

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à Aix-Marseille Université

Le 24 septembre 2021 par

Marc Garel

Méthodes, procédures et techniques hyperbares pour l'étude des microorganismes du milieu profond en condition *in situ*

Discipline

Science de l'environnement

Spécialité

Océanographie

École doctorale

Science de l'environnement/ED 251

Laboratoire/Partenaires de recherche

Institut Méditerranéen d'Océanologie

Composition du jury

Ingrid Obernosterer Rapporteur
(Directrice de Recherche, LOMIC)

Urania Christaki
(Professeure, ULCO)

Anaïs Cario
(Chargée de Recherche, ICMCB)

Philippe Cuny
(Professeur AMU,MIO) Examineur

Christian Tamburini Directeur de thèse
(Directeur de Recherche, MIO)

Affidavit

Je soussigné, Marc Garel, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Christian Tamburini, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte d'Aix-Marseille Université relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille , le 16 juillet 2021



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la [Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Production scientifique

Articles

Garel, M., Panagiotopoulos, C., Boutrif, M., Repeta, D., Sempéré, R., Santinelli, C., Charrière, B., Nerini, D., Poggiale, J.-C., Tamburini, C., 2021. Contrasting degradation rates of natural dissolved organic carbon by deep-sea prokaryotes under stratified water masses and deep-water convection conditions in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 231, 103932. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2021.103932>

Garel, M., Bonin, P., Martini, S., Guasco, S., Roumagnac, M., Bhairy, N., Armougom, F., Tamburini, C., 2019. Pressure-Retaining Sampler and High-Pressure Systems to Study Deep-Sea Microbes Under in situ Conditions. *Front. Microbiol.* 10, 453. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00453>

Tamburini, C., Garel, M., Barani, A., Boeuf, D., Bonin, P., Bhairy, N., Guasco, S., Jacquet, S., Le Moigne, F.A.C., Panagiotopoulos, C., Riou, V., Veloso, S., Santinelli, C., Armougom, F., submitted. Increasing hydrostatic pressure impacts the prokaryotic diversity during *Emiliana huxleyi* aggregates biodegradation. *MDPI Water* 1–18.

Congrès

Congrès Ocean Science Meeting, Oral (2020)

Garel, M., Bonin, P., Martini, S., Guasco, S., Roumagnac, M., Bhairy, N., Armougom, F., Tamburini, C. (2020) Pressure-Retaining Sampler and High-Pressure Systems to Study Deep-Sea Microbes Under In Situ Conditions

Congrès IMBER Future Oceans 2, Poster (2019)

M. Garel, F.A.C. Le Moigne, C. Baumas, F. Armougom, V. Riou, S. Guasco, N. Bhairy, C. Santinelli, A. Belcher, R. Lampitt, C. Tamburini. Heterotrophic prokaryotic activity and structure in the water column vs fast sinking particles.

Forum des Hautes Pressions, Oral (2018)

M. Garel and C. Tamburini Deep-sea microbial oceanography: a complete high-pressure facility to study microbes under in situ conditions

Application Web

Garel, M., Izard, L., Vienne, M., Nerini, D., Tamburini, C., Martini, S. (2021). R-shiny-microorganisms v2 : A ready-to-use logistic regression implemented in R shiny to estimate growth parameters of microorganisms [Data set]. MIO UMR 7294 CNRS. <https://doi.org/10.34930/DC1DAF1C-09E3-4829-8878-91D0BF0E643E>

Remerciements

Ce manuscrit de thèse est pour moi l'occasion de remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, mais également toutes les personnes, qui depuis, mon entrée au CNRS en 2006 me soutiennent ou m'ont soutenu. Je profite de ce manuscrit pour les remercier.

En premier lieu, je remercie les membres du jury Urania Christaki, Ingrid Obernosterer, Anaïs Cario et Phillipe Cuny d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèses.

Je tiens à remercier Richard Sempéré (Directeur du MIO), Patricia Bonin et Alain Dolla (Responsables de l'équipe MEB) pour m'avoir encouragé à réaliser ce travail de thèse.

Ces travaux de thèse ainsi que mon activité depuis 17 ans n'auraient jamais pu exister sans Jean Garcin. Jean est l'un des « pères » de la technologie hyperbare ainsi que de la thématique du milieu profond. J'ai eu le privilège de vous rencontrer et de vous côtoyer en 2005 lors de mon tout premier stage au LMGEM. Vous m'aviez ouvert les portes de votre atelier et enseigné avec beaucoup de patience et de bienveillance vos petits secrets sur cette technologie si particulière. Jean, un grand merci pour votre immense gentillesse et votre enthousiasme durant toutes ces années.

La deuxième personne qui a le plus influencé ma carrière et particulièrement le choix de cette thématique est Christian Tamburini. Cela fait 17 ans que nous travaillons ensemble (je sais cela ne nous rajeunit pas !), tu as su me transmettre ta passion, ton goût pour l'aventure avec le matériel hyperbare. Je te remercie également pour ton amitié et la confiance que tu m'accordes au quotidien.

Ces travaux de thèses ont pu être menés grâce à la participation à deux missions océanographiques : la mission Peacetime et la mission PAP DY032.

Je remercie Cécile Guieu et Karine Desboeufs pour m'avoir permis de réaliser la mission Peacetime. Cette campagne m'a permis de publier mon tout premier article en premier auteur. Cécile, Karine merci également pour cette expérience inoubliable à bord du PP.

Je ne peux pas citer cette mission sans également remercier le reste du « crew science » et particulièrement Estelle Bigeard, Céline Ridame, Fred Gazeau, Julia Uitz, Mathieu Bressac, Thibaut Wagener, Fabrizio D'ortenzio, Vincent Taillandier, Nagibus, DOM, Soso, Guillaume pour tous les bons moments passés lors de cette mission. Mais je n'oublie pas les marins qui étaient de quart la nuit avec nous Nico, Fred, Juliette.

Concerning DY032, i would like to thank Richard Lampitt for giving me the opportunity to participate in the PAP cruise. I would like special thanks to the « cooker teams » Mark and Amy and the steward Jeffrey for pleasant discussion during the cruise.

Cette thèse n'aurait pas pu se réaliser sans le soutien indéfectible de la MIO Dream Team, JC, Philou, Dave, GG, Christian, Vincent, Dom. Merci pour votre amitié et toutes ces réunions au BS...

Jean-Christophe, David, Philippe, Valérie j'ai eu l'immense privilège de vous avoir comme professeur lors de mon cursus universitaire, votre engagement et votre passion ont été un véritable exemple que j'essaie de transmettre à mon tour. Merci !

Vorrei ringraziare Chiara Santinelli per tutte le discussioni che abbiamo avuto per la scrittura dell'articolo sulla degradazione della materia organica ad alto peso molecolare. Chiara, grazie per il tuo entusiasmo e i tuoi consigli. Spero che avremo ancora l'opportunità di lavorare insieme.

Toutes ces années, et pas seulement que mes années de thèses, ont été parsemées de rencontres lors des stages que j'ai pu encadrer. Certains de ces étudiants m'ont particulièrement marqué par leur enthousiasme, leur énergie, leur passion. Chloé Pupier, Emilie Pasero, Lisa Tanet, Chloé Baumas, Marthe Vienne merci d'être passées par la MIO HP team pour vos stages en BTS, Licence, Master...

Je n'oublie évidemment pas Séverine, avec qui j'ai le grand bonheur de collaborer depuis de nombreuses années. Tu es la première étudiante que j'ai encadré, à être devenue chercheuse, Ça met un coup de vieux, mais c'est génial. Merci à toi Séverine également pour ton enthousiasme au quotidien.

Sam, Anaïs, notre rencontre lors du forum des hautes pressions a été véritable tournant dans ma réflexion sur les développements technologiques liés à la haute pression. Cela a été également un point de départ dans la création d'une microcommunauté « HP-microbio » particulièrement avec le dépôt de projets de cette année.

Merci également à l'équipe d'étudiantes de thèse et post-doc du Pacifique Nord Caro, Fatima-Ezzahra, Marie-Maëlle, Chloé, Maud, Cathy (WR), Marion, qui contribuent à la bonne ambiance du coin café...

Adiu nine !!! Merci à toi Bruno, tu es l'une des personnes qui m'accueille au laboratoire avec beaucoup d'enthousiasme, merci pour ton amitié depuis toutes ces années.

Fabrice, tu es l'une des personnes qui a joué également un rôle central dans cette thèse. Tu m'as initié à l'analyse de donnée du métabarcoding et par la suite tu m'as embarqué dans l'animation de cette même formation. Un grand merci pour tout, mais surtout pour ta confiance, ton amitié et ton soutien lors des concours.

Cathy et Marc merci pour votre amitié et votre soutien au quotidien.

Merci France pour toutes ces années de conseils et de soutien avec énormément de bienveillance, particulièrement pour la gestion de la plateforme de Radioactivité.

Je remercie également Laurie, Nono, Corinne, Léa, Sophie, Yannick CB, Cécile et Marie pour votre implication à mes côtés durant toutes ces années. Merci également à toi Domie (D. Estival) pour ton aide chaque année lors de ma réinscription en thèse.

Je remercie également mon frère Vincent Garel, qui a eu la gentillesse de mettre à contribution sa créativité pour réaliser quelques infographies de ce manuscrit.

Enfin, ce travail de thèse n'aurait pas pu se faire le soutien sans faille de ma famille, particulièrement ma femme Emmanuelle, et mes deux filles Clémence et Joséphine, qui m'épaulent depuis tant d'années, qui ont accepté que je sacrifie quelques vacances et week-ends pour ce projet. C'est à vous que je dédie ce travail.

Enfin, je remercie de nouveau Emmanuelle pour toutes les corrections orthographiques, grammaticales et syntaxiques, et croyez-moi il y en avait....

Résumé

L'océan est en grande partie profond, la majorité de son volume (> 80 %) se situant à une profondeur supérieure à 1000 m, et est peu échantillonné (< 0,01 %). Il est caractérisé par une pression hydrostatique élevée, une température basse, des nutriments inorganiques élevés et de faibles concentrations de carbone organique. L'apport de matière et énergie est principalement issu de la production primaire en surface sous forme de matière organique particulaire et dissoute puis exporté vers le fond des océans par différentes voies d'export et de transfert. Les fractions particulaire et dissoute biodisponibles sont principalement consommées dans les eaux de surface par les procaryotes, et ne laissant qu'une fraction dite réfractaire, plus complexe à dégrader comme seule source de carbone pour les procaryotes de l'océan profond (zone bathypélagique). La plupart des mesures d'activités métaboliques et de diversité des procaryotes bathypélagiques sont généralement sous-estimées en raison des limitations technologiques pour récupérer les échantillons et les maintenir dans des conditions environnementales *in situ* (pression hydrostatique élevée, température, *etc.*). Pour étudier les procaryotes dans les conditions *in situ*, nous disposons d'une technologie hyperbare pour collecter, transférer et incuber des échantillons dans des conditions *in situ* (pression hydrostatique et température élevées) qui est maintenant commercialisée et disponible pour la communauté scientifique. En utilisant la versatilité de nos équipements, nous pouvons également simuler l'augmentation de la pression hydrostatique le long de la colonne d'eau. Les résultats mettent en lumière qu'en maintenant les conditions de pression, il est possible d'échantillonner des microorganismes piezophiles (avec une affinité pour la vie sous pression) représentatif du milieu profond. Ces résultats ont été confirmés lors d'une expérimentation sur la dégradation de matière organique dissoute de haut poids moléculaire par une communauté adaptée au milieu profond. Enfin, nous avons également montré l'importance des conditions environnementales pour étudier le devenir de la matière organique dans la colonne d'eau.

Mots-clés : océan profond, haute pression, procaryotes, diversité, activité microbienne, échantillonnage *in situ*

Abstract

The ocean is mostly deep, with most of its volume (>80%) at depths greater than 1000 m, and is poorly sampled (<0.01%). It is characterized by high hydrostatic pressure, low temperature, high inorganic nutrients and low organic carbon concentrations. The input of matter and energy is mainly driven from primary production at the surface in the form of particulate and dissolved organic matter and then exported to the seafloor through various export and transfer routes. The bioavailable particulate and dissolved fractions are mainly consumed in surface waters by prokaryotes, leaving only a fraction called refractory, more complex to degrade as the only source of carbon for prokaryotes in the deep ocean (bathypelagic zone). Most metabolic activity and diversity measurements of bathypelagic prokaryotes are generally underestimated due to technological limitations in recovering samples and maintaining them under *in situ* environmental conditions (high hydrostatic pressure, temperature, *etc.*). To study prokaryotes under *in situ* conditions, we have a hyperbaric technology to collect, transfer, and incubate samples under *in situ* conditions (high hydrostatic pressure and temperature) that is now commercialized and available to the scientific community. Using the versatility of our equipment, we can also simulate the increase of hydrostatic pressure along the water column. The results highlight that by maintaining pressure conditions, it is possible to sample piezophilic microorganisms (with an affinity to live under high hydrostatic pressure) representative of the deep environment. These results were confirmed in an experiment on the degradation of high molecular weight dissolved organic matter by a community adapted to the deep-sea environment. Finally, we have also shown the importance of environmental conditions to study the fate of organic matter in the water column.

Keywords: deep ocean, high pressure, prokaryotes, diversity, microbial activity, *in situ* sampling

"Il faut se méfier des ingénieurs, ça commence par la machine à coudre, ça finit par la bombe atomique."

Critique des critiques | M Pagnol

"Quand tu vas commencer à mesurer le fond de la mer, fais bien attention de ne pas trop te pencher, et de ne pas tomber par-dessus bord et là où ça sera trop profond, laisse un peu mesurer les autres."

Fanny | M Pagnol

Table des matières

1	<i>Introduction : État de L'art et objectifs de l'étude.....</i>	1
1.1	Généralité et bref historique sur les évolutions technologiques	1
1.1.1	Propriétés physico-chimiques et biogéochimiques du domaine océanique profond.....	1
1.1.2	Intérêt pour le milieu profond : un bref historique.	4
1.2	Les Procaryotes du milieu profond.....	8
1.2.1	Diversité des procaryotes du domaine océanique profond	8
1.2.2	Relation entre les procaryotes et la matière organique.....	10
1.3	Sensibilité du milieu profond aux changements globaux.....	16
1.3.1	Le réchauffement des eaux profondes : un bref état des connaissances.....	16
1.3.2	Impact du réchauffement sur les microorganisme	17
1.4	Problématiques et objectifs de l'étude.....	20
2	<i>Effet de la pression hydrostatique sur la communauté microbienne</i>	23
2.1	Introduction	27
2.2	Materials and Methods.....	28
2.2.1	High-Pressure Bottles (HPBs)	28
2.2.2	High-pressure sampler unit (HPSU).....	30
2.2.3	High-pressure sampling.....	32
2.2.4	Transfer and subsampling in equi-pressure mode.....	32
2.2.5	Piloted pressure generator	33
2.2.6	Protocol to transfer and subsample under equi-pressure mode.....	33
2.2.7	Example of field application	35
2.2.8	16S rDNA/rRNA sequences analysis	38
2.3	Results and discussion	39
2.3.1	Prokaryotic activity measurements.....	39
2.3.2	Prokaryotic Diversity and Community Structure (16S rDNA and rRNA)	40
2.4	Conclusion and perspectives	44
2.5	Supplementary Information.....	46
2.6	Données complémentaires	52
2.6.1	Préambule	52
2.6.2	Synthèse des résultats	54

3 *Dégradation du carbone organique dissous par les communautés procaryotiques profondes durant des conditions hydrologiques contrastées..... 62*

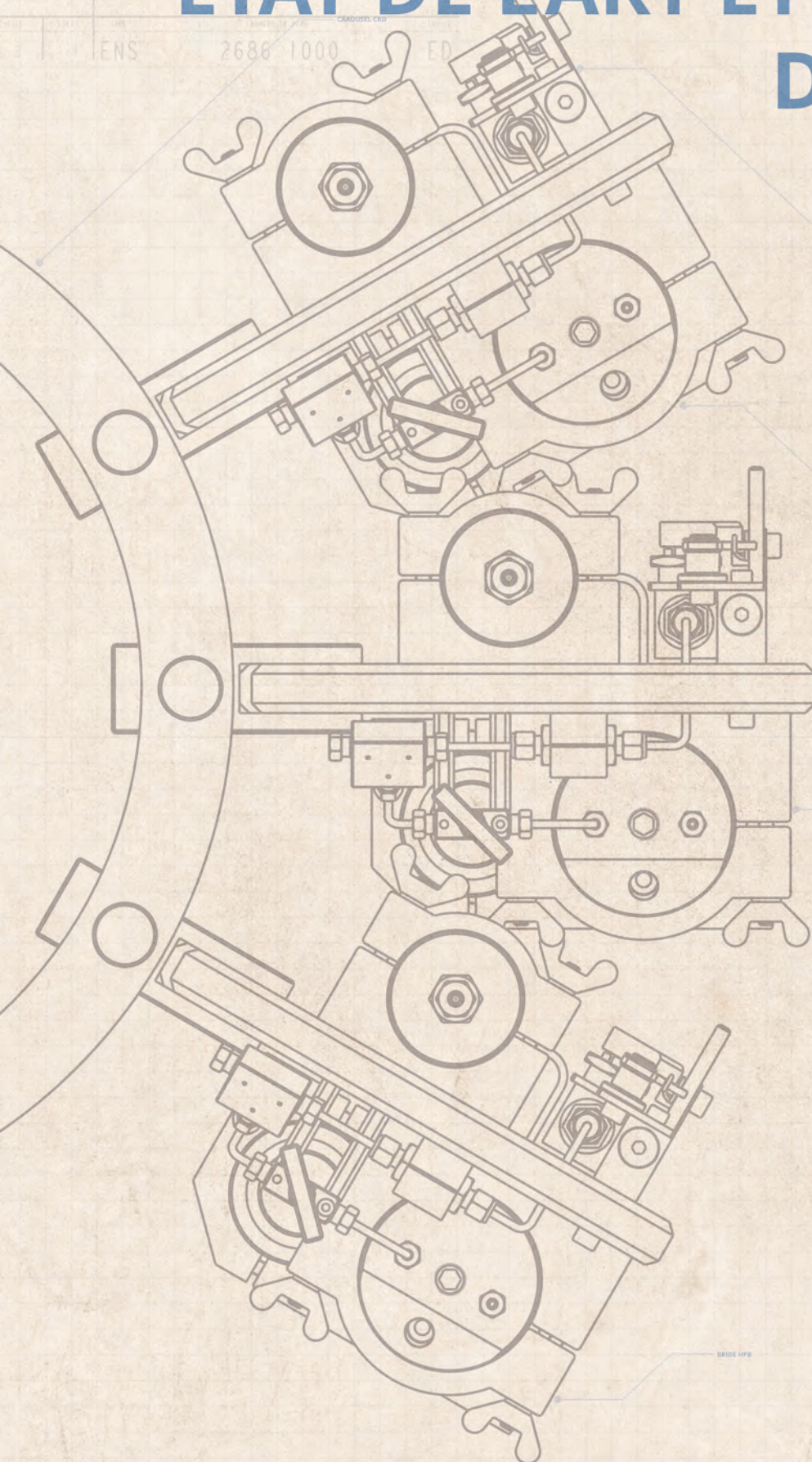
3.1	Introduction	66
3.2	Materials and methods.....	69
3.2.1	Recovering and preparation of HMW-DOC	69
3.2.2	Study site and hydrological conditions.....	69
3.2.3	Sampling.....	70
3.2.4	Incubation experiments.....	70
3.2.5	DOC measurements	73
3.2.6	Dissolved combined neutral sugars (DCNS) determination.....	73
3.2.7	Prokaryotic abundance	74
3.2.8	Dynamics of DOC and prokaryotes adjusted to a Droop Model	74
3.2.9	Statistical methods.....	76
3.3	Results.....	76
3.3.1	Bulk and molecular composition characteristics of HMW-DOC throughout the experiment.....	76
3.3.2	DOC degradation and prokaryotic biomass	80
3.4	Discussion.....	82
3.4.1	HMW-DOC compositional changes during degradation	82
3.4.2	Prokaryotic degradation of DOC in stratified period condition	82
3.4.3	Prokaryotic degradation of DOC in deep-water convection period condition.....	85
3.4.4	DOC degradation in stratified versus deep-water convection period conditions	86
3.5	Conclusion and perspectives	88

4 *Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggregats de *Emilinia huxleyi*..... 89*

4.1	Introduction	93
4.2	Methods.....	96
4.2.1	SINKing PArticles Simulation experiments (SINPAS experiments)	96
4.2.2	Biogeochemical analyses	98
4.2.3	16S rRNA extraction, PCR amplification and sequencing	99
4.2.4	Analysis of the 16S rRNA-based community	99
4.3	Results and discussion	102
4.3.1	Biogeochemistry of <i>E. huxleyi</i> particles in sinking particle simulation experiments.....	102

4.3.2	Biological activity associated with <i>E. huxleyi</i> particles in sinking particles simulation experiments.....	107
4.3.3	Effect of the increasing pressure on the active prokaryotic communities experiments	108
4.3.4	Factors driving the active prokaryotic communities	112
4.4	Conclusion	116
5	<i>Conclusions et perspectives.....</i>	117
5.1	Conclusions.....	117
5.1.1	Méthodes, procédures et technologies pour étudier les communautés profondes.....	117
5.1.2	Impact de la méthodologie pour étudier la dégradation des particules chutant dans la colonne d'eau.....	119
5.2	Perspectives	121
5.2.1	Quelques applications de la microfluidique à pression atmosphérique	122
5.2.2	La microfluidique et la haute pression, vers des séquenceurs autonomes in situ	126
6	<i>Travaux complémentaires.....</i>	128
6.1	Préambule.....	128
6.2	Application logistic_microbio.....	130
6.2.1	Pourquoi ce travail ?	130
6.2.2	La méthode	131
6.2.3	Les résultats.....	138
6.2.4	Conclusion.....	143
7	<i>Bibliographie.....</i>	144
8	<i>Liste des figures.....</i>	180
9	<i>Liste des tableaux.....</i>	185

INTRODUCTION : ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

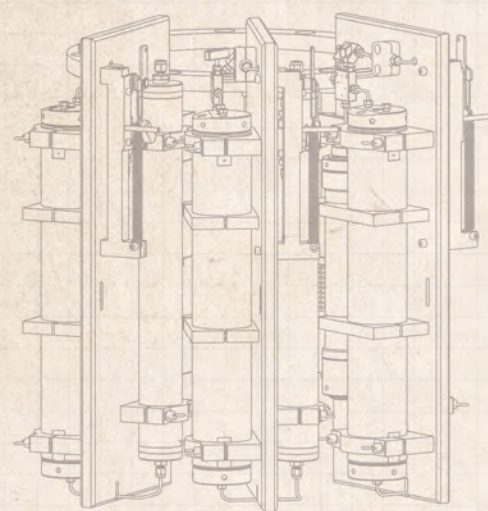


VANNE DE PRÉLÈVEMENT & DE TOUW

BRIDE HPB

PLATEAU DE PRÉLÈVEMENT

BRIDE HPB



PRO	LIBRELL	NOV	DATE
MODIFICATIONS			
CE DOCUMENT EST LA PROPRIÉTÉ DE TOP INDUSTRIE ET NE PEUT ÊTRE MODIFIÉ, REPRODUIT OU COMMUNIQUÉ SANS SON AUTORISATION			
DESIGNER	PAR	DATE	09/03/2016
VERIFIÉ PAR	CAJACQUES		
TOP INDUSTRIE			
APERÇU SUR CAROUSEL			
A2			
ENS 2686 1000			
FD			

1 INTRODUCTION : ÉTAT DE L'ART ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

1.1 GENERALITE ET BREF HISTORIQUE SUR LES EVOLUTIONS TECHNOLOGIQUES

1.1.1 PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES ET BIOGEOCHIMIQUES DU DOMAINE OCEANIQUE PROFOND.

L'hydrosphère représente $1.38 \times 10^{18} \text{ m}^3$ soit 71 % de notre planète. Plus de 70 % de l'océan sont en dessous de 1200 m (soit 12 MPa de pression hydrostatique¹) et 50 % sont en dessous de 3000 m de profondeur (soit 30 MPa). La profondeur moyenne des océans est de 3690 m et la profondeur maximum de 11000 m soit 110 MPa (Tableau 1-1). L'océan est divisé verticalement en différentes zones : la zone épipélagique (de 0 à 200 m, zone éclairée siège de la production primaire), la zone mésopélagique (de 200 à 1000 m, c'est de début de la zone obscure), la zone bathypélagique (de 1000 à 4000m) et la zone abyssopélagique ou hadale (>4000m). Bien qu'étant le plus large écosystème sur terre, l'océan profond (> 1000m) reste mal connu avec seulement 5 % exploré et 0.01 % échantillonné et étudié en détail ([Ramirez-Llodra et al., 2010](#)). L'océan profond est principalement caractérisé par une forte pression hydrostatique, une faible température, entre 2 et 4°C (à l'exception des sources hydrothermales profondes avec des températures dépassant les 300 °C et certaines mers comme la mer Méditerranée avec des températures comprises entre 11 et 13°C), l'absence de lumière, et une faible concentration en matière organique biodisponible ([Bartlett, 1999](#); [Robison, 2004](#); [Tamburini, 2006](#); [Lauro and Bartlett, 2008](#)).

Tableau 1-1 Volume et profondeurs des océans selon Sarmiento and Gruber (2013)

Acronyme	Valeurs	Unité	Description
Volume	1.38×10^{18}	m^3	Volume total des océans
Vol. Océan Profond	9.44×10^{17}	m^3	Volume de l'océan > 1200m
Profondeur	3690	m	Profondeur moyenne des océans
Profondeur	11000	m	Profondeur max. des océans

¹ Selon le système international, la pression est estimée en Pascal (Pa). La pression hydrostatique augmente de $1.01 \times 10^5 \text{ Pa} = 1 \text{ bar}$ tous les 10m de profondeur.

En dehors des « *oasis profondes* » que représentent les sources hydrothermales profondes, les ressources en matière organique biodisponible « carbonées » sont principalement issues de la zone euphotique où le dioxyde carbone et les nutriments inorganiques sont convertis par le biais de la photosynthèse en carbone organique particulaire (POC) et dissous (DOC). Selon [Arístegui et al., \(2009, 2005\)](#) 90% du POC produit dans la zone épipélagique et exporté vers le fond serait reminéralisé dans la partie supérieure de la zone mésopélagique et donc n'atteindrait pas les profondeurs en dessous de 1000m. Par conséquent le DOC constitue donc, la principale source de carbone dans la zone bathypélagique ([Arístegui et al., 2009](#)). Le DOC est divisé en plusieurs réservoirs en fonction de sa réactivité (biodisponibilité) : DOC labile qui est la ressource principale de la boucle microbienne en zone épipélagique, il n'est pas accumulé (turnover compris entre l'heure et la journée). Le domaine profond, quant à lui, est caractérisé par des fractions de DOC plus récalcitrantes comme le DOC semi-labile (SLDOC, temps de vie ~1.5 ans), le DOC semi-réfractaire (SRDOC, temps de vie ~20 ans), le DOC réfractaire (RDOC, temps de vie = 16000 ans), et le DOC ultra-réfractaire (URDOC, temps de vie = plusieurs dizaines de millénaires) ([Carlson and Hansell, 2014](#); [Santinelli, 2014](#); Tableau 1-2). Ces auteurs ont défini un diagramme conceptuel sur la répartition de ces fractions le long de la colonne d'eau pour des conditions oligotrophiques selon [Hansell \(2013\)](#)(Figure 1-1A) et en Mer Méditerranée (Figure 1-1B et C) [Santinelli \(2014\)](#). Étant donné que les chapitres 0 et 3 portent exclusivement sur la Méditerranée c'est sur les figures Figure 1-1B et C que je vais un peu plus détailler la répartition de ces fractions du DOC.

Chapitre 1

Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

Tableau 1-2 Tableau des caractéristiques du carbone organique dissous : labile, semi-labile, semi-réfractaire, réfractaire et ultra-réfractaire dans l'Océan. DCAA : dissolved combined amino-acid ; DCNS : dissolved combined neutral sugar ; APS : acyl heteropolysaccharides ; modifié d'après Nagata, (2008).

Fraction	Concentration (μM)	Temps de résidence	Fonction	Identité chimique
Labile	<1	< Heures-Jours	Utilisé pour la production hétéotrophique	Acides aminés dissous, sucres libres, protéines dissoutes
Semi Labile	~ 10-30	Mois-années	Exportée	DCAA, DCNS, APS
Semi Réfractaire	~10	>années-centaines d'années	Stockage	NA
Réfractaire	40	Millénaire	Stockage	NA
Ultra Réfractaires	<10	>10000 ans	Stockage	« Black carbon »

La Figure 1-1 montre que le domaine océanique profond, que cela soit en Méditerranée ou en Atlantique, est composé essentiellement par du DOC réfractaire (RDOC, en moyenne de l'ordre de 40 μM) et semi-réfractaire (en moyenne de l'ordre de 10 μM) (Hansell and Carlson, 2015; Santinelli, 2015). Par ailleurs, en Méditerranée (Mer Adriatique), il est possible de retrouver jusqu'à 10 μM C de SLDOC en dessous de 800 m. Ce SLDOC, plus réactif, est transporté en profondeur, lors du mélange hivernal qui peut persister plusieurs semaines, et constitue ainsi une source significative pour les activités métaboliques profondes (taux de minéralisation du DOC en profondeur compris entre 2.2 et 14.4 μM C an^{-1})(Figure 1-1.C) (Santinelli et al., 2010).

L'océan profond est également le plus important réservoir de carbone inorganique, contenant plus de 98% du carbone inorganique dissous global (Gruber et al., 2004).

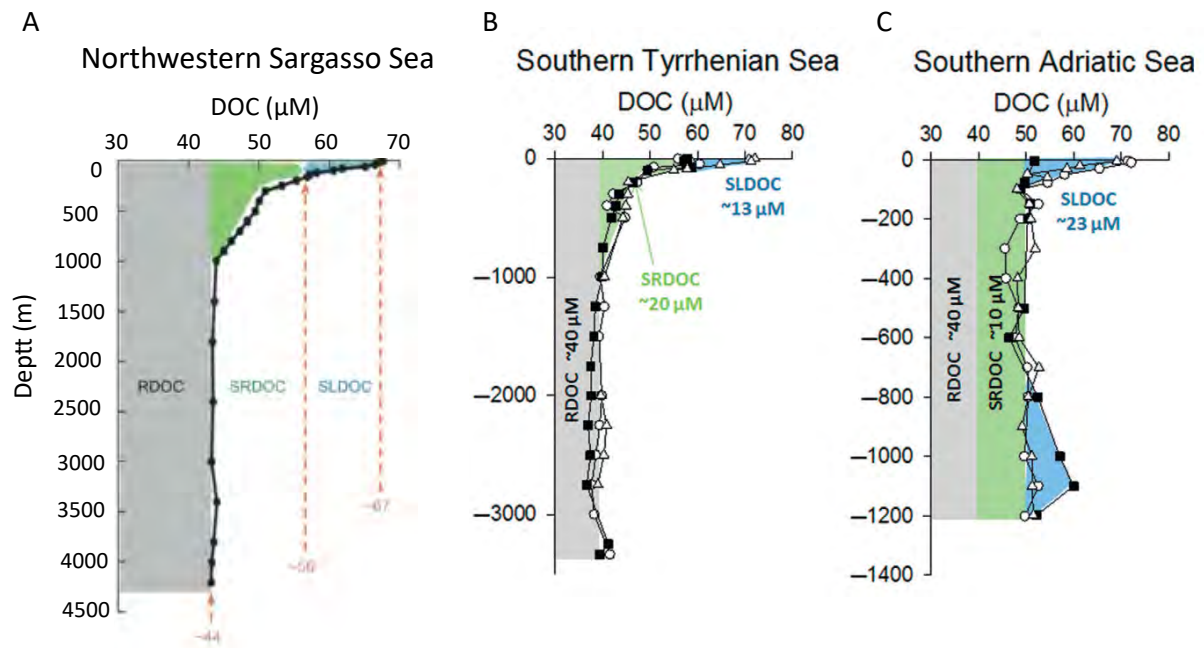


Figure 1-Distribution des différentes fractions de DOC dans la colonne d'eau est définie en fonction de leur réactivité dans une région de l'océan Atlantique et des régions de la mer Méditerranée. A) Distribution verticale des stocks de RDOC, SRDOC, et SLDOC et estimation de la concentration de DOC pour chaque fraction dans des eaux oligotrophiques stratifiées du Nord-Ouest de la mer des Sargasse. B) Dans les eaux sud de la mer Tyrrhénienne (Novembre 2006, Janvier 2009, Août 2010) de la C) dans les eaux de la mer Adriatique (Novembre 2006, Février 2008 et Juin 2008) période. SLDOC, semi-labile DOC; SRDOC, semi-refractory DOC; RDOC, refractory DOC (Hansell, 2013; Santinelli, 2015).

1.1.2 INTERET POUR LE MILIEU PROFOND : UN BREF HISTORIQUE.

L'étude du milieu profond a débuté au début du 19^{ème} siècle avec la découverte d'une espèce d'ophiure *Gorgonocephalus caputmedusae* par Sir John Ross durant une campagne de dragage. Cette découverte a été cachée et durant une autre campagne de dragage en mer Égée entre 1841 et 1842, Edward Forbes constate une diminution du nombre d'espèces avec la profondeur et conclut qu'après 600 m il n'y a plus de vie. C'est le début de la « Azoic Theory ». Cette théorie fait alors débat. De nombreuses expéditions sont organisées montrant l'évidence de la vie dans les profondeurs. C'est particulièrement à partir de l'expédition *Challenger* organisée entre 1872 et 1876 par C. W. Thomson pour étudier la physique, la chimie et la biologie du milieu profond que de nombreux efforts seront déployés pour étudier ce milieu. Les études qui suivirent furent principalement concentrées sur les macroorganismes (pour plus de détails voir les références dans Ramirez-Llodra et al., 2010).

La microbiologie du domaine océanique profond, et particulièrement l'effet de la pression hydrostatique, a débuté à peine au milieu du 20^{ième} siècle par les travaux du pionnier Claude ZoBell (Figure 1-2A, [ZoBell and Morita, 1959](#)). Des espèces de bactéries marines ont été inoculées dans des milieux de culture puis contraintes à différentes pressions hydrostatiques. Les conclusions de cette étude ont montré que certaines bactéries marines se développaient mieux à forte pression hydrostatique qu'à pression atmosphérique constituant la définition du terme "barophile" ([ZoBell and Johnson, 1949](#)). Ce terme, du grec poids 'baro' proposé par ZoBell sera remplacé par la suite par celui de "piézophile" proposé par Aristide Yayanos en 1995, en référence à 'piezo' du grec pression ([Yayanos, 1995](#)). À partir des années 1970, les développements technologiques se sont concentrés sur la capacité à prélever des échantillons en maintenant les conditions environnementales ([Jannasch et al., 1971, 1973; Jannasch and Wirsén, 1977, 1982](#)). C'est l'équipe de Holger W. Jannasch qui est pionnière dans le domaine de prélèvements à grande profondeur en proposant un système de prélèvement mis en œuvre à partir du sous-marin Alvin, déposé sur les sédiments (Figure 1-2B). Puis, au début des années 1980 suivirent les travaux de Tabor et collaborateurs qui ont proposé également un système de prélèvement de 400 mL d'échantillon, en maintenant les conditions *in situ* de pression hydrostatique et pouvant être déployé à l'aide d'un treuil hydraulique, disponible sur la plupart des navires océanographiques ([Tabor and Colwell, 1976; Tabor et al., 1981](#); Figure 1-2C). Par la suite, vingt ans après les travaux de Jannasch et collaborateurs, un laboratoire français mené par Bianchi et collaborateurs proposent un nouveau système de prélèvement, utilisant également un treuil hydrologique, d'un volume de 5 L permettant de multiplier les expérimentations et les répliquats ([Bianchi and Garcin, 1993, 1994; Tholosan et al., 1999](#)). Ce système lourd laissera place à un système plus compact permettant de prélever plusieurs échantillons, en maintenant les conditions de pression hydrostatique. C'est le système HPSS pour « High pressure serial sampler » qui se met en œuvre avec un carrousel-CTD Sea-Bird® ([Bianchi et al., 1999](#); Figure 1-2D). Les avantages principaux de ce système sont : i) la possibilité d'avoir plusieurs échantillons profonds, de 500 mL chacun, ii) la capacité de s'adapter à un carrousel-CTD Sea-Bird® présent également sur la plupart des navires océanographiques. En effet, chaque bouteille haute pression (HPBs) de 500 mL est montée sur une plaque de polypropylène puis installée sur un carrousel-CTD Sea-Bird® pour prélever jusqu'à une profondeur maximale de 3500 m. Le système HPSS a contribué à près de 150 couples

Chapitre 1

Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

d'échantillons maintenus dans les conditions environnementales à la pression *in situ* versus décomprimés sur les 250 cités dans la revue [Tamburini et al. \(2013a\)](#). C'est à partir de ce système que j'ai apporté des modifications telle qu'une simplification du mécanisme de la vanne prélèvement, un capteur de pression autonome, un hublot en saphir dans l'obturateur supérieur pour la mesure en ligne de la concentration en oxygène, et la mise en place de procédures dédiées au transfert d'échantillons en équipression. Ces mises à jour permettent maintenant de prélever jusqu'à 6000 m (précédemment jusqu'à 4000m de profondeur) en maintenant les conditions environnementales de pression (Figure 1-2E) et sont décrites dans [Garel et al. \(2019\)](#) et dans ce manuscrit au chapitre suivant (chapitre 2). Le système complet était assemblé au laboratoire à partir de différents fournisseurs (HPB, capteurs de pression, support en polypropylène, connexions et fluidiques hyperbares). J'ai donc mené un transfert de savoir-faire vers une société, Top Industrie (SAS, France) pour la commercialisation du système, pour en permettre l'accès à la communauté scientifique. À ce jour, ce nouveau système a été acquis par différents laboratoires internationaux : Deep Carbon Observatory, DCO—Sloan Foundation; Hadal Science and Technology Research Center, HAST, Shanghai, China; Sanya Institute of Deep Sea Science and Engineering, SIDSSE, China Academy of Science ; IFREMER Brest (pour le prélèvement de fluides hydrothermaux en maintenant les conditions environnementales).

L'engouement pour le milieu profond ne cesse de croître ces dernières années, d'autres développements technologiques ont vu le jour, comme le système de prélèvements de fluides hydrothermaux développé par [McNichol et al. \(2016, Figure 1-2G\)](#), les différents appareils développés par le JAMSTEC au Japon ([Kim and Kato, 2010](#)), ou bien l'échantillonneur développé par l'équipe de Douglas Bartlett au SCRIPPS (USA) permettant d'échantillonner jusqu'à 10000 m de profondeur ([Peoples et al., 2019, Figure 1-2F](#)).

Chapitre 1
Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

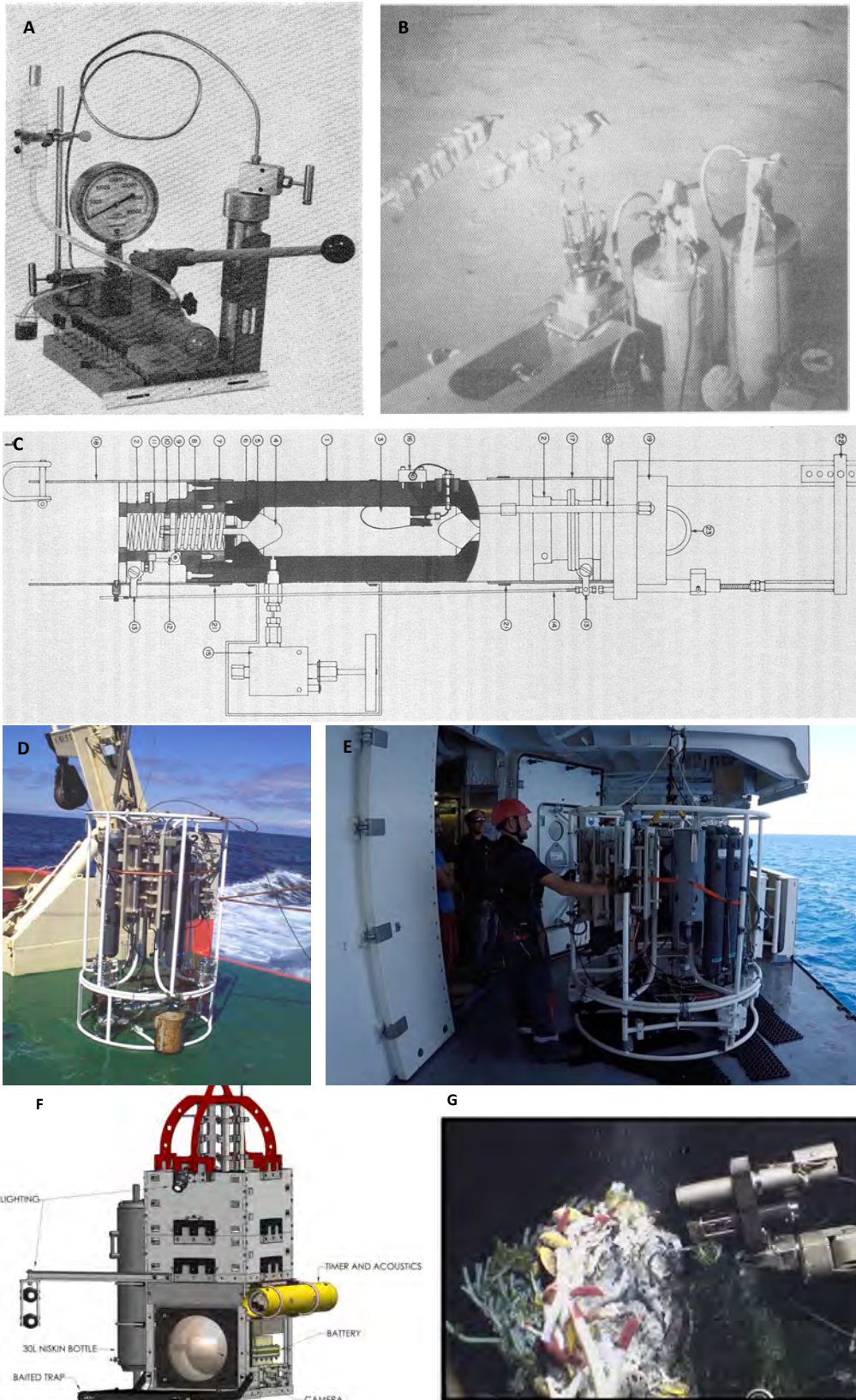


Figure 1-2 Panel non exhaustif de photographies ou schémas résumant 60 ans d'évolution technologique pour échantillonner le milieu profond en maintenant les conditions de pression *in situ*. 1) Photographie de l'autoclave hyperbare et pompe hydraulique manuelle utilisée par ZoBell et collaborateurs pour étudier l'impact de la pression hydrostatique sur les microorganismes marins (ZoBell and Morita, 1959); B) Système de prélèvement conservant les conditions environnementales de pression (Jannasch and Wirsén, 1973) ; C) Schéma du système de prélèvement isobare développé par Tabor et collaborateurs déployé à l'aide d'un treuil hydraulique (Tabor et al., 1981) ; D) Photographie du High Pressure Serial Sampler développé par Bianchi et al. (1999); E) HPSU monté sur un carrousel CTD Sea-Bird® durant la campagne PEACETIME décrit par Garel et al. (2019) dans le chapitre suivant, F) Schéma du Pressure Retaining Sampler et Lander développés par Peoples et al. (2019) pour étudier la diversité des microorganismes provenant des milieux très profonds, tel que la fosse des Mariannes, dans les conditions *in situ* ; G) Photographie de l'Isobaric Gas-Tight (IGT) sampler développé par McNichol et al. (2016) pour échantillonner les fluides provenant de sources hydrothermales en conservant les conditions de pression hydrostatique et d'anoxie.

1.2 LES PROCARYOTES DU MILIEU PROFOND

1.2.1 DIVERSITÉ DES PROCARYOTES DU DOMAINE Océanique PROFOND

Comme je le rappelle dans le paragraphe 1.1.1, la plus large fraction de l'océan est profonde, et contient 6.5×10^{28} cellules, soit 55 % des procaryotes du monde aquatique (Whitman et al., 1998; Bar-On et al., 2018) et abrite une très grande diversité de procaryotes différente des communautés de surface (DeLong et al., 2006; Sogin et al., 2006; Salazar et al., 2016). Cependant, très peu sont cultivables. La plupart des procaryotes isolés et cultivés, appartiennent principalement au domaine des Bacteria, sont Gram-négatives et anaérobiques facultatives. La majorité des Bacteria piézophiles sont regroupées dans les genres suivants : *Colwellia*, *Moritella*, *Photobacterium*, *Psychromonas* et *Shewanella* pour les γ -Proteobacteria et deux sulfato réductrices du genre *Desulfovibrio* (DeLong et al., 1987; Kato et al., 1995; Xu et al., 2003; Nogi et al., 2004; Khelaifia et al., 2011; Martini et al., 2013; Pradel et al., 2013). Alors que pour le domaine des Archaea, la plupart des organismes isolés proviennent des sources hydrothermales et appartiennent aux familles des *Thermococcaceae* abritant le genre de *Pyrococcus* (Erauso et al., 1993), *Methanocaldococcaceae* comme le genre *Methanocaldococcus* (Jones et al., 1983), la famille des *Methanococcaceae* abritant le genre *Methanococcus*, et la famille des *Archeoglobaceae* abritant l'espèce *Archeoglobus fulgidus* (Oliver et al., 2020). Une liste exhaustive a été dressée dans les revues écrites par Jebbar et al., (2015) et Cario et al., (2019). Ces microorganismes sont pour la majorité chimioorganotrophe et méthanogènes. En parallèle de cet effort d'isolement de souches piézophiles, l'essor de différents outils moléculaires (ex. PCR, hybridation *in situ*, clonage séquençage...) a permis de montrer au travers de différents travaux que les Bacteria dominaient les communautés procaryotiques (Venter et al., 2004; Delong et al., 2006), et que les Archaea pouvaient atteindre les mêmes

proportions que les Bacteria, notamment en profondeur (Karner et al., 2001; Reinthaler and Herndl, 2005; Tamburini et al., 2009a).

L'apport des nouvelles générations de séquençage (MiSeq Illumina, génomique, transcriptomique) a permis une réelle avancée dans l'étude des communautés microbiennes non cultivables en termes de biogéographie. A ce jour, l'état des connaissances sur la diversité des procaryotes du domaine bathypélagique est principalement dû à des études menées dans des zones spécifiques (voir les différentes références répertoriées dans les travaux de Salazar et al., 2016) et peu nombreuses en comparaison avec celles réalisées sur les communautés de surface. Le domaine bathypélagique a longtemps été considéré comme uniforme et la connectivité avec la surface réduite au mélange des masses d'eaux et à l'advection. Salazar et al. (2016) ont montré dans une étude réalisée durant les campagnes MALASPINA en échantillonnant sur tout le globe que (Figure 1-3) :

- i) Les phyla dominant dans le domaine bathypélagique sont les : *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Thaumarchaeota* et *Deltaproteobacteria*. Les *Archaea* ne représenteraient que 2.2% à 16.3% du total des procaryotes par rapport à ce qui avait été montré dans de précédentes études utilisant des techniques quantitatives (hybridation *in situ*) (Karner et al., 2001; DeLong, 2003) et seraient principalement représentées par les *Thaumarchaeota* et *Euryarchaeota* (1.7–14% vs 0.29–3.7%) comme décrit par (Herndl et al., 2005b; Teira et al., 2006b; Tamburini et al., 2009a).
- ii) Chaque communauté procaryotique des grands fonds échantillonnée dans l'étude de Salazar et al., (2016) est composée d'un ensemble d'espèces dominantes partagées avec le reste des stations dans des proportions variables, qui est à environ 42 % des OTU identifiés et d'un ensemble de taxons peu abondants et relativement spécifiques à l'échantillon (c'est-à-dire très peu partagés) comprenant une "biosphère rare" (Sogin et al., 2006; Pedrós-Alio, 2012) du pool global de procaryotes des grands fonds.
- iii) Les masses d'eaux sont les principales actrices de la distribution des communautés libres et attachées, comme cela a déjà été montré par Agogué et al. (2011). De plus, ces auteurs ont montré au travers d'analyse sur la bêta-diversité en utilisant la distance de Bray-Curtis (Figure 1-3) que les procaryotes attachés aux particules (obtenus après filtration séquentielle) étaient clustérisés par bassin océanique profond, alors que la

distribution des procaryotes libres serait plutôt, gouvernée par d'autres facteurs environnementaux tels que la température, la profondeur (c'est-à-dire la pression hydrostatique).

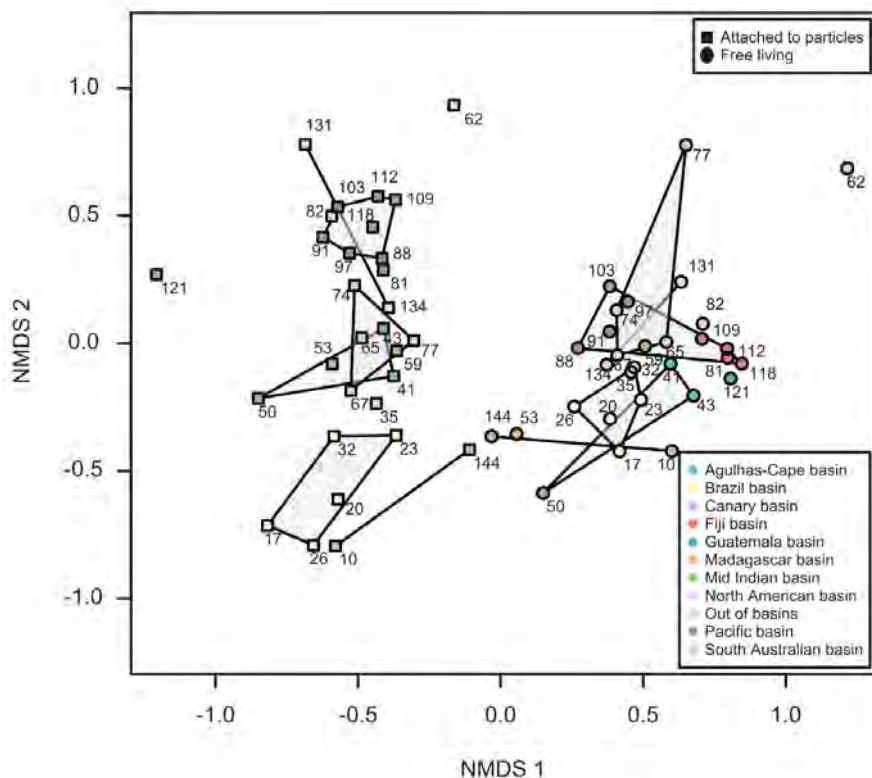


Figure 1-3 Analyse de la diversité bêta (distance de Bray-Curtis) à l'aide du NMDS (« non metric multidimensional scaling ») issue des échantillons de la campagne MALASPINA. La fraction de taille est codée avec le style de points (carrés, attachés et cercles, vivant en liberté) et les bassins océaniques profonds suivant des codes de couleur (voir légendes). Les nombres proches de chaque échantillon représentent le numéro de la station. A noter que les bactéries attachées aux particules ont été obtenues après filtration séquentielle d'après Salazar et al., (2016).

1.2.2 RELATION ENTRE LES PROCARYOTES ET LA MATIERE ORGANIQUE

Les procaryotes hétérotrophes, principaux acteurs du cycle du carbone dans l'océan global, i) consomment 10 à 50 % de la matière organique produite par la production primaire dans les eaux de surface (Azam et al., 1983), ii) sont responsables de la solubilisation des particules (Aristegui et al., 2009; Cho and Azam, 1988; Sempéré et al., 2000; Tamburini et al., 2009b) iii) produisent entre 0.008-0.023 Pg C an⁻¹ de DOC réfractaire à partir du DOC labile à travers différents processus comme la « Microbial Carbon Pump » (Tamburini et al., 2003; Jiao et al., 2010; Benner and Herndl, 2011; Fang et al., 2015), et enfin, iv) sont responsables de 20–33.3 Pg C yr⁻¹ minéralisés par respiration hétérotrophe en haute mer (del Giorgio et al., 1997;

[Arístegui, 2003](#)). Cependant, il existe encore des lacunes importantes dans la compréhension des processus métaboliques des procaryotes qui contrôlent la transformation et la dégradation de la matière organique dans l'ensemble de la colonne d'eau et plus particulièrement dans les eaux profondes.

Pour ces organismes adaptés à l'environnement profond, les seules sources d'énergie et de carbones connues sont issues de la surface des océans et transférées sous forme de DOC (0.2 PgC an^{-1} après 500 m ([Carlson et al., 2010](#)) et de POC ($0.7 \text{ Pg Gt de POC an}^{-1}$ après 2000 m, ([Henson et al., 2012](#)), vers le fond des océans par différentes voies d'export et de transfert. La pompe biologique de carbone et la pompe physique (solubilité), ainsi que la pompe à carbone organique dissous, sont les principaux moteurs du transfert descendant du carbone et jouent un rôle central dans la séquestration du dioxyde de carbone ([Boyd et al., 2019](#); [Dall'Olmo et al., 2016](#); [Hansell et al., 2009](#); [Levy et al., 2013](#); [Siegel et al., 2016](#)). Au sein de la pompe biologique de carbone, le dioxyde de carbone et les nutriments inorganiques sont convertis par photosynthèse en particules (POC) et en carbone organique dissous (DOC) dans la zone euphotique, et sont transférés vers les profondeurs de l'océan par divers mécanismes, notamment le flux particulaire (chute gravitationnelle des particules et de la neige marine ([Siegel et al., 2016](#)), la convection profonde hivernale, la subduction ([Arístegui et al., 2009](#); [Hansell, 2009](#); [Burd et al., 2010](#)), la fragmentation des gros agrégats en petites particules ([Briggs et al., 2020](#)) et la migration verticale du zooplancton et du micronecton avec libération de POC/DOC par exsudation et défécation ([Steinberg et al., 2000](#); [Hidaka et al., 2001](#); [Steinberg and Landry, 2017](#)). Récemment, [Boyd et al. \(2019\)](#) ont proposé le concept de "pompes à injection de particules" (PIP) à médiation physique et biologique : la pompe gravitationnelle biologique, la pompe à subduction par tourbillon, la pompe à couche mixte, la pompe mésopélagique et la pompe à lipides saisonnière. Ces PIP, dont l'importance varie dans le temps et dans l'espace au niveau de la colonne d'eau, pourraient transporter directement des stocks importants de particules biogènes (8.7 Pg C an^{-1}) en profondeur, d'une ampleur cumulative qui peut être équivalente au stockage de carbone de la pompe à carbone biologique (gravitationnelle). Ces nouveaux concepts pourraient aider à clôturer le bilan du carbone qui jusqu'à présent est déséquilibré dans les couches méso- et bathypélagique ([Arístegui et al., 2009](#); [Burd et al., 2010](#); [Santinelli et al., 2010, 2013](#); [Reinthal et al., 2013](#); [Tamburini et al., 2013a](#)).

Mais l'activité métabolique (production de biomasse et respiration) mesurée semble supérieure aux flux d'apport de matière organique qui chute le long de la colonne d'eau ([Burd et al., 2010](#); [Nagata et al., 2010](#); [Reinthal et al., 2013](#)). Plusieurs hypothèses ont été mises en avant comme une mauvaise estimation du flux de matière organique particulaire, l'existence d'une autre source de carbone comme le carbone inorganique dissous utilisé comme source d'énergie et de carbone (chemolithoautotrophie), ou encore une mauvaise estimation de l'activité métabolique due à des biais d'échantillonnages ([Burd et al., 2010](#)). Une étude récente de [Acinas et al., \(2021\)](#), issue des campagnes MALASPINA, dans laquelle 58 génomes ont été analysés de région tropicale et subtropicale, met en lumière des traits écologiques différents selon que les communautés de procaryotes soient libres ou attachées aux particules. En résumé, les communautés libres possèderaient des gènes impliqués dans l'oxydation du NH_4 et du CO . Les communautés attachées aux particules possèderaient des gènes impliqués dans la voie de la réduction dissimilatrice du NO_3^- en NH_4 (*i.e* nirB, NADH-dépendent nitrite réductase) dans 27% des échantillons, la sulfato-réduction (*i.e* aprA et B) dans 90% des échantillons et des gènes impliqués dans l'oxydation du H_2 dans 24% des échantillons. Ces études récentes, comme celle de [Salazar et al. \(2016\)](#) et [Acinas et al., \(2021\)](#), mettent en lumière la diversité spécifique et fonctionnelle des communautés de procaryotes libres et attachés aux particules de l'océan profond qui représentent une étape clé dans la compréhension du rôle des microorganismes dans les cycles biogéochimiques. Cependant, la grande majorité de ces résultats sont issus d'échantillons profonds obtenus à partir d'échantillons décomprimés, c'est-à-dire non maintenus aux conditions de pression hydrostatique *in situ*.

En réalité, lors de la remontée des échantillons la décompression provoque des changements physiologiques et métaboliques ([voir les références dans Tamburini et al., 2013a](#); [Edgcomb et al., 2016](#)), mais également un changement de la composition de la communauté procaryotique ([La Cono et al., 2015](#); [Garel et al., 2019](#)). De plus la revue de 2013 de [Tamburini et collaborateurs](#) a montré que les procaryotes du domaine océanique profond sont adaptés à la pression hydrostatique en recensant plus de 250 couples de mesures d'activités métaboliques effectuées dans les conditions *in situ* de pression et décomprimés. Ils ont montré l'impact des conditions environnementales (pression hydrostatique, température, stratification des eaux, flux particulaire et mélanges des eaux) sur les activités métaboliques.

Chapitre 1

Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

Les principales conclusions de cette revue sont qu'en fonction des conditions d'échantillonnages les activités métaboliques obtenues après décompression sont i) généralement sous-estimées dans le cas le plus classique de stratification des eaux ; ii) surestimées dans le cas de convection d'eau profonde, de fort flux particulières ou d'échantillons obtenus à l'interface eau-sédiments dû à un mélange de communautés allochtones (issus des masses océaniques supérieures) et autochtones (issues de la zone bathypélagique). Dans ces derniers cas de figure, une fois décomprimées, les communautés allochtones, souvent plus compétitrices sur les substrats, se retrouveraient majoritaires lors des expérimentations et biaiserait les mesures d'activités métaboliques. Il importe donc, dans la mesure du possible, de réaliser les mesures d'activités et de diversités *in situ* ou en maintenant les conditions *in situ*.

Ces communautés procaryotiques inféodées au domaine océanique profond ont des caractéristiques phénotypiques et génotypiques différentes des procaryotes provenant des eaux de surfaces. Depuis plus de 50 ans avec les premiers travaux de Claude ZoBell, il a été montré avec des souches modèles que les procaryotes dits piézophiles (qui ont une affinité avec la pression hydrostatique selon [Yayanos \(1995\)](#)) ont développé des adaptations physiologiques pour survivre dans les conditions de haute pression : i) modification de la composition lipidique de la membrane cellulaire par l'augmentation de l'insaturation des acides gras membranaires ([Bartlett, 2002](#); [Mangelsdorf et al., 2005](#)) ou des lipides de réserve ([Grossi et al., 2010](#)); ii) modification des protéines transmembranaires ([Qureshi et al., 1998](#); [Michoud and Jebbar, 2016](#)); iii) modification du taux de croissance ([ZoBell and Morita, 1959](#); [Martini et al., 2013](#)); iv) des protéines impliquées dans la division cellulaire comme la protéine FtsZ, la sous-unité de la RNZA polymérase, la dihydrofolate réductase (DHFR), et l'isopropylmalate déshydrogénase (IPMDH) sont stables et actives dans les conditions de haute pression ([Kato, 2011 and references therein](#)); v) la capacité à dégrader des composés complexes de haut poids moléculaire probablement dû à la présence de gènes codant pour des enzymes particulières comme les CAZyme extracellulaires (*e.g* chitine, cellulose and pullulane, carbohydrate) ([Vezi et al., 2005](#); [Peoples et al., 2019](#)).

Cette capacité à dégrader de la matière de haut poids moléculaire par une communauté naturelle profonde a déjà été mise en évidence. Tout d'abord, [Boutrif et al. \(2011\)](#) montrent que dans des conditions de stratification des eaux, la capacité d'une communauté

Chapitre 1

Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

procaryotique issue de 2000 m de profondeur à dégrader un substrat complexe comme des exopolysaccharides marqués au tritium, synthétisé en laboratoire. En couplant une technique de biologie moléculaire appelée CARD-FISH (CAlyser Reported Deposition Fluorescent in Situ Hybridization) à la microautoradiographie, les auteurs ont également démontré que dans des échantillons maintenus dans les conditions *in situ* de pression, les *Euryarcheota* apparaissent aussi actives que les *Bacteria* sur la dégradation de ce substrat (Boutrif et al., 2011). Ensuite, très récemment, j'ai pu montrer la capacité des communautés inféodées à la zone bathypélagique à dégrader des composés naturels de haut poids moléculaires (article publié en 2021 qui constitue mon chapitre 3). Enfin dans une autre étude récente de Saw et al. (2020), des échantillons ont été récoltés dans trois différentes fosses océaniques : la fosse des Mariannes, la fosse du Japon et la fosse d'Izu-Ogasawara. Les auteurs ont utilisé différentes approches moléculaires, comme le « single cell genome amplification » et le CARD-FISH pour étudier la répartition des bactéries du clade SAR202 (appartenant au phylum des *Chloroflexi*) ainsi que les gènes impliqués dans la dégradation de composés complexes. L'étude met en évidence, d'une part une stratification verticale des différents groupes du clade SAR202 suggérant l'existence de niches spécifiques pour chaque groupe, et d'autre part la présence de gènes codant pour des familles de monooxygénase flavine-dépendante. Ces derniers, abondants dans le groupe III des SAR202 (le plus abondant dans le domaine bathypélagique), seraient responsables de l'oxydation des stérols et hopanoïdes (lipides marqueurs des membranes lipidiques bactériennes) en molécules alicycliques riches en carboxyle abondant dans la RDOM.

Les composés de haut poids moléculaire sont hydrolysés en composés de faible poids moléculaire pour être transportés dans la cellule par des protéines membranaires appelées "transporteur" ou bien être diffusés dans le milieu naturel pour alimenter d'autres compartiments du réseau trophique, c'est la théorie de « POM-DOM piezophilic microorganisms continuum (PDPMC) » (Fang et al., 2015) ou séquestrés sous forme plus réfractaire, par le biais de la « MCP microbial carbon pump » (Jiao et al., 2010) (Figure 1-4).

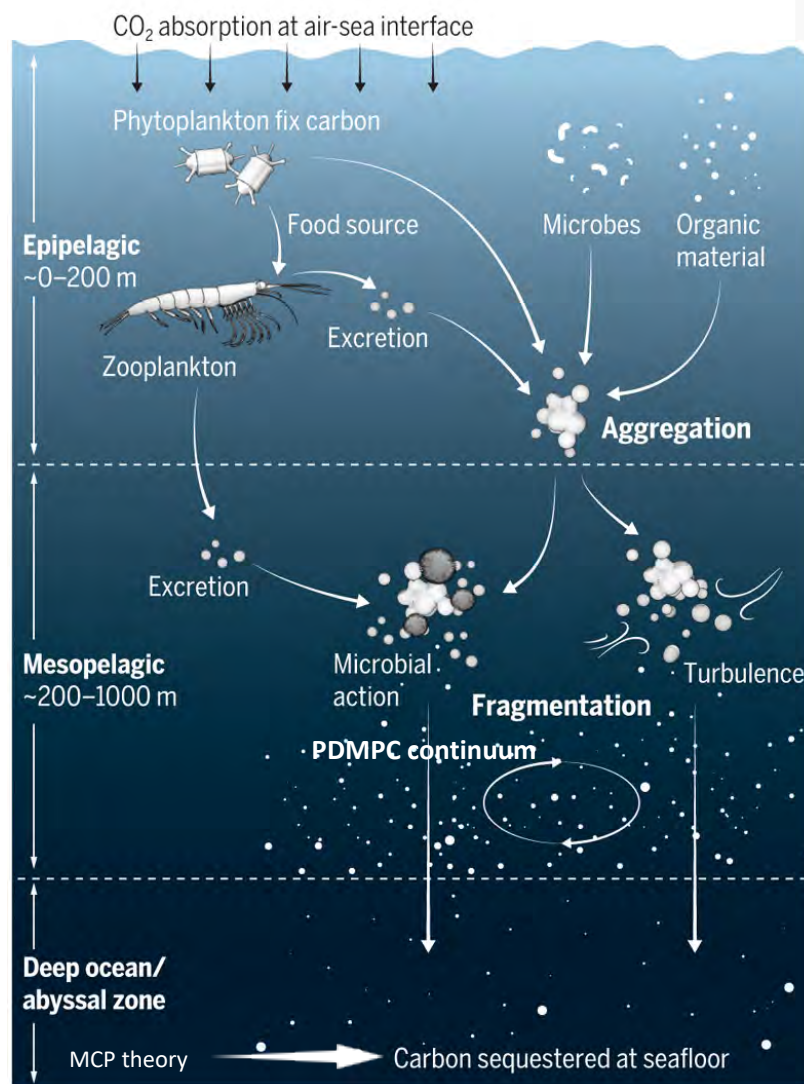


Figure 1-4 Schéma conceptuel de la pompe biologique de carbone, modifié d'après Nayak and Twardowski (2020). Le carbone organique majoritairement produit en surface par le phytoplancton va subir par des processus biotique et abiotique des transformations qui vont entraîner son exportation, principalement sous forme particulaire (carbone organique particulaire, POC), fragmenté par l'activité des microorganismes attachés aux particules ou colonisant ces particules (« POM-DOM piezophilic microorganisms continuum (PDPMC) », Fang et al., 2015) puis séquestré dans l'océan profond principalement par l'activité microbienne (MCP theory, « Microbial Carbon Pump », Jiao et al, 2010).

