



HAL
open science

Dynamique des populations picoplanctoniques marines

Stéphan Jacquet

► **To cite this version:**

Stéphan Jacquet. Dynamique des populations picoplanctoniques marines. Ecologie, Environnement. Paris 6, 2000. Français. NNT: . tel-01116025

HAL Id: tel-01116025

<https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01116025>

Submitted on 12 Feb 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

**THÈSE DE DOCTORAT ÈS-SCIENCE DE L'UNIVERSITÉ
PIERRE ET MARIE CURIE - PARIS 6**

UFR 937 : Station Biologique de Roscoff

Spécialité :

Océanologie biologique et Environnement marin

Présentée par :

Stéphan JACQUET

Pour obtenir le grade de **DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS 6**

Sujet de la thèse :

**DYNAMIQUE DES POPULATIONS
PICOPLANCTONIQUES MARINES**

soutenue le 6 mars 2000 devant le jury composé de :

MM.	M. BIANCHI	Directeur de Recherche, CNRS	Examinatrice
M.	Y. DANDONNEAU	Directeur de Recherche, IRD	<u>Rapporteur</u>
M.	L. MEMERY	Chargé de Recherche, CNRS	Examinateur
M.	P. NIVAL	Professeur, Université Paris 6	Examinateur
M.	F. RASSOULZADEGAN	Directeur de Recherche, CNRS	Examinateur
M.	A. SCIANDRA	Chargé de Recherche, CNRS	<u>Rapporteur</u>
M.	A. TOULMOND	Professeur, Université Paris 6	Examinateur
M.	D. VAULOT	Directeur de Recherche, CNRS	Directeur de thèse

*Impose ta chance,
Serre ton bonheur,
Va vers ton risque, ...
À te regarder, ils
s'habitueront.*

René Char

À Blanche, ...

REMERCIEMENTS

Il est généralement peu fréquent, lors du passage difficile de la rédaction d'une thèse, de commencer véritablement son écriture par la page de remerciements. Bien que celle-ci soit la première page à être lue, elle est souvent celle que l'on écrit en dernier, symbole probable de l'accomplissement et de la clôture d'un travail de plusieurs mois. Faisons donc exception ! Nous sommes le dimanche 15 octobre 1998 lorsque je décide de la commencer. Pourquoi si tôt ? La réponse est simple. Le désir et le devoir de n'oublier personne en prenant le temps de remercier toutes les personnes directement et indirectement attachées à la réalisation de ce travail. Cette page, écrite à différents moments de la dernière année de thèse, a été achevée le 15 novembre 1999. J'y suis très attaché et j'espère que vous prendrez autant de plaisir à la lire que j'en ai eu à l'écrire.

Mes premiers remerciements sont adressés à Monsieur le professeur **Paul Nival**. Comment d'ailleurs pourrait-il en être autrement ? Deux ans après mon premier DEA, il a accepté une seconde candidature de ma part et sa lettre de recommandation auprès de la présidence de l'Université de Paris 6, condition *sine qua non* pour l'acceptation de cette situation extraordinaire, a définitivement gravé ma mémoire. Pour cela et tout le reste, qu'il trouve ici le témoignage de la confiance qu'il a mis en moi et l'expression d'une profonde gratitude et de toute mon amitié.

Originaire du sud de la France, né au bord de l'eau à Cannes, le monde de la mer (avec ses richesses et ses secrets) a eu très tôt raison de moi. Mes études supérieures en biologie ont commencé à l'université de Nice Sophia-Antipolis mais déjà pendant le DEUG, l'université Pierre et Marie Curie (Paris 6) avec ses formations tournées vers les « métiers océanographiques » et son excellente réputation occupaient mon esprit. Je suis profondément reconnaissant à **Madame Raccault**, responsable à l'époque (1991-1992) de la Licence de *Biologie des Organismes* d'avoir accepté ma candidature et permis mon ancrage dans le cursus de cette université prestigieuse.

C'est au cours de la Maîtrise de *Biologie de Organismes et des Populations* (mention Ecologie marine) que j'ai eu l'occasion de rencontrer pour la première fois Monsieur le **professeur André Toulmond** (responsable de la dite Maîtrise). Je garde un excellent souvenir de la qualité de son enseignement. Je ne savais pas à l'époque que nos chemins se croiseraient à nouveau, moi en tant qu'étudiant chercheur et lui en tant que directeur de la Station Biologique de Roscoff. J'ai eu maintes fois l'occasion de lui demander un conseil ou une lettre de recommandation. A chaque fois

que j'ai suscité sa compétence, il n'a jamais hésité à me consacrer une partie de son temps et a toujours fait preuve d'une grande sollicitude à mon égard. J'espère qu'il sera fier de ce travail réalisé dans le laboratoire qu'il dirige. Pour ma part, je lui adresse un grand merci.

Ce travail de thèse a été effectué sous le regard attentif et éclairé de **Daniel Vaultot**. Dans le monde scientifique et plus particulièrement dans la communauté des *phytoplanktologues*, la réputation de l'équipe qu'il dirige n'est plus à faire. Il est vrai que j'ai été particulièrement frappé au cours de ces quatre années passées à Roscoff par la compétence scientifique et la rigueur de mon directeur de thèse. Je lui suis très reconnaissant de m'avoir accueilli au sein de son groupe et d'avoir dirigé si efficacement mon travail de DEA puis de thèse. Il m'a donné sa confiance en me procurant l'occasion à maintes reprises de rencontrer les protagonistes travaillant sur les micro-organismes marins et de me faire connaître auprès d'eux. Je pense aux différents ateliers de travail, campagne en mer et congrès auxquels j'ai pu participer et pour lesquels je garde un excellent souvenir. Je lui répète la fierté qui est la mienne d'avoir pu contribuer au travail de son équipe et lui adresse mes remerciements les plus chaleureux.

Dans cette équipe « Phytoplancton Océanique », j'ai beaucoup de personnes à remercier à commencer par **Frédéric Partensky**. Il est le bras droit de Daniel et la pierre à l'édifice sans laquelle rien ne peut tenir debout. Signes extérieurs : gentillesse, humour, compétence. Il a toujours suivi avec intérêt mon travail et a su répondre encore et toujours aux questions pressantes. Qu'il trouve ici ma profonde gratitude. **Dominique Marie** est la seconde personne de l'équipe à qui je tiens à présenter ma reconnaissance. Grand manitou de la cytométrie en flux, ingénieur hors pair, véritable alchimiste, il est la personne indéfectible de l'équipe « Phytoplancton Océanique » grâce à laquelle rien n'est jamais impossible. J'ai appris beaucoup auprès de lui et tiens donc à lui présenter l'expression d'une très grande considération en plus de mon amitié. Enfin, merci à **Florence, Isabelle, Laure, Laurence, Nathalie, Sandrine, Sylvie** les « Spice girls » de l'équipe, pour tous les bons moments mais aussi leur aide et leurs conseils. Trouvez ici l'expression de mon amitié la plus sincère.

