

Mars - Mai 2024

Rapport de stage

Etude par approche cytométrique de l'influence des
structures océaniques de fine échelle sur la distribution du
bactérioplancton en Méditerranée occidentale – Campagne
océanographique BioSWOT-Med

Ludivine GRAND

ludivine.grand@univ-tlse3.fr



Encadrement :

Gérald GREGORI,

04 86 09 05 15 | gerald.gregori@univ-amu.fr

Chargé de Recherche CNRS

Equipe BIOGEOCHIMIE



Institut Méditerranéen d'Océanologie (M.I.O.), UMR 7294, Marseille

Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu Gérald Grégori, mon tuteur, qui a su m'aiguiller dans mes recherches, et m'accompagner tout en me laissant une grande liberté, notamment sur le choix du sujet de ce stage parmi tous ceux qu'auraient pu abriter ces données. Merci pour sa confiance, et pour l'opportunité donnée de continuer à ses côtés en stage de M2. Je garde précieusement en tête sa bonne humeur permanente, plus réchauffante encore que le soleil brûlant de Marseille.

Je remercie également Aude Barani et Morgane Didry, responsables de la plateforme de cytométrie du M.I.O., pour leur aide au cours de ce stage.

Un merci tout particulier à Laurina Oms pour ses conseils, ses renseignements sur la campagne et sa gentillesse, ainsi qu'à Andréa Doglioli pour ses remarques à propos de mon travail, toujours en quête de justesse scientifique.

Enfin, je remercie le CNES (Centre National d'Etudes Spatiales) et le LEFE-CNRS pour avoir soutenu le projet SWOTAdAC (www.swot-adac.org), à l'origine de cette campagne océanographique.

Avant-propos

Le projet présenté dans ce rapport porte sur l'étude de l'influence des structures océaniques de fine échelle sur la distribution du bactérioplancton en Méditerranée occidentale. Ce type de recherche a nécessité une étude *in situ*, à travers la campagne océanographique BioSWOT-Med qui s'est déroulée l'année dernière (avril-mai 2023). Les analyses et collectes de données *in situ* (mesure de paramètres physico-chimiques, collecte de microorganismes, etc.) étaient ainsi déjà réalisées lors du début de ce stage. Les échantillons de bactérioplancton ont également été analysés en cytométrie en flux par Marceau Dupin, en juin 2023. Ce stage a donc consisté en l'analyse des données cytométriques, déjà disponibles, mais non-traitées pour le moment. Pour la compréhension de ce rapport, de nombreux éléments rappelant le contexte et le déroulement de la campagne et des analyses effectuées sont décrits en partie « Matériels et Méthodes ». Enfin, seule une partie des échantillons bactériens analysés au cours de ce stage ont été étudiés dans les parties « Résultats » et « Discussion » de ce rapport (cf. partie 1.6. « Données traitées »).

Table des matières

Introduction	1
1. Matériels et méthodes	4
1.1. Description de la campagne océanographique	4
1.2. Zone d'étude	4
1.3. Stratégie d'échantillonnage	5
1.3.1. Echantillonnage des objets biologiques <i>in situ</i>	5
1.3.2. Mesures physico-chimiques <i>in situ</i>	5
1.4. Analyse par cytométrie en flux	5
1.4.1. Préparation des échantillons	5
1.4.2. Analyse des échantillons par cytométrie en flux	6
1.4.3. Analyse des données cytométriques	7
1.5. Analyses statistiques et représentations graphiques	8
1.6. Données traitées	8
2. Résultats	8
2.1. Caractéristiques hydrographiques	8
2.2. Caractéristiques biologiques	10
2.2.1. Composition de la communauté bactérioplanctonique	10
2.2.2. Distribution des populations bactériennes au sein des masses d'eau	10
3. Discussion	14
3.1. Caractéristiques hydrographiques des masses d'eau étudiées	14
3.2. Couplage physique-biologie dans une zone frontale	15
3.3. Discrimination des masses d'eau selon le type de variables étudiées	18
Conclusion	19
Références	19
Annexes	21

Résumé

Les fronts océaniques sont des structures de fine échelle répandues dans les océans, et consistent en la zone de rencontre entre deux masses d'eau. Malgré l'importance reconnue du bactérioplancton dans les cycles biogéochimiques et l'omniprésence de ces structures, l'effet des zones frontales sur la distribution des communautés bactériennes dans l'espace reste peu connu. En utilisant la cytométrie en flux afin d'étudier la diversité et l'abondance de cette communauté, et en analysant les caractéristiques physiques et chimiques des masses d'eau, il est démontré de forts changements dans les abondances des populations d'une zone frontale de Méditerranée, et ce verticalement et horizontalement. Le front contenait des abondances bactériennes supérieures aux eaux alentours pour quasiment toutes les populations, la distribution de ces dernières étant principalement corrélée à la température et à la salinité, variables classiquement utilisées pour la discrimination des masses d'eau. Néanmoins, il s'est avéré que les données biologiques discriminent plus nettement les masses d'eau que les données physico-chimiques. Ces résultats, liant écologie microbienne et océanographie physique et chimique, mettent en évidence l'importance de comprendre la structuration des communautés bactérioplanctoniques par les masses d'eau dans le but de l'utiliser comme un modèle plus sensible pour la détermination de leur origine et déplacement.

Mots clefs : couplage physique-biogéochimie, bactérioplancton, front océanique, cytométrie en flux, distribution.

Abstract

Oceanic fronts are fine-scale structures widespread in the oceans, consisting of the meeting zone between two water masses. Despite the recognized importance of bacterioplankton in biogeochemical cycles and the omnipresence of these structures, the effect of frontal zones on the distribution of bacterial communities in space remains poorly understood. By using flow cytometry to study the diversity and abundance of this community, and analyzing the physical and chemical characteristics of water masses, strong changes in population abundances are demonstrated within a Mediterranean frontal zone, both vertically and horizontally. The front contained higher bacterial abundances compared to surrounding waters for almost all populations, with the distribution of these populations primarily correlated with temperature and salinity, variables conventionally used for water mass discrimination. However, it was found that biological data discriminate more clearly water masses than physicochemical data. These results, linking microbial ecology with physical and chemical oceanography, highlight the importance of understanding the structuring of bacterioplankton communities by water masses to use it as a more sensitive model for determining their origin and movement.

Keywords: Physical-biogeochemical coupling, bacterioplankton, oceanic front, flow cytometry, distribution.

Introduction

Les milieux océaniques sont des entités très dynamiques, autant en termes de physique, que de chimie, de géologie ou encore de biologie. A l'origine considérées comme une entité unique, il est aujourd'hui admis que ces étendues sont constituées de plusieurs masses d'eau, persistantes grâce à des différences de température et de salinité en leur sein, les rendant plus ou moins denses, et empêchant leur brassage. Elles sont distinguables à différentes échelles : la macroéchelle, (de 100 à plusieurs milliers de kilomètres), la mésoéchelle (de 10 à 100 kilomètres), la submésoéchelle (de 1 à 10 kilomètres) et la microéchelle (inférieure à 1 kilomètre) (Talley *et al.*, 2011).

De nos jours, la majorité des études océanographiques se concentrent sur les courants permanents, de grande échelle (Wenegrat *et al.*, 2020). Les structures de fine échelle (entre la méso et submésoéchelle), comprenant principalement des tourbillons, des fronts et des filaments, sont peu étudiées du fait de leur caractère éphémère et restreint dans l'espace. Elles s'étendent de 1 à 100 km et subsistent entre plusieurs jours et quelques mois (Talley *et al.*, 2011). Difficiles à caractériser *in situ*, ce sont surtout des satellites (SWOT, Jason, etc.) qui permettent leur étude. Ces données sont ensuite intégrées dans des modèles numériques afin de modéliser les impacts de ces structures sur les organismes et sur la chimie des océans, particulièrement importante dans le contexte du changement climatique, où la compréhension du cycle du carbone et notamment de sa fixation et de sa séquestration sont primordiales (Azam *et al.*, 1994).

Des corrélations entre distribution des organismes et structures océaniques de fine échelle ont été observées (Samo *et al.*, 2014, Baltar & Aristegui, 2017), et ce d'autant plus pour les organismes dérivants, contraints à être transportés passivement par ces masses d'eau (Samo & Moutin, 2012). Certains composent le groupe des microorganismes, pourvus d'une seule cellule et à durée de vie courte (turn-over d'un jour en moyenne (Moger-Reischer & Lennon, 2019)). Cette courte existence permet de caractériser des évolutions rapides dans les communautés, et ceci est d'autant plus pertinent lors de l'étude de structures océaniques éphémères. Ce groupe taxinomique permet donc une étude à haute résolution temporelle de la structuration des populations vivantes par les masses d'eau de fine échelle. Certaines études suggèrent d'ailleurs que ces structures se comportent comme des habitats, en abritant des communautés microbiennes relativement distinctes, notamment en termes de taxon dominant (D'Ovidio *et al.*, 2010). Cette dernière étude précise que les turbulences à mésoéchelle, en créant des masses d'eau aux dynamiques et compositions chimiques contrastées, permettent de maintenir des niches écologiques suffisamment longtemps pour que certains groupes microbiens localement adaptés deviennent dominants. Ces structures finissent ensuite par disparaître, permettant aux eaux de se mélanger et empêchant l'exclusion complète de certains groupes. Le type initialement le plus adapté se retrouve dans un environnement aux conditions distinctes, où une coexistence de plusieurs groupes peut alors être observée. Ce mécanisme de structuration du paysage océanique en

niches écologiques éphémères et fluides à méso et submésoéchelle permet le maintien d'une dominance locale d'un groupe, et d'une dispersion à grande échelle des taxons, passivement transportés par ces structures. Dans les milieux océaniques sont alors notable une faible diversité alpha, mais une diversité gamma importante.

La présente étude se focalise sur le compartiment bactérien hétérotrophe, principal groupe minéralisateur de la matière organique (Reich *et al.*, 2024) de la surface jusqu'en profondeur (B.S. Lambert *et al.*, 2019). C'est un groupe ubiquiste en milieu marin (Pommier *et al.*, 2007), qui joue un rôle important dans les cycles biogéochimiques du carbone, de l'azote, du fer et du phosphore entre autres (Soares *et al.*, 2017, Dyrman *et al.*, 2007). La détection rapide et peu coûteuse de ces organismes au sein des structures océaniques est permise par la cytométrie en flux, seule méthode à haut débit permettant le dénombrement de particules et de cellules, et la discrimination de groupes microbiens sur la base de plusieurs critères morpho-phénotypiques à partir de leurs propriétés optiques.

Dans ce rapport, les bactéries seront étudiées au sein d'un type particulier de structure de submésoéchelle : les fronts. Ils se forment par la déformation de l'écoulement de l'eau, à l'interface entre deux masses d'eau. La littérature reconnaît déjà une plus grande abondance phytoplanctonique dans ces structures (J. S. Franks, 1992), hypothétiquement dû aux mouvements verticaux en leur sein, permettant une remontée de nutriments en faveur de la croissance phytoplanctonique (D'Ovidio *et al.*, 2010). Cela stimule la dynamique bactérienne hétérotrophe (M.L.S. Fontes *et al.*, 2018), ce qui favorise la minéralisation de la matière organique formée par ces autotrophes.

La mer Méditerranée est une zone particulièrement propice à l'étude de ces fronts. En effet, c'est un milieu oligotrophe (pauvre en éléments minéraux) (Moutin & Prieur, 2012), comme la plupart des océans, mais il possède une grande diversité planctonique (Bianchi & Morri, 2000), ce qui conduit à la notion de « Paradoxe du Plancton », à savoir qu'une si grande diversité planctonique dans un milieu si pauvre en ressources est difficilement explicable. Cela peut justement probablement s'élucider par le grand nombre de structures à fine échelle que contient cette mer, qui se comportent comme des niches écologiques différentes (D'Ovidio *et al.*, 2010), induisant une grande diversité à l'échelle de la mer, mais faible à l'échelle de ces structures de fine échelle.

C'est dans ce contexte que s'est déroulée la campagne océanographique internationale BioSWOT-Med (BIOlogical applications of the satellite Surface Water and Ocean Topography in the MEDiterranean) au printemps dernier (<https://doi.org/10.17600/18002392>), avec comme ambition de cibler un front (F) séparant deux masses d'eau (A et B) aux conditions physico-chimiques contrastées dans le but d'en étudier leurs communautés planctoniques. Des données physiques (courants horizontaux, vitesses verticales, etc.), chimiques (concentration en nutriments, en matière organique, en chlorophylle A, en dioxygène dissous, en chlorure de sodium (salinité), etc.) et biologiques (virus,

microorganismes et zooplancton) ont été recueillies, à différentes profondeurs et heures de la journée dans chaque masse d'eau. Le but de cette étude est d'étudier le couplage entre processus physiques et biologiques en termes de dynamique spatiale (verticale et horizontale).