1.3 SENSIBILITE DU MILIEU PROFOND AUX CHANGEMENTS GLOBAUX

1.3.1 LE RECHAUFFEMENT DES EAUX PROFONDES : UN BREF ETAT DES CONNAISSANCES

Selon le dernier rapport du GIEC, il est incontestable que l'océan est impacté directement par le réchauffement global, avec des effets différents en fonction des régions. Les résultats présentés dans le rapport [IPCC \(2013\)](#) mettent en évidence des changements des propriétés océaniques sur les 40 dernières années au niveau de la température, du niveau de la mer, du carbone, du pH et de l'oxygène.

Les résultats de ce rapport [IPCC \(2013\)](#) montrent que non seulement les eaux de surface se réchauffent mais également les eaux des zones mésopélagique et bathypélagique, particulièrement entre 700 et 2000 m, avec une augmentation de la température de 0.015°C tous les 10 ans contribuant à 30 % du réchauffement global de l'océan ([Levitus et al., 2012](#)). Ces mesures permettent de modéliser l'évolution de la température de l'eau dans les années à venir. Il a été calculé que d'ici la fin du 21^{ème} siècle, la température dans les cent premiers mètres pourrait s'élever de 0.6 à 2 °C et de 0.3 à 0.6 °C à 1000 m de profondeur, en fonction des régions. Cependant, pour certaines zones océaniques comme les zones plus profondes, en dessous de 2000 m de profondeur, les incertitudes subsistent. L'acquisition des données reste trop incomplète ou trop faible pour dégager des tendances à l'échelle de l'année ou de la décennie. La mise en place de programmes internationaux d'observation comme DOOS (Deep-Ocean Observing Strategy, <https://deepoceanobserving.org>) qui depuis 2014 a été adopté par le GOOS « Global Ocean Observation Strategy », européens comme EMSO-ERIC (the European Multidisciplinary Seafloor and water column Observatory, <http://emso.eu/>) et les récents développements de capteurs autonomes montrent la prise de conscience du manque de résolution spatio-temporelle de données pour le domaine océanique profond ([Levin et al., 2019](#)). Par exemple, la mise au point récente de flotteurs "Deep Argo" étendent les paramètres mesurés jusqu'à une profondeur de 6000 m. Ces nouveaux types d'Argo ont été déployés dans une zone d'essais dans l'hémisphère sud (Pacifique et océan Indien, <https://deepoceanobserving.org/deep-ocean-observations/>). Cependant, pour de nombreuses variables biogéochimiques et biologiques, les méthodes d'échantillonnages limitent la compréhension des changements dans l'océan mondial sur les organismes, malgré

l'initiative BCG Argo (seulement pour les 2000 premiers mètres) qui vise à étendre les capacités d'observation des flotteurs profileurs autonomes pour inclure des variables biogéochimiques et biologiques ([Levin et al., 2019](#)).

Pour conclure cette section, grâce aux efforts internationaux d'échantillonnage, il n'est plus à démontrer que l'augmentation de la température en surface des océans a un impact direct sur les écosystèmes de surface mais également sur les écosystèmes profonds. Les conséquences de ces changements globaux sont bien connues chez les macroorganismes (*i.e* modification de la biodiversité, blanchiment de coraux) mais un peu moins discutées au niveau des microorganismes ([Cavicchioli et al., 2019](#)).

1.3.2 IMPACT DU RECHAUFFEMENT SUR LES MICROORGANISMES

L'élévation de la température des eaux de surface favorise la stratification et par conséquent affecte la circulation océanique ce qui i) diminue l'export de matière organique de la surface vers les couches plus profondes ([Smith et al., 2009](#)), ii) limite la production primaire par une diminution des apports en nutriment ([Passow and Carlson, 2012](#)) et iii) favorise le transfert du DOC labile vers le DOC réfractaire ([Smith et al., 2009](#); [Jiao et al., 2010](#); [Legendre et al., 2015](#)), iv) augmente la dégradation de la matière organique par les respirations aérobies microbiennes conduisant à une production accrue de pCO₂ ([Robinson, 2019](#)) et v) limite également la diffusion de l'oxygène vers les couches plus profondes en favorisant la formation de zone de minimum d'oxygène entre 200 et 700m de profondeur ([Stramma et al., 2010](#)).

Concernant les communautés phytoplanctoniques, les effets du réchauffement climatique sur les eaux de surface sont régionalisés. [Boyce et al., \(2010\)](#) ont montré une relation sur le déclin des communautés phytoplanctoniques (avec un taux annuel de 1%) phytoplanctonique et l'augmentation de la température des eaux de surfaces (SST) dans huit régions océaniques sur dix. Les régions aux faibles latitudes sont les plus touchées. En effet le réchauffement de eaux de surface induisant une forte stratification des eaux conduit à un appauvrissement des eaux de surface en éléments nutritifs nécessaires pour la photosynthèse. Cette conclusion est soutenue par une étude récente qui met en évidence une régionalisation des effets de l'augmentation de la SST sur la croissance et la calcification des coccolithophores ([Krumhardt et al., 2017](#)). Les résultats du modèle tendent à montrer que dans les basses

Chapitre 1

Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

latitudes, la stratification induite par le réchauffement produit une diminution de la calcification et conduit à des taux de croissance ~25% plus lents, ce qui influe directement sur l'export de matière organique vers les couches profondes. Dans les hautes latitudes [Krumhardt et al., \(2017\)](#), montre qu'une augmentation de la température de surface de la mer de ~2-3°C conduirait à des taux de croissance plus rapides des coccolithophores et la calcification dans les hautes latitudes. Ces différents effets sont par la suite transférés dans les compartiments supérieurs du réseau trophique.

Concernant le compartiment hétérotrophe, l'élévation de la température entraîne une augmentation de la production hétérotrophique (PHP) et de la respiration (PR) en surface mais également dans l'océan profond ([Pomeroy et al., 2000](#); [Apple et al., 2006](#); [Lønborg et al., 2016](#)). D'après [Cavan and Boyd, \(2018\)](#) cette augmentation de la PR en surface conduirait à une diminution de l'export de matière organique vers le milieu mésopélagique dans la zone sub-Antarctique. Dans d'autres régions [Apple et collaborateurs \(2006\)](#) décrivent, en surface, une réponse différente dans le métabolisme procaryotique entre l'anabolisme (production hétérotrophique) et le catabolisme (respiration procaryotique). Les auteurs montrent que l'action conjointe de la température et de la diminution de la qualité de matière organique diminuerait l'efficacité de croissance durant les mois les plus chauds. Ce qui a également été montré par [Céa et al., \(2015\)](#) dans une étude décrivant l'action conjointe de la température de la concentration en phosphore sur l'efficacité de croissance. Les communautés procaryotiques auraient tendance à favoriser la maintenance cellulaire au détriment de leur croissance ([Bunse et al., 2016](#)).

De plus, la dépendance des communautés des grands fonds marins à l'égard de la production d'eau de surface soulève d'importantes questions sur la façon dont le changement climatique affecte le cycle du carbone et le fonctionnement des écosystèmes des grands fonds marins ([Aristegui et al., 2009](#); [Smith et al., 2009](#); [Reinthal et al., 2013](#)). Le domaine océanique profond comprenant 75% de la biomasse procaryotique pélagique et une grande fraction de la minéralisation de la matière organique s'effectue en dessous de 200m ([del Giorgio and Duarte, 2002](#)), alors une modification de cette activité procaryotique, due au changement climatique, impacterait le fonctionnement de l'océan ([Lønborg et al., 2016](#)). Les auteurs mettent en lumière une dépendance de la PHP à la température. La PHP apparaît fondamentalement différente entre ces grandes couches océaniques profondes. Les auteurs estiment une

Chapitre 1

Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

augmentation de 55% de la PHP pour une augmentation de 1°C. Tout comme en surface, l'augmentation de la température des eaux profondes favoriserait la production de DOC récalcitrant nécessitant plus d'énergie pour être dégradé. Cette faible bioréactivité entraîne une augmentation de E_a avec la profondeur pour la maintenance cellulaire. Ils en concluent donc que l'océan profond serait plus sensible au réchauffement global. J'ai résumé ces phénomènes sur la Figure 1-5.

Encore une fois, il est important de noter que tous ces résultats ont été obtenus, pour la zone bathypélagique, sur des échantillons décomprimés et incubés à pression atmosphérique. Or, comme déjà mentionné plus haut, [Tamburini et al. \(2013a\)](#) ont montré que dans des conditions de stratification des eaux, l'activité mesurée en décomprimant est largement sous-estimée (4.01 ± 6.83 fois inférieurs en moyenne). Par conséquent, l'importance du réchauffement peut être minimisée et il est donc très urgent d'utiliser un système d'échantillonnage et d'incubation adapté au milieu profond afin d'avoir une vision plus réaliste des effets du changement climatique.

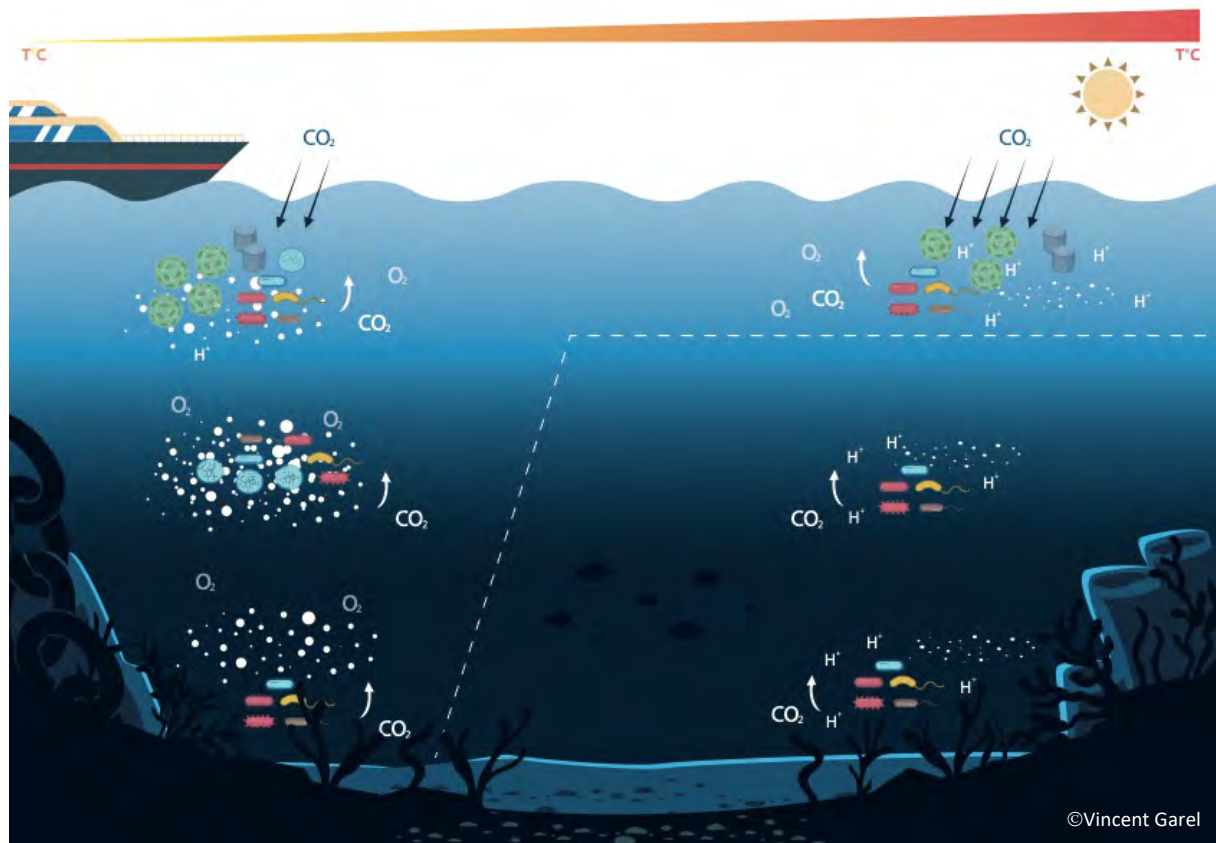


Figure 1-5 Infographie représentant de manière schématique les impacts du changement climatique sur les zones méso- et bathypélagique. L'augmentation de la température de surface augmente la stratification des eaux de surface, limitant les échanges avec les eaux sous-jacentes. Par conséquent, le CO_2 s'accumulerait en surface provoquant l'acidification des eaux de surfaces. La matière organique produite en surface est principalement consommée par les communautés de surfaces ce qui diminue l'export vers les zones méso- et bathypélagique, donc diminuerait la séquestration du carbone. Enfin, le front thermique diminuerait la diffusion de l'oxygène vers les zones plus profondes modifiant la ventilation des eaux profondes (accroissement des zones à minimum d'oxygène – OMZ). La ligne en pointillés représente la stratification des eaux. Illustration réalisée par Vincent Garel.

1.4 PROBLÉMATIQUES ET OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Le but de cet état de l'art était : i) de mettre en exergue les particularités des domaines méso- et bathypélagique tant au niveau biogéochimique qu'au niveau des organismes y vivant, en particulier les procaryotes hétérotrophes ; ii) de rappeler qu'il existe une connectivité entre l'atmosphère-zone épipélagique et les zones méso- et bathypélagique. Le domaine océanique profond est constitué en règle générale (dans des conditions de stratification des eaux) par des communautés des procaryotes dites autochtones, c'est-à-dire adaptées aux conditions environnementales (forte pression hydrostatique et faible température).

Dans ce travail de thèse, j'ai contribué à amender les travaux entrepris initialement au laboratoire depuis plus de trois décennies : comment échantillonner correctement le domaine océanique profond pour avoir une mesure la plus juste possible de l'activité des procaryotes ? Comment maintenir les conditions *in situ* ou reproduire au plus près les conditions environnementales pour réaliser des expérimentations permettant de comprendre l'impact de la pression hydrostatique sur les activités et la diversité des procaryotes ?

Bianchi et al, proposaient en 1999 déjà un système de prélèvement permettant de collecter et maintenir un échantillon d'eau de mer dans les conditions *in situ* de pression hydrostatique qui était resté à l'état de prototype. Ici j'ai entrepris de continuer ce développement en y apportant quelques améliorations que je détaillerai dans l'article 1 (chapitre 2). Ce développement a été standardisé et rendu disponible à toute la communauté scientifique (nationale et internationale) en étant commercialisé par la société Top Industrie (SA). Avec ce nouveau dispositif, j'ai pu évaluer l'impact de la décompression des échantillons d'eau de mer sur la diversité spécifique de la communauté microbienne. Ce travail a été réalisé dans le cadre de la campagne [PEACETIME](#) démarré à bord du N/O Pourquoi Pas? et prolongé au laboratoire.

Dans un deuxième temps, je démontrerai l'importance des prélèvements dans les conditions *in situ* sur la dégradation de la matière organique dissoute de haut poids moléculaire (HMWDOM) dans deux conditions hydrologiques contrastées (article 2, chapitre 3).

Dans un troisième temps, j'étudierai l'impact de la pression hydrostatique sur une communauté procaryotique naturelle de surface, en simulant en laboratoire, une chute de particules provenant d'une culture d'*Emiliana huxleyi*, une espèce phytoplanctonique représentative du milieu naturel (article 3, chapitre 4). A l'aide des mêmes bouteilles HPBs et en utilisant le dispositif de simulation de particules (PASS, PArticle Sinking Simulator), cette étude a été réalisée avec une communauté issue du site « Porcupine Abyssal Plain » durant la campagne [DY032](#) au travers d'une expérimentation en laboratoire à bord du RRS Discovery.

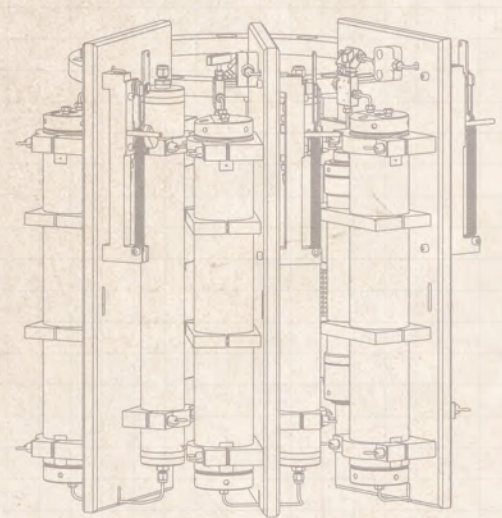
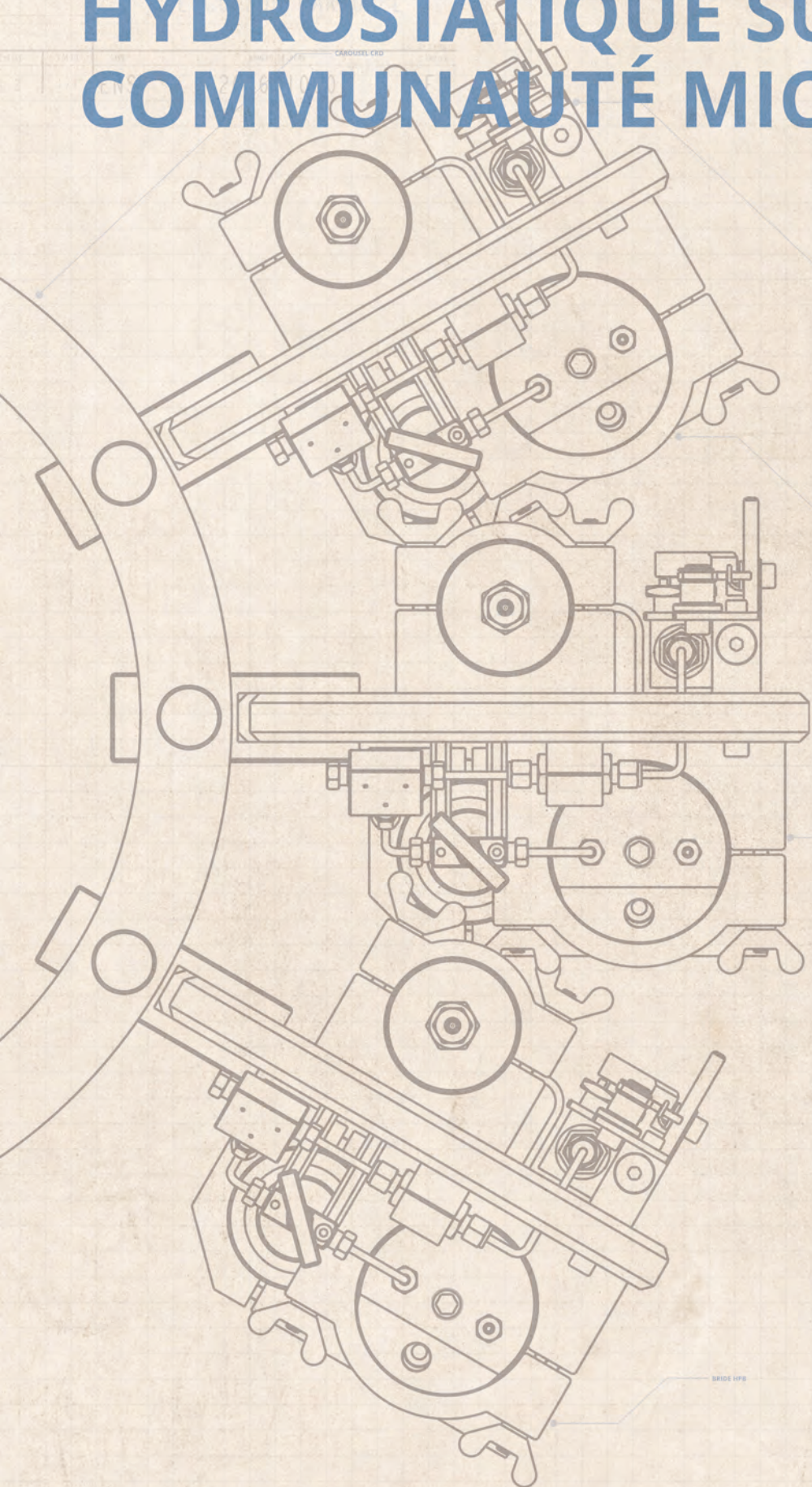
Chacun de ces trois chapitres contenant les articles est constitué d'un préambule, pouvant répéter quelques notions déjà abordées dans cette introduction mais permettant de prendre chaque chapitre de manière indépendante, de l'article, et éventuellement des données complémentaires obtenues après la publication de l'article.

Chapitre 1

Introduction : État de l'art et Objectifs de l'étude

Enfin, je terminerai mon manuscrit de thèse sur des conclusions et perspectives (chapitre 5) et un chapitre (chapitre 6) présentant mes travaux complémentaires où je traiterai d'aspects techniques, concernant plus particulièrement mon poste d'ingénieur, nécessaire au soutien de la recherche dans cette thématique.

02 EFFET DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE SUR LA COMMUNAUTÉ MICROBIENNE



CHAPITRE 02

PRO	LIBELLE	NOM	DATE
MODIFICATIONS			
CE DOCUMENT EST LA PROPRIÉTÉ DE TOP INDUSTRIE ET NE PEUT ÊTRE MODIFIÉ, REPRODUIT OU COMMUNIQUÉ SANS SON AUTORISATION			
Dessin par	J. LAFRANCOIS	09/03/2016	
Verifié par	Ch. JACQUES		
NATURE			
PROJET			
TRACÉ			
TOLERANCES GEN			
A2		ENS	2686 1000

2 EFFET DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE SUR LA COMMUNAUTE MICROBIENNE

PREAMBULE

Le maintien des conditions environnementales pour étudier les microorganismes de la zone bathypélagique est une préoccupation relativement récente. En effet cela a débuté avec les travaux de Claude ZoBell dans les années 50, en étudiant l'effet de la pression hydrostatique sur des souches bactériennes provenant du milieu marin (ZoBell and Morita, 1959). Plus tard dans années 70, le laboratoire de Holger Jannasch a conçu le premier échantillonneur d'eau de mer capable de maintenir la pression hydrostatique en anglais « *Pressure Retaining Sampler* » (PRS). Ce PRS permettait d'échantillonner et filtrer l'eau de mer dans les conditions *in situ*, ce qui a permis d'entreprendre les premières études concernant le rôle de procaryotes dans le domaine océanique profond (Jannasch et al., 1976; Jannasch and Wirsén, 1977). Dans les années qui suivirent d'autres PRS ont été développés sur le même principe (Tabor and Colwell, 1976; Tabor et al., 1981). Mais l'inconvénient majeur de ces différents systèmes en était la mise en œuvre. En effet cela nécessitait l'intervention d'un sous-marin rendant les campagnes océanographiques plus difficiles et plus onéreuses.

Dans le début des années 90, l'équipe d'Armand Bianchi a développé un PRS s'adaptant sur les câbles hydrologiques des navires océanographiques (Bianchi and Garcin, 1993, 1994). Les résultats issus de ces études ont permis de mettre en évidence les premiers résultats sur l'effet de la pression hydrostatique sur l'activité métabolique des communautés procaryotiques. Par la suite, Bianchi et al. (1999) ont développé le « High Pressure Serial Sampler », un système multi-échantillonneur de 500mL capable de collecter, de maintenir et d'incuber les échantillons d'eau de mer dans les conditions *in situ* de pression hydrostatique et de température sur une rosette Sea-Bird® au côté de bouteilles Niskin® classiquement déployé via le câble électro-porteur des navires océanographiques. Le système de déclenchement de ces bouteilles hyperbares étant actionné à partir du carrousel Sea-Bird®. Jusqu'à maintenant cet équipement a permis non seulement de montrer et comprendre l'impact de la pression

Chapitre 2

Effet de la pression hydrostatique sur la communauté microbienne

hydrostatique sur les procaryotes vivant dans les milieux méso et bathypélagique (pour plus de détails voir la review de [Tamburini et al.\(2013\)](#)), mais également d'ouvrir une nouvelle voie sur l'océanographie microbienne du domaine océanique profond.

L'article 1 présenté ci-après dans ce chapitre, constitue, dans la continuité du développement technologique du système de Bianchi et collaborateurs, un bilan des améliorations réalisées tant en terme technique que de procédures. Les mesures classiques réalisées sont associées à des méthodes de nouvelle génération de séquençage (NGS) ainsi que des mesures d'activités en temps réel.

Article 1

Garel, M., Bonin, P., Martini, S., Guasco, S., Roumagnac, M., Bhairy, N., et al. (2019). Pressure-Retaining Sampler and High-Pressure Systems to Study Deep-Sea Microbes Under In Situ Conditions. *Front. Microbiol.* 10, 453. doi:10.3389/FMICB.2019.00453.

Aknowledgement :

Authors would like to acknowledge PEACETIME project (MISTRALS CNRS INSU, doi: 10.17600/17000300) for opportunity to participate to the cruise. We would also like to acknowledge Top Industrie SAS (<https://www.top-industrie.com>) for all schematic drawing, and C. Gojak and K. Mahiouz from DT-INSU CNRS for mechanical improvement. Authors also thank D. Lefevre for discussions on oxygen measurements using oxygen planar optodes within high- pressure bottles. We thank F. Le Moigne for discussions and T. L. Bentley for English improvement. We thank the captains and crews of RV Pourquoi Pas? for cruise assistance and C. Guieu and K. Desboeufs, Chief scientists of PEACETIME.

PRESSURE-RETAINING SAMPLER AND HIGH-PRESSURE SYSTEMS TO STUDY DEEP-SEA MICROBES UNDER IN SITU CONDITIONS

Marc Garell¹, Patricia Bonin¹, Séverine Martini², Sophie Guasco¹, Marie Roumagnac¹, Nagib Bhairy¹, Fabrice Armougom¹ and Christian Tamburini^{1*}

¹ Aix Marseille Univ., Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO UM 110, 13288, Marseille, France

² Sorbonne Université, CNRS, Laboratoire d'Océanographie de Villefranche, LOV, F-06230, Villefranche-sur-mer, France

Publié dans *Frontiers Microbiology* :

Keywords: Pressure-retaining sampler, deep sea, in situ sampling, prokaryotic activities, prokaryotic diversity.

Abstract

The pelagic realm of the dark ocean is characterized by high hydrostatic pressure, low temperature, high-inorganic nutrients and low organic carbon concentrations. Measurements of metabolic activities of bathypelagic bacteria are often underestimated due to the technological limitations in recovering samples and maintaining them under *in situ* environmental conditions. Moreover, most of the pressure-retaining samplers, developed by a number of different labs, able to maintain seawater samples at *in situ* pressure during recovery have remained at the prototype stage, and therefore not available to the scientific community. In this paper, we will describe a ready-to-use pressure-retaining sampler, which can be adapted to use on a CTD-carousel sampler. As well as being able to recover samples under *in situ* pressure, we propose a sample processing in equi-pressure mode. Using a piloted pressure generator, we present how to perform sub-sampling and transfer of samples in equi-pressure mode to obtain replicates and perform hyperbaric experiments safely and efficiently (with less than 2% pressure variability). As proof of concept, we describe a field application (prokaryotic activity measurements and incubation experiment) with samples collected at 3000 m-depth in the Mediterranean Sea. Sampling, sub-sampling, transfer and incubations were performed under *in situ* pressure conditions and compared to those performed following decompression and incubation at atmospheric pressure. Three successive incubations were made for each condition using direct dissolved-oxygen concentration measurements to determine the incubation times. Subsamples were collected at the end of each incubation to monitor the prokaryotic diversity, using 16S-rDNA/rRNA high-throughput sequencing. Our results demonstrated that oxygen consumption by prokaryotes is always higher under *in situ* conditions than after decompression and incubation at atmospheric pressure. In addition, over time, the variations in the prokaryotic community composition and structure are seen to be driven by the different experimental conditions. Finally, within samples maintained under *in situ* pressure conditions, the active (16S rRNA) prokaryotic community was dominated by sequences affiliated with rare families containing piezophilic isolates, such as *Oceanospirillaceae* or *Colwelliaceae*. These results demonstrate the biological importance of maintaining *in situ* conditions during and after sampling in deep-sea environments.

2.1 INTRODUCTION

Only 5% of the ocean has been explored using remote instruments and less than 0.01% has been sampled and studied ([Ramirez-Llodra et al., 2010](#)). Despite the deep sea, being the largest ecosystem of the ocean (mean depth of about 3500 m, i.e. 35 MPa), with the greatest reservoir of microbes ([Whitman et al., 1998](#)), it still hasn't been sampled or studied adequately under *in situ* conditions. This major issue is mainly the consequence of technical limitations that both restrict access to this environment and make sampling under *in situ* pressure conditions difficult.

Microorganisms living in the deep-sea are subjected to well-known conditions: high hydrostatic pressure, low temperature, high concentrations of inorganic matter and low organic carbon content. Pressure-adapted microorganisms have been isolated from many deep-sea sites and are defined as piezophiles when their optimum growth occurs at high hydrostatic pressure. Using laboratory pressure vessels, the characteristics of piezophiles have been described, including membrane properties, motility, nutrient transport and DNA replication and translation under elevated hydrostatic pressure (see e.g. [Bartlett et al., 2007](#); [Lauro and Bartlett, 2008](#)).

In deep-sea environments, microorganisms represent the main players in the biological carbon pump by consuming and mineralizing organic matter as it sinks down the water column ([Cho and Azam, 1988](#); [Aristegui et al., 2009](#)). However, one of the main biases in deep-sea metabolic activity estimations is that, most of the time, they are measured at atmospheric pressure following the decompression of the water sample. As a result of decompression, significant shifts in prokaryotic activity ([Tamburini et al., 2013](#); [Wannicke et al., 2015](#)), community composition ([La Cono et al., 2009, 2015](#)) and gene expression ([Edgcomb et al., 2016](#)) have been identified. In a previous review ([Tamburini et al., 2013a](#)), we considered the hydrostatic pressure effects on natural communities containing both unadapted prokaryotes (piezosensitive) originating from surface water, and adapted prokaryotes (including piezophilic) from the deep sea. Analysis of datasets in the literature, show that under stratified conditions, deep-sea communities are adapted to *in situ* conditions of high pressure, low temperature and low organic matter. Measurements from decompressed samples that are incubated at atmospheric pressure thus underestimate *in situ* activities. Exceptions that can lead to

overestimations can be attributed to deep sea mixing events, large influxes of surface particles, or the provision of excessive organic matter during experimentation (Tamburini et al., 2013a).

In order to study the deep-sea environment, it is necessary to perform *in situ* measurements or continuously maintain the hydrostatic pressure at *in situ* temperature from deep-sea water sampling through to the transfer and measurement of microorganism activity and community composition. Over the last 40 years, pressure-retaining sampler prototypes have been developed by several laboratories using different approaches, but none are available to the scientific community without local engineering expertise or high-pressure system facilities. For the oldest systems refer to Bianchi et al. (1999), Jannasch et al. (1973), Tabor and Colwell (1976) or for an historical review of microbial pressure-retaining samplers see Tamburini (2006). Recently, new pressure-retaining samplers have been locally developed (without being exhaustive NIOZ, the Netherlands; JAMSTEC, Japan – (Kim and Kato, 2010); WHOI, USA – McNichol et al. 2016; SCRIPPS, USA – (Peoples et al., 2019)).

Here we describe a ready-to-use pressure-retaining sampler capable of collecting and maintaining samples under *in situ* pressure conditions (up to 60 MPa) during sampling and the ascent from ocean depth. Along with a complete high-pressure setup, we show how to perform experiments, including replicates, transfer, and subsampling, without decompression. Technical specifications and proof of concept are described with examples of data including oxygen concentration and prokaryotic diversity from incubation experiments. These latter were carried out from a deep natural prokaryotic community collected at 3000 m-depth in Mediterranean Sea, a first series being maintained under *in situ* pressure compared to another series incubated at atmospheric pressure.

2.2 MATERIALS AND METHODS

2.2.1 HIGH-PRESSURE BOTTLES (HPBs)

Two kinds of High-Pressure Bottles (HPBs) are available, one in stainless-steel coated with PEEK (Poly-Ether-Ether-Ketone) described in Bianchi et al., (1999) and Tamburini et al., (2003) and one in titanium (described below). Different volumes can also be used: 500 mL HPBs used for sampling and 50 mL HPBs used for incubation.

Titanium alloy is widely used in oceanography instrumentation as it meets corrosion constraints linked to biofouling and prolonged immersion at great depths, or those seen in hydrothermal vents such as extreme temperatures and pH. Titanium, in particular TA6V ELI grade 5 used in the medical field, has several interesting mechanical properties when working at high-pressure. The tear resistance of TA6V is 3 times higher than 316L and the elastic limit of TA6V is 4 times higher than 316L. Densities are 4.33 g cm^{-3} and 8 g cm^{-3} respectively for TA6V ELI and 316L. Such differences facilitate manual handling. In addition, TA6V ELI, like other titanium, is resistant to corrosion, specifically to crevice corrosion.

Based on our previous expertise we built a new generation of HPBs in Titanium TA6V ELI grade 5 for medical use (2686 0000, Top Industrie SAS, <https://www.top-industrie.com>) avoiding the use of PEEK coating which is an expensive consumable. These bottles are similar in principle to those made in 316L stainless-steel with PEEK coating described by [Bianchi et al. \(1999\)](#) and [Tamburini et al. \(2003\)](#) (Figure 2-1A). An important additional improvement was made using a top-end cap devoted to optical measurements. Ti-HPBs are 500 mL Titanium TA6V ELI cylinders with PEEK floating pistons fitted with two polyurethane seals as they are more suitable for longitudinal friction. Maximum operating pressure and operating temperatures are 60 MPa and 50°C.

The screw top end-cap (in titanium TA6V ELI) fitted with two O-rings is composed of two parts (see details in Supplementary Figure 2-1). Main part with 4 pipes, 2 screwed pipe connections 1/8" (3.2 mm O.D.) for sample pathway, 1 blind pipe for PT100 sensor with a diameter of 6 mm and length 60 mm and 1 pipe for the optic fiber with a diameter 5 mm and a length of 82 mm. The second part is 4 mm thick, screwed into the main part with three titanium grade 5 screws to fix a sapphire window for optical measurements. The bottom end-cap (in titanium TA6V ELI) has only one connection (see in the text below).

Cleaning procedure: HPBs are washed with pressurized milliQ water using a pre-cleaned stainless-steel pressurized container. For washing HPBs, pressurized milliQ water moves the floating piston in two ways sequentially. This backward and forward movement is repeated three times and the floating piston is placed at the top of the HPB. Hence, the part below the floating piston is fully filled with milliQ water. Finally, HPBs were sterilized in a pressure-sealed unit (for 20min at 110°C).

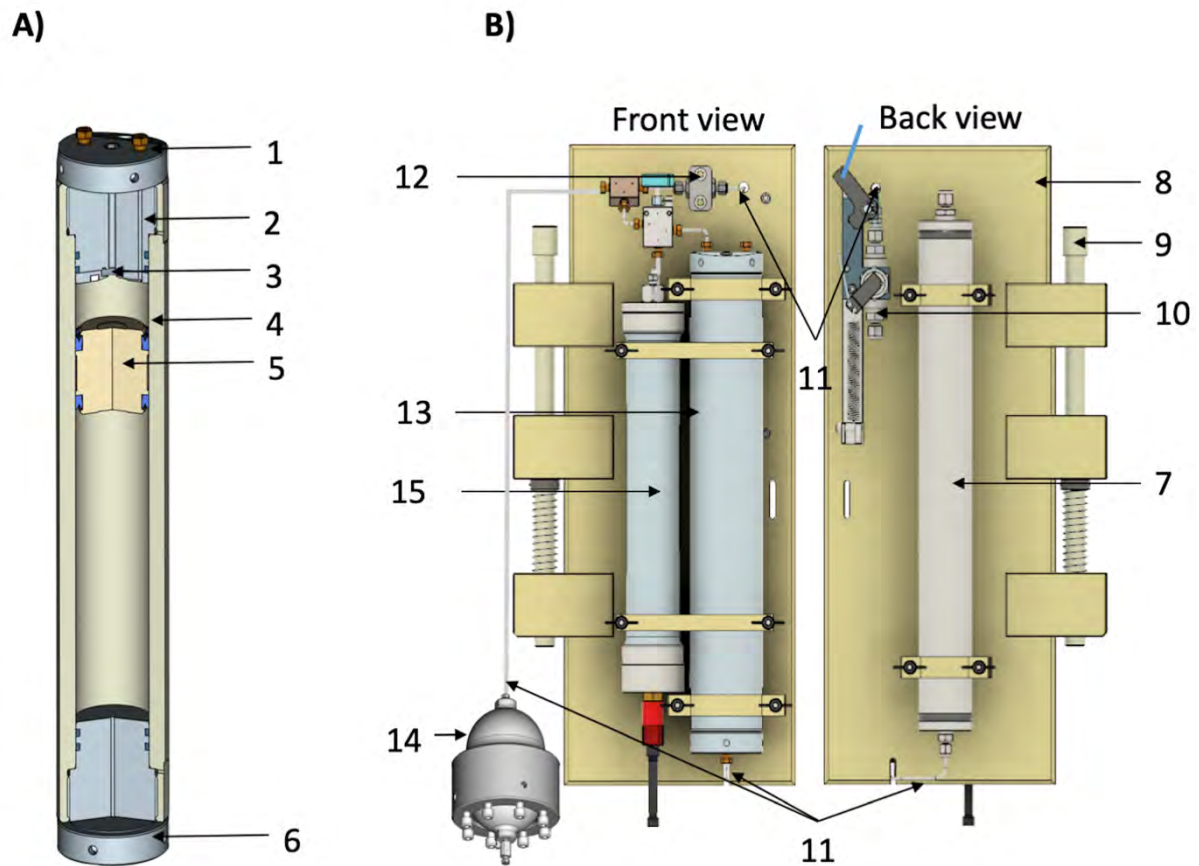


Figure 2-1 (A) Cross section of the Titanium TA6V 500mL High Pressure Bottle (HPBs). (B) Schematic drawing of the front and back views of the High-Pressure Sample Unit (HPSU). 1. Top end-cap devoted to oxygen measurement; 2. 1/8" (3.2mm O.D.) Inlet flowthrough; 3. Sapphire window; 4. Main core; 5. PEEK floating-piston with lip seal; 6. Bottom end-cap. In the part, above floating-piston seawater sample is in contact with sapphire window (see details in the text). The part below the floating-piston contains sterile milliQ water which serve as hydraulic brakes when passing through the thin catheter into the exhaust tank (7); 8. Polypropylene main frame; 9. Push rod for attachment to a rosette system. When the (10) inlet-valve is opened by magnetically activated lanyard release, the seawater enters the hydraulic circuit through a 1/8" (3.2mm O.D.) stainless-steel tube (11), via one check valve (12), to fill in the HPB (13), the pressure accumulator (14), and the aero-hydraulic pressure sensor (15).

2.2.2 HIGH-PRESSURE SAMPLER UNIT (HPSU)

To perform deep-water sampling with maintained elevated pressure, both 500 mL HPBs, described previously, are fitted onto a specific frame, designated the high-pressure sampler

unit (HPSU, described in Figure 2-1B). The HPSU can be fitted onto a CTD carousel beside the Niskin bottles (using the same attachment push-rod system), widely used in oceanography but now providing decompressed deep-water samples.

To make it accessible to potential future users, we have standardized the manufacturing of the HPSU in collaboration with Top Industrie SAS (Vaux-le-Penil, France). The HPB is fitted by two flanges onto a polypropylene frame (287x600mm) and connected to the top-part at the inlet-valve (see Supplementary Figure 2-2 for details) with a check-valve and to the bottom-part on the exhaust tank (a stainless-steel tank, 480 mm total length, 55 mm O.D.). The Supplementary Figure 2-2 shows the schematic drawing of the quarter-turn inlet-valve, which is set to closed position, thanks to a nylon wire (under tension using a strong spring) on the corresponding CTD-carousel trigger until fired for sampling. Moreover, each HPB is linked to the hydraulic part of autonomous data-logger pressure sensors (2903-0000, Top Industrie SAS), these are independent of the CTD carousel and gives quality control of samples before processing. HPBs are connected to an aero-hydraulic pressure accumulator (2820-1300, Top Industrie SAS) to counterbalance drops in pressure ([see the description in Bianchi et al., 1999](#)).

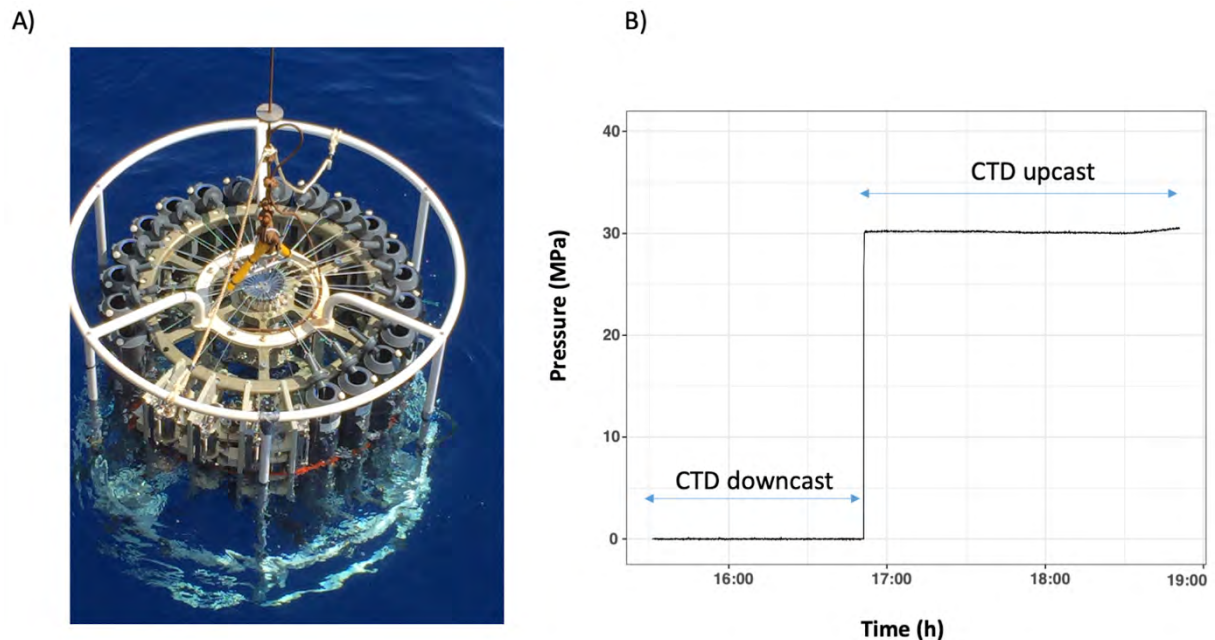


Figure 2-2(A) Photograph of four HPSUs mounted on a rosette system. In this example, four HPSUs are taking the place of 5 Niskin-bottles. (B) Plot of recorded data by pressure sensor during sampling. Dark-blue line is a sample from 3600 m-depth and dark-red is a sample from 3500 m-depth. Pressure sensor begins to record data when inlet valve of frame is open. Data is recorded during all the casts and stored in data logger. Recorded data are available on board to check quality of collected samples.

2.2.3 HIGH-PRESSURE SAMPLING

For sampling, the HPSU is fitted to a CTD-carousel. The photograph in Figure 2-2A shows four HPSUs mounted on a 24-bottle CTD-carousel. At the desired depth, the CTD carousel trigger is fired, freeing a spring to open the inlet-valve with a quarter turn. The seawater enters the hydraulic circuit through a 1/8" (3.2 mm O.D.) stainless-steel tube, via one check-valve, filling the HPB, the pressure accumulator and the pressure sensor. As the seawater enters the HPB, the floating-piston moves and flushes out the milliQ water below the floating piston into the exhaust tank through a stainless-steel-tube (1/51" I.D. – 0.5 mm I.D.). This ensures a continuous and slow flow rate during the downward movement of the floating-piston and prevents damage to the floating-piston as the HPB fills up with seawater. Seawater sampling ends when the floating-piston sits on the bottom end-cap (Figure 2-1B and animated drawing in Supplementary Figure 2-4). The check-valve means there is no need for a closing valve or an additional trigger. Once the inlet-valve is triggered to open, the sampling time is estimated to be around 10 minutes to guarantee full-filling and equilibrium with the pressure accumulator.

Once the HPSU is back on board, the master pressure sensor is connected to the computer to check the monitored pressure recorded during sampling and to determine its quality (pressure variability). It can be observed that the hydrostatic pressure is maintained at $\pm 5\%$ during the up-cast of the carousel. Once on board the ship, HPSUs are recovered and transferred immediately into our mobile MIO HP-Lab container (Supplementary Figure 2-3). HPSUs are then placed in the *in situ* temperature water baths before being processed to offset the slight increase in temperature during up-cast and manual handling on deck. An example on Figure 2-2B shows a sample collected at a depth of 3000 m, it can be observed that the hydrostatic pressure is maintained throughout the ascent without pressure variation.

2.2.4 TRANSFER AND SUBSAMPLING IN EQUI-PRESSURE MODE

An important improvement was made in transferring the main sample and several subsamples (obtained with the HPSU) under an equi-pressure mode maintaining at all times the high hydrostatic pressure, using a piloted pressure generator (PPG). This procedure can be used to obtain replicates of the same activity measurement.

2.2.5 PILOTED PRESSURE GENERATOR

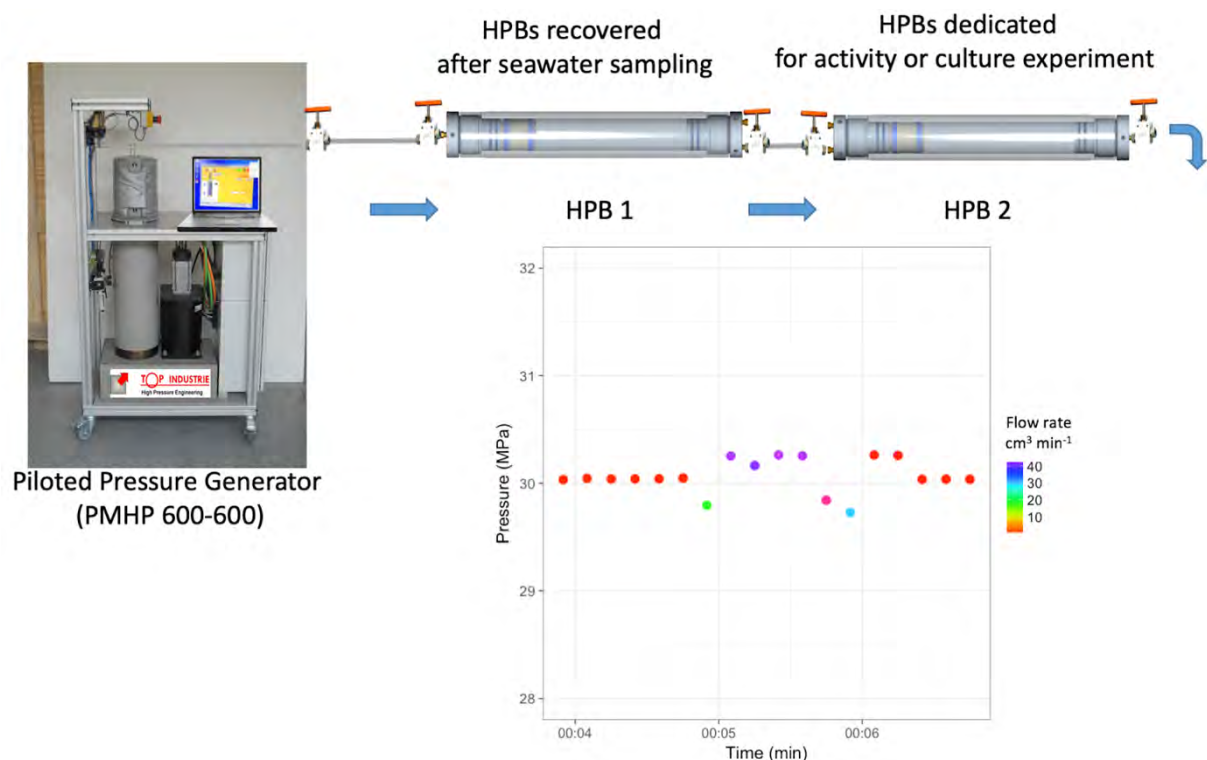
The piloted pressure generator is a PHMP 600-600 (2493 0000, Top Industrie SA). It consists of a TA6V reservoir with a maximum operating pressure of 60 MPa, a useful capacity volume of 600 mL and a maximum flow rate of 50 mL min⁻¹. The PMHP 600-600 is filled with milliQ water that is compressed by a piston regulated by a brushless motor Servomotor Compax 3. This enables us to work with hydrostatic pressure safely. The PMHP 600-600 operates in three modes: pressure, volume and flow. The draining and filling/pressure input is controlled by two 1/8" electro-valves piloted by Labview software (National InstrumentsTM).

2.2.6 PROTOCOL TO TRANSFER AND SUBSAMPLE UNDER EQUI-PRESSURE MODE

Figure 2-3 describes the set-up used to transfer under equi-pressure mode. It is composed of three main parts: the PMHP 600-600, the 500 mL-HPB containing seawater sample (entitled thereafter HPB 1) and the HPB with a labeled tracer to measure activity or HPB with a culture medium (entitled thereafter HPB 2). To facilitate handling and to reduce experiment costs, 50 mL HPBs (2730 4000, Top Industrie SA) may be used instead of 500 mL HPBs. Both volumes of HPB can be used to perform a transfer in equi-pressure mode if the HPBs are equipped with a floating piston inside.

Firstly, HPB 2 is filled in with the labeled tracer or the culture medium and pre-conditioned at the *in situ* temperature. This operation is done at atmospheric pressure using a precision sterile syringe in sterile conditions. Firstly, HPB 2 is filled in with the labeled tracer or the culture medium and pre-conditioned at the *in situ* temperature. This operation is done at atmospheric pressure using sterile syringe in sterile condition. Then, the HPB 2 is pressurized at the same pressure as the HPB 1 to equilibrate the pressure between both HPBs. Finally, both hand valves of the HPBs (at their the top parts) are connected using a sterile 1/8" (3.2 mm O.D.) stainless tube. The bottom part of the HPB 1 is connected to the PMHP 600-600. The top hand-valve of HPB 1 is opened to equilibrate the pressure with the small stainless-tube connection. The top hand-valve of HPB2 can be opened. The bottom part of the HPB 2, also fitted with a 1/8" hand valve, is then slowly opened by the operator to create a weak leak, the PMHP 600-600 compensates the pressure loss by an increase in the flow rate. The PMHP 600-600 regulates the hydrostatic pressure by injecting distilled water into the bottom part of the HPB, separated from the original deep-sea sample by the floating piston. The operator regulates the volume using the end hand-valve. The PMHP 600-600 regulates the hydrostatic pressure in

both HPBs, while the operator manages the transferred volume. Hence, the original deep-sea sample is transferred from HPB 1 into HPB 2 at constant pressure. HPBs are covered with a survival blanket to limit temperature change. From 500 mL samples, it is possible to transfer sub-samples of different volumes to perform replicates for metabolic activities or culture experiments under *in situ* pressure conditions. Less than 2 minutes is required to transfer 40 mL of sub-sample with a pressure accuracy of less than 0.5 MPa (see the graph in Figure 2-3 and animated diagram in Supplementary Figure 2-4).



2.2.7 EXAMPLE OF FIELD APPLICATION

IN SITU SAMPLING AND INCUBATION EXPERIMENT UNDER HIGH-HYDROSTATIC PRESSURE

The experiment was conducted during the PEAcETIME cruise (<http://peacetime-project.org/>) in May 2017 in the Ionian Sea. Seawater was sampled from 3000 m-depth (Station ION, 35.49N, 19.78E) using two HPSUs, one under *in situ* conditions (30 MPa) and another one decompressed during up-cast (HPSU mounted without check valve) and incubated at atmospheric pressure (0.1 MPa). Details of the PEAcETIME cruise will be fully described in a special issue soon. Incubations were carried out at *in situ* temperature (i.e., at 13°C in the deep Mediterranean Sea) for 7 days (named I₁). At the end of the first incubation (I₁), fifty milliliters (50 mL) were transferred in equi-pressure mode into another HPB previously filled with 450 mL 0.2-µm-pore size filtered-seawater (to remove particulate matter and microorganisms), obtained at the same time and at the same depth using regular Niskin bottles for the second incubation (I₂). The remaining volume was filtered, in less than 15 minutes, through 0.2-µm-pore-size filters (Millipore®, GPWP04700) without any fixation and stored at -80 °C for DNA/RNA metabarcoding analysis. A third incubation (I₃) is performed with the same protocol. A total of three incubations were performed maintaining *in situ* pressure (HP) or decompressed and incubated at atmospheric pressure conditions (DEC) (see workflow in Figure 2-4). The concentration of dissolved oxygen was monitored during the incubation using optode sensors (see section 0, Figure 2-4).

PROKARYOTIC HETEROTROPHIC PRODUCTION

Prokaryotic heterotrophic production (PHP) was measured by incorporating L-[4,5-³H]-Leucine, (³H-Leu, 109 Ci mmol⁻¹ of specific activity, PerkinElmer®) to get a final concentration of 10 nM. Saturation concentrations were defined by multi-concentration kinetic experiments (data not shown) and according to previous experiments (e.g. [Tamburini et al. 2002](#)). Transfer and sub-sampling of high-pressure samples were performed using the PHMP 600-600 piloted pressure generator to ensure that hydrostatic pressure was maintained throughout the procedure within the MIO-HPLab (certified for the use of radiolabeled compounds). Figure 2-3 and Supplementary Figure 2-4 present an example of the transfer from the HPB containing the 3000 m-samples, obtained with the HPSU (HPB1), and the HPB pre-filled with the ³H-Leu (HPB2). In this case, forty millimeters of deep-sea samples were transferred into 3 independent HPBs, amended with ³H-Leu, for samples maintained at *in situ* pressure conditions (HP).

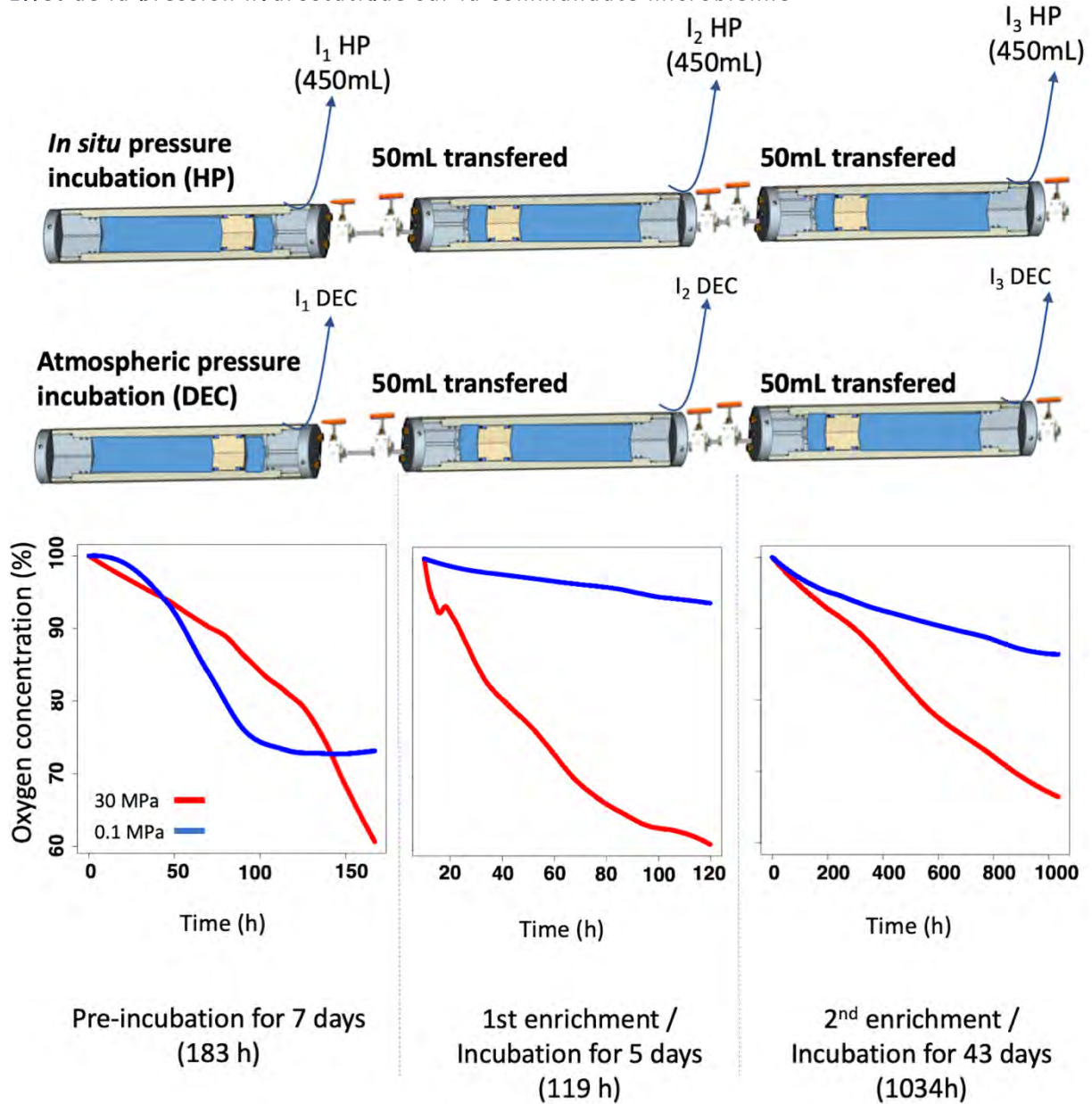


Figure 2-4 Timeline of the incubation experiment. Deep-sea samples were recovered at 3000 m-depth and incubated at *in situ* pressure conditions (HP) or after decompression at atmospheric pressure conditions (DEC). Samples were firstly incubated at *in situ* temperature over 7 days. Then, the second incubation was made by transferring, in equi-pressure mode for each condition, 50 mL of the first incubated sample into a new high-pressure bottle (HPB) containing 450 mL of 0.2 μ m-filtrated and sterilized seawater, sampled at the same depth. The remaining 450 mL of the first-incubated HPBs were then quickly sampled and conditioned for sequencing analysis (T_0 HP and T_0 DEC). At the end of the 2nd incubation, a third incubation was made according to the same protocol. At the end of each incubation the remaining 450 mL was conditioned for sequencing analysis and named T_1 HP/ T_1 DEC and T_2 HP/ T_2 DEC, respectively. Dissolved-oxygen concentration was used to determine the incubation time. Graph plots represent dissolved-oxygen concentration (expressed in percent of initial dissolved-oxygen concentration) against time (h).

In parallel, triplicate 40 mL formaldehyde-killed blanks and triplicate 40 mL decompressed atmospheric pressure (DEC) samples were incubated with a final concentration of 10 nM of 3 H-Leu. All the replicates (3 HP, 3 DEC, 3 blanks) were incubated at *in situ* temperature (13°C) in a

Peltier-cooled incubator (Mettmert® IPP750 plus). After 10 hours of incubation, samples were fixed with 2% final concentration formaldehyde and stored at 4°C until filtration. The following protocol is detailed in [Kircham \(1993\)](#). To calculate the prokaryotic heterotrophic production, we used the empirical conversion factor of 1.55 ng C pmol⁻¹ of incorporated ³H-Leu according to [Simon and Azam \(1989\)](#) assuming that isotope dilution was negligible under these saturating concentrations. The concentration of ³H-Leu within HPBs was checked at the end of the experiment based on 100 µL of samples.

IN SITU OXYGEN CONSUMPTION

To measure, dissolved oxygen consumption inside HPBs, we modified the top end-cap of the HPB with a sapphire window for optical measurement (see details in 'High-pressure bottles' section and Supplementary Figure 2-1). We have adapted an available solution based on an optical method using a non-invasive planar optode method which provides high-frequency measurements. The optical oxygen-sensor spot was glued with silicon glue onto the sapphire window directly inside the HPB rather than using a flow-through cell as in the pressure incubation system of [McNichol et al. \(2016\)](#). The oxygen sensor, containing the photoluminescent quenching dye, is produced by Presens GmbH® (Pst3, detection limit 15 ppb, ≈ 0.47µM) or by PyroScience GmbH® (OXSP5, detection limit 0.3µM). On the other side of the sapphire window, a polymeric optic-fiber was held against the sapphire window and was connected to a data logger. We used OXY-10 mini device for Presens GmbH® or FireStingO2 (fiber-optic oxygen meter) coupled to TeX4 (temperature extension module) for PyroScience GmbH®. Both data loggers shone a beam of light at a precise wavelength (for Presens 485 nm/620 nm, for PyroScience 620 nm/760 nm) onto the optode spot from the outside. Oxygen concentration data were then collected every minute during the incubation. Particular attention must be given to maintaining a constant temperature (here the samples were maintained at 13±0.1°C) during the whole incubation to avoid a temperature sensor dependence signal during the experiment. The optodes were calibrated manually using a two-point calibration procedure. All optodes are intercalibrated individually and intercompared.

Hydrostatic pressure, temperature and salinity are compensated for using algorithms proposed by [McNeil and D'Asaro \(2014\)](#) and [McNeil and D'Asaro \(2014\)](#). In the Figure 2-4,

dissolved oxygen concentration is expressed as a percentage of initial concentration to normalize the differences in absolute concentration at the initial time of each incubation.

DNA AND RNA EXTRACTION AND PCR AMPLIFICATION

The 16S-rDNA (revealing all taxa present in a given sample) and 16S-rRNA (revealing taxa actively transcribing RNA) were taken from the same filter. 16S-rDNA and 16S-rRNA were extracted on two different pieces of filter. Each piece of filter was treated with TE-Lysis buffer (20 mM Tris, 25 mM EDTA, 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ Lysozyme) followed by 10% SDS. The extractions were performed twice with an equal volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol pH8 16S-rDNA and pH 6 16S-rRNA. Then 16S-rRNA samples were treated with TurboDNase™ (Ambion®, Thermo Fisher Scientific Corp.) and reverse transcribed into cDNA by RT-PCR using SuperScript® IV Reverse Transcriptase with random primers (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific Corp.). For ribosomal diversity analysis, the V4 region of the bacterial and archaeal 16S rDNA genes and 16S cDNA product were amplified using universal primer sets (Caporaso et al., 2012), 515F-Y (5' -GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3', Parada et al. (2016)) and 806RB (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3', Apprill et al. (2015)) and using 2.5U/50 μL TaKaRa PrimeSTAR® GXL DNA polymerase (OZYME). The 16S amplicons were sequenced by the MiSeq Illumina (paired end 2* 250) platform GeT of Genotoul (<https://get.genotoul.fr/en/>). 16S-rDNA and 16S-rRNA raw reads sequences are deposited on public database GeneBank (accession number are ranged between SRR8503024 to SRR8503035).

2.2.8 16S rDNA/rRNA SEQUENCES ANALYSIS

The paired-end raw reads were firstly overlapped and merged by platform GeT of Genotoul. The analysis of the 16S-assembled data relied on the use of QIIME 1.91 (Ramírez-Guzmán et al., 2004; Kuczynski et al., 2012). The removal of low quality bases and chimera sequences were performed by QIIME 1.91 script and UCHIME (Edgar et al., 2011), respectively. The high-quality sequences were then clustered into the Operational Taxonomic Unit (OTU) using the UCLUST algorithm and a threshold of 97% of sequence identity. The taxonomic assignment of representative sequences of OTUs was performed using the SILVA123 database (Edgar, 2010; Quast et al., 2013). The OTU table was filtered for low abundance OTUs (Bokulich et al., 2013). Finally, sub-sampling normalization, alpha and beta diversity were characterized

by Phyloseq, an open-source software package project for R (www.r-project.org) (R Core Team, 2008; McMurdie and Holmes, 2013).

2.3 RESULTS AND DISCUSSION

In this article, we describe a field application using the pressure-retaining sampler and high-pressure systems that we developed. Samples taken from 3000 m-depth were obtained in the Mediterranean Sea during the multidisciplinary cruise PEAcETIME in May 2017. Three HPSUs were implemented on the CTD-carousel used during the PEAcETIME cruise, one HPSU dedicated to the measurement of prokaryotic heterotrophic production (PHP) and the other two for the incubation experiment described in Figure 2-4.