Voici le moment de remercier une personne extraordinaire et qui a largement contribué à l'accomplissement de ce travail de thèse. Je veux parler de Monsieur **Jean-François Lennon** (chargé de recherche à la Station Biologique de Roscoff). Il m'a accordé beaucoup de son temps, de son génie et de ses impressions. Ensemble, nous avons construit des appareils de prélèvement, et le plus souvent pendant les jours dit non ouvrables de la semaine. Je me souviens en effet de ces nuits

et week-ends à bricoler les prototypes en compagnie de Manon (le chat de la maison), sans oublier les repas de Michèle, sa femme. Si vous doutez encore de l'hospitalité bretonne, c'est que vous n'avez pas encore rencontré ce couple féru de sciences, de musique classique, d'anecdotes et de bonne humeur. Ici encore, ce travail n'aurait pas été le même sans eux. Michèle et Jef, merci.

J'adresse bien sur mes remerciements aux étudiants, mes ami(e)s. FloFlo, Gwenou, FYB, Stéph, MCDC, Nonorak, Xav, Seb, Florent, etc Ils sont nombreux, je ne peux tous les citer mais je ne les oublie pas.

Pendant ces 4 années passées à Roscoff, j'ai eu l'occasion de vivre des expériences extraordinaires bien que n'ayant aucun rapport avec mon travail de thèse. Elles ont toutes un rapport avec la pratique de la plongée sous-marine, passion de longue date (13 ans déjà !) et je m'en voudrais de ne pas vous les faire partager tant elles ont été riches d'enseignement et de plaisir tout autant que la porte de secours, la bouffée d'air pur dont on peut avoir tant besoin. Ainsi ai-je eu l'occasion d'être, l'espace d'une année, vice-président d'une association sportive de plongée sub-aquatique. Cette activité bénévole m'a permis de me présenter au monitorat fédéral : un examen particulièrement en accord avec le métier de la recherche pour ses applications pédagogiques ou son apprentissage du sérieux et de la rigueur. Accompagné de Monsieur Laurent Meijer, directeur de recherche au CNRS à la station biologique mais que je me plais à définir comme un ami, j'ai pu partir sur le Territoire de la Polynésie Française comme responsable de la plongée dans le cadre d'une mission scientifique visant à la récolte d'espèces naturelles marines. L'objectif scientifique ayant donné lieu à cette mission et de celles qui suivront est de découvrir de nouvelles molécules anti-cancéreuses provenant d'espèces marines dans une partie du monde encore peu explorée dans ce domaine d'étude. A l'heure où vous lisez ces quelques lignes, 1 produit extrait d'une éponge récoltée dans le port de Tahiti semble particulièrement prometteur. Savoir que l'on peut participer, certes très modestement, à la découverte d'une de ces molécules qui peut être demain nous guérira de ces fléaux que sont les maladies cancéreuses et autres neuro-dégénérescences est particulièrement gratifiant. Merci à toi Laurent pour cette superbe aventure, ta gentillesse et le partage de ta passion. Enfin, et je m'arrêterai là, j'ai pu participer, d'abord comme candidat (à Banyuls-sur-mer) puis comme encadrant (à Roscoff et encore à Banyuls-sur-mer), à la formation de chef plongeurs scientifiques: une qualification reconnue par l'Institut National des Plongeurs Professionnels et mis en place avec le concours de la formation permanente du CNRS. Je remercie toutes les personnes concernées pour l'acceptation de mon dossier puis de mon recrutement comme

encadrant car j'ai pu vivre, là encore, de grands moments en compagnie de mes amis le Professeur Alain Couté et le Docteur Gérard Thouzeau.

Si je devais dédier ce travail, ce que je fais, ce serait bien sur à des gens exceptionnels : mes parents, **Eliane** et **Bernard**. Je ne peux que les remercier de m'avoir laissé vivre ma vie, prendre les décisions que j'estimais ou voulais bonnes, partir loin pour achever mes envies et surtout de n'avoir jamais douté même dans les moments difficiles. Cela a été le cas lorsque, pour des raisons diverses, j'ai arrêté mes études et ai embrassé le métier de soigneur-dresseur d'orques (au Marineland d'Antibes), une expérience fascinante, qu'ils ont comprise et appréciée. Saint Augustin vous a sûrement inspiré, lui qui disait : « *celui qui se perd dans sa passion a moins perdu que celui qui a perdu sa passion* ». Pour m'avoir laissé connaître les miennes, trouvez ici mes remerciements et l'expression de mon amour. Il est infini.

Merci Carol pour ton soutien dans les derniers moments de doute et d'appréhension. Puisse la formule de Virgile : « L'amour triomphe de tout », que tu aimes à employer, perdurer ... à jamais.

Enfin, j'adresse mes remerciements aux membres du jury pour la lecture et la critique de ce travail de thèse mais aussi pour avoir fait le déplacement pour m'encourager à le soutenir.

Ce travail a été soutenu financièrement par les contrats de la Communauté Européenne MAS2-CT93-0063 (MEDIPELAGOS), MAS3-CT95-0016 (MEDEA) et MAS3-CT97-0128 (PROMOLEC), par JGFOS-France (FRONTAL) ainsi qu'une allocation de recherche nationale attribuée par le Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur.

PRÉAMBULE

En Ecologie marine, au regard de la complexité des phénomènes existant entre les organismes et leur environnement, l'objectif d'expliquer certains comportements ou processus physiologiques peut être difficile à atteindre, le chercheur devant se contenter de réponses intermédiaires. Claude Bernard au siècle dernier ne disait-il pas: "[...] *Quelqu'heureux que l'on puisse être dans les recherches expérimentales, on ne peut jamais arriver qu'à éclairer partiellement un ordre de phénomènes, et il y a toujours à côté des questions plus ou moins connexes qui restent encore obscures [...]*".

L'étude de la dynamique des populations n'échappe pas à cette remarque tant les paramètres et processus impliqués peuvent être nombreux et complexes. « *La science de la dynamique des populations [...] en est encore à un stade d'incertitude dans beaucoup de cas [...]. Une conception raisonnable semble être la suivante : de très nombreux facteurs agissent simultanément ou successivement et interfèrent dans leur influence : climat, alimentation, maladies, prédation, parasitisme, individus de la même espèce, facteurs génétiques et physiologiques et enfin la structure et la diversité de l'écosystème. L'analyse de tels systèmes n'est pas simple et elle requiert pour être exacte des données précises et nombreuses recueillies au cours d'échantillonnage souvent laborieux. Il est certain également que, suivant les espèces et peut-être même les conditions du milieu, ce ne sont pas les mêmes facteurs qui agissent. On peut espérer que grâce aux moyens modernes d'analyse des résultats par ordinateurs, il sera bientôt possible d'exploiter avec succès les données qui s'accumulent en nombre [...]* ». Tout est dit dans ces quelques phrases du livre *Dynamique des populations* de René Dajoz publié en 1974 chez Masson. Il y a déjà 25 ans, l'auteur soulignait l'importance des facteurs environnementaux, la variabilité existant entre organismes, la nécessité d'opérer un échantillonnage haute fréquence, l'utilisation d'outils performants pour le stockage et l'analyse des données. On ne pouvait trouver meilleur préambule au travail de thèse qui suit.