Comme le suggèrent les études citées précédemment, ces trois masses d'eau devraient contenir des assemblages microbiens relativement différents, s'il est considéré qu'elles correspondent à des niches distinctes. Cette étude investigate ainsi de quelle façon les structures océaniques de fine échelle influencent la distribution du bactérioplancton. Pour y répondre, quatre hypothèses sont définies (Fig. 1) : i) les trois masses d'eau comportent des communautés qui leurs sont spécifiques, une limite physique semblerait empêcher le brassage des eaux et donc le mélange des communautés, indiquant que les structures océaniques se comportent comme des entités indépendantes (Fig.1 (a)), ii) les zones A et B contiennent des communautés distinctes, le front consiste en un mélange de ces communautés (Fig.1 (b)), iii) les trois masses d'eau contiennent une communauté similaire, elles ne structurent donc pas la distribution des populations (Fig.1 (c)), et enfin, ii) les communautés des trois masses d'eau se mélangent partiellement, un gradient est observable dans la différenciation des communautés, il existe une structuration spatiale non-stricte des masses d'eau (Fig.1 (d)).

Le sujet de ce rapport, en plus d'étudier la façon dont les masses d'eau structurent les communautés bactériennes, est de comparer comment les masses d'eau sont discriminées à partir des données physico-chimiques et biologiques. Historiquement, ces masses d'eau sont définies par des différences en termes de température et de salinité, mais les microorganismes, extrêmement sensibles à leur environnement et ne pouvant survivre que dans une combinaison spécifique de ces variables environnementales, pourraient devenir un indicateur plus fin que la chimie pour les discriminer.

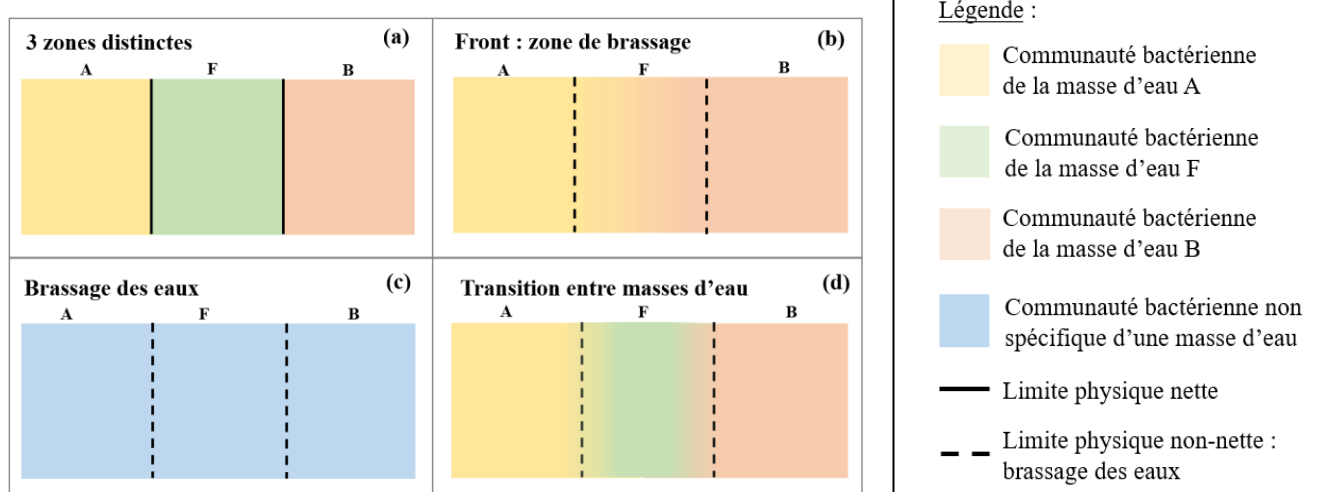


Figure 1 – Représentation schématique des quatre hypothèses principales concernant la structuration des communautés bactériennes par les trois masses d'eau étudiées lors de la campagne BioSWOT-Med. Inspiré de Lévy et al., 2018.

1. Matériels et méthodes

1.1. Description de la campagne océanographique

La campagne océanographique BioSWOT-Med s'est tenue non loin des Iles Baléares, dans les eaux Méditerranéennes nord-occidentales, du 20 avril au 15 mai 2023 à bord de l'Atalante, navire de recherche de la FOF (Flotte Océanographique Française) affrété par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la MER) (Fig. 2 (a)). Les trois masses d'eau prospectées ont été identifiées par images satellites de l'altimètre de l'orbiteur NASA-CNES SWOT (Surface Water Ocean Topography), et par des modèles mathématiques construits à partir de données collectées par des bouées dérivantes (CARTHE drifters). Cela permet une stratégie d'échantillonnage dite « Lagrangienne adaptative », consistant à se déplacer en même temps que les masses d'eau et permettant donc de suivre en temps réel les structures océaniques.

1.2. Zone d'étude

La zone d'étude se compose de trois masses d'eau : i) « A » une masse d'eau ouverte et productive (forte abondance de phytoplancton (Fig. 3)). Elle correspond à de vieilles eaux Atlantiques, entrées en Méditerranée par le détroit de Gibraltar puis modifiées par brassage avec les eaux méditerranéennes, réchauffement et évaporation, ii) « B » une masse d'eau fermée de type tourbillonnaire et moins productive, composée de plus jeunes eaux Atlantiques modifiées, et enfin iii) « F » une masse d'eau turbulente, correspondant à un front ; zone de rencontre entre les masses d'eau A et B.

Trois salves d'échantillonnage ont eu lieu : la première du 24 au 28 avril 2023 (A1, B1 et F1), la seconde du 4 au 7 mai 2023 (A2, B2 et F2) et la troisième le 13 mai 2023 (B3) (Fig. 2 (b)). Une tempête, survenue entre ces deux salves, a empêché une troisième prise complète d'échantillons initialement prévue. Le trajet effectué pour échantillonner les zones A, B et F s'est réalisé en couronne (Fig. 2 (b)) afin de prospecter les trois masses d'eau à intervalle de temps régulier.

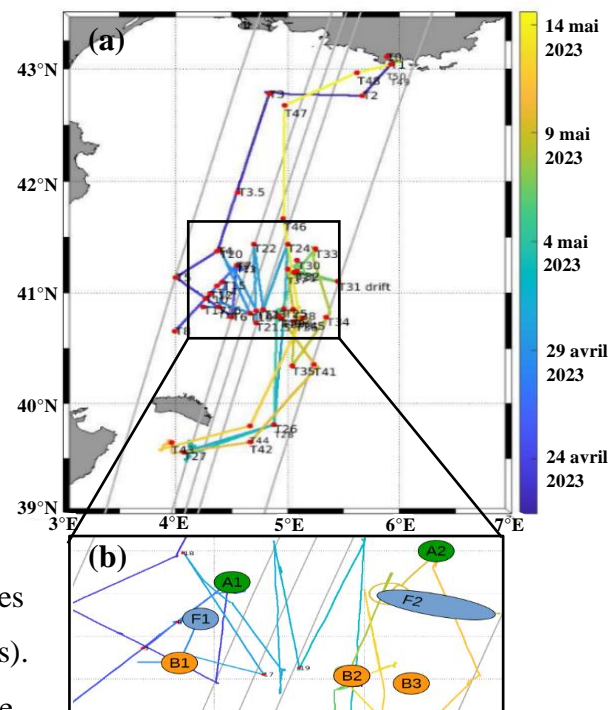


Figure 2 – (a) Trajet effectué par le bateau lors de la campagne. Les couleurs correspondent aux dates de traversée des eaux et les points aux zones échantillonnées. (b) Echantillonnage « en couronne » des trois masses d'eau étudiées. Crédit : Doglioli A.

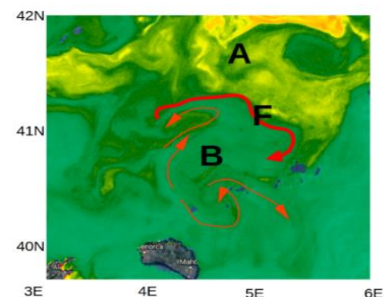


Figure 3 – Carte de haute résolution de la concentration en chlorophylle en surface (vert foncé : 0,1 µg/L, rouge : 1 µg/L) illustrant la zone d'étude le premier jour de la campagne (21 avril 2023). Crédit : D'Ovidio F.

1.3. Stratégie d'échantillonnage

1.3.1. Echantillonnage des objets biologiques *in situ*

Deux stratégies d'échantillonnage ont été utilisées lors de la campagne pour la collecte de microorganismes : i) collecte d'échantillons par des bouteilles hydrologiques (Niskin), disposées sur un carrousel (Fig. 4 (a)), en rosette (24 bouteilles par carrousel afin d'échantillonner à des profondeurs différentes en une seule descente), permettant l'échantillonnage de la surface à 500 mètres de profondeur, et ii) collecte d'échantillons par pompage directement à partir du bateau grâce à deux tuyaux attachés à une sonde CTD lestée, et reliés à une pompe, permettant un échantillonnage à haute fréquence (tous les 2 à 4 mètres) entre la surface et 50 mètres de profondeur (Fig. 4 (b)). Cette dernière méthode d'échantillonnage n'a jamais été réalisée à une telle résolution lors de précédentes campagnes, et constitue des données inédites en océanographie.



Figure 4 – Outils utilisés lors de la campagne pour la collecte de microorganismes. (a) Carrousel. (b) Système de pompage. Crédit : Grégori G.

1.3.2. Mesures physico-chimiques *in situ*

De nombreuses mesures de caractéristiques physico-chimiques ont été effectuées à bord. Seules les données de salinité, température, fluorescence, conductivité et turbidité ont été utilisées pour cette étude¹. Leur mesure s'est effectuée grâce à des sondes embarquées sous le carrousel : CTD (mesure de la conductivité, température et densité/profondeur), fluorimètre (mesure de la fluorescence chlorophyllienne) et turbidimètre (mesure de la turbidité, proxy de la quantité de matière en suspension).

1.4. Analyse par cytométrie en flux

1.4.1. Préparation des échantillons

Les échantillons provenant du carrousel ont été transvasés des bouteilles Niskin à des tubes Falcon® de 25mL et ont été fixés selon le protocole suivant : 20 µl d'une solution de glutaraldéhyde-pluronic + 1 980 µl d'échantillon afin de conserver les cellules en leur état physiologique, et d'éviter la dégradation cellulaire dans le cas présent où les échantillons sont analysés plusieurs mois après la campagne. Ils ont ensuite été incubés pendant 30 minutes à l'obscurité afin d'optimiser la fixation des cellules, puis ont rapidement été congelés dans de l'azote liquide avant d'être stockés à -80°C jusqu'à l'analyse en laboratoire. Les échantillons provenant du pompage ont été directement prélevés à bord grâce à deux tuyaux de prélèvement et mis dans des tubes Falcon® de 25 ml, rincés 3 fois avec l'eau

¹ Les mesures de sels nutritifs, de matière organique et autres ne sont pas encore disponibles car en cours d'analyse.

de mer pompée, puis fixés dans des cryotubes de 25 ml selon le même protocole que pour les échantillons provenant du carrousel.

1.4.2. Analyse des échantillons par cytométrie en flux

L'analyse des échantillons par cytométrie en flux a été réalisée par le cytomètre Cytoflex®(Beckman Coulter®) de la plateforme de cytométrie PRECYM (Plateforme Régionale de Cytométrie pour la Microbiologie (<http://precym.com.univ-mrs.fr>)) du M.I.O². La cytométrie en flux consiste en une analyse optique, à haut débit (jusqu'à plusieurs par seconde) et à l'échelle individuelle, de particules (dont les cellules) en suspension dans un fluide (liquide de gaine) suite à leur excitation par un faisceau laser bleu (488nm) et violet (405 nm)³.

Les échantillons du carrousel et du pompage ont d'abord été décongelés au laboratoire, puis incubés avec du Sybr Green (Sigma®), fluorochrome se liant aux acides nucléiques et émettant de la fluorescence verte lors de son excitation par le laser du cytomètre, et des billes de calibrage de diamètre 2µm, repères de taille afin de discriminer les bactéries des particules de taille plus importante.

Les données acquises grâce au logiciel CytExpert® (version 2.5) lors du passage des échantillons dans le cytomètre, en particulier les différents signaux optiques enregistrés (diffusion de la lumière et fluorescences des cellules), permettent la génération de graphiques bidimensionnels appelés « cytogrammes ». Cinq variables (canaux de diffusion) utiles à la suite de l'analyse des échantillons bactériens ont été conservées et représentées sur les cytogrammes. Le canal de détection FSC (Forward Scatter) correspond à la diffusion vers l'avant et aux petits angles de la lumière du laser bleue par la particule. C'est un proxy de la taille des particules. Le canal SSC (Side Scatter) est associé à la diffusion de la lumière incidente bleue par les particules à 90°. C'est un proxy de la granularité (complexité de la structure interne) et de la taille des particules. vSSC mesure la même variable de diffusion que le SSC mais à partir du faisceau laser violet, plus efficace et plus résolutif pour la détection de petites particules comme les bactéries. Le canal Sybr Green-FITC (Fluorescein Isothiocyanate) correspond à la fluorescence verte induite par le Sybr Green, après excitation par le laser. Sa fluorescence est proportionnelle à la quantité d'acides nucléiques dans la cellule, c'est donc un proxy de la taille du génome. Enfin, PC5.5-Chlorophylle *a* (PerCP-Cyanine5.5) se rapporte à la fluorescence rouge de la chlorophylle *a* après excitation par le laser bleu. Sa fluorescence est proportionnelle à la quantité de pigments chlorophylliens.

² Les analyses des échantillons par cytométrie en flux n'ayant pas été réalisées au cours de ce stage et étant relativement complexes, elles ne seront détaillées finement qu'en Annexe (Partie 2.). Seules les informations indispensables à la compréhension de ce rapport concernant cette partie sont présentées.