2.3.1 PROKARYOTIC ACTIVITY MEASUREMENTS

The prokaryotic heterotrophic production (PHP) measurements were performed to characterize the prokaryotic community lifestyle status with respect to hydrostatic pressure (Tamburini et al., 2013). PHP was 3.2-fold higher for samples maintained at *in situ* ($\text{PHP}_{\text{HP}} = 0.93 \pm 0.13 \text{ ng C L}^{-1}$, $n=3$) than those decompressed and incubated at atmospheric pressure conditions ($\text{PHP}_{\text{DEC}} = 0.29 \pm 0.01 \text{ ng C L}^{-1}$, $n=3$). Thus, the natural 3000 m-depth prokaryotic assemblage sampled can be defined globally as piezophilic (that means adapted to *in situ* pressure conditions) according to Tamburini et al. (2013) and Wannicke et al., (2015). This global adaptation of the prokaryotic assemblage to pressure is supported by the prokaryotic respiration rate (PR) measurements derived from oxygen consumption rates within the two high-pressure bottles during the incubation experiment. One set of samples was maintained at *in situ* hydrostatic pressure (HP) and the other was decompressed and incubated at atmospheric pressure (DEC). Tableau 1-1 and plots presented in Figure 2-4 summarize the O_2 -consumption results. Oxygen consumption is clearly always higher in HP than in DEC conditions as exemplified by the third incubation experiment where only 14% of the O_2 is consumed in DEC conditions compared to 34% in HP conditions after 43 days of incubation (see O_2 graph-plots in Figure 2-4). Results in Tableau 2-1 show that for each incubation experiment, PR was between 1.6 and 7.0-folds higher under *in situ* pressure conditions than in incubations carried out after decompression and incubated in atmospheric conditions. Furthermore, the sampling

strategy of the incubation experiments was adjusted using real-time monitoring of oxygen concentrations. All incubation experiments were performed until oxygen consumption reached a maximum of 40%.

Tableau 2-1 Total cells count (stained with DAPI), range of prokaryotic respiration, number of observed operational taxonomic units (OTUs), 647 16S-rDNA- and 16S-rRNA-based sequence lengths, and alpha-diversity indexes for enrichment incubation experiments (Figure 2-4).

	I1_HP	I1_DEC	I2_HP	I2_DEC	I3_HP	I3_DEC
DAPI cells count 10^5 mL^{-1}	2.05±0.33	1.97±0.29	2.39±0.36	1.73±0.25	6.78±0.79	2.01±0.32
Prokaryotic respiration ($\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (min-max)	0.55-2.5	0.15-1.15	0.32-2.39	0.09-0.22	0.07-0.15	0.01-0.09
Total number OTU 16S-rDNA-based	108	120	126	136	128	131
Total number OTU 16S-rRNA-based	129	110	139	148	109	155
Means length of sequence DNA (bp)	305.2 ± 31.3	300.2 ± 25.3	297.1 ± 20.9	299.8 ± 25.0	299.8 ± 25.0	308.0 ± 33.7
Means length of sequence RNA (bp)	300.0 ± 25.7	300.2 ± 25.3	300.0 ± 25.5	299.8 ± 25.0	302.4 ± 28.6	309.2 ± 34.5
Simpson DNA	0.77	0.40	0.77	0.85	0.90	0.87
Simpson Rarefied DNA	0.77	0.40	0.78	0.84	0.90	0.87
Simpson RNA	0.83	0.23	0.81	0.81	0.90	0.86
Simpson Rarefied RNA	0.83	0.24	0.81	0.82	0.90	0.87

2.3.2 PROKARYOTIC DIVERSITY AND COMMUNITY STRUCTURE (16S rDNA AND rRNA)

The prokaryotic diversity and community structure shifts were characterized by 16S rDNA (the resident community) and 16S rRNA (the active community) gene sequencing according to experimental conditions (HP and DEC). Beyond RNA instability and bias originating from DNA/RNA extraction and amplification, the rRNA- overcomes rDNA-based approach for detecting live prokaryotic cells in water (Li et al., 2017).

The amplicon sequencing followed by trimming and normalization processes generated 19420 16S rDNA and 16S rRNA high quality reads (average length 302 bp) per sample (Tableau 2-1). In addition, the number of observed OTUs ranged from 108 to 155 over time with no significant difference between rDNA and rRNA analysis. The decrease of the specific richness during the experiment was indicated by the Simpson index, which increases from 0.77 to 0.90 and from 0.40 to 0.87 within HP and DEC samples, respectively. Moreover, the comparison of

the OTUs relative abundances shared between rDNA and rRNA ($\log(\text{rDNA}/\text{rRNA})$) showed a distribution around the 1:1 bar, especially for the more abundant ones (Supplementary Figure 2-5). Beyond the pitfalls linked to the overestimation or underestimation of OTUs abundances, this result suggests that the active community corresponded to almost the entire resident community. This finding is fully supported by a non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis that highlighted close positions for rDNA and rRNA samples with common experimental conditions (Figure 2-5). In contrast, the shifts observed in prokaryotic community structure over time are driven by the different experimental conditions, confirming a previous study (Wannicke et al., 2015b). Indeed, HP versus DEC incubation conditions were mainly discriminated by the absence of *Colwelliaceae* and *Bacterioviraceae* in DEC incubations (NMDS1 axis). This is already the case at the end of the 1st incubation (I₁_HP vs I₁_DEC) and reinforces the results that decompression impacts not only prokaryotic activity as shown in this study and elsewhere (Tamburini et al., 2013; Wannicke et al., 2015) but also effects the community composition (La Cono et al., 2009, 2015) or the gene expression (Edgcomb et al., 2016).

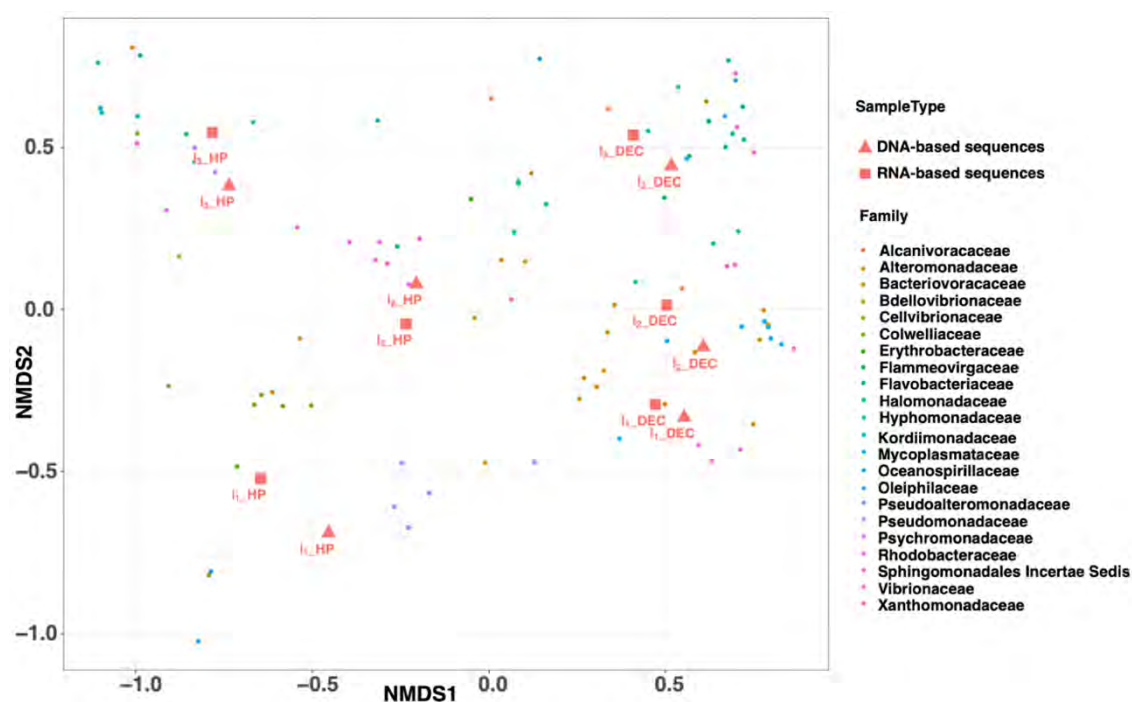


Figure 2-5 NMDS ordination plot (Bray–Curtis distance matrix) from incubation experiment performed with deep-seawater sample maintained at *in situ* condition (HP) and after decompression and incubated at atmospheric pressure (DEC). This graph shows two clusters: on one side the HP samples and on the other the DEC samples. Prefix D and R before the name for the sample is for DNA- or RNA-based sequences, respectively. The NMDS stress is equal to 0.03.

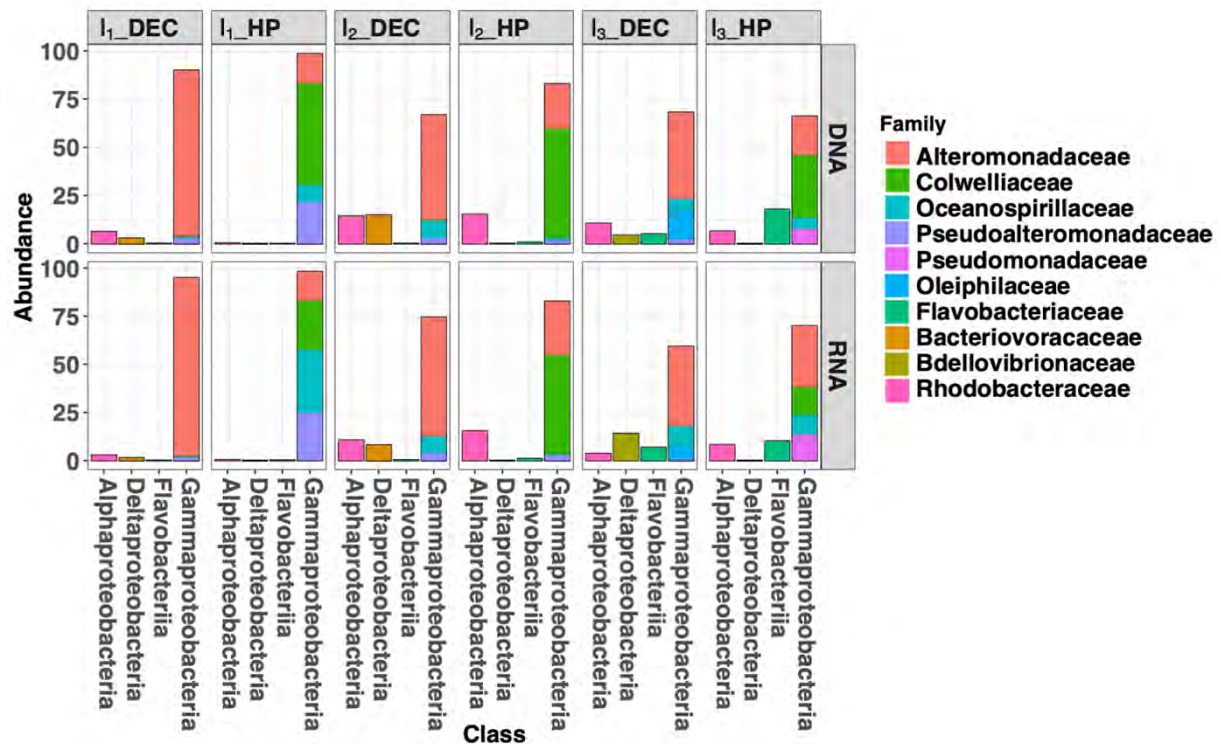


Figure 2-6 Bar plot of the ten most abundant families into the four main classes during incubation experiments of deep-seawater samples maintained at *in situ* pressure conditions (HP) and after decompression and incubated at atmospheric pressure conditions (DEC).

For each experimental condition (HP and DEC), variation in community structure over time (incubation time-series) was observed and driven by the NMDS2 axis (Figure 2-5). This suggests that sufficient carbon and energy is available in the deep-sea water sampled at 3000 m-depth used as the 'medium' in our incubation experiments. Figure 2-6 shows the shifts in prokaryotic community structure from the ten most abundant families (corresponding to four classes) during the course of the incubation experiments. After the 1st incubation experiment (I₁) no *Archaea* were detected in either condition whilst they can reach 50% of the prokaryotic community in the deep ocean (Herndl et al., 2005; Karner et al., 2001; Tamburini et al., 2009). The absence of *Archaea* genes sequenced in the incubation experiment is confirmed by the RT-qPCR quantification showing more than 4-orders of magnitude between the number of *Archaea* and *Bacteria* gene copies per milliliter (data not shown). In DEC conditions (I₁_DEC), the class *Gammaproteobacteria* accounted for 93% of the total sequences and was almost exclusively represented by the family *Alteromonadaceae* (Figure 2-6). Conversely, in HP conditions (I₁_HP), the prokaryotic community was also dominated by the class *Gammaproteobacteria* (99% of the total sequences) but included various families such as *Alteromonadaceae*, *Oceanospirillaceae*, *Pseudoalteromonas* and *Colwelliaceae*. The family

Alteromonadaceae accounted only for 15% (of both 16S rDNA- and rRNA sequences), while *Colwelliaceae* dominated with 53% and 25% of 16S rDNA- and rRNA sequences, respectively. In our study, the family *Colwelliaceae* was mainly made up of the genus *Colwellia* (more than 50%) which contained isolates described as piezophilic (Deming et al., 1988; Nogi et al., 2004; Elloe et al., 2011b). The proportions of family *Pseudoaltermonadaceae* reached 22 and 25% of 16S rDNA- and rRNA sequences, respectively. Interestingly, *Oceanospirillaceae* represented 9% of 16S rDNA sequences but 33% of 16S rRNA sequences at I₁_HP. The family *Oceanospirillaceae* is one of the rare families containing piezophilic isolates (Cao et al., 2014).

At the end of the third incubation experiment (I₃, Figure 2-4), the active community (rRNA) of the *Gammaproteobacteria* decreased around 60% and 70% in DEC and HP conditions, respectively. Under DEC conditions, this decrease was in favor of *Bdellovibrionaceae* (family *Deltaproteobacteria*) which is mainly represented by the genus OM27, previously described as bacterial predatory (Fuchs et al., 2005; Orsi et al., 2016) and was only found in the DEC condition. This result suggests that high hydrostatic pressure could initiate growth repression of these microorganisms within this family. In contrast, at I₃_HP, an increase in the abundance of families *Rhodobacteraceae* (*Alphaproteobacteria* class) and *Flavobacteriaceae* (*Flavobacteria* class) was observed and reached 10 and 8% of the rRNA total sequences, respectively. Both of these families were absent from the 'active community' at I₁_HP. The family *Rhodobacteraceae* was found in both DEC and HP conditions in proportions ranging from 6 to 15% and are ubiquitous from the surface to the deep ocean (Moran et al., 2003). Members of the family *Flavobacteriaceae* have shown the ability to degrade high molecular dissolved organic matter (HMW-DOM) such as chitin, agar or particulate organic matter (POM) that characterize the deep-sea environment (Kirchman, 2002; Fernández-Gómez et al., 2013). It is widely known that the deep-sea waters are depleted in carbon and energy sources. Consequently, deep-sea microorganisms harbored unique metabolic capabilities with respect to the degradation of complex organic matter and were supported by genomic and transcriptomic analysis (Vezzi et al., 2005; Delong et al., 2006) as well as the measurements of degradation of refractory organic matter in deep water compared with surface water (Boutrif et al., 2011; Hoppe and Ullrich, 1999; Tamburini et al., 2009; Teira et al., 2006).

2.4 CONCLUSION AND PERSPECTIVES

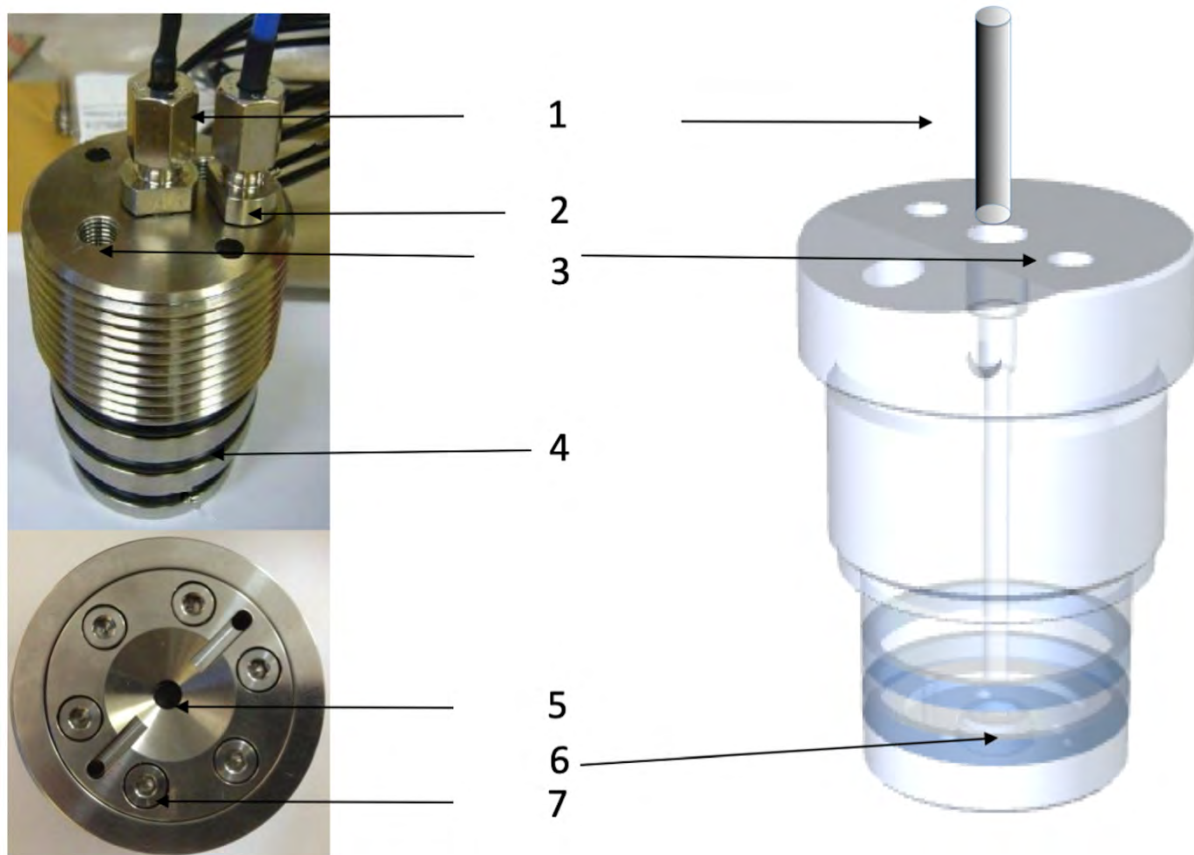
Conserving the *in situ* conditions when sampling the deep ocean is becoming a major concern for the scientific community and many have tried to find solutions to sample without decompressing the samples. For example, Shillito and collaborators developed PERISCOP to sample deep-sea macro-organisms (e.g. shrimps, crabs), under *in situ* conditions without decompression issues. This was then adapted by BALIST into IPOCAMP for use in physiology and behavioral experiments (Shillito et al., 2008, 2014; Ravaux et al., 2013). Likewise, McNichol et al. (2016) developed a specific device to sample hydrothermal vent fluids under *in situ* conditions and to study microbial metabolism associated with fluid biogeochemistry. Peoples et al. (2019) proposed a pressure-retaining sampler (coupled to a Lander) capable of collecting hadal seawaters under *in situ* conditions during recovery. Finally, Parkes and coll. (2009) have proposed high-pressure sampler systems to study prokaryotic subseafloor sediments.

Based on the prototype proposed by Bianchi et al (1999) and our experience with more than 200 deep-water samples collected under *in situ* pressure conditions, we propose a 6000 m-seawater pressure-retaining sampler ready-to-use for the scientific community. The various improvements implemented promote the success of high-pressure sampling, sub-sampling and transfer of samples in equi-pressure mode with replicate. In addition, our system provides (it is also possible to make) direct measurements of oxygen consumption at high hydrostatic pressure as well as the use of radiolabeled compounds in accordance with health and safety standards. Such methodology can be an outstanding tool in isolating new piezophilic strains without any pressure losses during the experiment.

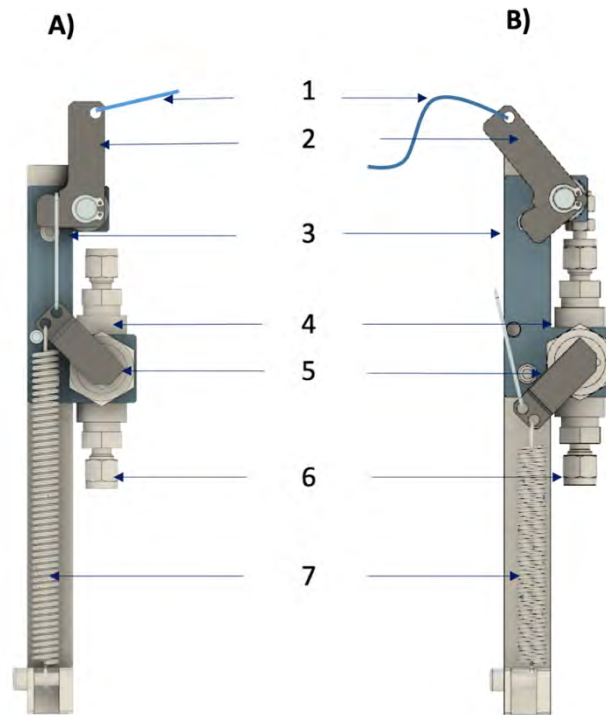
Apart from collecting samples and maintaining them under *in situ* conditions, it is important to note that this system and specifically HPBs are versatile. For example, PEEK-coated HPBs can be selected for cultivation under anoxic conditions (e.g. sulfato-reducing bacteria) they don't corrode. HPBs and piloted pressure generators can be used to perform laboratory experiments such as for sinking particle simulation experiments (Riou et al., 2017; Tamburini et al., 2009; Tamburini et al., 2006). To our knowledge, at least several teams have already achieved the same pressure-retaining sampler (Deep Carbon Observatory, DCO – Sloan Foundation; Hadal Science and Technology Research Center, HAST, Shanghai, China; Sanya Institute of Deep Sea Science and Engineering, SIDSSE, China Academy of Science).

The incubation experiment, presented in this study, is an example of a field application using the pressure-retaining sampler and associated high-pressure systems. This illustrates its fully operational use during our field experiment dedicated to deep-sea microbial oceanography. Using prokaryotic diversity and community structure based on 16S rDNA- and rRNA-sequences, we have shown that the diversity decreased in both HP and DEC conditions and that the community structure evolved differently according the pressure conditions. Further studies will be conducted to reveal the metabolic pathways and microbial taxa involved in the biogeochemical transformation of the organic matter in the dark ocean, as many important ecological and biogeochemical processes, linked to the biological carbon pump, take place in this the largest habitat of the biosphere.

2.5 SUPPLEMENTARY INFORMATION



Supplementary Figure 2-1 Top end cap with optic measurement. 1) Optic fiber, 2) Temperature sensor (pt100), 3) Inlet/outlet 1/8" diameter (3.2 mm O.D.), 4) O'ring, 5) Planar optode (diameter 5mm), 6) Sapphire window, 7) Titanium screw.



Supplementary Figure 2-2 Schematic drawing of sampling valve fitted on HPSU. 1. Nylon wire; 2. Stainless steel trigger; 3. Stainless steel frame for valve; 4. Modified swagelock valve (réf : SS-84PS4); 5. Modified handle to link trigger at spring; 6. sample inlet, 7. spring. In this view sampling valve is set in close position before sampling (A). At the sampling depth nylon wire is disconnected to carousel trigger, modified Swagelock® valve move to opening position performing a quarter of a rotation by power of the extended spring (B).

Chapitre 2
Effet de la pression hydrostatique sur la communauté microbienne



Supplementary Figure 2-3 Photograph showing different point of view of MIO-HPLab. This mobile laboratory has been constructed in a 20 feet container. It is composed of two piloted pressure generators, four temperature regulated water baths with two temperature coolers dedicated for HPSU and PASS experiments (Tamburini et al., 2009), and a reinforced Peltier-cooled incubator Memmert IPP 750 oven for HPBs incubation. The mobile laboratory (MIO-HPLab) is also certified to use radiolabeled during oceanographic cruises.

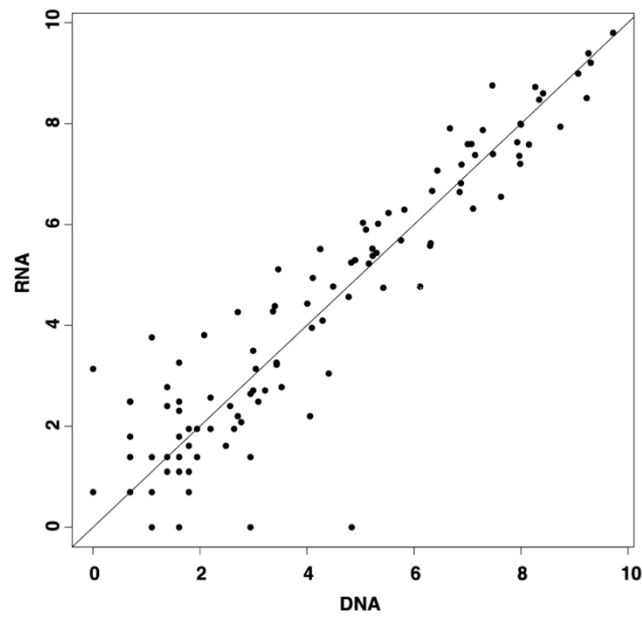
Chapitre 2

Effet de la pression hydrostatique sur la communauté microbienne

Click on hyperlink to download movie (Supplementary Video 1)

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00453/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 2-4 An animated diagram showing a transfer in equi-pressure mode between two HPBs. HPB1 is the high-pressure bottle containing the 3000 m-depth sample maintained under *in situ* pressure conditions. HPB2 is the high-pressure bottle containing radiolabeled compounds, such as, ^3H -Leucine to measure prokaryotic heterotrophic production. Forty milliliters of 3000 m-depth seawater sample from HPB1 are transferred into HPB2 containing 10nM of aqueous ^3H -Leucine. This process is performed, securely, in replicate inside the mobile MIO-HPLab.



Supplementary Figure 2-5 RNA:DNA ratios from RNA-based and DNA-based relative log transformed abundance of OTU. This ratio enables us to estimate a proportion of active prokaryote for each sample. The black line is 1:1 bar. OTU are distributed around the line which indicates that the microbial communities identified in the sample are also active.

Click on hyperlink to download movie (Supplementary Video 2) :

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.00453/full#supplementary> material.

Supplementary Figure 2-6 Animated schematic drawing in transparency of the front and back views of the High-Pressure Sample Unit (HPSU). A) During the descent of the CTD-carousel. The inlet valve is in close position; B) During the sampling at the chosen depth after firing the CTD-Carousel and the inlet valve is in open position. The numbers are the same than in figure 1: 7. exhaust tank; 8. Polypropylene main frame; 9. Push rod for attachment to a rosette system. When the (10) inlet valve is opened by magnetically activated lanyard release, the seawater enters the hydraulic circuit through a 1/8" (3.2 mm O.D.) stainless-steel tube (11), via one check valve (12), to fill in the HPB (13), the pressure accumulator (14) and the aero-hydraulic pressure sensor (15).

2.6 DONNÉES COMPLÉMENTAIRES

2.6.1 PREAMBULE

L'article 1 présenté dans ce chapitre, souligne un effet de l'échantillonnage sur la composition de la communauté procaryotique profonde. S'il n'est plus à démontrer l'impact de l'échantillonnage sur les activités microbiennes ([Bianchi and Garcin, 1993, 1994; Tamburini et al., 2003, 2013a](#)), il n'en reste pas moins qu'il n'existe peu d'études portant sur l'impact de l'échantillonnage sur la structure des communautés procaryotiques et l'expression génétique ([La Cono et al., 2009, 2015; Taylor et al., 2015; Edgcomb et al., 2016](#)). Ce premier article est donc un démonstrateur sur les potentialités de notre équipement, disponible commercialement, en termes d'isolement de nouvelles souches de procaryotes en maintenant les conditions environnementales. L'article 1 met en évidence un suivi des communautés procaryotiques durant trois incubations dans deux conditions :

- HP : le prélèvement, les transferts et les incubations ont été maintenus dans les conditions de pression et de température durant toute l'expérimentation (soit 43 jours)
- DEC : les échantillons ont été décomprimés puis incubés à pression atmosphérique durant toute l'expérimentation (soit 43 jours)

Cependant, en raison du délai de séquençage les résultats publiés sont incomplets, les incubations suivantes ont été séquencées dans un deuxième temps (incubation 4 HP et l'échantillon d'eau de mer prélevé à 3000m avec une bouteille Niskin). En effet l'expérimentation a duré 54 jours de plus. Une quatrième incubation a donc été effectuée pour les échantillons HP et DEC (I₄ HP et I₄ DEC, respectivement). Après I₄, pour la condition DEC, il y a une accélération de la consommation d'oxygène dissous, par conséquent, j'ai dû faire un transfert supplémentaire ce qui a donné lieu à une cinquième incubation (I₅ DEC). J'ai résumé le protocole dans la Figure 2-7. En plus des incubations, un prélèvement a été effectué avec une bouteille Niskin au même moment de l'échantillonnage initial, puis séquencé. L'ensemble des données issues du séquençage (celles de l'article et celles des incubations complémentaires) ont été ré-analysées au moyen de QIIME 1.94 avec l'algorithme décrit dans [Garel et al., \(2019\)](#).

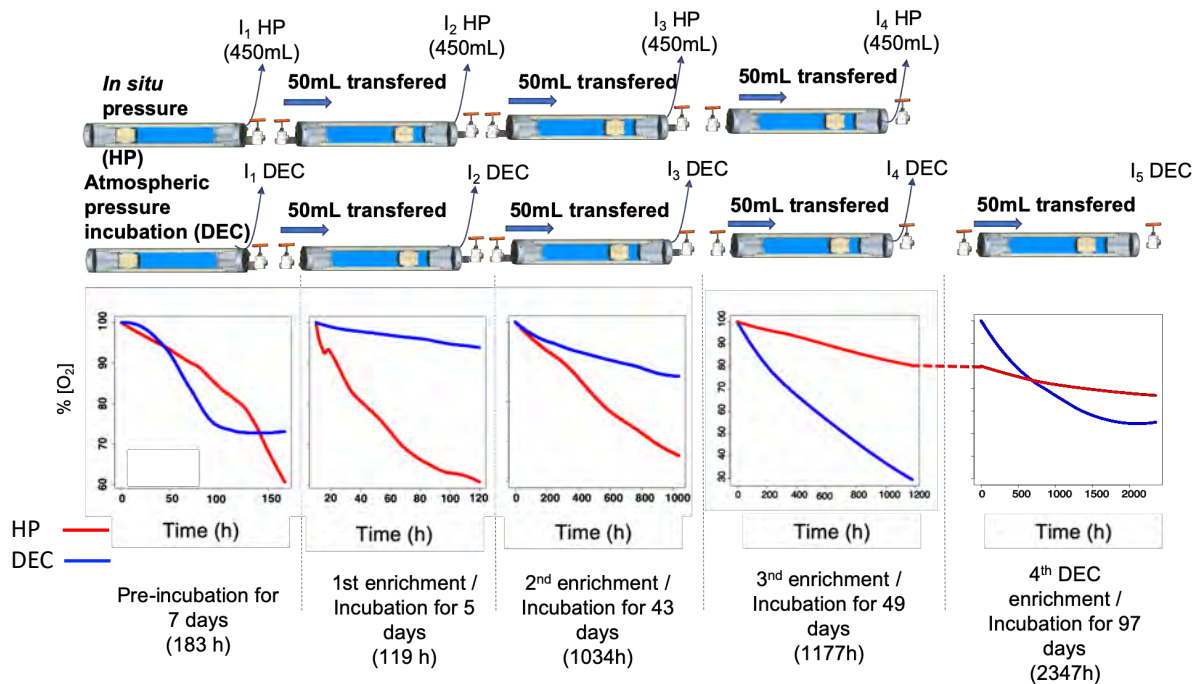


Figure 2-7 Chronologie de l'expérience d'incubation. Des échantillons d'eau profonde ont été récupérés à 3000 m de profondeur et incubés à des conditions de pression *in situ* (HP) ou après décompression à des conditions de pression atmosphérique (DEC). Les échantillons ont d'abord été incubés à la température *in situ* pendant 7 jours. Ensuite, la seconde incubation a été réalisée en transférant, en mode équipression pour chaque condition, 50 mL du premier échantillon incubé dans une nouvelle bouteille haute pression (HPB) contenant 450 mL d'eau de mer filtrée à 0,2 µm et stérilisée, échantillonnée à la même profondeur. Les 450 mL restants des HPB incubées en premier ont ensuite été rapidement échantillonnés et conditionnés pour l'analyse de séquençage (T0 HP et T0 DEC). Les incubations suivantes ont été faites selon le même protocole. La concentration d'oxygène dissous a été utilisée pour déterminer le temps d'incubation. Les graphiques représentent la concentration d'oxygène dissous (exprimée en pourcentage de la concentration initiale d'oxygène dissous) en fonction du temps (h).

2.6.2 SYNTHÈSE DES RESULTATS

IMPACT DES TRANSFERTS SUCCESSIFS SUR L'ALPHA-DIVERSITE

Pour montrer l'impact des transferts successifs sur la diversité, j'ai utilisé l'indice de Simpson qui représente la probabilité que deux individus tirés au hasard appartiennent à la même espèce. S'il y a beaucoup de diversité dans un échantillon, l'indice tend vers 0, alors que si la diversité est faible l'indice tend vers 1. La Figure 2-8, ci-dessous, montre l'évolution de la diversité au cours des transferts successifs.

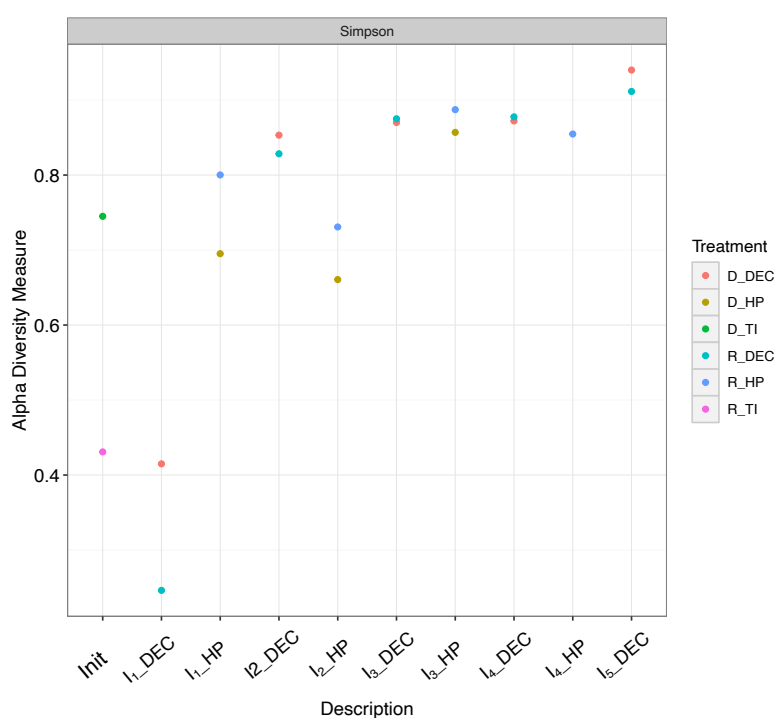


Figure 2-8 Évolution de l'alpha-diversité au cours des différentes incubations mesurées à l'aide de l'indice de Simpson. Le préfixe D et R dans la légende graphique sont DNA et RNA, TI est pour l'échantillon initial prélevé à l'aide de la bouteille Niskin, HP sont pour les incubations maintenues dans les conditions *in situ* de pression hydrostatique et DEC sont pour les incubations décompressées puis incubées à pression atmosphérique.

Comme je l'ai déjà démontré dans l'article 1 [Garel et al., \(2019\)](#), la diversité spécifique (basée sur le DNA et le RNA) diminue au fur et à mesure des transferts, passant de 0.77 à 0.90 et 0.40 à 0.91 pour les échantillons HP et DEC respectivement. L'échantillon prélevé à la bouteille Niskin à un indice de Simpson compris entre 0.43 (basé sur le DNA) et 0.73 (basé sur le RNA).

IMPACT DES INCUBATIONS SUCCESSIVES SUR LA STRUCTURE DE LA COMMUNAUTE

Pour décrire l'évolution successive des communautés de procaryotes au cours du temps, j'ai repris la présentation graphique des Figure 2-5 et Figure 2-6 de l'article 1, dans lesquels j'ai implémenté les données des derniers séquençages. Les résultats sont présentés dans les figure 2-5 et 2-6 modifiées de l'article 1, ci-après notées Figure 2-9 et Figure 2-10.

La Figure 2-9 est une représentation d'une analyse NMDS utilisant une matrice de similarité (Bray-Curtis). Dans cette représentation, NMDS1 discrimine les échantillons au cours du temps, et NMDS2 discrimine les échantillons par rapport aux conditions de prélèvement et d'incubation. Tout comme la Figure 2-5 de l'article 1, les conditions de prélèvement et d'incubation sont les critères principaux marquant la dissimilarité entre les deux conditions de HP et DEC. De plus, concernant les échantillons notés 'Init' (provenant de l'échantillonnage à la bouteille Niskin avant de débiter les incubations), la Figure 2-9 montre que les échantillons basés sur le séquençage de l'ARNr sont différents de ceux provenant du séquençage de l'ADN, contrairement aux autres échantillons. Ce qui signifie que la communauté dite « potentiellement active » (identifiée à partir des transcrits de gène codant pour 16S) est différente de la communauté identifiée à partir du gène. Les auteurs [Edgcomb et al. \(2016\)](#) et [La Cono et al. \(2015\)](#) ont montré que l'échantillonnage classique avec une bouteille Niskin avait un effet sur la qualité de l'échantillon, provenant de la zone bathypélagique, au niveau de la diversité spécifique et de la transcription des gènes. Le temps d'échantillonnage ainsi que le conditionnement de l'échantillon entraînent des changements physiologiques chez les microorganismes altérant l'analyse barcode basée sur les ARN. Ces résultats 'Init' sont donc à prendre avec précaution puisqu'ils sont décomprimés et ne représentent donc pas la réalité de la diversité *in situ*. Il faut noter, également que les échantillons notés 'Init' sont plus proches des incubations effectuées à pression atmosphérique après décompression que celles maintenues dans les *in situ* conditions de pression. Ils sont dominés par la famille des *Alteromonadaceae* avec une abondance relative de 52,8 % (Tableau 2-2).

Chapitre 2
Effet de la pression hydrostatique sur la communauté microbienne

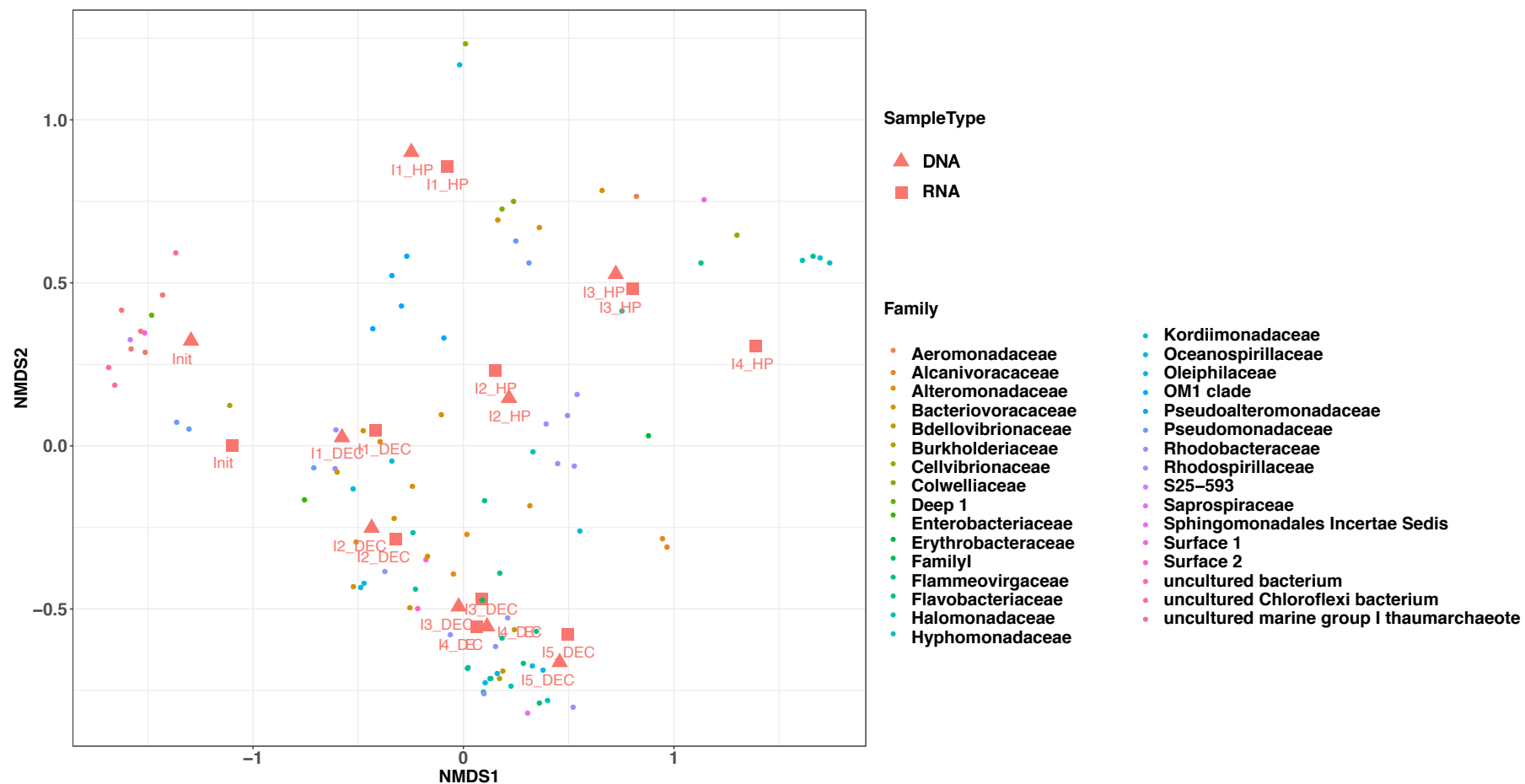


Figure 2-9 Graphique d'ordination du NMDS (matrice de distance Bray-Curtis) d'une expérience d'incubation réalisée avec un échantillon d'eau profonde maintenu à l'état *in situ* (HP) et après décompression et incubé à la pression atmosphérique (DEC). Ce graphique montre deux grappes : d'un côté les échantillons HP et de l'autre les échantillons DEC. Les préfixes D et R avant le nom de l'échantillon correspondent à des séquences à base d'ADN ou d'ARN, respectivement. Le stress du NMDS est égal à 0,09.'

La Figure 2-10 est une modification de la Figure 2-6 dans laquelle d'une part j'ai implémenté les dernières incubations, d'autre part j'ai dû sélectionner les 15 familles les plus abondantes au lieu des 10 majoritaires présentées dans l'article. Je rappelle qu'il y a un décalage temporel entre I4_HP et I4_DEC. Ce décalage est dû à une accélération de la respiration (données non montrées) dans la condition DEC, par conséquent, afin d'éviter l'anoxie dans mon incubation j'ai dû procéder à un transfert supplémentaire. Cela a donné lieu à une cinquième incubation dans la condition DEC. Les incubations I4_HP et I5_DEC ont été arrêtées au même moment.

Comme décrit dans [Garel et al. \(2019\)](#) la communauté de procaryotes de la condition DEC est dominée par la classe des *Gammaproteobacteria* et la famille des *Alteromonadaceae* jusqu'à l'incubation I4 passant de 85,5 à 32.9 % et de 92.9 à 48 %, respectivement pour les séquences basées sur l'ADNr (gène codant pour l'ARNr 16S) et les séquences basées sur l'ARNr (les transcrits) (Tableau 2-2). Cette diminution des *Alteromonadaceae* est au profit des familles des *Oceanospirillaceae* et des *Rhodobacteraea* avec des abondances relatives inférieures à 1 % dans I1 et deviennent dominantes dans I5 avec une abondance relative supérieure à 10 %. Dans l'article 1, nous avons souligné une augmentation de la famille *Bdellovibrionaceae*, membre des *Deltaproteobacteria* jusqu'à I3, mais qui diminue après I4 jusqu'à atteindre des valeurs de 0.1 et 0.3 % respectivement pour les séquences basées sur l'ADNr et l'ARNr dans I5. L'incubation I5 est également marquée par une multiplication de 2 à 3 de l'abondance relative des familles *Hyphomonadaceae* et *Alcanivoracaceae* atteignant ainsi une abondance relative de 11.8 % et 13.8 % pour les séquences basées sur l'ARNr présentes toutes deux dans de nombreux habitats profonds ([Abraham and Rohde, 2014](#); [Silveira and Thompson, 2014](#)).

Ces changements de familles dominantes sont aussi remarquables dans la dernière incubation I4_HP. En effet dans [Garel et al. \(2019\)](#), l'étude montre que dans l'incubation I3 les *Colwelliaceae* sont dominantes avec des abondances relatives comprises entre 25 et 50 %, suivies par les *Rhodobacteraceae* et les *Flavobacteriaceae* avec des abondances relatives comprises entre 10 et 8 %. Dans la dernière incubation, les *Colwelliaceae* diminuent jusqu'à atteindre 1 % (Figure 2-10 et Tableau 2-2). Les familles de *Erythrobacteraceae* et *Kordiimonadaceae* appartenant à la classe des *Alphaproteobacteria*. Ces familles sont décrites comme pouvant exister dans un grand nombre d'environnements ([Tonon et al., 2014](#); [Xu et al., 2014](#)).

Chapitre 2

Effet de la pression hydrostatique sur la communauté microbienne

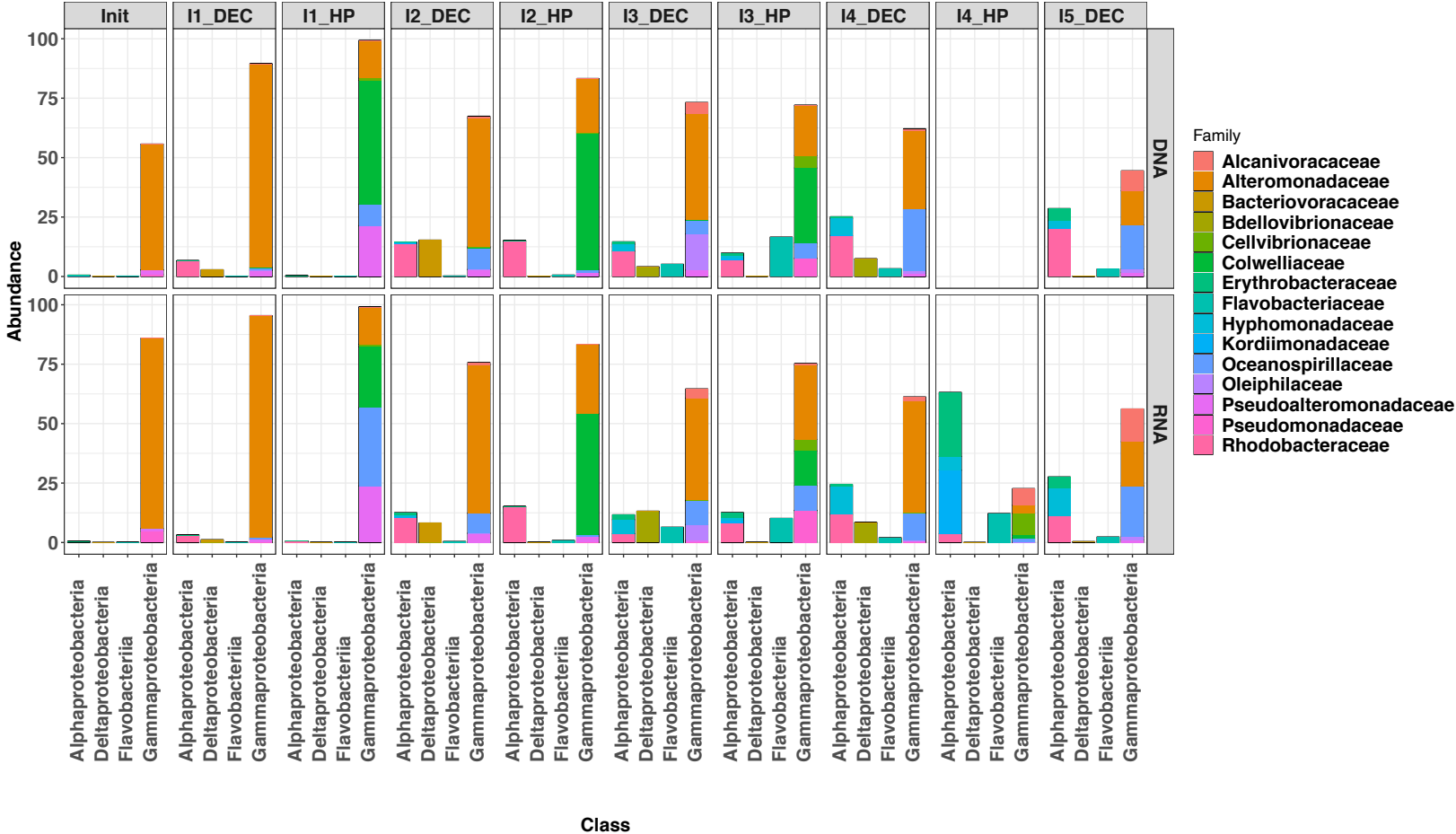


Figure 2-10 Diagramme à barres des quinze familles les plus abondantes dans les quatre classes principales pendant les expériences d'incubation d'échantillons d'eau profonde maintenus à des conditions de pression *in situ* (HP) et après décompression et incubés à des conditions de pression atmosphérique (DEC).

Chapitre 2

Effet de la pression hydrostatique sur la communauté microbienne

Tableau 2-2 Abondance relative des 15 familles les plus abondantes provenant du séquençage du gène codant pour l'ARN 16S (DNA), des transcrits (RNA)

Family	DNA									RNA									
	Init	I1_HP	I1_DEC	I2_HP	I2_DEC	I3_HP	I3_DEC	I4_DEC	I5_DEC	Init	I1_HP	I1_DEC	I2_HP	I2_DEC	I3_HP	I3_DEC	I4_DEC	I4_HP	I5_DEC
Alcanivoracaceae	0.1	0.0	0.2	0.0	0.7	0.3	4.8	0.8	8.3	0.0	0.0	0.2	0.0	0.9	0.7	3.9	1.7	7.0	13.8
Oleiphilaceae	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	15.2	0.9	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	6.7	0.5	0.0	1.3
Pseudoalteromonad	1.8	21.3	2.5	1.6	2.9	0.2	2.6	1.3	1.6	1.0	23.5	1.2	2.6	3.8	0.0	0.7	0.3	0.0	1.2
Colwelliaceae	0.0	52.1	0.4	57.4	0.5	31.6	0.1	0.1	0.0	0.0	25.6	0.3	50.7	0.1	14.6	0.2	0.0	1.3	0.0
Pseudomonadaceae	0.9	0.0	0.0	0.1	0.1	7.5	0.1	0.1	0.0	4.8	0.3	0.1	0.1	0.0	13.4	0.1	0.2	0.0	0.0
Hyphomonadaceae	0.0	0.0	0.0	0.1	0.4	1.1	2.9	7.2	3.1	0.0	0.0	0.1	0.1	1.0	1.2	5.9	11.8	5.8	11.8
Erythrobacteraceae	0.2	0.0	0.0	0.1	0.2	0.9	1.0	0.7	5.1	0.2	0.0	0.1	0.1	0.9	2.1	2.1	0.8	27.0	4.6
Kordiimonadaceae	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	26.6	0.0
Rhodobacteraceae	0.3	0.3	6.6	15.0	13.9	6.7	10.6	17.3	20.3	0.3	0.5	3.0	15.0	10.6	8.3	3.7	11.8	3.7	11.2
Bdellovibrionaceae	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	3.7	7.3	0.1	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	13.1	8.3	0.0	0.3
Oceanospirillaceae	0.1	9.1	0.8	1.3	8.9	6.3	5.8	26.0	18.5	0.1	32.9	0.6	0.8	8.4	10.5	10.0	11.5	1.9	21.4
Flavobacteriaceae	0.1	0.1	0.1	0.6	0.2	16.6	5.1	3.2	3.1	0.1	0.2	0.1	0.9	0.4	10.1	6.4	2.0	12.2	2.3
Bacteriovoracaceae	0.0	0.0	2.8	0.0	15.3	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	8.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Cellvibrionaceae	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	5.2	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	4.9	0.0	0.0	9.1	0.0
Alteromonadaceae	52.8	15.8	85.5	22.8	54.2	21.0	44.6	32.9	14.4	80.0	15.6	92.9	29.0	62.4	31.2	43.0	47.1	3.4	18.5

ÉVOLUTION DE LA COMMUNAUTÉ DOMINANTE DANS LES CONDITIONS *IN SITU* DE PRESSION

Dans la Figure 2-11 Évolution des familles dominantes dans les incubations maintenues dans les conditions *in situ* de pression. ci-dessous, je mets en exergue le changement de la communauté dans I₄_HP. Toutes les incubations ont été réalisées avec de l'eau de mer stérile provenant du site de prélèvement. Les *Colwelliaceae* dominent dans I₁ et I₂ puis commencent à diminuer en I₃ pour être minoritaires en I₄. Cela suggère que l'apport d'une nouvelle eau pour chaque incubation ne suffit pas à soutenir la croissance des *Colwelliaceae*. Cette famille a été remplacée par des organismes plus opportunistes pouvant se développer dans des conditions plus oligotrophes avec des sources de carbone plus diverses. Afin d'aller plus loin, il serait judicieux de prévoir l'utilisation de la génomique et de la transcriptomique dans le but de relier la diversité fonctionnelle à la diversité spécifique ou d'être capable de réaliser un séquençage plus rapidement au laboratoire pour suivre la diversité non pas en fin d'expérimentation mais à la fin de chaque incubation. De ce fait, en fonction des cibles identifiées, un milieu de culture spécifique pourrait être ajouté pour tenter l'isolement d'une souche d'intérêt. Nous ne sommes pas aller jusque-là dans cette expérimentation, mais c'est une preuve de concept qu'il serait bon d'investiguer dans le futur.

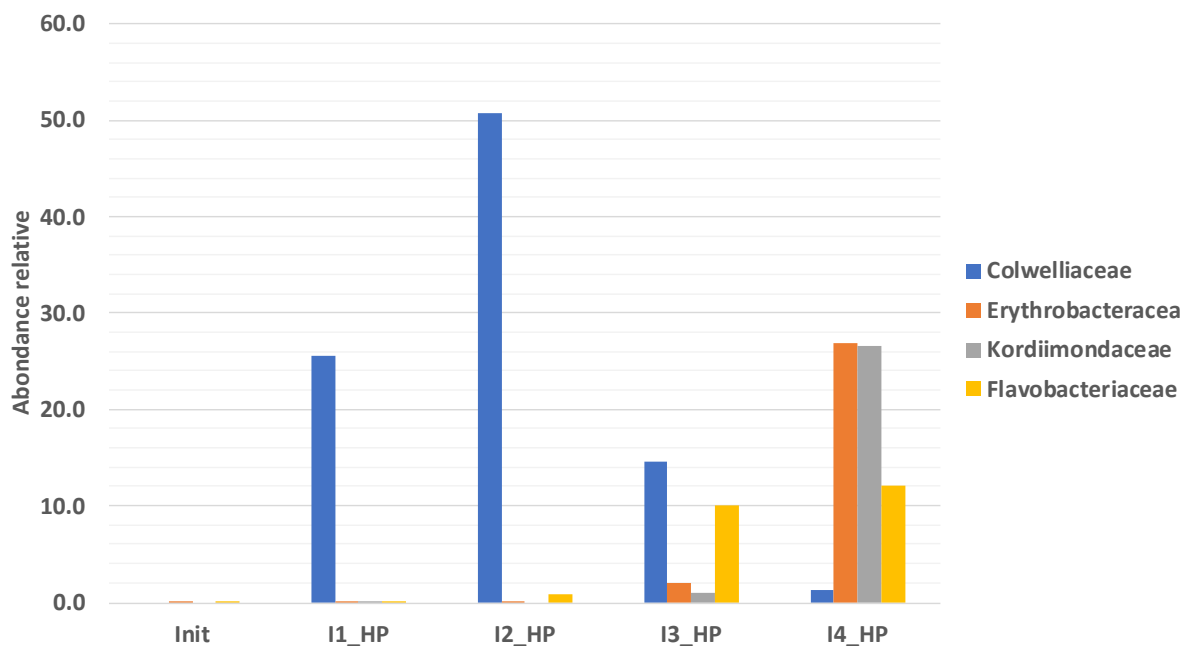
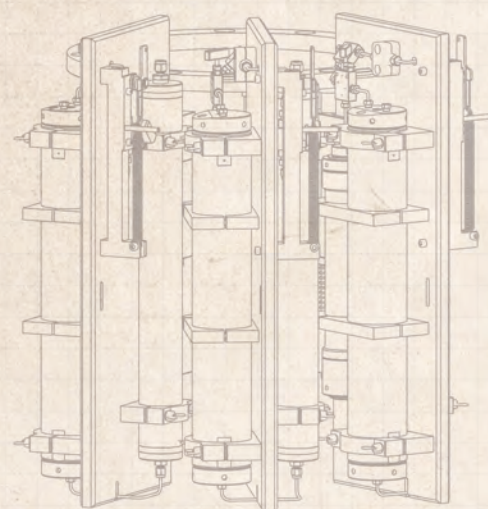
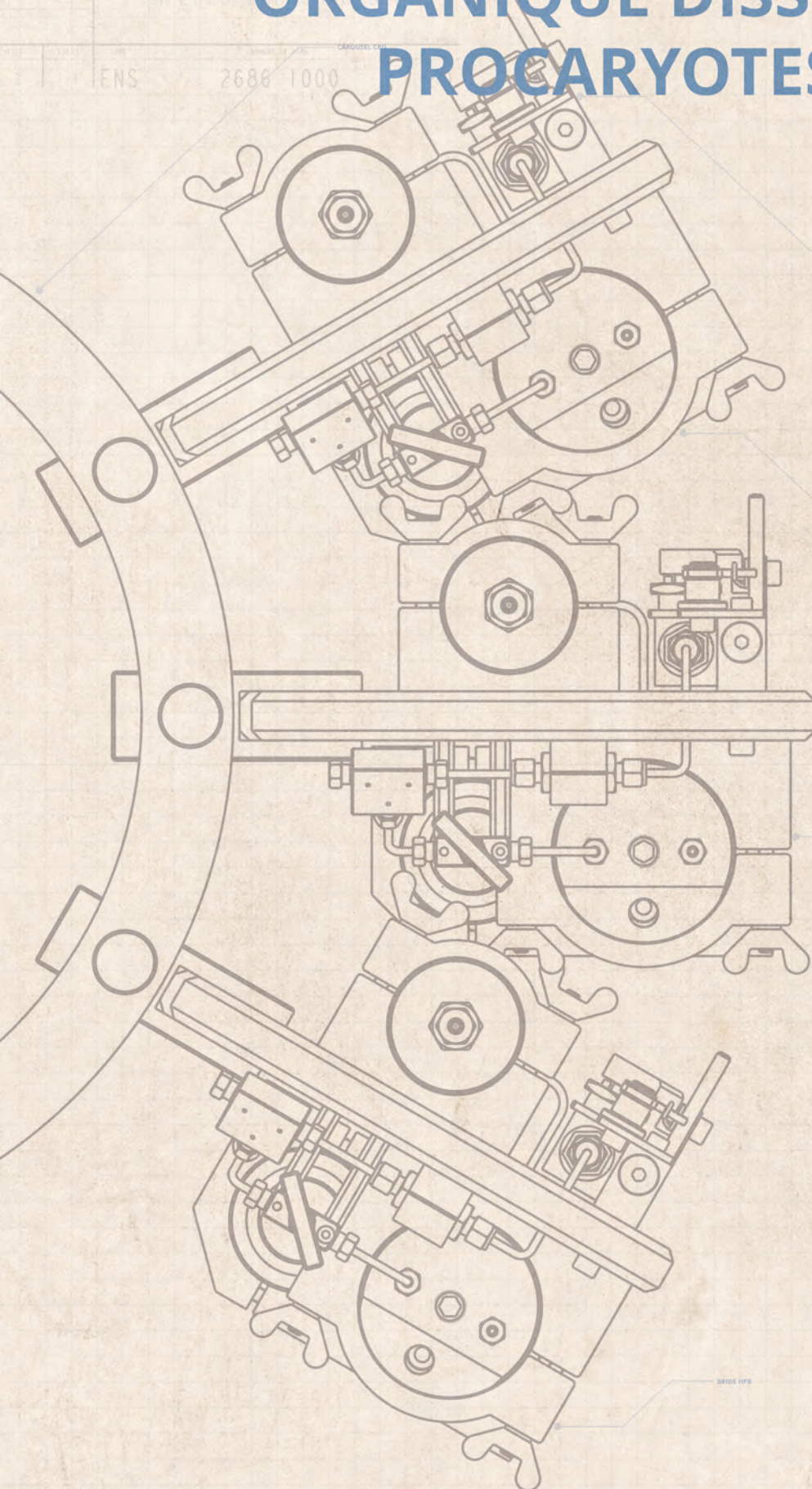


Figure 2-11 Évolution des familles dominantes dans les incubations maintenues dans les conditions *in situ* de pression.

CONCLUSION SUR LES DONNEES COMPLEMENTAIRES

Les ajouts de ces données complémentaires ont renforcé le message de l'article [Garel et al. \(2019\)](#). L'utilisation d'un système d'échantillonnage adapté est cruciale pour l'étude du milieu profond. En effet, il y a un effet de la pression hydrostatique sur la diversité spécifique des procaryotes. Les résultats montrent également un appauvrissement de la diversité au cours du temps, ce qui pourrait permettre dans une expérimentation plus longue de pouvoir isoler des microorganismes piézophiles en utilisant des milieux de cultures adaptées. Il serait également judicieux de suivre les variations du génome ainsi que du transcriptome afin de mettre en avant, en plus de nouvelles espèces, des nouvelles voies métaboliques inconnues.

DÉGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUT PAR LES PROCARYOTES PROFONDS



CHAPITRE 03

PRO	LIBRE	MODIFICATIONS	NOV	DATE
CE DOCUMENT EST LA PROPRIÉTÉ DE TOP INDUSTRIE ET NE PEUT ÊTRE MODIFIÉ, REPRODUIT OU COMMUNIQUÉ SANS SON AUTORISATION				
DESIGNER	PAR	J. LAMARCA	09/03/2016	
VERIFIÉ PAR	CH. JACQUES			
MATIERE				
SUBJECT	MATIERE			
TRAVAIL	TRAVAIL			
TOLERANCE	GEN			
A2				
ENS	2686 1000			

3 DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARYOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

PREAMBULE

Le carbone organique dissous (en anglais DOC) constitue l'une des principales sources de carbone et d'énergie pour les microorganismes du domaine océanique profond avec des concentrations comprises entre 33-45 μMC (Nagata et al., 2010; Santinelli, 2015). Ce DOC est produit en surface et transféré en profondeur au moyen de différents procédés (Boyd et al., 2019; Dall'Olmo et al., 2016; Hansell et al., 2009; Levy et al., 2013; Siegel et al., 2016). Le DOC est subdivisé en plusieurs compartiments en fonction de sa complexité moléculaire, donc sa biodisponibilité, c'est-à-dire sa capacité à être assimilé par les microorganismes. En dessous de 800m, le DOC est un assemblage de molécules complexes et existe sous trois formes, avec une disponibilité décroissante : semi-labile (temps de résidence de l'ordre de plusieurs semaines à plusieurs mois), semi-réfractaire (temps de résidence de l'ordre de plusieurs dizaines d'années), et réfractaire (temps de résidence de l'ordre de plusieurs centaines d'années).

Dans la littérature, des expérimentations en laboratoire sur des souches pures ont montré que certains microorganismes profonds adaptés aux conditions de fortes pressions hydrostatiques possèdent les outils nécessaires pour dégrader ces molécules complexes (Vezzi et al., 2005; Lauro and Bartlett, 2008). A partir d'une communauté naturelle prélevée à 2000m de profondeur, il a également été montré la capacité du phylum de *Euryarchaeota* à assimiler du ^3H -EPS (exopolysaccharide marqué au tritium) un proxy du SL-DOC (Boutrif et al., 2011).

Dans ce chapitre nous avons réitéré cette expérimentation dans deux conditions hydrologiques contrastées en utilisant du DOC de haut poids moléculaire (HMWDOC dans l'article) naturel.

Chapitre 3

DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

Ce travail avait été commencé lors de la thèse de Mehdi Boutrif (2009-2012), avec qui j'ai réalisé l'ensemble des expérimentations sur le terrain. Une première analyse avait été proposée dans sa thèse mais de nombreux verrous ne permettaient d'arriver à une conclusion très claire. Dans ce manuscrit, entièrement repensé et réécrit, je propose une nouvelle approche mathématique en collaboration avec J-C Poggiale et D. Nérini qui permet d'étudier conjointement la dégradation du DOC et la dynamique de la communauté microbienne.

