

**UFR SCIENCES & TECHNIQUES COTE
BASQUE**

Université de Pau et des Pays de l'Adour
Licence Biologie des Organismes



*Importance des facteurs physiques versus les facteurs chimiques et
hiérarchie de ces facteurs, sur le déclenchement du développement
printanier des communautés phytoplanctoniques de la lagune de
Thau*

Garand Pauline

Stage effectué du 07.03.2016 au 29.07.2016 au laboratoire MARBEC

Station marine de l'Université de Montpellier

2, rue des chantiers, 34200, Sète

Sous la direction scientifique de M. Éric Fouilland et Mme Emilie Le Floc'h



« Le présent rapport constitue un exercice pédagogique qui ne peut en aucun cas engager la responsabilité de l'entreprise ou du laboratoire d'accueil »

Résumé

Du 07/03/2016 au 29/07/2016, j'ai eu l'opportunité de réaliser un stage de fin d'année d'étude au laboratoire MARBEC (Marine Biodiversity, Exploitation & Conservation) et à la station marine de l'Université de Montpellier à Sète

Le stage réalisé dans le cadre du projet PHOTO-PHYTO, visait à déterminer l'importance des facteurs physiques (température et lumière) versus les facteurs chimiques (présence de nutriments et de vitamines B12), et la hiérarchie de ces facteurs sur le déclenchement du développement printanier des communautés phytoplanctoniques de la lagune de Thau.

Les différents résultats obtenus ont pu apporter quelques éléments de réponse. Effectivement, les analyses de fluorescence de la chlorophylle a, les analyses par cytométrie en flux sur l'abondance bactérienne et phytoplanctonique et les analyses d'extraction de cobalamine ont montré que le développement du phytoplancton se fait lorsque des conditions précises sont réunies.

L'apport du milieu en sels nutritifs (azote, phosphore...) doit être suffisant. La cobalamine ou B₁₂ quant à elle, n'est pas un déclencheur de la production algale, mais plutôt un cofacteur de croissance. La température, elle, a un effet positif sur l'initiation du bloom phytoplanctonique, au contraire de la lumière qui, elle, a un effet négatif (phot inhibition à court-terme).

Mots clefs: Bactérie, Bloom, Cobalamine (B₁₂), Cytométrie en flux, Phytoplancton, Sels nutritifs

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier le Dr. Jean-Claude Salvado, directeur de la licence Biologie des organismes à Montauray, de m'avoir laissé l'opportunité de réaliser ce stage professionnel avec une durée plus longue que celle autorisée. Ce fut un stage vraiment intéressant et enrichissant, tant professionnellement qu'humainement. Un grand merci à vous pour cela.

Pour leur entière implication dans le bon déroulement de mon stage, je tiens tout particulièrement à remercier le Dr. Éric Fouilland et le Dr. Emilie Le Floc'h, mes deux directeurs de stage. Leurs réponses, aides, questions, conseils et surtout leurs disponibilités m'auront été indispensables pendant ces 5 mois de stage. Ce fut un réel plaisir de travailler dans la bonne humeur avec un fort enthousiasme avec vous. Ce fut très bénéfique et enrichissant pour moi. Merci beaucoup de la confiance accordée.

Je voudrais également remercier le Dr. Christophe Leboulanger, les Dr. Sébastien Màs et David Parin, qui m'ont apporté leur aide et leurs compétences dans leur domaine, les formations suivies dans la maîtrise de différents appareils m'auront permis de progresser durant ces 5 mois.

Mes remerciements vont également à Elodie, Diane et Jean-François, pour avoir répondu à diverses questions. Un grand merci Rémi et Cathy qui ont bien voulu me montrer et me consacrer du temps pour l'exploration dans leur domaine professionnel en aquaculture et génétique.

Enfin je remercie Emmanuel et Caroline, mes deux camarades de stage.

Un grand merci à vous tous, vous m'avez permis de m'épanouir durant ces 5 mois de stage.

Présentation de la structure d'accueil

Afin de finaliser la licence BIOLOGIE DES ORGANISMES proposée par l'université de Pau et des pays de l'Adour, j'ai eu l'opportunité de réaliser un stage de fin d'année d'étude, durant une période d'environ 5 mois, au laboratoire MARBEC (Marine Biodiversity, Exploitation & Conservation) et à la station marine de l'Université de Montpellier à Sète.

Fondée en 1879 par Armand Sabatier, au même moment que les grandes stations marines de Roscoff, Banyuls, Villefranche ou Monaco, la station marine de Sète sert, depuis l'origine, de point d'appui aux recherches, à l'observation et à l'enseignement dans le domaine de la biologie marine. Pour ce faire, elle dispose d'une halle d'expérimentation en eau de mer, d'un bateau, d'un local plongé, de laboratoires secs et humides, de chambres pour l'hébergement des étudiants, et de locaux dédiés aux activités pédagogiques. Elle accueille des équipes de recherche telles que certains membres de l'UMR MARBEC. Elle constitue actuellement une plateforme de l'OSU OREME.

L'UMR MARBEC est une nouvelle unité mixte de recherche qui est née en Languedoc Roussillon, le 1er janvier 2015, par la fusion de deux Unités Mixtes de Recherche : l'UMR ECOSYM et l'UMR EME et de deux laboratoires Ifremer, le laboratoire LER-LR de Sète et le laboratoire BOME de Palavas.

Ainsi, l'UM, le CNRS, l'IRD et l'Ifremer unissent leurs forces sur Sète, Palavas et Montpellier pour aborder l'étude de la biodiversité marine, ainsi que ses usages et sa conservation.

Cette nouvelle unité mixte de recherche comprend 133 agents permanents et 97 agents non permanents. Les activités de recherche y sont organisées autour de 8 thèmes (Figure 1) qui visent à répondre aux trois objectifs principaux de recherches de l'unité MARBEC que sont :

- Décrire la biodiversité marine, comprendre sa dynamique et le fonctionnement des écosystèmes marins
- Analyser l'impact des pressions anthropiques sur ces écosystèmes et développer des scénarios de réponses au changement global
- Concilier exploitation (en particulier pêche et aquaculture) et conservation, et répondre aux attentes sociétales (expertise, innovation, remédiation).

Durant ces 5 mois de stage, j'ai travaillé au sein du thème « Micro-organisme et interactions avec les macro-organismes » où j'ai pu contribuer au projet ANR - PHOTO-PHYTO « Effet du réchauffement climatique sur le déclenchement du bloom phytoplanctonique : photopériodisme, composition et adaptation », financé par l'agence nationale de recherche.

L'objectif du projet PHOTO-PHYTO est d'étudier le rôle et la hiérarchie des facteurs environnementaux fluctuants, tels que la température et les processus cellulaires intrinsèques, comme l'horloge circadienne (photopériodisme) dans le déclenchement printanier du bloom phytoplanctonique. Autrement dit, ce projet a pour but d'étudier les effets directs de la température et de la lumière sur la physiologie et la croissance du phytoplancton, mais aussi leurs effets indirects sur le phytoplancton (interactions biologiques telles que les relations proies/prédateurs ou la synergie entre les bactéries et le phytoplancton).

Les zones d'études se situent d'une part dans un écosystème côtier aux échanges restreints avec la mer, et d'autre part dans un écosystème marin côtier ouvert, respectivement l'étang de Thau et la baie de Banyuls sur mer.

Ce projet se déroule sur soixante mois, amorcé à partir d'octobre 2014, et vise à répondre à quatre questions principales :

- Quels sont les principaux facteurs in situ contrôlant les blooms phytoplanctoniques printaniers ?
- Comment la température et la photopériode interagissent-elles pour déclencher les blooms printaniers ?
- L'adaptation au réchauffement affecte-t-elle le photopériodisme et les interactions trophiques ?
- Quel est l'effet du réchauffement sur les communautés microbiennes naturelles ?

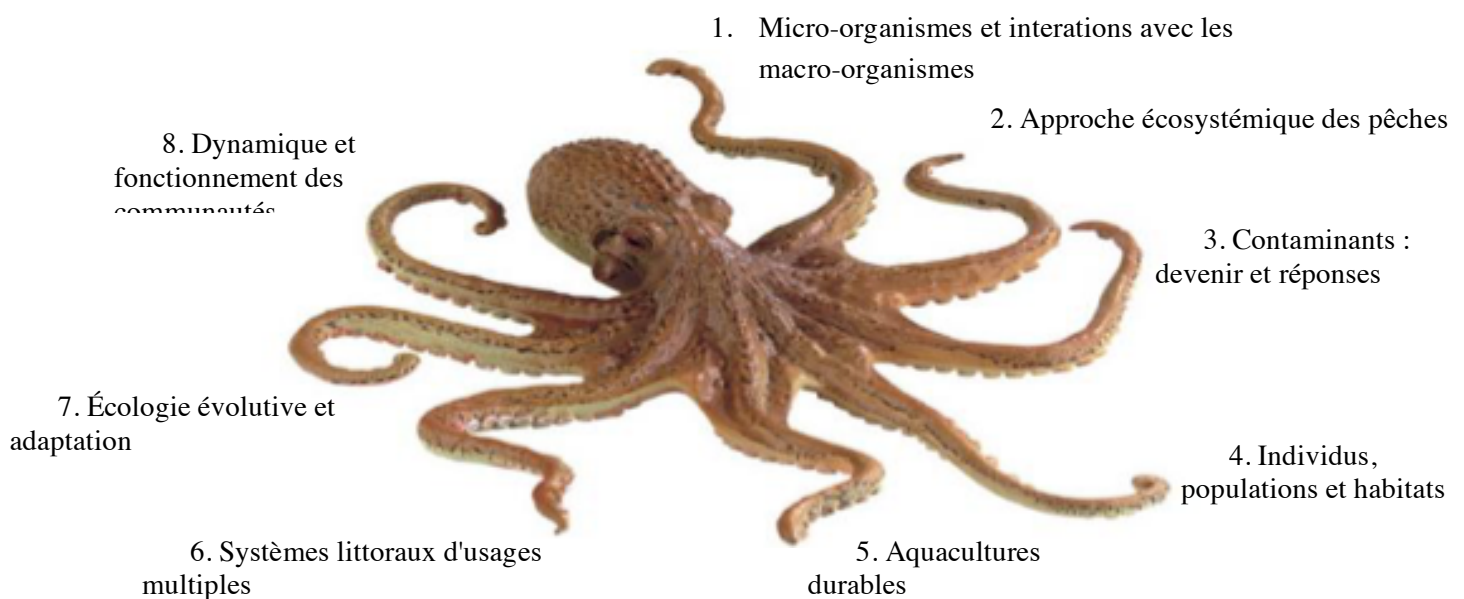


Figure 1 : Schéma représentant les 8 thèmes de recherche de l'unité MARBEC

Table des matières

Introduction.....	1
Matériel & Méthodes.....	3
1. Présentation du site d'échantillonnage : l'étang de Thau	3
2. Echantillonnage des communautés naturelles	3
3. Traitements expérimentaux en microcosme de laboratoire.....	4
4. Analyse de la biomasse (F0) et de l'activité photosynthétique (Fv/Fm) des communautés phytoplanctoniques par fluorescence	5
5. Suivi de l'abondance des bactéries hétérotrophes, des cyanobactéries, du pico et nano phytoplancton	6
6. Suivi et dosage de la COBALAMINE (B ₁₂)	7
6.1. Préparation de l'échantillon	7
6.2. Pré-concentration et extraction de la cobalamine sur une colonne	7
6.3. Evaporation du méthanol	8
6.4. Dosage de la cobalamine avec un test ELISA (Annexe 4)	8
7. Analyses statistiques	9
Résultats & Discussions.....	10
1. Conditions initiales des différents paramètres (température, Chl a, salinité, B ₁₂ , photopériode) au début de chaque incubation	10
2. Importance de l'azote, du phosphore, de la B ₁₂ , de la lumière et de la température sur la fluorescence du phytoplancton.....	11
3. Effet de la température, de la lumière et des nutriments sur l'abondance des communautés microbiennes	16
3.1. Contributions des différents groupes microbiens	16
3.3. Taux de croissance des communautés microbiennes	23
Conclusion	26
Références bibliographiques	27
Annexes	
Annexe 1 : Protocole FIRE (Fluorescence induction relaxation system).....	
Annexe 2 : Protocole de cytométrie	
Annexe 3 : Extraction de la cobalamine	
Annexe 4 : Dosage de la cobalamine	
Annexe 5 : Cumulés de l'abondance des populations microbiennes durant l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16.....	
1. Populations phytoplanctonique	
2. Populations bactériennes.....	

Introduction

Le réseau microbien des écosystèmes pélagiques est composé de deux grandes catégories de micro-organismes qui se distinguent en fonction de leur mode d'acquisition du carbone. Il y a les autotrophes (phytoplancton) qui utilisent le CO₂ et l'énergie lumineuse pour leur croissance, et les hétérotrophes (bactérioplancton, protozooplancton) qui consomment le carbone organique pour leur croissance. Ces micro-organismes sont en interaction entre eux et avec leur environnement, mais aussi avec les macroorganismes de niveaux trophiques supérieurs comme le métazooplancton à travers la prédation (Mostajir *et al.* 2015). Certains organismes sont également mixotrophes, c'est-à-dire qu'ils se nourrissent soit par autotrophie ou par hétérotrophie en fonction de la disponibilité de la ressource, ou soit par ces deux modes à la fois.

Le phytoplancton représente l'ensemble des cyanobactéries et microalgues (végétaux microscopiques) pélagiques présentes dans les eaux de surface et dérivant au gré des courants. Il est à la base de la chaîne alimentaire (responsable de plus de la moitié de la production primaire nette du globe, Rousseaux et Watson. 2013), et joue un rôle essentiel dans les réseaux trophiques, et dans les cycles biogéochimiques, notamment en fixant le carbone (Carpenter.1988).

Le réchauffement des océans est censé être le principal facteur contribuant aux changements observés récemment dans la biomasse globale du phytoplancton (Vidussi *et al* 2011). Généralement, l'abondance du phytoplancton croît considérablement entre l'hiver et le printemps. En effet, dans les écosystèmes marins des régions tempérées, le passage de l'hiver au printemps est marqué par un changement de l'ensoleillement (intensité et photopériode), et une hausse de température. Ces changements reflètent les conditions idéales pour initier l'efflorescence du phytoplancton. Cette efflorescence est qualifiée de « bloom ». Les blooms phytoplanctoniques peuvent résulter non seulement d'une modification de paramètres environnementaux (augmentation de la température), mais également d'un changement des équilibres qui existent entre les micro-organismes qui sont liés par des interactions complexes. Plusieurs années d'observations ont été réalisées dans deux écosystèmes côtiers méditerranéens : l'étang de Thau, un écosystème côtier relativement fermé, et la baie de Banyuls qui est directement ouverte sur la méditerranée. Leurs conclusions ont révélé que ce bloom phytoplanctonique printanier résulterait vraisemblablement d'une association de paramètres physiques (augmentation de la température et de la lumière), chimiques (présence de nutriments), et écologiques (présence de bactéries probiotiques produisant des vitamines nécessaires au phytoplancton et peu de prédateurs).