Les années 80-90 ont vu le développement de grands programmes internationaux qui se sont intéressés aux processus dynamiques comme la circulation de l'océan (programme WOCE), les flux de matières (programme JGOFS) ou encore ceux caractérisant les écosystèmes (programme GLOBEC). C'est dans le cadre d'un programme international européen intitulé MEDEA (*Microbial Ecosystems Dynamics*, MAS3-CT95-0016) que s'inscrit l'essentiel de ce travail de thèse. Il s'est

agit pour moi d'étudier la dynamique des populations picoplanctoniques (organismes de taille $<3 \mu\text{m}$) afin de gagner en compréhension sur la variabilité observée à courte échelle de temps pour un certain nombre de paramètres cellulaires et physiologiques de ces organismes. L'ensemble des résultats obtenus en culture et sur le terrain devrait permettre une meilleure interprétation des propriétés optiques enregistrées dans les eaux de surface de l'océan et de mieux comprendre *in fine* les évolutions des populations à long terme.

Dans ce manuscrit, pour des raisons de clarté et de cohérence, je me suis contenté de développer un seul thème, celui de l'influence de la lumière et des rythmes jour-nuit sur les processus de croissance et de division des populations picoplanctoniques. Pour autant, il est évident que la dynamique des populations n'a pas pour seul objet d'étude les processus qui mènent à la production des organismes. Elle doit aussi analyser les processus qui mènent à la disparition des cellules tel que le broutage des cellules par les prédateurs microplanctoniques. C'est une des questions à laquelle je me suis également intéressé, par l'intermédiaire de collaborations de travail. Les travaux concernant ce thème ne sont pas inclus dans le corps de la thèse mais seulement fournis dans un volume annexe. En bref, avec Urania Christaki du Centre National de la Recherche Marine d'Hellinikon en Grèce, nous avons démontré que les populations de ciliés broutaient de manière préférentielle *Synechococcus* par rapport à *Prochlorococcus*, un résultat susceptible d'expliquer la dominance de ce dernier dans certaines situations océanographiques (Christaki et al. 1999). Avec Laure Guillou, de la station biologique de Roscoff, nous avons analysé le comportement du plus petit brouteur des cellules picoplanctoniques connu à ce jour, un flagellé hétérotrophe s'adaptant très rapidement à la biomasse picoplanctonique et pouvant expliquer la remarquable stabilité des populations naturelles (Guillou et al. en révision).

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières.....	11
Liste des figures.....	16
Liste des tableaux et encadrés.....	18
Liste des abréviations.....	19
I INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	21
I.1 Introduction.....	23
I.2 Le picoplancton marin.....	24
I.2.1 Découverte des organismes.....	24
I.2.2 Les représentants du picoplancton.....	25
I.2.3 Ecologie du picoplancton.....	27
I.2.3.1 Distribution des organismes.....	27
I.2.3.2 Facteurs de distribution des organismes.....	28
I.2.3.3 Profils de distribution du picoplancton.....	32
I.2.3.4 Biomasse et production du picoplancton.....	34
I.2.3.4a Vue synoptique.....	34
I.2.3.4b Contribution du picoplancton.....	35
I.3 La dynamique des populations.....	37
I.3.1 Définition.....	37
I.3.2 Echelles d'étude.....	37
I.3.3 La variabilité à petite échelle.....	38
I.3.4 La dynamique des populations picoplanctoniques.....	39
I.3.4.1 Le cycle cellulaire.....	42
I.3.4.1a rappels sur le cycle cellulaire.....	42
I.3.4.1b Mesure de l'ADN des cellules par cytométrie en flux.....	43
I.3.4.1c Estimation du taux de croissance par la méthode du cycle cellulaire.....	44
I.3.4.2 Le broutage du picoplancton.....	47

I.3.4.3	L'action virale.....	49
I.4	Les questions posées.....	51
I.5	Organisation du travail de thèse.....	51
II	MATÉRIELS et METHODES.....	53
II.1	Présentation générale.....	55
II.2	Préleveurs automatiques.....	56
II.3	La cytométrie en flux.....	58
II.3.1	Instrumentation et principe général.....	58
II.3.1.1	La partie fluïdique.....	59
II.3.1.2	La partie optique.....	59
II.3.1.3	La partie électronique et informatique.....	60
II.3.2	La fonction de tri.....	60
II.3.3	Les filtres chromatiques.....	61
II.3.4	Etalonnage de l'appareil, coefficient de variation.....	61
II.3.5	Appareils utilisés.....	62
II.3.5.1	Utilisation du FACSort.....	63
II.4	La microscopie confocale	64
II.4.1	Présentation.....	64
II.4.2	Principe optique.....	65
II.4.3	Préparation des échantillons.....	65
II.5	Article 1: Application of a compact automatic sea water sampler to high frequency picoplankton studies (<i>Aquatic Microbial Ecology</i> 1998, 14:309-314).....	67
II.5.1	Résumé en français.....	67
II.5.2	Publication en anglais.....	67
II.5.3	Informations supplémentaires du site Internet de l'équipe	79
II.6	Article 2: Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR TM Green I (<i>Applied and Environmental Microbiology</i> 1997, 63:186-193).....	84
II.6.1	Résumé en français.....	84
II.6.2	Publication en anglais.....	84

III	Comportement circadien du picoplancton en culture.....	103
III.1	Introduction.....	105
III.2	Article 3: Diel patterns of picoplankton in culture (en préparation pour <i>Journal of phycology</i>).....	106
III.2.1	Résumé de l'article en français.....	106
III.2.2	Publication en anglais.....	106
IV	Régulation par la lumière du cycle cellulaire de <i>Prochlorococcus</i>.....	151
IV.1	Introduction.....	153
IV.2	Régulation du cycle cellulaire par la lumière.....	154
IV.3	Article 4: Cell cycle regulation by light in marine <i>Prochlorococcus</i> (en préparation pour <i>Applied and Environmental Microbiology</i>).....	157
IV.3.1	Résumé de l'article en français.....	157
IV.3.2	Publication en anglais.....	158
V	Dynamique des populations picoplanctoniques dans les eaux côtières de la mer Méditerranée Nord occidentale (rade de Villefranche-sur-mer).....	187
V.1	Introduction.....	189
V.2	Article 5: Picoplankton population dynamics in coastal waters of the NW Mediterranean Sea (<i>Limnology and Oceanography</i> 43:1916-1931).....	190
V.2.1	Résumé de l'article en français.....	190
V.2.2	Publication en anglais.....	191
VI	Dynamique des populations picoplanctoniques en mer d'Alboran (Mer Méditerranée occidentale).....	223
VI.1	Introduction.....	225
VI.2	Structures frontale et tourbillonnaire: rappels.....	226
VI.3	Objectifs de la campagne en mer ALMOFRONT-2.....	228
VI.4	Contribution de l'équipe de Roscoff.....	228
VI.5	Article 6: Picoplankton populations dynamics in surface waters of the Alboran Sea (W Mediterranean Sea) in winter (en préparation pour	

<i>Limnology and Oceanography</i>).....	229
VI.5.1 Résumé de l'article en français.....	229
VI.5.2 Publication en anglais.....	230
VII Conclusions générales et perspectives.....	259
VII.1 Conclusions générales.....	261
VII.2 Perspectives.....	264
VII.2.1 le prélèvement des échantillons.....	264
VII.2.2 Discrimination des populations.....	265
VII.2.3 Mesurer l'ADN des cellules picophytoplanctoniques.....	265
VII.2.4 Les questions en suspens concernant la synchronisation.....	266
VII.2.4.1 Qualité de la lumière et perception du signal.....	266
VII.2.4.2 L'effet du rayonnement ultraviolet.....	267
VII.2.4.3 L'horloge biologique circadienne.....	267
VII.2.5 L'analyse détaillée du cycle cellulaire.....	268
Bibliographie.....	271
Glossaire.....	301

Annexes (voir second volume)

Avant propos

Annexe 1 : Article 7

Growth and grazing on *Prochlorococcus* and *Synechococcus* by two contrasting marine ciliates (*Limnology and Oceanography* 1999, 44: 52-61).