³ Le principe de la cytométrie en flux est décrit plus largement en Annexe (Partie 1.).

1.4.3. Analyse des données cytométriques

L'analyse des cytogrammes est également effectuée à partir du logiciel CytExpert®. Elle a consisté en la discrimination de populations⁴ bactériennes à l'aide d'une stratégie de fenêtrage. Elle vise à éliminer successivement les événements⁵ de taille supérieure à celle des bactéries (Fig. 5 (a)), le phytoplancton (Fig. 5 (b)), puis le « bruit » (débris cellulaires, particules virales, etc.) (Fig. 5 (c)). Cela permet ensuite de discriminer les bactéries en populations à partir de leur taille (canal vSSC) et de la quantité d'acide nucléique qu'elles contiennent (canal Sybr Green - FITC) (Fig. 5 (d)). 1 020 échantillons de bactéries, en provenance du carrousel et du pompage, ont été analysés au cours de ce stage.

Les populations sont nommées selon leur position dans le cytogramme par rapport aux deux axes. 4 dénominations sont possibles concernant l'axe des abscisses, indiquant la taille des cellules (vSSC) : LowSSC (faible valeur sur l'axe, petites cellules), MediumSSC (cellules de taille moyenne), HighSSC (grandes cellules) et VeryHighSSC (très grandes cellules). A propos de l'axe des ordonnées, indiquant le contenu en acides nucléiques (Sybr Green), 3 dénominations sont possibles : LNA (Low nucleid acid : faible valeur sur l'axe, la cellule fluoresce peu, elle contient donc peu d'ADN), MNA (Medium nucleid acid : cellules avec un contenu moyen en

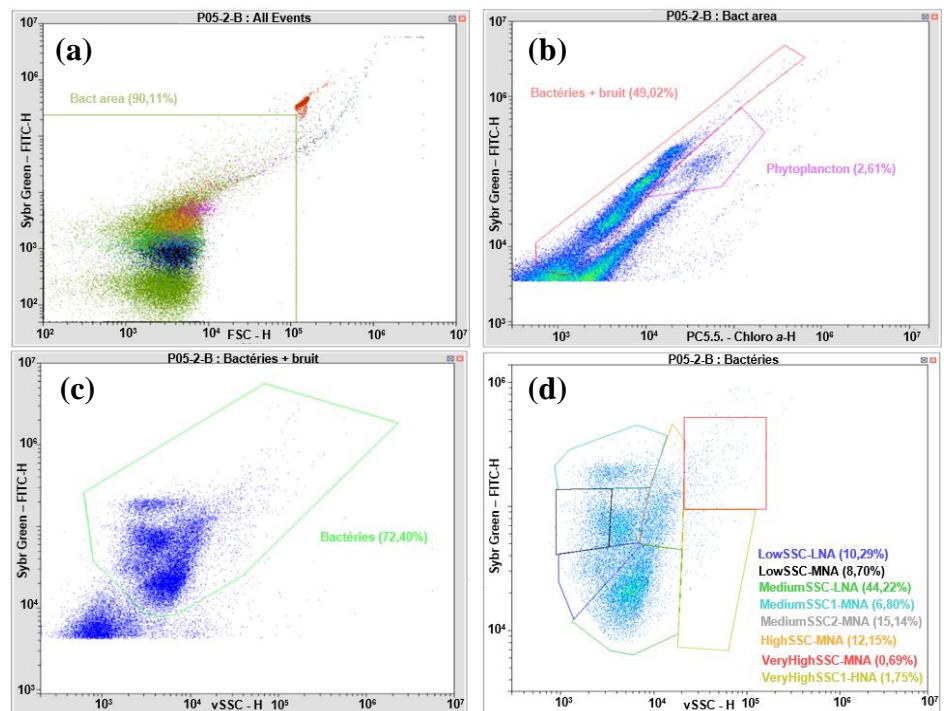


Figure 5 – Cytogrammes illustrant la stratégie de fenêtrage utilisée pour l'étude des bactéries. Exemple de l'échantillon « P05-2-B » provenant de la masse d'eau F, échantillonnée l'après-midi, à 2 mètres de profondeur. (a) cytogramme SSC-FSC permettant l'élimination d'événements de taille supérieure à $2\mu\text{m}$ (repère : billes $2\mu\text{m}$), (b) cytogramme FITC-PC5.5 permettant l'élimination du phytoplancton, (c) cytogramme FITC-vSSC permettant l'élimination des particules fluoresçant peu (« bruit ») et (d) cytogramme FITC-vSSC dépourvu de « bruit », permettant la discrimination des populations bactériennes.

⁴ Le terme population employé ici est différent de celui usuellement utilisé en écologie. Il renvoie à un groupe discerné en cytométrie en flux, ces groupes pouvant en réalité contenir plusieurs espèces similaires de par leur taille et celle de leur génome. Cela doit donc être considéré sur le plan statistique et non de biodiversité.

⁵ Les événements, en cytométrie en flux, correspondent à une particule détectée par le cytomètre. Tant que l'élimination des particules non-vivantes n'est pas effectuée, les points visibles sur les cytogrammes sont appelés « événements », et non « cellules ».

ADN) et HNA (High nucleid acid : cellules contenant une importante quantité d'ADN). Les populations comportent donc des noms combinés, détaillés en partie Résultats.

Les fenêtres créées comptabilisent le nombre de cellules en leur sein. Le calcul suivant est effectué pour chaque fenêtre de chaque échantillon afin d'obtenir l'abondance de chaque population à chaque profondeur. Le facteur de dilution correspond à la dilution de l'échantillon d'eau de mer par la solution de microbilles, de Sybr Green et de glutaraldéhyde-pluronique.

$$Abondance (cellules/mL) = \frac{\text{nombre de cellules par fen\^etre}}{\text{volume d'\^echantillon analys\^e (\mu L)}} \times \text{facteur de dilution} \times 1000$$

1.5. Analyses statistiques et représentations graphiques

Le logiciel Ocean Data View (ODV) (version 5.7.0) a été utilisé afin de créer des profils, des transects et des cartes de la zone marine étudiée. La génération de cartes représentant l'abondance totale de chaque population en un point de surface a nécessité une intégration de l'abondance de chaque population sur toute la colonne d'eau échantillonnée. La méthode d'interpolation « Weighted-average gridding » a été utilisée pour la création des transects.

Le logiciel RStudio (version 2023.06.2+561) et le package « ade4 » ont été utilisés afin de réaliser des Analyses de Composantes Principales (ACP) permettant de discriminer les masses d'eau à partir de leurs propriétés physico-chimiques (température, conductivité, salinité, fluorescence et turbidité) et biologiques (abondances bactériennes des populations qu'elles abritent). Les variables ont été normées. Des corrélations entre variables physico-chimiques et abondances bactériennes ont été calculées à partir d'un test non-paramétrique de Spearman et un diagramme en bâtons a été généré afin de comparer les abondances bactériennes des trois masses d'eau.

Enfin, des indices de Shannon ont été calculés (formule et détails selon Shannon, 1948) afin de caractériser la diversité (richesse et régularité) des masses d'eau. Cet indice a été calculé pour chaque profondeur de chaque masse d'eau, à partir des abondances des populations bactériennes.

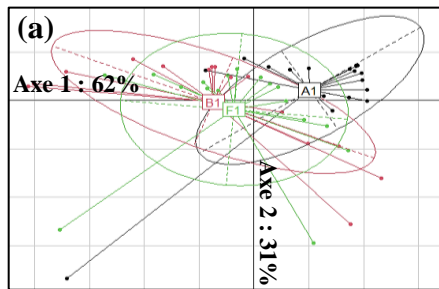
1.6. Données traitées

Seules les données des échantillonnages ayant eu lieu les après-midi ont été utilisées dans ce rapport, étant les plus variables, de même que seules les données de pompage, dont l'échantillonnage à haute résolution consiste en la particularité inédite de la campagne (cf partie 2.3.1.) et la première salve d'échantillonnage (A1, F1 et B1) ont été étudiées.

2. Résultats

2.1. Caractéristiques hydrographiques

A, B et F sont des masses d'eau relativement similaires d'un point de vue de leurs conditions physico-chimiques (partielle superposition sur le plan défini par les deux premières composantes principales)



(b)

Variable	Axe 1	Axe 2
Température (°C)	-0.983	-0.024
Conductivité (S/m)	-0.969	-0.041
Salinité (PSU)	0.727	-0.087
Fluorescence (mg/m ³)	0.652	-0.615
Turbidité (FTU)	-0.486	-0.823

Figure 6 – Résultats de l'ACP réalisée à partir des données environnementales. (a) Représentation des masses d'eau dans le plan défini par les deux premières composantes principales. (b) Corrélation de chaque variable aux deux premières composantes principales.

(Fig. 6 (a)). Des différences sont cependant notables. En effet, ces structures océaniques se distinguent sur l'axe 1. A1, positivement corrélée à cet axe, est plus salée que B1 et comporte une fluorescence forte, mais est plus froide et de faible conductivité (Fig. 6 (b)). B1, au contraire négativement corrélée à l'axe 1, est caractérisée par de fortes températures, turbidités et conductivités, mais des valeurs de salinité et de fluorescence moindre. Le front, se plaçant quasiment au centre du plan, est donc caractérisé environnementalement parlant par des valeurs de température, conductivité, salinité et fluorescence moyennes comparé aux deux structures alentours (A1 et B1), et visiblement plus turbide vu sa corrélation négative à l'axe 2. L'analyse graphique permet d'observer que F1 et B1 sont plus similaires entre elles qu'elles ne le sont de A1.

Des transects de la zone prospectée lors de la campagne ont été réalisés à partir des données de salinité, turbidité, fluorescence et température⁶ (Fig. 7). Une régionalisation spatiale verticale et horizontale des valeurs

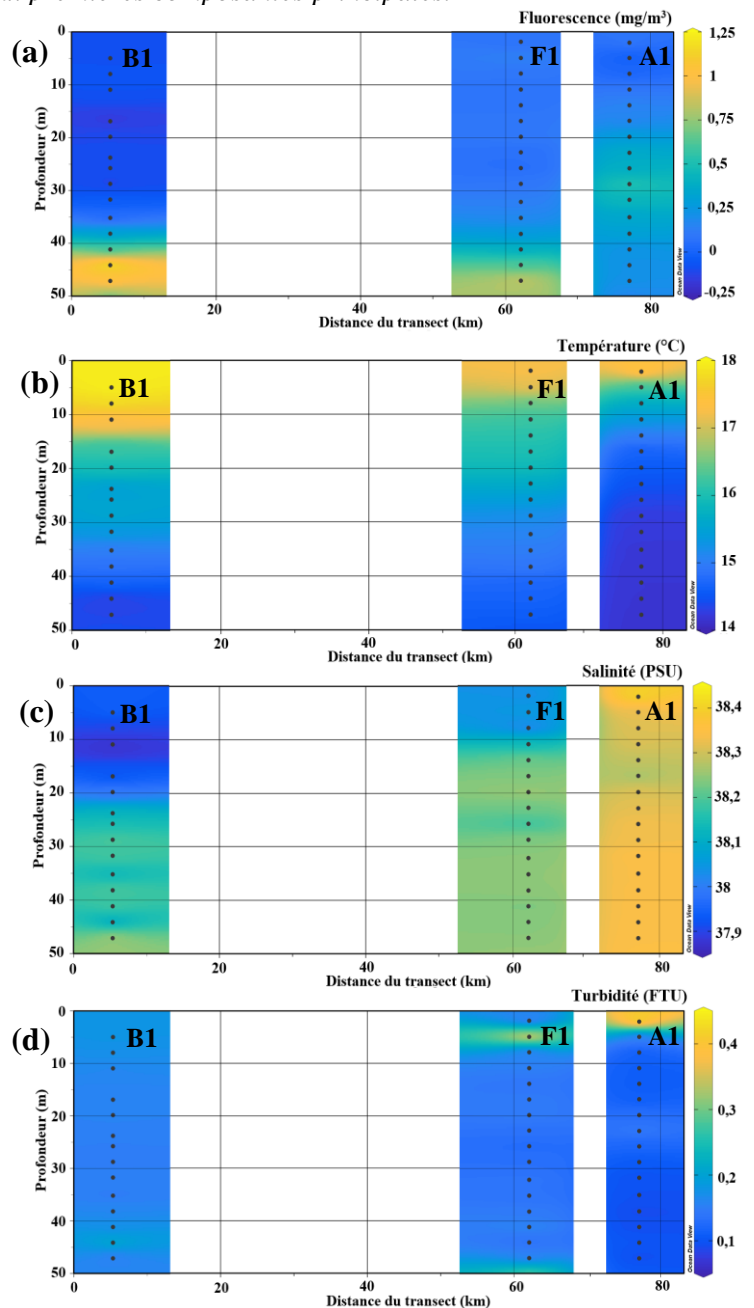


Figure 7 – Transects de la région marine abritant les trois masses d'eau étudiées, représentant (a) la fluorescence, (b) la température, (c) la salinité et (d) la turbidité.