Dans le contexte du réchauffement climatique, il est intéressant de déterminer comment les communautés phytoplanctoniques réagissent et s'adaptent face à l'augmentation de la température et à l'allongement des journées, (car la vie de la plupart des organismes est fortement influencée par la photopériode), bien que l'allongement des journées ne soit pas lié au changement climatique. De nombreuses études montrent que le développement phytoplanctonique avance de 0.3 jours/décade dans la mer du Nord et de 2-3 mois au cours des 15 dernières années dans l'Océan Atlantique (Henson *et al* 2013). Des expérimentations en mésocosmes démontrent également qu'une augmentation de la température de l'eau de quelques degrés influence les communautés planctoniques ainsi que leurs interactions, et cela

peut se traduire par l'avancement du déclenchement du bloom phytoplanctonique (Vidussi *et al* 2011, Fouilland *et al* 2013). Dans les écosystèmes marins méditerranéens, le réchauffement climatique se traduit régionalement par une augmentation de la température de l'eau de surface d'environ 1.1°C depuis les 35 dernières années (Calvo *et al* 2011). Par ailleurs, dans les systèmes côtiers peu profonds, il apparaît que la lumière et la température sont des facteurs physiques majeurs expliquant le déclenchement du bloom (Winder et Cloern. 2010). Ainsi, il est suggéré que la période du déclenchement du bloom phytoplanctonique est directement impactée par le changement climatique

Toutefois, il a également été démontré qu'il existerait un couplage fort entre les bactéries hétérotrophes et la communauté phytoplanctonique en début de développement de bloom (Fouilland *et al* 2014). Ce couplage pourrait être lié à la production bactérienne de vitamines nécessaires à la croissance du phytoplancton, mais qu'il ne peut synthétiser lui-même, telles que les vitamines B₁₂, ou des dérivés de ces dernières (Helliwell *et al* 2016). En contrepartie, le phytoplancton sécrète de la matière organique assimilable, qui peut être ensuite directement utilisable par les bactéries pour leur croissance.

L'objectif du stage est donc de déterminer l'importance des facteurs physiques (température et lumière) versus les facteurs chimiques (présence de nutriments et de vitamines B₁₂), et la hiérarchie de ces facteurs, sur le déclenchement du développement printanier des communautés phytoplanctoniques de la lagune de Thau. Ainsi, plusieurs questions sont posées :

- Le développement des algues au printemps se fait lorsque la température augmente **ou** lorsque la photopériode augmente ?
- Le développement des algues au printemps se fait lorsque la température **et** la lumière augmentent ? ou d'abord la température **puis** la lumière ? ou d'abord la lumière **puis** la température ?
- Le développement des algues au printemps se fait lorsque la quantité en nutriment et en vitamine B₁₂ augmente ?

L'expérience scientifique réalisée consistera à mettre les communautés naturelles hivernales et printanières en présence d'un ou de plusieurs facteurs testés en laboratoire (température, lumière, nutriments, B₁₂) et de suivre la croissance des communautés phytoplanctoniques et bactériennes à travers des outils de détection des densités de cellules (cytométrie en flux) et d'activité (fluorescence des pigments), ainsi que la diversité des communautés et des éléments nutritifs (ammonium, phosphate et vitamines B₁₂).

Matériel & Méthodes

1. Présentation du site d'échantillonnage : l'étang de Thau

L'étude s'est réalisée aux abords de l'étang de Thau, situé à proximité de la station marine de l'Université de Montpellier à Sète. Il s'agit d'une des plus grandes lagunes du Languedoc, couvrant une superficie voisine de 7.500 hectares (19 km de longueur et 5 km de largeur). D'origine tectonique et sédimentaire, cette lagune est la plus profonde des lagunes du littoral méditerranéen avec une profondeur en moyenne de 4.5m. La température de l'eau varie de 0°C et + 24°C (Marchanf *et al.* 1986) L'eau de l'étang est bien oxygénée, et la salinité (35‰) évolue au cours de l'année (33‰ de février à juin et plus de 38‰ de juillet à janvier). L'azote et le phosphore, deux éléments indispensables à la croissance du phytoplancton, sont maintenant en concentration limitante, comme la mer méditerranée, du fait de la réduction des apports en azote et phosphore du bassin versant, via l'amélioration de l'épuration des eaux usées urbaines.

Toutes ces caractéristiques réunies lui confèrent une biodiversité importante :
Les végétaux de l'étang peuvent être divisés en 3 groupes :

- Le phytoplancton ou plancton végétal, constitué d'algues microscopiques, on y trouve aussi des diatomées. (Marchanf *et al.* 1986)
- Les algues supérieures, macroalgues. (Marchanf *et al.* 1986)
- Les plantes à fleurs constituées essentiellement de zostères. (Marchanf *et al.* 1986)

Les animaux marins ou littoraux montrent une diversité importante également ; nous ne rentrerons pas dans les détails à ce sujet, mais à savoir qu'il y a de nombreux protozoaires, crustacés, mollusques, poissons...

2. Echantillonnage des communautés naturelles

La station marine de Sète, accueillant l'équipe de la plateforme MEDIMEER, est devenue une plateforme de l'OSU-OREME depuis janvier 2015. Afin de suivre la variation physico-chimique et biologique de la lagune au cours du passage de l'hiver au printemps, des capteurs ont été installés sur un ponton appartenant à MEDIMEER. C'est depuis ce ponton que les prélèvements ont été effectués afin de suivre le bloom printanier. L'échantillonnage de notre étude s'est effectué en début de semaine généralement (lundi/mardi ou mercredi).

Pour cette étude, 4 échantillons d'eau de mer ont été prélevés pendant une période de prébloom printanier se faisant du 02/02/2016 au 21/03/2016. L'ensemble de la communauté microbienne, constituée par des micro algues, bactéries, pico et nanoflagellés hétérotrophes, a été échantillonnée dans la lagune de Thau pendant des conditions de préfloraison. Pour cela, l'eau de la lagune a été prélevée à un mètre de profondeur en utilisant une bouteille Niskin de 10L et transvasée dans deux bidons en polycarbonate de 20L. Cette communauté naturelle a été filtrée à travers 40 μ m pour éliminer la plupart des grands prédateurs et a été diluée à 90%

avec de l'eau de mer filtrée à 0,2 μm juste avant de commencer les incubations expérimentales. Cette dilution supplémentaire permet de limiter l'activité de prédation des micro-brouteurs en début d'incubation.

Chacune des communautés naturelles a subi ensuite différents traitements expérimentaux, tels que décrits dans la partie suivante (Tableau 1)

3. Traitements expérimentaux en microcosme de laboratoire

Les communautés naturelles filtrées et diluées, du 02/02/16 au 21/03/16, ont subi différents traitements expérimentaux, résumés dans le *Tableau 1*. Sont notés également les différents temps d'échantillonnages et les différents ajouts d'azote (N), de phosphore (P), et de cobalamine (B_{12}) effectués :

A) Condition de pré-bloom en termes d'intensité lumineuse, de photopériode, et de température (température et lumière équivalentes à celles de l'in situ) pendant 9 jours.

B) sous la condition de température de bloom(+ 3°C) pendant 9 jours.

C) Sous les conditions de lumière bloom (intensité lumineuse et photopériode de + 1 mois) pendant 9 jours.

D) Sous, à la fois les conditions de température bloom (+3°C) et lumière bloom (+1 mois) pendant 9 jours.

E) Sous la condition de température bloom pendant 4 jours et ensuite à la fois sous température bloom et lumière bloom pendant 5 jours.

F) Sous les conditions de lumière bloom pendant 4 jours et ensuite sous à la fois les conditions de température bloom et lumière bloom pendant 5 jours.

Traitements	Jours 1 à 4	Jours 5 à 9	ESA	E + NP	E + B12
A : Contrôle prébloom	<i>Température prébloom et lumière prébloom</i>		3	3	3
B : Température seulement	<i>Température bloom</i>				3
	<i>Lumière prébloom</i>				
C : Lumière seulement	<i>Température prébloom</i>				3
	<i>Lumière bloom</i>				
D : Température et lumière	<i>Température bloom</i>		3	3	3
	<i>Lumière bloom</i>				
E : Hiérarchie température puis conditions de bloom	<i>Température bloom</i>				3
	<i>Lumière prébloom</i>	<i>Lumière bloom</i>			
F : Hiérarchie lumière puis conditions de bloom	<i>Température prébloom</i>	<i>Température bloom</i>			3
	<i>Lumière bloom</i>				

Tableau 1 : Tableau des différents traitements effectués aux communautés naturelles échantillonnées. "ESA" signifie échantillons sans ajout, "E+NP" signifie échantillon plus ajout de sels nutritifs, "E+B12" signifie échantillon plus ajout de sels nutritifs et de cobalamine.

Les trois traitements D, E et F combinaient ensemble les conditions de lumière bloom et température bloom ; ils ont été conçus pour tester l'importance de ces paramètres. Ces derniers ont été contrôlés par l'intermédiaire d'incubateurs à température fixe et lumière définie (intensité et photopériode), pilotés par ordinateur, qui conservaient nos communautés dans les conditions expérimentales souhaitées.

Des ajouts de sels nutritifs (nitrate : 5 micromol/L et phosphate : 0,3 micromol/L) ont également été effectués, ainsi que des ajouts en cobalamine (10 ng/L), afin d'étudier l'impact de ces facteurs sur la croissance phytoplanctonique et bactérioplanctonique. Ces concentrations ajoutées ont été choisies en tenant compte des concentrations maximales observées lors de l'année précédente.

Il y eu 4 incubations au total, avec par conséquent des communautés naturelles différentes. Elles se sont réalisées entre le 02/01/16 et 30/03/16 ; mais je n'ai travaillé que sur les deux dernières, c'est-à-dire l'incubation 3, réalisée du 8 mars au 17 mars, et l'incubation 4, réalisée du 21 mars au 30 mars. Ces deux incubations ont été réalisées par triplicats en terme d'échantillons, d'où le chiffre 3 dans le Tableau 1, et suivies en continu pendant 9 jours.

Ces échantillons d'eau de mer ont permis de mesurer plusieurs paramètres afin de quantifier et d'estimer :

- La dynamique du phytoplancton (pico et nanoplancton)
- La dynamique du bactérioplancton (bactéries libres hétérotrophes et autotrophes)
- La diversité moléculaire microbienne (non analysée dans ce stage)
- L'impact des facteurs physiques et chimiques
- L'activité photosynthétique
- Les éléments nutritifs présents dans le milieu (non analysés dans ce stage)

4. Analyse de la biomasse (F0) et de l'activité photosynthétique (Fv/Fm) des communautés phytoplanctoniques par fluorescence

L'abondance et l'activité photosynthétique du phytoplancton ont été suivies quotidiennement par la fluorescence qu'il émet. Pour cela, chaque jour, un prélèvement de 8 mL par bouteille de chaque traitement (Tableau 2) a été effectué afin de pouvoir analyser la fluorescence émise grâce au FIRE (Fluorescence Induction Relaxation System) ; ainsi, nos deux paramètres ont pu être mesurés : le F0, fluorescence minimum de la chlorophylle a, qui représente un indice de la biomasse, et le rapport Fv/Fm, qui correspond à l'activité photosynthétique et renseigne aussi sur l'état physiologique de la cellule. Le protocole de cette méthode est détaillé dans Annexe 1 : Protocole FIRE (Fluorescence induction relaxation system)

Traitements	Signification
-------------	---------------

PBS	Pré-Bloom Sans ajout (condition d'un mois d'intensité lumineuse en moins, et une température plus faible de 3°C, température d'un mois en moins qu'en condition de bloom)
PBNP	Pré-Bloom + Ajout de phosphore et d'azote
PBV ou PBNPV	Pré-Bloom + Ajout de phosphore d'azote et de cobalamine
TB	Température Bloom (+3°C), lumière pré-bloom, + ajout de phosphore et d'azote
LB	Lumière Bloom, température pré-bloom, + ajout de phosphore et d'azote
BS	Bloom (lumière bloom et température bloom) sans ajout
BNP	Bloom + ajout de phosphore et d'azote
BV ou BNPV	Bloom + ajout de phosphore et d'azote + ajout de cobalamine
HT ou HTB	Facteur hiérarchique température (température prébloom, puis température bloom), lumière bloom, + ajout de phosphore et d'azote
HL ou HLB	Facteur hiérarchique lumière (lumière pré-bloom, puis lumière bloom), température bloom, + ajout de phosphore et d'azote

Tableau 2 : Résumé des 10 traitements réalisés lors de chaque expérience

5. Suivi de l'abondance des bactéries hétérotrophes, des cyanobactéries, du pico et nano phytoplancton

Afin de suivre l'abondance des bactéries hétérotrophes libres (ou bactérioplancton), des cyanobactéries et du picophytoplancton (taille inférieure à environ 2 μm) et du nanophytoplancton (d'une taille comprise entre 2 et 20 μm), un volume de (4 mL) de chaque échantillon ayant subi les différents traitements, a été prélevé quotidiennement. Pour pouvoir les analyser par la suite (quelques semaines plus tard), ces 30 échantillons quotidiens ont été fixés avec 20 μl de formol, puis conservés à -80°C jusqu'à la réalisation des analyses par cytométrie en flux.

Le cytomètre FACS Calibur (Becton-Dickinson, Lac Franklin, NJ, USA) utilisé, est équipé d'un laser de 15 mW. Les interprétations des résultats ont été effectuées à partir de plusieurs cytogrammes obtenus à l'aide du logiciel Cell Quest Pro. Le dénombrement de chaque groupe a été calculé à l'aide de billes TRUCOUNT-TM (TC) calibrées. L'ensemble de la préparation des échantillons pour le passage en cytométrie en flux a été effectué dans des tubes Falcon, selon le protocole en annexe 2. Le liquide de gaine utilisé est de l'eau de mer artificielle (salinité 36), liquide légèrement plus salée que l'échantillon permettant de transporter les cellules jusqu'à la source d'excitation, le laser. Du SYBR Green (S7563, Invitrogen, 2% concentration finale) a été ajouté aux préparations (8 μl) servant à l'analyse de l'abondance des

bactéries, car ces dernières ne fluorescent pas naturellement, un marqueur à ADN et ARN est donc nécessaire ; il se fixe aux acides nucléiques et émet une fluorescence.