Annexe 2 : Article 8

Dynamique haute fréquence des populations picoplanctoniques (*Journal de Recherche Océanographique* 1999, 24:68-74).

Annexe 3 : Article 9

Smallest oceanic predator (en révision pour *Nature*).

Annexe 4 : Article 10

Silicate interferes negatively with bacterial ability to consume labile DOC
(en révision pour *Nature*).

Annexe 5 : Article 11

Effect of organic and inorganic nutrient addition on coastal microbial communities
(Isefjord, Denmark) (en préparation pour *Ecology*).

Annexe 6 : Article 12

Circadian expression of cell cycle-related genes in a synchronized and axenic
culture of *Prochlorococcus*. (en préparation pour *Molecular Microbiology*).

Annexe 7 : Article 13

Microbial community in the Alboran Sea (W Mediterranean Sea). I. Picophytoplankton,
heterotrophic bacteria and virus distributions (en préparation pour *Journal of
Geophysical research*)

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : Introduction générale.

- Figure I.1** Carte représentant la production primaire annuelle moyenne (en $\text{gC}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$) de l'océan global (d'après Longhurst et al. 1995)..... 24
- Figure I.2** Photographies en microscopie électronique d'organismes caractérisant le picoplancton. A : *Prochlorococcus*, B : *Synechococcus*, C : *Pelagomonas calceolata*, D : *Symbiomonas scintillans*, E : *Micromonas pusilla*, F : *Bolidomonas pacifica*. Photographie en microscopie confocale d'une communauté naturelle mixte de bactéries hétérotrophes (G)..... 26-27
- Figure I.3** Ensemble des distributions verticales dans l'océan de *Prochlorococcus* (A) et *Synechococcus* (B). Données compilées à partir d'un grand nombre de campagnes en mer (d'après Partensky et al. 1999b)..... 30
- Figure I.4** Relation entre les concentrations intégrées de *Prochlorococcus* et (A) la température ou (B) les nitrates en surface (d'après Partensky et al. 1999b)..... 30
- Figure I.5** Distributions des populations de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* pour différentes situations trophiques dans l'océan (d'après Buck et al. 1996, Partensky et al. 1996, Vaultot & Marie 1999)..... 33
- Figure I.6** Cartes représentant la distribution au niveau mondial de *Prochlorococcus* (A) et *Synechococcus* (B) mesurée par cytométrie en flux. Les concentrations sont intégrées le long de la colonne d'eau (d'après Partensky et al. 1999a)..... 36
- Figure I.7** Comparaison entre la variabilité inter-annuelle et la variabilité journalière des concentrations cellulaires des populations de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* mesurées par cytométrie en flux dans l'Océan Pacifique central nord (d'après Campbell et al. 1997 et Vaultot & Marie 1999)..... 40-41
- Figure I.8** Répartition des cellules d'une population naturelle de *Synechococcus* dans les phases du cycle cellulaire observée après marquage de l'ADN en cytométrie en flux 43
- Figure I.9** Schéma résumant la méthode d'estimation du taux de croissance basée sur le cycle cellulaire..... 46
- Figure I.10** Photographies en microscopie électronique des virus marins..... 49

Chapitre II : Matériels et méthodes.

Figure II.1	Photographies d'ensemble de l'échantillonneur linéaire pour cultures..	57
Figure II.2	Schéma de principe du cytomètre en flux.....	59
Figure II.3	Photographie d'ensemble d'un cytomètre en flux de type FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).....	63
Figure II.4	Schémas de principe de la microscopie confocale.....	66
Figure II.5	Photographie en microscopie confocale de <i>Prochlorococcus</i>	66

Chapitre IV : Régulation du cycle cellulaire de *Prochlorococcus* par la lumière.

Figure IV.1	Représentation schématique du cycle cellulaire eucaryote avec le segment A-T dépendant de la lumière inséré en G1. D correspond à la division de la cellule..	155
--------------------	--	-----

Chapitre VI : Dynamique des populations picoplanctoniques en mer d'Alboran.

Figure VI.1	Photographie aérienne du détroit de Gibraltar séparant l'océan Atlantique de la mer d'Alboran.....	226
Figure VI.2	Schémas représentant la mise en place d'une structure tourbillonnaire chaude à partir de l'effondrement d'un méandre créé par la rencontre des eaux atlantiques avec le jet du « Gulf Stream » (extrait de Tom Garison. 1995. Oceanography: an introduction to marine science, Wadsworth Publishing Company, 567 p.).....	227
Figure VI.3	Schéma symbolisant la structure jet-front géostrophique de la mer d'Alboran rencontrée pendant la mission en mer Almofront-2 et les différents sites échantillonnés.....	228

LISTE DES TABLEAUX ET ENCADRÉS

Chapitre II : Matériels et méthodes.

Encadré II.1 Les applications de la cytométrie en flux à l'étude du plancton marin... 58

Tableau II.1 Principales caractéristiques des deux cytomètres utilisés..... 62

Encadré II.2 Mesures de CV des billes 0,95 μm pour différentes conditions
d'utilisation..... 64

Chapitre IV : Régulation par la lumière du cycle cellulaire de *Prochlorococcus*.

Encadré IV.1 Définition et propriétés des horloges biologiques circadiennes..... 157

Chapitre VI : Dynamique des populations picoplanctoniques en mer d'Alboran.

Tableau VI.1 Biomasse et production primaire annuelles moyennes en mer d'Alboran
et dans les bassins occidental, oriental et méditerranéen tout entier (d'après Antoine
et al. 1995)..... 226

LISTE DES ABBREVIATIONS

Cycle cellulaire

ADN, ARN	Acide désoxyribonucléique, Acide ribonucléique
G1, G2, S, M	Gap 1, Gap 2, Synthesis, Mitosis

Cytométrie en flux

CV	Coefficient de variation
FALS	Forward Angle Light Scatter
LASER	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
RALS	Right Angle Light Scatter

Divers

DMS	Diméthylsulfide
§	paragraphe

Pigments

PUB	Phycourobiline
PEB	Phycoérythrobiline

Océanographie

GLOBEC	Global Ocean Ecosystems Dynamics
JGOFS	Joint Global Ocean flux Study
PCO₂	Pression partielle de CO ₂
pH	potentiel hydrogène
PICODIV	Picoplankton Diversity
PROOF	Processus biogéochimiques dans l'océan et flux
WOCE	World Ocean Circulation Experiment

- CHAPITRE I -

INTRODUCTION GÉNÉRALE

- CHAPITRE I -

INTRODUCTION GÉNÉRALE

“Small is beautiful” (Raven 1998).

I.1 Introduction.