Article 2

Citation

Garel, M., Panagiotopoulos, C., Boutrif, M., Repeta, D., Sempéré, R., Santinelli, C., Charrière, B., Nerini, D., Poggiale, J.-C., Tamburini, C., 2021. Contrasting degradation rates of natural dissolved organic carbon by deep-sea prokaryotes under stratified water masses and deep-water convection conditions in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 231, 103932. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2021.103932>

Acknowledgments

This research is endorsed by the national French program MERMEX and funded by the National Research Agency under the grant POTES [grant number ANR ANR-05-BLAN-0161-01, 2007] and the French LEFE-Cyber program [DORADE project]. Part of the equipment used in this work was funded by European Regional Development Fund (ERDF). The project associated to this publication has received funding from European ERDF Fund under project 1166-39417. This work is a contribution to the Mediterranean Institute of Oceanography "Pompe Biologique" (BioPump Group). Authors have benefited of the support of the SOERE-MOOSE and the SAM-MIO platform with special thanks for Nagib Bhairy for organizing cruise logistics. Authors thank the captain and the crew of Tethys II ship for excellent service at sea, M. Patrisi for help on board during April 2010 sampling; F. Van Wambeke, D. Kirchman and H.-P. Grossart for valuable discussions; C. Carlson and the two anonymous reviewers for their comments.

CONTRASTING DEGRADATION RATES OF NATURAL DISSOLVED ORGANIC CARBON BY DEEP-SEA PROKARYOTES UNDER STRATIFIED WATER MASSES AND DEEP-WATER CONVECTION CONDITIONS IN THE NW MEDITERRANEAN SEA

Marc Garel¹, Christos Panagiotopoulos¹, Mehdi Boutrif¹, Daniel Repeta², Richard Sempéré¹, Chiara Santinelli³, Bruno Charrière⁴, David Nerini¹, Jean-Christophe Poggiale¹ and Christian Tamburini¹

1 Aix Marseille Univ., Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO UM 110, 13288, Marseille, France

2 Department of Marine Chemistry and Geochemistry, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA 02543, USA

3 C.N.R., Istituto di Biofisica, Pisa, Italy

4 Univ. Perpignan Via Domitia, Centre de Formation et de Recherche sur les Environnements Méditerranéens (CEFREM), UMR 5110, 66860 Perpignan, France

Keywords: High-molecular weight dissolved organic carbon (HMW-DOC); Deep-sea prokaryotes; Deep-water convection; Marine microbes; Organic matter degradation; High-pressure; Deep Ocean

Abstract

Most of the ocean is deep with the majority of its volume (> 80%) lying under a depth greater than 1000 m. Deep-ocean substrates input is mainly supplied as organic matter (in particulate and/or dissolved forms) by physical and biological processes. Bioavailable dissolved organic carbon (DOC) is mainly consumed in surface water by prokaryotes, while most of DOC in the deep ocean is recalcitrant. Deep-sea prokaryotes are known to be adapted to degrade complex substrates. In this study, we investigate the utilization of HMW-DOC on the short temporal scale (10-15 days) by deep-sea prokaryotes maintained at in situ high-pressure conditions. Deep-sea prokaryotic natural assemblages were collected in the Mediterranean Sea in two contrasting hydrological conditions (water column stratification and deep-water formation period conditions). The experimental results were coupled with a cell-quota model, in order to quantify the kinetics of HMW-DOC degradation and its impact on the prokaryotic assemblages under these two contrasting hydrological conditions. The results show that under stratified water conditions autochthonous deep prokaryotic assemblages are able to degrade up to 46.6% of DOC on the timescales of the incubation, when maintained under in situ sampling high-pressure conditions. By contrast, during deep-water convection period condition, DOC is weakly degraded on the timescales of the incubation under in situ high pressure conditions. This study shows that the remineralization rates of DOC are controlled by the prokaryotic communities, which are further driven by the hydrological conditions of the water column.

3.1 INTRODUCTION

The deep sea, below 1000 m, is one of the largest ecosystems and the largest biome on Earth, yet it is the least well studied and sampled. It is a microbially dominated environment, where prokaryotes drive the most important biological processes. It is characterized by high-hydrostatic pressure, low temperature, high nutrient concentrations and low dissolved organic carbon content (around 33-45 μMC) (Nagata et al., 2010). The main source of carbon and energy is organic matter produced in the euphotic layer and transferred to depth by different processes (Hansell et al., 2009; Levy et al., 2013; Dall'Olmo et al., 2016; Siegel et al., 2016; Boyd et al., 2019). Hence, carbon dioxide and inorganic nutrients are converted by photosynthesis into particulate (POC) and dissolved organic carbon (DOC) in the euphotic zone, and transferred to the deeper ocean by various mechanisms including winter deep convection (Copin-Montégut and Avril, 1993), subduction (Sohrin and Sempéré, 2005; Arístegui et al., 2009; Hansell, 2009; Burd et al., 2010), fragmentation of large aggregates into small particles (Briggs et al., 2020), dissolution of sinking particles (Smith et al., 1992; Follett et al., 2014) and the vertical migration of zooplankton with release of POC/DOC by exudation and defecation (Steinberg et al., 2000; Steinberg and Landry, 2017).

DOC concentration decreases with depth (Hansell et al., 2009) and can be divided into two reservoirs of different biological lability: labile-DOC and recalcitrant DOC (Hansell et al., 2009; Carlson and Hansell, 2015). The recalcitrant fraction can be further divided in semi-labile, semi-refractory, refractory and ultra-refractory DOC (Hansell, 2013). Semi-labile DOC accumulates in the surface ocean where DOC production exceeds DOC consumption and is transferred in the dark ocean where consumption exceeds production (Carlson et al., 1994; Carlson and Hansell, 2015). However, turnover times for semi-labile DOC are largely unconstrained, and the contribution of semi-labile DOC to global prokaryotic heterotrophic production is hard to quantify (Carlson, 2002; Carlson and Hansell, 2015). From a chemical point of view, a major portion of surface high-molecular-weight-DOC (HMW-DOC) is composed of carbohydrates (acyl-polysaccharides) that have remarkably conservative spectrometric and chemical properties throughout the global ocean (Benner et al., 1992; Aluwihare et al., 1997; Repeta, 2015).

Heterotrophic prokaryotes are one of the main actors of the carbon cycle in marine ecosystems. They i) consume 10 to 50% organic matter produced by primary production in the surface waters (Azam et al., 1983), ii) facilitate particle solubilization (Cho and Azam, 1988; Sempéré et al., 2000; Panagiotopoulos et al., 2002; Arístegui et al., 2009; Tamburini et al., 2009b), iii) produce semi-labile DOC from labile DOC (ranged 0.1 to 0.2 Gt C yr⁻¹) (Tamburini et al., 2003; Jiao et al., 2010; Fang et al., 2015) and finally, iv) account for a large part of heterotrophic respiration in open ocean (20–33.3 Gt C yr⁻¹) (del Giorgio et al., 1997; Arístegui, 2003). However, there are still significant gaps in our knowledge of prokaryotic processes that control transformation, and degradation of the organic matter in the deep sea.

Most studies of DOC degradation have targeted the labile fraction and used simple compounds coupled with radioelements or fluoregenic substrate analogs to measure uptake and turnover time (Koike and Nagata, 1997; Hoppe and Ullrich, 1999; Tamburini et al., 2002, 2009a; Teira et al., 2006a, 2006b). As such very little is known about the degradation of semi-labile or semi-refractory DOC fractions. In addition, most studies have not taken into account the effect of hydrostatic pressure, which is a major parameter acting on prokaryotic metabolisms (Tamburini et al., 2013a). One of the few studies of semi-labile DOC degradation under pressure was made by Boutrif et al., (2011) who used radiolabeled exopolysaccharides (3H-EPS) as a proxy semi-labile DOC and incubated their samples under in situ high-pressure conditions. Using this approach, Boutrif and colleagues were able to show (i) an increase with depth of specific-cell activity assimilating 3H-EPS and (ii) a high contribution of Euryarchaeota in driving the degradation of 3H-EPS in the deep-sea waters of the Mediterranean Sea.

The phylogenetic composition and metabolic capabilities of marine microbial communities change with depth (DeLong et al., 2006; Nagata et al., 2010) as does metabolic capabilities of the microbial communities that regulate carbon export (Giovannoni and Stingl, 2005; Mccarren et al., 2010). Delong et al., (2006) identified a great number of genes, putatively involved in polysaccharide degradation, in deep microbial populations compared to those found in the surface. More recently, using comparative metaproteomics, Bergauer et al., (2018) found that deep-sea microorganisms produce transporters not only for substrate such as amino

acids and carbohydrates, but also for osmolytes. These osmolyte transporters increase with depth, reaching 39% of protein sequences identified in the bathypelagic zone. Recently, [Saw et al., \(2020\)](#) describe the enzymatic repertoire of resident mesopelagic and bathypelagic SAR202 that appear to favor remineralization of recalcitrant DOC. Moreover, under high hydrostatic pressure, piezophile deep-sea microorganisms display unique metabolisms ([Campanaro et al., 2005](#); [Lauro and Bartlett, 2008](#)). As an example, piezophilic *Photobacterium profundum* SS9 have shown its ability to degrade complex organic matter. The regulation of metabolic pathways for the degradation of different polymers such as chitin, pullulan, and cellulose is controlled by pressure, being activated at 28 MPa and turned off at 0.1 MPa ([Vezi et al., 2005](#)). Fieldwork investigation using 3H-labeled extracellular polymeric substance labeled (3H-EPS), done at in situ high pressure conditions, showed that prokaryotes increased their ability to use 3H-EPS with depth ([Boutrif et al., 2011](#)).

The Mediterranean Sea is a semi-enclosed sea, with a deep warm temperature (~13°C), and very short ventilation and residence times for deep waters of ~70-126 years (Schlitzer et al., 1991). The NW Mediterranean Sea is one of the few regions in the world's ocean where both dense shelf water cascading and open-sea convection take place ([Mertens and Schott, 2002](#); [Canals et al., 2006](#); [Santinelli et al., 2010](#); [Durrieu de Madron et al., 2011, 2017](#); [Tamburini et al., 2013b](#)). These sinking water masses carry POC and DOC, as well as significant numbers of organisms from the surface layer into the deep sea ([Marshall and Schott, 1999](#); [Avril, 2002](#); [Testor and Gascard, 2006](#); [Vidal et al., 2009](#); [Martín et al., 2010](#); [Santinelli et al., 2010](#); [Santinelli, 2015](#)). Depending on the preconditioning phase different volumes of surface water are exported (in a more cold and dry winter, more water will sink; [Durrieu de Madron et al., 2017](#)), driving a larger amount of dissolved oxygen, semi-labile DOC ([Lefèvre et al., 1996](#); [Canals et al., 2006](#); [Santinelli et al., 2010](#); [Santinelli, 2015](#); [Powley et al., 2017](#)) and surface-prokaryotic communities ([Tamburini et al., 2013a](#); [Luna et al., 2016](#); [Severin et al., 2016](#)) from surface to deep-sea layers.

This paper investigates the utilization of HMW-DOC on the short temporal scale (10-15 days) by deep-sea prokaryotes maintained at in situ high-pressure conditions. Deep-sea prokaryotic natural assemblages were collected in the Mediterranean Sea in two contrasting hydrological conditions including water column stratification and deep-water formation period

conditions. Here, the experimental results were coupled with a cell-quota model (Droop, 1968), in order to quantify the kinetics of HMW-DOC degradation and its impact on the prokaryotic assemblages under these two contrasting hydrological conditions.

3.2 MATERIALS AND METHODS

3.2.1 RECOVERING AND PREPARATION OF HMW-DOC

HMW-DOC was obtained from seawater that was drawn from the 600 m depth at the Natural Energy laboratory of Hawaii Authority NEHLA (19° 43' 42.7"N; 156° 03' 33.2" W) in December 2003. Samples were filtered in-line, and the <0.2 µm fraction concentrated using a custom crossflow ultrafiltration system fitted with a GE-osmonics "GE series" membrane. The membrane has a pore size of ~1 nm and nominally retains organic matter of molecular weight >1 kDa (>99% rejection of vitamin B12 in laboratory tests). Seawater (~1800 L) was concentrated daily to 20 L, frozen and returned to the laboratory for further processing. In the laboratory, HMW-DOC concentrates were thawed and filtered through an Ultracel 30kD membrane (Millipore Corp.) to remove viruses and other small particles, reduced in volume to 2 L by ultrafiltration, and desalted by serial (~10x; 2L each) dilution/concentration with ultra-high purity water until addition of a 0.1N AgNO₃ solution remained clear. Samples from different concentrates were pooled and freeze-dried to a fluffy white powder that was ~36% carbon. Between 18-21% of the total dissolved organic carbon in seawater was recovered (modified protocole from [Repeta and Aluwihare, 2006](#)).

3.2.2 STUDY SITE AND HYDROLOGICAL CONDITIONS

Water samples were collected at 2000 m depth in August 2008 and April 2010 at the ANTARES study site (42°48'N; 6°10'E) about 40 km offshore the French Mediterranean coast (NW Mediterranean Sea; [Tamburini et al., 2013b](#)). The hydrological conditions at this site were monitored over the time period of two and a half years prior to sample collection as part of the cabled ANTARES neutrino telescope and EMSO (European Multidisciplinary Subsea Observatory) observation program (ANTARES – EMSO-LO site), in addition measurements of NW Mediterranean deep convection zone located in the Gulf of Lions (LION Site; [Tamburini et al. 2013b](#)). In August 2008, the water column was characterized by a strong summertime stratification, which isolates the Western Mediterranean Deep Water from the upper water masses. In contrast, deep-sea waters sampled in April 2010, were recorded as modified due to

a strong deep-water convection (see for details [Tamburini et al., 2013b](#) and [Durrieu de Madron et al., 2017](#)) causing surface water cooling, vertical mixing and finally homogenization of the water column to the deep that occurred in the Gulf of Lion. These two experiments will be called hereafter stratified (Strat.) and deep-water convection period (Conv.), respectively.

3.2.3 SAMPLING

Deep-sea water (2000 m) was sampled and kept in high pressure bottles (HPBs) to maintain constantly the ambient high hydrostatic pressure (20 MPa) during all manipulations (sampling and retrieval, incubation, transfer and sub-sampling) corresponding to the in-situ depth conditions ([Garel et al., 2019](#)). Before collecting samples, 500 μ L of the HMW-DOC solution was added in the top-part of HPBs (Figure 3-1). To assess the effect of pressure on deep-sea prokaryotes, two HPBs were maintained at in situ high-pressure condition (thereafter HP). To determine the effect of HP on our results, two replicates were decompressed and incubated at atmospheric pressure (thereafter DEC). Before use, HPBs (volume capacity 500 $\pm$ 20 mL) were thoroughly cleaned as described in [Garel et al. \(2019\)](#). Using this protocol, the organic carbon background (DOC) in the HPBs bottles was $\leq$ 2 μ MC.

3.2.4 INCUBATION EXPERIMENTS

HMW-DOC solution was amended into the HPBs, just before the CTD cast, to a theoretical final concentration of 120 μ MC, and the incubation experiments started once the HPBs came on board ($t=0$ point). As such, HMW-DOC was incubated with Strat. and Conv. seawater under in situ and atmospheric pressure conditions, in the dark at 13 °C along with the prokaryotic assemblages sampled at 2000 m-depth for 10 and 15 days, respectively. Sub-samples were collected using a piloted pressure generator that maintains the hydrostatic pressure within the HPBs ([Garel et al., 2019](#)). Aliquots (in duplicates or triplicates) of 10 – 40 mL were sampled for DOC, sugars, and bacterial abundance measurements.

All glassware including glass pipettes and ampoules used for DOC and carbohydrates sampling were combusted at 450 °C for at least 6 h to remove traces of organic compounds. For DOC measurements, 8 mL of sample were collected directly into glass ampoules with 10 μ L of H₃PO₄ 85%, flame-sealed, stored in the dark at 4 °C and analyzed within 3 months of sub-sampling. Carbohydrates were collected into cleaned (10% HCl and Milli-Q water) plastic tubes

Chapitre 3

DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES

PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

and stored at -20°C until analyses. Subsamples for microbial abundance were collected into sterile plastic tubes, fixed with formaldehyde (2 - 4% final concentration) and stored at 4°C for 24 h. Samples were then filtered through $0.22\mu\text{m}$ -pore-sized polycarbonate filter, dried and stored at -20°C .

Chapitre 3
 DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS
 HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

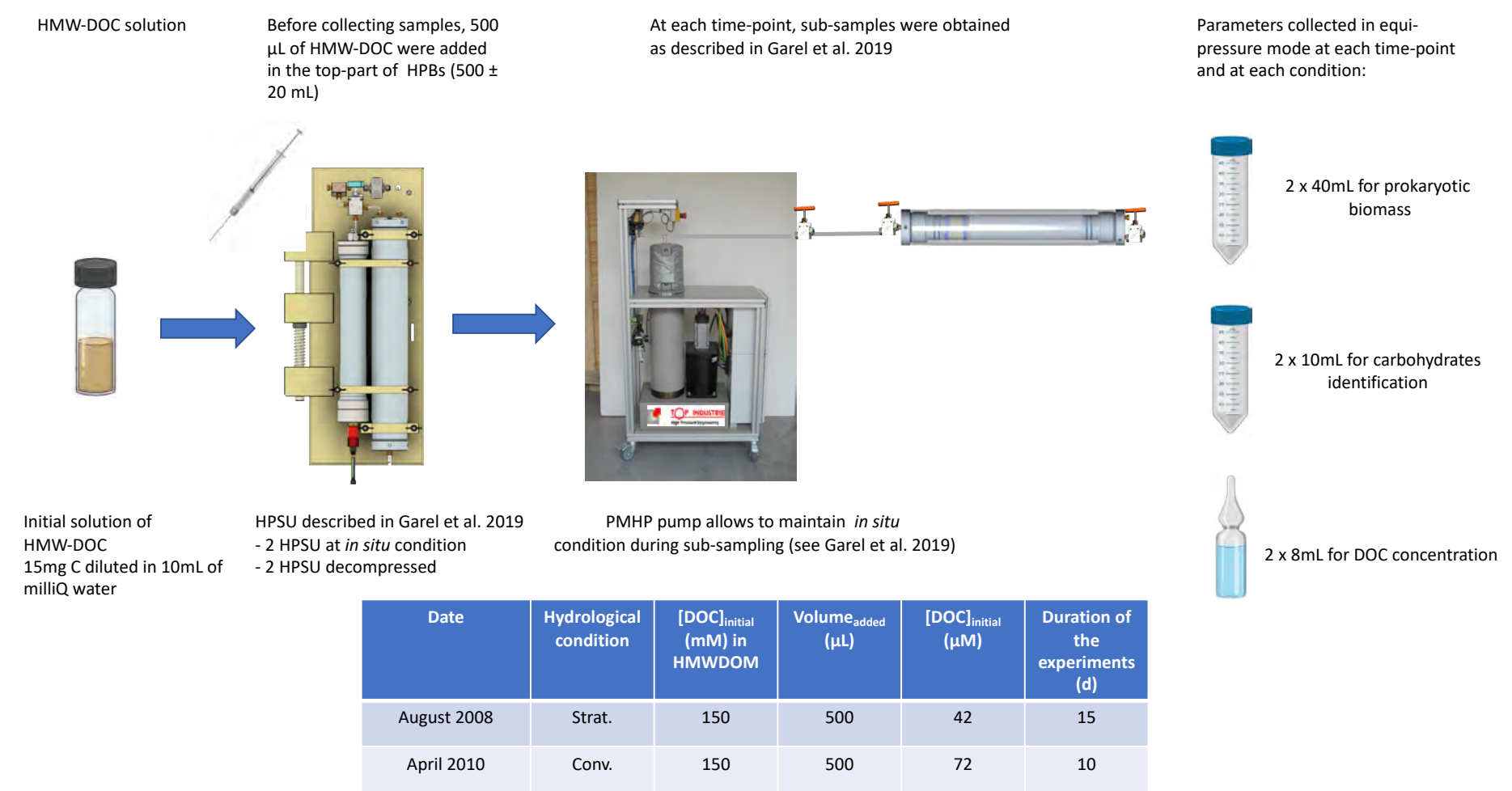


Figure 3-1 Timeline of the HMW-DOC incubation experiment. Before use, high-pressure bottles (HPBs) were thoroughly cleaned as described in Garel et al. (2019). Two experiments were done during stratified (Strat.) and deep-water convection period (Conv.), see text for details.

3.2.5 DOC MEASUREMENTS

DOC was measured by high temperature combustion on a Shimadzu TOC 5000 analyzer (Sohrin and Sempéré, 2005). A four point-calibration curve was performed daily with standards prepared by diluting a stock solution of potassium hydrogen phthalate in Milli-Q water. To avoid the small error associated with day-to-day instrument variability, all samples from a given experiment were analyzed in a single day's run. Procedural blanks were run with acidified sparged Milli-Q water and ranged from 1 to 2 $\mu\text{M C}$. Blanks were subtracted from the measured values. Deep seawater reference samples (provided by D. Hansell; Univ. Miami) were run daily ($43.5 \pm 1 \mu\text{M C}$, $n = 4$) to check the accuracy of the TOC analysis. Finally, it is important to note that in our study sub-samples were not filtered, in order to reduce contamination, we therefore consider $\text{DOC} \approx \text{TOC}$ since seawater samples were collected at 2000 m, where POC may be considered as negligible. Experimental errors based on triplicates analyses were estimated to be about 5-8% for DOC.

3.2.6 DISSOLVED COMBINED NEUTRAL SUGARS (DCNS) DETERMINATION

Aliquots of 8 mL were desalted using dialysis tubes with a molecular weight cut-off of 100-500 Da (Spectra/Por® Biotech cellulose ester) (Engel and Händel, 2011). Before use, dialysis tubes were rinsed with Milli-Q water to remove sodium azide. Before applying the sample, dialysis tubes were rinsed with 1–2 mL of the sample volume. Then, the dialysis tube was filled with 8 mL of the sample and the dialysis was conducted in a 1 L beaker filled with Milli-Q water at 4 °C. Dialysis was achieved after 4-5 h (salinity dropped from 35 to 1–2 g L^{-1}). Prior to sample removal, the tubes were placed into an ultrasonic bath for 5 min. Samples were transferred into pre-combusted glass vials (500 °C, 4 h) and freeze dried. The obtained powder was hydrolyzed with 1M HCl for 20 h at 100 °C (Murrell and Hollibaugh, 2000; Engel and Händel, 2011). As a precaution, we ensured the complete removal of HCl by adding 2–3 mL of Milli-Q water and repeating the freeze-drying. The dried sample was then re-dissolved in 4 mL of Milli-Q water, filtered through quartz wool, and pipetted into scintillation vials and kept at 4 °C until the time of analysis (this never exceeded 24 h). Finally, it is important to note that the current desalination procedure does not allow for the determination of the dissolved free neutral sugars (i.e., sugar monomers present in samples with $\text{MW} \sim 180 \text{ Da}$) because these compounds are lost and/or poorly recovered during the dialysis step (Panagiotopoulos et al., 2014).

Carbohydrate concentrations in samples were measured by HPAEC-PAD according to (Mopper et al., 1992) and were modified by (Panagiotopoulos et al., 2001, 2012). Briefly, monosaccharides were separated on an-anion exchange column (CarbopacPA-1, Dionex) by isocratic elution (mobile phase 19 mM NaOH) and were detected by an electrochemical detector set in the pulsed amperometric mode (Panagiotopoulos et al., 2014). The flow rate and the column temperature were set at 0.7 mL min⁻¹ and 17°C, respectively. Data acquisition and processing were performed using the Dionex software Chromeleon. The recovery yields of the whole procedure (dialysis and hydrolysis) were estimated using standard polysaccharides (laminarin, and chondroitin sulfate) and ranged from 82 to 86% (n = 3). Repeated injections (n = 6) of a dissolved sample previously submitted to dialysis and hydrolysis resulted in a CV of 12 - 15% for the peak area, for all sugars.

3.2.7 PROKARYOTIC ABUNDANCE

Prokaryotic cells were stained by 4, 6-di-amidino-2-phenylindole (DAPI, final concentration 25 µg mL⁻¹). Total cells marked by DAPI were counted using semi-automatic epifluorescence microscope (Olympus B61) and image analyses with biovolume calculation were done as described by Cottrell and Kirchman, (2003). Biovolume (V, Table 1) was converted in carbon content (CC) (µM C) according to the methods described in Posch (2001) using the following equation: $CC = 218 \times V - 0.86$ (Loferer-Krössbacher et al., 1998). Prokaryotes biomass (µg C L⁻¹) is calculated as the product of abundance (DAPI-cells count, Table 1) and mean cellular carbon content (CC). Experimental errors based on duplicates analyses were estimated to be about 3-5%.

3.2.8 DYNAMICS OF DOC AND PROKARYOTES ADJUSTED TO A DROOP MODEL

A cell-quota model (Droop, 1968) was built to represent both the kinetics of HMW-DOC and growth of microbial community. Such model, which has been already reported as much relevant for prokaryote dynamics as well (Eichinger et al., 2010, 2009, 2011) describes here the ability of the deep-sea microbial community to degrade HMW-DOC, store carbon with cell-quota and coupling HMW-DOC, uptake and biomass synthesis. Equations of the model are the following:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \mu_{max} X \left(1 - \frac{Q_m}{Q}\right) \\ \frac{dDOC}{dt} = -k(DOC - DOC_{rec})X \\ \frac{dQ}{dt} = k(DOC - DOC_{rec}) - \mu_{max}(Q - Q_m) \end{cases}$$

The model involves three state variables: the biomass of microorganisms denoted as X ($\mu\text{M C}$), the concentration of the substrate, here HMW-DOC, denoted as DOC ($\mu\text{M C}$) and the intracellular quota of nutrient, here the carbon, denoted as Q ($\mu\text{M C. } \mu\text{mol cells}^{-1}$). The growth rate of prokaryotes, μ is the product of the maximum growth rate μ_{max} by an increasing function of the intracellular quota Q . The parameter Q_m is defined as a threshold of intracellular quota, under which growth of prokaryotes is inhibited. The dynamics of concentration of substrate DOC depends on the cell biomass X that degrades substrate with degradation rate k . Only a fraction of DOM is labile and can be degraded by the microbial community present in the closed system, thus we denote by DOC_{rec} the concentration of the recalcitrant fraction of carbon substrate. Using the sampled data $(x_i, doc_i), i = 1, \dots, n$ in each experimental condition, parameters μ_{max} , k , Q_m and DOC_{rec} were estimated by non-linear regression (Nelder-Mead simplex method, [Seber and Wild, 2003](#)) when minimizing the sum of squared error (SSE) which measures a distance from the data to the model as follows:

$$SSE(\mu_{max}, k, Q_m, DOC_{rec}) = \sum_{i=1}^n \left(\frac{X(t_i) - x_i}{s_x} \right)^2 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{DOC(t_i) - doc_i}{s_{doc}} \right)^2.$$

This cost function has been constructed to give the same weight between cell biomass X and concentration of the substrate DOC by dividing each distance with its respective standard deviation, s_x for the cell biomass data and s_{doc} for the substrate concentration data. At each step of the minimization process, the trajectories $X(t)$ and $DOC(t)$ were estimated from the model by numerical integration (Euler method) until convergence to the minimum of SSE . Once the parameters were estimated and under some classical statistical hypotheses, bootstrapped data were drawn from the distribution of the model errors ([Seber and Wild, 2003](#), chap. 2). The minimization process has been reconducted 500 times. By this way, a 95% confidence interval for each parameter as well as some interval of variability of the trajectories $X(t)$ and $DOC(t)$ have been evaluated in each experimental condition. By this way, it is easy

to compare the dynamical evolution of each state variable between different experimental conditions and to assess how variability bands are superimposed i.e. how experience are similar (see Figure 2).

3.2.9 STATISTICAL METHODS

Non-parametric statistical methods were used to test the parameters (growth rates – μ_{max} , degradation rates – k , minimum quota – Q_m and the remaining DOC at the end of the incubation named recalcitrant carbon – DOC_{rec}) obtained using the Droop model after 500 simulations (see above) and to compare incubation (HP versus DEC) and hydrological (Strat. versus Conv.) conditions. Specifically, Kruskal–Wallis and Pairwise Wilcoxon Rank Sum tests ([R Core Team, 2017](#)) were used to compare medians between incubation and hydrological conditions. These tests performed on the box-and-whisker plots attests that each parameter estimated is significantly different ($p < 0.05$) between each incubation and each condition (except for DOC_{rec} between Strat_HP and Conv_HP).

3.3 RESULTS

3.3.1 BULK AND MOLECULAR COMPOSITION CHARACTERISTICS OF HMW-DOC THROUGHOUT THE EXPERIMENT

At 2000m-depth, DOC concentration significantly increased from 42 μM in December 2009, prior to a deep-water convection period, to 63 μM in March and 72 μM in May 2010 when the new deep water mass occupied the ANTARES site, concurrently with higher oxygen concentration in the bottom waters between March and mid-June 2010 (see for details [Tamburini et al. 2013b](#) and [Durrieu de Madron et al. 2017](#)). The *in situ* DOC concentrations for Strat. and Conv. experiments were 42 and 72 μM , respectively; after HMW-DOC addition, DOC initial concentrations in HPBs reached 96 ± 16 and 182 ± 46 μM for Strat. and Conv. experiments, respectively. In order to apply the Droop model to compare the kinetics of DOC degradation between each condition, we normalized the raw data of DOC concentrations (Tableau 3-1) to a fixed value of 120 μM , corresponding to the expected theoretical final concentration of DOC (Figure 3-2). Dissolved combined neutral sugars (DCNS) concentrations after HMW-DOC addition were 9 - 11 μMC for Strat. and Conv. experiments under HP conditions, respectively whereas the corresponding values for the DEC experiment were 5 - 12 μMC . These results indicate that sugars account about 5 - 9% of DOC which is in agreement

Chapitre 3

DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

with literature data showing that sugars represent about <10% of DOC (Tableau 3-1;
[\(Panagiotopoulos and Sempéré, 2005\)](#)).

Chapitre 3

DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

Tableau 3-1 Raw data of DOC concentrations before normalization, DAPI-counts, biovolume and sugars relative abundance during incubation experiments during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.) conditions. The contribution of the dissolved combined neutral sugars (DCNS) to the dissolved organic carbon (DCNS/DOC) pool is also given. Abbreviations: Fuc.: Fucose, Rha.: Rhamnose.: Ara.: Arabinose.: GlcN.: Glucosamine, Gal.: Galactose, Glc.: Glucose, Man.: Mannose, Xyl.: Xylose. HP: samples maintained under in situ high pressure condition without decompression; DEC: sampled decompressed and incubated at atmospheric pressure (DEC).

	Raw data of DOC ($\mu\text{M-C}$)	DAPI counts ($\times 10^5 \text{ cells mL}^{-1}$)	Biovolume (μm^3)	Fuc.	Rha.	Ara.	GlcN.	Gal.	Glc.	Man.	Xyl.	DCNS/DOC	DCNS (μMC)
HMW-DOC in the initial solution				13%	17%	5%	19%	11%	14%	11%	11%		
HP T ₀ (Strat.)	111 $\pm$ 3.5	0.67	0.05 $\pm$ 0.03	0%	1%	1%	2%	16%	63%	8%	10%	8%	9.0
HP T ₂ (Strat.)	75 $\pm$ 7.1	0.70 $\pm$ 0.7	0.07 $\pm$ 0.05	2%	2%	1%	3%	20%	55%	9%	8%	8%	5.8
HP T ₇ (Strat.)	56 $\pm$ 4.2	3.98 $\pm$ 1.26	0.09 $\pm$ 0.06	3%	2%	2%	2%	19%	58%	7%	7%	9%	5.1
HP T ₁₅ (Strat.)	62 $\pm$ 07	6.09 $\pm$ 0.09	0.08 $\pm$ 0.04	2%	2%	3%	2%	19%	55%	9%	9%	9%	5.8
DEC T ₀ (Strat.)	81 $\pm$ 0.7	0.66 $\pm$ 0.25	0.05 $\pm$ 0.03	4%	2%	4%	3%	25%	47%	7%	8%	6%	5.2
DEC T ₂ (Strat.)	83 $\pm$ 0.7	1.43 $\pm$ 0.55	0.08 $\pm$ 0.03	5%	3%	3%	4%	22%	47%	9%	7%	6%	5.1
DEC T ₇ (Strat.)	74 $\pm$ 2.1	3.52 $\pm$ 0.34	0.07 $\pm$ 0.1	5%	3%	4%	3%	21%	47%	9%	8%	8%	4.9
DEC T ₁₅ (Strat.)	78 $\pm$ 2.8	6.03 $\pm$ 0.09	0.07 $\pm$ 0.1	3%	2%	2%	3%	23%	53%	9%	6%	6%	4.8
HP T ₀ (Conv.)	157 $\pm$ 21	0.28	0.06 $\pm$ 0.04	2%	1%	1%	6%	12%	59%	12%	7%	7%	10.7
HP T ₂ (Conv.)	167 $\pm$ 27	1.30 $\pm$ 0.14	0.05 $\pm$ 0.03	2%	2%	2%	5%	12%	60%	11%	6%	5%	9.0
HP T ₅ (Conv.)	151 $\pm$ 29	2.15 $\pm$ 0.07	0.07 $\pm$ 0.05	3%	2%	2%	5%	11%	63%	10%	4%	6%	9.7
HP T ₁₀ (Conv.)	138 $\pm$ 20	4.9	0.08 $\pm$ 0.06	3%	2%	1%	8%	13%	53%	14%	6%	7%	10.2
DEC T ₀ (Conv.)	208 $\pm$ 57	0.28	0.06 $\pm$ 0.03	0%	1%	1%	3%	32%	48%	13%	3%	6%	11.8
DEC T ₂ (Conv.)	161 $\pm$ 36	1.07 $\pm$ 0.05	0.05 $\pm$ 0.03	1%	2%	1%	4%	37%	45%	7%	3%	7%	11.4
DEC T ₅ (Conv.)	134 $\pm$ 30	4.56 $\pm$ 0.7	0.06 $\pm$ 0.05	2%	2%	2%	5%	22%	52%	9%	5%	8%	10.3
DEC T ₁₀ (Conv.)	143 $\pm$ 28	6.0 $\pm$ 0.42	0.08 $\pm$ 0.03	3%	3%	3%	5%	27%	46%	8%	6%	7%	10.4

Chapitre 3

DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

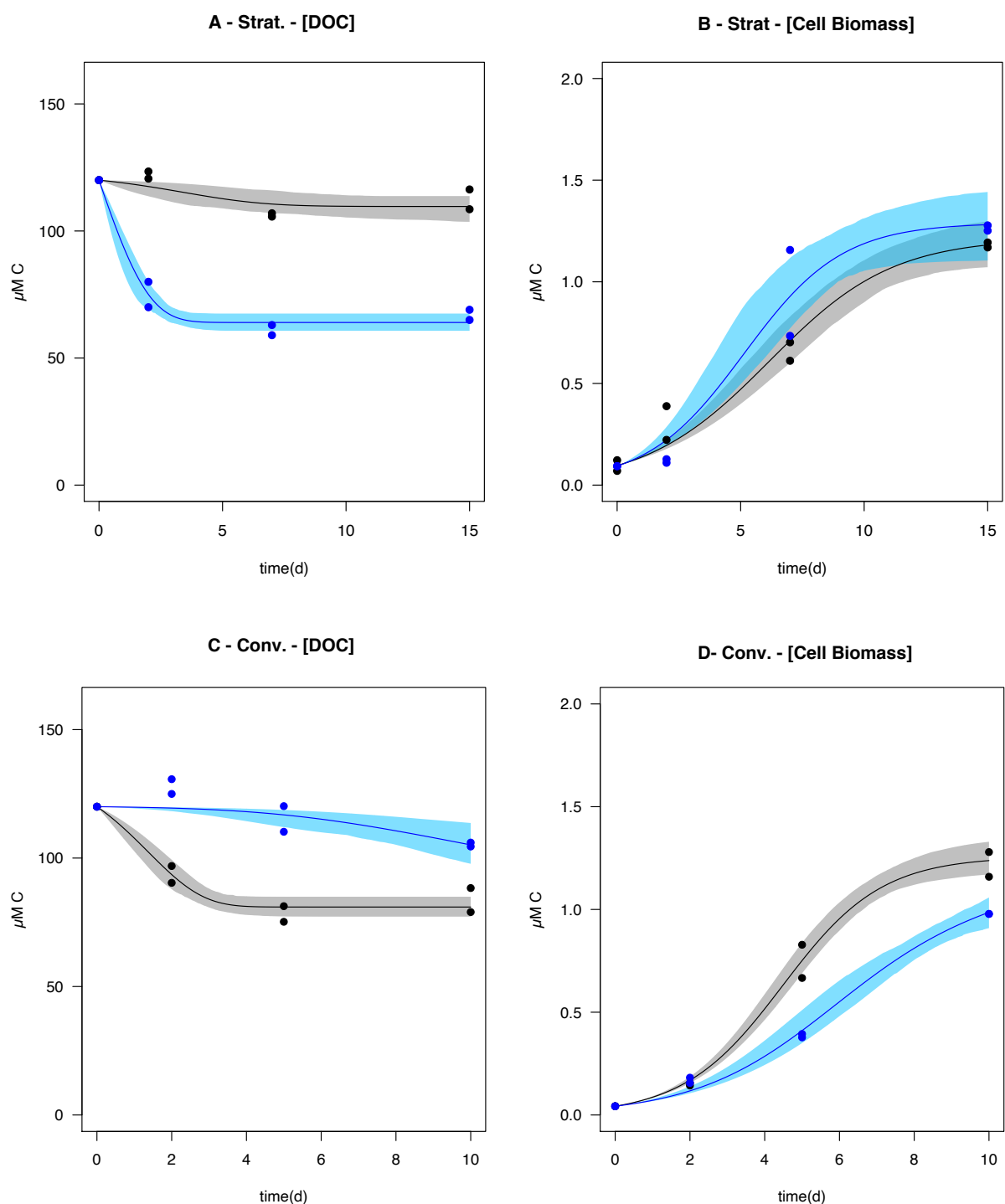


Figure 3-2 Changes in DOC concentrations (A, C), cell biomass concentrations (B, D) in μM C over time (in days) during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.). Blue and black dots are observations respectively for HP and DEC incubations. Blue and black lines are predicted data by model and blue and grey variability bands are 95% confident intervals, respectively for HP and DEC incubations.

Before the addition to the HPBs, the analysis of hydrolyzed HMW-DOC indicated the presence of six neutral monosaccharides namely fucose, rhamnose, galactose, glucose, mannose and xylose occurring at approximately equimolar abundance (11-17% of DCNS) as well as arabinose (5% of DCNS) and glucosamine (19% of DCNS). With the exception of glucosamine, which was unusually high in this sample, all the above values agree well with previous investigations and support the idea that these sugars are an important component of acyl-polysaccharides or semi-labile DOM (McCarthy et al., 1996; Aluwihare et al., 1997; Skoog and Benner, 1997; Repeta, 2015). Although we have not measured in situ background DCNS concentrations at the ANTARES site, data obtained during Conv. conditions (CASCADE cruise 1-23 March 2011) suggested that DCNS represented 1.7% of DOC whereas glucose (49% DCNS), galactose (9% DCNS) and rhamnose (9% DCNS) were among the most abundant monosaccharides. Immediately after HMWDOM addition in HPBs bottles, glucose accounted for 59 to 48% of the DCNS at the beginning of the experiments while at the end it represented 53 - 46% of the DCNS, in HP and DEC incubations respectively, suggesting a selective degradation of this compound during the incubation (Tableau 3-1). Galactose was second in abundance accounting for 12 - 32% of the DCNS at the beginning of the experiment and did not show variation throughout the experiment (13-27%), in HP and DEC incubations respectively. With the exception of mannose, the remaining sugars accounted less than 10% of the DCNS pool and again they vary little during the incubation experiment.

3.3.2 DOC DEGRADATION AND PROKARYOTIC BIOMASS

Key degradation kinetic parameters including DOC degradation rate (k), estimated recalcitrant DOC concentration (DOC_{rec}) as well as maximum growth rate (μ_{max}) and metabolic state of microbial community were estimated in non-steady state and closed conditions by using the Droop model (Figure 3-2 – Figure 3-3 and Tableau 3-2). Figure 3-2A compares the kinetics of DOC degradation between observed data (black and blue circles for DEC and HP conditions, respectively) and theoretical data (black and blue curves for DEC and HP conditions, respectively) during the stratified period condition. The variability bands around the curves represent 95% confidence intervals showing the statistical difference over time (or not if the variability bands intersect) between incubations. The same method has been used for the cell biomass concentration (Figure 3-2B).

Chapitre 3

DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

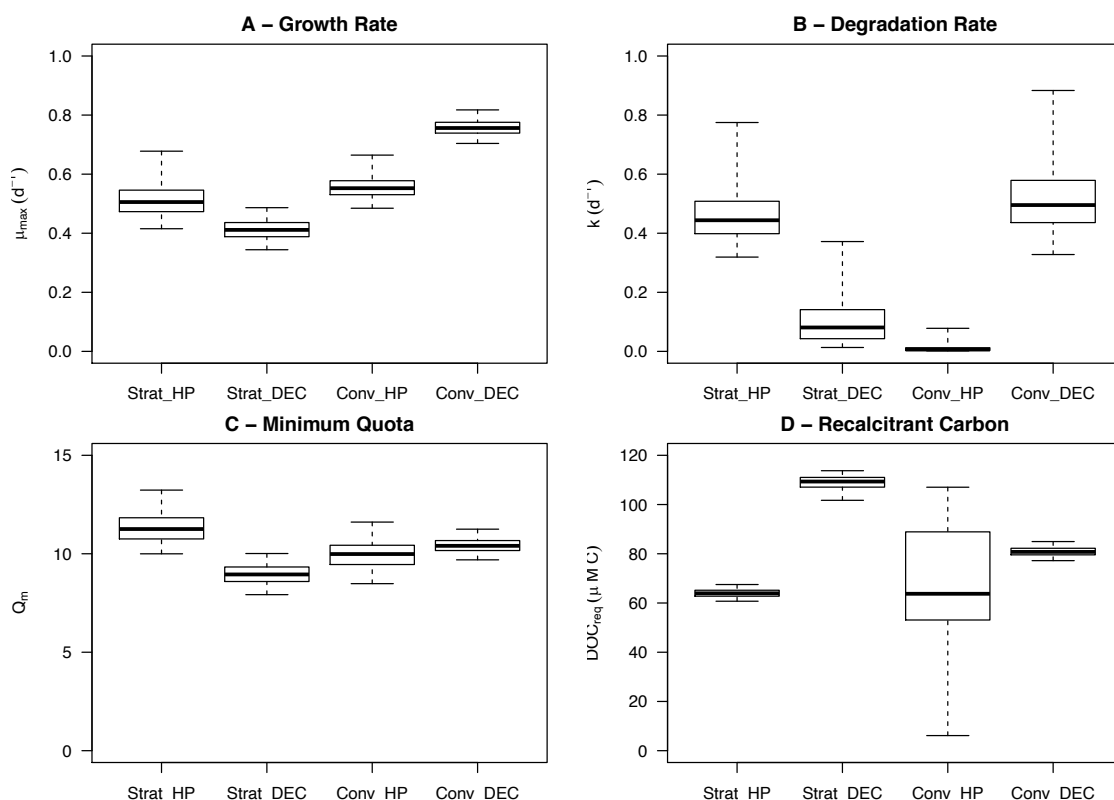


Figure 3-3 Bootstrapped (with 500 simulations) distribution of parameters estimated by Droop Model during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.) conditions maintained under in situ high pressure conditions without decompression of the sample (HP) and decompressed plus incubated at atmospheric pressure conditions (DEC). A) Growth rate (μ_{max}) for both conditions in d⁻¹; B) Degradation constant (k) in d⁻¹; C) Minimum cell-quota (Q_m) (a ratio between intracellular concentration of organic carbon and cellular biomass, dimensionless); and D) Concentration of recalcitrant (DOC_{rec}) in $\mu M C$ on the timescales of the incubations. The horizontal lines are respectively, third quartiles, median and first quartiles. The whiskers correspond to the 95% of the confidence interval.

Results from the Conv. period conditions are given in Figure 3-2 B and D. Hence, it is possible to directly compare HP and DEC incubations on the same graph and between water masses period conditions, Strat_HP versus Conv_HP, comparing all panels in Figure 3-2).

During Strat. conditions, DOC degradation was significantly higher in HP than in DEC incubations (Figure 3-2A). On the timescales of the incubations, 56.0 μM (i.e. 46.6% of the initial concentration) of DOC were degraded in HP incubation whereas only 11.2 μM (i.e. 9.3% of the initial concentration) of DOC were degraded in DEC incubation. Degradation rates (k) averaged 0.45 ± 0.12 d⁻¹ and 0.11 ± 0.10 d⁻¹ in HP and DEC conditions, respectively (Tableau 3-2). Growth rate was also higher in HP conditions averaging 0.51 ± 0.07 d⁻¹ compared to 0.41 ± 0.03 d⁻¹ for DEC incubations (Figure 3-2B), being closed to growth rates median (Tableau 3-2).

By contrast, during Conv. period, DOC degradation rates (k) were higher ($k = 0.51 \pm 0.11 \text{ d}^{-1}$) in DEC than in HP incubations ($k = 0.01 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$) (Figure 3-2C). Due to this very low DOC degradation rates in HP incubations, the DOC_{rec} is highly variable ($65.04 \pm 29.11 \text{ } \mu\text{MC}$, Tableau 3-2). This does not allow us to calculate with confidence a percentage of degradation in this case. Prokaryotic growth rates averaged 0.76 ± 0.02 and $0.56 \pm 0.08 \text{ d}^{-1}$, for DEC and HP incubations (Figure 3-2D and Tableau 3-2), respectively. In addition, for HP incubation, the community of prokaryotes does not seem to reach a stationary phase in contrast to DEC incubation.

3.4 DISCUSSION

3.4.1 HMW-DOC COMPOSITIONAL CHANGES DURING DEGRADATION

The monosaccharide composition of the samples after addition of HMW-DOC (samples retrieved at 2000 m at DEC and HP conditions) resembled that generally reported for deep waters (Tableau 3-1) (Skoog and Benner, 1997; Kaiser and Benner, 2008; Panagiotopoulos et al., 2014). Our results showed distinct differences in the initial and final sugar composition during the biodegradation experiments for both Strat. and Conv. conditions (Tableau 3-1). This finding was more pronounced for glucose (45% decrease of its initial concentration) mannose (27%) and galactose (20%) during Stat. water period under HP incubations than Conv. period also under HP conditions (glucose 14%; mannose and galactose <1%). These results suggest deep-sea prokaryotes under high HP preferentially remove hexoses (e.g. glucose, mannose and galactose) from HMW-DOC similar to results of previous studies carried out in Atlantic and Pacific Oceans (Kaiser and Benner, 2009; Goldberg et al., 2011).

Overall, these results further indicate that neutral sugars can be used as tracers of deep-sea semi-labile DOC and that changes in DOC composition are related to the bioavailability of DOC.

3.4.2 PROKARYOTIC DEGRADATION OF DOC IN STRATIFIED PERIOD CONDITION

In the NW Mediterranean Sea, summertime stratification isolates the upper mixed layer from deeper water masses preventing down-mixing of DOC (Copin-Montégut and Avril, 1993; Santinelli et al., 2010, 2013). Thus, the prokaryotic communities sampled at 2000 m-depth in summertime are well adapted to the deep-sea conditions, due to the stratification (Tamburini et al., 2013a) while surrounded with old and recalcitrant DOC (Santinelli et al., 2010; Santinelli, 2015).

Chapitre 3

DEGRADATION DU CARBONE ORGANIQUE DISSOUS PAR LES COMMUNAUTES PROCARIOTIQUES PROFONDES DURANT DES CONDITIONS HYDROLOGIQUES CONTRASTEES

Tableau 3-2 Parameters estimated by cell-quota model and bootstrapped variance and median during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.) conditions. μ_{max} is the growth rate in d⁻¹; k is the degradation rate in d⁻¹; Q_m is the minimum cell-quota (a ratio between intracellular concentration of organic carbon and cellular biomass, dimensionless); DOC_{rec} is the quantity of residual HMW-DOC in μ MC. HP: samples maintained under in situ high pressure conditions without decompression; DEC: samples decompressed and incubated at atmospheric pressure conditions (DEC).

	Stratified water period								Deep-water convection period							
	HP				DEC				HP				DEC			
	μ_{max}	k	Q_m	DOC_{rec}	μ_{max}	k	Q_m	DOC_{rec}	μ_{max}	k	Q_m	DOC_{rec}	μ_{max}	k	Q_m	DOC_{rec}
mean	0.51	0.45	11.32	64.02	0.41	0.11	8.94	108.80	0.56	0.01	9.05	65.04	0.76	0.51	10.42	80.85
sd	0.07	0.12	0.81	1.75	0.03	0.10	0.55	3.37	0.08	0.03	1.34	29.11	0.02	0.11	0.18	1.99
median	0.5	0.44	11.25	63.94	0.44	0.08	8.94	109.34	0.55	0.006	9.98	63.74	0.76	0.49	10.40	80.76

Gravitational sinking of particles carrying HMW-DOC in its plume can locally enhance and provide HMW-DOC to free-living deep-sea prokaryotes ([Kjørboe and Jackson, 2001](#); [Long and Azam, 2001](#); [Tamburini et al., 2003](#); [Follett et al., 2014](#); [Fang et al., 2015](#)).

Then, results presented in [Carlson et al., \(1994\)](#), show that stratification sequesters DOC in deep water, leading to an increase of remineralization by deep prokaryotes, that is consistent with our results in Strat_HP. HMW-DOC issue from surface water is more bioreactive than HMW-DOC already present in deep ocean ([Carlson et al., 2004](#)). Our results showed that autochthonous deep-sea prokaryotes, during stratified period conditions, are able to use HMW-DOC, at a higher rate (1.7-fold) under *in situ* high pressure conditions than if decompressed and incubated at atmospheric pressure conditions. These results agree with previous investigations of [Boutrif et al. \(2011\)](#) showing higher degradation rates of radiolabeled marine extracellular polymeric substances by deep-sea prokaryotes under HP compared to DEC incubations during stratified period conditions. Overall, the above results are in agreement with other investigations that demonstrated that deep-sea adapted prokaryotes have specific enzymes able to degrade complex organic matter substrates ([DeLong and Karl, 2005](#); [Vezzi et al., 2005](#)) and with those of [Bergauer et al. \(2018\)](#) reporting an increase of protein transporter of the microbial community with depth to adapt to the change of OM quality.

Figure 3-3 summarizes the distribution of parameters estimated by the cell-quota model after 500 simulations (see Materials and methods section) and to compare incubation (HP versus DEC) and hydrological conditions (Strat. versus Conv.). The Kruskal-Wallis and Pairwise Wilcoxon Rank Sum tests ([R Core Team, 2017](#)) performed on the box-and-whisker plots attests that each parameter estimated is significantly different ($p < 0.05$) between each incubation (HP versus DEC) in stratified period condition. Under HP conditions Q_m (median Q_m HP = 11.32) was significantly higher than DEC conditions (median Q_m DEC = 8.94). These results indicate that under HP conditions, deep-sea prokaryotes have elevated carbon requirements to grow, or in other words expends more energy for their growth. According to [del Giorgio and Cole \(1998\)](#), if the supply of organic carbon is scarce, then most of the substrate will be catabolized and used primarily for maintenance energy requirements rather than for growth. On the other hand, the DEC community also sampled at 2000m depth but decompressed may need less organic carbon to grow. Recent results by [Arrieta et al., \(2015\)](#), have incubated at atmospheric pressure conditions, deep seawater with natural community from the Pacific and

Atlantic Ocean, have shown that even a low concentration of labile DOC (even of only 2-fold of the natural DOC) could sustain growth after a 10-day incubation. Closed incubation approaches as well as changes in pressure lead to changes in prokaryotic community composition (Ionescu et al., 2015; Edgcomb et al., 2016; Garel et al., 2019). The prokaryotic community, able to withstand changes in pressure, showed greater catabolism requirements in growing with the available DOC (Q_m DEC = 8.94 versus Q_m HP = 11.32). However, the HMW-DOC degradation is more efficient under HP than DEC incubations since the DOC_{rec} is significantly higher in DEC incubations (median DOC_{rec} = 109.34 μ M) than in HP incubations (median DOC_{rec} = 63.94 μ M) on the timescales of the incubations (Figure 3-3 and Tableau 3-2).

3.4.3 PROKARYOTIC DEGRADATION OF DOC IN DEEP-WATER CONVECTION PERIOD CONDITION

During deep-water convection event, the story is completely different. Under that condition, bioavailable surface DOC can be carried to the deep microbial community with the mixing of surface and deep Mediterranean seawaters. Tamburini et al. (2013b) reported that the concentration of DOC at 2000m increases from ~ 42 μ M under stratified conditions, to ~ 72 μ M under deep-water period condition. These values are in agreement with those reported by Santinelli et al. (2010) in the Gulf of Lions in May 2005, that show a marked increase in DOC by deep convection event. During deep-water convection events, deep seawater is amended with ~ 30 μ M labile or semi-labile DOC originating from the surface. Moreover, in this specific case, the prokaryotic communities were composed of both prokaryotes from surface water mixed with prokaryotes from deep waters (Tamburini et al., 2013b), surface seawater includes a larger proportion of surface prokaryotic cells, which are not adapted to *in situ* HP conditions (Egan et al., 2012; Tamburini et al., 2013a). Another study of Turley (1993) has shown that prokaryotes from surface water are affected by increasing hydrostatic pressure, i.e decrease of protein synthesis, during sinking of particles, thus preserving particles to reach the seabed. A study of Grossart and Gust (2009), using shallow-water bacterial strains submitted to increasing pressure, indicates that strains from the surface respond individually to pressure exposure and appear to rapidly reduce cell division. In the same vein, our series of experiments increasing hydrostatic pressure of surface prokaryotic communities lead in generally to a decrease in the activities of surface prokaryotic communities with increasing pressure (Tamburini et al., 2006,

2009b; Riou et al., 2018). As a consequence, on the timescales of the incubations, DOC degradation rates in the HP incubations (median $k = 0.006 \text{ d}^{-1}$) are significantly lower than in the DEC incubations (median $k = 0.49 \text{ d}^{-1}$) during the deep-water convection event (Kruskal-Wallis and Wilcoxon Signed Rank tests, $p < 0.05$) (Figure 3-3 and Tableau 3-2). Due to low degradation rate during the deep-water convection under HP incubation (Figure 3-2C and Figure 3-3B, Conv_HP), the highest variability is found, by the Droop model, on the estimation of DOC_{rec} (Figure 3-3D, Conv_HP).

Similarly, growth rates are lower when incubated at HP conditions (median $\mu_{\text{max}} = 0.55 \text{ d}^{-1}$) than when decompressed and incubated at atmospheric pressure conditions (median $\mu_{\text{max}} = 0.76 \text{ d}^{-1}$) (Figure 3-3 and Tableau 3-2, Kruskal-Wallis and Wilcoxon Signed Rank tests, $p < 0.05$). Moreover, in the HP incubations, the minimum cell-quota estimation is relatively high with the highest variability ($Q_m \text{ HP} = 9.05 \pm 1.34$, mean $\pm$ s.d., see Tableau 3-2), slightly lower than DEC conditions ($Q_m \text{ DEC} = 10.42 \pm 0.18$). In the HP incubations of our experiments during deep-sea convection event, degradation rates appear to be inhibited or not visible. The production and removal of recalcitrant DOC can be hypothesized to occur, as shown in Romera-Castillo et al., (2019), sustaining the growth rates estimated in the HP incubations. In contrast, after decompression (DEC incubations), surface prokaryotes carried out in the deep-sea water and incubated at atmospheric conditions are able to partially degrade the DOC available. However, the DOC_{rec} at the end of incubation during the deep-water convection event remained relatively high in DEC incubations. In their experiments conducted with surface and mesopelagic prokaryotic consortium, Carlson et al. (2004) found high DOC degradation and biomass yields in surface waters inoculated with upper mesopelagic consortium than with surface ones. They suggested that mesopelagic prokaryotes adapted to use recalcitrant DOC are in competition for inorganic nutrients with surface prokaryotes that are adapted to use labile DOM, they may grow at slower rates thereby limiting semi-labile DOC remineralization.

3.4.4 DOC DEGRADATION IN STRATIFIED VERSUS DEEP-WATER CONVECTION PERIOD CONDITIONS

Changes of the *in situ* hydrostatic pressure conditions during sample retrieval and incubation impact the degradation of HMW-DOC due to the change of prokaryotic community

(Egan et al., 2012; Tamburini et al., 2013a). Recent studies have demonstrated that decompression of deep seawater samples very likely involves a shift of the prokaryotic community (Edgcomb et al., 2016; Garel et al., 2019). Even if the shift of the prokaryotic community is true for the both incubations (HP and DEC) due to the 2-weeks incubation time (ZoBell and Anderson, 1936; Lee and Fuhrman, 1991), to make statements about DOC degradation in the deep ocean, HP incubation conditions are more realistic.

Follett et al., (2014) have shown that in the deep ocean, 10 - 30% of the deep DOC reservoir is semi-labile and supported by a flux of $\sim 1 \text{ Gt C year}^{-1}$ carbon introduced by sinking particles. During stratified period conditions, the deep seawaters are sequestered for up to century, and carbon is introduced principally by gravitational sinking of particles (Siegel et al., 2016; Le Moigne, 2019). Moreover, autochthonous prokaryotes adapted to *in situ* high pressure conditions (Boutrif et al., 2011; DeLong and Karl, 2005; Tamburini et al., 2013a; Vezzi et al., 2005) seem able to degrade up to 46.6% of the added DOC (according to Figure 3-2A; Tableau 3-2). Finally, it is more and more obvious that some deep prokaryotes exploit environments where the most abundant energy resources are sinking organic particles or recalcitrant dissolved organic matter (DOM). As an example, SAR202 group III dominate bathypelagic waters presumably indicating that molecules, such as recalcitrant organic compounds, susceptible to oxidation by FMNOs (flavin-dependent monooxygenases) become one of the few remaining harvestable DOM resources at these depths (Saw et al., 2020). However, during the deep convection event periods, surface prokaryotes are carried deeper into the water column, mixing with the pressure adapted community. The result is a lower degradation observed under *in situ* HP incubations, (Figure 3-2C; Tableau 3-2). In this experiment, we hypothesize that adapted deep-sea bacteria grew by using mainly the surface semi-labile DOC transported by deep water formation. Semi-labile DOC can stay in deep waters for several weeks in agreement with Santinelli et al. (2010). These authors estimated DOC removal rates to be $14.4 \mu\text{M C year}^{-1}$, or $0.04 \mu\text{M C d}^{-1}$ in deep waters recently ventilated (and thus characterized by high DOC concentrations). This removal rate is in agreement with our results, the estimate of the degradation rate in the HP incubations during Conv. experiments, being apparently very low ($0.01 \pm 0.03 \text{ d}^{-1}$), the production and removal of recalcitrant DOC can be hypothesized to occur as discussed previously.

3.5 CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Our results demonstrate that the degradation of DOC under stratified and deep convective mixing conditions depends on the origin and the history of the prokaryotic communities, which were controlled by the origin of the water masses in the NW Mediterranean Sea. Depending on the hydrological conditions, the proportion of allochthonous and autochthonous prokaryotes in deep-sea microflora can vary, with surface bacteria increasing in deep-sea waters during deep-sea convection (Luna et al., 2016; Severin et al., 2016). Degradation of HMW-DOC is less effective during deep-sea convection than during stratified period conditions, where adapted deep-sea prokaryotes probably have a specific metabolism to degrade HMW-DOM. This study must be considered in the context of climate change, as the stratification of the surface layers of the Mediterranean Sea is expected to intensify and thus limit the vertical transfer of both dissolved oxygen and DOC by winter convection of surface waters (Adloff et al., 2015; Powley et al., 2016).

The interactions between the DOC and the deep-sea prokaryotic communities are still unclear, and future experiments should include measurements of oxygen consumption throughout the incubation and the dissolved inorganic matter (DIC) concentration, key indicators of the microbial remineralization. Furthermore, a better understanding of the metabolic abilities of deep-sea prokaryotes, at a cellular scale, and under *in situ* conditions of pressure and temperature, are needed. Since dense water formation occurs in other regions worldwide, a steering of deep pelagic ecosystem activity similar to that observed in the NW Mediterranean Sea should occur there too.

Genomic and transcriptomic analysis will be required in further studies to highlight the succession of different prokaryotic communities and metabolic pathways involved in degradation of the different pool of dissolved organic matter.

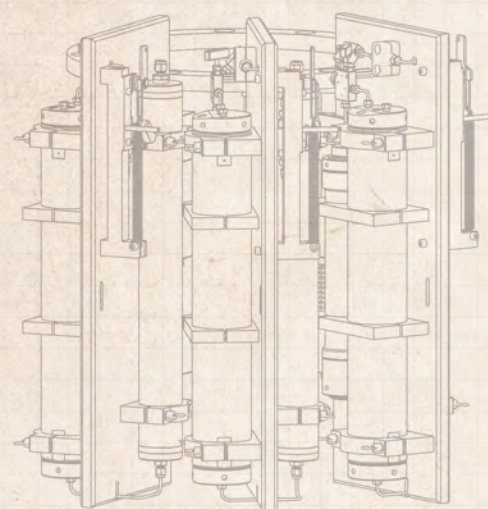
EFFET D'UNE AUGMENTATION DEPRESSION HYDROSTATIQUE SUR LA DIVERSITE MICRO- BIENNE DURANT LA BIODE- GRADATION D'AGGREGATS DE *EMILINIA HUXLEYI*

VANNE DE PRÉLEVEMENT & DE TOURNER

BRIDE HYD

PLATEAU DE PRÉLEVEMENT

BRIDE HYD



PRO	SYNTHÈSE	MODIFICATIONS	NOU	DATE
CE DOCUMENT EST LA PROPRIÉTÉ DE TOP INDUSTRIE ET NE PEUT ÊTRE MODIFIÉ, REPRODUIT OU COMMUNIQUÉ SANS SON AUTORISATION				
Dessin par	J. LAFRANÇOIS	PROJ03102016	TOP INDUSTRIE	
Vérifié par	Ch. JACQUES		APERÇU SUR CAROUSEL	
MATÉRIEL				
PROJETS MATÉRIEL				
SYM. TECHNIQUE				
Traitement				
Tolérances GDN				
A2	1:2	1:1	ENS	2686 1000

4 EFFET D'UNE AUGMENTATION DE PRESSION HYDROSTATIQUE SUR LA DIVERSITE MICROBIENNE DURANT LA BIODEGRADATION D'AGGREGATS DE *EMILINIA HUXLEYI*

PREAMBULE

L'essentiel de la matière organique exportée vers l'océan profond est synthétisé dans la zone épipélagique par les organismes phytoplanctoniques sous forme de carbone organique particulaire (POC, pour particulate organic carbon) et carbone organique dissous (DOC, dissolved organic carbon). Selon [Arístegui et al. \(2009, 2005\)](#), 90% du POC produit dans la zone épipélagique est exporté vers les couches inférieures, principalement par gravité, c'est la pompe biologique de carbone. La zone mésopélagique ou crépusculaire (de la base de la zone euphotique à 1000 m de profondeur) représente un environnement clé, dans lequel les particules qui chutent sont transformées par les microorganismes ([Siegel et al., 2016](#)). Pour comprendre l'impact de ces microorganismes sur la matière organique exportée, des études de biodégradation ont été menées en utilisant par exemple des agrégats obtenus à partir de cultures de diatomées, car celles-ci forment d'importantes efflorescences saisonnières ([Tréguer and Pondaven, 2000](#)). L'essentiel des expérimentations effectuées a été réalisé à pression atmosphérique, et pour certaines en simulant la diminution de la température ([Bidle et al., 2002a](#)). À ce jour il n'existe encore que trop peu d'expérimentations tenant compte de la pression hydrostatique.

Les précédentes études utilisant des particules naturelles (*i.e* pelotes fécales) ou synthétisées en laboratoire à l'aide de cultures phytoplanctoniques (*i.e* *Thalassiosira weissflogii*, *Emilinia huxleyi*) ont montré un changement de la communauté procaryotique avec l'augmentation de la pression hydrostatique ([Tamburini et al., 2006, 2009b; Riou et al., 2018](#)). En effet, [Tamburini et al. \(2006\)](#) ont mis en évidence, une augmentation du phylum *Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides* et de la classe des γ -*Proteobacteria* avec l'augmentation de la pression hydrostatique. Dans une autre expérimentation en laboratoire, Tamburini et collaborateurs

Chapitre 4

*Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi**

ont montré avec des particules issues du milieu naturel que la classe des α -*Proteobacteria* était impactée par l'augmentation de la pression hydrostatique (Tamburini et al., 2009b). Et enfin Riou et al. (2018) ont mis en évidence, avec des particules issues d'une culture *E. huxleyii*, une communauté dominée par la classe des γ -*Proteobacteria* dans les incubations en condition de pression, alors que dans le contrôle à pression atmosphérique, la communauté de procaryotes était dominée à la fois par les α -*Proteobacteria* et γ -*Proteobacteria*. Cependant, dans ces précédents travaux, la diversité des procaryotes a été évaluée avec des méthodes d'hybridation *in situ* couplé à la fluorescence (*i.e* FISH, CARD-FISH), bien que quantitatives, cela ne permet pas d'avoir une grande résolution au niveau de la diversité en ciblant principalement les taxons comme les phylums et classes.