La diffraction à 90° et la fluorescence naturelle ont permis de discriminer les différents groupes. En effet, le cytomètre FACS calibur est pourvu de différents photomultiplicateurs, chacun spécifique d'un intervalle de longueur d'onde. Ainsi, les communautés pico-phytoplanctoniques se distinguent à l'aide du photomultiplicateur nommé FL3 qui capte des longueurs d'onde supérieures à 650 nm, typiques de la fluorescence rouge de la chlorophylle a (Chl a). Quant aux cyanobactéries, elles ont été discriminées par l'activation du photomultiplicateur nommé FL2 qui capte des longueurs d'onde de 585 ± 42 nm, typiques de la fluorescence orange de la phycoérythrine. Enfin, les bactéries hétérotrophes ont été discriminées par le photomultiplicateur nommé FL1 qui capte les fluorescences induites par des marqueurs tels que le SYBR Green (longueurs d'onde 530 ± 30 nm).

Ainsi, le nombre de billes TC comptées, rapporté au nombre de TC initial, à leur volume ajouté à la préparation et au volume d'échantillon, permet d'obtenir l'abondance cellulaire en cellules en ml^{-1} . La vitesse du flux du cytomètre a été réglée sur « High » pour l'analyse du phytoplancton et réglée sur un temps d'acquisition de 4 minutes. Pour les bactéries, le flux du cytomètre a été réglé sur « LOW » pour un temps d'acquisition de 3 minutes (Annexe 2 : Protocole de cytométrie).

6. Suivi et dosage de la COBALAMINE (B_{12})

L'échantillonnage dans l'étang de Thau pour le dosage de la cobalamine, ou vitamine B_{12} dissoute dans l'eau, a été réalisé chaque semaine du 02/01/16 au 14/06/16 hebdomadairement, et à la fin de chacune des manipulations avec les différents traitements testés en microcosme. L'évaluation de la cobalamine s'est réalisée en plusieurs étapes ci-dessous (Figure 2 & Annexe 3 : Extraction de la cobalamine et Annexe 4 : Dosage de la cobalamine

6.1. Préparation de l'échantillon

Les échantillons d'eau de mer destinés au dosage de la B_{12} , prélevés chaque mardi, ont été filtrés successivement sur deux membranes afin de retenir et limiter toutes particules pouvant interférer la mesure de la B_{12} . Chaque semaine, 3 sacs de 500 ml ont été congelés pour des analyses ultérieures. Dans un des triplicats, une concentration finale de 10 ng/L de B_{12} a été ajoutée afin d'estimer le rendement d'extraction du protocole.

Une fois décongelé, le pH du filtrat a été ajusté à 6,4 avec de l'acide chlorydrique (HCl) à 1M, afin d'optimiser l'adsorption sur la colonne pour la suite de la procédure. La B_{12} étant photodégradable, il est préférable de faire ces manipulations à l'obscurité.

6.2. Pré-concentration et extraction de la cobalamine sur une colonne

Un système de pré-concentration élaboré par Suárez-Suárez *et al.* (2011), consistant à passer l'échantillon d'eau de mer préfiltré sur 0,2 μm contenant la B_{12} sur une colonne de résine

C18, permet l'extraction de la cobalamine contenue dans le volume d'eau de mer prélevé initial. Cette méthode débute par la préparation de la colonne, l'ajustement du pH puis le passage du filtra dans la colonne

L'extraction en phase solide (SPE) est basée sur le partage des composés entre une phase liquide (échantillon) et une phase stationnaire (l'adsorbant). Elle se compose en 4 étapes :

- La première étant le conditionnement de la phase stationnaire. Pour cela un support hydrophobe (résine C18 bondésil) est conditionné par un solvant organique (méthanol), puis par un solvant dont les caractéristiques ioniques et pH sont les plus proches que possible du solvant de l'échantillon (eau miliQ) : cette étape est nécessaire afin d'activer les sites de rétentions.
- La seconde étape consiste au dépôt de l'échantillon. Le but étant de provoquer une rétention quantitative de la B12 sur une phase stationnaire. Afin d'optimiser l'efficacité de cette étape, la vitesse d'écoulement doit être modérée, le débit de la pompe péristaltique a donc était réglé à 1ml/min.
- La troisième étape est un rinçage à l'eau miliQ (20ml) afin d'améliorer la propreté de l'extrait contribuant à la qualité de la cobalamine.
- La dernière étape correspond à une élution via un faible volume de méthanol (5ml) afin d'obtenir un facteur de pré-concentration important.

6.3. Evaporation du méthanol

Un évaporateur centrivap concentrator a été utilisé pour réaliser cette étape. Ce dernier fonctionnant sous vide à 40°C, permet de limiter les vapeurs toxiques du méthanol. Ce n'est qu'une fois le méthanol évaporé que le dosage de la cobalamine est possible.

6.4. Dosage de la cobalamine avec un test ELISA (Annexe 4 : Dosage de la cobalamine)

Le test ELISA (Enzyme Linked Immunosrbent Assay) est un procédé permettant de doser un anticorps ou antigène présent dans différent solvants. Cette technique immunoenzymatique est basée sur la spécificité Antigène-Anticorps, l'antigène ou anticorps est marqué par une enzyme afin de mettre en évidence justement le complexe Anticorps-Antigène formé.

Pour notre étude, nous avons utilisé un Kit ELISA spécifique pour la B₁₂ décrit par Zhu *et al* (2011). La vitamine B₁₂ de nos échantillons est vue comme un antigène sur la microplaque de 96 puits utilisés (Immunolab), contenant déjà un anticorps dirigé contre la B₁₂, a été ajouté également de la B₁₂ conjuguée à la peroxydase. Il va y avoir compétition entre la vitamine à doser et la vitamine marquée qui possède la même spécificité en termes de sites de liaison vis-à-vis des anticorps fixés. Après 1 heure d'incubation à température ambiante, 3 lavages successifs ont permis d'éliminer les vitamines non fixées aux anticorps. Une solution de substrat a été ajoutée et incubée pendant 20 minutes, entraînant le développement d'une couleur bleue. Le développement de cette couleur est inhibé par l'addition d'une solution d'arrêt, qui vire la couleur au jaune. La réaction enzymatique est mesurée par spectrofluométrie à 450 nm. Plus la vitamine à doser est concentrée, moins la vitamine marquée se fixe, ce qui se traduit par une diminution du signal caractérisée par une couleur moins intense. Les résultats ont été calculés par l'équation d'une courbe d'étalonnage établi par les 6 étalons du kit ELISA.

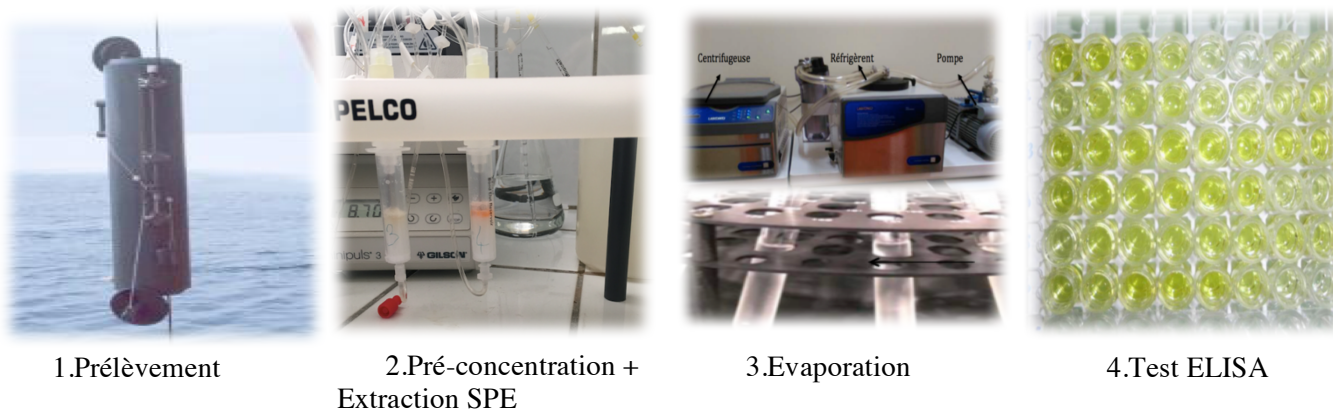


Figure 2 : Schéma des étapes réalisées respectivement pour l'extraction et le dosage de la cobalamine

7. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec l'aide de deux logiciels, que sont le logiciel R (v3.2.0, R Core Team, Vienne, Autriche) et le logiciel Microsoft® Excel 2016.

Pour savoir si les différents traitements imposés à nos communautés prélevées ont des effets significativement différents sur la croissance du phytoplancton ou des bactéries, des analyses de variance (ANOVA) à un ou plusieurs facteurs ont été effectuées avec le logiciel Rstudio. Cette méthode statistique a permis d'étudier le comportement de croissance des différentes communautés en fonction des traitements imposés (température, lumière, sels nutritifs, vitamines...). Si la p-valeur obtenue après l'analyse des résultats était inférieure à 0,05, alors cela signifiait que la différence entre les traitements appliqués aux échantillons était significativement différente. Au contraire si la p-valeur était supérieure à 0,05, la différence entre les traitements appliqués à nos échantillons n'était pas significative à ce moment.

Des ANOVA et des comparaisons sur les taux de croissance du phytoplancton et du bactérioplancton ont été effectuées également. Cela afin de voir s'il y a des différences significatives entre les traitements imposés sur la vitesse de croissance bactérioplanctonique et phytoplanctonique.

Résultats & Discussions

Il est important de rappeler que l'objectif du stage était de déterminer l'importance des facteurs physiques (température et lumière) versus les facteurs chimiques (présence de nutriments et de vitamines B₁₂), et la hiérarchie de ces facteurs, sur le déclenchement du développement printanier des communautés phytoplanctoniques de la lagune de Thau à travers plusieurs questions :

- Le développement des algues au printemps se fait-il lorsque la température augmente **ou** lorsque la photopériode augmente ?
- Le développement des algues au printemps se fait-il lorsque la température **et** la lumière augmentent ? ou d'abord la température puis la lumière ? ou d'abord la lumière puis la température ?
- Le développement des algues au printemps se fait-il lorsque la quantité en nutriment et en vitamine B12 augmente ?

Les résultats que je présenterai dans la suite de ce rapport sont ceux où j'ai pu collaborer pleinement au projet PHOTO-PHYTO. Par conséquent, je ne présenterai que les manipulations et interprétations les plus significatives que j'ai pu conclure. Dans un premier temps, je présenterai les conditions initiales des 4 incubations réalisées du 02/02/16 au 21/03/16. Dans un second temps, seront présentés les effets physiques versus chimie sur la biomasse phytoplanctonique, puis la dynamique des abondances cellulaires du phytoplancton et du bactérioplancton, ainsi que leur taux de croissance. Bien évidemment, d'autres facteurs ont été étudiés au-cour de ma période de stage, comme l'oxygène, le NO₃ ou encore le PO₄... mais je ne les évoquerai pas dans ce rapport puisque je n'ai pas travaillé entièrement dessus.

1. Conditions initiales des différents paramètres (température, Chl a, salinité, B₁₂, photopériode) au début de chaque incubation

Avant d'exposer tous les résultats des différentes manipulations effectuées sur nos incubations, il est important de s'intéresser aux conditions initiales des communautés prélevées. Les données sont présentées dans le tableau ci-dessous (Tableau 3).

Date	B ₁₂ en ng/L	T°C	Salinité	NH4 en µmol.L ⁻¹	Chl a en µg.L ⁻¹	Durée du jour (heure)
I1 : 02/02/16	3,86	11,04	37,75	0,18	0,76	9,81
I2 : 16/02/16	NA	8,68	38,1	0,05	0,82	10,43
I3 : 08/03/16	5,05	8,79	37,62	0,04	1,26	11,46
I4 : 21/03/16	4,08	11,17	37,59	0,1	0,94	12,1

Tableau 3 : Conditions physico-chimiques et biologiques de l'étang de Thau avant chaque incubation (I1, I2, I3 et I4)

Chaque échantillonnage des 4 incubations a été prélevé en conditions prébloom (période hivernale), afin de suivre l'évolution de chaque paramètre exposé dans le Tableau 3 jusqu'à l'initiation du bloom phytoplanctonique (période printanière).

Nous discuterons des données de l'incubation 3 et 4, puisque ce sont celles que j'ai réalisées et analysées entièrement. Cependant, pour la suite, je me focaliserai uniquement sur les données de l'incubation 3 pour l'ensemble des paramètres étudiés, du fait que c'est l'incubation la plus complète en terme d'analyses.

Il est bien apparent qu'entre les manipulations 3 et 4, il y a eu une hausse de la température de 2,38°C (Tableau 3) et un léger allongement de journée de 0,64h (Tableau 3). Concernant la salinité de la mer, elle n'avait que peu changé (Tableau 3) au contraire de la concentration en ammonium qui avait augmenté (Tableau 3). Enfin, on observe une baisse de la Chl a entre l'incubation 3 et 4 de 0,32 $\mu\text{g.L}$, et une baisse de la concentration en cobalamine de 0,97 ng/L (Tableau 3). C'est à partir de ces conditions initiales que nous verrons les effets ou non des différents traitements imposés aux communautés microbiennes prélevées.

2. Importance de l'azote, du phosphore, de la B₁₂, de la lumière et de la température sur la fluorescence du phytoplancton

Les différents traitements appliqués (Tableau 2) ont eu pour but de tester les effets et impacts de différents facteurs sur la croissance du phytoplancton à travers la mesure du F0 qui est représentative de la concentration en chl a et par conséquent, un très bon indicateur de la biomasse phytoplanctonique. La dynamique de cette mesure permet de mettre en évidence les variations temporelles de la communauté phytoplanctonique. Elle permet aussi d'identifier des périodes de bloom. Les effets testés étaient les suivants :

- Effet de l'ajout de sels nutritifs sur la croissance du phytoplancton
- Effet de l'ajout de cobalamine sur la croissance du phytoplancton
- Effet de l'augmentation de la lumière seule sur la croissance du phytoplancton
- Effet de l'augmentation de la température seule sur la croissance du phytoplancton
- Effet combiné de l'augmentation de la température et la lumière sur la croissance du phytoplancton
- Effet hiérarchique avec d'abord l'augmentation de la lumière et ensuite l'augmentation de la température et de la lumière sur la croissance du phytoplancton
- Effet hiérarchique avec d'abord l'augmentation de la température puis l'augmentation de la lumière et de la température sur la croissance du phytoplancton

Les résultats obtenus pour ces manipulations sont résumés dans le Tableau 4, ci-dessous. La significativité ($p < 0,05$) des effets positifs ou négatifs ont été testés par une analyse de variance multivariée.