Etablir comment la variabilité temporelle et spatiale de l'environnement structure les réponses biologiques à l'échelle des populations, de la cellule, et depuis peu au niveau moléculaire, est un thème central de l'océanographie biologique contemporaine. La boucle microbienne, c'est à dire la communauté formée par le picoplancton photosynthétique (*Prochlorococcus*, *Synechococcus*, les picoeucaryotes), les bactéries hétérotrophes, les virus et le microzooplancton, est extrêmement dynamique. L'échelle temporelle avec laquelle ces phénomènes ont été étudiés précédemment (celle de la semaine ou du mois) s'est révélée inadéquate pour cerner cette dynamique. L'influence environnementale et les interactions entre ces populations ou peuplements sont encore très peu connues en raison de la découverte récente des organismes, la taille des cellules et de la difficulté associée au coût de l'exploration de l'océan ouvert où ils prédominent.

Le travail de recherche présenté dans ce manuscrit a consisté en l'étude de la dynamique des populations picoplanctoniques. En développant des méthodes d'échantillonnage appropriées et au moyen d'outils d'analyse adéquats, nous avons pu concentrer notre attention sur l'échelle de la journée pour tenter de mieux comprendre la variabilité à petite échelle car c'est elle qui pourrait finalement expliquer les évolutions des populations à long terme. Au laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'influence d'un rythme jour-nuit de lumière et d'obscurité sur la synchronisation des processus de croissance et de division de divers représentants du picoplancton puis, plus spécifiquement, à la régulation par la lumière du cycle cellulaire de *Prochlorococcus*. Les données sur les populations naturelles ont été obtenues au cours d'un atelier de travail et d'une campagne à la mer en Méditerranée. Elles ont permis de suivre la variabilité circadienne du picoplancton pendant plusieurs jours et de montrer l'importance de certains facteurs environnementaux comme la couverture nuageuse ou l'hydrologie sur la dynamique des populations de surface.

I.2 Le picoplancton marin.

I.2.1 Découverte des organismes.

Il y a encore une trentaine d'années, les régions centrales des océans étaient perçues comme de vastes déserts biologiques (Fig. I.1). Bien que l'on pouvait y mesurer de faibles concentrations en chlorophylle, très peu de phytoplancton y était détecté (Ryther 1969). Jusqu'à la fin des années 1970, quelques travaux isolés supposent toutefois que des organismes de très petite taille existent et pourraient contribuer de manière significative à la production primaire océanique (Wauthy et al. 1967, Jeffrey 1976, Throndsen 1976). Il faut attendre les découvertes de Waterbury et al. (1979) puis de Johnson & Sieburth (1979, 1982) et enfin de Chisholm et al. (1988) pour révéler l'existence et l'importance des organismes planctoniques pélagiques autotrophes, procaryotes et eucaryotes, caractérisés par une taille de l'ordre du micron. Jusqu'alors, cette classe de taille dite picoplanctonique (0,2-2 μ m, Sieburth et al. 1978) était supposée être constituée essentiellement de bactéries hétérotrophes planctoniques, observées depuis beaucoup plus longtemps (Beijerinck 1889, Frankland & Frankland 1894). Pour autant, la découverte et la reconnaissance de l'importance de certains groupes au sein de la communauté picoplanctonique hétérotrophe sont récentes, à l'exemple des *Archaea* (Furhman et al. 1992, DeLong et al. 1994). A ce jour, seulement une trentaine d'espèces appartenant au picoplancton photosynthétique a été décrite sur les 5000 espèces phytoplanctoniques répertoriées (Norton et al. 1996) mais de nouveaux représentants sont régulièrement découverts (voir ci-dessous).

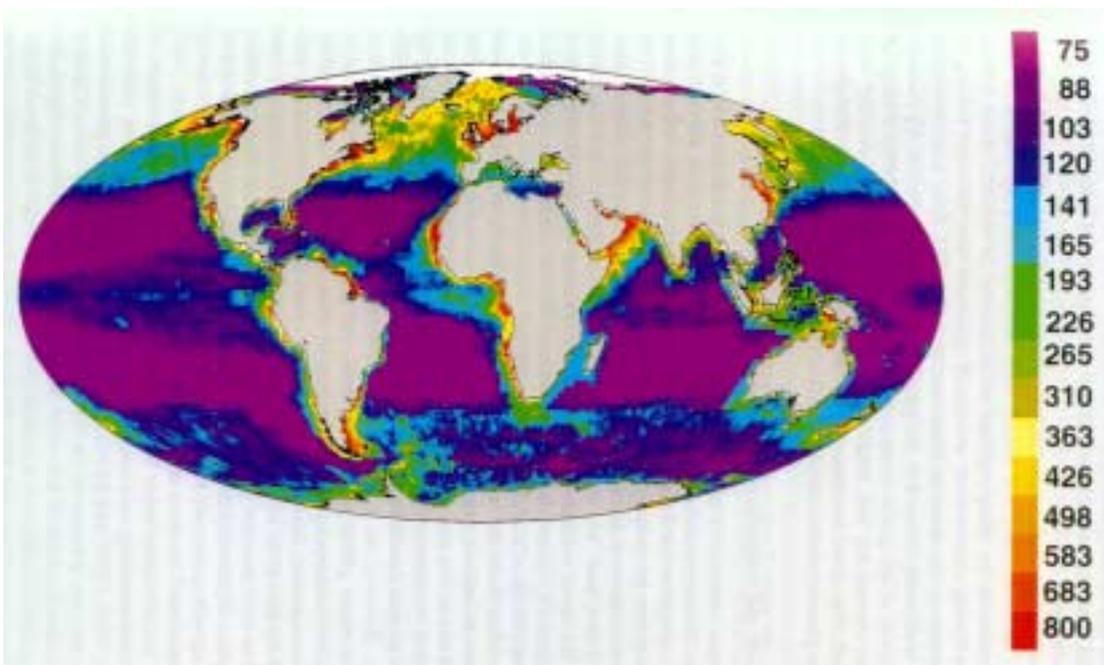
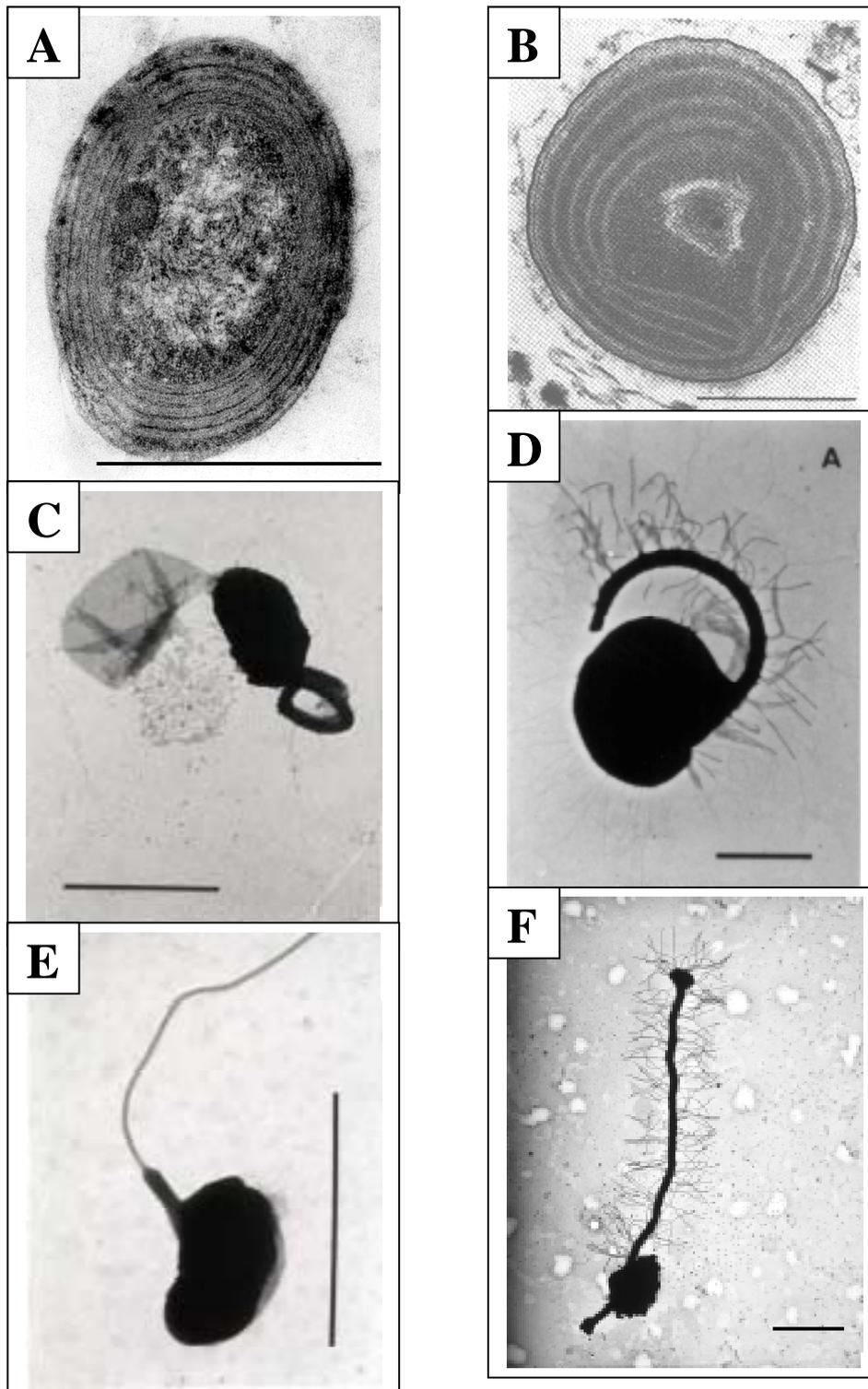