Dans ce chapitre, l'étude a été menée lors d'une campagne océanographique en Atlantique Nord (DY032), avec des particules issues également d'une culture *E. huxleyii*. La diversité des procaryotes a été estimée grâce à un séquençage MiSeq Illumina (2x250 pb paire-end) de l'ARNr 16S, afin de nous permettre d'augmenter la résolution de la diversité en présentant des résultats au niveau de la famille et du genre pour mieux comprendre qui sont les acteurs de la reminéralisation du POC. Ce chapitre de thèse a été publié en 2021 dans une issue spéciale de la revue MDPI Water.

Pour cette étude, j'ai réalisé l'expérimentation, analysé la diversité procaryotique issue de métabarcoding, et participé à l'écriture de l'article.

Chapitre 4

*Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi**

Article 3

Tamburini, C., Garel, M., Barani, A., Boeuf, D., Bonin, P., Bhairy, N., et al. (2021). Increasing hydrostatic pressure impacts the prokaryotic diversity during *Emilinia huxleyi* aggregates biodegradation. *MDPI Water* 13, 1–18. doi:10.3390/W13192616.

Acknowledgements

We thank the crew and officers of the R.R.S. DISCOVERY (NERC) for their help during the DY032 cruise. We would like to thank Prof. Richard Lampitt (NOC Southampton) for supporting our work at the Porcupine Abyssal Plain. This work was partly funded by Labex OT-Med (ANR-11-LABEX-0061 www.otmed.fr) Investissements d'Avenir, French National Research Agency (ANR, www.agence-nationale-recherche.fr), through the A*Midex ROBIN project (ANR-11-IDEX-0001-684 02 to F.A.C.L.M. and C.T.) with which V.R. was supported. Part of the equipment used in this work was funded by European Regional Development Fund (ERDF; project n° 1166-39417). This work is a contribution to the Mediterranean Institute of Oceanography "Pompe Biologique" (BioPump Group). The authors also thank PRECYM, OMICS, SAM, PACEM and CULTURE – MIO platforms for facilities.

INCREASING HYDROSTATIC PRESSURE IMPACTS THE PROKARYOTIC DIVERSITY DURING *EMILIANIA HUXLEYI* AGGREGATES BIODEGRADATION

Christian Tamburini¹, Marc Garel¹, Aude Barani¹, Dominique Boeuf², Patricia Bonin¹, Nagib Bhairy¹, Sophie Guasco¹, Stéphanie Jacquet¹, Frédéric A.C. Le Moigne¹, Christos Panagiotopoulos¹, Virginie Riou¹, Sandrine Veloso¹, Chiara Santinelli³, and Fabrice Armougom¹

(1) Aix Marseille Université, Université de Toulon, CNRS, IRD, MIO UM 110, 13288, Marseille, France

(2) Daniel K. Inouye Center for Microbial Oceanography: Research and Education, University of Hawaii, Manoa, Honolulu, HI, 96822, USA.

(3) C.N.R., Istituto di Biofisica, Pisa, Italy

Keywords: biological carbon pump; carbon cycle; mesopelagic; mineral ballast; coccolithophorid; *Emiliana huxleyi*; prokaryotes; biodegradation; hydrostatic pressure

Abstract

In the dark ocean, the balance between the heterotrophic carbon demand and the supply of sinking carbon through the biological carbon pump remains poorly constrained. In situ tracking of the dynamics of microbial degradation processes occurring on the gravitational sinking particles is still challenging. Our particle sinking simulator system (PASS) intends to mimic as closely as possible the *in situ* variations in pressure and temperature experienced by gravitational sinking particles. Here, we used the PASS to simultaneously track geochemical and microbial changes that occurred during the sinking through the mesopelagic zone of laboratory-grown *Emiliana huxleyi* aggregates amended by a natural microbial community sampled at 105 m depth in the North Atlantic Ocean. The impact of pressure on the prokaryotic degradation of POC and dissolution of *E. huxleyi*-derived calcite was not marked compared to atmospheric pressure. In contrast, using global O₂ consumption monitored in real-time inside the high-pressure bottles using planar optodes via a sapphire window, a reduction of respiration rate was recorded in surface-originated community assemblages under increasing pressure conditions. Moreover, using a 16S rRNA metabarcoding survey, we demonstrated a drastic difference in transcriptionally active prokaryotes associated with particles, incubated either at atmospheric pressure or under linearly increasing hydrostatic pressure conditions. The increase in hydrostatic pressure reduced both the phylogenetic diversity and the species richness. The incubation at atmospheric pressure, however, promoted an opportunistic community of “fast” degraders from the surface (*Saccharospirillaceae*, *Hyphomonadaceae*, and *Pseudoalteromonadaceae*), known to be associated with surface phytoplankton blooms. In contrast, the incubation under increasing pressure condition incubations revealed an increase in the particle colonizer families *Flavobacteriaceae* and *Rhodobacteraceae*, and also *Colwelliaceae*, which are known to be adapted to high hydrostatic pressure. Altogether, our results underline the need to perform biodegradation experiments of particles in conditions that mimic pressure and temperature encountered during their sinking along the water column to be ecologically relevant.

4.1 INTRODUCTION

The oceanic biological carbon pump, through a complex set of processes, removes a part of the atmospheric carbon dioxide (CO₂), fixed by photosynthesis in the euphotic ocean, by storing it into the ocean's interior (Eppley and Peterson, 1979; Siegel et al., 2016). Hence, the dark ocean food webs and biogeochemical cycles are mainly fueled by gravitational sinking particles (the biological gravitational pump—BGP). Recently, the particle injection pumps have been proposed as an augmented BGP (Boyd et al., 2019), aggregating additional transportation pathways such as water mixing process, eddy subduction, and diel or seasonal vertical migrations of fish or zooplankton. The mesopelagic or twilight zone (euphotic zone base to 1000 m depth) represents a key environment, in which gravitational sinking particles are transported and transformed (Siegel et al., 2016; Le Moigne, 2019), half of the flux loss being due to particle fragmentation and remineralization (Briggs et al., 2020), driven by zooplankton (Steinberg et al., 2008; Hernández-León et al., 2020; Kiko et al., 2020) and by heterotrophic microorganisms (Simon et al., 2002; Giering et al., 2014). While the twilight zone is at risk due to climate warming and potential human exploitations (Martin et al., 2020), little is known about the global composition, ecology, and functions of the microbiota inhabiting this vast ocean domain. The BGP functioning may be altered by global oceanic changes (increasing stratification, changes in upwelling and ice cover, acidification, lower oxygen, and higher temperature) according to future climate projections (Bopp et al., 2013; Moore et al., 2018; Ibarbalz et al., 2019). It is therefore highly relevant to estimate and understand how gravitational sinking particles are remineralized (into dissolved inorganic carbon) by heterotrophic prokaryotes through mesopelagic waters.

Using a marine snow catcher device, Baumas et al., (2021) recently studied the link between diversity and activity of prokaryotes associated with freshly collected gravitational sinking particles at the Porcupine Abyssal Plain site (PAP site) in the Eastern North Atlantic Ocean. To complement these observations, we hereby present a laboratory biodegradation experiment carried out during the same field sampling campaign (DY032 cruise). In this paper, we evaluate the hydrostatic pressure impact, as a single abiotic forcing factor, on prokaryotic diversity and activity associated with gravitational sinking particles. Following the diatom-dominated spring bloom, the Eastern North Atlantic experiences some of the most extensive

Chapitre 4

*Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi**

coccolithophore blooms on the planet (Sanders et al., 2014). Most of the deep North Atlantic sediments consist of rich calcareous materials composed of coccolithophores, such as *E. huxleyi*, implying a significant role for these organisms in efficient export (Le Moigne et al., 2013b; Sanders et al., 2014). The presence of “ballast” minerals (such as opal, calcium carbonate, or dust) has been proposed to preserve the organic matter from biotic degradation (Hedges et al., 2001; Armstrong et al., 2002, 2009; Ingalls et al., 2003; Bressac et al., 2019; Panagiotopoulos et al., 2020). Prokaryotic-mediated diatom silica dissolution has been found to increase together with the degradation of organic matter in surface waters (Bidle and Azam, 1999, 2001; Goutx et al., 2007) and to decrease with decreasing temperature (Bidle et al., 2002b). The addition of CaCO_3 to diatom aggregates was also observed to decrease silica dissolution by diminishing remineralization of the aggregates by zooplankton (Le Moigne et al., 2013a). Laboratory studies confirm that calcifying cells such as coccolithophores can enhance particle density and sinking speed (Engel et al., 2009). However, the link between CaCO_3 dissolution and particulate organic carbon (POC) degradation remains unclear, as there is still no evidence that CaCO_3 dissolution is microbiologically mediated Bissett et al., (2011) and referenced therein. Still, significant CaCO_3 dissolution occurs in the upper 1000 m of the water column, above the calcite or aragonite saturation horizon (Wollast and Chou, 1998, 2001). According to Sulpis et al., (2021), 47% of the global CaCO_3 exported to 300m depth might be dissolved in the water column.

In situ tracking of the dynamics at the particle level as they sink into the water column is still challenging. The PArticle Sinking Simulator (PASS) system is an experimental setup that accurately simulates the pressure increase (and the temperature decrease) that the prokaryotes associated with particles are experiencing during their sinking to depth (see details in Tamburini et al. 2009). Briefly, high-pressure bottles (HPBs) are used to incubate samples while pressure is linearly increased by means of a piloted pressure generator. Particles are maintained in suspension by rotating (semi-revolution) HPBs during the incubation in water baths mimicking temperature changes with depth. This unique experimental device has been previously used in a series of biodegradation experiments (Tamburini et al., 2006, 2009b; Riou et al., 2018).

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi*

Based on the experimental design of Bidle & Azam (1999, 2001) and Bidle et al. (2002, 2003), the first pressurized biodegradation assay of Tamburini et al. (2006) used diatom detritus (*Thalassiosira weissflogii*) as a source of POC and biogenic silica. In comparison with constant atmospheric pressure (ATM) conditions (as control), significantly lower aminopeptidase activity was measured under increasing pressure (HP) which, in turn, limited biogenic silica dissolution to a simulated depth of 800 m (Tamburini et al., 2006). Consistently with this first experiment, the degradation of freshly-sampled *in situ* particles (mainly fecal pellets) was also slower under HP than at ATM conditions (Tamburini et al., 2009b). In contrast with the latter experiments, calcifying *E. huxleyi* aggregates were found to be more sensitive to degradation under HP than ATM conditions, partially compensated by an increase of aggregation under increasing hydrostatic pressure (Riou et al., 2018). A stronger dissolution of particulate inorganic carbon (PIC) under HP has also been observed with diatom-biomineral (carbonate-kaolinite-smectite) aggregates, as well as a decrease in the rate of POC decay (de Jesus Mendes and Thomsen, 2012).

Although POC degradation rates decreased in the two sets of simulated sinking experiments (Tamburini et al., 2006, 2009b), in agreement with Turley (1993), no drastic changes were detected in prokaryotic assemblages, as estimated by Catalyzed Reporter Deposition Fluorescence *In situ* Hybridization methods (CARD-FISH). *Gammaproteobacteria* and *Alphaproteobacteria* dominated in both conditions, though the latter seemed to be affected by the increase in hydrostatic pressure (Riou et al., 2018). Archaea were also identified in particle degradation, as was already observed in previous studies (e.g. Bidle & Azam 2001, Simon et al. 2002). Changes in the finer taxonomic structure of the microbiota can, however, play a disproportionate role in the biogeochemical processes involved on particles, since rare species may realize key environmental functions (Jousset et al., 2017).

To finely monitor the phylogenetic changes occurring during particle sinking and to detail the effect of increasing hydrostatic pressure as the single abiotic forcing factor in this *Emilinia huxleyi*-aggregate biodegradation experiment, the present study describes the use of high-throughput sequencing of the transcript of the small ribosomal subunit (SSU, 16S rRNA) in particle-associated prokaryotes. We highlight the reduction in respiration rate of surface-originated community assemblages submitted to increasing hydrostatic pressure conditions as

well as a drastic difference in the composition of transcriptionally active prokaryotes associated with *E. huxleyi*-derived particles comparing incubations performed at atmospheric and at increasing hydrostatic pressure.

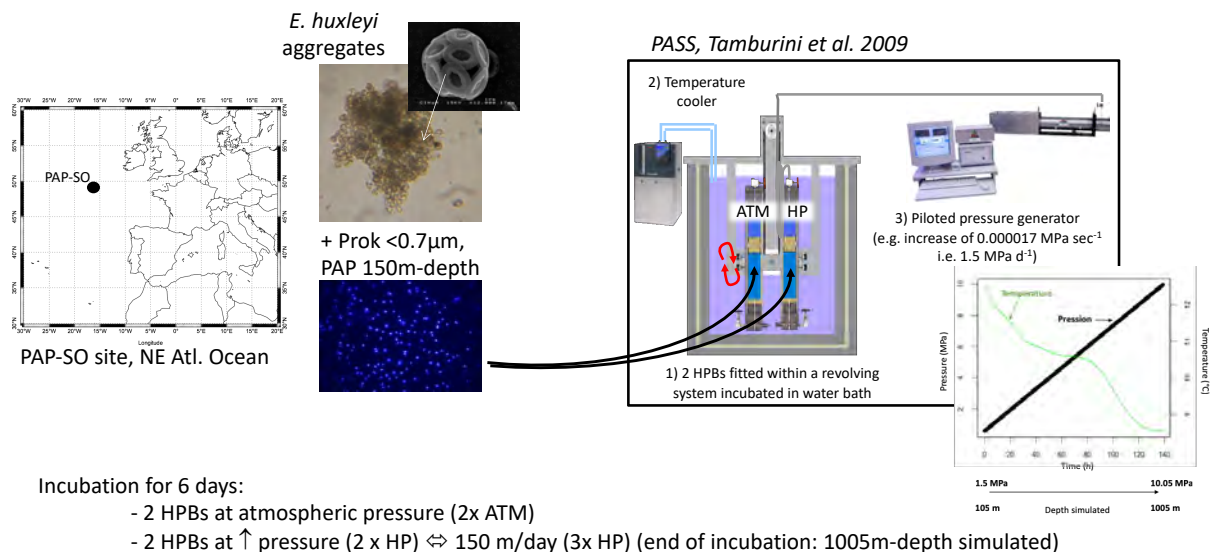
4.2 METHODS

4.2.1 SINKING PARTICLES SIMULATION EXPERIMENTS (SINPAS EXPERIMENTS)

Incubation experiments were conducted in June-July 2015 on board the RRS Discovery at the Porcupine Abyssal Plain Sustained Observatory (PAP-SO; 49°N,16°W) site during the DY032 cruise. Figure 4-1 shows the complete design of the incubation experiments. On June 28th 2015, a total volume of 7 L of seawater sampled at 105 m of depth was gently filtrated through pre-combusted GF/F filters (450°C for 6 h) in order to obtain fresh natural <0.7 µm prokaryotic assemblages. Around 4 L of these natural prokaryotic assemblages were inoculated with aggregates made of an axenic culture of *E. huxleyi* TW1 strain, prepared following the protocol described in Riou et al. (2018), to obtain a ca. 50 µM final POC concentration. This mix was split into six fractions, using a peristaltic liquid dispenser (Jencons Scientific Ltd., Leighton Buzzard, UK), pouring the fractions into pre-combusted glass bottles.

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi*



Incubation for 6 days:

- 2 HPBs at atmospheric pressure (2x ATM)
- 2 HPBs at ↑ pressure (2 x HP) ⇔ 150 m/day (3x HP) (end of incubation: 1005m-depth simulated)

Sampling (in duplicates) at T0 and at T6-ATM and T6-HP conditions:

- TOC, DOC, carbohydrates, minerals analyses and direct O₂ consumption
- Prokaryotic enumeration and specific diversity using MiSeq Illumina sequencing

Figure 4-1 Schematic design of the sinking particles simulation (SINPAS) experiment. The objective of the present study was to investigate the effect of increasing hydrostatic pressure on the degradation of *Emilinia huxleyi* aggregates by NE Atlantic natural free-living prokaryotic assemblages collected at 105 m depth (PAP site). Using the particles sinking simulator system (PASS described in Tamburini et al., (2009b)), incubations were performed in duplicates for over 6 days under constant atmospheric pressure (ATM) or controlled increasing pressure conditions (HP) simulating a sinking rate of 150 m d⁻¹. Both ATM and HP conditions were submitted to a decrease in temperature mimicking profiles measured in situ by CTD (see plot temperature and pressure versus time). Global O₂ consumption was real-time monitored inside the high-pressure bottles using planar optodes via a sapphire window in both ATM and HP conditions. Three data sets were therefore obtained: initial time (T0), and after 6 days of incubation T6-HP and T6-ATM. The differences between T0 and T6-HP were due to the fate of *E. huxleyi* aggregates, the decrease in temperature, and the increase in hydrostatic pressure, those between T0 and T6-ATM were due to the fate of *E. huxleyi* aggregates and the decrease in temperature, and those between T6-HP and T6-ATM were due only to the increase in hydrostatic pressure.

Duplicate samples (T0) were immediately sub-sampled for the biogeochemical parameters and diversity as described below. The four other aliquots were immediately transferred into high-pressure bottles (HPBs, 500 mL final volume) and fitted onto the particle sinking simulator (PASS) system (Tamburini et al., 2009b). Incubations were performed in duplicates for 6 days, either at atmospheric pressure (ATM) or continuously pressurized at a rate of 1.5 MPa d⁻¹ (HP) corresponding to a simulated sinking rate of 150 m per day. Coccolithophore aggregates were kept in suspension by half-revolutions every minute of the 2-paired HPBs in 2 temperature-regulated water baths. After the 6-days incubation, T6-HP samples had reached 10.05 MPa, simulating the sinking of the aggregates (and their associated prokaryotic assemblages) to a depth of -1005 m, while T6-ATM samples had remained at

Chapitre 4

*Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi**

atmospheric pressure. Both ATM and HP incubations were performed following a decrease in temperature (from 13 to 8.5 °C at the end of the incubation), agreeing with the temperature profile measured in situ between –105 and –1005 m, during the sampling period (Figure 4-1). HP samples were compared to ATM samples (in duplicate), in which the only decrease in temperature was controlled in the same water baths simultaneously. For a complete description of the PASS system, see ([Tamburini et al., 2009b](#)), except for the online measurement of dissolved oxygen concentration described hereafter.

At the end of the 6 days incubation, gentle depressurization was performed for the T6-HP samples. All the HPBs were opened and transferred in pre-combusted glass bottles prior to chemical and microbial sub-sampling.

4.2.2 BIOGEOCHEMICAL ANALYSES

All glassware was rinsed with 1 N HCl, Milli-Q water, and pre-combusted at 450 °C for 6 h prior to use. All plastic wares were rinsed with 1 N HCl and Milli-Q water and changed for each sample.

Samples (20 mL) for total organic carbon (TOC) were stored at –20 °C and analyzed at the Institute of Biophysics (IBF), CNR, Pisa, with a Shimadzu TOC-VCSN as described [Santinelli et al. \(2015\)](#). Particulate carbohydrates (PCHO-C) were obtained by gently filtrating 30 mL throughout pre-combusted GF/F filters. Then, 10–15 mL of the filtrate were transferred with pre-combusted glass pipettes into pre-cleaned 50 mL falcon tubes for dissolved carbohydrates (DCHO-C) analysis. GF/F filters and falcon tubes were stored in the dark at –20 °C until analysis. In the laboratory, samples were analyzed as described previously ([Panagiotopoulos et al., 2014](#); [Suroy et al., 2015](#)). Total carbohydrates (C-TCHO) were obtained by summing C-PCHO and C-DCHO results.

Samples for particulate calcium (PCa) were obtained by gently filtrating 50 mL throughout 0.45 µm polycarbonate filters. Filters were rinsed with a few mL of Milli-Q water, dried (50 °C), and stored in Petri dishes at room temperature for later analysis. In the laboratory, total digestion of filters was performed using a tri-acid mixture (0.5 mL HF/1.5 mL HNO₃/HCl 1 mL; all Optima grade) in closed Teflon beakers overnight at 95 °C in a clean pressurized room. After evaporation close to dryness, samples were re-dissolved into 10 mL of HNO₃ 2%. Solutions were analyzed for Ca and other elements of interest (i.e., Al, Sr, and Ba) by

Chapitre 4

*Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi**

HR-ICP-MS (high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry; ELEMENT XR, ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) according to [Jacquet et al. \(2015\)](#). The presence of remaining sea salt was checked by analyzing Na and the sea salt particulate Ca (and other elements analyzed). Their contribution was found to be negligible. The suspended matter was obtained by gently filtrating 50 mL through pre-combusted and pre-weighed GF/F filters, dried overnight, and reweighed.

Prokaryotic abundance was estimated by flow cytometry. Five milliliters of seawater were immediately fixed with glutaraldehyde (0.25% final concentration), freeze-trapped in liquid nitrogen, and stored at -80°C until analysis. In the laboratory, the samples were thawed at room temperature and stained using SYBR Green II (Invitrogen®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), then analyzed using a FACSCalibur (BD Biosciences®, San Jose, CA, USA) of the PRECYM flow cytometry platform (<http://precym.mio.univ-amu.fr/>, accessed on 17/09/2021), to enumerate heterotrophic prokaryotes with low nucleic acid content (LNA) and high nucleic acid content (HNA) as detailed in [Girault et al., \(2015\)](#).

Dissolved oxygen concentration was real-time monitored every minute, inside one ATM high-pressure bottle and one HP high-pressure bottle using a non-invasive planar optode method (optical oxygen-sensor and OXY-10 mini device, Presens GmbH®, Regensburg, Germany) following a protocol and design presented in [Garel et al., \(2019\)](#). Raw O_2 -data measured using planar O_2 sensing foil under increasing pressure conditions were corrected by post-treatment to take into account at each measurement point the hydrostatic pressure using the calibration equation of [McNeil and D'Asaro, \(2014\)](#). Temperature decrease was also corrected for both incubations. Respiration rates were estimated, in both conditions, by linear regression.

4.2.3 16S rRNA EXTRACTION, PCR AMPLIFICATION AND SEQUENCING

Fifty milliliters of initial time duplicates (T0) and of final-time duplicates after incubation at atmospheric pressure (T6-ATM) or at increasing pressure conditions (T6-HP) were filtered through $0.2\ \mu\text{m}$ -pore-size filters (hydrophilic polyethersulfone membrane 47 mm, GPWP04700 Millipore Corp., Burlington, Massachusetts, USA). Filters were flash-frozen in liquid nitrogen until further processing. Nucleic acids extractions were performed in duplicate, after gentle

Chapitre 4

*Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi**

thawing on ice, with TE-Lysis buffer (20 mM Tris, 25 mM EDTA, 1 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ Lysozyme) containing 10% SDS, and phenol:chloroform:isoamyl alcohol (1:1:1, pH 6). Resulting RNA samples were treated with TurboDNaseTM (Ambion[®], ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) until any trace of DNA remains and then reverse transcribed into cDNA by RT-PCR using SuperScript[®] IV Reverse Transcriptase with random primers (Life Technologies, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's recommendations. The hypervariable regions V4 of the SSU were amplified with universal primer sets (Caporaso et al., 2012), 515F-Y (5' -GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3', (Parada et al., 2016)) and 806RB (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3', (Apprill et al., 2015b)), using 2.5 U/50 μL TaKaRa PrimeSTAR[®] GXL DNA polymerase (OZYME). Amplicons were sequenced by MiSeq Illumina (paired-end, 2*250 pb) at the Genotoul platform (<https://get.genotoul.fr/en/> accessed on 17/09/2021). The raw data are available under the NCBI SRA project PRJNA731017.

4.2.4 ANALYSIS OF THE 16S rRNA-BASED COMMUNITY

The cDNA-based community is referred to as the “16S rRNA-based community”. The 16S rRNA-based community is interpreted as the “actively transcribing prokaryotes” since 16S rRNA is not a direct indicator of activity but rather protein synthesis potential (Blazewicz et al., 2013). Hereafter, “active” will thus refer to “actively transcribing prokaryotes”. Raw sequencing reads (paired-end, 2*250 bp) were analyzed using DADA2 v1.8, a model-based approach for correcting amplicon sequencing errors (Callahan et al., 2016). After inspection of quality read profiles, the 16S rRNA paired-end reads were quality-trimmed ($\text{maxEE} = \text{c}(2,3)$), and only reads >150 bp were retained. The paired-end reads were then dereplicated, denoised (DADA2 error correction model), assembled, and chimeras were discarded (see “Results and Discussion” section). The high-quality and denoising sequences obtained are amplicon sequence variants (ASVs). The taxonomic assignment of ASVs was performed using the SILVA_132 database (Quast et al., 2013), and 100% of sequence identity is required for species level. Finally, after sub-sampling normalization, α - and β -diversity were characterized by R packages including phyloseq v1.36 (McMurdie and Holmes, 2013), vegan v2.5–7 (Oksanen et al., 2020), Microbiome v1.14 (Lahti et al., 2017) and ComplexHeatmap v2.7 (Gu et al., 2016). Z-scores are abundance data normalized and standardized. The Z-scores are given in standard deviation (SD) to the population mean.

The global richness and the α -diversity indices (Observed, ASV, Shannon, Simpson, and PD_faith) were calculated from phyloseq v1.36 and abdiv v0.2 (Bittinger, 2020). To decide whether the data are homogeneous or heterogeneous, respectively (and thus more suitable for linear or unimodal ordination methods, respectively), we calculated detrended correspondence analysis (DCA) with vegan and checked the length of the first ordination axis in units of SD. The length of the first axis was 2.92 SD units, which means that linear ordination methods such as principal component analysis (PCA) are suitable (Lepš and Šmilauer, 2003). PCA was computed with prcomp from the stats R package (R Core Team, 2013). The PCA was performed at the family level because genus level indicated a large fraction of “not assigned” sequences (30% in HP and T0). To avoid the double-zeros problem (Legendre and Legendre, 1998), low abundant families were discarded (<0.5%). Only the most contributing families were displayed using the significant contribution scores from fviz_contrib of factoextra from stats v3.6.2 R package. The environmental variables were then fitted onto PCA ordination using envfit function of vegan by calculating multiple regression. Coordinates onto PCA ordination, R^2 scores, and p -values for each environmental variable were obtained from envfit from stats R package. Differences between T6-HP and T6-ATM conditions were analyzed by the non-parametric pairwise Mann–Whitney test on raw data (i.e., individual replicate values) due to the low number of replicates.

Finally, the β -Nearest-Taxon-Index (β NTI) (Webb et al., 2002; Stegen et al., 2012) was used to quantify the phylogenetic turnover of communities between groups (T6-ATM, T6-HP, and T0), estimated using the picante R package (Kembel et al., 2010). The β NTI quantifies the magnitude and direction of deviation between an observed β MNTD (Mean-Nearest-Taxon-Distance) value and the mean of the null β MNTD distribution in SD units. The β NTI values ranging from -2 to 2 indicate the dominance of stochastic processes, while $|\beta$ NTI| >2 indicates the dominance of deterministic processes (Stegen et al., 2015).

4.3 RESULTS AND DISCUSSION

4.3.1 BIOGEOCHEMISTRY OF *E. HUXLEYI* PARTICLES IN SINKING PARTICLE SIMULATION EXPERIMENTS.

TOC-normalized concentration of total carbohydrates (TCHO-C/TOC) significantly decreased (Mann–Whitney pairwise test, $p = 0.05$) under both conditions between the initial time ($T_0 = 5.6\% \pm 0.7\%$) and the 6-days incubation ($T_6\text{-HP} = 1.2\% \pm 0.1\%$; $T_6\text{-ATM} = 2.0\% \pm 0.5\%$; Figure 4-2A). Carbohydrates were equally degraded in both experimental conditions since no significant differences between ATM and HP conditions were noticeable (Mann–Whitney pairwise test, $p > 0.05$). Previous investigations with fecal pellet particles showed that particulate carbohydrate, chloropigments, and transparent exopolymer particles (TEP) concentrations decreased more slowly under HP than ATM conditions (Tamburini et al., 2009b). Increasing hydrostatic pressure conditions also influenced the efficiency of silica dissolution, as well as prokaryotic activity (aminopeptidase), during another sinking particle simulation experiment with diatom (*Thalassiosira weissflogii*) aggregates (Tamburini et al., 2006). The latter results agree with a recent study of Liu et al., (2020), which showed, using a ^{13}C -amended diatom culture (*T. weissflogii*), that degradation rates by the particulate-attached microbiote were markedly slowed down by increasing pressure.

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'agregats de *Emilinia huxleyi*

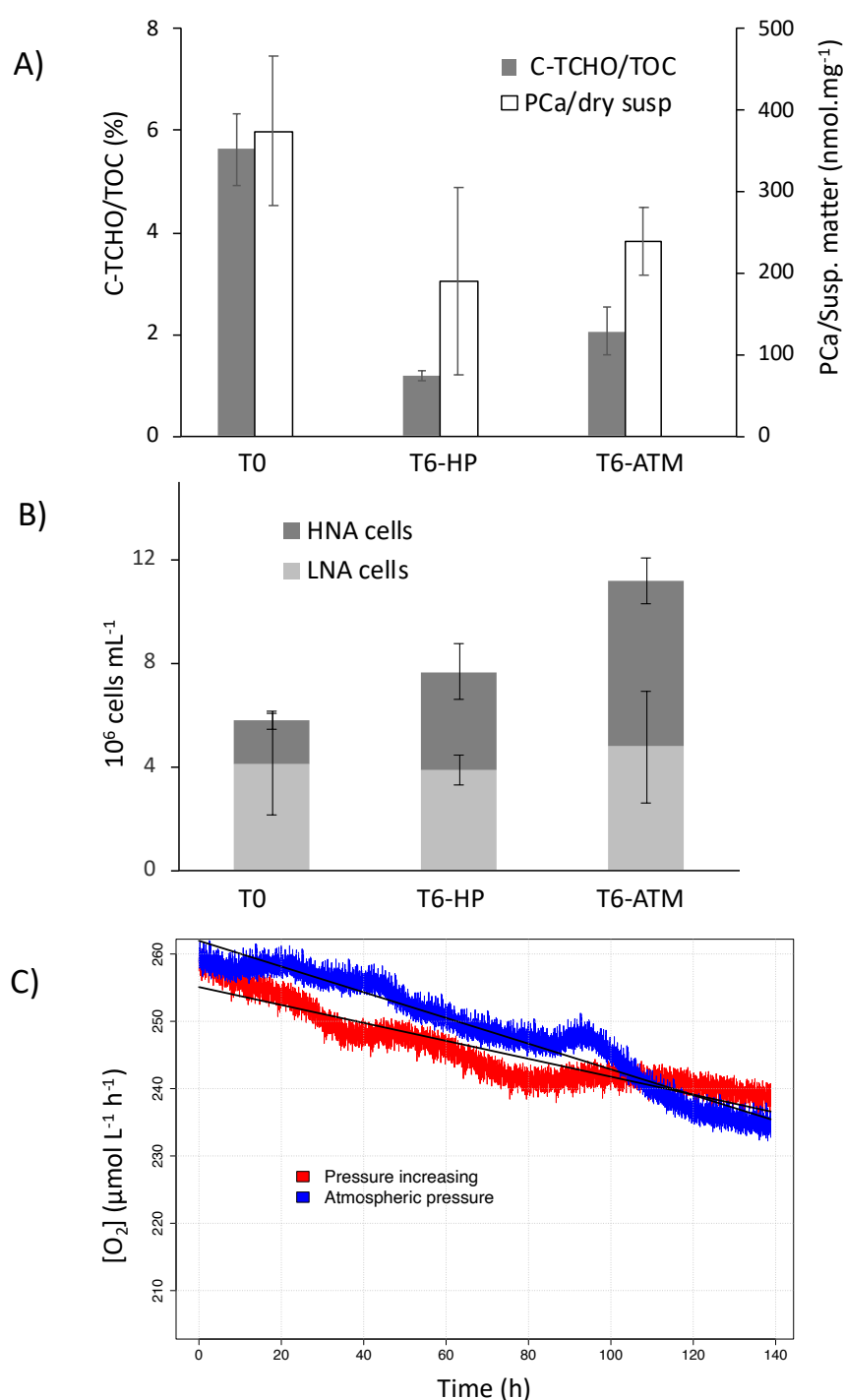


Figure 4-2 (A) Ratio of total carbohydrates (TCHO-C) versus total organic carbon (TOC) (left axis) and between particulate calcium and suspended matter (PCa/Susp.) expressed in nmol mg⁻¹ (right axis) initially (T0) and after 6 days of incubation under increasing pressure (T6-HP) or atmospheric pressure (T6-ATM) conditions. Error bars display the standard deviation of the duplicates in both incubation conditions. (B) Prokaryotic abundance initially (T0) and after 6 days of incubation at HP and ATM conditions. LNA (light gray) are cells with low nucleic acid content, HNA (dark gray) are cells with high nucleic acid content. Total cells correspond to the sum of LNA and HNA cells. Error bars display the standard deviation of the duplicates in both incubation conditions. (C) Real-time measurements of the total O₂ consumption under conditions of increasing pressure (HP, red line) and atmospheric conditions (ATM, blue line). Black lines correspond to the linear regression used to calculate oxygen consumption rates; HP: $-0.13 \pm 0.0005 \mu\text{M O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $R^2 = 0.90$; ATM: $-0.19 \pm 0.0005 \mu\text{M O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $R^2 = 0.96$.

In the present study, *E. huxleyi* coccoliths were partially dissolved, as the ratio of particulate calcium to suspended matter was twice lower after 6 days of incubation under both conditions (T6-ATM, T6-HP) compared to T0 (PCa/Susp., Figure 4-2A). However, as for the TCHO-C/TOC ratio, no significant difference in the particulate calcium/suspended matter ratio (PCa/Susp., Figure 4-2A) between ATM and HP conditions was noticeable. Another study using diatom-mineral aggregates (carbonate-kaolinite-smectite) found that particulate inorganic carbon dissolution was enhanced under HP conditions (de Jesus Mendes and Thomsen, 2012). Using coccolithophorid aggregates (*E. huxleyi*), we previously hypothesized that increased hydrostatic pressure may cause coccoliths to dissolve more rapidly than in surface waters (Riou et al., 2018). Concurrently, Dong et al., (2018) highlighted an in vitro pressure-dependent enhancement of PCa dissolution rates by a factor of 2 to 4 at 7 MPa (equivalent to a depth of 700 m) compared to dissolution at 0.1 MPa (atmospheric pressure).

Hence, the impact of increasing hydrostatic pressure on the degradation processes occurring in the mesopelagic zone could be dependent on the quality and source of carbon within the aggregates, as well as on the aggregate types themselves (Tableau 4-1). When increasing pressure, fecal pellets as well as diatom aggregates would better protect the access to organic carbon available for microbial degradation than particles composed of *E. huxleyi* coccoliths. Such variations in degradation efficiencies could also indicate differences in microbial communities associated with different types of aggregates or depths.

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi*

Tableau 4-1 Main results from literature reporting similar experiments performed with surface prokaryotic community

References	Aggregates	Pressure simulated	Depth simulated	Temperature	Sinking rate	Dissolved O ₂ measurement	Microbial diversity	Main results
[36]	Aggregate-forming diatom <i>T. weissflogii</i>	2 - 14 MPa	200-1400 m	13°C	Pressure increase of 1.5 MPa each day	ND	CARD-FISH	Increasing pressure decreased silica dissolution and aminopeptidase activity (relatively to constant ATM conditions) and increased Bacteroidetes abundance
[34]	Fecal pellets	2 - 15 MPa	200-1500 m	13-13.4°C	Continuously pressurized at a rate of 2 MPa d ⁻¹	ND	CARD-FISH	Particulate carbohydrate, chloropigments and TEP decreased more slowly under HP than ATM condition
[35]	Aggregate-forming coccolithophorid <i>E. huxleyi</i>	1 - 17 MPa	100-1700 m	13°C	Continuously pressurized at a rate of 1.5 MPa d ⁻¹	ND	CARD-FISH	Increasing pressure enhanced dissolution of calcite and particle aggregation (relatively to constant ATM conditions), and decreased α -Proteobacteria abundance
[67]	Synthetic inorganic Ca ¹³ CO ₃ (calcite)	25 MPa	2500 m	21°C	ND	ND	ND	Increasing pressure promoted calcite dissolution at 7 MPa
[38]	Culture of <i>Thalassiosira weissflogii</i>	10 MPa	1000 m	ND	Continuously pressurized at a rate of 3 MPa d ⁻¹	ND	ND	Increasing pressure enhanced particulate inorganic carbon dissolution
[70]	No aggregates	40 MPa	4000 m	20.5°C	Pressure increase of 10 MPa each day	Yes	FISH*	Increasing pressure inhibited growth of surface-originated bacteria and decreased α -Proteobacteria et Bacteroidetes abundance
[71]	Aggregate-forming diatom <i>Nannochloropsis</i> and <i>Tetraselmis</i> algae	30 MPa	3000 m	4°C	Pressure increase of 2.5 MPa every 15 min	Yes	ND	Increasing pressure promoted particulate inorganic carbon dissolution

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggregats de *Emilinia huxleyi*

[72]	Diatom-bacteria aggregates	10 to 100 MPa	100-10000 m	3°C	Pressure increase or decrease of 10 MPa during 15–20 min	Yes	ND	Increasing pressure inhibited respiration on surface prokaryotic assemblage
[72]	Aggregate-forming diatom <i>Skeletonema marinoi</i>	10 to 100 MPa	100-10000 m	3°C	Pressure increase or decrease of 10 MPa during 15–20 min	Yes	ND	Increasing pressure inhibited respiration on surface prokaryotic assemblage
[This study]	Aggregate-forming coccolithophorid <i>E. huxleyi</i>	1.05-10.05 MPa	105-1005 m	13-8.5°C	Continuously pressurized at a rate of 1.5 MPa d ⁻¹	Yes	Metabarcoding	Increasing pressure inhibited respiration on surface prokaryotic assemblage, reduced both the phylogenetic diversity and the species richness (specifically Bacteroidetes)

*Microbial community was artificial, composed with 5 different strains of Bacteria.

4.3.2 BIOLOGICAL ACTIVITY ASSOCIATED WITH *E. HUXLEYI* PARTICLES IN SINKING PARTICLES SIMULATION EXPERIMENTS.

The dynamics of prokaryotic abundance was monitored by flow cytometry in HP and ATM conditions (Figure 4-2B). The abundance of LNA cells remained constant, while HNA cells increased between the beginning and the end of the experiment. HNA cells would represent the active fraction of prokaryotes, while LNA cells would represent the dormancy fraction of prokaryotes (Bouvier et al., 2007). This increase was particularly marked under ATM conditions, which resulted in a significant difference (Mann–Whitney test, p -value = 0.03) in total cell abundance between HP and ATM incubation conditions (Figure 4-2B). However, during this experiment, the growth rate of total prokaryotes was lower compared to our previous studies on similar aggregates (Riou et al., 2018). This was probably caused by colder incubation temperatures. In this work, the temperature decreased from 13°C to 8.5°C, mimicking the gradient encountered between 150 and 1000 m depth in the NE Atlantic Ocean, whereas in the previous experiments temperature was never lower than 13°C, mimicking the temperature observed in the mesopelagic waters of the NW Mediterranean Sea (Tamburini et al., 2006, 2009b; Riou et al., 2018). In Turley (1993), while increasing pressure had no significant influence on cell numbers, it showed an impact on DNA and protein syntheses. Indeed, cell activities (biomass production) decreased exponentially for free-living bacteria but linearly for the particle-attached bacteria with increasing pressure, whereas no significant influence on cell numbers was reported. Hence, increasing pressure plays a role on the activity of particle-associated microbial community, diminishing their activity while they sink with particles, as previously mentioned in (Tamburini et al., 2006, 2013a).

To assess changes in prokaryotic activity with increasing pressure, we monitored, in real-time, O₂ consumption for both HP and ATM conditions (Figure 4-2C). This indicates rates of prokaryotic aerobic respiration activity. As far as we know, very few studies investigated the impact of pressure on particle respiration activity by direct measurements of O₂ consumption (de Jesus Mendes et al., 2007; Grossart and Gust, 2009; Stief et al., 2021). All of these investigations showed that no significant differences occurring in the first simulated 1000 meters of the water column. In our incubation experiments, O₂ consumption rates were slightly higher at ATM compared to HP conditions (-0.13 ± 0.0005 versus -0.19 ± 0.0005 $\mu\text{M h}^{-1}$, for HP

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'agregats de *Emilinia huxleyi*

and ATM conditions, respectively, t-test comparison regression slopes p value = 0.001). These respiration rates are in line with [Stief et al. \(2021\)](#) showing inhibition of respiration when surface prokaryotic assemblages were exposed to pressure levels of 10–50 and 60–100 MPa. Under ATM conditions, more competitive opportunistic taxa could grow by increasing the respiration rate unrealistically, as attested by the diversity found (see thereafter). A previous study has shown that a change of environmental conditions leads to a change in microbial community composition, privileging opportunistic microorganisms at atmospheric pressure ([Garel et al., 2019](#)). In the following section, we investigate how prokaryotic species richness evolved during our incubations.

4.3.3 EFFECT OF THE INCREASING PRESSURE ON THE ACTIVE PROKARYOTIC COMMUNITIES EXPERIMENTS

To further evaluate the effect of increasing pressure on the active community composition (term used hereafter referring to 'actively transcribing prokaryotes', see Methods section), a 16S rRNA metabarcoding survey was performed during the degradation experiment. A total of 445,620 raw reads were generated, ranging from 59,218 to 98,599 depending on the sample. After the quality trimming process, about 69-76% of reads were retained (Tableau 4-2).

Tableau 4-2 Data quality trimming and alpha diversity indices. The columns of Table 4.1 indicate the number of reads retained after each processing step of DADA2 from the initial raw data (Input). "Filtered" column corresponds to the removal of bad quality reads, "Denoised" corresponds to the correction of sequencing errors, "Merged" are assembled reads and "Non chimeric" are not artefact sequences. The "Final retained" column is the read proportion conserved for downstream analyses. The "global richness" (which corresponds to the number of observed amplicon sequence variants—ASVs), Shannon, Chao1, and PD (phylogenetic diversity) columns provide alpha diversity indices calculated for each sample.

Conditions	Samples	input	Filtered	Denoised	Merged	Non-chimeric	Final retained (%)	Observed	Shannon	Chao1	PD
T0	T01	59 218	43 696	43 524	42 323	42 242	71.33	106	4.13	106	10.47
	T02	71 661	54 986	54 827	53 562	53 412	74.53	96	3.86	96	8.45
T6-ATM	ATM1	50 037	36 087	35 891	34 808	34 746	69.44	90	2.55	104	8.80
	ATM2	98 599	72 212	71 853	70 168	69 053	70.03	98	2.14	99	9.21
T6-HP	HP1	94 669	72 866	72 701	71 523	71 500	75.53	76	3.83	76	6.20
	HP2	71 436	53 275	53 177	52 386	52 386	73.33	54	3.50	54	5.52

The global species richness (observed ASV counts) ranged from 54 to 106 ASVs, depending on the sample (Tableau 4-2). Overall, the T6-HP samples showed a lower global richness (65 ± 11) than those of the T6-ATM (94 ± 4) and the T0 (101 ± 5) ones. However, regarding the Shannon and Simpson diversity indices (Tableau 4-2), which consider the evenness, a small decrease of the α -diversity level is observed under ATM condition compared to either T0 or T6-HP samples.

This observation results from a more pronounced imbalance of the evenness within the microbial community under ATM conditions, a direct consequence of the presence of highly dominant ASVs (in relative abundance). Moreover, estimating the phylogenetic diversity indices (PD) (Faith, 1992) indicates higher phylogenetic diversity within T0 (9.46) and T6-ATM (8.63) compared to T6-HP groups (5.86). Altogether, these findings indicate that the degradation experiment under increasing pressure reduced both species richness and phylogenetic diversity independently of the degradation process of organic matter. Indeed, no significant difference was observed for the TCHO-C/TOC ratio, as well as for the particulate calcium/suspended matter ratio (PCA/Susp. Figure 4-2A) between ATM and HP conditions.

The overall taxonomic community composition of samples was spread across 21 phyla (Figure 4-3). The bacterial phylum *Proteobacteria* mostly dominated the active community in all the conditions, accounting for 68.7, 93.9 and 60.2% of the reads (on average) within T0, ATM and HP groups, respectively. The *Bacteroidetes*, *Firmicutes* and *Actinobacteria* were the other major bacterial phyla, accounting (on average) for 10.2, 1.4 and 18.1% for T0, 7.4, 3.3 and 5.8% for T6-ATM and 7.7, 0.5 and 6.7% for T6-HP samples. All the other bacterial phylum were represented by less than 2% in all conditions. The archaeal community, which encompasses the *Euryarchaeota*, *Nanoarchaeota*, *Crenarchaeota* and *Thaumarchaeota* phyla, represented 1.7, 0.1 and 5.5% (on average) of the reads within T0, T6-ATM and T6-HP samples, respectively. Finally, specific community structures emerged according to the experimental conditions (Figure 4-3). In that respect, the T0 samples (initial time) harbored a community profile dominated by *Proteobacteria* (68.7%) associated with similar abundance levels of *Firmicutes* (7.4%), *Bacteroidetes* (10.2%) and *Actinobacteria* (7.7%). In contrast, the T6-ATM community profile consisted of almost exclusively *Proteobacteria* (93.9%), with the lowest *Firmicutes* (3.3%), *Bacteroidetes* (1.4%) and *Actinobacteria* (0.5%) abundance levels, compared to T0 and T6-HP samples. Lastly, the T6-HP community profile showed the lowest *Proteobacteria* level (60.2%) to the benefit of *Bacteroidetes* (18.1%), and similar levels of *Actinobacteria* (6.7%) and *Firmicutes* (5.8%) to those of T0. These results emphasize the variations of dominant phyla within the active community subjected to different experimental conditions. Abundance variations occurred between T6-ATM and T6-HP samples after a 6-day incubation period,

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi*

starting from a common (T0) initial prokaryotic community (itself exhibiting variability between duplicates).

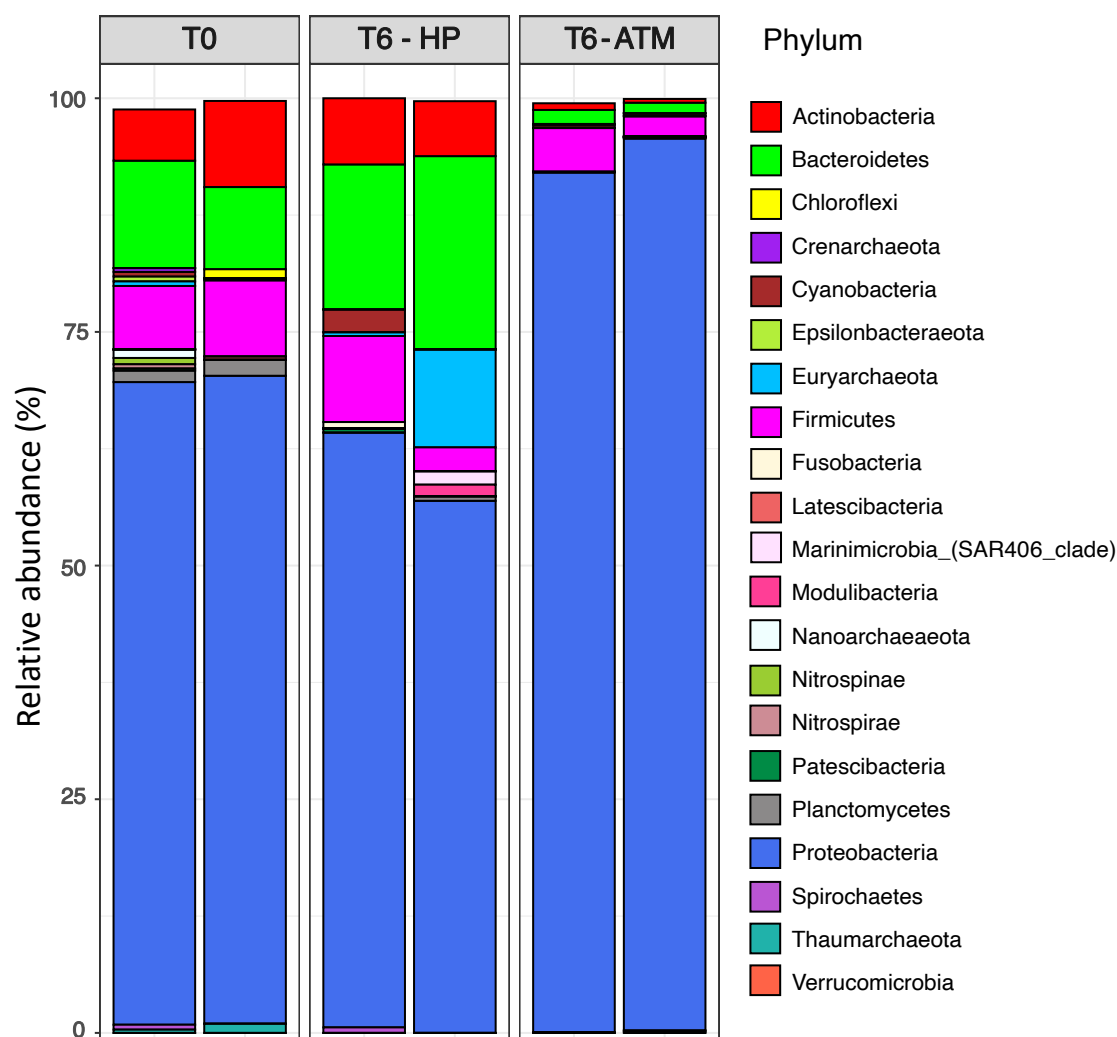


Figure 4-3 Relative abundance (%) of the most actively transcribed prokaryotes (>0.01% in average) initially (T0) and after 6 days of incubation under increasing pressure (T6-HP) and atmospheric pressure (T6-ATM) conditions.

Bacteroidetes appeared to be positively affected by increasing pressure (highest abundance level for T6-HP samples), which may have been stimulated by the supply of fresh complex organic matter released by particles, as already reported elsewhere (Cottrell and Kirchman, 2000; Kirchman, 2002). Using a similar 16S rRNA metabarcoding, Liu et al. (2020) recently found, from ^{13}C -amended diatom culture degradation experiment performed at pressures corresponding to 75, 2000 m and 4000 m-depth, that *Gammaproteobacteria*, *Alphaproteobacteria* and *Bacteroidetes* were the most active phyla in POC degradation. As already observed in previous similar biodegradation experiments using catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH) for phylogenetic distinctions

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi*

(Tamburini et al., 2006, 2009b; Riou et al., 2018), a very low abundance of Archaea (<3%, initially) was present after 6 days of incubation (except in one of the duplicate-sample at T6-HP where *Euryarchaeota* reached 10.5% of the whole community).

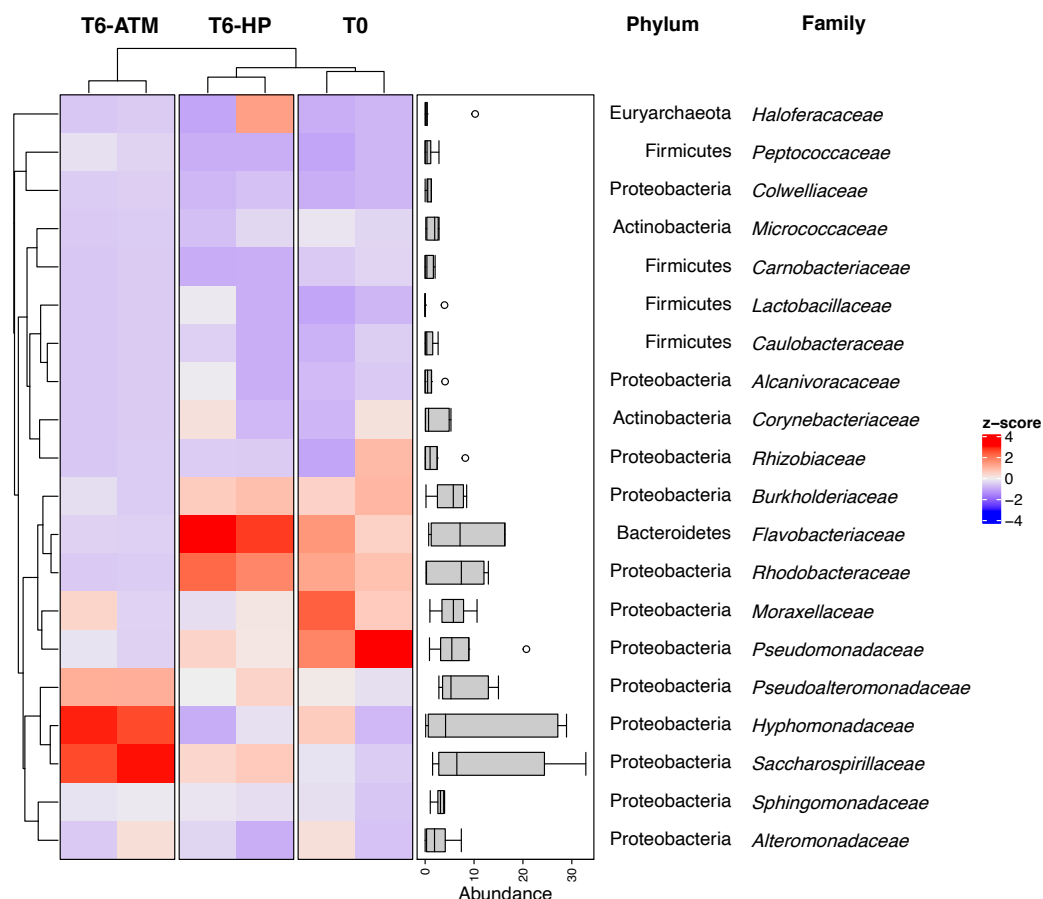


Figure 4-4 Heatmap visualizing the Z-score distribution from the relative abundance of the dominant families (>0.5% in average) initially (T0) and after 6 days of incubation under increasing pressure (T6-HP) and atmospheric pressure (T6 ATM) conditions. Z-score is the number of standard deviations separating a raw score from the mean. For each sample, we calculated how far from the mean (of a family relative abundance considering all samples) is the family abundance score of the sample. A positive Z-score indicates the raw score is higher than the mean (red color), and a negative Z-score reveals the raw score is below the mean (blue color). The higher the Z-score, the more overrepresented the family is for the sample compared to the mean. The dendrogram clusters were calculated with the UPGMA method (unweighted pair group method with arithmetic mean) according to the Bray–Curtis similarity index. The boxplots in the right panel show the distribution of family relative abundances (in %) for all samples.

As β -diversity analysis, a hierarchical clustering (based on Bray-Curtis dissimilarity of community composition) combined to a Z-score heatmap of the 20 most active families (relative abundance > 0.5%) showed the reunification of samples by experimental condition (T0, T6-ATM or T6-HP) Figure 4-4). Accordingly, Figure 4-4 exhibits a strong divergence between the abundance family profiles of T6-ATM, T0 and T6-HP groups. For the T6-ATM samples, the representative family pattern is indicated by a relative overabundance of the opportunistic

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi*

Pseudoalteromonadaceae (1.12 ± 0.002 , Z-score $\pm$ SD), *Hyphomonadaceae* ($+2.68 \pm 0.24$, Z-score $\pm$ SD) and *Saccharospirillaceae* ($+2.71 \pm 0.28$, Z-score $\pm$ SD) compared to the mean. In contrast, each of these families is slightly underrepresented within T0 and T6-HP samples (Z-score ≤ 0.5). These 3 opportunistic families belong to the *Gammaproteobacteria*, which account for 85% of the total of *Proteobacteria* fraction (93.9%) at ATM condition (Figure 4-3).

At atmospheric pressure, the genus *Oceanicaulis* of the *Hyphomonadaceae* is predominant (28% of all genera and represented by only one ASV), whereas it reaches only 2.6% and 0.6% within T0 and T6-HP, respectively. The genus *Oceanicaulis* has been associated with *E. huxleyi* blooms, and is one of the main consumers of alkenones produced by *E. huxleyi* (Zabeti et al., 2010). Strains of *Pseudoalteromonadaceae* were also exacerbated during a recent particles degradation experiment performed at atmospheric conditions (Enke et al., 2018). This family is considered as “fast” degraders (copiotrophic) and primary colonizers on particles, partially due to their ability to swim (Enke et al., 2018).

The bacterial families mainly responsible for the T6-HP pattern were the *Flavobacteriaceae* (Z-score = $+2.94 \text{ SD} \pm 0.2$), *Rhodobacteraceae* (Z-score = $+2.03 \text{ SD} \pm 0.30$), and to a lesser extent, *Colwelliaceae*. In our incubation experiments, *Flavobacteriaceae* (*Bacteroidetes*) and *Rhodobacteraceae* (*Alphaproteobacteria*), each representing 7.1% and 7.4% at T0, reached 16.3% and 12.4% at the end of incubation under HP condition, respectively.

4.3.4 FACTORS DRIVING THE active prokaryotic communities

Figure 4-5 is a principal component analysis (PCA) performed at the family level on which the environmental variables were fitted (see Methods section). It identifies the same taxonomic family patterns as the major compositional factors (of the global community) that govern the distinction of samples, as the Z-score heatmap (Figure 4-4). The PC1 axis (46.2% of total variance) mainly drives the position of T6-ATM samples by a positive gradient of *Hyphomonadaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Saccharospirillaceae*, but none of the environmental factors measured is linked to PC1 since the best candidate “HNA” shows weak correlation ($R^2 = 0.67$) and no significance (p-value = 0.21) with the PC1 axis. The PC2 axis (22.7% of total variance) mainly leads to the discrimination of T6-HP samples from others by another positive gradient of *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae* and *Colwelliaceae*. Interestingly, the multiple regression of environmental variables on the PCA ordination shows a strong

Chapitre 4

Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi*

correlation of the 'Pressure' factor with the PC2 axis ($R^2 = 0.97$) and close to the significance threshold (p-value = 0.067, probably due to the small number of samples – duplicates). This trend links the positive gradient of *Flavobacteriaceae*, *Rhodobacteraceae* and *Colwelliaceae* to the increased pressure, suggesting that increased pressure is one of the potential factors that may shape the specific family pattern of HP communities relative to those of the initial time – T0 (Figure 4-5).

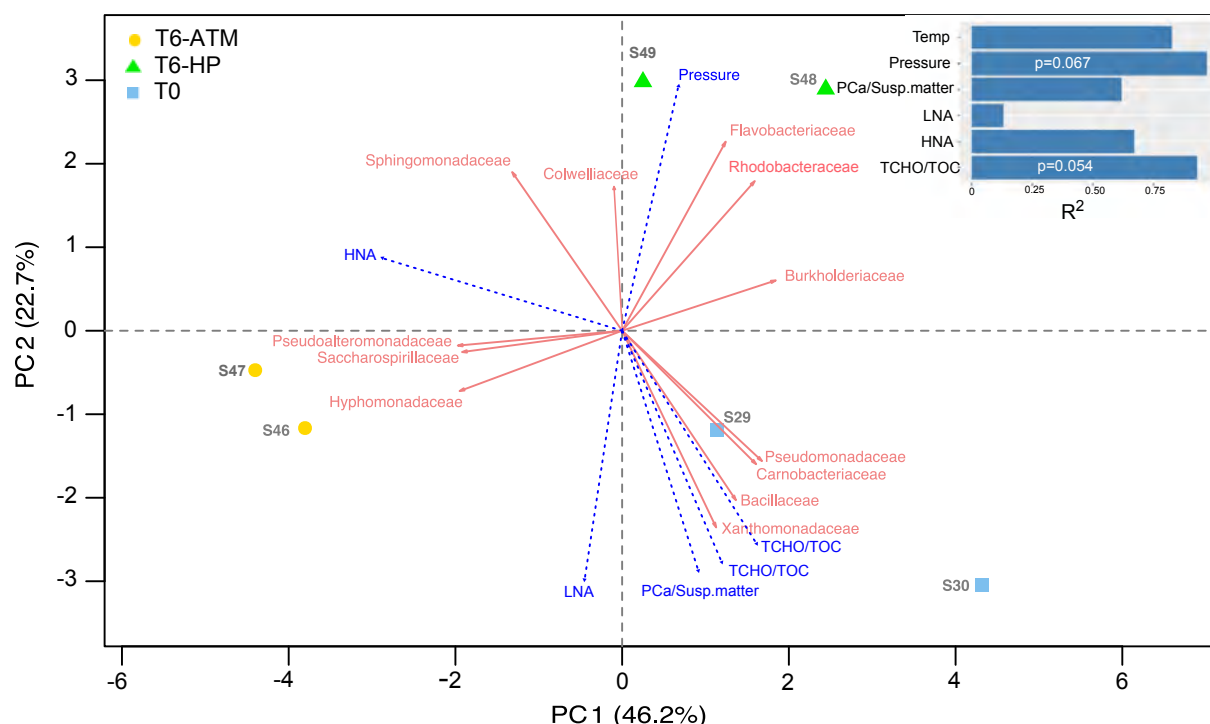


Figure 4-5 Principal Component Analysis (PCA) biplot of samples and the most contributing taxonomic families (based on `fviz_contrib` function of `factoextra`). Samples are indicated as yellow circles (ATM), green triangles (HP) or blue squares (T0) whereas taxonomic families are indicated as red vectors. The magnitude of red vectors indicates the strength of their contributions to each PCA axis. Vectors pointing in similar directions indicate positively correlated variables, vectors pointing in opposite directions indicate negatively correlated variables. The environmental variables were fitted as blue vectors (dashed lines) onto PCA using `envfit` function by calculating multiple regression with R^2 scores and p-values (top right of the Figure).

Phylogenetic community turnover (at the ASV level) between sample groups (T0 vs. T6-ATM and T0 vs. T6-HP) was assessed by the β Nearest-Taxon-Index (β NTI). This index helps to understand the forces that influence the community composition such as deterministic selection by environmental factors and/or ecologically neutral (stochastic) processes (Stegen et al., 2012, 2015). We thereby calculated β NTI to determine the stochastic/deterministic balance in the community assembly observed within each HP and ATM samples after a 6-day degradation experiment by increasing pressure (T6-HP) or not (T6-ATM) starting with the same initial community (T0). The β NTI score between 'T0 vs. T6-HP' and 'T0 vs. T6-ATM' is +2.57 and

Chapitre 4

*Effet d'une augmentation de pression hydrostatique sur la diversité microbienne durant la biodegradation d'aggrégats de *Emilinia huxleyi**

+0.02, respectively. A $|\beta NTI| < 2$ for 'T0 vs. T6-ATM' pairwise community comparison excluded selection as the dominant process. In our experiment, the environmental factors are controlled in a closed system, as factors that change over time do not impose selection in ATM, neutral processes are expected to be dominant, here opportunistic were favored. Hence, the three strong competitors (having ecological traits of *r*-strategy) gammaproteobacterial families dominated at ATM conditions (*Pseudoalteromonadaceae*, *Hyphomonadaceae*, and *Saccharospirillaceae*). The dynamics of surface community incubated in ATM conditions can be compared to what happens to deep-sea communities incubated at atmospheric pressure after decompression ([Garel et al., 2019](#)), in which a distortion of the diversity occurred in comparison with samples maintained at *in situ* high-pressure condition. Consequently, biodegradation experiments simulating particles sinking along the water column but carried out at atmospheric pressure could be stated as ecologically biased.

In contrast, the 'T0 vs. T6-HP' pairwise community comparison has a $\beta NTI > 2$, suggesting selection as the dominant process. Starting from the initial time (T0), the incubation experiments were done by changing only one factor: the hydrostatic pressure gradient. The increasing hydrostatic pressure progressively increased the strength of selection (the selective pressure) and could have led to the exclusion of taxa ([Dini-Andreote et al., 2015](#)), as suggested from the alpha-diversity results (richness and phylogenetic diversity reduction).

Although this work deals with a short sample number (due to technical constraints), our results suggest a selection process driven by increasing pressure conditions (Figure 4-5). This environmental factor, that microbes experienced while they sink with gravitational sinking particles, leads to a reduction in both species richness and phylogenetic diversity (37 genera initially detected in T0 were absent in T6-HP), as well as to a remodeling of the community structure (shifts in phyla and family abundance, Figure 4-4 and Figure 4-5). Thus, most interestingly, the results of these laboratory sinking particles simulation experiments agree with those obtained on freshly recovered particles samples using a marine snow catcher ([Baumas et al. 2021](#)).