Effets	Traitements	Incubation 1	Incubations 2	Incubations 3	Incubations 4
		02/02/2016 - 12/02/2016	16/02/2016 - 25/02/2016	08/03/2016 - 17/03/2016	21/03/2016 - 30/03/2016
Ajout de sels nutritifs dans la croissance du phytoplancton	PBS/PBNP	+	+	+	+
	BS/BNP	+	+	+	+
Ajout de cobalamine dans la croissance du phytoplancton	PBNP/PBV	Temps 4-5-6	NS	+	NS
	BNP/BV	NS	NS	+	NS
Effet de la lumière seule	LB/PBV	+	-	-	+
Effet température seule	TB/PBV	+	+	+	+
Effet combiné température et lumière	PBV/BV	+	+	+	+
Effet hiérarchique lumière/température	HL/PBV	+	+	+	+
	HL/BV	-	-	-	-
Effet hiérarchique température/lumière	HT/PBV	+	+	+	+
	HT/BV	+	+	+	+

Tableau 4 : Effet de PBS (prébloom sans ajout), PBNP (prébloom + N et P), PBV (prébloom + N + P + B12), TB (température bloom), LB (lumière bloom), BS (bloom sans ajouts), BNP (bloom + N et P), BV (bloom + N + P + B12), HT (T prébloom puis T bloom) et HL (L prébloom puis L bloom) sur la fluorescence de la chlorophylle a mesuré par le FIRE (Fluorescence Induction Relaxation System). Y sont indiqués les effets significatifs positifs (+), les effets significatifs négatifs (-) et les effets non significatifs (NS)

Les résultats des différents traitements appliqués montraient bien l'effet positif significatif de l'ajout de sels nutritifs (p-valeur <0,001) dans la croissance du phytoplancton (Tableau 4). En effet la représentation graphique de la fluorescence pour l'incubation 3 (Figure 3), montrait bien que sans ajout de sels nutritifs ou de cobalamines, il n'y avait pas de croissance 0 j^{-1} (courbe PBS). Au contraire avec un ajout de sels nutritifs, il y avait un développement important de phytoplancton avec une courbe dont le taux de croissance est égal à $0,8 \text{ j}^{-1}$. Le taux de croissance a été calculé de la même manière qui est expliquée dans la partie « Taux de croissance des communautés microbiennes »

Concernant la température, les résultats mettaient en avant son effet positif et significatif (p-valeur <0,001) sur la croissance du phytoplancton (Tableau 4). Effectivement la **Erreur ! Nous n'avons pas trouvé la source du renvoi.** montrait bien que lorsque l'on augmente la température de 3°C (courbe BNP) on peut voir un décalage du pic de croissance qui se produit plus tôt (par rapport à PBNP), avec une pente légèrement plus forte, le taux de croissance est égal à $1,0 \text{ j}^{-1}$.

Sur l'ensemble de nos incubations (Tableau 4), l'effet de l'ajout de cobalamine était peu significatif sauf pour l'incubation 3, où un effet positif sur l'initiation du développement du phytoplancton a été mis en évidence. En effet, la Figure 3 révèle de manière significative (p-valeur <0,001) une croissance plus rapide que BNP (courbe BV au-dessus de la courbe BNP) représentée par un taux de croissance égal à $0,9 \text{ j}^{-1}$.

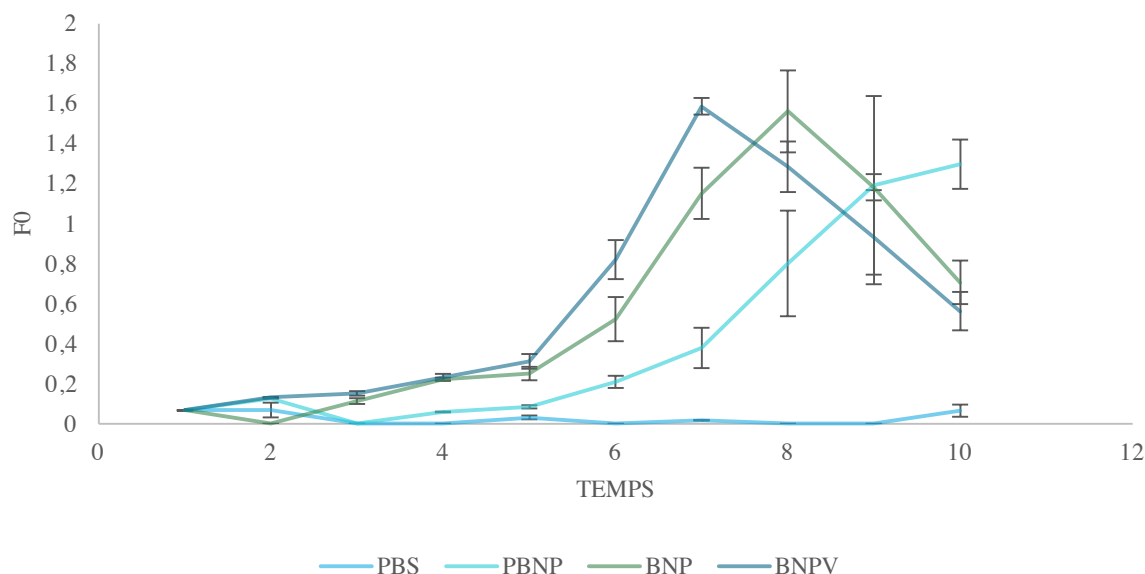


Figure 3 : Evolution de la fluorescence F0 en fonction du temps, soumis à différents traitements PBS (prébloom sans ajout), PBNP (prébloom + ajout d'azote et de phosphore), BNP (bloom + ajout d'azote et de phosphore) et BV (bloom + ajout de phosphore d'azote et de cobalamine) de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16

Pour ce qui en est de la lumière, il y avait un effet significativement négatif de l'augmentation de la lumière (+1 mois, LB) sur l'initiation au développement du phytoplancton pour l'incubation 3 (Tableau 4). Par contre, il n'y avait pas d'effet négatif lorsque les 2 augmentations (lumière et température) ont été combinées (Tableau 4). Une des interprétations possibles est que l'effet positif de la température était plus fort que l'effet négatif de la lumière. Cela est probablement dû au fait qu'il y a eu un effet de photo inhibition sur la croissance algale lié à l'augmentation soudaine de la lumière, on peut dire que la lumière a eu un effet antagoniste face à la température (intensité, photopériode). Effectivement l'adaptation température/lumière n'est pas du tout la même pour une algue. De plus, pour confirmer cet effet, il est intéressant de comparer l'effet combiné de la température plus lumière (BNPV), avec l'effet de la température seule (TB), cela met bien en évidence, comme on peut le voir sur le graphique (Figure 4), l'effet antagoniste entre ces deux facteurs. Effectivement, les courbes montraient bien une forte croissance avec la température seule (courbe TB), et une croissance retardée et moindre avec seulement la lumière (courbe LB), d'où l'effet antagoniste abordé, et la compensation de la température face à la lumière (courbe BNPV).

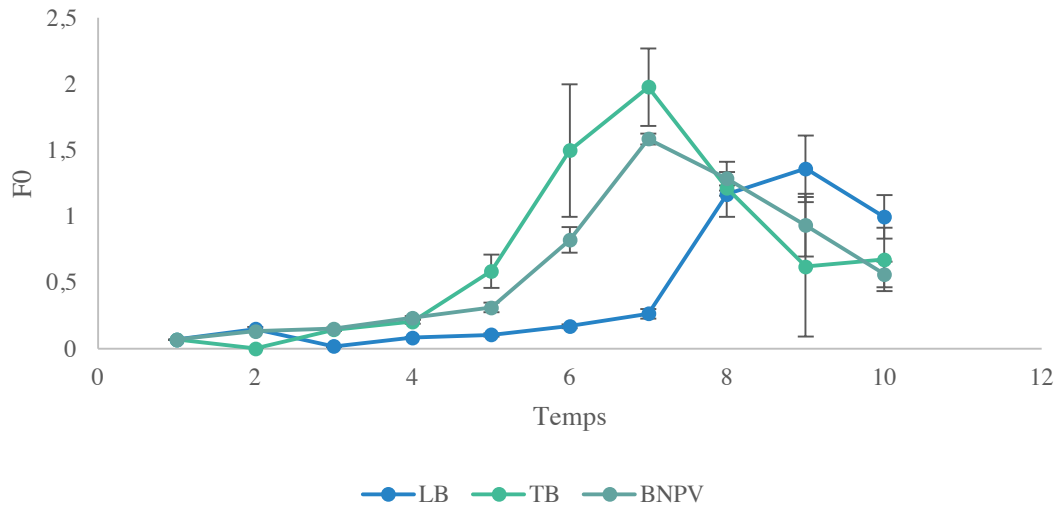


Figure 4 : Evolution de la fluorescence F0 en fonction du temps, soumis à différents traitements LB (lumière bloom + sels nutritifs), TB (température bloom + sels nutritifs) et BV (Bloom + sels nutritifs + cobalamine), de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16

Enfin, pour mettre en évidence un éventuel effet hiérarchique entre la température et la lumière, la comparaison entre plusieurs traitements était nécessaire :

Tout d'abord, pour visualiser l'effet hiérarchique avec la température en premier, la comparaison entre les traitements HT, BV et TB ont été représentés à l'aide de la (Figure 5). Les courbes montraient une croissance plus rapide et plus importante avec la température en premier (courbe HT) dont le taux de croissance est égal à $0,62 \text{ j}^{-1}$, par rapport à l'effet combiné de la température + lumière (courbe BNPV) dont le taux de croissance est égal à $0,58 \text{ j}^{-1}$ (p-valeur = 0,02). Est notable également, une similitude entre les courbes HTB et TB, bien que le taux de croissance avec la température seule soit plus important, égal à $0,75 \text{ j}^{-1}$.

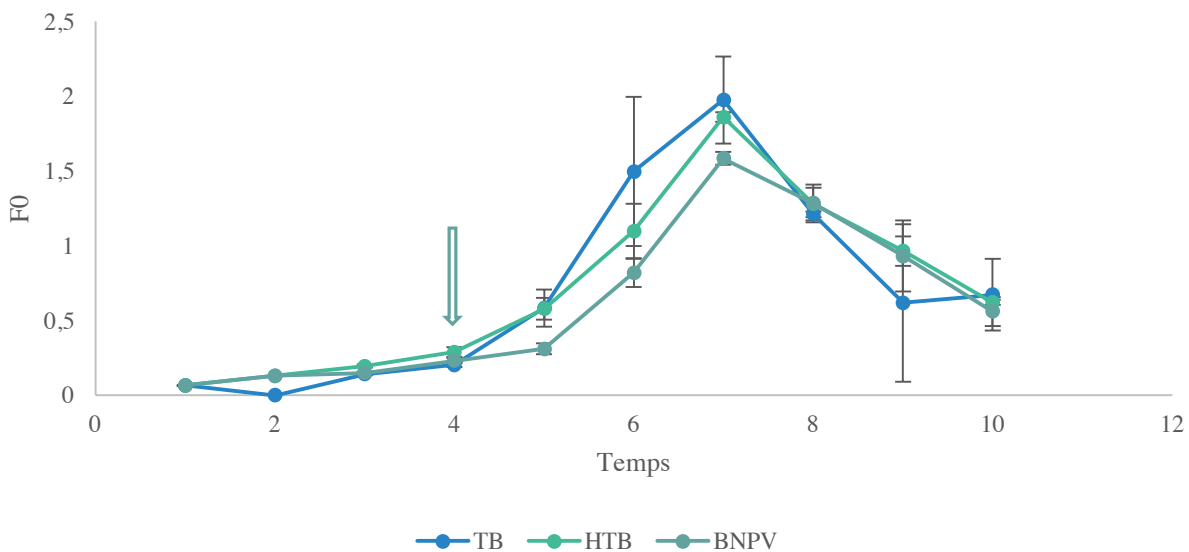


Figure 5 : Evolution de la fluorescence F0 en fonction du temps, soumis à différents traitements HT (facteur hiérarchisé avec la température prébloom puis après le shift température bloom +3°C + sels nutritifs), TB (température bloom + sels nutritifs) et BV (Bloom + sels nutritifs + cobalamine), de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16. La flèche symbolise le jour du shift (passage de température prébloom à condition de bloom)

Dans un second temps, pour voir l'effet hiérarchique de l'augmentation de la lumière en premier, la comparaison entre les traitements HL, BNPV et LB ont également été représentés à l'aide de la (Figure 6). Les courbes mettaient bien en évidence, et de manière significative (p-valeur <0,001 entre HL et BV), un effet négatif de la lumière en premier. Dans les premiers jours (jour 1 à 4), la lumière avait bien un effet négatif sur la croissance phytoplanctonique (courbe LB et HL en dessous de BV). On pourrait supposer que ce n'est qu'après un certain temps, à supposer un temps d'adaptation, que cette dernière est très bénéfique à la croissance du phytoplancton. Cependant cette supposition n'est pas valable puisque LB est toujours négatif quand on le compare à BV. Les taux de croissance de l'effet hiérarchique avec la lumière en premier ou de la lumière seule sont tous deux égaux à $0,8 \text{ j}^{-1}$. De plus ces taux de croissances sont équivalents à celui de PBNP ($0,8 \text{ j}^{-1}$) il n'y a donc pas d'effet de la lumière et par conséquent pas de hiérarchie avec la lumière.

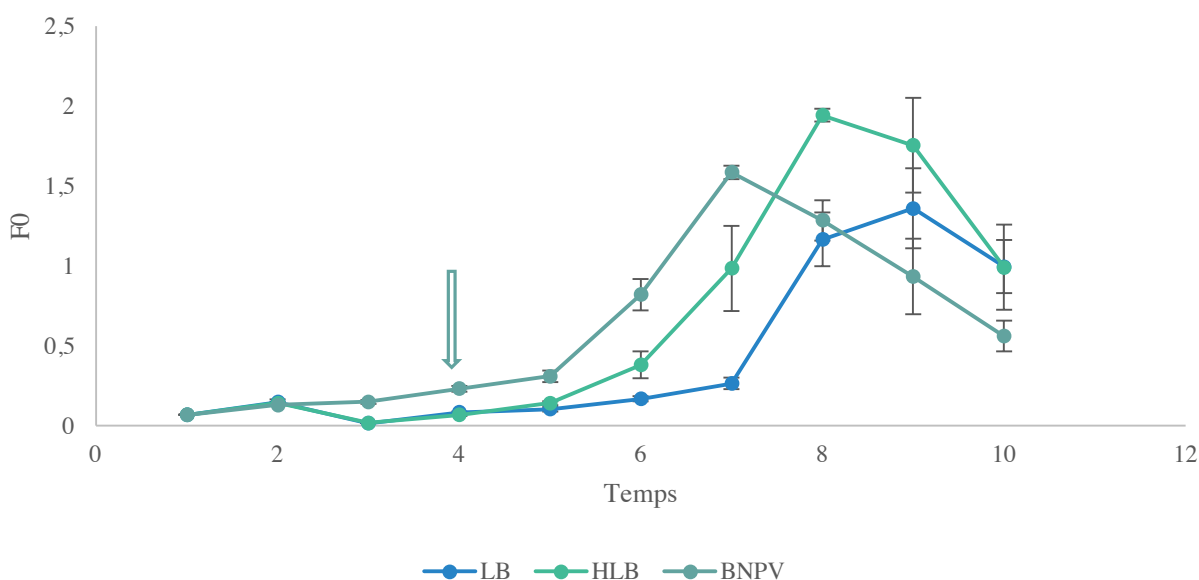


Figure 6 : Evolution de la fluorescence F0 en fonction du temps, soumis à différents traitements HL (facteur hiérarchisé avec la lumière prébloom puis après le shift lumière bloom (+1 mois) + sels nutritifs), LB (lumière bloom + sels nutritifs) et BV (Bloom + sels nutritifs + cobalamine), de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16. La flèche symbolise le jour du shift (passage de la lumière prébloom à la lumière bloom)

Il a donc été mis en évidence de manière significative que c'est l'effet hiérarchique avec la température en premier qui déclenche le bloom phytoplanctonique quand les apports en sels nutritifs sont convenables pour la biomasse. La lumière quant à elle n'a pas d'effet ou a un effet négatif sur l'initiation du bloom.