⁶ Le transect représentant la température est similaire en tout point à celui de la conductivité (transect non présenté dans cette partie, voir Annexe (Fig. 19, Partie 3.)) du fait de leur forte corrélation (Spearman=170, p-value < 0.001, rho=0.991). Il illustrera donc ces deux variables.

de ces variables est clairement observable entre les masses d'eau, et soutiennent les informations suggérées sur l'ACP (A1 froide, à faible fluorescence et conductivité, mais forte salinité, et B1 chaude, à forte fluorescence et turbidité, mais faible salinité et conductivité). La variation verticale est particulièrement visible en profondeur pour les masses d'eau B1 et F1. En effet, B1 est, en surface (0-22 mètres) une masse d'eau chaude ($>18^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7. (b)), à turbidité moyenne (entre 0.15 et 0.25 FTU (Formazin Turbidity Unit) (Fig. 7. (d))) et à faible salinité (38-38.3 PSU (Practical Salinity Unit) (Fig. 7. (c))). Elle est plus froide ($14-16^{\circ}\text{C}$) et salée (37.8-38 PSU) en profondeur, même si cette salinité reste faible comparée à celle de la masse d'eau A1. F1 semble correspondre à une zone de gradient entre les conditions physico-chimiques observées dans les deux masses d'eau adjacentes. En effet, elle est chaude ($16-18^{\circ}\text{C}$ (Fig. 7. (b))), turbide (0.4 FTU à 6 mètres (Fig. 7. (d))) et peu salée (38-38.1 PSU (Fig. 7. (c))) en surface, de manière relativement analogue à la masse d'eau B1, si ce n'est que cela est visible sur une profondeur plus faible. Elle est également plus froide ($14-16^{\circ}\text{C}$) et salée (38.1-38.3 PSU) en profondeur, à partir de 10 mètres, similairement à la masse d'eau A1. La fluorescence a un motif particulier sur le transect (Fig. 7. (a)), et semble corrélée à des eaux aux valeurs de salinité comprises entre 38.2 et 38.3 PSU (Fig. 7. (c)), et de température entre 14.5 et 15°C (Fig. 7. (b)). Ceci est vérifié statistiquement concernant la salinité (Spearman = 9708, p-value < 0.001 , rho = 0.505), la température (Spearman = 34456, p-value < 0.001 , rho = -0.758) mais pas à la turbidité. De même, la température est inversement corrélée à la salinité (Spearman = 32734, p-value < 0.001 , rho = -0.670) ainsi qu'à la turbidité (Spearman = 9525, p-value < 0.001 , rho = -0,510). La turbidité est également corrélée à la salinité (Spearman = 32419, p-value < 0.001 , rho = -0.654).

2.2. Caractéristiques biologiques

2.2.1. Composition de la communauté bactérienne

Suite à l'analyse des cytogrammes, huit populations ont été identifiées sur la base de leurs propriétés optiques : LowSSC-LNA, LowSSC-MNA, MediumSSC-LNA, MediumSSC1-MNA, MediumSSC2-MNA, HighSSC-MNA, VeryHighSSC-MNA et VeryHighSSC1-HNA (Fig. 8). Elles sont présentes dans toutes les masses d'eau et à toutes les profondeurs excepté VeryHighSSC-MNA, absente de la masse d'eau B1.

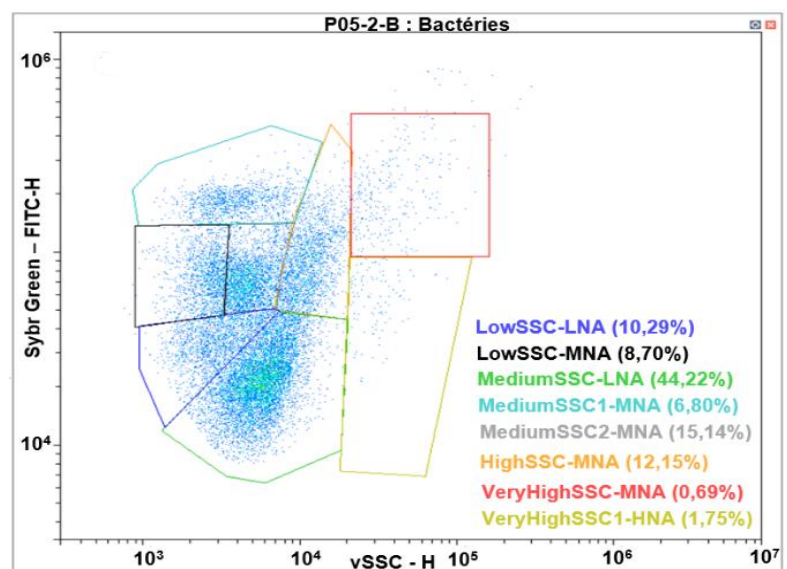
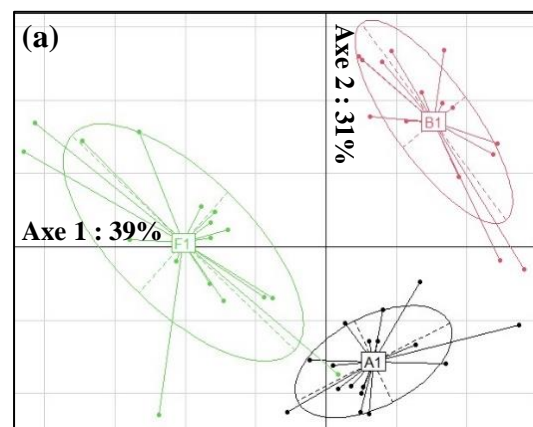


Figure 8 – Cytogramme illustrant les populations identifiées. Exemple de l'échantillon « P05-2 » provenant de la masse d'eau F, à 2 mètres de profondeur.

2.2.2. Distribution des populations bactériennes au sein des masses d'eau

Les trois masses d'eau se distinguent nettement par les abondances des populations qui les constituent (Fig. 9 (a)). La masse d'eau F1, corrélée négativement à l'axe 1, abrite des populations importantes de MediumSSC-LNA, MediumSSC1-MNA, LowSSC-LNA, VeryHighSSC1-HNA et VeryHighSSC-MNA (Fig. 9 (b)). C'est l'inverse pour B1, à l'exception que cette masse d'eau est également corrélée positivement à l'axe 2, indiquant de fortes abondances de LowSSC-LNA et HighSSC-MNA et MediumSSC-LNA principalement. Enfin, la masse d'eau A1 est négativement corrélée à l'axe 2, démontrant qu'elle abrite majoritairement des bactéries des populations MediumSSC2-MNA, MediumSSC1-MNA et LowSSC-MNA majoritairement. F1 est la zone la plus variable, contrairement à B1, et A1 particulièrement (Fig. 7 (a)).

Des cartes, formées à partir des abondances des populations bactériennes sur toute la colonne d'eau échantillonnée, confirment ces informations et permettent de comparer l'abondance de chaque population entre les différentes masses d'eau (Fig. 11). Le front (F1) comporte une communauté bactérienne caractérisée par des abondances supérieures à celles des autres masses d'eau pour toutes les populations, exceptées LowSSC-MNA et MediumSSC2-MNA (Fig. 11 (b), (e)), en plus faible abondance comparé à A1. A l'inverse, B1 abrite des populations en abondance les plus faibles, exceptée HighSSC-MNA (Fig. 11 (f)), dont la forte abondance dans cette zone est notable. Cela est vérifié par le calcul de la somme des abondances de toutes les populations par masse d'eau (Fig. 10), où F1 se démarque par sa communauté bactérienne abondante, tandis que B1 est la masse d'eau à la communauté la moins abondante. Ces cartes permettent également de discerner des motifs particuliers dans la distribution des microorganismes entre les trois zones étudiées. Certaines populations forment un gradient dans leur abondance entre les trois masses d'eau, comme LowSSC-MNA et MediumSSC2-MNA (A1 plus riche que B1 à chaque fois) (Fig. 11 (b), (e)). D'autres populations indiquent un front comportant une



(b) Variable	Axe 1	Axe 2
HighSSC-MNA (cellules/mL)	-0.33	0.79
MediumSSC2-MNA (cellules/mL)	-0.50	-0.64
MediumSSC-LNA (cellules/mL)	-0.65	0.35
MediumSSC1-MNA (cellules/mL)	-0.73	-0.62
LowSSC-LNA (cellules/mL)	-0.73	0.55
VeryHighSSC1-HNA (cellules/mL)	-0.80	0.10
VeryHighSSC-MNA (cellules/mL)	-0.79	-0.33
LowSSC-MNA (cellules/mL)	0.08	-0.72

Figure 9 – Résultats de l'ACP réalisée à partir des données d'abondances populationnelles. (a) Représentation des masses d'eau dans le plan défini par les deux premières composantes principales. (b) Corrélation de chaque variable aux deux premières composantes principales.

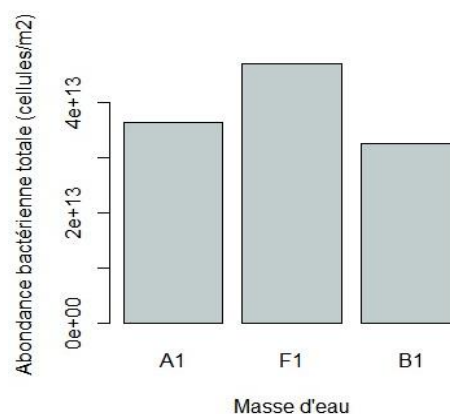


Figure 10 – Diagramme en bâtons représentant l'abondance bactérienne totale de la colonne d'eau échantillonnée pour chaque masse d'eau.

abondance bactérienne supérieure à celle des deux masses d'eau adjacentes (distribution unimodale entre les trois masses d'eau). C'est le cas des populations LowSSC-LNA, MediumSSC-LNA, MediumSSC1-MNA, VeryHighSS-MNA et VeryHighSSC1-HNA (Fig. 11 (a), (c), (d), (g), (h)).

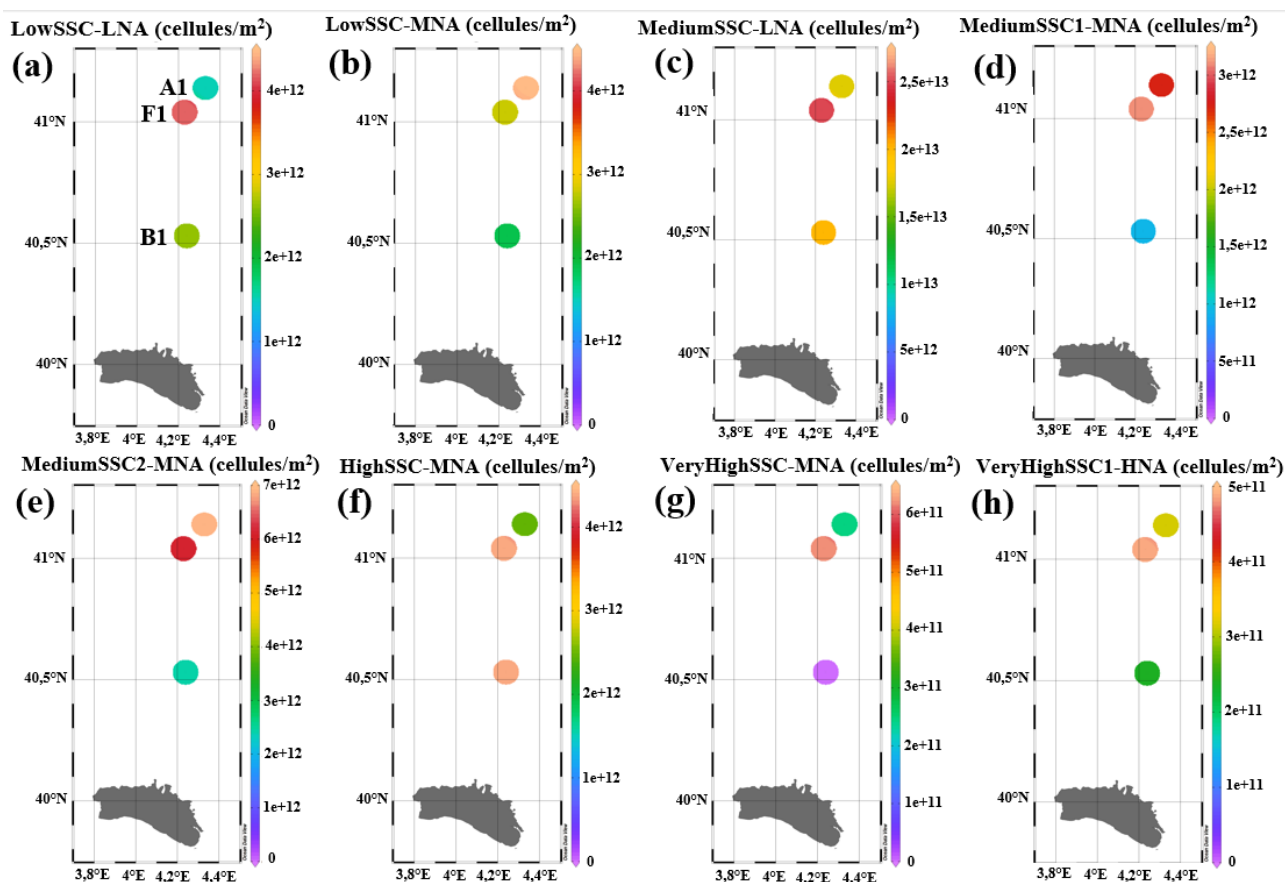


Figure 11 – Cartes géographiques représentant l'abondance, dans chaque masse d'eau, des populations (a) LowSSC-LNA, (b) LowSSC-MNA, (c) MediumSSC-LNA, (d) MediumSSC1-MNA, (e) MediumSSC2-MNA, (f) HighSSC1-MNA, (g) VeryHighSSC-MNA et (h) VeryHighSSC1-HNA.