Fig. I.1 Répartition en fausses couleurs à partir d'images satellites et de l'utilisation d'un modèle numérique de la production primaire annuelle moyenne du phytoplancton dans la zone euphotique, représentée avec une concentration croissante du violet vers le rouge en gC.m⁻².an⁻¹ (d'après Longhurst et al. 1995). On observe en violet la faible productivité dans les parties centrales océaniques dites oligotrophes (océans tropicaux et subtropicaux, mer Méditerranée).

I.2.2 Les représentants du picoplancton.

En raison de la plasticité de certains organismes, on accepte aujourd'hui dans la communauté picoplanctonique l'ensemble des organismes compris entre 0,2 et 3 μm en diamètre, la limite supérieure de 2 μm « dictée » par les systèmes de filtration étant peu réaliste dans certains cas (Simon 1995, Magazzù & Decembrini 1995, Charpy & Blanchot 1998). Parmi les organismes autotrophes, c'est à dire les représentants du picophytoplancton (Fogg 1986), les cyanobactéries sont très largement représentées en terme de biomasse et d'ubiquité (Partensky et al. 1999a). Cela n'est pas étonnant quand on sait que ces bactéries photosynthétiques sont les plus vieux représentants biologiques terrestres et qu'on en retrouve des espèces fossiles vieilles d'un milliard d'années (Schopf 1993). Au cours de l'évolution, ces cellules ont eu le temps de coloniser et de s'adapter à tous les milieux qu'elles ont en partie façonnés. Parmi elles, le genre *Synechococcus* est le plus ubiquiste alors que *Prochlorococcus* est reconnu aujourd'hui comme l'organisme photosynthétique le plus abondant de la biosphère (Partensky et al. 1999b). La diversité génétique au sein des populations picoplanctoniques de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* a été clairement démontrée (Scanlan et al. 1996, Toledo & Palenik 1997, Urbach & Chisholm 1998, Moore et al. 1998). Cette variabilité génétique a été observée en terme de composition pigmentaire (Olson et al. 1990, Campbell & Vaulot 1993), d'un point de vue immunologique (Campbell & Itturiaga 1988) et physiologique (Partensky et al. 1993, Moore et al. 1995). Elle a été clairement démontrée au moyen d'outils phylogénétiques basés notamment sur la comparaison des séquences de l'ARNr 16 S (voir Palenik et al. 1999 et les références qu'ils citent). Après les cyanobactéries et ses deux genres exclusifs précédemment cités (*Prochlorococcus* et *Synechococcus*), le troisième groupe du picoplancton photosynthétique est composé d'eucaryotes. Les espèces picoeucaryotes sont ubiquistes, des eaux équatoriales aux eaux polaires et leur contribution à la biomasse picoplanctonique est toujours importante (Campbell et al. 1994a, Partensky et al. 1996, Smith et al. 1985). La diversité taxonomique de ce groupe est grande et encore très peu connue (Potter et al. 1997, Guillou et al. 1999b). En effet, ces dernières années de nombreuses classes, genres et espèces auto- et hétérotrophes ont été décrites (Eikrem & Thronsen 1990, Guillard et al. 1991, Andersen et al. 1993, Courties et al. 1994, Guillou et al. 1999a, en préparation). Les hétérotrophes sont essentiellement représentés par des bactéries qui forment des communautés constituées de plusieurs groupes comme le révèlent par exemple la cytométrie en flux via l'intermédiaire d'un marquage simple des acides nucléiques des cellules (Monger & Landry 1993, Marie et al. 1996), l'hybridation *in situ* (Amann 1995, Joux & Lebaron 1995, Glöckner et al. 1999) ou encore d'autres techniques de biologie moléculaire comme l'électrophorèse sur gradient de gel dénaturant (DGGE, Muyzer et al. 1993, Muyzer & Smalla 1998). Dans ce groupe des hétérotrophes picoplanctoniques, *Bacteria* et

Archaea (Furhman et al. 1992, Delong et al. 1994) apparaissent comme les deux principaux domaines. En milieu marin, les membres des groupes des *Cytophaga* - *Flavobacter* dominent très largement sur ceux appartenant aux sous classes alpha et gamma des protéobactéries ou aux *Planctomycetales* (Glöckner et al. 1999, Hagström et al. soumis) sauf rares exceptions (Riemann et al. 1999). La diversité génétique au sein de la communauté hétérotrophique est sûrement très importante (Giovanonni et al. 1990, Furhman et al. 1993, Amann et al. 1996) mais reste encore parmi les moins bien connues. En 1997, Schut et al. estimaient que plus de 90% des cellules bactériennes marines et océaniques n'ont jamais été cultivées ou caractérisées.