En conclusion, sur ces analyses de fluorescence, il a été démontré que :

- Les sels nutritifs sont le facteur principal dans le déclenchement du bloom phytoplanctonique.
- La vitamine B₁₂ n'est pas un déclencheur de la production algale, mais plutôt un cofacteur de croissance, de par nos résultats obtenus. En effet, ce composé n'est pas

nécessaire au développement du phytoplancton, mais il intensifie et accélère la croissance de ce dernier.

- Il y a bel et bien un effet hiérarchique entre la température avec d'abord la température pour compenser l'effet négatif de l'augmentation de la lumière seule pour l'initiation au bloom phytoplanctonique.

3. Effet de la température, de la lumière et des nutriments sur l'abondance des communautés microbiennes

3.1. Contributions des différents groupes microbiens

Les résultats présentés ci-dessous seront ceux caractérisant l'incubation 3. Les résultats des analyses par cytométrie en flux ont permis d'identifier quatre communautés phytoplanctoniques (Figure 7), discriminées par rapport à leurs tailles et la fluorescence qu'émettent leurs pigments : les cyanobactéries, le picophytoplancton eucaryote $<1\mu\text{m}$ que l'on nommera pico 1, le picophytoplancton eucaryote compris entre 1 et $2\mu\text{m}$ que l'on nommera pico 2, et le nanophytoplancton. Le groupe des cyanobactéries n'a pas été considéré du fait qu'il est quasiment inexistant (Figure 7).

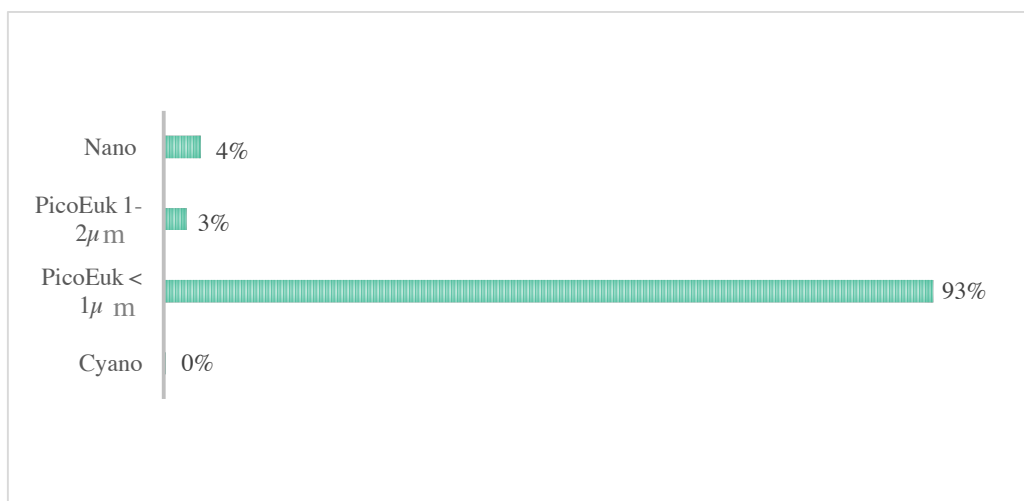


Figure 7 : Pourcentage de contribution des populations phytoplanctoniques détectées par cytométrie en flux au temps 0 de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16

Comme pour la détermination des communautés phytoplanctoniques, les bactéries hétérotrophes ont été discriminées selon l'intensité de la fluorescence du marqueur moléculaire SyberGreen, et par leur taille en analyse par cytométrie en flux. Ainsi, trois groupes ont pu être identifiés (Figure 8) : des groupes à intensité faible en acide nucléique et des groupes à intensité forte en acide nucléique que sont respectivement les LNA (Low Nuclear Acid) et les HNA (Hight Nuclear Acid) et les HNA B (Hight Nuclear Acid B, qui sont des HNA mais avec une intensité plus faible).

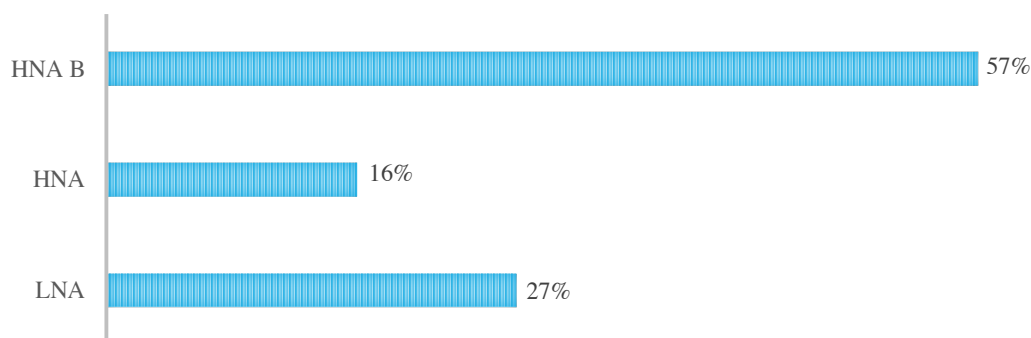


Figure 8 : Pourcentage de contribution des populations bactériennes détectées par cytométrie en flux au temps 0 de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16

Afin de visualiser une évolution des populations microbiennes au cours du temps lors de l'incubation 3, il était judicieux de représenter et comparer le temps 0 du % de contribution de chaque communauté avec leur temps final. La comparaison entre ces deux temps permettait aussi de voir l'effet de nos traitements sur un éventuel changement de population. C'est-à-dire, si les facteurs ; sels nutritifs, vitamines, température ou lumière favorisaient une communauté microbienne particulière. Les graphiques au temps 10 obtenus pour le phytoplancton et bactérioplancton étaient les suivants :

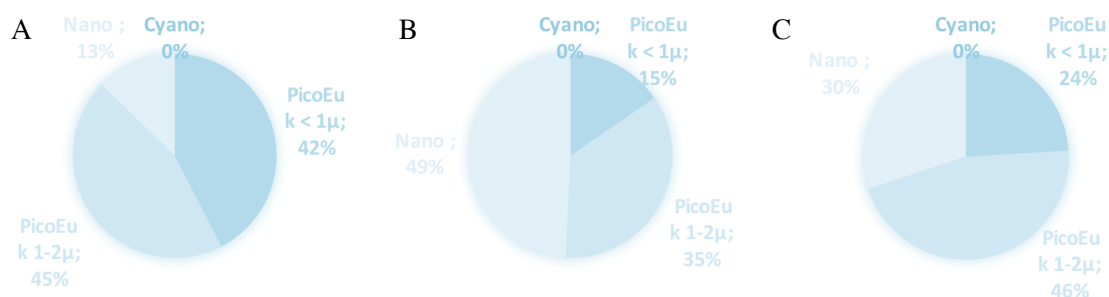


Figure 9 : Secteur du % de contribution des populations phytoplanctoniques au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : A : PBS (pré bloom sans ajout), B : PBNP (pré bloom + ajout d'azote et de phosphore), C : PBV (pré bloom + ajout d'azote et de phosphore + ajout de cobalamine)

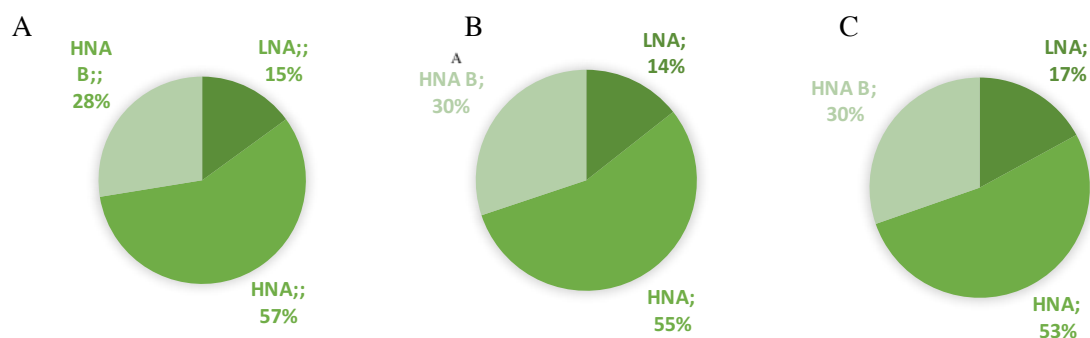


Figure 10 : Secteur du % de contribution des populations bactériennes au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : A : PBS (pré bloom sans ajout), B : PBNP (pré bloom + ajout d'azote et de phosphore), C : PBV (pré bloom + ajout d'azote et de phosphore + ajout de cobalamine)

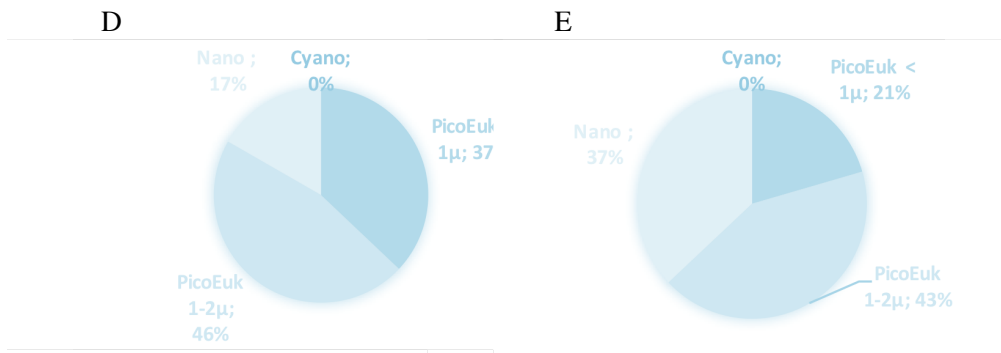


Figure 11 : Secteur du % de contribution des populations phytoplanctoniques au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : D : TB (température bloom + ajout d'azote et de phosphore), E : LB (lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore)

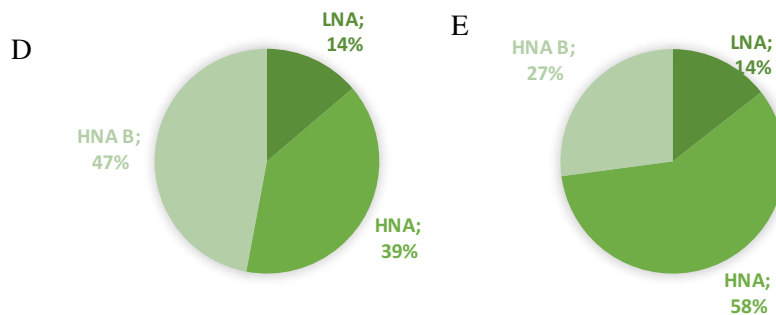


Figure 13 : Secteur du % de contribution des populations bactériennes au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : D : TB (température bloom + ajout d'azote et de phosphore), E : LB (lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore)

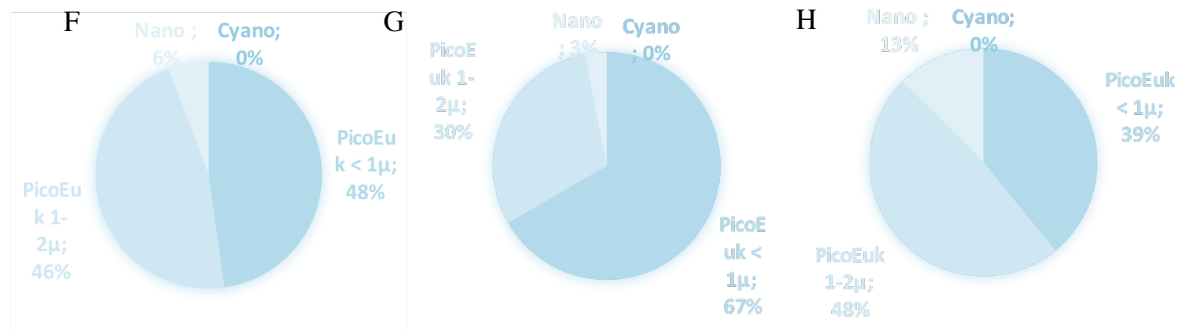


Figure 17 : Secteur du % de contribution des populations phytoplanctoniques au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : F : BS (bloom sans ajout), G : BNP (bloom + ajout d'azote et de phosphore), H : BV (bloom + ajout d'azote et de phosphore + ajout de cobalamine)

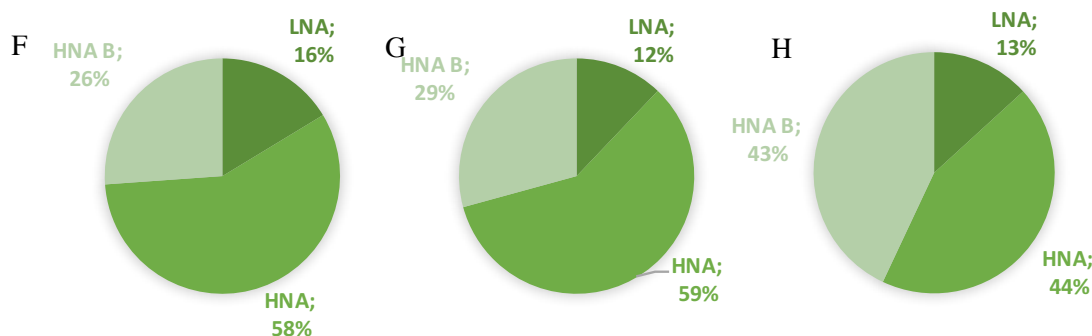


Figure 12 : Secteur du % de contribution des populations bactériennes au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : F : BS (bloom sans ajout), G : BNP (bloom + ajout d'azote et de phosphore), H : BV (bloom + ajout d'azote et de phosphore + ajout de cobalamine)