Des indices de Shannon ont ensuite été calculés pour chaque profondeur de chaque masse d'eau, et représentés sur un transect (Fig. 12). Des motifs distincts sont observables spatialement, les communautés sont donc variables en termes de régularité (populations dominantes ou non)⁷ entre toutes les masses d'eau, et au sein des masses d'eau à différentes profondeurs. La masse d'eau A1 comporte des valeurs d'indice de Shannon relativement élevées sur toute la colonne d'eau échantillonnée (entre 1.9 et 2.4), avec un pic en surface, indiquant une régularité forte de la communauté. Les populations peuplant cette masse d'eau en surface

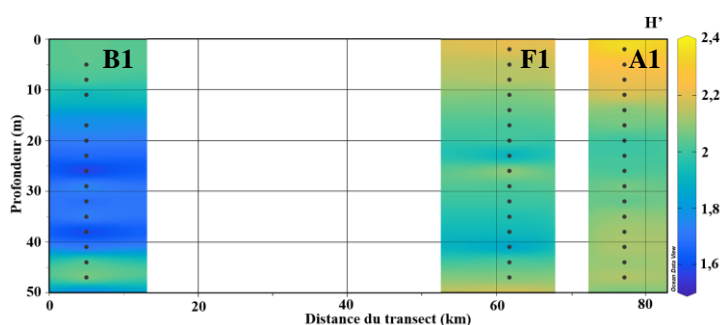


Figure 12 – Transects de la région marine prospectée, représentant l'indice de Shannon (H') dans les trois masses d'eau.

⁷ Les indices de Shannon représentés ici ne reflètent que peu des différences en termes de richesse spécifique, toutes les profondeurs contenant le même nombre de populations : huit pour A1 et F1, sept pour B1.

sont donc en abondance similaire. Au contraire, la masse d'eau B1 présente des indices de Shannon plus faibles, avec une forte variabilité spatiale (valeurs entre 1.8 et 2 en surface et en profondeur, et faible de 15 à 42 mètres de profondeur environ (1.5 à 1.8)), indiquant que la partie centrale de cette structure océanique est composée d'une ou de plusieurs populations dominantes. La zone frontale (F1) comporte des valeurs moyennes (comprises entre 1.8 et 2.3), et semble correspondre à une moyenne des valeurs des masses d'eau A et B.

La génération de profils montrant l'abondance de toutes les populations au sein de chaque masse d'eau permet d'étudier quelles populations sont responsables de la variation de cet indice de biodiversité. La masse d'eau B1 est caractérisée, entre 15 et 42 mètres, par la domination de la population MediumSSC-LNA (Fig. 14 (c)). Cette population est tout autant présente en surface, mais les autres populations, notamment HighSSC-MNA, sont plus abondantes et donc responsables de l'augmentation de la valeur de l'indice de Shannon. En profondeur, MediumSSC-LNA est moins abondante, d'où un indice de biodiversité plus élevé. Concernant A1, les populations sont en abondances relativement similaires en surface, expliquant les valeurs d'indice de Shannon élevées. Sa baisse en profondeur est due à la dominance de la population MediumSSC-LNA (Fig. 14 (a)). Concernant F1, la valeur d'indice de Shannon est attribuable à la forte abondance de MediumSSC-LNA (Fig. 14 (b)), population visiblement dominante dans toutes les masses d'eau.

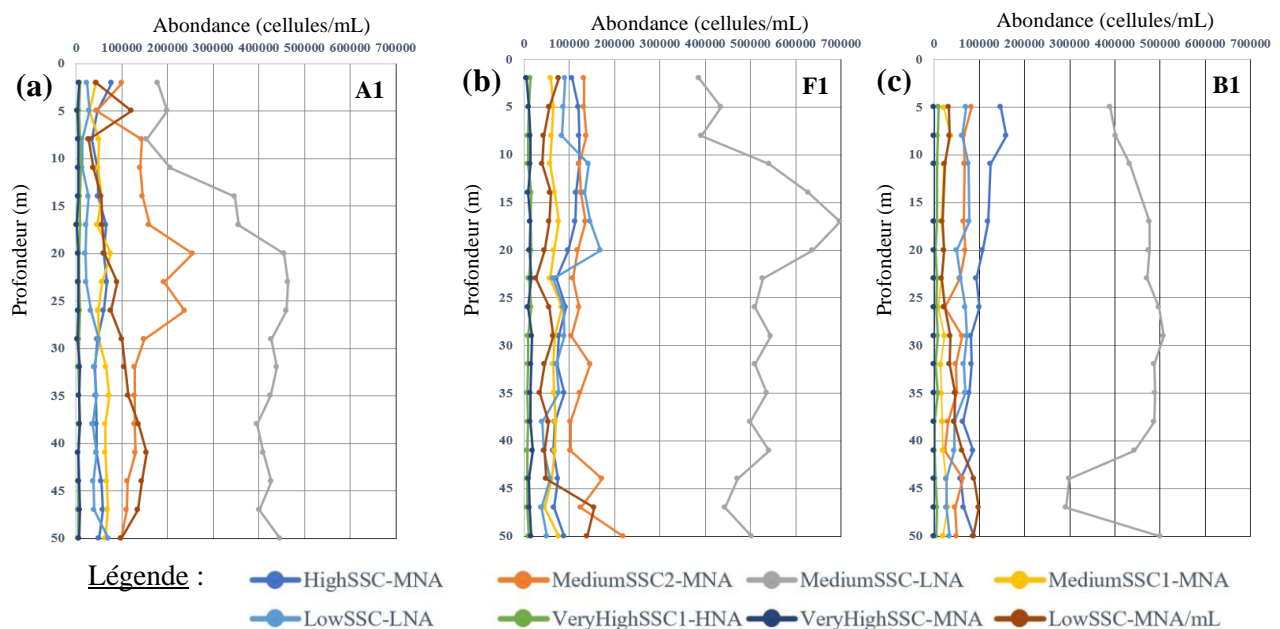


Figure 13 – Profils verticaux représentant les abondances de chaque population au sein des masses d'eau (a) A1, (b) F1 et (c) B1.

Enfin, des transects ont également été produits⁸ (Fig. 14), et indiquent une variabilité spatiale verticale importante des abondances populationnelles, non-visibles sur les cartes (Fig. 11). LowSSC-

⁸ Seuls les plus intéressants sont présentés dans cette partie, les autres sont disponibles en Annexe (Fig. 20, Partie 4.)

MNA est présente dans les masses d'eau A1, F1 et B1, principalement en profondeur (entre 35 et 50 mètres), mais en abondance distincte (environ 150 000 cellules/mL en F1 et B1 et environ 100 000 cellules/mL en B1) (Fig. 14 (a)). Sa distribution semble corrélée à celle de nombreuses autres variables physico-chimiques (Fig. 9 (a), (b), (c)), et confirmée statistiquement⁹ : température (Spearman = 33506, p-value < 0.001, rho = -0.71), fluorescence (Spearman = 5588, p-value < 0.001, rho = 0.72), salinité (Spearman = 7216, p-value < 0.001, rho = 0.63). La masse d'eau B1 est riche en bactéries de la population HighSSC-MNA en surface (0-15 mètres), tout comme F1 mais plus modérément (Fig. 14 (b)). Cette population est cependant peu retrouvée en A1. Sa répartition est corrélée à celle de la température (Fig. 9 (b)) (Spearman = 5144, p-value < 0.001, rho = 0.74), de la salinité (Fig. 9 (c)) (Spearman = 35242, p-value < 0.001, rho = -0.80), de la fluorescence (Fig. 9 (a)) (Spearman = 29486, p-value < 0.001, rho = -0.50) et de la turbidité (Fig. 9 (d)) (Spearman = 6187, p-value < 0.001, rho = 0.68). La population LowSSC-LNA se distribue principalement dans la masse d'eau F1, entre 10 et 20 mètres de profondeur (Fig. 14 (c)) et est corrélée majoritairement à la température (Fig. 9 (b)) (Spearman = 9577, p-value < 0.001, rho = 0.51) et à la salinité (Fig. 9 (c)) (Spearman = 30866, p-value < 0.001, rho = -0.57). Enfin, VeryHighSSC-MNA est observée principalement en F1, de manière variable sur toute la colonne d'eau échantillonnée (abondance importante (>15 000 cellules/mL) à 10, 22, 30 et 39 mètres), mais est absente de B1 et en faible abondance en A1 sur toute la colonne d'eau (Fig. 14 (d)).

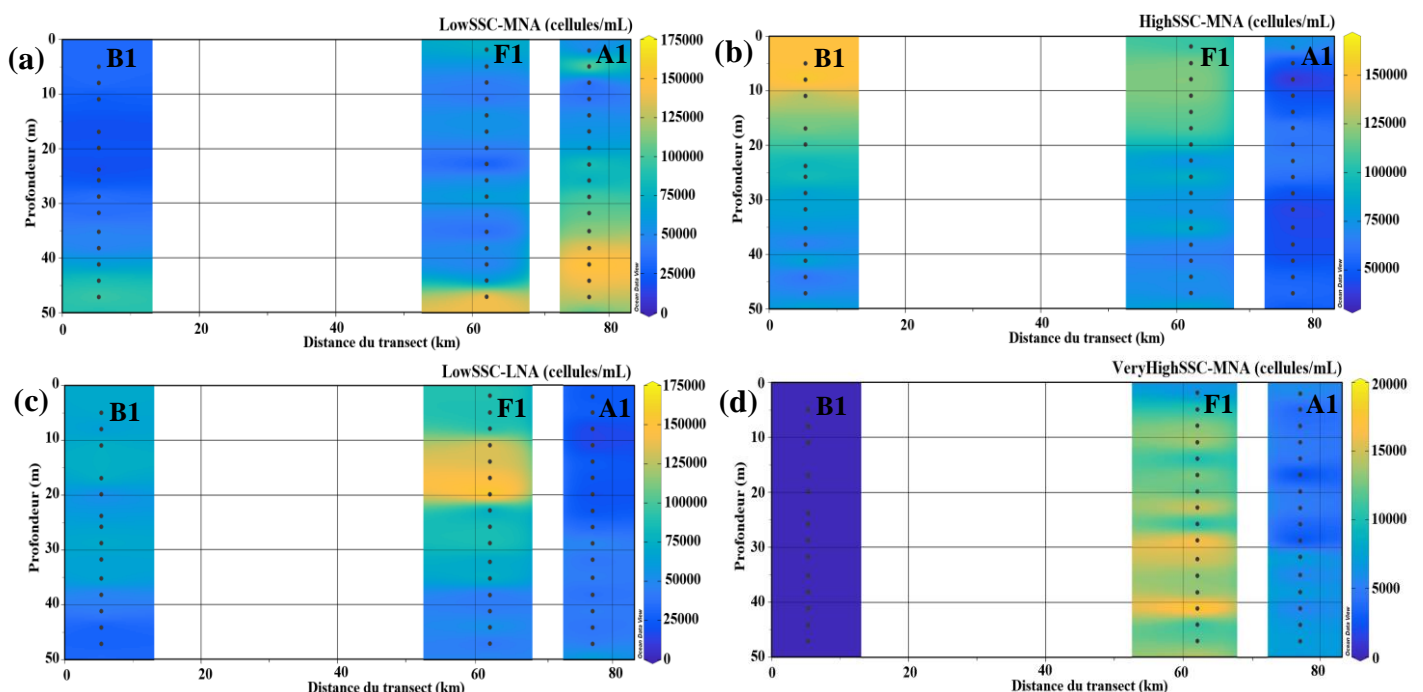


Figure 14 – Transects de la région marine étudiée, représentant les abondances des populations (a) LowSSC-MNA, (b) HighSSC-MNA, (c) LowSSC-LNA et (d) VeryHighSSC-MNA.

⁹ Toutes les corrélations suggérées par les transects en les comparant les uns aux autres sont vérifiées statistiquement. Seules celles avec un coefficient rho supérieur à 0.5 ou inférieur à -0.5 sont explicitées dans ce rapport, les autres sont disponibles en Annexe (Tab. III, Partie 5.).

3. Discussion

3.1. Caractéristiques physico-chimiques des structures de fine échelle étudiées

Les conditions hydrologiques au sein des trois masses d'eau étudiées lors de la campagne BioSWOT-Med montrent des différences marquées. La masse d'eau A est une zone plus salée et plus froide, contrairement à la masse d'eau B, moins salée et plus chaude. F est la zone frontale turbulente, qui sépare les masses d'eau A et B, et comporte des caractéristiques physico-chimiques semblant correspondre à un mélange de celle des deux masses d'eau environnantes. Ces trois masses d'eau, aux caractéristiques physico-chimiques distinctes, représentent donc des habitats contrastés pour les bactéries (Baltar *et al.*, 2015).