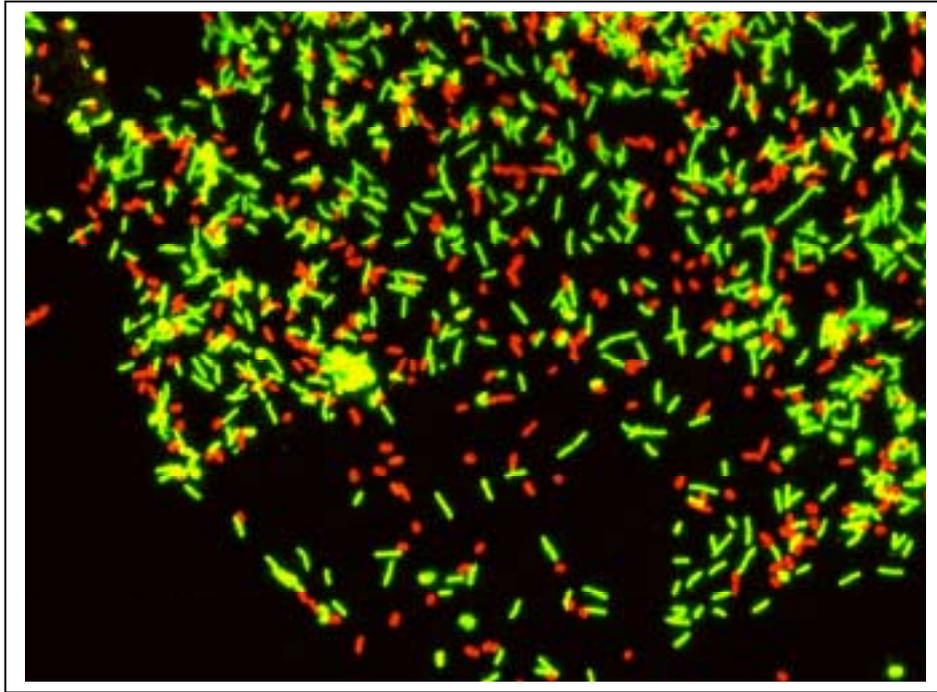


Fig. I.2 Les représentants du picoplancton. Photographies en microscopie électronique de A: *Prochlorococcus* SS 120 (Cyanophyceae, mer des Sargasses, dans Chisholm et al. 1988, barre d'échelle : 0,5 μm), B: *Synechococcus* sp. (Cyanophyceae, dans Rippka et al. 1979, barre d'échelle : 0,5 μm), C: *Pelagomonas calceolata* (Pelagophyceae, ubiquiste, dans Andersen et al. 1993, barre d'échelle : 1 μm), D: *Symbiomonas scintillans* (Bicosoecid, Pacifique équatorial et mer Méditerranée, Guillou & Chrétiennot-Dinet dans Guillou 1999, barre d'échelle :1 μm), E : *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae, ubiquiste, Manton & Parke 1960, dans Guillou 1999, barre d'échelle : 1 μm), F: *Bolidomonas pacifica* (Bolidophyceae, Pacifique équatorial, Guillou & Chrétiennot-Dinet dans Guillou et al. 1999a, barre d'échelle :1 μm). Image confocale d'une communauté naturelle mixte de bactéries hétérotrophes (alpha, bêta et *Cytophaga* – *Flavobacter*) observée en microscopie confocale après marquage et hybridation des acides nucléiques au moyen de sondes fluorescentes (Biegala et al. non publié).

I.2.3 Ecologie du picoplancton.

I.2.3.1 Distribution des organismes.

Le picoplancton domine la biomasse photosynthétique dans de nombreux écosystèmes aquatiques, non seulement dans les régions très oligotrophes comme le Pacifique central ou la Méditerranée orientale mais aussi dans des zones plus mésotrophes telles que les régions équatoriales, Atlantique et Pacifique (voir références dans Partensky et al. 1999b). Le picoplancton n'est toutefois pas exclusivement restreint aux environnements pélagiques. Dans les eaux côtières, cette communauté est présente tout au long de l'année et constitue le « peuplement de fond » sur lequel des phénomènes épisodiques tels que le bloom printanier se développe (Fogg 1986, Shimada et al. 1995). Dans certains environnements, tels que les atolls, le picoplancton constitue la composante majeure de la biomasse et de la productivité toute l'année (Charpy & Blanchot 1999). En terme de dominance, les populations autotrophes de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et de picoeucaryotes occupent des niches écologiques différentes bien que se recouvrant en partie. *Prochlorococcus* domine les eaux oligotrophes à ultra-oligotrophes, jusqu'à des profondeurs de

150-200 mètres mais reste cantonnée dans une bande latitudinaire stricte (45°N-40°S). Les populations de *Synechococcus* et de picoeucaryotes sont plus ubiquistes et dominant les zones mésotrophes à eutrophes sur des profondeurs excédant rarement les 100 mètres (Partensky et al. 1999b) bien que l'on enregistre très souvent en milieu oligotrophe un pic d'eucaryotes en profondeur (LeBouteiller et al. 1992). Les bactéries hétérotrophes colonisent toutes les niches écologiques avec une constance numérique remarquable (environ 5×10^5 cell.ml⁻¹), et sont majoritairement cantonnées à la couche euphotique (Ducklow 1999).

I.2.3.2 Facteurs de distribution des organismes.

La lumière est, avec les éléments nutritifs, le principal facteur pour expliquer la distribution des populations picoplanctoniques (Chisholm 1992, Fig. I.3). Les populations de *Prochlorococcus* qui peuvent vivre en profondeur (jusqu'à 200 mètres) synthétisent une quantité importante de divinyl-chl *b*, un pigment accessoire absorbant de façon optimale la lumière bleue (Goericke & Repeta 1992) qui est la couleur du spectre solaire qui pénètre le plus profondément dans l'océan (Jerlov 1976). Récemment, ces populations se sont avérées posséder également de la phycoérythrine fonctionnelle susceptible de favoriser la collecte d'énergie lumineuse en profondeur (Hess et al. 1996, Lokstein et al. 1999). Encore plus récemment, Garczarek et al. (accepté) ont trouvé que les protéines impliquées dans la collecte de la lumière étaient codées par 7 gènes différents chez les populations de fond contre 1 seul gène chez les populations de surface. La multiplication de ces gènes apparaîtrait donc comme un facteur clé pour survivre à des conditions de lumière extrêmement faibles. Les populations de surface n'ont qu'une faible quantité de divinyl-chl *b* et résistent mieux aux fortes intensités lumineuses. Les études génétiques ont révélé que les populations de surface et de fond sont différentes (Moore et al. 1998, Moore & Chisholm 1999). Les taux de croissance maximum sont enregistrés pour *Prochlorococcus in situ* à des intensités correspondant entre 1 et 30% de l'énergie lumineuse de surface. Ces résultats ont été confirmés en culture (Moore et al. 1995, Shalapyonok et al. 1998). Seuls quelques rares études comme celle de Liu et al. (1998) ou de Brown et al. (1999) ont rapporté un taux de croissance supérieur à une division par jour dans les eaux de surface de la mer d'Arabie. En fait les souches adaptées aux fortes lumière de surface semblent capables de présenter des taux de croissance supérieurs à une division par jour (Partensky et al. en préparation). De la même manière, il est possible de distinguer les populations océaniques et côtières de *Synechococcus*, adaptées chromatiquement à différentes couleurs de l'eau, c'est à dire plutôt caractéristiques des eaux vertes (côtières) et des eaux bleues (océaniques) respectivement. Leur pigmentation est différente ce qui leur permet d'absorber différemment les longueurs d'onde lumineuses disponibles (Wood et al. 1985, 1998). Cette