I

J

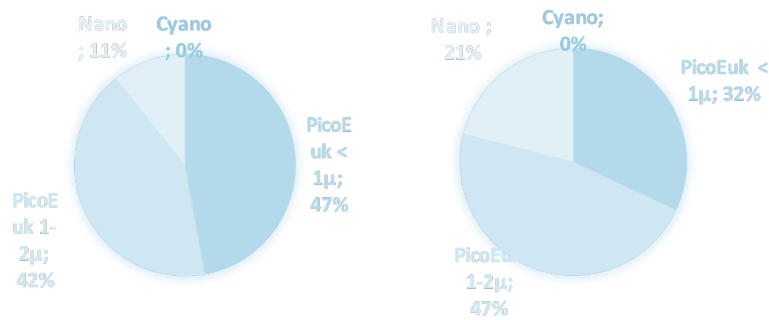


Figure 18 : Secteur du % de contribution des populations phytoplanctoniques au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : I : HT (facteur hiérarchique température prébloom en premier puis température bloom + ajout d'azote et phosphore), J : HL (facteur hiérarchique lumière prébloom en premier puis lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore)

I

J

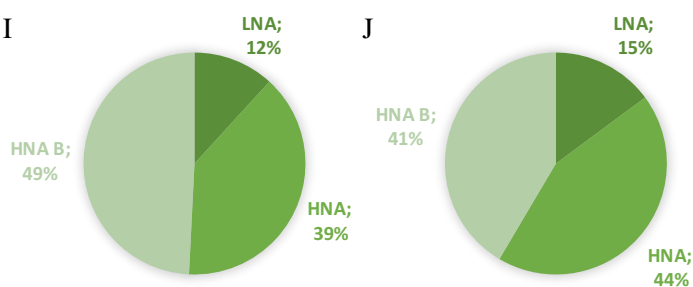


Figure 19 : Secteur du % de contribution des populations bactériennes au temps final de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16 et soumis à différents traitements : I : HT (facteur hiérarchique température prébloom en premier puis température bloom + ajout d'azote et phosphore), J : HL (facteur hiérarchique lumière prébloom en premier puis lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore)

A vu de cet ensemble de graphiques (Figure 9 à Figure 16), on peut observer des changements notables de populations qui ont eu lieu entre le temps 0 et le temps final, suivant les traitements subis par les communautés microbiennes. En effet :

Lorsque qu'il n'y avait pas d'ajout de nutriments, que ce soit sous les conditions de prébloom ou de bloom (PBS et BS), la contribution de pico 2 a augmenté considérablement, de 3% (Figure 7) on passait respectivement à 45 et 46% (Figure 9 A et Figure 13 A). En même temps, chez les bactéries, c'est la contribution des HNAB qui diminue de 29% au profit de la population des HNA qui elle, augmente de 41% (Figure 8 et Figure 10).

Lorsque qu'il y avait rajout des sels nutritifs, que ce soit sous conditions de bloom ou de prébloom (PBNP et BNP), c'est la contribution de la population pico 1 qui a diminué (de 78% pour PBNP et de 26 % pour BNP), laissant place à des cellules de taille plus importante comme des cellules appartenant au groupe du nano-phytoplancton (49%) ou pico 2 (67%) pour BNP (Figure 9 B et Figure 13 B). Concernant les bactéries, c'est également la population de HNA qui augmente de plus de 40% (Figure 10 et Figure 14) par rapport au T0 (Figure 8).

Pour le reste des traitements (effet de la cobalamine, de la température et de la lumière), c'est également au profit de populations plus grandes en taille que pico 1 a diminué, de plus de 50% pour la cobalamine, de 56% pour la température et de 72% pour la lumière. Il est majoritairement remplacé par pico 2 ou par le nanophytoplancton (Figure 7, Figure 9 C, Figure

11). Les bactéries, quant à elles, affichaient toujours le même profil, le % de contribution de HNAB diminue en moyenne de moitié au profit du % de contribution de la population HNA qui eux augmentaient de moitié (Figure 8, Figure 10, Figure 12 et Figure 14).

Les % de contributions de chaque groupe phytoplanctonique montraient bien, que même si au début, pico 1 contribuait majoritairement à l'abondance du phytoplancton avec plus de 93% (Figure 7), ce sont des cellules plus grosses comme le pico 2 et le groupe du nano-phytoplancton qui contribuent à l'abondance du phytoplancton total mesuré par cytométrie en flux, quel que soit les différents traitements. Une hypothèse éventuelle face à ces résultats est qu'il pourrait exister une forte prédation ou une forte mortalité sur cette population pico 1, et cela malgré la dilution à 90% initiale qui visait à supprimer les micro-brouteurs. Parallèlement à cela, au début de l'incubation 3, le % de contribution des communautés bactériennes le plus élevé était celui des HNAB avec plus de 57% (Figure 8). Cette population a disparu au profit de la population HNA qui elle, a augmenté d'environ de moitié au temps final pour l'ensemble des traitements.

3.2. Abondance cellulaire des communautés microbiennes

Après avoir analysé la contribution des différentes populations phytoplanctoniques pour nos traitements, il était intéressant de voir l'évolution des abondances en fonction de ces traitements. Le tableau A en annexe 5 décrit l'évolution de l'abondance cumulée du phytoplancton total (c'est-à-dire la somme des abondances mesurées par cytométrie en flux) en fonction du temps, ce tableau est illustré par la représentation graphique ci-dessous (Figure 17)

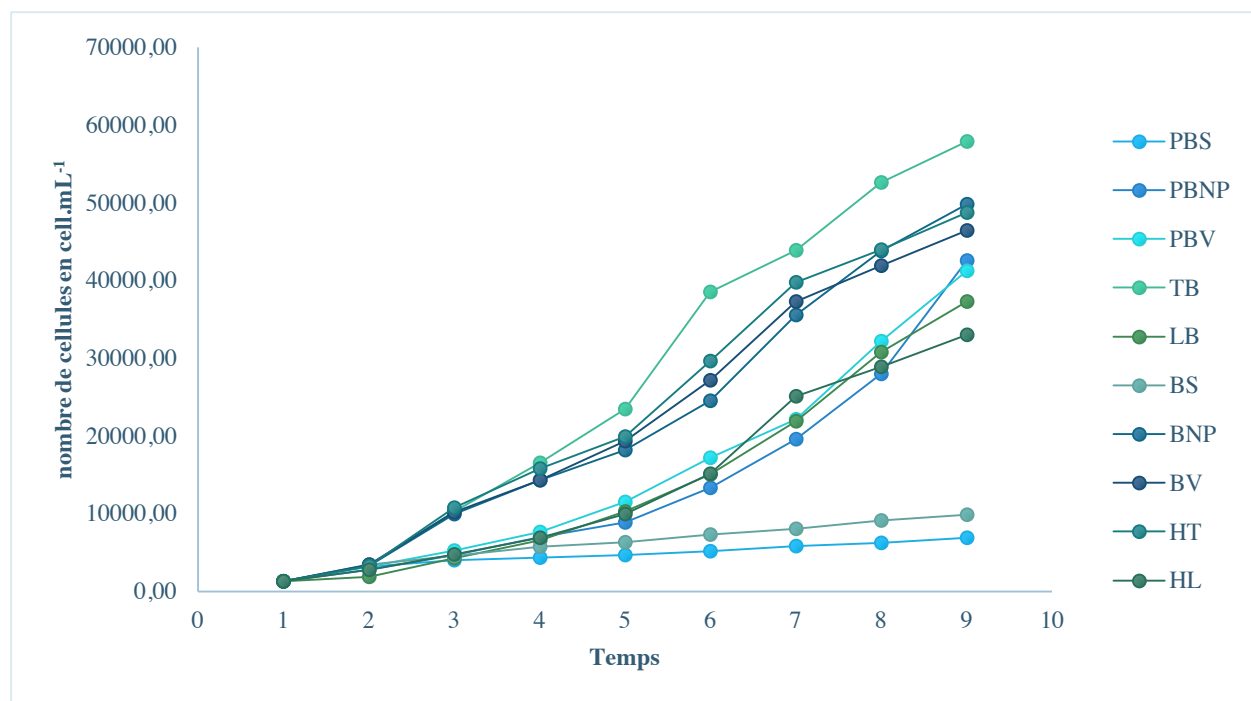


Figure 20 : Cumulés de l'abondance des populations phytoplanctoniques en fonction du temps pour chaque traitements : PBS (pré bloom sans ajout), PBNP (PB + ajout d'azote et de phosphore), PBV (PBNP + ajout de cobalamine), TB (température bloom + ajout d'azote et de phosphore), LB (lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), BS (bloom sans ajout), BNP (bloom + ajout d'azote et de phosphore), BV (BNP + ajout de cobalamine), HT (facteur hiérarchique température pré bloom en premier puis température bloom + ajout d'azote et phosphore), et HL (facteur hiérarchique lumière pré bloom en premier puis lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16.

Trois évolutions étaient distinctes à la vue de la Figure 17 : Une évolution sans ajout de nutriments (allant de 1323,81 à 9834,64 cell.mL⁻¹), une évolution plus importante (que celle sans nutriments) avec ajout de nutriments (pas d'effet lumière notable) avec des concentrations qui vont jusqu'à 49794,37 cell.mL⁻¹. Enfin une évolution encore plus intense (que celle avec nutriments) avec ajout de nutriment et augmentation de température, le maximum étant atteint avec le facteur température seule (57876,14 cell.mL⁻¹), ce qui confirme l'effet antagoniste de la lumière lorsque cette dernière est combinée avec la température.

Ces résultats sont donc très complémentaires de ce qui a pu être dit auparavant.

Effectivement, ces résultats confirment que sans ajouts de sels nutritifs, il n'y avait pas ou très peu de croissance comme on peut le voir à travers l'abondance des populations soumises au traitement PBS = 6883,4 cell.mL⁻¹ et BS = 9834,6 cell.mL⁻¹ (Figure 17). Contrairement à l'ajout d'azote et de phosphore où était observé une explosion abondance phytoplanctonique avec PBNP = 42566,3 cell.mL⁻¹ et BNP = 49794,3 cell.mL⁻¹ (Figure 17). Les sels nutritifs sont donc un des principaux facteurs qui favorise la croissance phytoplanctonique.

L'absence d'effet de la lumière était visible également avec HL = 32991,7 cell.mL⁻¹ et LB = 37289 cell.mL⁻¹ dont l'abondance mesurée au temps final est nettement inférieure à celle des populations traitées pour la température au même temps final ; HT = 48689,8 cell.mL⁻¹ et TB = 57876,1 cell.mL⁻¹. La lumière n'a donc aucun effet à vu de ces résultats, contrairement à la température qui elle, a un effet positif sur la croissance du phytoplancton.

En ce qui concerne les vitamines, graphiquement la cobalamine intensifie la croissance pour les conditions prébloom et bloom, et par conséquence l'abondance du phytoplancton, puisque les courbes PBV et BV (Figure 17) se situent au-dessus des courbes PBNP et BNP (Figure 17) sauf en fin d'incubation (à partir du jour 7) où les courbes PBNP et BNP passent au-dessus de celles des vitamines. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette situation :

- La concentration en cobalamine initiale était limitante par rapport à l'ajout initial en N et P, et un ajout de cette vitamine a permis la croissance du phytoplancton qui ne peut pas la synthétiser
- L'ajout de la cobalamine a entraîné une forte croissance (comme supposé juste avant) qui est suivie d'une plus forte mortalité, ce qui expliquerait que l'abondance soit plus faible que sans ajout de B₁₂ en fin d'incubation. Cela supposerait que la mortalité par les virus ou les prédateurs est d'autant plus virulente que la croissance de leur proie est élevée.

L'abondance du bactérioplancton total diffère de celle du phytoplancton, puisque seulement 2 évolutions de groupes se distinguaient (Figure 18) : un groupe sans ajout de nutriment et un autre groupe avec ajout de nutriments.

Comme pour le phytoplancton, sans ajout de sels nutritifs (azote et phosphore) la croissance bactérienne est moindre qu'avec ajout de sels nutritifs (p-valeur <0,001), cela semble logique puisqu'il faut un minimum de matière organique et sels nutritifs pour la croissance. En effet, la Figure 18 confirme cela, sans ajout d'azote et de phosphore, la concentration en bactérie était de 4229206,3 cell.mL⁻¹ dans PBS (Figure 18), et de 5123394,5 cell.mL⁻¹ dans BS (Figure

18). Une hypothèse peut se poser, le fait que l'abondance augmente avec entre le traitement PBS et le traitement BS est sûrement due à l'augmentation de 3°C de la température.

Lorsqu'on a rajouté des sels nutritifs, il a été observé une augmentation de l'abondance du bactérioplancton (p-valeur <0,001). La concentration en bactérie était de 9270490,7 cell.mL⁻¹ pour PBNP (Figure 18) et de 9810905,4 cell.mL⁻¹ pour BNP (Figure 18).

Pour cette incubation, l'ajout de cobalamine avait favorisé la croissance bactérienne. En effet, l'abondance du bactérioplancton pour les traitements PBV et BV avait fortement augmenté, en atteignant respectivement 10238971,0 cell.mL⁻¹ (Figure 18) et 11084995,6 cell.mL⁻¹ (Figure 18). Cela laisse à supposer que les populations bactériennes utilisent également la cobalamine pour leurs croissances, ou, une autre hypothèse serait que les populations bactériennes suivent l'augmentation du phytoplancton.