La structuration des caractéristiques hydrographiques au sein du front indique que les masses d'eau A et B se brassent de manière inégale verticalement. En effet, un gradient de salinité et de température est observé entre ces trois masses d'eau, avec une pénétration d'eau plus chaude et moins salée de la masse d'eau B en surface de la zone frontale (Fig. 7 (c)), tandis que le reste de la colonne d'eau en F est assez homogène en termes de salinité et de température, et très différente de la masse d'eau A. A partir de ces données, nous pouvons conclure qu'un brassage en surface a lieu entre les masses d'eau B et F, mais peu ou pas entre les masses d'eau F et A. Cette région frontale agit donc comme une barrière plus ou moins forte contre le transport de matière et de molécules (Thompson *et al.*, 2012). Ceci est particulièrement observable pour les données de fluorescence, proxy de l'abondance phytoplanctonique, où les masses d'eau A et F sont distinctes, A ne fluoresçant que très peu comparé à F, tandis que B et F fluorescent à la même profondeur et dans des gammes de valeurs similaires. Ceci est surprenant étant donné la nature de ces structures océaniques. En effet, A est considérée comme une masse d'eau ouverte, sous-entendant d'être plus susceptible de se brasser. Toutefois, elle a une salinité et une température telle sur 50 mètres (induisant une densité élevée), que cela empêche le mélange avec les eaux alentours. La masse d'eau B, considérée fermée du fait de sa nature tourbillonnaire, est cependant plus encline au brassage de par sa faible vitesse (Fig. 15), entraînant des échanges d'eau avec le milieu adjacent (Cetina-Heredia *et al.*, 2019).

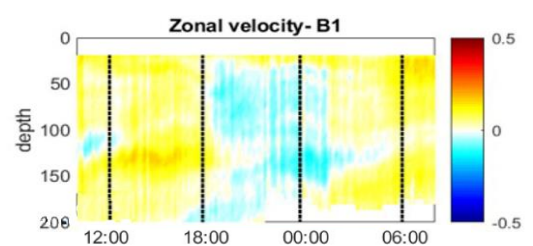


Figure 15 – Transect représentant la vitesse en B1 en fonction du temps, les 28-29 avril 2023. Crédit : Bouruet-Aubertot P. et Rolland R.

3.2. Couplage physique-biologique dans une zone frontale

Les contrastes physico-chimiques entre les trois masses d'eau se reflètent également sur la distribution des bactéries, aussi bien horizontalement que verticalement. En effet, les résultats des tests

de corrélation indiquent que la majorité des populations ont une distribution corrélée à celle des variables physico-chimiques. HighSSC-MNA, par exemple, se distribue dans les zones où la température est élevée et la salinité faible, en surface de la masse d'eau B1 principalement, indiquant la préférence écologique de ce groupe pour cette gamme de température et de salinité (Fig. 14 (b)). À l'inverse, LowSSC-MNA est identifiable dans les eaux froides et salées, correspondant aux profondeurs des masses d'eau F1 et B1 (Fig. 14 (b)). En d'autres termes, le front, en séparant deux masses d'eau aux caractéristiques chimiques et climatiques distinctes, sépare des groupes bactériens aux préférences écologiques différentes. Les corrélations entre les populations et la salinité ainsi que la température étaient plus fortes qu'avec les autres variables (fluorescence, turbidité, conductivité), démontrant que certaines jouent un rôle plus important que d'autres dans la structuration des communautés bactériennes, d'autant plus que ces variables correspondent à celles classiquement utilisées pour la discrimination des masses d'eau. En effet, certains papiers démontrent l'importance qualitative des variables, plus que quantitatives, dans la divergence de composition des communautés microbiennes en milieu marin (Pinhassi *et al.*, 2003). Ces résultats mettent en lumière l'importance majeure des structures de fine échelle dans la structuration spatiale du bactérioplancton.

L'étude de la distribution verticale des groupes bactérioplanctoniques confirme également certains résultats obtenus suite à l'analyse des caractéristiques physico-chimiques des masses d'eau, à savoir que le front est principalement formé et composé d'eau en provenance de B1. En effet, la variabilité des abondances populationnelles au sein du front se repère également au sein de B1, aux mêmes profondeurs, notamment pour les populations LowSSC-LNA, LowSSC-MNA et HighSSC-MNA (Fig. 14). De même, les faibles valeurs d'indice de Shannon à 22 et 40 mètres en F1 s'observent également en B1 (Fig. 15). Ainsi, alors que les données hydrographiques semblaient indiquer un mélange des masses d'eau B et F principalement en surface, les données biologiques viennent compléter ces informations et mettent en exergue que ces masses d'eau interagissent fortement sur toute la colonne d'eau échantillonnée. Cependant, ces deux structures océaniques sont plus distinctes sur le plan formé par l'ACP que ne le sont A1 et F1. Cela est explicable par la faible abondance d'un grand nombre de groupes bactériens en B1. Les masses d'eau B1 et F1 ont alors des répartitions bactériennes verticales similaires, mais des abondances de ces groupes très distinctes (F1 comporte des abondances bactériennes toujours supérieures à celle de B1, quelle que soit la population considérée).

La zone frontale, aux caractéristiques physico-chimiques intermédiaires à celles des eaux alentours, abrite justement des populations dont les abondances sont très nettement supérieures à celles des autres masses d'eau. C'est le cas des populations MediumSSC1-MNA, VeryHighSSC1-HNA et VeryHighSSC-MNA sur toute la colonne d'eau, et LowSSC-LNA, HighSSC-MNA ainsi que MediumSSC-LNA en surface. Cependant, aucune population cytométrique n'était endémique du front.

Comme explicité par certaines études, les zones de fronts augmentent l'abondance des populations résidentes, à défaut de favoriser l'émergence de nouveaux groupes (Franks, 1992). Ainsi, une dynamique populationnelle particulière s'établit dans le front et peut s'expliquer par une augmentation de l'abondance phytoplanctonique (ici tout de même moins élevée qu'en B1 (Fig. 9 (a)), la forte turbulence verticale au sein de cette masse d'eau entraînant le remontée de nutriments en provenance des profondeurs, favorisant la croissance des autotrophes, eux-mêmes stimulant la croissance bactérienne par libération de matière organique (Mahadevan & Archer, 2000). Ceci est suggéré, dans cette présente étude, par les corrélations significatives entre de nombreuses populations et la fluorescence, proxy de l'abondance phytoplanctonique. De la matière organique en cours de sédimentation dans les profondeurs peut également être apportée en surface par des courants ascendants (upwellings) au sein du front, contribuant cette fois de manière directe à la croissance bactérienne (Karpscales-Bosse *et al.*, 2004). Des analyses de vitesses verticales en cours par les collaborateurs physiciens du M.I.O. permettront d'apporter des éléments de réponse, cependant, la conductivité plus importante dans le front que dans les autres masses d'eau pourrait sous-entendre une forte quantité de matière organique particulaire dans la colonne d'eau. Enfin, cette turbulence peut également entraîner la formation de microniches écologiques en nombre au sein de la colonne d'eau, correspondant à des masses d'eau de microéchelle au sein de cette masse d'eau de méso-submésoéchelle qu'est le front. Ceci est particulièrement observable sur les transects des populations ultradominantes dans le front, comme VeryHighSSC-MNA ou encore LowSSC-LNA, où une forte variabilité verticale est observée le long de la colonne d'eau (Fig. 14 (a), (d)), et également démontrée par les indices de Shannon calculés, indiquant des changements importants à petite échelle dans la dominance de certaines groupes bactériens (Fig. 15), mais aussi par les résultats de l'ACP, où la masse d'eau F1 a la plus grande variabilité sur le plan (Fig. 7 (a)). Aucune étude ne s'est encore penchée sur cette question, cette campagne océanographique étant la seule à ce jour à avoir échantillonné à haute résolution les cinquante premiers mètres de la colonne d'eau, permettant l'observation de ces répartitions bactériennes singulières. Actuellement, seul le rôle des structures de mésoéchelle en tant que niches fluides, et donc d'échelle largement supérieure à celle des microniches possiblement formées au sein des fronts, a été évalué (D'Ovidio *et al.*, 2010). Les fronts seraient donc des structures jouant le rôle d'écotone, zone de transition entre deux écosystèmes où les conditions environnementales sont intermédiaires, abritant, comme c'est le cas pour les ripisylves en milieu terrestre (Spector, 2002), une abondance particulièrement importante de certains organismes vivants.

Ainsi, des hypothèses énoncées en Introduction à propos de la manière dont les structures océaniques de fines échelle influencent la distribution du bactérioplancton, seule la première (Fig. 1 (a)) semble plausible d'après les résultats de l'ACP (Fig. 7 (a)). Les communautés des trois masses d'eau, bien que similaires en termes de composition (groupes cytométriques), sont très distinctes d'un

point de vue de l'abondance relative de ces groupes. Les masses d'eau se comportent alors comme des entités différentes en termes de dynamique communautaire. Cependant, la cytométrie en flux étant ataxinomique, les analyses de diversité par des méthodes OMICS (méta-barcoding et méta-génomique) permettront de caractériser et de comparer la diversité des taxa procaryotiques entre les 3 masses d'eau.

3.3. Discrimination des masses d'eau selon le type de variables étudiées

Les masses d'eau sont initialement discriminées par des différences en termes de salinité et de température (Stramma & England, 1999). C'est donc la chimie et la climatologie qui permettent la détection des structures océaniques et l'étude de leur distribution dans l'espace. Les résultats de nos analyses concernant la discrimination des masses d'eau selon leurs caractéristiques physico-chimiques indiquent que les masses d'eau sont relativement similaires (Fig. 6 (a)). De manière surprenante, l'analyse des résultats concernant la discrimination des structures océaniques sur la base des populations bactériennes qu'elles abritent offre des résultats distincts. En effet, contrairement aux variables physico-chimiques, les variables biologiques distinguent très nettement les masses d'eau (Fig. 7 (a)). Cependant, de nombreuses données physico-chimiques sont manquantes, comme la concentration en matière organique, en oxygène dissous, en nutriments, etc., en cours d'analyse et pouvant certainement conduire à une meilleure discrimination des structures océaniques. Toutefois, la différence observée ici peut s'expliquer par l'extrême sensibilité des organismes vivants aux conditions environnementales. En effet, chaque organisme croît dans une gamme de variables environnementales précises, nommée niche climatique (Grinnel, 1917). A ceci se rajoute les interactions avec d'autres organismes, comme la compétition (pour l'accès au phosphore et à l'azote, (Suggett *et al.*, 2009)) ou encore la coopération (avec le phytoplancton, favorisant la croissance bactérienne (Aota & Nakajima, 2001)). Ceci forme la niche écologique des espèces (Hutchinson, 1957). Ainsi, la discrimination des masses d'eau sur la base de leurs caractéristiques abiotiques (physico-chimiques) ne prend pas en compte la combinaison de ces facteurs, contrairement à la biologie.

Les masses d'eau sont donc plus facilement discernables dans notre étude à partir de leurs propriétés biologiques que physiques et chimiques. Cependant, la détection de masses d'eau uniquement à partir de la biologie n'est pas possible. Elle se réalise généralement par image satellite, grâce la température et la coloration des eaux de surface (proxy de l'abondance phytoplanctonique), et *in situ via* des différences de salinité (Stramma & England, 1999). Ces mesures peuvent être effectuées instantanément, mais ce n'est pas le cas pour l'étude des bactéries, qui impose un lourd dispositif d'échantillonnage et d'analyse de l'eau de mer par cytométrie en flux ou méthodes OMICS. Ainsi, la détection des masses d'eau *via* leurs caractéristiques physico-chimiques est obligatoire en premier lieu, mais, à l'avenir, l'analyse de la composition bactérienne pourrait être une approche complémentaire précieuse pour une meilleure caractérisation des masses d'eau.

Conclusion

Cette étude met en lumière les caractéristiques physico-chimiques distinctes des masses d'eau étudiées. Ces conditions environnementales affectent la répartition du bactérioplancton qui les constituent, verticalement et horizontalement sur une zone géographique restreinte, démontrant l'intérêt d'étudier ces structures de fine échelle. En ce sens, comprendre le couplage entre la distribution des groupes bactérioplanctoniques et l'environnement physique et chimique revient à s'intéresser aux exigences écophysiologiques de ces groupes. Le front agit comme une barrière plus ou moins importante contre le brassage des eaux environnantes et la dispersion des bactéries, et souligne donc l'importance des facteurs physiques et chimiques dans la structuration des communautés microbiennes. Il est également plus riche en cellules bactériennes, démontrant la dynamique biologique particulière qui s'y déroule, définissant ce milieu comme un écotone. L'importante variabilité verticale de la distribution des groupes bactériens qu'il abrite sous-entend l'existence de microniches, dont la détection est permise par l'échantillonnage à haute résolution réalisé lors de la campagne. Cette nouvelle stratégie d'échantillonnage, jamais réalisée lors de précédentes missions océanographiques, permettrait de comprendre plus finement les mécanismes induisant une plus forte abondance microbienne dans les zones frontales. Enfin, cette étude met en évidence la pertinence de l'approche biologique pour la discrimination des masses d'eau, avec l'hypothèse que les micro-organismes, plus sensibles aux variations environnementales, caractérisent plus finement les structures océaniques que ne le font les caractéristiques physiques et chimiques traditionnellement utilisées pour leur identification. Les données biologiques en cours d'acquisition (détermination par cytométrie des abondances du phytoplancton, des virus, des flagellés, des protozoaires (flagellés) ; les analyses de biodiversité par des approches de bio-informatique ; les analyses du zooplancton), ainsi que les données physiques (direction, sens et intensité des courants), et chimiques (concentrations en sels nutritifs, mesures de carbone organique dissous, etc.) permettront de compléter le jeu de données afin de mieux comprendre les scénarii et les acteurs du couplage entre physique et biologie dans la zone d'étude en Méditerranée, zone oligotrophe et de faible énergie, représentative de la majeure partie de l'océan.