Our findings also indicated that there was no difference in the degradation of organic matter between HP and ATM conditions (Figure 4-2A), as well as there was no significant impact of the TCHO-C/TOC and PCa/Susp. matter in the microbial composition of HP and ATM

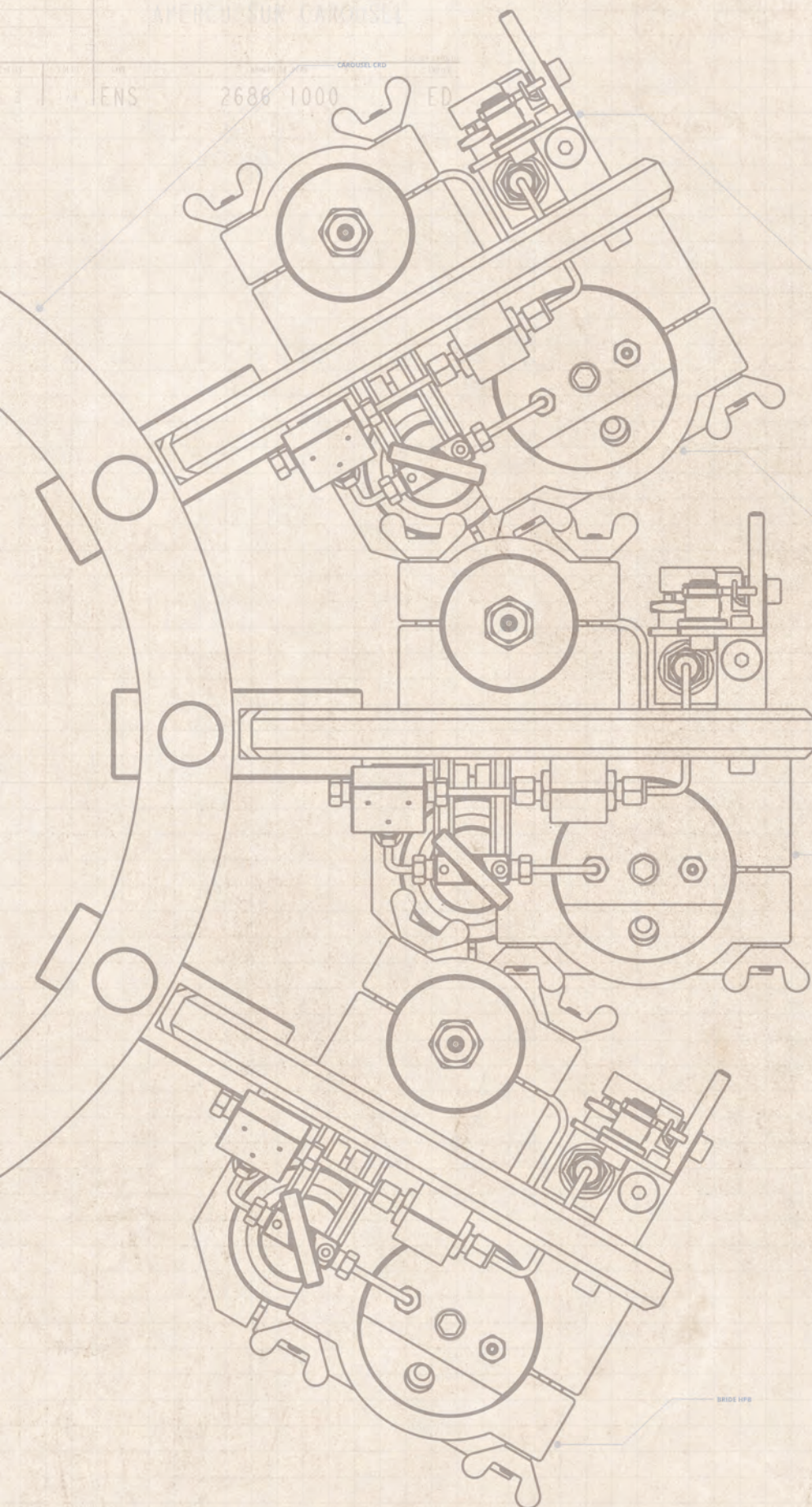
conditions (Figure 4-5). Thus, despite a reduction in the phylogenetic diversity in HP samples and a reshaping of the HP community structure, the functional capability of the HP community for degrading organic matter remains undisturbed (i.e., functional resilience). This result is supported by the fact that phyla, families, and genera are absent in the HP community but present in T6-ATM and/or T0 correspond to very low abundant taxa (<1% and mostly <0.5%), which are probably not major contributors to organic matter degradation.

This result supports the hypothesis that the pressure increase alone impacts the diversity of active prokaryotes during particle sinking throughout the water column. *Flavobacteriaceae* and *Rhodobacteraceae* are known to be key particle colonizers in surface waters, in part because of their ability to degrade complex substances (Buchan et al., 2014; Dang and Lovell, 2016). *Bacteroidetes* in particular, displayed many adaptation strategies to grow in a particle-attached lifestyle, such as a wide variety of genes coding for an integrated regulation of adhesion and polymers degradation processes (Fernández-Gómez et al., 2013). In a study carried out by Elifantz et al. (2013), in coastal water, it has been hypothesized that *Rhodobacteraceae* were pioneer colonizers and *Bacteroidetes* were secondary colonizers adapted to semi-labile substances. Finding them as belonging to the most active families in our experiment was thus in line with their known ecological traits. Interestingly, *Colwelliaceae* (*Gammaproteobacteria*), especially the *Colwellia* genus, were among the lowest active families at T0 (0.3% in average) and reached 1.7% at T6-HP. The genus *Colwellia* is known to be one of the few microbial taxa from which members adapted to life at high-hydrostatic pressure have been isolated (see for examples Peoples & Bartlett 2017 and references therein). This bathytype is an opportunistic heterotroph, capable of fast growing on nutrient-rich environments, such as classical culturing media, or when associated with sinking particles. Indeed, *Colwellia* has been found as the second most abundant genus (DNA-level) and one of the mostly transcriptomically active (RNA-based) inhabitants of the microbiote associated with sinking particles at abyssal depth in the North Pacific Subtropical Gyre (Boeuf et al., 2019). Wannicke et al. (2015) showed that the piezotolerant strain *Colwellia maris* was able to adapt itself to the increasing pressure by rising its proportion of unsaturated fatty acids in the membrane phospholipids. This characteristic is recognized in piezophilic strains to optimize membrane fluidity at high pressure (DeLong and Yayanos, 1985).

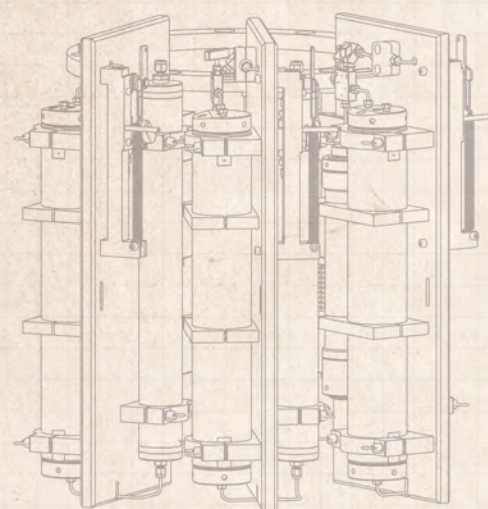
4.4 CONCLUSION

Using our original experimental setup and approach, we demonstrate a drastic difference in the composition of transcriptionally active prokaryotes associated with *E. huxleyi*-derived particles comparing incubations performed at atmospheric and at increasing hydrostatic pressure. Hence, we highlighted the necessity to simulate the increase in pressure to which prokaryotes are subjected during the gravitational sinking of particles to accurately characterize microbial key players in particle degradation in natural environment. Together with previous particle-degradation experiments ([Tamburini et al., 2006, 2009b](#); [Riou et al., 2018](#)) and field experiments ([Baumas et al., 2021](#)), this study also sheds light on the urgent need to combine geochemical and molecular biology approaches into laboratory simulation, to deconvolve the apparent imbalance between prokaryotic carbon demand and sinking flux within the deep sea ([Burd et al., 2010](#)). Going further by reducing the 'bottle effect' ([Ionescu et al., 2015](#); [Bižić-Ionescu et al., 2018](#)) and by including omic approaches such as those carried out by [Pelve et al. \(2017\)](#) or [Boeuf et al. \(2019\)](#), are promising ways to refine our understanding of processes at play on sinking particles. Such coupled approaches will provide relevant information on the biological actors and key microbial functions, or metabolic pathways involved in the degradation of sinking particles in the deep ocean.

CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES



PLATEAU DE PRÉLÈVEMENT



CHAPITRE 05

[illegible]

5 CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES

5.1 CONCLUSIONS

Dans ce travail de thèse, les objectifs principaux étaient d'apporter des éléments de réponses à la problématique de l'étude en conditions *in situ*, des procaryotes libres des zones méso- et bathypélagique ou de comprendre l'impact de l'augmentation de pression sur des communautés de surface. Quel est l'impact de la pression hydrostatique sur la diversité spécifique et l'activité métabolique ? Pour répondre à cette question, j'ai suivi deux axes de travail :

- i) Sur un assemblage microbien profond, quelles sont les méthodes, procédures et technologies nécessaires pour étudier ces microorganismes en condition *in situ* ? Quels sont les impacts d'une décompression sur la diversité spécifique et la dégradation de la matière organique ?
- ii) Sur un assemblage microbien de surface, quels sont les effets d'une chute de particules vers l'océan profond sur l'activité métabolique et la diversité spécifique des procaryotes ?

Le premier axe est développé dans les chapitres 2 et 3, le second axe est développé dans le chapitre 4. Dans cette section, je synthétiserai les résultats présentés dans chaque chapitre avant de donner quelques perspectives technologiques en termes d'échantillonnage et d'analyse de la diversité dans les conditions *in situ*.

5.1.1 METHODES, PROCEDURES ET TECHNOLOGIES POUR ETUDIER LES COMMUNAUTES PROFONDES

Il n'est plus à démontrer que les communautés procaryotiques profondes sont composées à la fois de communautés dites autochtones adaptées aux conditions environnementales (pression hydrostatique et température) et de communautés dites allochtones apportées dans le milieu profond par différents processus comme la chute des particules, la formation d'eaux denses (Tamburini et al., 2013a). Ces procaryotes issus de masses d'eaux moins profondes ou de surface vont pour une grande partie avoir leurs métabolismes et leurs activités inhibées voire entrer en état de dormance attendant de meilleures conditions pour reprendre une activité

métabolique. Un échantillonnage classique, avec les bouteilles Niskin ou GoFlow, qui décompressera l'échantillon permettront aux communautés non-adaptées à une forte pression hydrostatique de retrouver des conditions plus favorables à leur développement. Les mesures synthétisées dans la revue de [Tamburini et al. \(2013a\)](#) démontrent clairement l'impact des conditions hydrologiques sur les mesures d'activités métaboliques (*e.g* activités ectoenzymatiques, production hétérotrophique procaryotique, assimilation d'acides aminés, de carbohydrates...). Cependant il existe encore trop peu de travaux montrant l'impact du changement des conditions environnementales sur la structure de la communauté procaryotique. Dans [Garel et al. \(2019\)](#) (article 1 de ce manuscrit, chapitre 2), j'essaie d'apporter un éclairage nouveau quant à cette problématique, mais également j'apporte une solution technique pour la mesure de la consommation d'oxygène en continu et de manière non invasive.

Dans ce travail je décris une preuve de concept pour la collecte, le maintien et le transfert d'échantillons, tout en maintenant constamment les conditions de pression *in situ*, en vue de réaliser différents types d'expérimentations comme réaliser des réplicats, étudier le devenir de la diversité procaryotique selon différentes conditions, isoler éventuellement de nouvelles souches microbiennes piézophiles dans les conditions *in situ* sans briser « la chaîne de pression hydrostatique ». Pour cette étude, un couple d'échantillons d'eau prélevé à 3000m de profondeur en mer Ionienne (Méditerranée) dont l'un a été collecté, et maintenu dans les conditions *in situ* de pression et de température, et l'autre a été décomprimé mais maintenu dans les conditions *in situ* de température. Le tout a été comparé à une troisième condition, un prélèvement avec une bouteille Niskin (donc décomprimé). Les résultats démontrent que les communautés microbiennes maintenues dans les conditions *in situ* sont différentes de celles ayant été décomprimées et de celles prélevées classiquement. Les échantillons décomprimés et incubés à pression atmosphérique présentent une communauté i) dominée par la famille des *Alteromonadaceae*, ii) un développement de prédateurs appartenant à la classe de *Deltaproteobacteria* (genre OM27). A l'inverse les échantillons maintenus dans les conditions *in situ*, présentent une diversité plus importante et une forte abondance de la famille des *Colwelliaceae* et particulièrement le genre *Colwellia* dont certaines souches ont été décrites comme piézophile ([Deming et al., 1988](#)). Ces résultats confirment ceux obtenus par [Edgcomb et al. \(2016\)](#) qui ont mis au point système d'échantillonnage autonome permettant de filtrer et

conserver les acides nucléiques comme l'ARN_m dans les conditions *in situ* (en stockant les échantillons après filtration dans du RNA later). Les auteurs ont montré qu'il existe une différence significative dans les profils d'expression de gènes entre les échantillons récoltés, filtrés *in situ* et conservés dans les conditions par rapport à ceux collectés par bouteilles Niskin.

Par la suite, dans l'étude décrite dans le chapitre 3 (article 2 publié en Mars 2021), nous avons confirmé l'importance du maintien des conditions environnementales lors d'une incubation pour étudier la dégradation de DOC semi-labile, du carbone organique dissous de haut poids moléculaire (« HMWDOC ») dans des conditions hydrologiques contrastées : i) lors d'une stratification des eaux, ii) lors d'une convection d'eau profonde. Un couple d'échantillon en duplicata a été prélevé et incubé dans les conditions *in situ* dans un cas et dans l'autre cas décomprimé puis incubé à pression atmosphérique. Dans les conditions de stratification, la communauté procaryotique autochtone est adaptée aux conditions environnementales. Ils confirment les résultats qui ont été obtenus par [Boutrif et al. \(2011\)](#) qui avaient utilisé de la matière organique semi-labile radiomarkée obtenue à partir d'une culture d'algue en présence de ³H-glucose. Concernant les conditions de convection, les eaux profondes ont été mélangées avec des eaux provenant de la surface transportant une communauté non adaptée au milieu profond ([Egan et al., 2012](#); [Tamburini et al., 2013a](#)). Les résultats montrent que les cinétiques de dégradation sont inversées à ceux en condition de stratification des eaux, probablement due à la ventilation du milieu profond avec du DOC plus labile provenant de la surface, devenant ainsi la source de carbone préférentielle des procaryotes non adaptés à la pression hydrostatique, permettant ainsi un développement plus rapidement.

5.1.2 IMPACT DE LA METHODOLOGIE POUR ETUDIER LA DEGRADATION DES PARTICULES CHUTANT DANS LA COLONNE D'EAU

Enfin dans le chapitre 4 (article 3 soumis dans MDPI Water), j'ai étudié l'effet de la pression hydrostatique sur une communauté procaryotique de surface lors d'une chute de particules. Le modèle de particules utilisé provient d'une culture d'*E. huxleyii*, une microalgue ubiquiste que l'on retrouve dans tous les océans ([McIntyre and Bé, 1967](#)) et dont les blooms peuvent être visibles par satellites. Dans cette étude, nous avons mis en évidence non seulement un effet de la pression hydrostatique sur l'activité métabolique avec inhibition de la respiration avec l'augmentation de la pression pour une communauté de surface mais également sur la structure des communautés microbiennes. En effet, l'étude montre une

communauté qui chute avec les particules (subissant une pression hydrostatique croissante) différente de celle incubée en même temps à pression atmosphérique (classiquement fait dans tous les laboratoires). A pression atmosphérique, la communauté procaryotique est composée à plus de 90% par les familles des *Pseudoalteromonadaceae*, *Hyphomonadaceae*, et *Saccharospirillaceae* qui sont des organismes à stratégie r. Alors qu'en simulant les conditions environnementales (pression hydrostatique et température), la communauté procaryotique évolue différemment avec une augmentation significative (plus de 2 fois le Z-score) des familles de *Flavobacteriaceae* et *Rhodobacteriaceae* connus pour être des colonisateurs de particules clés en surface, en partie grâce à leur capacité à dégrader des substances complexes. Cette étude confirme d'une part les résultats obtenus avec une communauté de Méditerranée (Riou et al., 2018), et d'autre part ceux obtenus dans Garel et al. (2019) montrant l'effet de la pression hydrostatique sur les communautés procaryotiques. Les expérimentations portant sur la dégradation de particules et ne tenant pas compte des paramètres environnementaux constituent un biais majeur dans les bilans biogéochimiques et dans l'identification des acteurs de cette dégradation et par voie de conséquence les processus métaboliques mis en cause.

Dans ce manuscrit, j'ai décrit des méthodes et procédures pour étudier les zones méso- et bathypélagique au travers d'une technologie standardisée, versatile et accessible pour la communauté. Comme perspective de ce travail, de nouveaux développements sont à venir. Dans la section suivante, je propose une voie de développement pour :

- Cultiver et isoler l'incultivable sans changer les conditions environnementales du prélèvement jusqu'à la mise en collection de nouvelles souches.
- Isoler et amplifier à l'échelle cellulaire les cellules d'une communauté naturelle.

5.2 PERSPECTIVES

D'un point de vue technologique, les méthodes pour échantillonner, isoler et décrire provenant de la zone bathypélagique a très peu évolué et est toujours utilisé à l'heure actuelle (ZoBell and Morita, 1959; Kato et al., 1995; Yayanos, 1995; Bartlett, 2002; Kato, 2011a; Martini et al., 2013; Jebbar et al., 2015; Dalmasso et al., 2016; Quémeneur et al., 2019; Oliver et al., 2020). Il existe actuellement un peu plus de soixante souches décrites comme piézophiles qui sont listées dans les revues de Jebbar et al. (2015) et mises à jour dans Cario et al. (2019). Par ailleurs, les progrès réalisés au cours de la dernière décennie dans le domaine du séquençage ont permis de dresser un tableau plus exhaustif sur la diversité spécifique et la potentialité fonctionnelle des procaryotes des grands fonds marins (Salazar et al., 2016). Seulement, il est encore difficile de trouver un système technologiquement simple pour être mis en œuvre dans n'importe quel laboratoire permettant de maintenir la pression hydrostatique depuis les prélèvements jusqu'au retour en laboratoire. Malgré, les différents prototypes d'échantillonneurs sous pression, très peu sont disponibles pour la communauté scientifique sans une expertise locale en ingénierie ou des installations de systèmes à haute pression. Mais, l'avènement de nouvelles technologies comme les laboratoires sur puce (« lab-on-ship » en anglais), dans le domaine des sciences environnementales apparaissent comme une alternative à des techniques conventionnelles.

La technologie microfluidique peut être définie comme un assemblage de compartiments de culture de l'ordre du micromètre reliés à un réseau des canaux d'alimentation de quelques dizaines de micromètres. Cette technologie permet de réaliser sur une même puce un grand nombre d'expériences avec des conditions variées d'une part et d'autre part permet de travailler avec des volumes de l'ordre du nanolitre. Cela présente donc un avantage considérable tant dans la mise en œuvre que dans la répartition d'échantillons précieux et souvent de petit volume également. Cet outil connaît un essor important dans le domaine de la microbiologie (Campos and Da Silva, 2013; Hegab et al., 2013; Ishii et al., 2014; Girault et al., 2019). Il est, par exemple désormais possible de commencer à élucider des phénomènes bactériens à fine échelle comme notamment les cycles cellulaires, le transport des électrons, la détection du quorum sensing, une activité métabolique par fluorescence. Il est possible de coupler ces puces à des observations par microscopie et à des mesures optiques. Enfin la microfluidique permet également de créer des écosystèmes synthétiques dans lesquels la

dynamique éco-évolutive spatiale des communautés bactériennes peut être explorée (Hol and Dekker, 2014; Leygeber et al., 2019). Dans les paragraphes suivants, je vais détailler quelques exemples d'utilisations transposables à l'océanographie microbienne.

5.2.1 QUELQUES APPLICATIONS DE LA MICROFLUIDIQUE A PRESSION ATMOSPHERIQUE POUR LES ACTIVITES METABOLIQUES

Divers organismes, tels que les bactéries, les levures, les algues, les champignons, les consortiums microbiens et autres, peuvent être cultivés dans des monocouches cellulaires bien définies en faisant correspondre la hauteur du compartiment à la taille de la cellule (Leygeber et al., 2019). La manipulation d'aussi petit volume permet un contrôle très précis de conditions environnementales telles que : la température, la pression hydrostatique, le pH, la pression partielle en gaz dissous, l'apport en continu de sels nutritifs et/ou en substrats organiques. En adaptant le design des puces, il est possible d'effectuer différents types d'expérimentations sur une même puce (Leygeber et al., 2019). La possibilité de paralléliser plusieurs « chips » de microfluidique permet un screening rapide et à haut débit des conditions optimales sur les métabolismes de microorganismes.

Par exemple, Tang et al. (2014) ont examiné les conditions de croissance d'une suspension d'*E. coli* et de deux souches de *Bacillus subtilis* en comparant la technologie sur puce microfluidique à la culture en tube conventionnel. Les auteurs ont mis au point une architecture de microfluidique en réseau dit « en arbre de Noël » pour tester les conditions de pH, de concentration en sel nutritifs et la température sur les cultures mono-spécifiques d'*E. coli*. Leurs travaux ont montré que le « screening » de toutes ces conditions a pu être réalisé en parallèle et beaucoup plus facilement sur puce microfluidique qu'en culture avec tubes. Les résultats montrent que les taux de croissance sont entre 5 et 16 fois supérieurs sur puce au regard des cultures en tube.

Sur une application avec une thématique environnementale, Kim et al. (2016) ont montré, en couplant une puce microfluidique à la microscopie à fluorescence, la capacité de deux souches phytoplanctoniques à produire du biocarburant : *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellulaire) et *Botryococcus braunii* (coloniale). La Figure 5-1A décrit d'une part le schéma conceptuel de la puce microfluidique sur lequel il est possible de voir les différentes chambres

réactionnelles (chambre de culture, d'incubation et d'observation) reliées entre elles par de fins canaux. La Figure 5-1B et représente une photo du dispositif de puce microfluidique utilisée dans le cadre de cette expérimentation compatible avec une observation par microscope à fluorescence. Les principaux résultats mis en lumière par les auteurs montrent l'accumulation de lipide (type biocarburant) chez *C. reinhardtii* dans différentes conditions de cultures (enrichissement ou limitation d'azote) au moyen de marqueurs fluorescents.

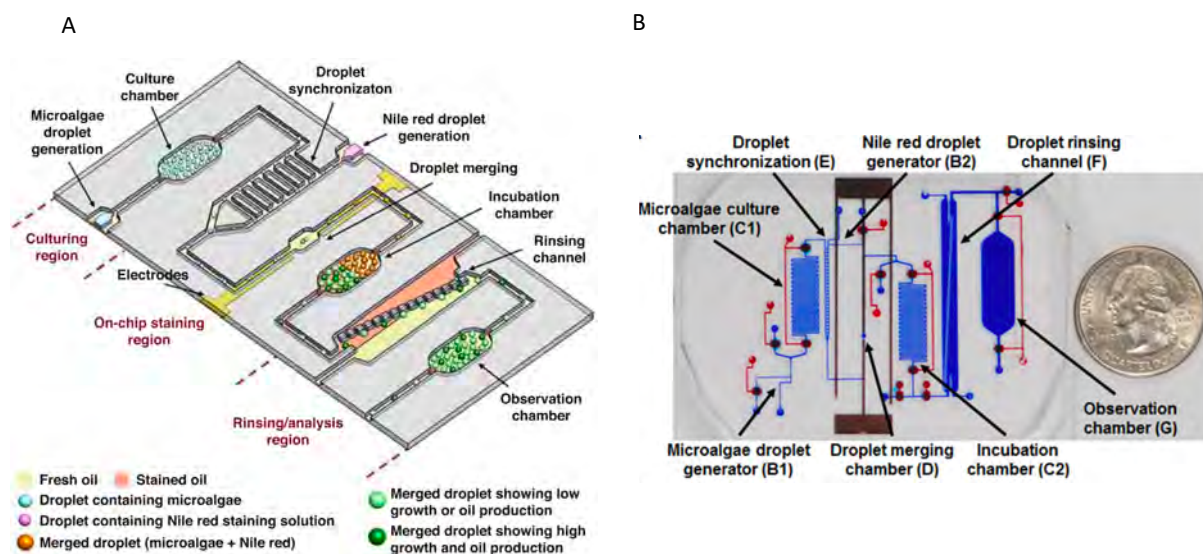


Figure 5-1 A) Schéma conceptuel d'une puce microfluidique pour étudier la production de biocarburant. Cette puce divisée en trois compartiments (une chambre de culture, une chambre d'incubation avec le marqueur fluorescent et la chambre d'incubation) reliées par des canaux. B) Photographie de la puce microfluidique rapportée à une pièce de monnaie mettant en exergue la miniaturisation du système réactionnel. D'après Kim et al. (2016).

Dans une application biotechnologique les puces microfluidiques ont été utilisées comme microréacteurs en culture semi-continue couplés à un microscope à épifluorescence (Buffi et al., 2016). Les auteurs utilisent *E. coli* comme « bactosensor », la souche bactérienne a été modifiée en y ajoutant un rapporteur fluorescent pour détecter l'arsénite (Na_2AsO_2). L'utilisation des puces microfluidiques a permis d'une part de trouver rapidement les paramètres optimaux de culture en continu de *E. coli* (taux de croissance, taux de dilution, volume réactionnel) pour l'induction de la fluorescence par l'exposition à l'arsénite. Les auteurs concluent que ce développement pourrait être déployé pour d'autres composés, mais également intégré à de nouveaux capteurs autonomes utilisables pour la détection de composé toxique dans l'environnement à l'image du capteur autonome qui mesure l'ATP dans l'eau développé par Fukuba et al. (2018).

POUR LA GENOMIQUE

D'un point vue écologie moléculaire, cette dernière décennie a vu se développer des laboratoires sur puce permettant à la fois le phénotypage mais également l'identification taxonomique par amplification et séquençage du génome à l'échelle cellulaire². Une étude récente effectuée par [Leung et al. \(2012\)](#) propose un automate de laboratoire permettant l'analyse génomique de cellules uniques et de consortiums microbiens à partir d'échantillons environnementaux en utilisant la microfluidique. Le Figure 5-2 présente l'architecture de la puce microfluidique couplant à la fois un système de tri cellulaire, des chambres réactionnelles et de pompes péristaltiques ainsi que le set-up de l'automate.

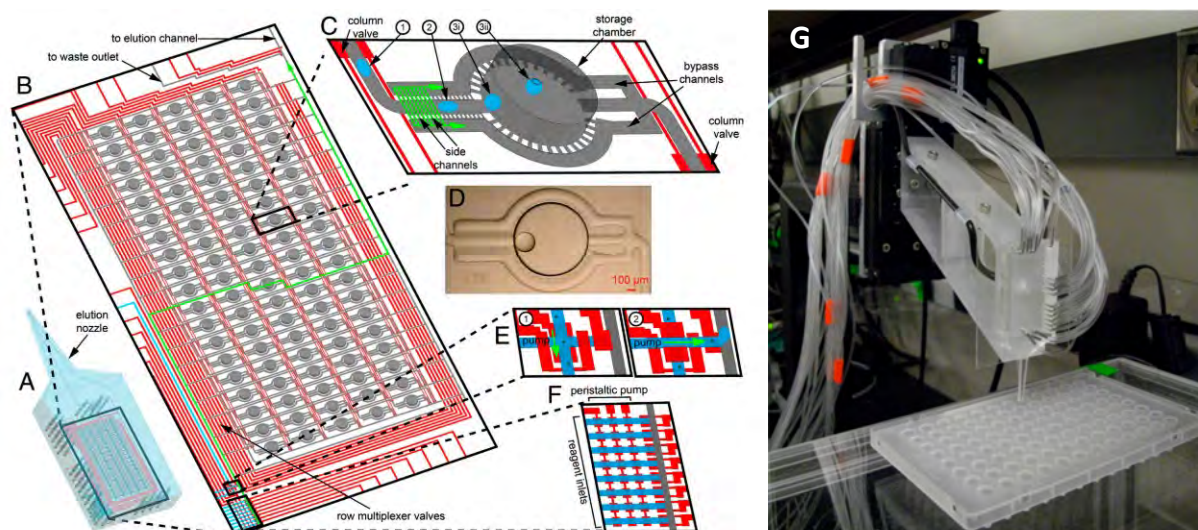


Figure 5-2 Réseau de réacteurs microfluidiques programmables tiré de l'article de Leung et al. (2012). Les légendes des schéma A, B, C, D, E, F sont une traduction de la légende originale. (A) Schéma du dispositif montrant la structure d'une buse d'élution conçue pour s'interfacer avec des tubes microfuges standards pendant l'élution des chambres. (B) Réseau adressable de 95 chambres de stockage organisées en 19 rangées et 5 colonnes. Les couches de contrôle sont indiquées en rouge. L'actionnement du multiplexeur de rangées et des vannes de colonnes crée un chemin fluide unique (flèche verte) s'écoulant des ports de haute et de basse pression. (C) Géométrie de l'élément de stockage pour l'immobilisation et la coalescence des gouttelettes contrôlées par le flux. (1) Pendant le transport vers un élément de stockage adressé, un mince film d'huile lubrifiant empêche le mouillage des parois des canaux. (2) Les canaux latéraux créent une dérivation pour l'huile (flèches vertes), réduisant la vitesse des gouttelettes. (3i) En dessous de la vitesse d'écoulement critique, la gouttelette entre dans la chambre et se positionne à l'extrémité de la chambre cylindrique. (3ii) Au-dessus de la vitesse d'écoulement critique, la gouttelette ne se positionne pas à l'entrée mais se déplace dans la chambre et s'immobilise au plafond de la chambre. (D) Micrographie d'une gouttelette d'eau stockée de 2,7 nL. (E) Module de triage des cellules. (1) Une suspension monocellulaire est pompée dans le canal de triage. (2) La cellule est encapsulée dans une gouttelette pour être transportée vers l'arrière de la chambre. (F) Module de dosage des réactifs. G Photographie d'une buse d'élution montée sur un bras articulé 3 axes.

² En anglais « single-cell whole genome amplification (WGA) »

Le système est composé par 95 chambres réactionnelles individuelles (Figure 5-2B et C) pouvant accueillir les cellules issues du tri (Figure 5-2E) en entrée de la puce. Dans cette étude, les auteurs présentent différentes applications des réacteurs de microfluidiques comme :

- i) Une amplification par PCR ou qPCR et un séquençage à l'échelle cellulaire (probablement triées et placées individuellement dans un réacteur) de l'ARNr 16S, 6 amplicons d'une culture d'*E. coli* et 5 amplicons d'une culture de *S. typhimurium* ont été sélectionnées aléatoirement sur une trentaine d'amplicons de chaque espèce. Les résultats montrent un séquençage et une identification taxonomique parfaites des 6 amplicons de *E. coli* et des 5 de *S. typhimurium*.
- ii) Un séquençage du génome complet à l'échelle cellulaire (WGA) sur des échantillons provenant de trois environnements différents : sédiment marin profond, d'eau de mer enrichie, et biofilm d'une bouche d'humain. Chaque échantillon de chaque environnement a été trié, amplifié et séquençé. Au total 203 WGA ont été effectués. Les résultats démontrent la singularité de chaque échantillon en termes de taxonomie.

BILAN

Les exemples, cités ci-dessus, montrent les potentialités importantes des puces microfluidiques tant pour les activités métaboliques des microorganismes à la fois dans des conditions de cultures dites en « batch » ou en continu type « chemostat » mais également sur des échantillons provenant d'environnement naturel. Cette technologie permet un i) screening à haut débit de différentes conditions sur différentes souches procaryotiques, en maximisant la reproductibilité et la mise en œuvre des expérimentations (montage en parallèle ou en séries des puces microfluidiques) ; ii) de trier et amplifier des cellules en vue de les séquencer. Cette technologie est bien maîtrisée pour les études des microorganismes à pression atmosphérique (Hegab et al., 2013; Girault et al., 2019; Leygeber et al., 2019), en conditions de haute pression, dans l'état actuel de mes connaissances, cela reste un domaine encore peu exploré. Cela pourrait offrir de nouvelle possibilité pour échantillonner, isoler et cultiver ce qui est actuellement incultivable et par conséquent également un outil pour étudier les différents métabolismes associés au milieu profond, sans jamais changer les conditions

environnementales. L'adaptation de ces outils à un système de prélèvement *in situ* tel que l'HPSU ouvrirait de réels nouveaux champs d'investigation tant dans la mesure d'activité métabolique que dans les approches « omiques » tels que la génomique à l'échelle de la cellule couplée à différents forçages environnementaux : gradient de température, de pression hydrostatique, de concentration en gaz ou encore de nutriments.

5.2.2 LA MICROFLUIDIQUE ET LA HAUTE PRESSION, VERS DES SEQUENCEURS AUTONOMES *IN SITU*

La technologie de puces microfluidiques en condition de haute pression est bien connue dans le domaine de la chimie et particulièrement dans le domaine de la synthèse de matériaux (Marre et al., 2009, 2010), mais encore trop peu ou pas utilisé dans le domaine de la microbiologie en condition de haute pression. Les possibilités de cet outil, que j'ai résumé dans la section 5.2.1, offrirait un avantage important dans la découverte, l'isolement, et la description de nouvelles souches piézophiles, dans l'étude des métabolismes qui jusqu'à maintenant demande un investissement tant sur le plan financier que sur plan humain (nécessitant un personnel qualifié). Par conséquent, très peu de laboratoires dans le monde sont capables, à ce jour, d'isoler et cultiver des microorganismes en condition de haute pression. Les souches piézophiles isolées et répertoriées dans la littérature ont toutes été décrites après décompression (Jebbar et al., 2015; Zhang et al., 2018; Cario et al., 2019). Alors qu'il a été clairement démontré un impact de l'échantillonnage sur la diversité spécifique et fonctionnelle de la communauté microbienne après la décompression d'échantillons naturels (Edgcomb et al., 2016; Garel et al., 2019; Peoples et al., 2019).

Le développement des puces microfluidiques sous pression pour l'océanographie microbienne permettrait : i) de réduire les volumes utilisés et de multiplier le type d'expériences (isolement, mesures d'activités, phénotypage...) à partir d'un même prélèvement, ii) de conserver les conditions environnementales tout au long de l'expérimentation sans casser la chaîne de pression, iii) de maintenir et stocker les souches isolées dans les conditions environnementales au moyen de culture en continu par injections de milieu de culture frais sous pression. Cela ouvrirait de nouveau champs d'investigation concernant la microbiologie du domaine océanique profond avec la découverte de nouvelles espèces piézophiles, mais surtout dans la découverte de nouveaux métabolismes sans changer

les conditions environnementales de la culture jusqu'à l'amplification par PCR. Enfin d'un point de vue hygiène et sécurité, le travail en « petit volume » permettrait d'accroître de manière significative les conditions de sécurité en diminuant notamment le poids des équipements, d'accroître les capacités de tests donc diminuer fortement la manutention.

Parallèlement aux développements de laboratoire, des échantillonneurs/analyseurs autonomes *in situ* pour l'étude de la diversité spécifique et fonctionnelle sont développés. Ils sont immergés sur des mouillages ou bien intégrés aux AUV (« Autonomus Underwater Vehicle ») permettant ainsi de travailler à différentes échelles spatio-temporelles plutôt que travailler en « snapshot » (Scholin et al., 2006; Paul et al., 2007; Scholin, 2010; Preston et al., 2011; Ribeiro et al., 2019; Yamahara et al., 2019; Liu et al., 2020a). Cependant ces différents équipements sont déployés dans des environnements peu profonds. L'intégration de la microfluidique en condition *in situ* de pression permettrait de simplifier les systèmes mécaniques fonctionnant en équipression. Le montage en série de plusieurs puces permettrait d'échantillonner, de trier, de mesurer la croissance cellulaire par qPCR, d'amplifier les génomes à l'échelle cellulaire et de séquencer en y intégrant les nouvelles générations de séquenceurs compactes et peu coûteux en énergie (*i.e* MINION Oxford Nanopore).

dX

dt

=

 μ_{max}

```

shinyUI(
  fluidPage(
    navbarPage("Application of a logistic model on microbial datasets",
      tabPanel("Upload data",
        sidebarLayout(
          sidebarPanel("",
            fileInput('file1', 'Upload your dataset (.csv or .txt)',
              accept=c('text/csv', 'text/comma-separated-values,text/plain', '.csv'),

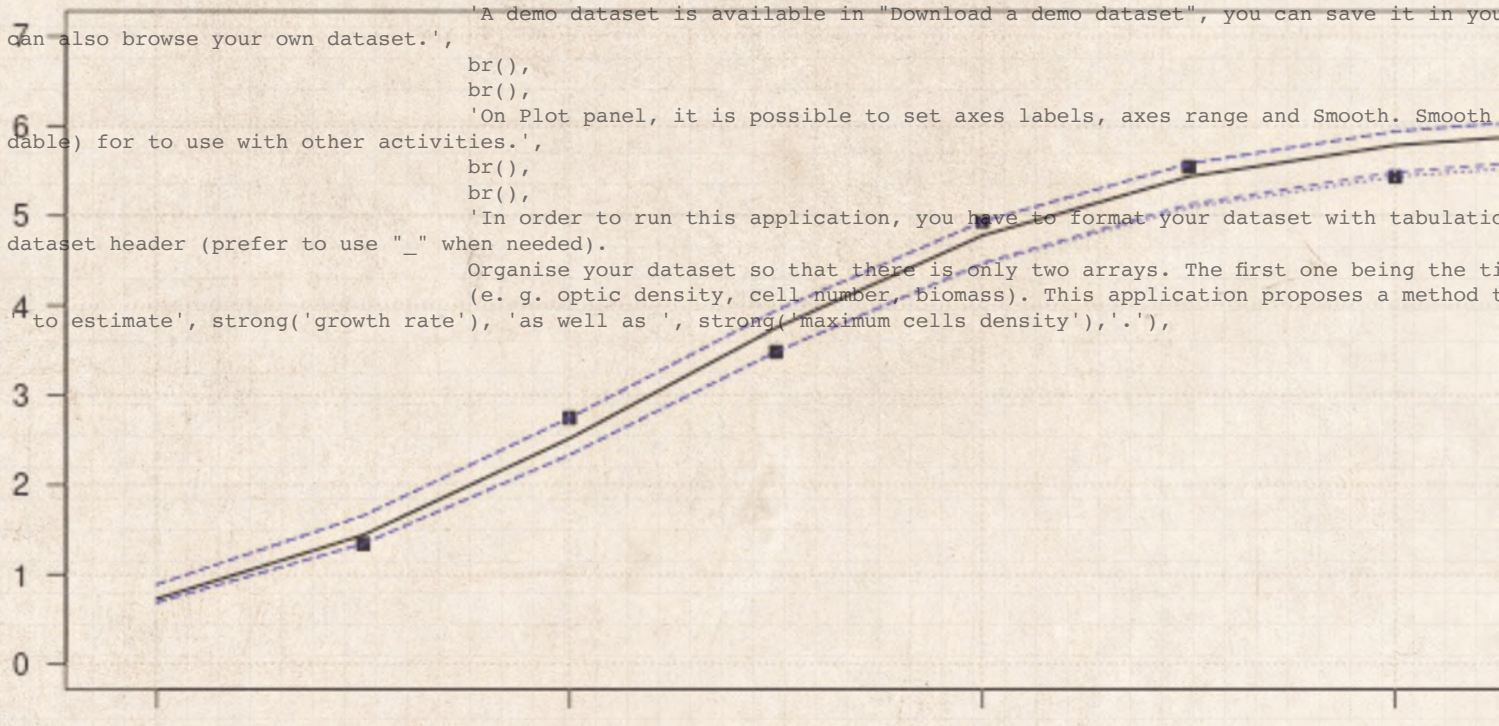
            # download demo file
            downloadButton("downloadDataDemo", label = "Download a demo dataset"),

            # header or not header
            checkboxInput('header', 'Header', TRUE),

            #
            radioButtons('sep', 'Dataset separator',
              c(Comma=',', Semicolon=';', Tab='\t'), selected="\t"),

            #
            radioButtons('dec', 'Decimal separator',
              c(Point='.', Comma=','), selected=".")
          ),
          mainPanel(
            helpText('This app aims at estimating the growth rate and maximum cells density u
            The method is detailed in Martini et al. (2013).',
            br(),
            br(),
            'A demo dataset is available in "Download a demo dataset", you can save it in you
            can also browse your own dataset.',
            br(),
            br(),
            'On Plot panel, it is possible to set axes labels, axes range and Smooth. Smooth
            dable) for to use with other activities.',
            br(),
            br(),
            'In order to run this application, you have to format your dataset with tabulation
            dataset header (prefer to use "_" when needed).
            Organise your dataset so that there is only two arrays. The first one being the ti
            (e. g. optic density, cell number, biomass). This application proposes a method t
            to estimate', strong('growth rate'), 'as well as ', strong('maximum cells density'),'.')
          )
        )
      )
    )
  )

```



6 TRAVAUX COMPLEMENTAIRES.

6.1 PRÉAMBULE

Ce chapitre de thèse est dédié aux développements d'un logiciel sous forme d'une application web, que j'ai réalisé pour analyser des données liées à la microbiologie, principalement pour l'estimation du taux de croissance des microorganismes. La méthode que j'utilise pour l'estimation des paramètres de croissance est une régression non-linéaire de type logistique, cela revient à ajuster les points de mesure à une courbe qui décrit un modèle théorique, ici logistique, pour lequel il est possible de calculer des paramètres de croissance. Le principe de la méthode a été décrit et utilisé pour caractériser une souche piézophile *Photobacterium phosphoreum* ANT 2200 dans [Martini et al. \(2013\)](#). L'outil que je vais détailler dans ce chapitre ne demande aucun talent particulier en programmation, c'est une application du type « ready-to-use ». L'idée de cette application est, en effet, de permettre au plus grand nombre d'utiliser des outils de mathématiques objectifs et de qualité. Il est possible de l'installer en local ou bien de l'utiliser via une connexion à internet.

Ce travail est le fruit de multiples discussions avec mes collègues mais également d'une collaboration avec des étudiants, Marthe Vienne et Lloyd Izard que j'ai eu l'immense plaisir d'encadrer et je tiens à les remercier, pour leur aide, leurs motivations et leur regard neuf sur l'outil.

Dans ce chapitre je décrirai rapidement la méthode mathématique, la démarche qui m'a permis de valider la méthode. Je décrirai également l'application, les différents onglets ainsi que les différentes sorties. L'application est actuellement hébergée gratuitement sur les serveurs de shinyapps.io. Il est possible de retrouver l'application sur l'url suivante : https://hpteam.shinyapps.io/logistic_microbio/.

Citation :

Garel, M., Izard, L., Vienne, M., Nerini, D., Tamburini, C., Martini, S. (2021). R-shiny-microorganisms v2: A ready-to-use logistic regression implemented in R shiny to estimate growth parameters of microorganisms [Data set]. MIO UMR 7294 CNRS. <https://doi.org/10.34930/DC1DAF1C-09E3-4829-8878-91D0BF0E643E>

Lien vers le code sources sur mon GitLab

https://gitlab.osupytheas.fr/garel/logisitic_microbio.git

Lien vers le catalogue de l'OSU Pytheas où sont hébergées les métadonnées ainsi que tous les liens utiles pour l'application.

<https://dataset.osupytheas.fr/geonetwork/srv/fre/catalog.search#/metadata/dc1daf1c-09e3-4829-8878-91d0bf0e643e>

6.2 APPLICATION LOGISTIC_MICROBIO

6.2.1 POURQUOI CE TRAVAIL ?

Les conditions environnementales sont un ensemble de paramètres physiques et biologiques qui définissent un écosystème. Les microorganismes, avec des temps de générations plus élevés que les organismes multicellulaires plus complexes, sont plus sensibles aux changements des conditions environnementales. Par conséquent, les courbes de croissance microbiennes constituent une donnée simple et importante pour comprendre, comment les conditions environnementales affectent les microorganismes. Les courbes de croissance sont utilisées dans un nombre varié de champs d'application en biologie. Jacques Monod, en 1949, décrivait l'étude des courbes de croissance de la manière suivante : « *L'étude de la croissance des cultures bactériennes ne constitue pas un sujet ou une branche spécialisée de la recherche : c'est la méthode de microbiologie. Ce serait une entreprise insensée, et condamnée à l'échec, pour tenter de passer brièvement en revue un « sujet » qui couvre en fait toute notre discipline* ».

La modélisation est utilisée depuis de nombreuses années pour décrire la croissance des microorganismes face à différentes conditions physiques et chimiques (Zwietering et al., 1990). Dans le domaine de la microbiologie alimentaire ces modèles permettent de prédire la durée de conservation des produits, de détecter les parties critiques du processus de production et de distribution, et d'optimiser les chaînes de production et de distribution (Zwietering et al., 1990). Dans le domaine environnemental, ces modèles permettent de déterminer les optimums de croissance de souches nouvellement isolées (Martini et al., 2013), ou bien de décrire la dynamique de croissance de microorganismes en relation avec la dégradation d'un composé par des microorganismes (Eichinger et al., 2009, 2010; Garel et al., 2021).

Selon Zwietering et coll. la courbe de croissance bactérienne présente souvent une phase de latence, d'une durée plus ou moins longue, dans laquelle le taux de croissance spécifique est égal à zéro puis la croissance s'accélère ensuite jusqu'à une valeur maximale, appelée 'taux de croissance maximum' (μ_{max}). Les courbes de croissance contiennent une phase finale dans laquelle le taux de croissance diminue et atteint finalement zéro, de sorte qu'une asymptote est atteinte.

Traditionnellement en microbiologie, le taux de croissance maximum μ_{max} est calculé en ajustant les données de la phase exponentielle de croissance préalablement linéarisée et déterminée de manière suggestive à un modèle linéaire. C'est une méthode très simple à mettre en place, et extrêmement robuste si la phase exponentielle contient un grand nombre de points. Par conséquent, si cette phase exponentielle contient peu de points, l'estimation μ_{max} entraîne beaucoup de variabilité. Ce dernier point, a été vérifié notamment dans le cadre de culture en condition de haute pression, où le nombre de point pour décrire une courbe complète est limitant (6 à 7 points), pour des raisons de disponibilité du matériel ou bien de manutention (une bouteille hyperbare HPB pèse entre 8 et 10 kg).

L'approche mathématique décrite ci-après a été développée et publiée dans [Martini et al. \(2013\)](#) dans le cadre d'expérimentation visant à trouver l'optimal de croissance d'une souche de *Photobacterium phosphoreum* en fonction de la pression hydrostatique et de la température.

Dans la sous-section suivante, je vais rappeler la méthodologie mathématique utilisée dans [Martini et al., \(2013\)](#) mais surtout décrire un outil, sous forme d'application web, permettant d'estimer simplement (sans avoir à connaître un langage de programmation) des paramètres d'une courbe de croissance comme le taux de croissance, la densité maximum, et le début de la phase exponentielle de croissance.

6.2.2 LA METHODE DESCRIPTION DU MODELE

La croissance d'un organisme est définie comme la variation du nombre d'individu $\{X(t_i), i=1,...,n\}$ en fonction du temps tel que $\frac{dX}{dt} = X(t)$. La courbe de croissance des procaryotes est non-linéaire et décrit trois phases : une phase de latence correspondant au début de la croissance avec un taux de croissance spécifique (μ) quasi-nul puis accélérant jusqu'à atteindre une valeur maximum (μ_{max}) au bout d'une certaine période. Par la suite, les procaryotes vont croître de manière exponentielle jusqu'à atteindre une asymptote, qui sera marquée par une diminution du taux de croissance jusqu'à $\mu=0$. Cette phase est appelée phase stationnaire, qui est souvent due, dans le cas de culture en « batch », à une limitation d'un substrat ou d'un sel nutritif ou de tout élément limitant où la densité de population reste constante (K). La courbe de croissance décrit ainsi une sigmoïde ([Zwietering et al., 1990](#)).

L'idée principale de cette méthode vise à ajuster la totalité des données observées de croissance à un modèle non-linéaire de type logistique de [Verhulst \(1938\)](#). Cela permet non seulement d'estimer un taux de croissance maximum μ_{max} , mais également la densité maximum de croissance et le début de la phase exponentielle. Ce type d'approche, permet également de pouvoir transformer des données discrètes en une fonction continue.

Le modèle est défini de la manière suivante :

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{max} * X \left(1 - \frac{X}{K} \right)$$

Où X=nombre d'individus, μ_{max} est le taux de croissance maximum et K la densité maximum de population.

La solution analytique de cette équation est :

$$\begin{cases} X(0) = X_0 \\ X(t) = \frac{KX_0}{X_0 + (K - X_0) \exp(-\mu_{max}t)} \end{cases}$$

Les estimations des paramètres sont déterminées comme étant les paramètres fournissant le meilleur ajustement de la fonction moyenne $\widehat{X(t_i)}$ aux observations $\{X(t_i), i=1,...,n\}$ obtenues par minimisation de la somme quadratique des résidus (en anglais « residual sums of squares », RSS) par la méthode itérative de Gauss-Newton.

Cela revient à :

$$RSS = \sum_{i=1}^n (X(t_i) - \widehat{X(t_i)})^2$$

Où $X(t_i)$ sont les observations et $\widehat{X(t_i)}$ sont les valeurs estimées.

TEST DE LA METHODE

Afin de tester le modèle décrit dans la section précédente, j'ai créé un jeu de courbes de croissance théorique grâce au logiciel de statistique GNU R ([R Core Team, 2013](#)). Pour se faire, les courbes théoriques ont été construites avec un modèle logistique dont les paramètres

sont : temps d'expérimentation = 10 heures, $\mu_{\max} = 1 \text{ h}^{-1}$, K la densité de population maximum = 6. De plus, j'ai ajouté un bruit gaussien afin de simuler une variabilité entre chaque point de mesure, ce qui est très commun dans le suivi d'une expérimentation. Pour tester les deux approches j'ai donc simulé 6 expérimentations avec un nombre décroissant de points : 100, 75, 50, 25, 10 et 6 points Figure 6-1A à F. Pour chaque courbe j'ai estimé les paramètres de croissances, à la fois avec un modèle logistique et avec un modèle linéaire en linéarisant les données au préalable. Pour la méthode de régression linéaire, la phase exponentielle a été estimée de manière subjective. La sensibilité de chaque méthode d'estimation a été testée avec un bootstrap (ré-échantillonnage aléatoire avec remise) de 1000 simulations.

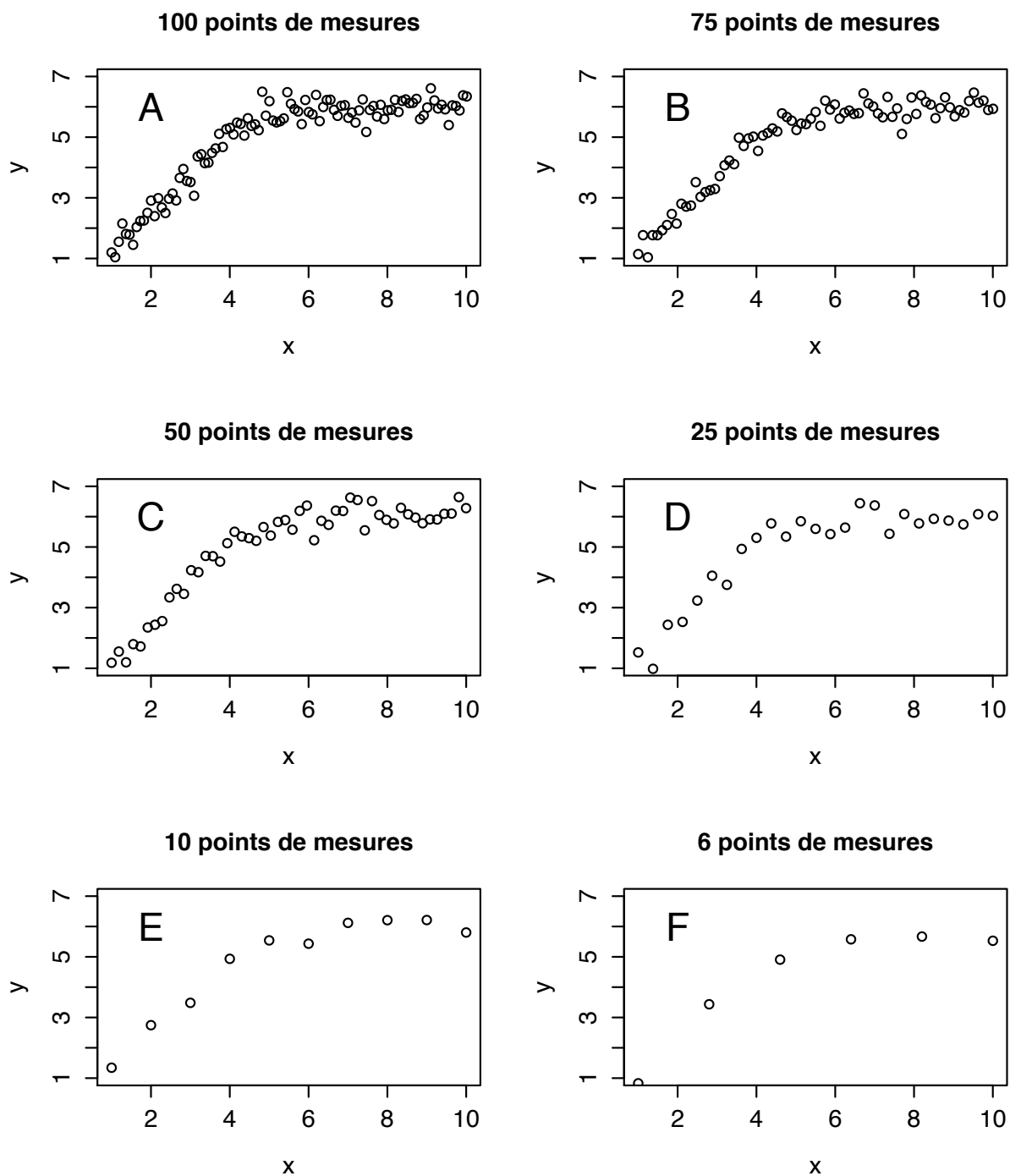


Figure 6-1 Jeux de données utilisés pour comparer l'estimation du taux de croissance par régression linéaire utilisée dans l'application *logistic_microbio* et par régression linéaire après transformation de y en $\log$, utilisée classiquement en microbiologie.

CONSTRUCTION DE L'APPLICATION

L'application a entièrement été conçue avec GNU R (R Core Team, 2013). Les packages utilisés sont : 'stat' pour la régression non-linéaire, 'quantreg' pour la régression des quantiles et l'estimation de l'intervalle de confiance à 95 %, et 'shiny' pour la construction de l'application web. Actuellement l'application est hébergée sur le serveur <https://www.shinyapps.io/>, elle est disponible depuis n'importe quel ordinateur (indépendant de l'OS de l'ordinateur) munit d'un accès à internet et d'un navigateur web.

DESCRIPTION DE L'APPLICATION

L'application « logistic_microbio » comprend plusieurs onglets permettant : i) d'importer les données en proposant différents types de séparateurs de vecteurs, un choix pour les types de marqueurs de décimales (Figure 6-2) ; ii) de vérifier l'importation des données (Figure 6-3); iii) de voir le modèle appliqué sur les données mais également les paramètres estimés (qui peuvent également être téléchargés dans un fichier texte), iv) d'apprécier la qualité du modèle au moyen d'une représentation graphique de la fonction de coût RSS en 2 dimensions ou 3 dimensions (les graphiques sont téléchargeables pour être intégrés dans un outil de traitement de texte).

- Pour importer les données dans l'application, il suffit d'inscrire les données dans un fichier texte (.txt) en séparant les différents vecteurs (*e.g* le temps, la densité cellulaire) de préférence par des tabulations. Le type décimal peut être paramétré également sur le premier onglet (Figure 6-2). Un jeu de données de démonstration est téléchargeable pour tester l'application et apprécier le format de la matrice de données
- La deuxième étape est de vérifier l'importation en cliquant sur l'onglet « Uploaded data ». Les données sont représentées sous forme d'un tableau Figure 6-3.

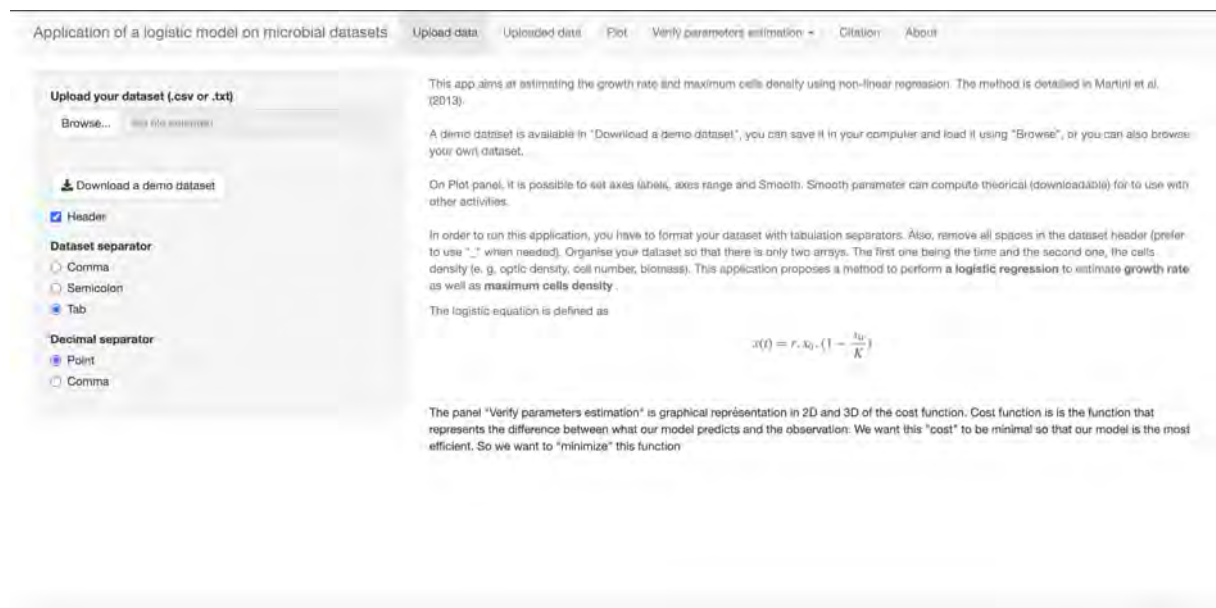


Figure 6-2 Accueil de l'application. Sur cet onglet, l'utilisateur télécharge son jeu de données, en indiquant s'il y a une légende, le type de séparateur (virgule, point-virgule, tabulation), le type de décimal (virgule ou point), donne le titre de chaque axe.

Application of a logistic model on microbial datasets

Upload data | **Uploaded data** | Plot | Verify parameters estimation | Citation | About

Show 10 entries

Search:

	Time	TE_0.1_A	TE_0.1_B	TE_0.1_C
1	0	0.156	0.156	0.156
2	6	0.173	0.183	0.175
3	12	0.3	0.296	0.295
4	16	0.395	0.373	0.388
5	20		0.43	0.429
6	36	0.512		0.485
7	63	0.51	0.535	0.507

Showing 1 to 7 of 7 entries

Previous 1 Next

Figure 6-3 Onglet « Uploaded data » : représentation des données sous forme de tableau. Ici les données sont des valeurs de densités optiques (DO à 600nm) en triplicata (TE_0.1_A à C) en fonction du temps.

- L'onglet « Plot » permet de visualiser les données sous forme d'un graphique en nuage de point Figure 6-4. Sur cet onglet, il est possible de donner un label pour chaque axe, d'ajuster la limite de chaque axe et d'ajuster le « smooth » de la courbe théorique. Cela revient à changer le nombre de données théorique généré par le modèle. Par défaut, le modèle génère autant de données théoriques qu'observées. Ce paramètre influe sur la forme de la courbe, plus le paramètre « smooth » tend vers 0 plus la courbe aura un aspect arrondi. Ce paramètre n'exerce aucune influence l'estimation des paramètres de croissance. Tous les résultats sont téléchargeables au format *.txt.

Chapitre 6

Travaux complémentaires

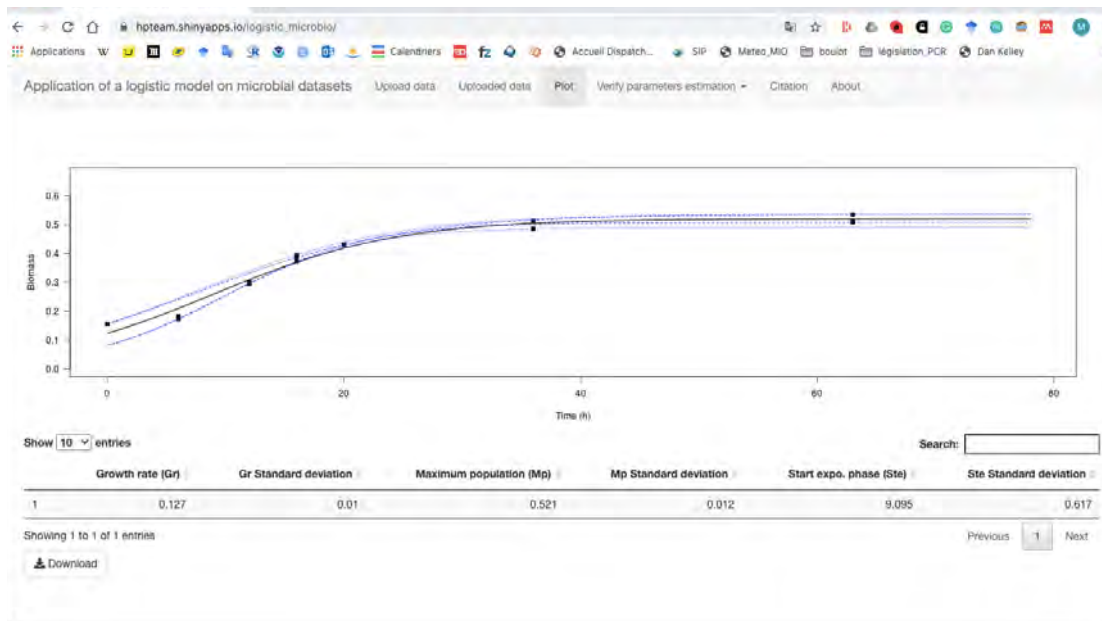


Figure 6-4 Onglet « Plot » : représentation graphique des données sous forme d'un nuage de point. La courbe noire représente le modèle, les courbes en pointillés bleus représentent l'enveloppe 1^{er} et 3^{ème} quartile, et les courbes en points bleus représentent l'enveloppe de l'intervalle de confiance à 95 %.

- L'onglet « Verify parameters estimation » (Figure 6-5) affiche deux représentations graphiques en 2D et 3D de la fonction de coût en fonction du taux de croissance maximum et de la densité de population maximum. La fonction de coût est la fonction qui représente la différence entre ce que le modèle prédit et l'observation. Nous voulons que ce "coût" soit minimal afin que le modèle soit le plus efficace possible.

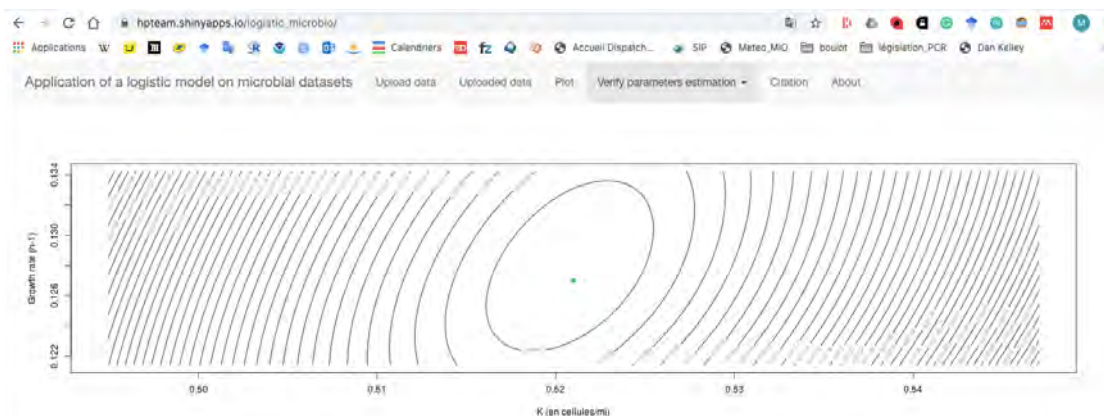


Figure 6-5 Représentation en contour-plot 2D de la minimisation de la somme résiduelle des carrés. Le point vert représente les coordonnées des paramètres estimés ($\mu_{\max}$ et K)

6.2.3 LES RESULTATS

COMPARAISON DES APPROCHES LINEAIRES ET NON-LINEAIRES POUR ESTIMER LES PARAMETRES DE CROISSANCES

Pour comparer les deux méthodes d'estimation des paramètres de croissance, j'ai choisi de me focaliser sur le paramètre du taux de croissance, très utilisé en microbiologie dans la caractérisation de nouvelles souches, par exemple.