Pour la croissance bactérienne, il ne semble pas avoir un impact particulier d'un facteur lumière seule (LB) ou d'un facteur température seule (TB) ou les deux combinés (Figure 18), car il n'y a pas de différences significatives avec PBNP

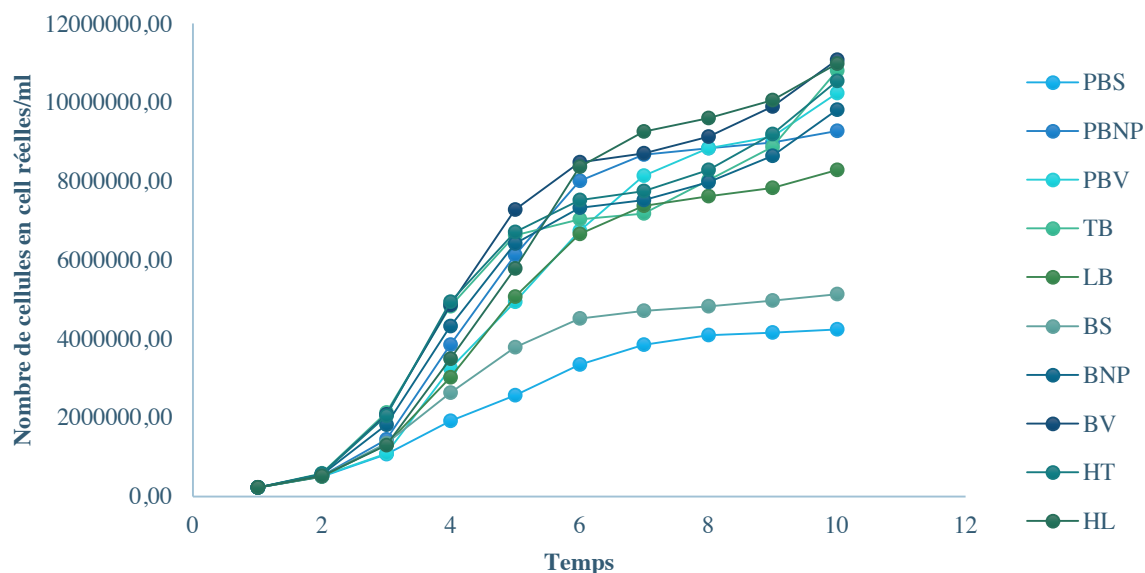


Figure 21 : Cumulés de l'abondance des populations bactériennes en fonction du temps pour chaque traitements : PBS (pré bloom sans ajout), PBNP (PB + ajout d'azote et de phosphore), PBV (PBNP + ajout de cobalamine), TB (température bloom + ajout d'azote et de phosphore), LB (lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), BS (bloom sans ajout), BNP (bloom + ajout d'azote et de phosphore), BV (BNP + ajout de cobalamine), HT (facteur hiérarchique température pré bloom en premier puis température bloom + ajout d'azote et phosphore), et HL (facteur hiérarchique lumière pré bloom en premier puis lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16.

3.3. Taux de croissance des communautés microbiennes

Après avoir vu les effets que pouvaient avoir les différents traitements visant à tester plusieurs facteurs physiques (température + lumière) et chimiques (sels nutritifs et cobalamine), sur la structure (composition) et l'abondance des communautés microbiennes, il était intéressant de calculer les taux de croissance de ces différentes communautés (phytoplancton total et bactérioplancton total) afin de confirmer les conclusions apportées dans les facteurs initiant le développement du bloom phytoplanctonique printanier.

Typiquement la croissance du phytoplancton peut être généralisée en 4 phases (A.Herbland *et al.* 2007). Une phase de latence, qui est une phase où la croissance du phytoplancton est lente et dépend principalement des facteurs environnementaux (milieu riche en sels nutritifs ou non, acclimatation du phytoplancton dans son milieu...). Une phase exponentielle, une phase stationnaire qui perdure jusqu'à ce qu'un élément limitant (souvent un élément nutritif comme l'azote ou le phosphore) atteigne une valeur ne satisfaisant plus les demandes cellulaires. Et enfin une phase de déclin se traduisant par la mort des cellules.

C'est la phase exponentielle qui nous a intéressés pour calculer la croissance du phytoplancton. En effet, pendant cette phase, et par définition du caractère exponentiel de la croissance, l'augmentation du nombre de cellules (dN) par unité de temps (dt) est proportionnelle au nombre de cellules présentes à l'instant t ; le facteur de proportion est appelé le taux de croissance et se note μ , il se calcule à partir de la formule suivante :

$$\frac{\ln\left(\frac{N_t}{N}\right)}{\Delta T}$$

Ln : Logarithme népérien
N : Biomasse au temps t_0
 N_t : Biomasse au temps $t > t_0$
 ΔT : Intervalle de temps $t - t_0$

Le taux de croissance μ est exprimé en t^{-1} mais peut être également exprimé en nombre de doublement par jour (k). On passe de μ à k en divisant simplement μ par le logarithme népérien de 2.

$$k = \mu / \ln(2) = \mu / 0,693$$

Le tableau suivant (Tableau 5) récapitule les taux de croissance en fonction des différents traitements du phytoplancton totale. Les valeurs prises pour calculer ces différents taux de croissance ont été prises en début d'incubation, entre le jour 2 et 5, lors de la phase exponentielle de la croissance.

Traitements	$\mu(\text{en j}^{-1})$	$k(\text{en div j}^{-1})$
PBS	$0,63 \pm 0,12$	0,90
PBNP	$0,96 \pm 0,23$	1,38
PBV	$0,71 \pm 0,05$	1,02
TB	$1,11 \pm 0,34$	1,60
LB	$0,80 \pm 0,05$	1,15
BS	$0,47 \pm 0,08$	0,67
BNP	$1,15 \pm 0,26$	1,65
BV	$1,01 \pm 0,15$	1,45
HT	$1,13 \pm 0,37$	1,63
HL	$0,81 \pm 0,07$	1,16

Tableau 5 : Tableau des différents taux de croissance du phytoplancton total soumis à différents traitements : PBS (prébloom sans ajout), PBNP (PB + ajout d'azote et de phosphore), PBV (PBNP + ajout de cobalamine), TB (température bloom + ajout d'azote et de phosphore), LB (lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), BS (bloom sans ajout), BNP (bloom + ajout d'azote et de phosphore), BV (BNP + ajout de cobalamine), HT (facteur hiérarchique température prébloom en premier puis température bloom + ajout d'azote et de phosphore), et HL (facteur hiérarchique lumière prébloom en premier puis lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16.

Tous ces résultats (Tableau 5) sont en accord avec les résultats de biomasse et d'abondance (FIRE et de la cytométrie en flux) décrits précédemment.

Effectivement, une croissance importante du phytoplancton (p -valeur = 0,005) a été observée lorsqu'il y a eu rajout de sels nutritifs en condition de pré-bloom (passage de $0,90 \text{ j}^{-1}$ pour PBS à $1,38 \text{ j}^{-1}$ pour PBNP) et en condition de bloom (passage de $0,67 \text{ j}^{-1}$ pour BS à $1,65 \text{ j}^{-1}$ pour BNP).

Toutefois, l'ajout de cobalamine n'a pas intensifié la croissance du phytoplancton total en condition de bloom (passage de $1,65 \text{ j}^{-1}$ BNP à $1,45 \text{ j}^{-1}$ pour BV).

L'effet positif de l'augmentation de la température seule est également confirmé avec un passage de $1,38 \text{ j}^{-1}$ pour PBNP à $1,60 \text{ j}^{-1}$ pour TB, bien qu'il soit peu significatif (p -valeur = 0,795).

L'effet négatif de la lumière dans le développement algale est aussi confirmé PBNP $\rightarrow 1,38 \text{ j}^{-1}$ LB $\rightarrow 1,15 \text{ j}^{-1}$ (p -valeur = 0,047).

L'effet hiérarchique de l'augmentation en température en premier (p -valeur = 0,05) est également confirmé par les taux de croissance HT $\rightarrow 1,63 \text{ j}^{-1} > , BV \rightarrow 1,45 \text{ j}^{-1} > PBV \rightarrow 1,02 \text{ j}^{-1}$. La comparaison entre le traitement HT et TB montrait que leurs taux de croissance étaient similaires (Tableau 5).

<i>Traitements</i>	$\mu(\text{en } \text{j}^{-1})$
<i>PBS</i>	$0,52 \pm 0,08$
<i>PBNP</i>	$0,79 \pm 0,03$
<i>PBV</i>	$0,84 \pm 0,35$
<i>TB</i>	$0,83 \pm 0,09$
<i>LB</i>	$0,67 \pm 0,06$
<i>BS</i>	$0,53 \pm 0,14$
<i>BNP</i>	$0,83 \pm 0,16$
<i>BV</i>	$0,85 \pm 0,01$
<i>HT</i>	$0,96 \pm 0,22$
<i>HL</i>	$0,67 \pm 0,12$

Tableau 6 : Tableau des différents taux de croissance bactériens soumis à différents traitements : PBS (prébloom sans ajout), PBNP (PB + ajout d'azote et de phosphore), PBV (PBNP + ajout de cobalamine), TB (température bloom + ajout d'azote et de phosphore), LB (lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), BS (bloom sans ajout), BNP (bloom + ajout d'azote et de phosphore), BV (BNP + ajout de cobalamine), HT (facteur hiérarchique température prébloom en premier puis température bloom + ajout d'azote et phosphore), et HL (facteur hiérarchique lumière prébloom en premier puis lumière bloom + ajout d'azote et de phosphore), de l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16.

Enfin, en ce qui concerne les taux de croissance bactériens calculés en fonction des différents traitements (Tableau 6), il était bien visible que ces derniers ont des taux de croissance similaires à ceux du phytoplancton (Tableau 5), ce qui pourrait suggérer une association entre les bactéries et le phytoplancton.

Cependant, les courbes des cumulés entre le phytoplancton et les bactéries (Figure 17 et Figure 18) semblent contredire cette hypothèse et affirmer que seule la présence de sels nutritifs améliore la croissance bactérienne, comme il a été montré avec la présence de deux évolutions différentes, avec et sans ajout de sels nutritifs (Figure 18).

Pour le phytoplancton, la présence de sels nutritifs et l'augmentation de la température favoriseraient sa croissance, cette augmentation avec la température n'a pas eu de répercussions positives sur la croissance des bactéries.

Conclusion

Le stage réalisé dans le cadre du projet PHOTO-PHYTO visait, à déterminer l'importance des facteurs physiques (température et lumière) versus les facteurs chimiques (présence de nutriments et de vitamines B12), et la hiérarchie de ces facteurs sur le déclenchement du développement printanier des communautés phytoplanctoniques de la lagune de Thau. Les problématiques posées au début de cette expérience professionnelle étaient les suivantes :

- Le développement des algues au printemps se fait-il lorsque la température augmente **ou** lorsque la photopériode augmente ?
- Le développement des algues au printemps se fait-il lorsque la température **et** la lumière augmentent ? ou d'abord la température puis la lumière ? ou d'abord la lumière puis la température ?
- Le développement des algues au printemps se fait-il lorsque la quantité en nutriment et en vitamine B12 augmente ?

Les différents résultats obtenus ont pu apporter quelques éléments de réponse aux questions posées. Effectivement, il a été montré, et cela de manière significative, que le développement du phytoplancton se fait lorsque certaines conditions sont réunies :

L'apport du milieu en sels nutritifs (azote, phosphore...) doit être suffisant, car les sels nutritifs sont le facteur principal dans le déclenchement du bloom phytoplanctonique.

La cobalamine ou B₁₂ quant à elle, n'est pas un déclencheur de la production algale, mais plutôt un cofacteur de croissance. Cependant, ce composé est nécessaire au développement du phytoplancton puisqu'il intensifie et accélère la croissance de ce dernier, lorsque celui-ci est en présence de plus de nutriments disponibles.

La température, elle, a un effet positif sur l'initiation du bloom phytoplanctonique, au contraire de la lumière qui, elle, a un effet négatif (phot inhibition à court-terme).

Il a également été prouvé qu'il y avait bel et bien un effet hiérarchique avec la température en premier, qui peut compenser l'effet négatif d'une augmentation de la lumière brusque (ensoleillement soudain) dans le déclenchement du bloom du phytoplancton.

Enfin, il ne semble pas avoir de couplage entre le phytoplancton et les bactéries, mais plutôt un effet direct et positif des nutriments inorganiques pour la croissance de ces dernières.

Références bibliographiques

- Audouin, J., 1962. Hydrologie de l'étang de Thau [WWW Document]. URL <http://archimer.ifremer.fr/doc/1962/publication-4244.pdf> (accessed 5.18.15).
- Bertrand, E.M., Allen, A.E., 2012. Influence of vitamin B auxotrophy on nitrogen metabolism in eukaryotic phytoplankton. *Front. Microbiol.* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00375
- Bertrand, E.M., McCrow, J.P., Moustafa, A., Zheng, H., McQuaid, J.B., Delmont, T.O., Post, A.F., Sipler, R.E., Spackeen, J.L., Xu, K., Bronk, D.A., Hutchins, D.A., Allen, A.E., 2015. Phytoplankton–bacterial interactions mediate micronutrient colimitation at the coastal Antarctic sea ice edge. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 9938–9943. doi:10.1073/pnas.1501615112
- Biedendieck, R., Malten, M., Barg, H., Bunk, B., Martens, J.-H., Deery, E., Leech, H., Warren, M.J., Jahn, D., 2010. Metabolic engineering of cobalamin (vitamin B₁₂) production in *Bacillus megaterium*. *Microb. Biotechnol.* 3, 24–37. doi:10.1111/j.1751-7915.2009.00125.x
- Cáceres, C., Taboada, F.G., Höfer, J., Anadón, R., 2013. Phytoplankton Growth and Microzooplankton Grazing in the Subtropical Northeast Atlantic. *PLoS ONE* 8, e69159. doi:10.1371/journal.pone.0069159
- Carlucci, A.F., Silbernagel, S.B., McNally, P.M., 1969. Influence of temperature and solar radiation on persistence of vitamin B₁₂, thiamine, and biotin in seawater.
- Chang, J., Carpenter, E.J., 1991. Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. V. Application to natural populations in Long Island Sound. *Mar Ecol Prog Ser* 78, 115–122.
- Cloern, J.E., Foster, S.Q., Kleckner, A.E., 2014. Phytoplankton primary production in the world's estuarine-coastal ecosystems. *Biogeosciences* 11, 2477–2501. doi:10.5194/bg-11-2477-2014
- Fiala, M., 1982. Vitamine B₁₂ et phytoplancton au niveau de la thermocline en Méditerranée nord-occidentale. *Oceanol. Acta* 5, 339–347.
- Fouilland, E., Mostajir, B., Torréton, J.-P., Bouvy, M., Got, P., Le Floch, E., Nouguié, J., Charrière, B., Sempéré, R., Vidussi, F., 2013. Microbial carbon and nitrogen production under experimental conditions combining warming with increased ultraviolet-B radiation in Mediterranean coastal waters. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 439, 47–53. doi:10.1016/j.jembe.2012.10.014
- Fouilland, E., Tolosa, I., Bonnet, D., Bouvier, C., Bouvier, T., Bouvy, M., Got, P., Le Floch, E., Mostajir, B., Roques, C., Sempéré, R., Sime-Ngando, T., Vidussi, F., 2014. Bacterial carbon dependence on freshly produced phytoplankton exudates under different nutrient availability and grazing pressure conditions in coastal marine waters. *FEMS Microbiol. Ecol.* 87, 757–769. doi:10.1111/1574-6941.12262
- Harrison, H.N., Shuck, J.M., Caldwell, E., 1975. Studies of the pain produced by mafenide acetate preparations in burns. *Arch. Surg. Chic. Ill* 1960 110, 1446.
- Helliwell, K.E., Lawrence, A.D., Holzer, A., Kudahl, U.J., Sasso, S., Kräutler, B., Scanlan, D.J., Warren, M.J., Smith, A.G., 2016. Cyanobacteria and Eukaryotic Algae Use Different Chemical Variants of Vitamin B₁₂. *Curr. Biol.* 26, 999–1008. doi:10.1016/j.cub.2016.02.041
- Holmquist, B., Vallee, B.L., 1976. Esterase activity of zinc neutral proteases. *Biochemistry (Mosc.)* 15, 101–107.
- Jones, D.O.B., Yool, A., Wei, C.-L., Henson, S.A., Ruhl, H.A., Watson, R.A., Gehlen, M., 2014. Global reductions in seafloor biomass in response to climate change. *Glob. Change Biol.* 20, 1861–1872. doi:10.1111/gcb.12480