Références

- Y. Aota et H. Nakajima, « Mutualistic relationships between phytoplankton and bacteria caused by carbon excretion from phytoplankton », *Ecological Research*, vol. 16, n° 2, p. 289-299, 2001, doi: 10.1046/j.1440-1703.2001.00396.x.
- F. Azam *et al.*, « Bacteria-organic matter coupling and its significance for oceanic carbon cycling », *Microbial Ecology*, vol. 28, n° 2, p. 167-179, 1994, doi: 10.1007/BF00166806.
- F. Baltar et J. Arístegui, « Fronts at the Surface Ocean Can Shape Distinct Regions of Microbial Activity and Community Assemblages Down to the Bathypelagic Zone: The Azores Front as a Case Study », *Frontiers in Marine Science*, vol. 4, 2017, doi: 10.3389/fmars.2017.00252.
- F. Baltar *et al.*, « Oceanic fronts: transition zones for bacterioplankton community composition », *Environmental Microbiology Reports*, vol. 8, n° 1, p. 132-138, 2016, doi: 10.1111/1758-2229.12362.
- C. N. Bianchi et C. Morri, « Marine Biodiversity of the Mediterranean Sea: Situation, Problems and Prospects for Future Research », *Marine Pollution Bulletin*, vol. 40, n° 5, p. 367-376, 2000, doi: 10.1016/S0025-326X(00)00027-8.

- P. Cetina-Heredia *et al.*, « Retention and Leakage of Water by Mesoscale Eddies in the East Australian Current System », *Journal of Geophysical Research: Oceans*, vol. 124, n° 4, p. 2485-2500, 2019, doi: 10.1029/2018JC014482.
- F. D'Ovidio *et al.*, « Fluid dynamical niches of phytoplankton types », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, n° 43, p. 18366-18370, 2010, doi: 10.1073/pnas.1004620107.
- S. T. Dyrhman *et al.*, « Microbes and the Marine Phosphorus Cycle », *Oceanography*, vol. 20, n° 2, p. 110-116, 2007, doi: 10.5670/oceanog.2007.54
- M. L. S. Fontes *et al.*, « Bacterioplankton abundance and biomass stimulated by water masses intrusions over the Southern Brazilian Shelf (between 25°57'S and 29°24'S) », *Continental Shelf Research*, vol. 164, p. 28-36, 2018, doi: 10.1016/j.csr.2018.05.003.
- P. J. S. Franks, « Phytoplankton blooms at fronts: Patterns, scales, and physical forcing mechanisms », 1992. [En ligne]. Disponible sur: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:129615404>
- J. Grinnell, « Field Tests of Theories Concerning Distributional Control », *The American Naturalist*, vol. 51, n° 602, p. 115-128, 1917, doi: 10.1086/279591.
- R. B. Heywood et J. Priddle, « Retention of phytoplankton by an eddy », *Continental Shelf Research*, vol. 7, n° 8, p. 937-955, 1987, doi: 10.1016/0278-4343(87)90007-0.
- G. E. Hutchinson, « Concluding remarks : Cold Spring Harbor Symposium », *Quantitative Biology*, vol. 22, p. 415-427, 1957, doi: 10.1101/SQB.1957.022.01.039
- L. Karp-Boss *et al.*, « Distributions and variability of particulate organic matter in a coastal upwelling system », *Journal of Geophysical Research: Oceans*, vol. 109, n° 9, p.124-141, 2004, doi: 10.1029/2003JC002184.
- B. S. Lambert *et al.*, « Motility drives bacterial encounter with particles responsible for carbon export throughout the ocean », *Limnology and Oceanography Letters*, vol. 4, n° 5, p. 113-118, 2019, doi: 10.1002/lol2.10113.
- J. R. Ledwell *et al.*, « Nutrient flux into an intense deep chlorophyll layer in a mode-water eddy », *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, vol. 55, n° 10, p. 1139-1160, 2008, doi: 10.1016/j.dsr2.2008.02.005.
- M. Levy et P. Klein, « Impact of sub-mesoscale physics on production and subduction of phytoplankton in an oligotrophic regime », *Journal of Marine Research*, vol. 59, n° 4, p. 535-565, 2001. [En ligne]. Disponible sur: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/800/>
- A. Mahadevan et D. Archer, « Modeling the impact of fronts and mesoscale circulation on the nutrient supply and biogeochemistry of the upper ocean », *Journal of Geophysical Research: Oceans*, vol. 105, n° C1, p. 1209-1225, 2000, doi: 10.1029/1999JC900216.
- R. Z. Moger-Reischer et J. T. Lennon, « Microbial ageing and longevity », *Nature Reviews Microbiology*, vol. 17, n° 11, p. 679-690, 2019, doi: 10.1038/s41579-019-0253-y.
- T. Moutin *et al.*, « Introduction to the Biogeochemistry from the Oligotrophic to the Ultraoligotrophic Mediterranean (BOUM) experiment », *Biogeosciences*, vol. 9, n° 10, p. 3817-3825, 2012, doi: 10.5194/bg-9-3817-2012.
- J. Pinhassi *et al.*, « Spatial Variability in Bacterioplankton Community Composition at the Skagerrak–Kattegat Front », *Marine Ecology-progress Series - MAR ECOL-PROGR SER*, vol. 255, p. 1-13, juin 2003, doi: 10.3354/meps255001.
- T. Pommier *et al.*, « Global patterns of diversity and community structure in marine bacterioplankton », *Molecular Ecology*, vol. 16, n° 4, p. 867-880, 2007, doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03189.x.
- T. Reich *et al.*, « Significant dark inorganic carbon fixation in the euphotic zone of an oligotrophic sea », *Limnology and Oceanography*, vol. 2, n°3, p. 235-249, 2024, doi: 10.1002/lno.12560.
- T. J. Samo, « Microscale habitats and activities of bacteria and their ecological and biogeochemical significance in the ocean », 2012, [Thesis], UC San Diego, <https://escholarship.org/uc/item/6d42w9m2>
- K. Scales *et al.*, « Mesoscale fronts as foraging habitats: Composite front mapping reveals oceanographic drivers of habitat use for a pelagic seabird », *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 11, c. 20140679, 2014, doi: 10.1098/rsif.2014.0679.
- C. E. Shannon, « A Mathematical Theory of Communication », *Bell System Technical Journal*, vol. 27, n° 3, p. 379-423, 1948, doi: 10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x.
- A. R. A. Soares *et al.*, « New insights on resource stoichiometry: assessing availability of carbon, nitrogen, and phosphorus to bacterioplankton », *Biogeosciences*, vol. 14, n° 6, p. 1527-1539, 2017, doi: 10.5194/bg-14-1527-2017
- S. Spector, « Biogeographic Crossroads as Priority Areas for Biodiversity Conservation », *Conservation Biology*, vol. 16, n° 6, p. 1480-1487, 2002, doi: 10.1046/j.1523-1739.2002.00573.x
- L. Stramma et M. England, « On the water masses and mean circulation of the South Atlantic Ocean », *Journal of Geophysical Research: Oceans*, vol. 104, n° C9, p. 20863-20883, 1999, doi: 10.1029/1999JC900139.
- D. J. Suggett *et al.*, « Nitrogen and phosphorus limitation of oceanic microbial growth during spring in the Gulf of Aqaba », *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 56, n° 2-3, p. 227-239, 2009, doi: 10.3354/ame01357
- A. Thompson et J. Sallée, « Jets and Topography: Jet Transitions and the Impact on Transport in the Antarctic Circumpolar Current », *Journal of Physical Oceanography*, vol. 42, p. 956-972, 2012, doi: 10.1175/JPO-D-11-0135.1.
- J. O. Wenegrat *et al.*, « Enhanced mixing across the gyre boundary at the Gulf Stream front », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 117, n° 30, p. 17607-17614, 2020, doi: 10.1073/pnas.2005558117.

Annexes

1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une méthode combinant un système fluide et optique permettant la détection des particules en suspension dans un fluide suite à leur passage dans un laser (Fig. 19). La diffusion de la lumière par ces particules ainsi que la fluorescence qu'elles

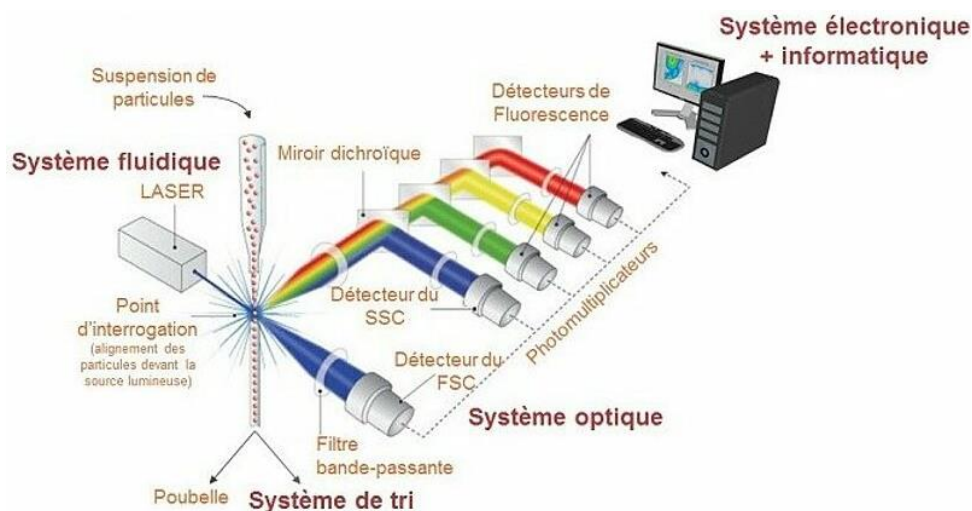


Figure 16 – Représentation schématique du fonctionnement interne d'un cytomètre en flux.

peuvent émettre par excitation lumineuse donnent des indications sur leur taille, granulométrie, taille du génome (dans le cas d'un marquage de l'acide nucléique avec un fluorochrome) ou encore quantité de pigments (naturellement fluorescents après excitation comme la chlorophylle *a* ou encore la phycoérythrine). Ainsi, la détection de particules, et en particulier dans le cas de cette étude, de bactéries, est possible. Cette méthode est particulièrement utilisée en microbiologie, car elle permet un comptage rapide des cellules, ainsi qu'une discrimination des cellules en populations. C'est une technique dite « aveugle », car elle ne permet pas directement l'observation des cellules, comme c'est le cas en microscopie, et ne donne donc pas la possibilité d'observer des structures particulières portées par les microorganismes comme des flagelles ou encore des coques en silice. La détermination de populations sur la base des cytogrammes générés suite au passage des échantillons dans le cytomètre est relativement sommaire, uniquement basée sur la taille de la cellule et de son génome. Ainsi, plusieurs OTU¹⁰ peuvent se concentrer en une seule population cytométrique. La diversité observable en cytométrie en flux est donc sommaire, comparée à celle obtenue à partir de méthodes génomiques. Elle reste cependant la méthode la moins coûteuse et la plus rapide pour l'analyse de communautés microbiennes.

¹⁰ Unité taxinomique opérationnelle, terme remplaçant le mot « espèce » ici, peu pertinent à utiliser pour le groupe des microorganismes où la conjugaison (échange de matériel génétique) régulière entre microorganismes empêche la détermination de réelles espèces.

2. Protocole d'analyse des échantillons bactériens par cytométrie en flux

Pour l'analyse par cytométrie en flux des échantillons, plusieurs solutions ont été préparées (Tab. 1).

Tableau I – Solutions préparées pour de l'analyse des échantillons en cytométrie en flux ainsi que leur composition.

	Nom de la solution	Composition de la solution
Préparation des solutions de billes	Billes TC prep (TruCount) (V=500µL)	500 µL NaCl-pluronique par tube de BD TruCount Tube
	Billes 2µm MS (MotherSolution)	2µL stock billes + 0.5mL NaCl-pluronique + 2.5mL NaCl filtré
	Billes 2µm WS (WorkingSolution)	2 µL MS + 120 µL NaCl filtré
	Solution NaCl/2µm	35µL 2µm MS + 1 000 µL NaCl filtré
Préparation des échantillons	Echantillon dilué (V=205.5µL)	100 µL Echantillon décongelé + 103.5 µL NaCl/2µm + 2µL Sybr green dilué au 1/10

Protocoles de préparation des échantillons :

- NaCl filtré : Prélèvement de NaCl (35 g/L), filtration stérile à l'aide d'un filtre seringue de 0,2 µm de porosité, utilisable sous 2-3 jours.
- TC : Trucount (billes de comptage) dans des tubes contenant une quantité précise de billes (50000/tube selon le lot, sous forme déshydratée). Ajout de 500 µl de NaCl filtré par tube, puis bain à sonication (pour la mise en suspension des billes) pendant 5 minutes.
- Billes 2 µm : billes de polystyrène fluorescentes calibrées d'une taille de 2 µm (standard interne et standard de taille). La solution mère (MS) contient 2 µL de la solution stock + 3 ml de NaCl filtré.
- SYBR Green II (colorant des acides nucléiques, longueur d'onde d'excitation de 488 nm et longueur d'onde d'émission de 530 nm) : préparation d'un aliquot au 1/10 avec de l'eau Milli-Q répartie dans des microtubes (200 µl).