La Figure 6-6 représente la distribution des taux de croissance μ_{max} en fonction du nombre de points dans une courbe de croissance pour les deux approches mathématiques : i) estimation des paramètres de croissance à l'aide d'une régression non-linéaire avec un modèle logistique ; ii) estimation du taux de croissance par régression linéaire appliquée sur la phase exponentielle de croissance après linéarisation. De plus, la Figure 6-6 résume la distribution des taux de croissance avec quelques statistiques descriptives.

Tableau 6-1 Résumé statistique des taux de croissance par méthode de régression non-linéaire et régression linéaire obtenue après 1000 simulations en bootstrap. Dans ce tableau se trouve le taux de croissance minimum, le 1^{er} quartile, la médiane, la moyenne, et le 3^{ème} quartile et le maximum. Le paramètre n est le nombre de points utilisés pour chaque méthode pour l'estimation du taux de croissance et le nombre des simulations n'ayant abouti à aucune estimation (Nombre NA).

Méthodes	Nombre de points	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max	n	Nombre de NA
Régression non-linéaire	100	0.88	0.99	1.02	1.02	1.06	1.18	100	0
	75	0.81	0.92	0.96	0.96	1.00	1.18	75	0
	50	0.86	1.01	1.06	1.06	1.10	1.29	50	0
	25	0.65	0.88	0.95	0.96	1.03	1.37	25	0
	10	0.75	0.90	0.95	0.96	1.02	1.31	10	0
	6	0.65	0.81	0.86	0.87	0.92	1.12	6	0
Régression linéaire	100	0.34	0.40	0.43	0.43	0.45	0.54	38	0
	75	0.28	0.40	0.47	0.47	0.51	0.84	28	0
	50	0.35	0.45	0.48	0.48	0.50	0.64	19	0
	25	0.24	0.40	0.46	0.46	0.51	0.90	10	0
	10	0.24	0.24	0.48	0.47	0.48	0.72	4	118
	6	0.16	0.16	0.32	0.32	0.32	0.49	3	123

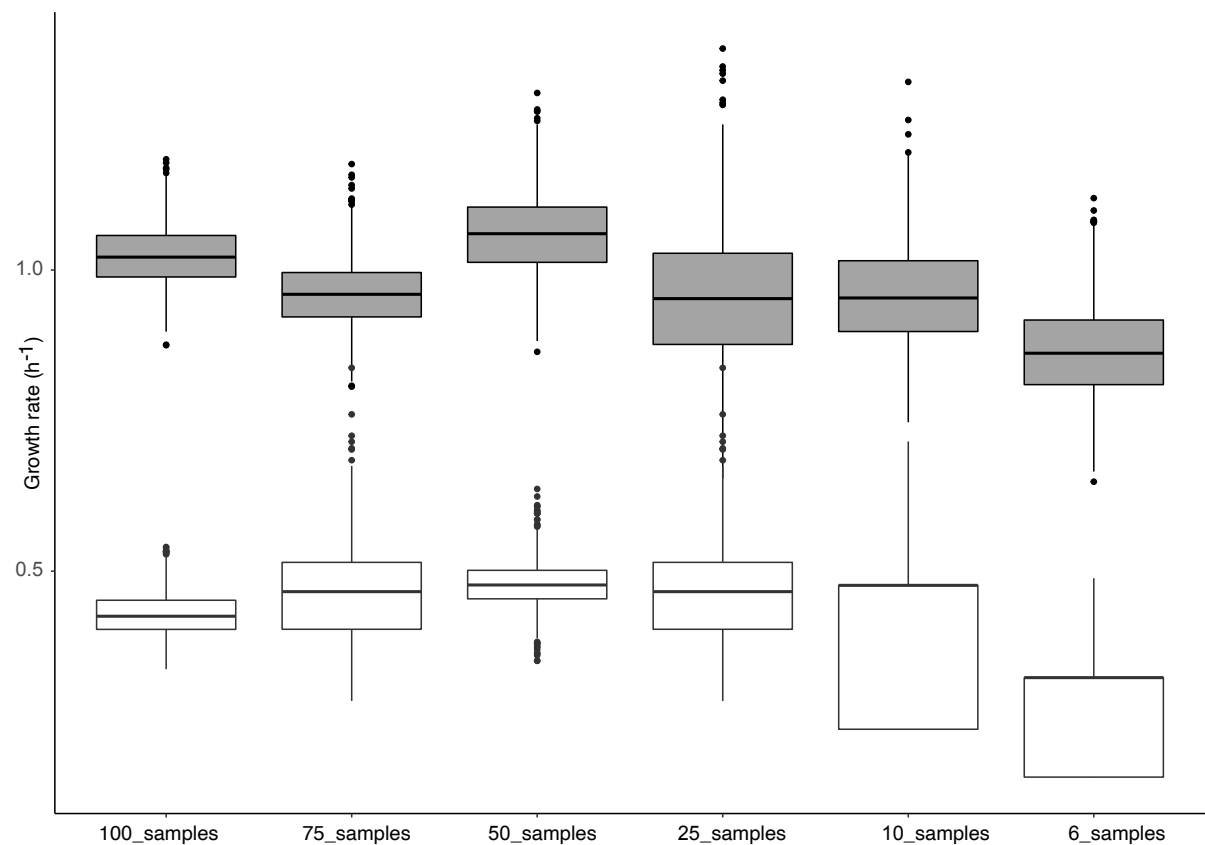


Figure 6-6 Distribution de l'estimation de $\mu_{\max}$ pour les 1000 simulations pour chaque courbe. La barre noire représente la valeur médiane. Les box plots gris représentent la distribution des $\mu_{\max}$ estimés par régression non-linéaire et les box plots blancs représentent $\mu_{\max}$ estimés par régression linéaire dans la phase exponentielle après linéarisation des données.

D'après le Tableau 6-1, les taux de croissance estimés à l'aide du modèle logistique sont compris entre 0.65 et 1.37 h⁻¹ alors que pour les taux de croissance estimés par régression linéaire sont compris entre 0.16 et 0.90 h⁻¹. Le paramètre du taux de croissance que j'ai rentré dans le modèle logistique pour construire les courbes étaient de 1h⁻¹. Ainsi, lorsque j'ai estimé les taux de croissance avec les deux méthodes, les résultats provenant de la régression non-linéaire bornent 1 h⁻¹ (taux de croissance choisi pour les simulations) alors que les taux de croissances calculés classiquement par régression linéaire à partir de la phase exponentielle sont inférieurs à 1 h⁻¹. Par ailleurs, la distribution des taux de croissance obtenue par bootstrap sur la Figure 6-6 montre que les taux de croissances estimés par ces deux méthodes sont significativement différents.

Outre cette différence significative, d'après le

Méthodes	Nombre de points	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max	n	Nombre de NA
	100	0.88	0.99	1.02	1.02	1.06	1.18	100	0

Chapitre 6

Travaux complémentaires

Regression non-linéaire	75	0.81	0.92	0.96	0.96	1.00	1.18	75	0
	50	0.86	1.01	1.06	1.06	1.10	1.29	50	0
	25	0.65	0.88	0.95	0.96	1.03	1.37	25	0
	10	0.75	0.90	0.95	0.96	1.02	1.31	10	0
	6	0.65	0.81	0.86	0.87	0.92	1.12	6	0
Régression linéaire	100	0.34	0.40	0.43	0.43	0.45	0.54	38	0
	75	0.28	0.40	0.47	0.47	0.51	0.84	28	0
	50	0.35	0.45	0.48	0.48	0.50	0.64	19	0
	25	0.24	0.40	0.46	0.46	0.51	0.90	10	0
	10	0.24	0.24	0.48	0.47	0.48	0.72	4	118
	6	0.16	0.16	0.32	0.32	0.32	0.49	3	123

, il est à noter que pour la méthode par régression linéaire, pour les courbes avec 6 et 10 points, plus de 100 simulations par courbe n'ont pu aboutir à une estimation du taux de croissance, en raison du très petit nombre de points dans la phase exponentielle.

Enfin la Figure 6-6 et le

Méthodes	Nombre de points	Min.	1st Qu.	Median	Mean	3rd Qu.	Max	n	Nombre de NA
Regression non-linéaire	100	0.88	0.99	1.02	1.02	1.06	1.18	100	0
	75	0.81	0.92	0.96	0.96	1.00	1.18	75	0
	50	0.86	1.01	1.06	1.06	1.10	1.29	50	0
	25	0.65	0.88	0.95	0.96	1.03	1.37	25	0
	10	0.75	0.90	0.95	0.96	1.02	1.31	10	0
Régression linéaire	6	0.65	0.81	0.86	0.87	0.92	1.12	6	0
	100	0.34	0.40	0.43	0.43	0.45	0.54	38	0
	75	0.28	0.40	0.47	0.47	0.51	0.84	28	0
	50	0.35	0.45	0.48	0.48	0.50	0.64	19	0
	25	0.24	0.40	0.46	0.46	0.51	0.90	10	0
	10	0.24	0.24	0.48	0.47	0.48	0.72	4	118
	6	0.16	0.16	0.32	0.32	0.32	0.49	3	123

montrent une augmentation de la variabilité des taux de croissance estimée par méthodes linéaires pour les courbes contenant 25, 10 et 6 points de mesures. Cette augmentation de variabilité est moins nette avec l'utilisation d'un modèle logistique.

UTILISATION DE L'APPLICATION WEB SUR DES DONNEES ISSUES DE LA LITTERATURE

Pour continuer la validation d'application web et l'approche par régression non-linéaire en ajustant les données de croissance à un modèle logistique, j'ai comparé cette approche avec 17 souches de bactérie, issues d'environnements très différents, provenant de la littérature et

résumé dans le Tableau 6-2. Ce travail a fait l'objet d'un stage effectué par Marthe Vienne que j'ai encadré lors de son stage L3. Ces 17 courbes de croissance ont été récoltées dans la littérature au moyen de GNU R et du package 'digitizer' (Tableau 6-2).

Les 17 souches proviennent de culture mono-spécifique d'organismes issus de différents environnements : milieu marin, milieu marin profond, agro-alimentaire, mucus gastro-intestinal, sources hydrothermales. Les taux de croissance ont été calculés par régression non-linéaire en ajustant les données de croissance à un modèle logistique et par régression linéaire des points de la phase exponentielle linéarisée (différentes phases exponentielles ont été choisies de manière graphique). Ces taux de croissances ont été ensuite comparés aux taux de croissances calculés par les différents auteurs quand cela a été possible. Dans la majorité des articles, la méthode de détermination du taux de croissance n'a pas été décrite, donc j'ai supposé que cela avait été calculé de manière classique, soit par régression linéaire des points de la phase exponentielle après linéarisation.

Le Tableau 6-2 montre que les taux de croissances estimés par méthode non-linéaire sont en moyenne 1.6 fois supérieurs à ceux estimés par régression linéaire et encore différent de ceux estimés par les auteurs des différentes études. Pour 15 courbes sur 17 les taux de croissance estimés grâce au modèle logistique sont supérieurs à ceux calculés par la méthode classique et aux valeurs données de la littérature.

Chapitre 6

Travaux complémentaires

Tableau 6-2 Estimation des paramètres de croissance de 17 souches microbiennes par régression non linéaire et régression linéaire. $\mu_{\max}$ est le taux maximal de croissance, sd est l'écart-type de chaque paramètre estimé, et K est la densité maximum de population.

Tableau récapitulatif de chaque paramètre estimé, et K estimé densité maximum de population													
Souche	Milieu	Nbr point par courbe	Pression (en bar)	Paramètres via modèle non linéaire				Paramètres via modèle linéaire			Littérature	Références	
				K	sd	μ _{max}	sd	K	μ _{max}	sd			
Isolate PE31	Marin profond	10	1	2,92x10 ⁷	9,08x10 ⁵	0.082	0,006	2,92x10 ⁷	0.075	0,011	0.099	(Yayanos et al., 1982)	
Isolate PE31	Marin profond	7	139	5,51x10 ⁷	1,72x10 ⁶	0.117	0,015	5,90x10 ⁷	0.082	0,016	0.136	(Yayanos et al., 1982)	
Isolate PE31	Marin profond	10	553	1,30x10 ⁷	3,31x10 ⁵	0.097	0,008	1,29x10 ⁷	0.051	0,002	0.054	(Yayanos et al., 1982)	
Rhodobacterales bacterium PRT1	Marin profond	17	800	1,07x10 ⁶	1,82x10 ⁴	0.03	0,002	1,12x10 ⁶	0.021	0,001	0.019	(Eloe et al., 2011a)	
E. coli	Terrestre	8	1,013	2,45x10 ⁹	2,40x10 ⁷	2.131	0,118	2,48x10 ⁹	1.134	0,123	NA	(Pal et al., 2007)	
V. alginolyticus NCMB 1803	Marin surface	10	1,013	5,90x10 ¹⁰	6,58x10 ⁹	1.794	0,128	3,80x10 ¹⁰	3.273	0,016	3.485	(Ulitzur, 1974)	
Shewanella putrefaciens MR-1	Sédiments anoxiques	8	1,013	6,76x10 ²	3,74x10 ¹	0.161	0,022	6,78x10 ²	0.427	0,059	NA	(Moser and Nealson, 1996)	
Colwellia.sp MT41	Marin profond	11	690	2,70x10 ⁷	1,02x10 ⁶	0.046	0,006	2,76x10 ⁷	0.028	0,001	0.028	(Yayanos et al., 1981)	
Colwellia.sp MT41	Marin profond	9	863	3,63x10 ⁷	1,67x10 ⁶	0.031	0,001	2,79x10 ⁷	0.021	0,001	0.027	(Yayanos et al., 1981)	
Colwellia.sp MT41	Marin profond	12	1035	2,67x10 ⁷	1,94x10 ⁶	0.028	0,003	2,59x10 ⁷	0.027	0,002	0.020	(Yayanos et al., 1981)	
Staphylococcus aureus	Produits laitiers	13	1,013	2,82x10 ³	7,15x10 ¹	0.279	0,031	2,89x10 ³	0.11	0,006	NA	(Fujikawa and Morozumi, 2006)	
Vibrio cholerae	Eau douce	13	1,013	2,59x10 ⁵	3,80x10 ³	0.512	0,028	2,56x10 ⁵	0.357	0,025	0.5	(Vital et al., 2007)	
Vibrio anguillarum	Mucus gastrointestinal des saumons	11	1,013	7,09x10 ⁸	8,83x10 ⁶	1.102	0,242	7,24x10 ⁸	0.832	0,013	NA	(Garcia et al., 1997)	
Strain 106	Source hydrothermale	6	160	6,38x10 ⁸	1,02x10 ⁷	0.195	0,010	6,19x10 ⁸	0.1	0,012	NA	(Takai et al., 2009)	
Strain 108	Source hydrothermale	6	360	2,01x10 ⁹	1,61x10 ⁷	0.216	0,005	1,98x10 ⁹	0.144	0,015	NA	(Takai et al., 2009)	
Pyrococcus abyssi sp. nov.	Source hydrothermale	7	200	8,32x10 ⁷	6,79x10 ⁶	1.266	0,038	7,85x10 ⁷	0.888	0,066	0.87	(Erauso et al., 1993)	
Phosphobacterium 9320-SD	Substrat cultivé	8	1,013	9,74x10 ⁹	4,08x10 ⁸	0.051	0,007	9,43x10 ⁹	0.014	0,002	NA	(Chen et al., 2008)	

Dans le cas de la souche de *V. alginolyticus* NCMB 1803, le taux de croissance calculé par la méthode classique est supérieur à celui calculé par le modèle logistique. Une des hypothèses pourrait être la répartition des points dans la courbe de croissance est insuffisante. En effet, en examinant la courbe, il s'avère que les auteurs ont arrêté la croissance avant la phase stationnaire. Or d'après modèle logistique, la phase stationnaire est paramètre de l'équation car cela permet de calculer la densité maximum de population (paramètre K). L'absence de phase stationnaire entraînerait la sous-estimation du taux croissance avec la méthode non-linéaire par rapport à l'estimation par la méthode classique (linéaire).

Concernant *Shewanella putrefaciens* MR-1, il y a également une surestimation du taux de croissance avec le modèle logistique. La courbe de croissance possède seulement 8 points et il manque une partie de la phase stationnaire (Figure 6-7). Ce qui pourrait expliquer la sous-estimation du taux de croissance avec le modèle logistique. Si nous nous reportons à la Figure 6-6, l'estimation de taux de croissance par méthode classique entraîne une grande incertitude pour des courbes comportant moins de 25 points.

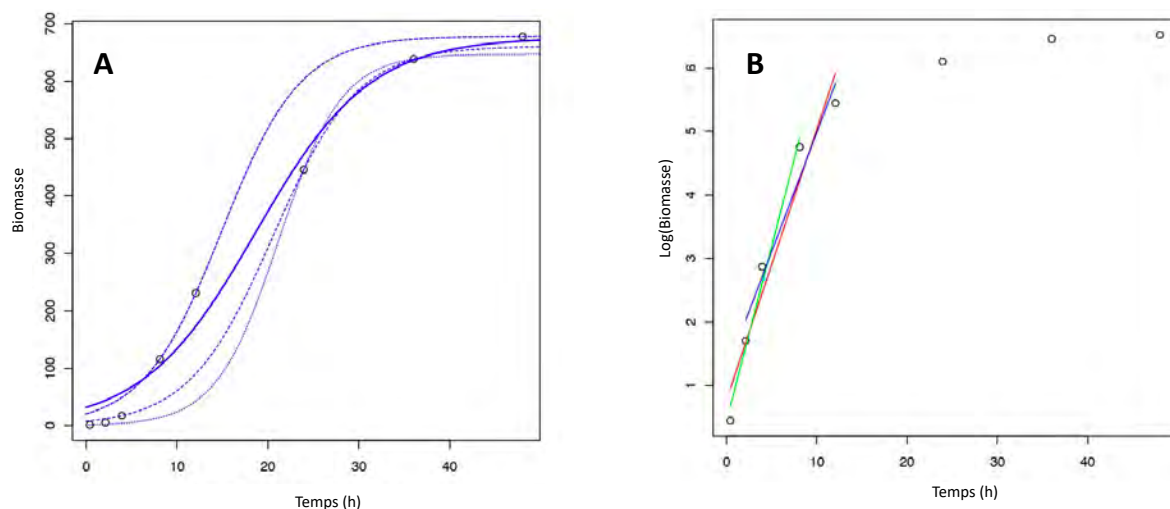


Figure 6-7 Courbes de croissance *Shewanella putrefaciens* MR-1 issue de Duane and Moser (1996). A) Les données de biomasse sont représentées au cours du temps. La courbe noire représente la courbe théorique. Les courbes en tiret sont les 1^{er} et 3^{ème} quartile et les courbes en pointillés sont les intervalles de confiance à 95%. B) Les données de biomasse sont transformées en log et représentées au cours du temps. Le droite rouge, verte et bleue sont des droites possibles pour calculer le taux de croissances.

L'utilisation de méthode classique induit un choix subjectif des points se situant sur la phase exponentielle influençant ainsi l'estimation du taux de croissance. Dans l'exemple de la Figure 6-7B, la droite rouge donne un taux de croissance de 0.43 ± 0.06 , la droite verte donne un taux de croissance 0.55 ± 0.05 et la droite bleue donne un taux de croissance 0.38 ± 0.06 . Quel

est le bon ? Avec la méthode logistique, il n'y a pas de suggestivité liée éventuellement au manipulateur.

6.2.4 CONCLUSION

La méthode d'estimation par régression non-linéaire utilise la totalité des observations pour les ajuster à la courbe théorique, mais à condition que les différentes phases de croissance soient bien mesurées, alors qu'avec la méthode linéaire seule une partie de observations sont utilisées. Les résultats sur les données issues de la littérature semblent confirmer les résultats obtenus à ceux obtenus à partir de données théoriques : i) le choix subjectif des points de la phase exponentielle entraîne des différences entre les paramètres de la littérature et les paramètres estimés par régression linéaire, et une différence entre paramètres estimés par méthode non-linéaire et méthode linéaire ; ii) la méthode non-linéaire permet d'obtenir une estimation plus robuste des paramètres de croissance à condition d'avoir un jeu complet permettant de définir correctement la phase stationnaire de croissance.

7 BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, W. R., and Rohde, M. (2014). "The family Hyphomonadaceae," in *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 283–299. doi:10.1007/978-3-642-30197-1_260.
- Acinas, S. G., Sánchez, P., Salazar, G., Cornejo-Castillo, F. M., Sebastián, M., Logares, R., et al. (2021). Deep ocean metagenomes provide insight into the metabolic architecture of bathypelagic microbial communities. *Commun. Biol.* 4, 604. doi:10.1038/s42003-021-02112-2.
- Adloff, F., Somot, S., Sevault, F., Jordà, G., Aznar, R., Déqué, M., et al. (2015). Mediterranean Sea response to climate change in an ensemble of twenty first century scenarios. *Clim. Dyn.* 45, 2775–2802. doi:10.1007/s00382-015-2507-3.
- Agogué, H., Lamy, D., Neal, P. R., Sogin, M. L., and Herndl, G. J. (2011). Water mass-specificity of bacterial communities in the North Atlantic revealed by massively parallel sequencing. *Mol. Ecol.* 20, 258–274. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04932.x.
- Aluwihare, L. I., Repeta, D. J., and Chen, R. F. (1997). A major biopolymeric component to dissolved organic carbon in surface sea water. *Nature* 387, 166–169. doi:10.1038/387166a0.
- Apple, J. K., Del Giorgio, P. A., and Kemp, W. M. (2006). Temperature regulation of bacterial production, respiration, and growth efficiency in a temperate salt-marsh estuary. *Aquat. Microb. Ecol.* 43, 243–254. doi:10.3354/ame043243.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., and Weber, L. (2015a). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 75, 129–137. doi:10.3354/ame01753.
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., and Weber, L. (2015b). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 75, 129–137. doi:10.3354/ame01753.
- Aristegui, J. (2003). Respiration in the dark ocean. *Geophys. Res. Lett.* 30, 1–4. doi:10.1029/2002GL016227.

Bibliographie

- Arístegui, J., Duarte, C. M., Gasol, J. M., and Alonso-Saez, L. (2005). Active mesopelagic prokaryotes support high respiration in the subtropical northeast Atlantic Ocean. *Geophys. Res. Lett.* 32, L03608. doi:10.1029/2004GL021863.
- Arístegui, J., Gasol, J. M. M., Duarte, C. M. M., and Herndl, G. J. (2009). Microbial oceanography of the dark ocean's pelagic realm. *Limnol. Ocean.* 54, 1501–1529. Available at: <http://www.rug.nl/fwn/onderzoek/instituten/esrig/oe/publications/artikelen/arislimnolocea542009.pdf> [Accessed November 25, 2010].
- Armstrong, R. A., Lee, C., Hedges, J. I., Honjo, S., and Wakeham, S. G. (2002). A new, mechanistic model for organic carbon fluxes in the ocean based on the quantitative association of POC with ballast minerals. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 49, 219–236. doi:10.1016/S0967-0645(01)00101-1.
- Armstrong, R. A., Peterson, M. L., Lee, C., and Wakeham, S. G. (2009). Settling velocity spectra and the ballast ratio hypothesis. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56, 1470–1478. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.dsr2.2008.11.032>.
- Arrieta, J. M., Mayol, E., Hansman, R. L., Herndl, G. J., Dittmar, T., and Duarte, C. M. (2015). Dilution limits dissolved organic carbon utilization in the deep ocean. *Science* (80-.). 328, 331–333. doi:10.1126/science.1258955.
- Avril, B. (2002). DOC dynamics in the northwestern Mediterranean Sea (DYFAMED site). *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 49, 2163–2182. doi:10.1016/S0967-0645(02)00033-4.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J., Gray, J., Meyer-Reil, L., and Thingstad, F. (1983). The Ecological Role of Water-Column Microbes in the Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* doi:10.3354/meps010257.
- Bar-On, Y. M., Phillips, R., and Milo, R. (2018). The biomass distribution on Earth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 6506–6511. doi:10.1073/pnas.1711842115.
- Bartlett, D. H. (1999). Microbial adaptations to the psychrosphere/piezosphere. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 1, 93–100.
- Bartlett, D. H. (2002). Pressure effects on in vivo microbial processes. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1595, 367–381. doi:10.1016/S0167-4838(01)00357-0.

Bibliographie

- Bartlett, D. H., Lauro, F. M., and Eloe, E. A. (2007). "Microbial adaptation to high pressure," in *Physiology and Biochemistry of Extremophiles* (American Society of Microbiology), 333–348. doi:10.1128/9781555815813.ch25.
- Baumas, C. M. J., Le Moigne, F. A. C., Garel, M., Bhairy, N., Guasco, S., Riou, V., et al. (2021). Mesopelagic microbial carbon production correlates with diversity across different marine particle fractions. *ISME J.* doi:10.1038/s41396-020-00880-z.
- Benner, R., and Herndl, G. J. (2011). "Bacterially Derived Dissolved Organic Matter in the Microbial Carbon Pump," in *Microbial Carbon Pump in the Ocean*, 46–48. Available at: https://www.researchgate.net/publication/281265337_Bacterially_derived_dissolved_organic_matter_in_the_microbial_carbon_pump [Accessed December 6, 2020].
- Benner, R., Pakulski, J. D., McCarthy, M., Hedges, J. I., and Hatcher, P. G. (1992). Bulk chemical characteristics of dissolved organic matter in the ocean. *Science* (80-.). 255, 1561–1564. doi:10.1126/science.255.5051.1561.
- Bergauer, K., Fernandez-Guerra, A., Garcia, J. A. L., Sprenger, R. R., Stepanauskas, R., Pachiadaki, M. G., et al. (2018). Organic matter processing by microbial communities throughout the Atlantic water column as revealed by metaproteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, E400–E408. doi:10.1073/pnas.1708779115.
- Bianchi, A., and Garcin, J. (1993). In stratified waters the metabolic rate of deep-sea bacteria decreases with decompression. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 40, 1703–1710. doi:10.1016/0967-0637(93)90024-W.
- Bianchi, A., and Garcin, J. (1994). Bacterial response to hydrostatic pressure in seawater samples collected in mixed-water and stratified-water conditions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 111, 137–141. doi:10.3354/meps111137.
- Bianchi, A., Garcin, J., and Tholosan, O. (1999). A High-pressure serial sampler to measure microbial activity in the deep sea. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 46, 2129–2142.
- Bidle, K. D., and Azam, F. (1999). Accelerated dissolution of diatom silica by marine bacterial assemblages. *Nature* 397, 508–512. doi:10.1038/17351.

Bibliographie

- Bidle, K. D., and Azam, F. (2001). Bacterial control of silicon regeneration from diatom detritus: Significance of bacterial ectohydrolases and species identity. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1606–1623. doi:<https://doi.org/10.4319/lo.2001.46.7.1606>.
- Bidle, K. D., Brzezinski, M. A., Long, R. A., Jones, J. L., and Azam, F. (2003). Diminished efficiency in the oceanic silica pump caused by bacterially-mediated silica dissolution. *Limnol. Oceanogr.* 48, 1855–1868.
- Bidle, K. D., Manganelli, M., and Azam, F. (2002a). Regulation of oceanic silicon and carbon preservation by temperature control on bacteria. *Science (80-.)*. 298, 1980–1984. doi:[10.1126/science.1076076](https://doi.org/10.1126/science.1076076).
- Bidle, K. D., Manganelli, M., and Azam, F. (2002b). Regulation of oceanic silicon and carbon preservation by temperature control on bacteria. *Science (80-.)*. 298, 1980–1984.
- Bissett, A., Neu, T. R., and de Beer, D. (2011). Dissolution of Calcite in the Twilight Zone: Bacterial Control of Dissolution of Sinking Planktonic Carbonates Is Unlikely. *PLoS One* 6, e26404. doi:[10.1371/journal.pone.0026404](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026404).
- Bittinger, K. (2020). abdiv: Alpha and Beta Diversity Measures. R package version 0.2.0.
- Bižić-Ionescu, M., Ionescu, D., and Grossart, H.-P. (2018). Organic Particles: Heterogeneous Hubs for Microbial Interactions in Aquatic Ecosystems. *Front. Microbiol.* 9, 2569. doi:[10.3389/fmicb.2018.02569](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02569).
- Blazewicz, S. J., Barnard, R. L., Daly, R. A., and Firestone, M. K. (2013). Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: Limitations and uses. *ISME J.* doi:[10.1038/ismej.2013.102](https://doi.org/10.1038/ismej.2013.102).
- Boeuf, D., Edwards, B. R., Eppley, J. M., Hu, S. K., Poff, K. E., Romano, A. E., et al. (2019). Biological composition and microbial dynamics of sinking particulate organic matter at abyssal depths in the oligotrophic open ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116, 11824–11832. doi:[10.1073/pnas.1903080116](https://doi.org/10.1073/pnas.1903080116).
- Bokulich, N. A., Subramanian, S., Faith, J. J., Gevers, D., Gordon, J. I., Knight, R., et al. (2013). Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10, 57–59. doi:[10.1038/nmeth.2276](https://doi.org/10.1038/nmeth.2276).

Bibliographie

- Bopp, L., Resplandy, L., Orr, J. C., Doney, S. C., Dunne, J. P., Gehlen, M., et al. (2013). Multiple stressors of ocean ecosystems in the 21st century: Projections with CMIP5 models. *Biogeosciences* 10, 6225–6245. doi:10.5194/bg-10-6225-2013.
- Boutrif, M., Garel, M., Cottrell, M. T., and Tamburini, C. (2011). Assimilation of marine extracellular polymeric substances by deep-sea prokaryotes in the NW Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 705–709. doi:10.1111/j.1758-2229.2011.00285.x.
- Bouvier, T., Giorgio, P. A. Del, and Gasol, J. M. (2007). A comparative study of the cytometric characteristics of High and Low nucleic-acid bacterioplankton cells from different aquatic ecosystems. *Environ. Microbiol.* 9, 2050–2066. doi:10.1111/J.1462-2920.2007.01321.X.
- Boyce, D. G., Lewis, M. R., and Worm, B. (2010). Global phytoplankton decline over the past century. *Nature* 466, 591–596. doi:10.1038/nature09268.
- Boyd, P. W., Claustre, H., Levy, M., Siegel, D. A., and Weber, T. (2019). Multi-faceted particle pumps drive carbon sequestration in the ocean. *Nature* 568, 327–335. doi:10.1038/s41586-019-1098-2.
- Bressac, M., Guieu, C., Ellwood, M. J., Tagliabue, A., Wagener, T., Laurenceau-Cornec, E. C., et al. (2019). Resupply of mesopelagic dissolved iron controlled by particulate iron composition. *Nat. Geosci.* 2019 1212 12, 995–1000. doi:10.1038/s41561-019-0476-6.
- Briggs, N., Dall’Olmo, G., and Claustre, H. (2020). Major role of particle fragmentation in regulating biological sequestration of CO₂ by the oceans. *Science* (80-.). 367, 791–793. doi:10.1126/science.aay1790.
- Buchan, A., LeClerc, G. R., Gulvik, C. A., and González, J. M. (2014). Master recyclers: features and functions of bacteria associated with phytoplankton blooms. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 686–698. doi:10.1038/nrmicro3326.
- Buffi, N., Beggah, S., Truffer, F., Geiser, M., Van Lintel, H., Renaud, P., et al. (2016). An automated microreactor for semi-continuous biosensor measurements. *Lab Chip* 16, 1383–1392. doi:10.1039/c6lc00119j.
- Bunse, C., Lundin, D., Karlsson, C. M. G., Akram, N., Vila-Costa, M., Palovaara, J., et al. (2016). Response of marine bacterioplankton pH homeostasis gene expression to elevated CO₂. *Nat. Clim. Chang.* 6, 483–487. doi:10.1038/nclimate2914.

Bibliographie

- Burd, A. B., Hansell, D. a., Steinberg, D. K., Anderson, T. R., Arístegui, J., Baltar, F., et al. (2010). Assessing the apparent imbalance between geochemical and biochemical indicators of meso- and bathypelagic biological activity: What the @\$#! is wrong with present calculations of carbon budgets? *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 57, 1557–1571. doi:10.1016/j.dsr2.2010.02.022.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., and Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat. Methods* 13, 581–583. doi:10.1038/nmeth.3869.
- Campanaro, S., Vezzi, A., Vitulo, N., Lauro, F. M., D’Angelo, M., Simonato, F., et al. (2005). Laterally transferred elements and high pressure adaptation in *Photobacterium profundum* strains. *BMC Genomics* 6, 122. doi:10.1186/1471-2164-6-122.
- Campos, C. D. M., and Da Silva, J. A. F. (2013). Applications of autonomous microfluidic systems in environmental monitoring. *RSC Adv.* 3, 18216–18227. doi:10.1039/c3ra41561a.
- Canals, M., Puig, P., de Madron, X. D., Heussner, S., Palanques, A., and Fabres, J. (2006). Flushing submarine canyons. *Nature* 444, 354–357. doi:10.1038/nature05271.
- Cao, Y., Chastain, R. A., Eloë, E. A., Nogi, Y., Kato, C., and Bartlett, D. H. (2014). Novel psychropiezophilic Oceanospirillales species *Profundimonas piezophila* gen. nov., sp. nov., isolated from the deep-sea environment of the Puerto Rico trench. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 54–60. doi:10.1128/AEM.02288-13.
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2012.8.
- Cario, A., Oliver, G. C., and Rogers, K. L. (2019). Exploring the Deep Marine Biosphere: Challenges, Innovations, and Opportunities. *Front. Earth Sci.* 7, 225. doi:10.3389/feart.2019.00225.
- Carlson, C. A. (2002). “Production and Removal Processes,” in *Biogeochemistry of marine dissolved organic matter*, 91–151.

Bibliographie

- Carlson, C. A., Ducklow, H. W., and Michaels, A. F. (1994). Annual flux of dissolved organic carbon from the euphotic zone in the northwestern Sargasso Sea. *Nature* 371, 405–408. doi:10.1038/371405a0.
- Carlson, C. A., Giovannoni, S. J., Hansell, D. A., Goldberg, S. J., Parsons, R., and Vergin, K. (2004). Interactions among dissolved organic carbon, microbial processes, and community structure in the mesopelagic zone of the northwestern Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* 49, 1073–1083. doi:10.4319/lo.2004.49.4.1073.
- Carlson, C. A., and Hansell, D. A. (2015). “DOM Sources, Sinks, Reactivity, and Budgets,” in *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter: Second Edition* (Elsevier Inc.), 65–126. doi:10.1016/B978-0-12-405940-5.00003-0.
- Carlson, C. A., Hansell, D. A., Nelson, N. B., Siegel, D. A., Smethie, W. M., Khatiwala, S., et al. (2010). Dissolved organic carbon export and subsequent remineralization in the mesopelagic and bathypelagic realms of the North Atlantic basin. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 57, 1433–1445. doi:10.1016/j.dsr2.2010.02.013.
- Cavan, E. L., and Boyd, P. W. (2018). Effect of anthropogenic warming on microbial respiration and particulate organic carbon export rates in the sub-Antarctic Southern Ocean. *Aquat. Microb. Ecol.* 82, 111–127. doi:10.3354/ame01889.
- Cavicchioli, R., Ripple, W. J., Timmis, K. N., Azam, F., Bakken, L. R., Baylis, M., et al. (2019). Scientists’ warning to humanity: microorganisms and climate change. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 569–586. doi:10.1038/s41579-019-0222-5.
- Céa, B., Lefèvre, D., Chirurgien, L., Raimbault, P., Garcia, N., Charrière, B., et al. (2015). An annual survey of bacterial production, respiration and ectoenzyme activity in coastal NW Mediterranean waters: temperature and resource controls. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 13654–13668. doi:10.1007/s11356-014-3500-9.
- Chen, Z., Ma, S., and Liu, L. (L.). (2008). Studies on phosphorus solubilizing activity of a strain of phosphobacteria isolated from chestnut type soil in China. *Bioresour. Technol.* 99, 6702–6707. doi:10.1016/j.biortech.2007.03.064.
- Cho, B. C., and Azam, F. (1988). Major role of bacteria in biogeochemical fluxes in the ocean’s interior. *Nature* 332, 441–443. doi:10.1038/332441a0.

Bibliographie

- Copin-Montégut, G., and Avril, B. (1993). Vertical distribution and temporal variation of dissolved organic carbon in the North-Western Mediterranean Sea. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 40, 1963–1972. doi:10.1016/0967-0637(93)90041-Z.
- Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L. (2000). Community composition of marine bacterioplankton determined by 16S rRNA gene clone libraries and fluorescence in situ hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 5116–22. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=92431&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Cottrell, M. T., and Kirchman, D. L. (2003). Contribution of major bacterial groups to bacterial biomass production (thymidine and leucine incorporation) in the Delaware estuary. *Limnol. Oceanogr.* 48, 168–178. doi:10.4319/lo.2003.48.1.0168.
- Dall’Olmo, G., Dingle, J., Polimene, L., Brewin, R. J. W., and Claustre, H. (2016). Substantial energy input to the mesopelagic ecosystem from the seasonal mixed-layer pump. *Nat. Geosci.* 9, 820–823. doi:10.1038/ngeo2818.
- Dalmasso, C., Oger, P., Selva, G., Courtine, D., L’Haridon, S., Garlaschelli, A., et al. (2016). *Thermococcus piezophilus* sp. nov., a novel hyperthermophilic and piezophilic archaeon with a broad pressure range for growth, isolated from a deepest hydrothermal vent at the Mid-Cayman Rise. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 440–444. doi:10.1016/j.syapm.2016.08.003.
- Dang, H., and Lovell, C. R. (2016). Microbial Surface Colonization and Biofilm Development in Marine Environments. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 91–138. doi:10.1128/mmmbr.00037-15.
- de Jesus Mendes, P. a., and Thomsen, L. (2012). Effects of Ocean Acidification on the Ballast of Surface Aggregates Sinking through the Twilight Zone. *PLoS One* 7, e50865. doi:10.1371/journal.pone.0050865.
- de Jesus Mendes, P. A., Thomsen, L., Holscher, B., de Stigter, H. C., and Gust, G. (2007). Pressure effects on the biological degradation of organo-mineral aggregates in submarine canyons. *Mar. Geol.* 246, 165–175. doi:10.1016/j.margeo.2007.05.012.
- del Giorgio, P. A., Cole, J. J., and Cimbleris, A. (1997). Respiration rates in bacteria exceed phytoplankton production in unproductive aquatic systems. *Nature* 385, 141–151.

Bibliographie

- del Giorgio, P. a, and Duarte, C. M. (2002). Respiration in the open ocean. *Nature* 420, 379–84. doi:10.1038/nature01165.
- DeLong, E. (2003). Oceans of Archaea. *ASM News-American Soc. Microbiol.* 69, 503–511. Available at: http://www.microeco.uzh.ch/uni/kurs/mikevol03/scinews/ASM_news_69_2003_503.pdf [Accessed May 24, 2014].
- DeLong, E. (2007). Microbial Domains in the Ocean: A Lesson from the Archaea. *Oceanography* 20, 124–129. doi:10.5670/oceanog.2007.56.
- DeLong, E. E. F., Preston, C. C. M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S. J., Frigaard, N., et al. (2006). Community Genomics Among Stratified Microbial Assemblages in the Ocean's Interior. *Science* (80-.). 311, 496–503. doi:https://doi.org/10.1126/science.1120250.
- DeLong, E. F., and Karl, D. M. (2005). Genomic perspectives in microbial oceanography. *Nature* 437, 336–42. doi:10.1038/nature04157.
- DeLong, E. F., Wickham, G. S., and Pace, N. R. (1987). Phylogenetic Stains: Ribosomal RNA-Based Probes for the Identification of Single Cells. *Science* (80-.). 845, 1–4.
- DeLong, E. F., and Yayanos, A. A. (1985). Adaptation of the membrane lipids of a deep-sea bacterium to changes in hydrostatic pressure. *Science* (80-.). 228, 1101–1103. doi:10.1126/science.3992247.
- Deming, J. W., Somers, L. K., Straube, W. L., Swartz, D. G., and Macdonell, M. T. (1988). Isolation of an Obligately Barophilic Bacterium and Description of a New Genus, *Colwellia* gen. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 10, 152–160. doi:10.1016/S0723-2020(88)80030-4.
- Dini-Andreote, F., Stegen, J. C., Van Elsas, J. D., and Salles, J. F. (2015). Disentangling mechanisms that mediate the balance between stochastic and deterministic processes in microbial succession. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1326–E1332. doi:10.1073/pnas.1414261112.
- Dong, S., Subhas, A. V., Rollins, N. E., Naviaux, J. D., Adkins, J. F., and Berelson, W. M. (2018). A kinetic pressure effect on calcite dissolution in seawater. *Geochim. Cosmochim. Acta* 238, 411–423. doi:10.1016/j.gca.2018.07.015.

Bibliographie

- Droop, M. R. (1968). Vitamin B₁₂ and Marine Ecology. IV. The Kinetics of Uptake, Growth and Inhibition in *Monochrysis Lutheri*. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 48, 689–733. doi:10.1017/S0025315400019238.
- Durrieu de Madron, X., Guieu, C., Sempéré, R., Conan, P., Cossa, D., D’Ortenzio, F., et al. (2011). Marine ecosystems’ responses to climatic and anthropogenic forcings in the Mediterranean. *Prog. Oceanogr.* 91, 97–166. doi:10.1016/j.pocean.2011.02.003.
- Durrieu de Madron, X., Ramondenc, S., Berline, L., Houpert, L., Bosse, A., Martini, S., et al. (2017). Deep sediment resuspension and thick nepheloid layer generation by open-ocean convection. *J. Geophys. Res. Ocean.* 122, 2291–2318. doi:10.1002/2016JC012062.
- Edgar, R. C. (2010). Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
- Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi:10.1093/bioinformatics/btr381.
- Edgcomb, V. P., Taylor, C., Pachiadaki, M. G., Honjo, S., Engstrom, I., and Yakimov, M. (2016). Comparison of Niskin vs. in situ approaches for analysis of gene expression in deep Mediterranean Sea water samples. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 129, 213–222. doi:10.1016/j.dsr2.2014.10.020.
- Egan, S. T., McCarthy, D. M., Patching, J. W., and Fleming, G. T. a. (2012). An investigation of the physiology and potential role of components of the deep ocean bacterial community (of the NE Atlantic) by enrichments carried out under minimal environmental change. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 61, 11–20. doi:10.1016/j.dsr.2011.11.005.
- Eichinger, M., Kooijman, S., Sempéré, R., Lefèvre, D., Grégori, G., Charrière, B., et al. (2009). Consumption and release of dissolved organic carbon by marine bacteria in a pulsed-substrate environment: from experiments to modelling. *Aquat. Microb. Ecol.* 56, 41–54. doi:10.3354/ame01312.
- Eichinger, M., Sempéré, R., Grégori, G., Charrière, B., Poggiale, J. C., and Lefèvre, D. (2010). Increased bacterial growth efficiency with environmental variability: Results from DOC degradation by bacteria in pure culture experiments. *Biogeosciences* 7, 1861–1876. doi:10.5194/bg-7-1861-2010.

Bibliographie

- Elifantz, H., Horn, G., Ayon, M., Cohen, Y., and Minz, D. (2013). Rhodobacteraceae are the key members of the microbial community of the initial biofilm formed in Eastern Mediterranean coastal seawater. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85, 348–357. doi:10.1111/1574-6941.12122.
- Eloe, E. A., Malfatti, F., Gutierrez, J., Hardy, K., Schmidt, W. E., Pogliano, K., et al. (2011a). Isolation and characterization of a psychropiezophilic alphaproteobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 8145–53. doi:10.1128/AEM.05204-11.
- Eloe, E. a., Shulse, C. N., Fadrosch, D. W., Williamson, S. J., Allen, E. E., and Bartlett, D. H. (2011b). Compositional differences in particle-associated and free-living microbial assemblages from an extreme deep-ocean environment. *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 449–458. doi:10.1111/j.1758-2229.2010.00223.x.
- Engel, A., and Händel, N. (2011). A novel protocol for determining the concentration and composition of sugars in particulate and in high molecular weight dissolved organic matter (HMW-DOM) in seawater. *Mar. Chem.* 127, 180–191. doi:10.1016/j.marchem.2011.09.004.
- Engel, A., Szlosek, J., Abramson, L., Liu, Z., and Lee, C. (2009). Investigating the effect of ballasting by CaCO₃ in *Emiliania huxleyi*: I. Formation, settling velocities and physical properties of aggregates. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56, 1396–1407. doi:10.1016/j.dsr2.2008.11.027.
- Enke, T. N., Leventhal, G. E., Metzger, M., Saavedra, J. T., and Cordero, O. X. (2018). Microscale ecology regulates particulate organic matter turnover in model marine microbial communities. *Nat. Commun.* 9. doi:10.1038/s41467-018-05159-8.
- Eppley, R. W., and Peterson, B. J. (1979). Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature* 282, 677–680. doi:10.1038/282677a0.
- Erauso, G., Reysenbach, A.-L., Godfroy, A., Meunier, J.-R., Crump, B., Partensky, F., et al. (1993). *Pyrococcus abyssi* sp. nov., a new hyperthermophilic archaeon isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 160. doi:10.1007/BF00252219.
- Faith, D. P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biol. Conserv.* 61, 1–10. doi:https://doi.org/10.1016/0006-3207(92)91201-3.

Bibliographie

- Fang, J. S., Zhang, L., Li, J. T., Kato, C., Tamburini, C., Zhang, Y. Z., et al. (2015). The POM-DOM piezophilic microorganism continuum (PDPMC)—The role of piezophilic microorganisms in the global ocean carbon cycle. *Sci. China Earth Sci.* 58, 106–115. doi:10.1007/s11430-014-4985-2.
- Fernández-Gómez, B., Richter, M., Schüler, M., Pinhassi, J., Acinas, S. G., González, J. M., et al. (2013). Ecology of marine Bacteroidetes: a comparative genomics approach. *ISME J.* 7, 1026–1037. doi:10.1038/ismej.2012.169.
- Follett, C. L., Repeta, D. J., Rothman, D. H., Xu, L., and Santinelli, C. (2014). Hidden cycle of dissolved organic carbon in the deep ocean. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16706–16711. doi:10.1073/pnas.1407445111.
- Fuchs, B., Woebken, D., Zubkov, M., Burkill, P., and Amann, R. (2005). Molecular identification of picoplankton populations in contrasting waters of the Arabian Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 39, 145–157. doi:10.3354/ame039145.
- Fujikawa, H., and Morozumi, S. (2006). Modeling *Staphylococcus aureus* growth and enterotoxin production in milk. *FOOD Microbiol.* 23, 260–267. doi:10.1016/j.fm.2005.04.005.
- Fukuba, T., Noguchi, T., Okamura, K., and Fujii, T. (2018). Adenosine triphosphate measurement in deep sea using a microfluidic device. *Micromachines* 9, 1–10. doi:10.3390/mi9080370.
- Garcia, T., Otto, K., Kjelleberg, S., and Nelson, D. R. (1997). Growth of *Vibrio anguillarum* in salmon intestinal mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1034–1039. doi:10.1128/aem.63.3.1034-1039.1997.
- Garel, M., Bonin, P., Martini, S., Guasco, S., Roumagnac, M., Bhairy, N., et al. (2019). Pressure-Retaining Sampler and High-Pressure Systems to Study Deep-Sea Microbes Under in situ Conditions. *Front. Microbiol.* 10, 453. doi:10.3389/fmicb.2019.00453.
- Garel, M., Panagiotopoulos, C., Boutrif, M., Repeta, D., Sempéré, R., Santinelli, C., et al. (2021). Contrasting degradation rates of natural dissolved organic carbon by deep-sea prokaryotes under stratified water masses and deep-water convection conditions in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 231, 103932. doi:10.1016/j.marchem.2021.103932.

Bibliographie

- Giering, S. L. C., Sanders, R., Lampitt, R. S., Anderson, T. R., Tamburini, C., Boutrif, M., et al. (2014). Reconciliation of the carbon budget in the ocean's twilight zone. *Nature* 507, 480–3. doi:10.1038/nature13123.
- Giorgio, P. Del, and Cole, J. (1998). Bacterial growth efficiency in natural aquatic systems. *Annu. Rev. Ecol. ...* 29, 503–541. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ecolsys.29.1.503> [Accessed May 27, 2014].
- Giovannoni, S. J., and Stingl, U. (2005). Molecular diversity and ecology of microbial plankton. *Nature* 437, 343–8. doi:10.1038/nature04158.
- Girault, M., Arakawa, H., Barani, A., Ceccaldi, H. J., Hashihama, F., and Gregori, G. (2015). Heterotrophic prokaryote distribution along a 2300 km transect in the North Pacific subtropical gyre during a strong la Niña conditions: Relationship between distribution and hydrological conditions. *Biogeosciences*. doi:10.5194/bg-12-3607-2015.
- Girault, M., Beneyton, T., del Amo, Y., and Baret, J. C. (2019). Microfluidic technology for plankton research. *Curr. Opin. Biotechnol.* 55, 134–150. doi:10.1016/j.copbio.2018.09.010.
- Goldberg, S. J., Carlson, C. a., Brzezinski, M., Nelson, N. B., and Siegel, D. a. (2011). Systematic removal of neutral sugars within dissolved organic matter across ocean basins. *Geophys. Res. Lett.* 38, 1–7. doi:10.1029/2011GL048620.
- Goutx, M., Wakeham, S. G., Lee, C., Duflos, M., Guigue, C., Liu, Z., et al. (2007). Composition and degradation of sinking particles with different settling velocities. *Limnol. Oceanogr.* 52, 1645–1664.
- Grossart, H., and Gust, G. (2009). Hydrostatic pressure affects physiology and community structure of marine bacteria during settling to 4000 m: an experimental approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 390, 97–104. doi:10.3354/meps08201.
- Grossi, V., Yakimov, M. M., Al Ali, B., Tapilatu, Y., Cuny, P., Goutx, M., et al. (2010). Hydrostatic pressure affects membrane and storage lipid compositions of the piezotolerant hydrocarbon-degrading *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* strain #5. *Environ. Microbiol.* 12, 2020–2033. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02213.x.

Bibliographie

- Gruber, N., Friedlingstein, P., Field, C., Valentini, R., Heimann, M., Richey, J., et al. (2004). The vulnerability of the carbon cycle in the 21st century: an assessment of carbon-climate-human interactions. In C. B. Field, & M. R. Raupach (Eds.), *The global carbon cycle*. Washington: Island Press. 62, 45–76. Available at: <https://www.researchgate.net/publication/258432144> [Accessed September 17, 2019].
- Gu, Z., Eils, R., and Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32, 2847–2849. doi:10.1093/bioinformatics/btw313.
- Hansell, D. A. (2009). DissolveD oRgaNlc MatteR IN the oceaN. *Oceanography* 22, 202–211.
- Hansell, D. A. (2013). Recalcitrant Dissolved Organic Carbon Fractions. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 5, 421–445. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100757.
- Hansell, D. A., and Carlson, C. A. (2015). *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter: Second Edition*. Elsevier Inc. doi:10.1016/C2012-0-02714-7.
- Hansell, D., Carlson, C., Repeta, D., and Schlitzer, R. (2009). Dissolved Organic Matter in the Ocean: A Controversy Stimulates New Insights. *Oceanography*. doi:10.5670/oceanog.2009.109.
- Hedges, J. I., Baldock, J. A., Gelinas, Y., Lee, C., Peterson, M., and Wakeham, S. G. (2001). Evidence for non-selective preservation of organic matter in sinking marine particles. *Nature* 409, 801–804.
- Hegab, H. M., ElMekawy, A., and Stakenborg, T. (2013). Review of microfluidic microbioreactor technology for high-throughput submerged microbiological cultivation. *Biomicrofluidics* 7, 21502. doi:10.1063/1.4799966.
- Henson, S. A., Sanders, R., and Madsen, E. (2012). Global patterns in efficiency of particulate organic carbon export and transfer to the deep ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 26. doi:10.1029/2011GB004099.
- Hernández-León, S., Koppelman, R., Fraile-Nuez, E., Bode, A., Mompeán, C., Irigoien, X., et al. (2020). Large deep-sea zooplankton biomass mirrors primary production in the global ocean. *Nat. Commun.* 11, 6048. doi:10.1038/s41467-020-19875-7.

Bibliographie

- Herndl, G. J., Reinthaler, T., Teira, E., Van Aken, H., Veth, C., Pernthaler, A., et al. (2005a). Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep atlantic ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2303–2309. doi:10.1128/AEM.71.5.2303-2309.2005.
- Herndl, G. J., Reinthaler, T., Teira, E., Van Aken, H., Veth, C., Pernthaler, A., et al. (2005b). Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2303–2309. doi:10.1128/AEM.71.5.2303.
- Hidaka, K., Kawaguchi, K., Murakami, M., and Takahashi, M. (2001). Downward transport of organic carbon by diel migratory micronekton in the western equatorial Pacific:: its quantitative and qualitative importance. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 48, 1923–1939. doi:10.1016/S0967-0637(01)00003-6.
- Hol, F. J. H., and Dekker, C. (2014). Zooming in to see the bigger picture: Microfluidic and nanofabrication tools to study bacteria. *Science* (80-.). 346, 1251821. doi:10.1126/science.1251821.
- Hoppe, H. G., and Ullrich, S. (1999). Profiles of ectoenzymes in the Indian Ocean: Phenomena of phosphatase activity in the mesopelagic zone. *Aquat. Microb. Ecol.* 19, 139–148. doi:10.3354/ame019139.
- Ibarbalz, F. M., Henry, N., Brandão, M. C., Martini, S., Busseni, G., Byrne, H., et al. (2019). Global Trends in Marine Plankton Diversity across Kingdoms of Life. *Cell* 179, 1084-1097.e21. doi:10.1016/j.cell.2019.10.008.
- Ingalls, A. E., Lee, C., Wakeham, S. G., and Hedges, J. I. (2003). The role of biominerals in the sinking flux and preservation of amino acids in the Southern Ocean along 170°W. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* doi:10.1016/S0967-0645(02)00592-1.
- Ionescu, D., Bizic-Ionescu, M., Khalili, A., Malekmohammadi, R., Morad, M. R., de Beer, D., et al. (2015). A new tool for long-term studies of POM-bacteria interactions: overcoming the century-old Bottle Effect. *Sci. Rep.* 5, 14706. doi:10.1038/srep14706.
- IPCC (2013). “Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change,” in *IPCC Fifth Assessment Report*, eds. T. F. Stocker, D. Qin, G.-K. Plattner, M. Tignor, S. K. Allen, J. Boschung, et al. (Cambridge, United Kingdom and New York), 1535 pp.

Bibliographie

- Ishii, S., Kitamura, G., Segawa, T., Kobayashi, A., Miura, T., Sano, D., et al. (2014). Microfluidic quantitative PCR for simultaneous quantification of multiple viruses in environmental water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 7505–7511. doi:10.1128/AEM.02578-14.
- Jacquet, S. H. M., Dehairs, F., Lefèvre, D., Cavagna, A. J., Planchon, F., Christaki, U., et al. (2015). Early spring mesopelagic carbon remineralization and transfer efficiency in the naturally iron-fertilized Kerguelen area. *Biogeosciences*. doi:10.5194/bg-12-1713-2015.
- Jannasch, H., Eimhjellen, K., and Farmanfarnian, A. (1971). Microbial degradation of organic matter in the deep sea. *Science* (80-.). 171, 672–675. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/171/3972/672.short> [Accessed April 27, 2014].
- Jannasch, H. J., Wirsen, C. O., and Taylor, C. D. (1976). Undecompressed microbial populations from the deep sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 32, 360–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=170071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jannasch, H. W., and Wirsen, C. (1977). Retrieval of Concentrated and Undecompressed Microbial Populations from the Deep Sea. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, 642–646.
- Jannasch, H. W., Wirsen, C. O., and Winget, C. L. (1973). A bacteriological pressure-retaining deep-sea sampler and culture vessel. *Deep. Res. Oceanogr. Abstr.* 20, 661–664. doi:10.1016/0011-7471(73)90033-8.
- Jannasch, H., and Wirsen, C. (1973). Deep-sea microorganisms: in situ response to nutrient enrichment. *Science* (80-.). 180, 641–643. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/180/4086/641.short> [Accessed August 10, 2014].
- Jannasch, H., and Wirsen, C. (1982). Microbial activities in undecompressed and decompressed deep-seawater samples. *Appl. Environ. ...* 43, 1116–1124. Available at: <http://aem.asm.org/content/43/5/1116.short> [Accessed July 16, 2014].
- Jebbar, M., Franzetti, B., Girard, E., and Oger, P. (2015). Microbial diversity and adaptation to high hydrostatic pressure in deep-sea hydrothermal vents prokaryotes. *Extremophiles* 19, 721–740. doi:10.1007/s00792-015-0760-3.

Bibliographie

- Jiao, N., Herndl, G. J., Hansell, D. A., Benner, R., Kattner, G., Wilhelm, S. W., et al. (2010). Microbial production of recalcitrant dissolved organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 593–599. doi:10.1038/nrmicro2386.
- Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R., and Wolfe, R. S. (1983). *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* 136, 254–261. doi:10.1007/BF00425213.
- Jousset, A., Bienhold, C., Chatzinotas, A., Gallien, L., Gobet, A., Kurm, V., et al. (2017). Where less may be more: how the rare biosphere pulls ecosystems strings. *ISME J.* 11, 853–862. doi:10.1038/ismej.2016.174.
- Kaiser, K., and Benner, R. (2008). Major bacterial contribution to the ocean reservoir of detrital organic carbon and nitrogen. *Limnol. Oceanogr.* 53, 99–112. doi:10.4319/lo.2008.53.1.0099.
- Kaiser, K., and Benner, R. (2009). Biochemical composition and size distribution of organic matter at the Pacific and Atlantic time-series stations. *Mar. Chem.* 113, 63–77. doi:10.1016/j.marchem.2008.12.004.
- Karner, M. B., Delong, E. F., and Karl, D. M. (2001). Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. *Nature* 409, 507–510. doi:10.1038/35054051.
- Kato, C. (2011a). “Cultivation Methods for Piezophiles,” in *Extremophiles Handbook*, ed. K. Horikoshi (Tokyo: Springer Japan), 719–726. doi:10.1007/978-4-431-53898-1.
- Kato, C. (2011b). “High Pressure and Prokaryotes,” in *Extremophiles Handbook*, ed. K. Horikoshi (Tokyo: Springer Japan), 657–668. doi:10.1007/978-4-431-53898-1.
- Kato, C., Sato, T., and Horikoshi, K. (1995). Isolation and properties of barophilic and barotolerant bacteria from deep-sea mud samples. *Biodivers. Conserv.* 4, 1–9. doi:10.1007/BF00115311.
- Kembel, S. W., Cowan, P. D., Helmus, M. R., Cornwell, W. K., Morlon, H., Ackerly, D. D., et al. (2010). Picante: R tools for integrating phylogenies and ecology. *Bioinformatics* 26, 1463–1464. doi:10.1093/bioinformatics/btq166.

Bibliographie

- Khelaifia, S., Fardeau, M.-L., Pradel, N., Aussenberg, C., Garel, M., Tamburini, C., et al. (2011). *Desulfovibrio piezophilus* sp. nov., a piezophilic, sulfate-reducing bacterium isolated from wood falls in the Mediterranean Sea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 61, 2706–11. doi:10.1099/ijs.0.028670-0.
- Kiko, R., Brandt, P., Christiansen, S., Faustmann, J., Kriest, I., Rodrigues, E., et al. (2020). Zooplankton-Mediated Fluxes in the Eastern Tropical North Atlantic. *Front. Mar. Sci.* 7, 358. doi:10.3389/fmars.2020.00358.
- Kim, H. S., Guzman, A. R., Thapa, H. R., Devarenne, T. P., and Han, A. (2016). A droplet microfluidics platform for rapid microalgal growth and oil production analysis. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 1691–1701. doi:10.1002/bit.25930.
- Kim, S.-J., and Kato, C. (2010). “Sampling, Isolation, Cultivation, and Characterization of Piezophilic Microbes,” in *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 3869–3881. doi:10.1007/978-3-540-77587-4_303.
- Kjørboe, T., and Jackson, G. A. (2001). Marine snow, organic solute plumes, and optimal chemosensory behavior of bacteria. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1309–1318. doi:10.4319/lo.2001.46.6.1309.
- Kirchman, D. (1993). “Leucine incorporation as a measure of biomass production by heterotrophic bacteria,” in *Handbooks of Methods in Aquatic Microbial Ecology*, eds. P. F. Kemp, B. F. Sherr, E. B. Sherr, and J. J. Cole (Lewis Publishers, Boca Raton,), 509–5012.
- Kirchman, D. L. (2002). The ecology of Cytophaga-Flavobacteria in aquatic environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 39, 91–100. doi:10.1111/j.1574-6941.2002.tb00910.x.
- Koike, I., and Nagata, T. (1997). High potential activity of extracellular alkaline phosphatase in deep waters of the central Pacific. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 44, 2283–2294. doi:10.1016/S0967-0645(97)00025-8.
- Krumhardt, K. M., Lovenduski, N. S., Iglesias-Rodriguez, M. D., and Kleypas, J. A. (2017). Coccolithophore growth and calcification in a changing ocean. *Prog. Oceanogr.* 159, 276–295. doi:10.1016/j.pocean.2017.10.007.

Bibliographie

- Kuczynski, J., Stombaugh, J., Walters, W., González, A., Caporaso, J. G., and Knight, R. (2012). Using QIIME to Analyze 16S rRNA Gene Sequences from Microbial Communities. *Curr. Protoc. Microbiol.*, Unit 10.7. doi:10.1002/9780471729259.mc01e05s27.
- La Cono, V., Smedile, F., La Spada, G., Arcadi, E., Genovese, M., Ruggeri, G., et al. (2015). Shifts in the meso- and bathypelagic archaea communities composition during recovery and short-term handling of decompressed deep-sea samples. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 450–459. doi:10.1111/1758-2229.12272.
- La Cono, V., Tamburini, C., Genovese, L., La Spada, G., Denaro, R., and Yakimov, M. M. (2009). Cultivation-independent assessment of the bathypelagic archaeal diversity of Tyrrhenian Sea: Comparative study of rDNA and rRNA-derived libraries and influence of sample decompression. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56, 768–773. doi:10.1016/j.dsr2.2008.07.025.
- Lahti, L., Shetty, S., and Blake, T. (2017). Tools for microbiome analysis in R. *Microbiome Packag. Version 0.99*.
- Lauro, F. M., and Bartlett, D. H. (2008). Prokaryotic lifestyles in deep sea habitats. *Extremophiles* 12, 15–25. doi:10.1007/s00792-006-0059-5.
- Le Moigne, F. A. C. (2019). Pathways of Organic Carbon Downward Transport by the Oceanic Biological Carbon Pump. *Front. Mar. Sci.* 6, 634. doi:10.3389/fmars.2019.00634.
- Le Moigne, F. A. C., Gallinari, M., Laurenceau, E., and De La Rocha, C. L. (2013a). Enhanced rates of particulate organic matter remineralization by microzooplankton are diminished by added ballast minerals. *Biogeosciences* 10, 5755–5765. doi:10.5194/bg-10-5755-2013.
- Le Moigne, F. A. C., Villa-Alfageme, M., Sanders, R. J., Marsay, C., Henson, S., and García-Tenorio, R. (2013b). Export of organic carbon and biominerals derived from ²³⁴Th and ²¹⁰Po at the Porcupine Abyssal Plain. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 72, 88–101. doi:10.1016/j.dsr.2012.10.010.
- Lee, S., and Fuhrman, J. (1991). Species composition shift of confined bacterioplankton studies at the level of community DNA. *Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldend.* 79, 195–201. Available at: <http://www.int-res.com/articles/meps/79/m079p195.pdf> [Accessed May 27, 2014].

Bibliographie

- Lefèvre, D., Denis, M., Lambert, C. E., and Miquel, J. C. (1996). Is DOC the main source of organic matter remineralization in the ocean water column? *J. Mar. Syst.* 7, 281–291. doi:10.1016/0924-7963(95)00003-8.
- Legendre, L., Rivkin, R. B., Weinbauer, M. G., Guidi, L., and Uitz, J. (2015). The microbial carbon pump concept: Potential biogeochemical significance in the globally changing ocean. *Prog. Oceanogr.* 134, 432–450. doi:10.1016/j.pocean.2015.01.008.
- Legendre, P., and Legendre, L. (1998). Numerical ecology. 2nd. *Elsevier Sci.*
- Lepš, J., and Šmilauer, P. (2003). *Multivariate Analysis of Ecological Data using CANOCO*. doi:10.1017/cbo9780511615146.
- Leung, K., Zahn, H., Leaver, T., Konwar, K. M., Hanson, N. W., Pagé, A. P., et al. (2012). A programmable droplet-based microfluidic device applied to multiparameter analysis of single microbes and microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 7665–7670. doi:10.1073/pnas.1106752109.
- Levin, L. A., Bett, B. J., Gates, A. R., Heimbach, P., Howe, B. M., Janssen, F., et al. (2019). Global Observing Needs in the Deep Ocean. *Front. Mar. Sci.* 6, 241. doi:10.3389/fmars.2019.00241.
- Levitus, S., Antonov, J. I., Boyer, T. P., Baranova, O. K., Garcia, H. E., Locarnini, R. A., et al. (2012). World ocean heat content and thermosteric sea level change (0-2000 m), 1955-2010. *Geophys. Res. Lett.* 39, n/a-n/a. doi:10.1029/2012GL051106.
- Levy, M., Bopp, L., Karleskind, P., Resplandy, L., Ethe, C., and Pinsard, F. (2013). Physical pathways for carbon transfers between the surface mixed layer and the ocean interior. *Global Biogeochem. Cycles* 27, 1001–1012. doi:10.1002/gbc.20092.
- Leygeber, M., Lindemann, D., Sachs, C. C., Kaganovitch, E., Wiechert, W., Nöh, K., et al. (2019). Analyzing Microbial Population Heterogeneity—Expanding the Toolbox of Microfluidic Single-Cell Cultivations. *J. Mol. Biol.* 431, 4569–4588. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.025.
- Li, R., Tun, H. M., Jahan, M., Zhang, Z., Kumar, A., Fernando, D., et al. (2017). Comparison of DNA-, PMA-, and RNA-based 16S rRNA Illumina sequencing for detection of live bacteria in water. *Sci. Rep.* 7, 5752. doi:10.1038/s41598-017-02516-3.