- Koch, F., Marcoval, M.A., Panzeca, C., Bruland, K.W., Sañudo-Wilhelmy, S.A., Gobler, C.J., 2011. The effect of vitamin B₁₂ on phytoplankton growth and community structure in the Gulf of Alaska. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1023–1034. doi:10.4319/lo.2011.56.3.1023
- Mostajir, B., Roques, C., Bouvier, C., Bouvier, T., Fouilland, É., Got, P., Le Floch, E., Nougier, J., Mas, S., Sempéré, R., others, 2015. Microbial food web structural and functional responses to oyster and fish as top predators. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 535, 11–27.
- Panzeca, C., Beck, A.J., Leblanc, K., Taylor, G.T., Hutchins, D.A., Sañudo-Wilhelmy, S.A., 2008. Potential cobalt limitation of vitamin B₁₂ synthesis in the North Atlantic Ocean: Co AND VITAMIN B₁₂ IN THE N. ATLANTIC. *Glob. Biogeochem. Cycles* 22, n/a-n/a. doi:10.1029/2007GB003124
- Rodriguez, I.B., Ho, T.-Y., 2015. Influence of Co and B₁₂ on the growth and nitrogen fixation of *Trichodesmium*. *Front. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00623
- Rousseaux, C.S., Gregg, W.W., 2015. Recent decadal trends in global phytoplankton composition: TRENDS IN PHYTOPLANKTON COMPOSITION. *Glob. Biogeochem. Cycles* 29, 1674–1688. doi:10.1002/2015GB005139
- Suárez-Suárez, A., Tovar-Sánchez, A., Rosselló-Mora, R., 2011. Determination of cobalamins (hydroxo-, cyano-, adenosyl- and methyl-cobalamins) in seawater using reversed-phase liquid chromatography with diode-array detection. *Anal. Chim. Acta* 701, 81–85. doi:10.1016/j.aca.2011.04.040
- Vidussi, F., Mostajir, B., Fouilland, E., Le Floch, E., Nougier, J., Roques, C., Got, P., Thibault-Botha, D., Bouvier, T., Troussellier, M., 2011. Effects of experimental warming and increased ultraviolet B radiation on the Mediterranean plankton food web. *Limnol. Oceanogr.* 56, 206–218. doi:10.4319/lo.2011.56.1.0206
- Zhu, Q., Aller, R.C., Kaushik, A., 2011. Analysis of vitamin B₁₂ in seawater and marine sediment porewater using ELISA: Vitamin B₁₂ analysis in seawater using ELISA. *Limnol. Oceanogr. Methods* 9, 515–523. doi:10.4319/lom.2011.9.515

Annexes

Annexe 1 : Protocole FIRE (Fluorescence induction relaxation system)

Prélever 8 ml par flasks
Laisser les échantillons à la température 'bloom' dans l'incubateur.
Dans le labo, allumer le FIRE sans oublier la clef USB et mettre en route l'incubateur à la température 'pré-bloom'. Basculer également le bouton de la LED bleue.
Laisser les échantillons dans l'incubateur au noir au moins 30 minutes

FIRE : menu

Exc Profile : excb1200.txt (sauf si gain = 2400 alors excb2400.txt)

Filename : in'ddmm'.000 (le numéro de fichier va s'incrémenter à chaque acquisition, pas besoin de le modifier à chaque fois).

Gain : 0 à 2400. Incrémentation par pas de 200, moins il y a de biomasse, plus le gain doit être élevé, partir du gain de la veille. Faire un 1^{er} test, si le signal n'atteint pas 20, augmenter le gain, s'il dépasse 95, diminuer le gain.

Number of samples : 30 si gain à 2400 sinon 20

STF : 100

Agiter doucement l'échantillon. Rincer une fois la cuvette avec l'échantillon et la remplir avec 2,5 ml.

Appuyer sur la touche 's' pour démarrer l'acquisition.

Une fois l'acquisition terminée, surtout ne pas oublier de sauvegarder en appuyant sur 'w'. Un message s'affiche.

Récupérer l'échantillon et le verser dans la seringue équipée du filtre seringue et rajouter le reste d'échantillon = utiliser le filtrat pour faire le blanc. Passer à l'échantillon suivant.

Ne pas oublier de changer la température de l'incubateur avant d'aller chercher les échantillons restés à la Tbloom

Passer les blancs à la fin (bien rincer la cuvette auparavant) en utilisant un nom de fichier bk'ddmm'.000. Respecter pour chaque blanc le gain utilisé lors de la mesure des échantillons correspondants. Faire 20 acquisitions par blanc.

Pour l'analyse des fichiers utiliser Firepro ('2' dans le menu)

Rentrer le nom de fichier puis taper 'i' (import), puis dans le menu taper '5' Quit

Pour copier les fichiers : copy 'nomdefichier' d :

Eteindre l'appareil.



Annexe 2 : Protocole de cytométrie

Pour la préparation du SYBR Green (S7563, Invitrogen, 2% concentration finale)

- Mettre 500 μ l de SYBR Green dans un tube Falcon
- Compléter avec 4,5 ml d'eau miliQ et vortexer
- Prélever 500 μ l de la solution obtenue et verser dans un Eppendorf de 1,8ml
- Répéter l'opération 10 fois



Phytoplancton

Préparation des billes trucount :

- Prendre une bille trucount et la diluer dans 500 μ l d'eau distillée

Préparation des tubes trucount :

- Pipetter 60 μ l de bille trucount
- Ajouter 420 μ l d'eau salée (36%) filtrée à 0,2 μ
- Ajouter 10 μ l de bille nano
- Ajouter 10 μ l de bille pico

→ Volume final 500 μ l

Préparer 6 tubes, en faire passer 3 au début de la série et 3 en fin de série afin de contrôler le débit du cytomètre.

Préparation des tubes d'échantillons :

- 480 μ l d'échantillon
- 10 μ l de bille pico
- 10 μ l de bille nano

→ Volume final 500 μ l

Faire un passage de 4 minutes par échantillon en "High"

Bactéries

Préparation des billes trucount :

- Prendre une bille trucount et la diluer dans 500 μ l d'eau distillée

Préparation des tubes trucount :

- Pipetter 65 μ l de bille trucount
- Ajouter 310 μ l d'eau salée (36%) filtrée à 0,2 μ
- Ajouter 25 μ l de bille pico

→ Volume final 400 μ l

Préparer 6 tubes, en faire passer 3 au début de la série et 3 en fin de série afin de contrôler le débit du cytomètre.

Préparation des tubes d'échantillons :

- Pipetter 300 μ l d'échantillon dans des éppendorf
- Ajouter 8 μ l du marqueur SYBR Green :
- Placer 20' obscurité
- Prélever 50 μ l d'échantillon marqué + 25 μ l de pico
- Compléter avec 325 μ l d'eau salée (36%)

→ Volume final 400 μ l

Faire un passage de 3 minutes en "Low"

Annexe 3 : Extraction de la cobalamine

- Produits chimiques

- Méthanol
- Résine C18 Bondésil
- HCl 1M
- Kit ELISA contenant 1 microplaque, 6 standards de vitamin B12, solution de 'conjugate' (vitamin B12-peroxidase), solution de substrat (TMB), solution stop (H₂SO₄, 0.5 M), solution de dilution (PBS), solution de rinçage (PBS + Tween 20) à diluer 10 fois (1 ml pour 9 ml MilliQ) avant utilisation, 2 feuilles plastique, un sac plastique de stockage, des strips non-utilisés
- Eau milliQ

- Matériel

- Pompe péristaltique et tuyaux diamètre interne 1.85 mm
- Membranes polycarbonate 0,2 µm
- Set de filtration
- Set de colonnes SPE
- Pipette et tips 10 mL
- Pipette et tips 1 mL
- Pipette multi canaux et tips 100 µL
- Sorbonne
- pHmètre
- agitateur microplaque
- lecteur microplaque OD à 450 nm et 620 nm

- Préparation des colonnes

Mélanger 2 g de C18 Bondesil avec 10 mL de méthanol, remplir une colonne SPE en polypropylène. Faire passer 10 mL de méthanol puis faire passer 10 ml d'eau MilliQ.

- Extraction

- Filtrer x L d'EM sur membrane polycarbonate 0,2 µm
- Ajuster le pH du filtrat à 6.4 avec de l'HCl 1M après étalonnage du pHmètre
- Faire passer x L par colonne à la vitesse de 1 ml/min
- Rincer la colonne avec 20 mL d'eau MilliQ
- Eluer la colonne avec 5 mL de méthanol
- Faire évaporer l'éluat

Mettre au réfrigérateur pour une analyse ultérieure

Annexe 4 : Dosage de la cobalamine

Précautions

- 1- Avant de commencer, les réactifs doivent être à température ambiante (20-25°C)
- 2- Tous les réactifs doivent être homogénéisés doucement avant utilisation
- 3- Reboucher les réactifs immédiatement après leur utilisation
- 4- Utiliser différents embouts pour chaque réactif pour éviter toute contamination
- 5- La gamme étalon et les essais doivent être faits en parallèle, sous les mêmes conditions.
- 6- Ne pas utiliser les réactifs après leur date de péremption.



Réactifs

Le kit contient une quantité de réactifs nécessaire pour déterminer 96 échantillons. Ils doivent être stockés au frais à 2-8°C.

- 1- La microplaque contient 12 bandes avec 8 puits de chaque où l'acs anti Vitamine B12 est déjà fixée.
- 2- Vitamines B12 standards (pour étalon) (0 ; 0,4 ; 1 ; 4 ; 10 ; 40 ng/ml) : 6 flacons avec 0,5 ml de chaque .
- 3- Vitamine B12 conjuguée à la peroxydase : 6 ml (solution rouge)
- 4- Solution de substrat : 15 ml
- 5- Solution stop : 15 ml
- 6- Diluant pour échantillon (PBS) : 2*60 ml
- 7- Solution lavante (PBS+Tween) : 30 ml couleur bleu . Diluer 1+9 avec de l'eau distillée. Si pendant le stockage au froid la solution se cristallise, la chauffer à 37°C pendant 15 minutes

Procédure

- 1- Ajouter 50µl de l'éluat
- 2- Immédiatement ajouter 50 µl de vitamine conjuguée
- 3- Recouvrir les puits
- 4- Incuber 1h à T° ambiante sous agitation
- 5- Rincer 3 fois avec 300µl/puits de PBS+Tween
- 6- Ajouter 100µl de substrat (TMB+H₂O₂)
- 7- Incuber 20 min à l'obscurité et à T° ambiante
- 8- Ajouter 100µl de la solution d'arrêt

Lecture au lecteur de microplaque à 450nm et 620nm



Annexe 5 : Cumulés de l'abondance des populations microbiennes durant l'incubation 3 réalisée du 08/03/16 au 17/03/16

1. Populations phytoplanctoniques

Traitement	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7	Jour 8	Jour 9
PBS	1323,8	3206,5	4014,7	4360,0	4644,1	5118,5	5773,9	6259,9	6883,4
PBNP	1323,8	2788,4	4689,9	6993,1	8884,8	13319,6	19570,9	27941,2	42566,3
PBV	1323,8	3156,5	5206,8	7604,3	11459,2	17175,6	22130,8	32134,3	41249,0
TB	1323,8	3318,6	10232,9	16559,0	23446,8	38512,1	43834,8	52594,6	57876,1
LB	1323,8	1849,4	4219,7	6569,3	10230,6	15055,8	21860,0	30772,0	37289,0
BS	1323,8	3394,3	4599,5	5696,0	6346,6	7297,2	8050,1	9104,0	9834,6
BNP	1323,8	3223,1	9892,5	14294,4	18174,7	24527,0	35564,3	43756,3	49794,3
BV	1323,8	3401,9	10162,5	14305,4	19282,3	27133,8	37279,9	41850,5	46409,4
HT	1323,8	3265,6	10720,8	15741,2	19873,8	29629,6	39733,5	43948,9	48689,8
HL	1323,8	2773,3	4703,5	6864,5	9951,3	15110,9	25078,1	28838,7	32991,7

Figure A : Tableau des cumulés de l'abondance des populations phytoplanctoniques en fonction du temps pour chaque traitement : PBS, PBNP, PBV, TB, LB, BS, BNP, BV, HT et HL

2. Populations bactériennes

Traitement	Jour 1	Jour 2	Jour 3	Jour 4	Jour 5	Jour 6	Jour 7	Jour 8	Jour 9
S	215180,9	499291,3	1906685,7	2569396,0	3342951,4	3852624,7	4086559,3	4147524,0	422920,0
NP	215180,9	509023,5	3850077,5	6128283,7	8006571,9	8675459,3	8836744,6	8977499,0	927049,0
V	215180,9	510095,0	3245517,5	4940125,0	6744926,0	8143936,8	8829146,8	9121446,5	102389,0
	215180,9	574024,3	4816067,8	6625661,8	7024024,9	7175890,6	8021283,4	8866676,3	107962,0
	215180,9	503487,8	3023823,3	5067676,9	6653567,1	7377943,9	7612586,8	7832264,5	829717,0
	215180,9	518666,5	2626628,5	3779662,3	4519188,6	4707796,0	4819097,1	4966704,1	512339,0
IP	215180,9	555095,5	4313254,9	6410781,3	7326754,6	7524594,5	7973340,3	8639698,5	981090,0
	215180,9	571167,1	4859050,6	7268550,3	8475855,1	8703182,6	9130477,5	9885447,3	110849,0
	215180,9	557238,4	4929557,4	6713060,5	7519287,7	7749064,6	8278351,8	9188096,3	105363,0
	215180,9	517416,5	3483465,9	5784035,8	9367724,3	9263939,1	9600675,5	10053421	109811,0

Figure B : Tableau des cumulés de l'abondance des populations bactériennes en fonction du temps pour chaque traitement : PBS, PBNP, PBV, TB, LB, BS, BNP, BV, HT et HL