Les billes 2µm sont utilisées comme billes de standard de taille pour évaluer la taille des particules analysées et de standard interne de fluorescence. Les billes TC sont utilisées pour la vérification du bon débit de la pompe péristaltique grâce à une concentration connue de billes par mL.

Les échantillons ont d'abord été décongelés puis mis chacun dans un puit d'une plaque d'analyse cytométrique (Fig. 20). Dans chaque puit correspondant à celui d'un échantillon à analyser ont été rajouté les solutions de NaCl/2µm, de Sybr Green et de billes 2µm WS. Le description précise des composants de chaque puit est décrit en Tableau II.

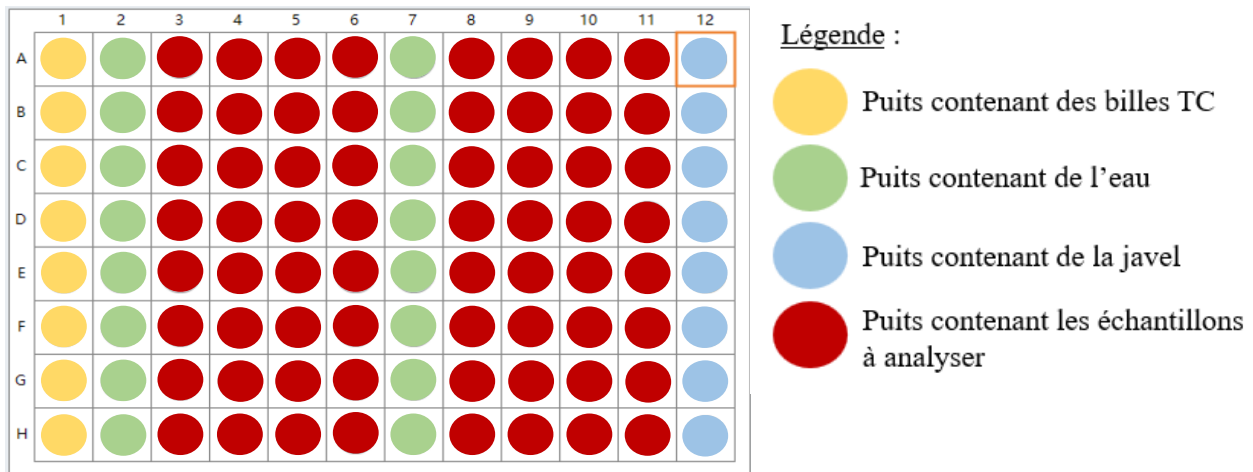


Figure 17 – Représentation schématique de la plaque d’analyse des échantillons par cytométrie en flux.

Tableau II – Contenu de chaque puits, ainsi que son volume et le volume acquis par le cytomètre.

Numéro de colonne de la plaque (Fig. 20)	Nom de la solution contenue dans les puits (Tab. 1)	Volume puit (Vp) et volume acquis (Va) par le cytomètre
1	Billes TC prep	- Vp 50 µl - Va 30 µl
2	Eau (rinçage)	- Vp 150 µl - Va 100 µl
3 à 6	Echantillon dilué	- Vp 202 µl - Va 40 µl
7	Eau (rinçage)	- Vp 150 µl - Va 100 µl
8 à 11	Echantillon dilué	- Vp 202 µl - Va 40 µl
12	Javel (lavage)	- Vp 500 µl - Va 250 µl

La plaque est ensuite analysée par le cytomètre, à une vitesse de 3h30 environ par plaque, avec des paramètres d’acquisition précis (Fig. 21). 6 plaques ont été analysés pour le pompage, et 10 pour le carrousel.

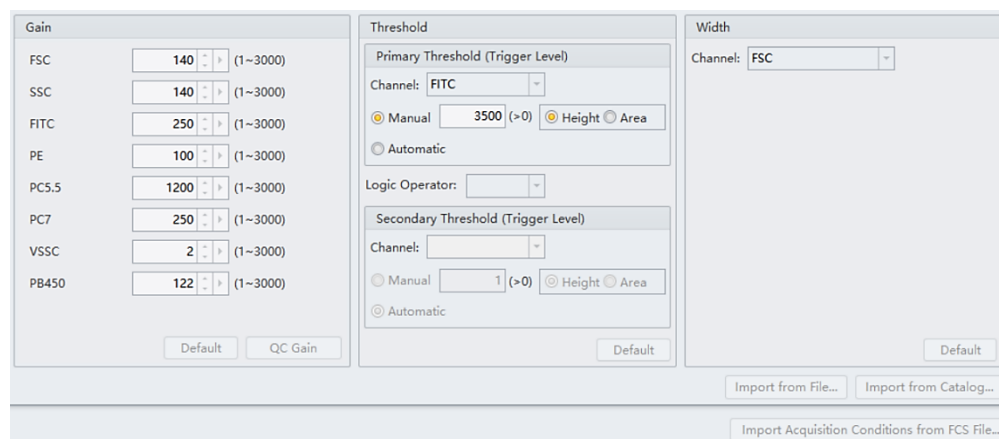


Figure 18 – Capture d’écran des paramètres sélectionnés pour l’analyse cytométrique des échantillons. « Gain » représente la sensibilité des photomultiplicateurs (capteurs de la fluorescence émise par les cellules). « Threshold » représente le seuil de sensibilité minimal, ici définit pour le canal FITC-Sybr Green.

3. Transect de la zone marine étudiée, représentant la conductivité et non présenté en partie
 « Résultats »

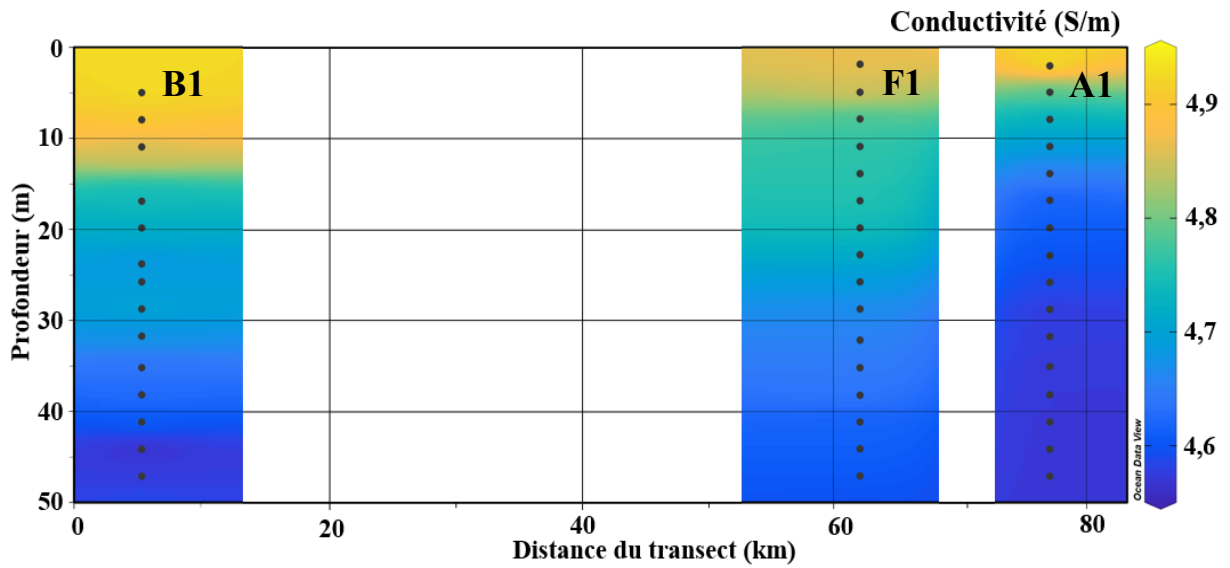


Figure 19 – Transect de la région marine étudiée, représentant la conductivité.

4. Transects de la zone marine étudiée, représentant les abondances des populations
 détectées en cytométrie en flux et non présentés en partie « Résultats »

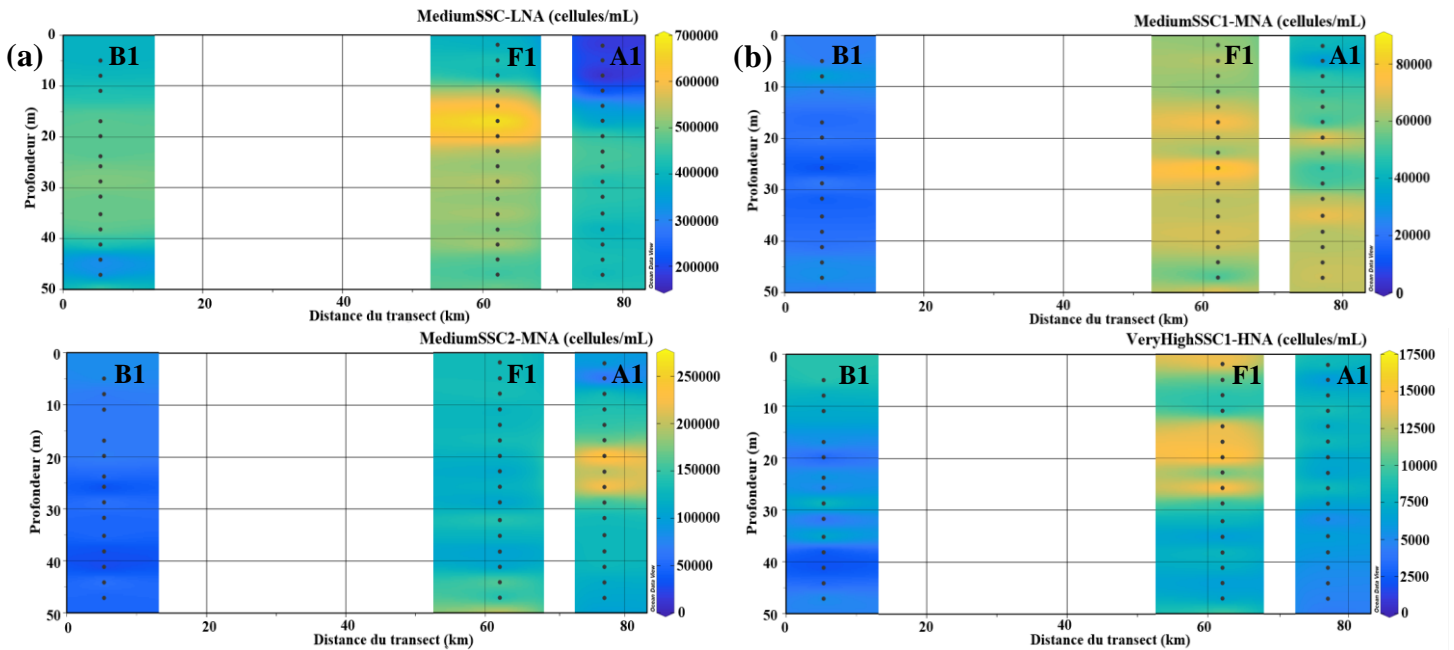


Figure 20 – Transects de la région marine étudiée, représentant les abondances des populations (a) MediumSSC-LNA, (b) MediumSSC1-MNA, (c) MediumSSC2-MNA et (d) VeryHighSSC1-HNA.

5. Corrélations entre abondances populationnelles et variables physico-chimiques

Tableau III – Résultats des tests de corrélation de Spearman effectués entre les abondances populationnelles et les variables physico-chimiques. Les p-values indiquées par des astérisques et en gras correspondent aux tests significatifs.

Variable 1	Variable 2	Statistique du test	P-value	Coefficient de corrélation (Rho)
LowSSC-LNA	Salinité	30866	<0.001*	-0.575
	Température	9576	<0.001*	0.511
	Fluorescence	28761	<0.001*	-0.467
	Turbidité	14479	0.07	0.261
LowSSC-MNA	Salinité	7216	<0.001*	0.632
	Température	33506	<0.001*	-0.709
	Fluorescence	5588	<0.001*	0.715
	Turbidité	28805	<0.001*	-0.47
MediumSSC-LNA	Salinité	24644	0.074	-0.257
	Température	17731	0.515	0.095
	Fluorescence	21576	0.491	-0.101
	Turbidité	14779	0.088	0.246
MediumSSC1-MNA	Salinité	11628	0.004*	0.407
	Température	24510	0.083	-0.251
	Fluorescence	13120	0.021	0.331
	Turbidité	28172	0.002*	-0.437
MediumSSC2-MNA	Salinité	12152	0.007*	0.38
	Température	23382	0.184	-0.193
	Fluorescence	13356	0.026*	0.319
	Turbidité	29114	<0.001*	-0.485
HighSSC-MNA	Salinité	35242	<0.001*	-0.798
	Température	5144	<0.001*	0.738
	Fluorescence	29486	<0.001*	-0.504
	Turbidité	6187	<0.001*	0.684
VeryHighSSC-MNA	Salinité	14847	0.093	0.242
	Température	20331	0.8	-0.037
	Fluorescence	14860	0.094	0.242
	Turbidité	24756	0.068	-0.263
VeryHighSSC1-HNA	Salinité	22864	0.253	-0.167
	Température	9731	<0.001*	0.504
	Fluorescence	24535	0.081	-0.252
	Turbidité	18836	0.790	0.039