Bibliographie

- Liu, Y., Blain, S., Crispi, O., Rembauville, M., and Obernosterer, I. (2020a). Seasonal dynamics of prokaryotes and their associations with diatoms in the Southern Ocean as revealed by an autonomous sampler. *Environ. Microbiol.* 22, 3968–3984. doi:10.1111/1462-2920.15184.
- Liu, Y., Fang, J., Jia, Z., Chen, S., Zhang, L., and Gao, W. (2020b). DNA stable-isotope probing reveals potential key players for microbial decomposition and degradation of diatom-derived marine particulate matter. *Microbiologyopen* 9. doi:10.1002/mbo3.1013.
- Loferer-Krössbacher, M., Klima, J., and Psenner, R. (1998). Determination of bacterial cell dry mass by transmission electron microscopy and densitometric image analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 688–94. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=106103&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Lønborg, C., Cuevas, L. A., Reinthaler, T., Herndl, G. J., Gasol, Josep, M., Moràn, X. A., et al. (2016). Depth dependent relationships between temperature and ocean heterotrophic prokaryotic production. *Front. Microbiol.* ... doi:10.3389/fmars.2016.00090.
- Long, R. A., and Azam, F. (2001). Antagonistic Interactions among Marine Pelagic Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 4975–4983. doi:10.1128/aem.67.11.4975-4983.2001.
- Luna, G. M., Chiggiato, J., Quero, G. M., Schroeder, K., Bongiorno, L., Kalenitchenko, D., et al. (2016). Dense water plumes modulate richness and productivity of deep sea microbes. *Environ. Microbiol.* doi:10.1111/1462-2920.13510.
- Mangelsdorf, K., Zink, K., Birrien, J., and Toffin, L. (2005). A quantitative assessment of pressure dependent adaptive changes in the membrane lipids of a piezosensitive deep sub-seafloor bacterium. *Org. Geochem.* 36, 1459–1479. doi:10.1016/j.orggeochem.2005.08.002.
- Marre, S., Adamo, A., Basak, S., Aymonier, C., and Jensen, K. F. (2010). Design and packaging of microreactors for high pressure and high temperature applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* 49, 11310–11320. doi:10.1021/ie101346u.
- Marre, S., Baek, J., Park, J., Bawendi, M. G., and Jensen, K. F. (2009). High-Pressure/High-Temperature Microreactors for Nanostructure Synthesis. *J. Lab. Autom.* 14, 367–373. doi:10.1016/j.jala.2009.06.005.

Bibliographie

- Marshall, J., and Schott, F. (1999). Open-ocean convection: Observations, theory, and models. *Rev. Geophys.* 37, 1–64. doi:10.1029/98RG02739.
- Martin, A., Boyd, P., Buesseler, K., Cetinic, I., Claustre, H., Giering, S., et al. (2020). The oceans' twilight zone must be studied now, before it is too late. *Nature* 580, 26–28. doi:10.1038/d41586-020-00915-7.
- Martín, J., Miquel, J.-C., and Khripounoff, A. (2010). Impact of open sea deep convection on sediment remobilization in the western Mediterranean. *Geophys. Res. Lett.* 37, n/a-n/a. doi:10.1029/2010GL043704.
- Martini, S., Al Ali, B., Garel, M., Nerini, D., Grossi, V., Pacton, M., et al. (2013). Effects of Hydrostatic Pressure on Growth and Luminescence of a Moderately-Piezophilic Luminous Bacteria *Photobacterium phosphoreum* ANT-2200. *PLoS One* 8, e66580. doi:10.1371/journal.pone.0066580.
- Mccarren, J., Becker, J. W., Repeta, D. J., Shi, Y., Young, C. R., Malmstrom, R. R., et al. (2010). Microbial community transcriptomes reveal microbes and metabolic pathways associated with dissolved organic matter turnover in the sea. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 16420–16427. doi:10.1073/pnas.1010732107/-/DCSupplemental.www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010732107.
- McCarthy, M., Hedges, J., and Benner, R. (1996). Major biochemical composition of dissolved high molecular weight organic matter in seawater. *Mar. Chem.* 55, 281–297. doi:10.1016/S0304-4203(96)00041-2.
- McIntyre, A., and Bé, A. W. H. (1967). Modern coccolithophoridae of the atlantic ocean-I. Placoliths and cyrtoliths. *Deep. Res. Oceanogr. Abstr.* 14, 561–597. doi:10.1016/0011-7471(67)90065-4.
- Mcmurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0061217.
- McMurdie, P. J., and Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* 8, e61217. doi:10.1371/journal.pone.0061217.

- McNeil, C. L., and D'Asaro, E. a. (2014). A calibration equation for oxygen optodes based on physical properties of the sensing foil. *Limnol. Oceanogr. Methods* 12, 139–154. doi:10.4319/lom.2014.12.139.
- McNichol, J., Sylva, S. P., Thomas, F., Taylor, C. D., Sievert, S. M., and Seewald, J. S. (2016). Assessing microbial processes in deep-sea hydrothermal systems by incubation at in situ temperature and pressure. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 115, 221–232. doi:10.1016/j.dsr.2016.06.011.
- Mertens, C., and Schott, F. (2002). Interannual Variability of Deep-Water Formation in the Northwestern Mediterranean. *J. Phys. Oceanogr.* 28, 1410–1424. doi:10.1175/1520-0485(1998)028<1410:ivodwf>2.0.co;2.
- Michoud, G., and Jebbar, M. (2016). High hydrostatic pressure adaptive strategies in an obligate piezophile *Pyrococcus yayanosii*. *Sci. Rep.* 6, 27289. doi:10.1038/srep27289.
- Moore, J. K., Fu, W., Primeau, F., Britten, G. L., Lindsay, K., Long, M., et al. (2018). Sustained climate warming drives declining marine biological productivity. *Science (80-.)*. 359, 1139–1143. doi:10.1126/science.aao6379.
- Mopper, K., Schultz, C. A., Chevolot, L., Germain, C., Revuelta, R., and Dawson, R. (1992). Determination of Sugars in Unconcentrated Seawater and Other Natural Waters by Liquid Chromatography and Pulsed Amperometric Detection. *Environ. Sci. Technol.* 26, 133–138. doi:10.1021/es00025a014.
- Moran, M. A., González, J. M., and Kiene, R. P. (2003). Linking a bacterial taxon to sulfur cycling in the sea: Studies of the marine *Roseobacter* group. *Geomicrobiol. J.* 20, 375–388. doi:10.1080/01490450303901.
- Moser, D. P., and Nealson, K. H. (1996). Growth of the Facultative Anaerobe *Shewanella putrefaciens* by Elemental Sulfur Reduction Downloaded from. Available at: <http://aem.asm.org/> [Accessed March 24, 2020].
- Murrell, M. C., and Hollibaugh, J. T. (2000). Distribution and composition of dissolved and particulate organic carbon in northern San Francisco Bay during low flow conditions. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51, 75–90. doi:10.1006/ecss.2000.0639.

Bibliographie

- Nagata, T. (2008). "Organic matter-bacteria interactions in seawater," in *Microbial ecology of the oceans*, ed. D. L. Kirchman (Wiley Online Library), 207–241.
- Nagata, T., Tamburini, C., Arístegui, J., Baltar, F., Bochkansky, A. B., Fonda-Umani, S., et al. (2010). Emerging concepts on microbial processes in the bathypelagic ocean – ecology, biogeochemistry, and genomics. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 57, 1519–1536. doi:10.1016/j.dsr2.2010.02.019.
- Nayak, A. R., and Twardowski, M. S. (2020). "Breaking" news for the ocean's carbon budget. *Science* (80-.). doi:10.1126/science.aba7109.
- Nogi, Y., Hosoya, S., Kato, C., and Horikoshi, K. (2004). *Colwellia piezophila* sp. nov., a novel piezophilic species from deep-sea sediments of the Japan Trench. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1627–1631. doi:10.1099/ijs.0.03049-0.
- Oksanen, J., Blanchet, F. G., Friendly, M., Kindt, R., Legendre, P., McGlinn, D., et al. (2020). Package "vegan" Title Community Ecology Package Version 2.5-7. *cran.ism.ac.jp*.
- Oliver, G. C., Cario, A., and Rogers, K. L. (2020). Rate and Extent of Growth of a Model Extremophile, *Archaeoglobus fulgidus*, Under High Hydrostatic Pressures. *Front. Microbiol.* 11. doi:10.3389/fmicb.2020.01023.
- Orsi, W. D., Smith, J. M., Liu, S., Liu, Z., Sakamoto, C. M., Wilken, S., et al. (2016). Diverse, uncultivated bacteria and archaea underlying the cycling of dissolved protein in the ocean. *ISME J.* 10, 2158–2173. doi:10.1038/ismej.2016.20.
- Pal, S., Tak, Y. K., and Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 1712–1720. doi:10.1128/AEM.02218-06.
- Panagiotopoulos, C., Goutx, M., Suroy, M., and Moriceau, B. (2020). Phosphorus limitation affects the molecular composition of *Thalassiosira weissflogii* leading to increased biogenic silica dissolution and high degradation rates of cellular carbohydrates. *Org. Geochem.* 148, 104068. doi:10.1016/j.orggeochem.2020.104068.
- Panagiotopoulos, C., and Sempéré, R. (2005). Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnol. Oceanogr. Methods* 3, 419–454.

Bibliographie

- Panagiotopoulos, C., Sempéré, R., Jacq, V., and Charrière, B. (2014). Composition and distribution of dissolved carbohydrates in the Beaufort Sea Mackenzie margin (Arctic Ocean). *Mar. Chem.* 166, 92–102. doi:10.1016/j.marchem.2014.09.004.
- Panagiotopoulos, C., Sempéré, R., Lafont, R., and Kerhervé, P. (2001). Sub-ambient temperature effects on the separation of monosaccharides by high-performance anion-exchange chromatography with pulse amperometric detection - Application to marine chemistry. in *Journal of Chromatography A*, 13–22. doi:10.1016/S0021-9673(01)00697-5.
- Panagiotopoulos, C., Sempéré, R., Obernosterer, I., Striby, L., Goutx, M., Van Wambeke, F., et al. (2002). Bacterial degradation of large particles in the southern Indian Ocean using in vitro incubation experiments. *Org. Geochem.* doi:10.1016/S0146-6380(02)00057-8.
- Panagiotopoulos, C., Sempéré, R., Para, J., Raimbault, P., Rabouille, C., and Charrière, B. (2012). The composition and flux of particulate and dissolved carbohydrates from the Rhone River into the Mediterranean Sea. *Biogeosciences* 9, 1827–1844. doi:10.5194/bg-9-1827-2012.
- Parada, A. E., Needham, D. M., and Fuhrman, J. A. (2016). Every base matters: Assessing small subunit rRNA primers for marine microbiomes with mock communities, time series and global field samples. *Environ. Microbiol.* 18, 1403–1414. doi:10.1111/1462-2920.13023.
- Parkes, R. J., Sellek, G., Webster, G., Martin, D., Anders, E., Weightman, A. J., et al. (2009). Culturable prokaryotic diversity of deep, gas hydrate sediments: first use of a continuous high-pressure, anaerobic, enrichment and isolation system for seafloor sediments (DeepIsoBUG). *Environ. Microbiol.* 11, 3140–53. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.02018.x.
- Passow, U., and Carlson, C. A. (2012). The biological pump in a high CO₂ world. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 470, 249–271. doi:10.3354/meps09985.
- Paul, J., Scholin, C., van den Engh, G., and Perry, M. J. (2007). In Situ Instrumentation. *Oceanography* 20, 70–78. doi:10.5670/oceanog.2007.50.
- Pedrós-Alio, C. (2012). The rare bacterial biosphere. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 4, 449–466. doi:10.1146/annurev-marine-120710-100948.
- Pelvé, E. A., Fontanez, K. M., and DeLong, E. F. (2017). Bacterial Succession on Sinking Particles in the Ocean's Interior. *Front. Microbiol.* 8, 2269. doi:10.3389/fmicb.2017.02269.

Bibliographie

- Peoples, L. M., and Bartlett, D. H. (2017). "Ecogenomics of deep-ocean microbial bathotypes," in *Microbial Ecology of Extreme Environments*, 7–50. doi:10.1007/978-3-319-51686-8_2.
- Peoples, L. M., Norenberg, M., Price, D., McGoldrick, M., Novotny, M., Bochdanský, A., et al. (2019). A full-ocean-depth rated modular lander and pressure-retaining sampler capable of collecting hadal-endemic microbes under in situ conditions. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 143, 50–57. doi:10.1016/j.dsr.2018.11.010.
- Pomeroy, L. R., Sheldon, J. E., Sheldon, W. M., Blanton, J. O., Amft, J., and Peters, F. (2000). Seasonal changes in microbial processes in estuarine and continental shelf waters of the South-eastern U.S.A. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51, 415–428. doi:10.1006/ecss.2000.0690.
- Posch, T. (2001). Precision of bacterioplankton biomass determination: a comparison of two fluorescent dyes, and of allometric and linear volume-to-carbon conversion factors. *Aquat. Microb. Ecol.* 25, 55–63. doi:10.3354/ame025055.
- Powley, H. R., Cappellen, P. Van, and Krom, M. D. (2017). "Nutrient Cycling in the Mediterranean Sea: The Key to Understanding How the Unique Marine Ecosystem Functions and Responds to Anthropogenic Pressures," in *Mediterranean Identities - Environment, Society, Culture* doi:10.5772/intechopen.70878.
- Powley, H. R., Krom, M. D., and Van Cappellen, P. (2016). Circulation and oxygen cycling in the Mediterranean Sea: Sensitivity to future climate change. *J. Geophys. Res. Ocean.* 121, 8230–8247. doi:10.1002/2016JC012224.
- Pradel, N., Ji, B., Gimenez, G., Talla, E., Lenoble, P., Garel, M., et al. (2013). The First Genomic and Proteomic Characterization of a Deep-Sea Sulfate Reducer: Insights into the Piezophilic Lifestyle of *Desulfovibrio piezophilus*. *PLoS One* 8, e55130. doi:10.1371/journal.pone.0055130.
- Preston, C. M., Harris, A., Ryan, J. P., Roman, B., Marin, R., Jensen, S., et al. (2011). Underwater Application of Quantitative PCR on an Ocean Mooring. *PLoS One* 6, e22522. doi:10.1371/journal.pone.0022522.
- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., et al. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 41, D590–D596. doi:10.1093/nar/gks1219.

Bibliographie

- Quéméneur, M., Erauso, G., Frouin, E., Zeghal, E., Vandecasteele, C., Ollivier, B., et al. (2019). Hydrostatic Pressure Helps to Cultivate an Original Anaerobic Bacterium From the Atlantis Massif Subseafloor (IODP Expedition 357): *Petrocella atlantisensis* gen. nov. sp. nov. *Front. Microbiol.* 10, 1497. doi:10.3389/fmicb.2019.01497.
- Qureshi, M., Kato, C., and Horikoshi, K. (1998). Purification of a ccb-type quinol oxidase specifically induced in a deep-sea barophilic bacterium, *Shewanella* sp. strain DB-172F. *Extremophiles* 2, 93–99. Available at: <http://link.springer.com/article/10.1007/s007920050047> [Accessed May 29, 2014].
- R Core Team (2008). R software. *R Found. Stat. Comput.* 739, 409. doi:10.1007/978-3-540-74686-7.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. *R Found. Stat. Comput. Vienna, Austria*.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. *R Found. Stat. Comput.*
- Ramírez-Guzmán, A., Taran, Y., and Armienta, M. A. (2004). Geochemistry and origin of high-pH thermal springs in the Pacific coast of Guerrero, Mexico. *Geofis. Int.* 43, 415–425. doi:10.1038/nmeth.f.303.
- Ramirez-Llodra, E., Brandt, A., Danovaro, R., De Mol, B., Escobar, E., German, C. R., et al. (2010). Deep, diverse and definitely different: Unique attributes of the world's largest ecosystem. *Biogeosciences* 7, 2851–2899. doi:10.5194/bg-7-2851-2010.
- Ravaux, J., Hamel, G., Zbinden, M., Tasiemski, A. A., Boutet, I., Léger, N., et al. (2013). Thermal Limit for Metazoan Life in Question: In Vivo Heat Tolerance of the Pompeii Worm. *PLoS One* 8, e64074. doi:10.1371/journal.pone.0064074.
- Reinthal, T., Aken, H. M. Van, and Herndl, G. J. (2013). Impact of water mass mixing on the biogeochemistry and microbiology of the Northeast Atlantic Deep Water. 27, 1151–1162. doi:10.1002/2013GB004634.
- Reinthal, T., and Herndl, G. J. (2005). Chapter 3 Seasonal dynamics of bacterial growth efficiencies in relation to phytoplankton in the southern North Sea 1. *North*, 7–16.

Bibliographie

- Repeta, D. J. (2015). "Chemical Characterization and Cycling of Dissolved Organic Matter," in *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter: Second Edition* (Elsevier Inc.), 21–63. doi:10.1016/B978-0-12-405940-5.00002-9.
- Repeta, D. J., and Aluwihare, L. I. (2006). Radiocarbon analysis of neutral sugars in high-molecular-weight dissolved organic carbon: Implications for organic carbon cycling. *Limnol. Oceanogr.* 51, 1045–1053. doi:10.4319/lo.2006.51.2.1045.
- Ribeiro, H., Martins, A., Gonçalves, M., Guedes, M., Tomasino, M. P., Dias, N., et al. (2019). Development of an autonomous biosampler to capture in situ aquatic microbiomes. *PLoS One* 14. doi:10.1371/journal.pone.0216882.
- Riou, V., Para, J., Garel, M., Guigue, C., Al Ali, B., Santinelli, C., et al. (2018). Biodegradation of *Emiliana huxleyi* aggregates by a natural Mediterranean prokaryotic community under increasing hydrostatic pressure. *Prog. Oceanogr.* 163, 271–281. doi:10.1016/j.pocean.2017.01.005.
- Robinson, C. (2019). Microbial Respiration, the Engine of Ocean Deoxygenation. *Front. Mar. Sci.* 5. doi:10.3389/fmars.2018.00533.
- Robison, B. (2004). Deep pelagic biology. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 300, 253–272. doi:10.1016/j.jembe.2004.01.012.
- Romera-Castillo, C., Álvarez, M., Pelegrí, J. L., Hansell, D. A., and Álvarez-Salgado, X. A. (2019). Net Additions of Recalcitrant Dissolved Organic Carbon in the Deep Atlantic Ocean. *Global Biogeochem. Cycles* 33. doi:10.1029/2018GB006162.
- Rotem, O., Pasternak, Z., and Jurkevitch, E. (2014). "The genus *bdellovibrio* and like organisms," in *The Prokaryotes: Deltaproteobacteria and Epsilonproteobacteria*, eds. E. Rosenberg, E. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt, and F. Thompson (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 3–17. doi:10.1007/978-3-642-39044-9_379.
- Salazar, G., Cornejo-Castillo, F. M., Benítez-Barrios, V., Fraile-Nuez, E., Álvarez-Salgado, X. A., Duarte, C. M., et al. (2016). Global diversity and biogeography of deep-sea pelagic prokaryotes. *ISME J.* 10, 596–608. doi:10.1038/ismej.2015.137.

Bibliographie

- Sanders, R., Henson, S. a., Koski, M., De La Rocha, C. L., Painter, S. C., Poulton, A. J., et al. (2014). The Biological Carbon Pump in the North Atlantic. *Prog. Oceanogr.* 129, 200–218. doi:10.1016/j.pocean.2014.05.005.
- Santinelli, C. (2015). "DOC in the Mediterranean Sea," in *Biogeochemistry of Marine Dissolved Organic Matter: Second Edition* (Elsevier Inc.), 579–608. doi:10.1016/B978-0-12-405940-5.00013-3.
- Santinelli, C., Follett, C., Retelletti Brogi, S., Xu, L., and Repeta, D. (2015). Carbon isotope measurements reveal unexpected cycling of dissolved organic matter in the deep Mediterranean Sea. *Mar. Chem.* 177, 267–277. doi:10.1016/j.marchem.2015.06.018.
- Santinelli, C., Hansell, D. A., and Ribera d'Alcalà, M. (2013). Influence of stratification on marine dissolved organic carbon (DOC) dynamics: The Mediterranean Sea case. *Prog. Oceanogr.* 119, 68–77. doi:10.1016/j.pocean.2013.06.001.
- Santinelli, C., Nannicini, L., and Seritti, A. (2010). DOC dynamics in the meso and bathypelagic layers of the Mediterranean Sea. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 57, 1446–1459. doi:10.1016/j.dsr2.2010.02.014.
- Sarmiento, J. L., and Gruber, N. (2013). Ocean biogeochemical dynamics. *Choice Rev. Online* 44, 44-2124-44–2124. doi:10.5860/choice.44-2124.
- Saw, J. H. W., Nunoura, T., Hirai, M., Takaki, Y., Parsons, R., Michelsen, M., et al. (2020). Pangenomics Analysis Reveals Diversification of Enzyme Families and Niche Specialization in Globally Abundant SAR202 Bacteria. *MBio* 11. doi:10.1128/mBio.02975-19.
- Schlitzer, R., Roether, W., Oster, H., Junghans, H.-G., Hausmann, M., Johannsen, H., et al. (1991). Chlorofluoromethane and oxygen in the Eastern Mediterranean. *Deep Sea Res. Part A. Oceanogr. Res. Pap.* 38, 1531–1551. doi:10.1016/0198-0149(91)90088-W.
- Scholin, C. A. (2010). What are "ecogenomic sensors?" A review and thoughts for the future. *Ocean Sci* 6, 51–60. doi:10.5194/osd-6-191-2009.
- Scholin, C., Jensen, S., Roman, B., Massion, E., Marin, R., Preston, C., et al. (2006). The Environmental Sample Processor (ESP) – An Autonomous Robotic Device for Detecting Microorganisms Remotely using Molecular Probe Technology. in *OCEANS 2006* (IEEE), 1–4. doi:10.1109/OCEANS.2006.306885.

Bibliographie

- Seber, G. A. ., and Wild, C. J. (2003). *Nonlinear Regression*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. Available at: <https://www.wiley.com/en-us/Nonlinear+Regression-p-9780471471356> [Accessed February 8, 2021].
- Sempéré, R., Yoro, S. C., Van Wambeke, F., and Charrière, B. (2000). Microbial decomposition of large organic particles in the northwestern Mediterranean Sea: An experimental approach. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 198, 61–72. doi:10.3354/meps198061.
- Severin, T., Sauret, C., Boutrif, M., Duhaut, T., Kessouri, F., Oriol, L., et al. (2016). Impact of an intense water column mixing (0-1500 m) on prokaryotic diversity and activities during an open-ocean convection event in the NW Mediterranean Sea. *Environ. Microbiol.* 18, 4378–4390. doi:10.1111/1462-2920.13324.
- Shillito, B., Gaill, F., and Ravaux, J. (2014). THE IPOCAMP PRESSURE INCUBATOR FOR DEEP-SEA FAUNA. *J. Mar. Sci. Technol.* 22, 97–102. doi:10.6119/JMST-013-0718-3.
- Shillito, B., Hamel, G., Duchi, C., Cottin, D., Sarrazin, J., Sarradin, P.-M., et al. (2008). Live capture of megafauna from 2300m depth, using a newly designed Pressurized Recovery Device. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 55, 881–889. doi:10.1016/j.dsr.2008.03.010.
- Siegel, D. A., Buesseler, K. O., Behrenfeld, M. J., Benitez-Nelson, C. R., Boss, E., Brzezinski, M. A., et al. (2016). Prediction of the Export and Fate of Global Ocean Net Primary Production: The EXPORTS Science Plan. *Front. Mar. Sci.* 3, 22. doi:10.3389/fmars.2016.00022.
- Silveira, C. B., and Thompson, F. (2014). “The family alcanivoraceae,” in *The Prokaryotes: Gammaproteobacteria* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 59–67. doi:10.1007/978-3-642-38922-1_369.
- Simon, M., and Azam, F. (1989). Protein content and protein synthesis rates of planktonic marine bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 51, 201–213. doi:10.3354/meps051201.
- Simon, M., Grossart, H., Schweitzer, B., and Ploug, H. (2002). Microbial ecology of organic aggregates in aquatic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* 28, 175–211. doi:10.3354/ame028175.
- Skoog, A., and Benner, R. (1997). Aldoses in various size fractions of marine organic matter: Implications for carbon cycling. *Limnol. Oceanogr.* 42, 1803–1813. doi:10.4319/lo.1997.42.8.1803.

Bibliographie

- Smith, D. C., Simon, M., Alldredge, A. L., and Azam, F. (1992). Intense hydrolytic enzyme activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature*. doi:10.1038/359139a0.
- Smith, K. L., Ruhl, H. A., Bett, B. J., Billett, D. S. M., Lampitt, R. S., and Kaufmann, R. S. (2009). Climate, carbon cycling, and deep-ocean ecosystems. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 19211–19218. doi:10.1073/pnas.0908322106.
- Sogin, M. L., Morrison, H. G., Huber, J. a, Mark Welch, D., Huse, S. M., Neal, P. R., et al. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 12115–20. doi:10.1073/pnas.0605127103.
- Sohrin, R., and Sempéré, R. (2005). Seasonal variation in total organic carbon in the northeast Atlantic in 2000–2001. *J. Geophys. Res. Ocean.* 110. doi:10.1029/2004JC002731@10.1002/(ISSN)2169-9291.POMME1.
- Stegen, J. C., Lin, X., Fredrickson, J. K., and Konopka, A. E. (2015). Estimating and mapping ecological processes influencing microbial community assembly. *Front. Microbiol.* 0, 370. doi:10.3389/FMICB.2015.00370.
- Stegen, J. C., Lin, X., Konopka, A. E., and Fredrickson, J. K. (2012). Stochastic and deterministic assembly processes in subsurface microbial communities. *ISME J.* 2012 69 6, 1653–1664. doi:10.1038/ismej.2012.22.
- Steinberg, D. K., Carlson, C. A., Bates, N. R., Goldthwait, S. A., Madin, L. P., and Michaels, A. F. (2000). Zooplankton vertical migration and the active transport of dissolved organic and inorganic carbon in the Sargasso Sea. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 47, 137–158. doi:10.1016/S0967-0637(99)00052-7.
- Steinberg, D. K., and Landry, M. R. (2017). Zooplankton and the Ocean Carbon Cycle. *Ann. Rev. Mar. Sci.* 9, 413–444. doi:10.1146/annurev-marine-010814-015924.
- Steinberg, D. K., Van Mooy, B. A. S., Buesseler, K. O., Boyd, P. W., Kobari, T., and Karl, D. M. (2008). Bacterial vs. zooplankton control of sinking particle flux in the ocean’s twilight zone. *Limnol. Oceanogr.* 53, 1327–1338.

Bibliographie

- Stief, P., Elvert, M., and Glud, R. N. (2021). Respiration by “marine snow” at high hydrostatic pressure: Insights from continuous oxygen measurements in a rotating pressure tank. *Limnol. Oceanogr.* n/a. doi:<https://doi.org/10.1002/lno.11791>.
- Stramma, L., Schmidtko, S., Levin, L. A., and Johnson, G. C. (2010). Ocean oxygen minima expansions and their biological impacts. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 57, 587–595. doi:10.1016/j.dsr.2010.01.005.
- Sulpis, O., Jeansson, E., Dinauer, A., Lauvset, S. K., and Middelburg, J. J. (2021). Calcium carbonate dissolution patterns in the ocean. *Nat. Geosci.*, 1–6. doi:10.1038/s41561-021-00743-y.
- Suroy, M., Panagiotopoulos, C., Boutorh, J., Goutx, M., and Moriceau, B. (2015). Degradation of diatom carbohydrates: A case study with N- and Si-stressed *Thalassiosira weissflogii*. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* 470, 1–11. doi:10.1016/j.jembe.2015.04.018.
- Tabor, P., and Colwell, R. (1976). Initial Investigations with a Deep Ocean In Situ Sampler. in *OCEANS '76* (Washington, DC, USA: IEEE), 324–327. doi:10.1109/OCEANS.1976.1154236.
- Tabor, P. S., Deming, J. W., Ohwada, K., Davis, H., Waxman, M., and Colwell, R. R. (1981). A pressure-retaining deep ocean sampler and transfer system for measurement of microbial activity in the deep sea. *Microb. Ecol.* 7, 51–65. doi:10.1007/BF02010478.
- Takai, K., Miyazaki, M., Hirayama, H., Nakagawa, S., Querellou, J., and Godfroy, A. (2009). Isolation and physiological characterization of two novel, piezophilic, thermophilic chemolithoautotrophs from a deep-sea hydrothermal vent chimney. *Environ. Microbiol.* 11, 1983–1997. doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01921.x.
- Tamburini, C. (2006). “Life under pressure,” in *Life as we know it*, ed. J. Seckbach (Springer), 1–17.
- Tamburini, C., Boutrif, M., Garel, M., Colwell, R. R., and Deming, J. W. (2013a). Prokaryotic responses to hydrostatic pressure in the ocean - a review. *Environ. Microbiol.* 15, 1262–1274. doi:10.1111/1462-2920.12084.
- Tamburini, C., Canals, M., Durrieu de Madron, X., Houpert, L., Lefèvre, D., Martini, S., et al. (2013b). Deep-Sea Bioluminescence Blooms after Dense Water Formation at the Ocean Surface. *PLoS One* 8, e67523. doi:10.1371/journal.pone.0067523.

Bibliographie

- Tamburini, C., Garcin, J., and Bianchi, A. (2003). Role of deep-sea bacteria in organic matter mineralization and adaptation to hydrostatic pressure conditions in the NW Mediterranean Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 32, 209–218. doi:10.3354/ame032209.
- Tamburini, C., Garcin, J., Grégori, G., Leblanc, K., Rimmelin, P., and Kirchman, D. L. (2006). Pressure effects on surface Mediterranean prokaryotes and biogenic silica dissolution during a diatom sinking experiment. *Aquat. Microb. ...* 43, 267–276. doi:10.3354/ame043267.
- Tamburini, C., Garcin, J., Ragot, M., and Bianchi, A. (2002). Biopolymer hydrolysis and bacterial production under ambient hydrostatic pressure through a 2000 m water column in the NW Mediterranean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 49, 2109–2123.
- Tamburini, C., Garel, M., Al Ali, B., Mérigot, B., Kriwy, P., Charrière, B., et al. (2009a). Distribution and activity of Bacteria and Archaea in the different water masses of the Tyrrhenian Sea. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 56, 700–712. doi:10.1016/j.dsr2.2008.07.021.
- Tamburini, C., Goutx, M., Guigue, C., Garel, M., Lefèvre, D., Charrière, B., et al. (2009b). Effects of hydrostatic pressure on microbial alteration of sinking fecal pellets. *Deep Sea Res. ...* 56, 1533–1546. doi:10.1016/j.dsr2.2008.12.035.
- Tang, Y., Gan, M., Xie, Y., Li, X., and Chen, L. (2014). Fast screening of bacterial suspension culture conditions on chips. *Lab Chip* 14, 1162–1167. doi:10.1039/c3lc51332g.
- Taylor, C. D., Edgcomb, V. P., Doherty, K. W., Engstrom, I., Shanahan, T., Pachiadaki, M. G., et al. (2015). Fixation filter, device for the rapid in situ preservation of particulate samples. *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 96, 69–79. doi:10.1016/j.dsr.2014.09.006.
- Teira, E., Lebaron, P., van Aken, H., and Herndl, G. J. (2006a). Distribution and activity of Bacteria and Archaea in the deep water masses of the North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 51, 2131–2144. doi:10.4319/lo.2006.51.5.2131.
- Teira, E., van Aken, H., Veth, C., and Herndl, G. J. (2006b). Archaeal uptake of enantiomeric amino acids in the meso- and bathypelagic waters of the North Atlantic. *Limnol. Oceanogr.* 51, 60–69. doi:10.4319/lo.2006.51.1.0060.

Bibliographie

- Testor, P., and Gascard, J.-C. (2006). Post-convection spreading phase in the Northwestern Mediterranean Sea. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 53, 869–893. doi:10.1016/J.DSR.2006.02.004.
- Tholosan, O., Garcin, J., and Bianchi, A. (1999). Effects of hydrostatic pressure on microbial activity through a 2000 m deep water column in the NW Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 183, 49–57.
- Tonon, L. A. C., Moreira, A. P. B., and Thompson, F. (2014). “The family Erythrobacteraceae,” in *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 213–235. doi:10.1007/978-3-642-30197-1_376.
- Tréguer, P., and Pondaven, P. (2000). Silica control of carbon dioxide. *Nature* 406, 358–359. doi:10.3109/09638288309166945.
- Turley, C. M. (1993). The effect of pressure on leucine and thymidine incorporation by free-living bacteria and by bacteria attached to sinking oceanic particles. *Deep Sea Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.* 40, 2193–2206. doi:10.1016/0967-0637(93)90098-N.
- Ullrich, S. (1974). *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*: Short generation-time marine bacteria. *Microb. Ecol.* 1, 127–135. doi:10.1007/BF02512384.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., et al. (2004). Environmental Genome Shotgun Sequencing of the Sargasso Sea. *Science* (80-.). 304, 66–74.
- Verhulst, P.-F. (1938). Notice sur la loi que la population suit dans son accroissement. *Quetelet* Quetelet 1, 113–121.
- Vezzi, A., Campanaro, S., D’Angelo, M., Simonato, F., Vitulo, N., Lauro, F. M., et al. (2005). Life at depth: *Photobacterium profundum* genome sequence and expression analysis. *Science* 307, 1459–61. doi:10.1126/science.1103341.
- Vidal, A. S.-, Pasqual, C., Kerhervé, P., Heussner, S., Calafat, A., Palanques, A., et al. (2009). Across margin export of organic matter by cascading events traced by stable isotopes, northwestern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 54, 1488–1500. doi:10.4319/lo.2009.54.5.1488.

Bibliographie

- Vital, M., Fuchslin, H. P., Hammes, F., and Egli, T. (2007). Growth of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa Eltor in freshwater. *Microbiology* 153, 1993–2001. doi:10.1099/mic.0.2006/005173-0.
- Wannicke, N., Frindte, K., Gust, G., Liskow, I., Wacker, A. 769, Meyer, A., et al. (2015a). Measuring bacterial activity and community composition at high hydrostatic pressure using a novel experimental approach: A pilot study. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–37.
- Wannicke, N., Frindte, K., Gust, G., Liskow, I., Wacker, A., Meyer, A., et al. (2015b). Measuring bacterial activity and community composition at high hydrostatic pressure using a novel experimental approach: A pilot study. *FEMS Microbiol. Ecol.* 91, 1–15. doi:10.1093/femsec/fiv036.
- Webb, C. O., Ackerly, D. D., McPeck, M. A., and Donoghue, M. J. (2002). Phylogenies and Community Ecology. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 33, 475–505. doi:10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150448.
- Whitman, W. B., Coleman, D. C., and Wiebe, W. J. (1998). Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6578–6583. doi:10.1073/pnas.95.12.6578.
- Wollast, R., and Chou, L. (1998). Distribution and fluxes of calcium carbonate along the continental margin in the Gulf of Biscay. *Aquat. Geochemistry* 4, 369–393. doi:10.1023/a:1009640432692.
- Wollast, R., and Chou, L. (2001). The carbon cycle at the ocean margin in the northern Gulf of Biscay. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 48, 3265–3293. doi:10.1016/S0967-0645(01)00040-6.
- Xu, X. W., Wu, M., and Oren, A. (2014). “The family Kordiimonadaceae,” in *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg), 307–312. doi:10.1007/978-3-642-30197-1_261.
- Xu, Y., Nogi, Y., Kato, C., Liang, Z., Rüger, H. J., De Kegel, D., et al. (2003). *Moritella profunda* sp. nov. and *Moritella abyssi* sp. nov., two psychropiezophilic organisms isolated from deep Atlantic sediments. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijss.0.02228-0.
- Yamahara, K. M., Preston, C. M., Birch, J., Walz, K., Marin, R., Jensen, S., et al. (2019). In situ autonomous acquisition and preservation of marine environmental dna using an autonomous underwater vehicle. *Front. Mar. Sci.* 6, 373. doi:10.3389/fmars.2019.00373.

Bibliographie

- Yayanos, A. A. (1995). Microbiology to 10,500 meters in the deep sea. *Annu. Rev. Microbiol. Review* 49, 777–805.
- Yayanos, A. A., Dietz, A. S., and Van Boxtel, R. (1981). Obligately barophilic bacterium from the Mariana trench. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78, 5212–5215. doi:10.1073/pnas.78.8.5212.
- Yayanos, A. A., Dietz, A. S., and Van Boxtel, R. (1982). Dependence of Reproduction Rate on Pressure as a Hallmark of Deep-Sea Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 1356–1361. doi:10.1128/aem.44.6.1356-1361.1982.
- Zabeti, N., Bonin, P., Volkman, J. K., Jameson, I. D., Guasco, S., and Rontani, J. F. (2010). Potential alteration of U 37K' paleothermometer due to selective degradation of alkenones by marine bacteria isolated from the haptophyte *Emiliania huxleyi*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 73, 83–94. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.00885.x.
- Zhang, Z., Wu, Y., and Zhang, X. H. (2018). Cultivation of microbes from the deep-sea environments. *Deep. Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 155, 34–43. doi:10.1016/j.dsr2.2017.07.008.
- ZoBell, C. E., and Anderson, D. Q. (1936). Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol. Bull.* 71, 324–342. doi:10.2307/1537438.
- ZoBell, C. E., and Johnson, F. H. (1949). THE INFLUENCE OF HYDROSTATIC PRESSURE ON THE GROWTH AND VIABILITY OF TERRESTRIAL AND MARINE BACTERIA. *J. Bacteriol.* 57, 179–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16561663> [Accessed April 14, 2019].
- ZoBell, C. E., and Morita, R. Y. (1959). DEEP-SEA BACTERIA. *Galathea report*.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., and van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348228>.

8 LISTE DES FIGURES

Figure 1-1 Distribution des différentes fractions de DOC dans la colonne d'eau est définie en fonction de leur réactivité dans une région de l'océan Atlantique et des régions de la mer Méditerranée. A) Distribution verticale des stocks de RDOC, SRDOC, et SLDOC et estimation de la concentration de DOC pour chaque fraction dans des eaux oligotrophiques stratifiées du Nord-Ouest de la mer des Sargasse. B) dans les eaux sud de la mer Tyrrhénienne (Novembre 2006, Janvier 2009, Aout 2010) de la C) dans les eaux de la mer Adriatique (Novembre 2006, Février 2008 et Juin 2008) période. SLDOC, semi-labile DOC; SRDOC, semi-refractory DOC; RDOC, refractory DOC (Hansell, 2013; Santinelli, 2015). 4

Figure 1-2 Panel non exhaustif de photographies ou schémas résumant 60 ans d'évolution technologique pour échantillonner le milieu profond en maintenant les conditions de pression *in situ*. 1) Photographie de l'autoclave hyperbare et pompe hydraulique manuelle utilisée par ZoBell et collaborateurs pour étudier l'impact de la pression hydrostatique sur les microorganismes marins (ZoBell and Morita, 1959); B) Système de prélèvement conservant les conditions environnementales de pression (Jannasch and Wirsén, 1973); C) Schéma du système de prélèvement isobare développé par Tabor et collaborateurs déployé à l'aide d'un treuil hydrologique (Tabor et al., 1981); D) Photographie du High Pressure Serial Sampler développé par Bianchi et al. (1999); E) HPSU monté sur un carrousel CTD Sea-Bird® durant la campagne PEACETIME décrit par Garel et al. (2019) dans le chapitre suivant, F) Schéma du Pressure Retaining Sampler et Lander développés par Peoples et al. (2019) pour étudier la diversité des microorganismes provenant des milieux très profond, tel que la fosse des Mariannes, dans les conditions *in situ*; G) Photographie de l'Isobaric Gas-Tight (IGT) sampler développé par McNichol et al. (2016) pour échantillonner les fluides provenant de sources hydrothermales en conservant les conditions de pression hydrostatique et d'anoxie. 8

Figure 1-3 Analyse de la diversité bêta (distance de Bray-Curtis) à l'aide du NMDS (« non metric multidimensional scaling ») issues des échantillons de la campagne MALASPINA. La fraction de taille est codée avec le style de points (carrés, attachés et cercles, vivant en liberté) et les bassins océaniques profonds suivant des codes de couleur (voir légendes). Les nombres proches de chaque échantillon représentent le numéro de la station. A noter que les bactéries attachées aux particules ont été obtenus après filtration séquentielle d'après Salazar et al., (2016). 10

Figure 1-4 Schéma conceptuel de la pompe biologique de carbone, modifié d'après Nayak and Twardowski (2020). Le carbone organique majoritairement produit en surface par le phytoplancton va subir par des processus biotique et abiotique des transformations qui vont entraîner son exportation, principalement sous forme particulaire (carbone organique particulaire, POC), fragmenté par l'activité des microorganismes attachés aux particules ou colonisant ces particules (« POM-DOM piezophilic microorganismes continuum (PDPMC) », Fang et al., 2015) puis séquestré dans l'océan profond principalement par l'activité microbienne (MPC theory, « Microbial Carbon Pump, Jiao et al, 2010). 15

Figure 1-5 Infographie représentant de manière schématique les impacts du changement climatique sur les zones méso- et bathypélagique. L'augmentation de la température de surface augmente la stratification des eaux de surface, limitant les échanges avec les eaux sous-jacentes. Par conséquent, le CO₂ s'accumulerait en surface provoquant l'acidification des eaux de surfaces. La matière organique produite en surface est principalement consommée par les communautés de surfaces ce qui diminue l'export vers les zones méso- et bathypélagique, donc diminuerait la séquestration du carbone. Enfin, le front thermique diminuerait la diffusion de l'oxygène vers les zones plus profondes modifiant la ventilation des eaux profondes (accroissement des zones à minimum d'oxygène – OMZ). La ligne en pointillé représente la stratification des eaux. Illustration réalisée par Vincent Garel. 20

Figure 2-1 (A) Cross section of the Titanium TA6V 500mL High Pressure Bottle (HPBs). (B) Schematic drawing of the front and back views of the High-Pressure Sample Unit (HPSU). 1. Top end-cap devoted to oxygen measurement; 2. 1/8" (3.2mm O.D.) Inlet flowthrough; 3. Sapphire window; 4. Main core; 5. PEEK floating-piston with lip seal; 6. Bottom end-cap. In the part, above floating-piston seawater sample is in contact with sapphire window (see details in the text). The part below the floating-piston contains sterile milliQ water which serve as hydraulic brakes when passing through the thin catheter into the exhaust tank (7); 8. Polypropylene main frame; 9. Push rod for attachment to a rosette system. When the (10) inlet-valve is opened by magnetically activated lanyard release, the seawater enters the hydraulic circuit through a 1/8" (3.2mm O.D.) stainless-steel tube (11), via one check valve (12), to fill in the HPB (13), the pressure accumulator (14), and the aero-hydraulic pressure sensor (15). 30

Figure 2-2(A) Photograph of four HPSUs mounted on a rosette system. In this example, four HPSUs are taking the place of 5 Niskin-bottles. (B) Plot of recorded data by pressure sensor during sampling. Dark-blue line is a sample from 3600 m-depth and dark-red is a sample from 3500 m-depth. Pressure sensor begins to record data when inlet valve of frame is open. Data is recorded during all the casts and stored in data logger. Recorded data are available on board to check quality of collected samples. 31

Figure 2-3 Transfer in equi-pressure mode. After sampling HPBs dedicated to sample (HPB 1) are connected at bottom end-cap to piloted pressure generator (PMHP 600-600) and at top end-cap to HPB dedicated to activity measurement or culture experiments (HPB 2), previously pressurized at the

working pressure. In the example, the PMHP 600-600 and the HPB2 are preconditioned to 30 MPa, the same hydrostatic pressure of the 3000 m-depth sample of the HPB1. During the transfer, the PMHP 600-600 prevents pressure loss by adding milliQ water at the working pressure into the lower part of HPB 1, the sample being isolated by the floating piston. The equivalent volume of the seawater sample enters HPB 2, which is managed by a handle valve at the bottom end-cap. Data is recorded during transfer in equi-pressure mode with a time-step of 10 s. The transfer takes about 2 minutes for a volume of 40 mL with an accuracy of less than 0.5 MPa. 34

Figure 2-4 Timeline of the incubation experiment. Deep-sea samples were recovered at 3000 m-depth and incubated at *in situ* pressure conditions (HP) or after decompression at atmospheric pressure conditions (DEC). Samples were firstly incubated at *in situ* temperature over 7 days. Then, the second incubation was made by transferring, in equi-pressure mode for each condition, 50 mL of the first incubated sample into a new high-pressure bottle (HPB) containing 450 mL of 0.2 µm-filtrated and sterilized seawater, sampled at the same depth. The remaining 450 mL of the first-incubated HPBs were then quickly sampled and conditioned for sequencing analysis (T₀ HP and T₀ DEC). At the end of the 2nd incubation, a third incubation was made according to the same protocol. At the end of each incubation the remaining 450 mL was conditioned for sequencing analysis and named T₁ HP/T₁ DEC and T₂ HP/ T₂ DEC, respectively. Dissolved-oxygen concentration was used to determine the incubation time. Graph plots represent dissolved-oxygen concentration (expressed in percent of initial dissolved-oxygen concentration) against time (h). 36

Figure 2-5 NMDS ordination plot (Bray–Curtis distance matrix) from incubation experiment performed with deep-seawater sample maintained at *in situ* condition (HP) and after decompression and incubated at atmospheric pressure (DEC). This graph shows two clusters: on one side the HP samples and on the other the DEC samples. Prefix D and R before the name for the sample is for DNA- or RNA-based sequences, respectively. The NMDS stress is equal to 0.03. 41

Figure 2-6 Bar plot of the ten most abundant families into the four main classes during incubation experiments of deep-seawater samples maintained at *in situ* pressure conditions (HP) and after decompression and incubated at atmospheric pressure conditions (DEC). 42

Figure 2-7 Chronologie de l'expérience d'incubation. Des échantillons d'eau profonde ont été récupérés à 3000 m de profondeur et incubés à des conditions de pression *in situ* (HP) ou après décompression à des conditions de pression atmosphérique (DEC). Les échantillons ont d'abord été incubés à la température *in situ* pendant 7 jours. Ensuite, la seconde incubation a été réalisée en transférant, en mode équipression pour chaque condition, 50 mL du premier échantillon incubé dans une nouvelle bouteille haute pression (HPB) contenant 450 mL d'eau de mer filtrée à 0,2 µm et stérilisée, échantillonnée à la même profondeur. Les 450 mL restants des HPB incubées en premier ont ensuite été rapidement échantillonnés et conditionnés pour l'analyse de séquençage (T₀ HP et T₀ DEC). Les incubations suivantes ont été faites selon le même protocole. La concentration d'oxygène dissous a été utilisée pour déterminer le temps d'incubation. Les graphiques représentent la concentration d'oxygène dissous (exprimée en pourcentage de la concentration initiale d'oxygène dissous) en fonction du temps (h). 53

Figure 2-8 Évolution de l'alpha-diversité au cours des différentes incubations mesurées à l'aide de l'indice de Simpson. Le préfixe D et R dans la légende graphique sont DNA et RNA, TI est pour l'échantillon initial prélevé à l'aide de la bouteille Niskin, HP sont pour les incubations maintenues dans les conditions *in situ* de pression hydrostatique et DEC sont pour les incubations décomprimées puis incubées à pression atmosphérique. 54

Figure 2-9 Graphique d'ordination du NMDS (matrice de distance Bray-Curtis) d'une expérience d'incubation réalisée avec un échantillon d'eau profonde maintenu à l'état *in situ* (HP) et après décompression et incubé à la pression atmosphérique (DEC). Ce graphique montre deux grappes : d'un côté les échantillons HP et de l'autre les échantillons DEC. Les préfixes D et R avant le nom de l'échantillon correspondent à des séquences à base d'ADN ou d'ARN, respectivement. Le stress du NMDS est égal à 0,09. 56

Figure 2-10 Diagramme à barres des quinze familles les plus abondantes dans les quatre classes principales pendant les expériences d'incubation d'échantillons d'eau profonde maintenus à des conditions de pression *in situ* (HP) et après décompression et incubés à des conditions de pression atmosphérique (DEC). 58

Figure 2-11 Évolution des familles dominantes dans les incubations maintenues dans les conditions *in situ* de pression. 60

Figure 3-1 Timeline of the HMW-DOC incubation experiment. Before use, high-pressure bottles (HPBs) were thoroughly cleaned as described in Garel et al. (2019). Two experiments were done during stratified (Strat.) and deep-water convection period (Conv.), see text for details. 72

Figure 3-2 Changes in DOC concentrations (A, C), cell biomass concentrations (B, D) in µMC over time (in days) during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.). Blue and black dots are observations respectively for HP and DEC incubations. Blue and black lines are predicted data by model and blue and grey variability bands are 95% confident intervals, respectively for HP and DEC incubations. 79

Figure 3-3 Bootstrapped (with 500 simulations) distribution of parameters estimated by Droop Model during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.) conditions maintained under *in situ* high pressure conditions without decompression of the sample (HP) and decompressed plus incubated at atmospheric pressure conditions (DEC). A) Growth rate (µ_{max}) for both conditions

in d-1; B) Degradation constant (k) in d-1; C) Minimum cell-quota (Qm) (a ratio between intracellular concentration of organic carbon and cellular biomass, dimensionless); and D) Concentration of recalcitrant (DOC_{rec}) in µMC on the timescales of the incubations. The horizontal lines are respectively, third quartiles, median and first quartiles. The whiskers correspond to the 95% of the confidence interval. 81

Figure 4-1 Schematic design of the sinking particles simulation (SINPAS) experiment. The objective of the present study was to investigate the effect of increasing hydrostatic pressure on the degradation of *Emiliania huxleyi* aggregates by NE Atlantic natural free-living prokaryotic assemblages collected at 105 m depth (PAP site). Using the particles sinking simulator system (PASS described in Tamburini et al., (2009b)), incubations were performed in duplicates for over 6 days under constant atmospheric pressure (ATM) or controlled increasing pressure conditions (HP) simulating a sinking rate of 150 m d⁻¹. Both ATM and HP conditions were submitted to a decrease in temperature mimicking profiles measured in situ by CTD (see plot temperature and pressure versus time). Global O₂ consumption was real-time monitored inside the high-pressure bottles using planar optodes via a sapphire window in both ATM and HP conditions. Three data sets were therefore obtained: initial time (T0), and after 6 days of incubation T6-HP and T6-ATM. The differences between T0 and T6-HP were due to the fate of *E. huxleyi* aggregates, the decrease in temperature, and the increase in hydrostatic pressure, those between T0 and T6-ATM were due to the fate of *E. huxleyi* aggregates and the decrease in temperature, and those between T6-HP and T6-ATM were due only to the increase in hydrostatic pressure.97

Figure 4-2 (A) Ratio of total carbohydrates (TCHO-C) versus total organic carbon (TOC) (left axis) and between particulate calcium and suspended matter (PCa/Susp.) expressed in nmol mg⁻¹ (right axis) initially (T0) and after 6 days of incubation under increasing pressure (T6-HP) or atmospheric pressure (T6-ATM) conditions. Error bars display the standard deviation of the duplicates in both incubation conditions. (B) Prokaryotic abundance initially (T0) and after 6 days of incubation at HP and ATM conditions. LNA (light gray) are cells with low nucleic acid content, HNA (dark gray) are cells with high nucleic acid content. Total cells correspond to the sum of LNA and HNA cells. Error bars display the standard deviation of the duplicates in both incubation conditions. (C) Real-time measurements of the total O₂ consumption under conditions of increasing pressure (HP, red line) and atmospheric conditions (ATM, blue line). Black lines correspond to the linear regression used to calculate oxygen consumption rates; HP: $-0.13 \pm 0.0005 \mu\text{M O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $R^2 = 0.90$; ATM: $-0.19 \pm 0.0005 \mu\text{M O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, $R^2 = 0.96$. 103

Figure 4-3 Relative abundance (%) of the most actively transcribed prokaryotes (>0.01% in average) initially (T0) and after 6 days of incubation under increasing pressure (T6-HP) and atmospheric pressure (T6-ATM) conditions. 110

Figure 4-4 Heatmap visualizing the Z-score distribution from the relative abundance of the dominant families (>0.5% in average) initially (T0) and after 6 days of incubation under increasing pressure (T6-HP) and atmospheric pressure (T6 ATM) conditions. Z-score is the number of standard deviations separating a raw score from the mean. For each sample, we calculated how far from the mean (of a family relative abundance considering all samples) is the family abundance score of the sample. A positive Z-score indicates the raw score is higher than the mean (red color), and a negative Z-score reveals the raw score is below the mean (blue color). The higher the Z-score, the more overrepresented the family is for the sample compared to the mean. The dendrogram clusters were calculated with the UPGMA method (unweighted pair group method with arithmetic mean) according to the Bray-Curtis similarity index. The boxplots in the right panel show the distribution of family relative abundances (in %) for all samples. 111

Figure 4-5 Principal Component Analysis (PCA) biplot of samples and the most contributing taxonomic families (based on fviz_contrib function of factoextra). Samples are indicated as yellow circles (ATM), green triangles (HP) or blue squares (T0) whereas taxonomic families are indicated as red vectors. The magnitude of red vectors indicates the strength of their contributions to each PCA axis. Vectors pointing in similar directions indicate positively correlated variables, vectors pointing in opposite directions indicate negatively correlated variables. The environmental variables were fitted as blue vectors (dashed lines) onto PCA using envfit function by calculating multiple regression with R² scores and p-values (top right of the Figure). 113

Figure 5-1 A) Schéma conceptuel d'une puce microfluidique pour étudier la production de biocarburant. Cette puce divisée en trois compartiments (une chambre de culture, une chambre d'incubation avec le marqueur fluorescent et la chambre d'incubation) reliées par de canaux. B) Photographie de la puce microfluidique rapportée à une pièce de monnaie mettant en exergue la miniaturisation du système réactionnel. D'après Kim et al. (2016). 123

Figure 5-2 Réseau de réacteurs microfluidiques programmables tirée de l'article de Leung et al. (2012). Les légendes des schéma A, B, C, D, E, F sont une traduction de la légende originale. (A) Schéma du dispositif montrant la structure d'une buse d'élution conçue pour s'interfacer avec des tubes microfuges standards pendant l'élution des chambres. (B) Réseau adressable de 95 chambres de stockage organisées en 19 rangées et 5 colonnes. Les couches de contrôle sont indiquées en rouge. L'actionnement du multiplexeur de rangées et des vannes de colonnes crée un chemin fluide unique (flèche verte) s'écoulant des ports de haute et de basse pression. (C) Géométrie de l'élément de stockage pour l'immobilisation et la coalescence des gouttelettes contrôlées par le flux. (1) Pendant le transport vers un élément de stockage adressé, un mince film d'huile lubrifiant empêche le mouillage des parois des canaux. (2) Les canaux latéraux créent une dérivation pour l'huile (flèches vertes), réduisant la vitesse des gouttelettes. (3i) En dessous de la vitesse d'écoulement critique, la gouttelette entre dans la chambre et se positionne à l'extrémité de la

chambre cylindrique. (3ii) Au-dessus de la vitesse d'écoulement critique, la gouttelette ne se positionnent pas à l'entrée mais se déplace dans la chambre et s'immobilise au plafond de la chambre. (D) Micrographie d'une gouttelette d'eau stockée de 2,7 nL. (E) Module de triage des cellules. (1) Une suspension monocellulaire est pompée dans le canal de triage. (2) La cellule est encapsulée dans une gouttelette pour être transportée vers l'arrière de la chambre. (F) Module de dosage des réactifs. G Photographie d'une buse d'élution montée sur un bras articulé 3 axes. 124

Figure 6-1 Jeux de données utilisées pour comparer l'estimation du taux de croissance par régression linéaire utilisée dans l'application logistic_microbio et par régression linéaire après transformation de y en log, utilisée classiquement en microbiologie. 134

Figure 6-2 Accueil de l'application. Sur cet onglet, l'utilisateur télécharge son jeu de données, en indiquant s'il y a une légende, le type de séparateur (virgule, point-virgule, tabulation), le type de décimal (virgule ou point), donne le titre de chaque axe. 136

Figure 6-3 Onglet « Uploaded data » : représentation des données sous forme de tableau. Ici les données sont des valeurs de densités optiques (DO à 600nm) en triplicata (TE_0.1_A à C) en fonction du temps. 136

Figure 6-4 Onglet « Plot » : représentation graphique des données sous forme d'un nuage de point. La courbe noire représente le modèle, les courbes en pointillé bleues représentent l'enveloppe 1^{er} et 3^{ème} quartile, et les courbes en points bleues représentent l'enveloppe de l'intervalle de confiance à 95 %. 137

Figure 6-5 Représentation en contour-plot 2D de la minimisation de la somme résiduelles des carrés. Le point vert représente les coordonnées des paramètres estimés ($\mu_{\max}$ et K) 137

Figure 6-6 Distribution de l'estimation de $\mu_{\max}$ pour les 1000 simulations pour chaque courbe. La barre noire représente la valeur médiane. Les box plots gris représentent la distribution des $\mu_{\max}$ estimés par régression non-linéaire et les box plots blancs représentent $\mu_{\max}$ estimés par régression linéaire dans la phase exponentielle après linéarisation des données. 139

Figure 6-7 Courbes de croissance *Shewanella putrefaciens* MR-1 issue de Duane and Moser (1996). A) Les données de biomasse sont représentées au cours du temps. La courbe noire représente la courbe théorique. Les courbes en tiret sont les 1^{er} et 3^{ème} quartile et les courbes en pointillés sont les intervalles de confiance à 95%. B) Les données de biomasse sont transformées en log et représentées au cours du temps. Le droite rouge, verte et bleue sont des droites possibles pour calculer le taux de croissances. 142

Supplementary Figure 2-1 Top end cap with optic measurement. 1) Optic fiber, 2) Temperature sensor (pt100), 3) Inlet/outlet 1/8" diameter (3.2 mm O.D.), 4) O'ring, 5) Planar optode (diameter 5mm), 6) Sapphire window, 7) Titanium screw. 46

Supplementary Figure 2-2 Schematic drawing of sampling valve fitted on HPSU. 1. Nylon wire; 2. Stainless steel trigger; 3. Stainless steel frame for valve; 4. Modified swagelock valve (réf : SS-84PS4); 5. Modified handle to link trigger at spring; 6. sample inlet, 7. spring. In this view sampling valve is set in close position before sampling (A). At the sampling depth nylon wire is disconnected to carousel trigger, modified Swagelock® valve move to opening position performing a quarter of a rotation by power of the extended spring (B). 47

Supplementary Figure 2-3 Photograph showing different point of view of MIO-HPLab. This mobile laboratory has been constructed in a 20 feet container. It is composed of two piloted pressure generators, four temperature regulated water baths with two temperature coolers dedicated for HPSU and PASS experiments (Tamburini et al., 2009), and a reinforced Peltier-cooled incubator Memmert IPP 750 oven for HPBs incubation. The mobile laboratory (MIO-HPLab) is also certified to use radiolabeled during oceanographic cruises. 48

Supplementary Figure 2-4 An animated diagram showing a transfer in equi-pressure mode between two HPBs. HPB1 is the high-pressure bottle containing the 3000 m-depth sample maintained under in situ pressure conditions. HPB2 is the high-pressure bottle containing radiolabeled compounds, such as, 3H-Leucine to measure prokaryotic heterotrophic production. Forty milliliters of 3000 m-depth seawater sample from HPB1 are transferred into HPB2 containing 10nM of aqueous 3H-Leucine. This process is performed, securely, in replicate inside the mobile MIO-HPLab. 49

Supplementary Figure 2-5 RNA:DNA ratios from RNA-based and DNA-based relative log transformed abundance of OTU. This ratio enables us to estimate a proportion of active prokaryote for each sample. The black line is 1:1 bar. OTU are distributed around the line which indicates that the microbial communities identified in the sample are also active. 50

Supplementary Figure 2-6 Animated schematic drawing in transparency of the front and back views of the High-Pressure Sample Unit (HPSU). A) During the descent of the CTD-carousel. The inlet

valve is in close position; B) During the sampling at the chosen depth after firing the CTD-Carousel and the inlet valve is in open position. The numbers are the same than in figure 1: 7. exhaust tank; 8. Polypropylene main frame; 9. Push rod for attachment to a rosette system. When the (10) inlet valve is opened by magnetically activated lanyard release, the seawater enters the hydraulic circuit through a 1/8" (3.2 mm O.D.) stainless-steel tube (11), via one check valve (12), to fill in the HPB (13), the pressure accumulator (14) and the aero-hydraulic pressure sensor (15).

9 LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1-1 Volume et profondeurs des océans selon Sarmiento and Gruber (2013) 1

Tableau 1-2 Tableau des caractéristiques du carbone organique dissous : labile, semi-labile, semi-réfractaire, réfractaire et ultra-réfractaire dans l'Océan. DCAA : dissolved combined amino-acid ; DCNS : dissolved combined neutral sugar ; APS : acyl heteropolysaccharides ; modifié d'après Nagata, (2008).3

Tableau 2-1 Total cells count (stained with DAPI), range of prokaryotic respiration, number of observed operational taxonomic units (OTUs), 647 16S-rDNA- and 16S-rRNA-based sequence lengths, and alpha-diversity indexes for enrichment incubation experiments (Figure 2-4). 40

Tableau 2-2 Abondance relative des 15 familles les plus abondantes provenant du séquençage du gène codant pour l'ARN 16S (DNA), des transcrits (RNA) 59

Tableau 3-1 Raw data of DOC concentrations before normalization, DAPI-counts, biovolume and sugars relative abundance during incubation experiments during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.) conditions. The contribution of the dissolved combined neutral sugars (DCNS) to the dissolved organic carbon (DOC) pool is also given. Abbreviations: Fuc.: Fucose, Rha.: Rhamnose., Ara.: Arabinose., GlcN.: Glucosamine, Gal.: Galactose, Glc.: Glucose, Man.: Mannose, Xyl.: Xylose. HP: samples maintained under in situ high pressure condition without decompression; DEC: sampled decompressed and incubated at atmospheric pressure (DEC). 78

Tableau 3-2 Parameters estimated by cell-quota model and bootstrapped variance and median during stratified period (Strat.) and deep-water mass convection period (Conv.) conditions. μ_{max} is the growth rate in d⁻¹; k is the degradation rate in d⁻¹; Q_m is the minimum cell-quota (a ratio between intracellular concentration of organic carbon and cellular biomass, dimensionless); DOC_{rec} is the quantity of residual HMW-DOC in μ MC. HP: samples maintained under in situ high pressure conditions without decompression; DEC: samples decompressed and incubated at atmospheric pressure conditions (DEC). 83

Tableau 4-1 Main results from literature reporting similar experiments performed with surface prokaryotic community 105

Tableau 4-2 Data quality trimming and alpha diversity indices. The columns of Table 4.1 indicate the number of reads retained after each processing step of DADA2 from the initial raw data (Input). "Filtered" column corresponds to the removal of bad quality reads, "Denoised" corresponds to the correction of sequencing errors, "Merged" are assembled reads and "Non chimeric" are not artefact sequences. The "Final retained" column is the read proportion conserved for downstream analyses. The "global richness" (which corresponds to the number of observed amplicon sequence variants—ASVs), Shannon, Chao1, and PD (phylogenetic diversity) columns provide alpha diversity indices calculated for each sample. 108

Tableau 6-1 Résumé statistique des taux de croissance par méthode de régression non-linéaire et régression linéaire obtenue après 1000 simulations en bootstrap. Dans ce tableau se trouve le taux de croissance minimum, le 1^{er} quartile, la médiane, la moyenne, et le 3^{ème} quartile et le maximum. Le paramètre n est le nombre de points utilisés pour chaque méthode pour l'estimation du taux de croissance et le nombre des simulations n'ayant abouti à aucune estimation (Nombre NA). 138

Tableau 6-2 Estimation des paramètres de croissance de 17 souches microbiennes par régression non linéaire et régression linéaire. μ_{max} est le taux maximal de croissance, sd est l'écart-type de chaque paramètre estimé, et K est la densité maximum de population. 141