pigmentation est liée à une famille de phycobiliprotéines qui sont les composants majeurs de l'appareil collecteur de lumière chez les cyanobactéries. Chez *Synechococcus*, la phycoérythrine est le pigment le plus important et il peut être caractérisé par la nature, le nombre et les proportions respectives de deux chromophores: la phycourobiline (PUB absorbant à 495 nm) et la phycoérythrobiline (PEB absorbant à 545 nm). Il est généralement observé que le rapport PUB/PEB augmente avec la profondeur et avec la distance à la côte indiquant une augmentation de la proportion de PUB, plus avantageux dans les eaux « bleues » (Alberte et al. 1984, Ong et al. 1984, Wood et al. 1995). *Synechococcus* est capable de s'adapter à une grande variation de l'intensité lumineuse comme l'ont montré les expériences réalisées sur la souche WH 7803, soumise à une intensité lumineuse variant entre 0 et 2000 $\mu\text{mol quanta.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Kana & Gilbert 1987). Globalement, les taux de croissance maximum mesurés pour les populations naturelles de *Synechococcus* correspondent à des niveaux d'éclairement supérieurs à 10% de l'intensité de surface (Furnas & Crosbie 1999), plus rarement à des niveaux moindres (Liu et al. 1998) avec une nette préférence pour des intensités de l'ordre de 80-100 $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et plus (Kana & Gilbert 1987, Moore et al. 1995). A l'inverse de *Prochlorococcus*, des taux de division supérieurs à 1 et 2 division(s) par jour ont été couramment observés chez *Synechococcus* (voir références dans Furnas & Crosbie 1999). Il n'y a que peu de données sur les capacités de croissance en réponse à la lumière du picoplancton eucaryote. Glover et al. (1987) ont montré pour quelques souches picoplanctoniques (*Nannochloris* sp., *Micromonas pusilla*) une croissance importante en lumière bleue et plus faible en lumière verte, avec typiquement des taux de croissance plus élevés à des niveaux d'éclairement comparables à ceux enregistrés à la base de la couche euphotique. Iriarte & Purdee (1993) ont révélé également que *Pycnococcus provasolii* est bien adapté pour croître à faible intensité permettant d'expliquer son succès dans la colonisation des profondeurs où se situe la pycnocline. Les organismes eucaryotes peuvent également s'accommoder d'intensités élevées, suggérant une grande plasticité des capacités photosynthétiques (Durand & Olson 1998).

La concentration en éléments nutritifs intervient de manière significative dans la distribution des populations, à l'exception semble-t-il de *Prochlorococcus*. Ce dernier domine dans les eaux oligotrophes (c'est à dire les eaux pour lesquelles la concentration en chlorophylle est inférieure à 0,1-0,2 mg.m^{-3}) et où la concentration en nitrate est souvent indétectable (Fig I.4B). En fait, la petite taille de *Prochlorococcus* (Raven 1998) et de son génome (Strehl et al. 1999) en complément de son adaptation à la lumière pourraient favoriser sa croissance dans les conditions oligotrophiques. Les eaux plus enrichies en nutriments inorganiques profitent plus aux grosses cellules à commencer par les picoeucaryotes qui dominent dans les eaux mésotrophes à eutrophes.

Synechococcus s'accommode parfaitement des eaux à caractère mésotrophe (Partensky et al. 1996) et l'accroissement d'abondance de cette cyanobactérie est généralement corrélé à celle des nitrates + nitrites (voir Partensky et al. 1999a). Il a été clairement démontré que le picoplancton est sensible aux enrichissements en azote (Vaulot & Partensky 1992, Lindell et al. en préparation) et en phosphore (Parpais et al. 1996, Vaulot et al. 1996, Thingstad et al. 1998) aussi bien en culture que dans le milieu naturel. Face aux éléments traces comme le fer, la limitation de la croissance semble plus forte chez les grosses cellules (Zettler et al. 1996) bien que des études au laboratoire aient clairement montré l'importance de cet élément sur les processus photosynthétiques et de croissance de *Synechococcus* par exemple (LaRoche et al. 1995, Henley & Wing 1998).

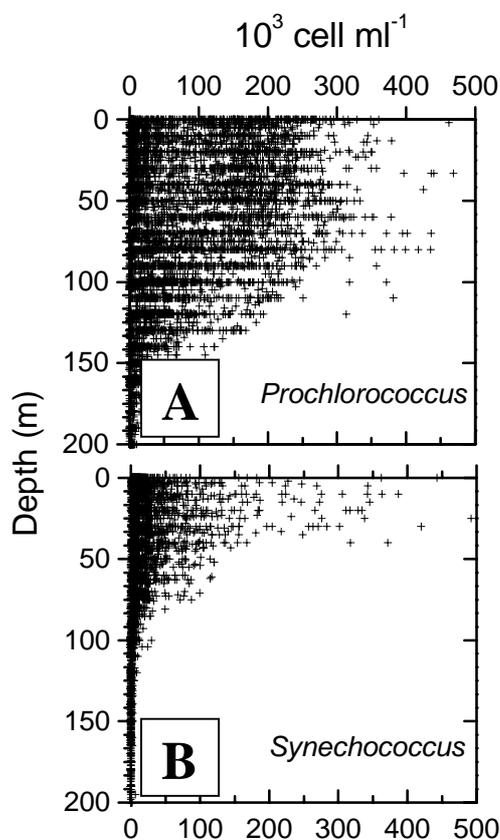


Fig. I.3 Ensemble des distributions verticales de *Prochlorococcus* (A) et *Synechococcus* (B). Compilation de données issues de 40 missions en mer, soit 740 stations et 6500 mesures individuelles (repris de Partensky et al. 1999b).

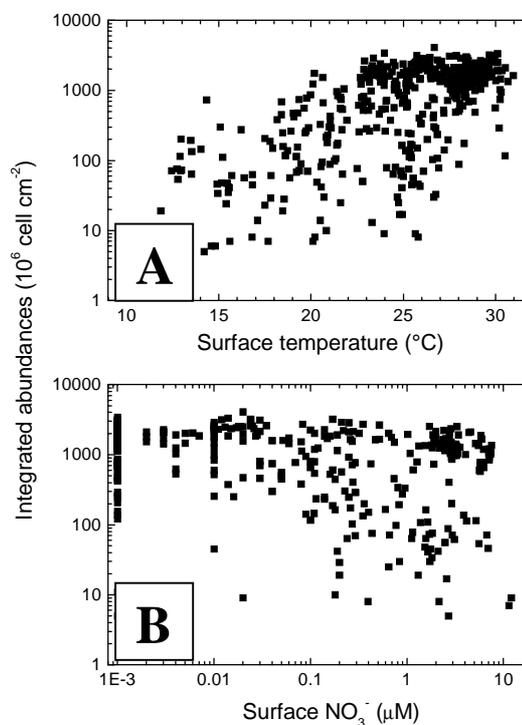


Fig. I.4 Relation entre les concentrations intégrées de *Prochlorococcus* et (A) la température ou (B) les nitrates en surface. Les concentrations de 1E-3 de nitrates correspondent à des niveaux indétectables. Base de données identique à celle de la figure I.3.

La température et la productivité picoplanctonique sont positivement corrélées, comme l'ont montré des expériences au laboratoire (Moore et al. 1995) et sur le terrain des études locales sur le long terme (Shimada et al. 1995, Li 1998) ou au travers de régions caractérisées par un gradient spatial ou temporel de température marqué (Suzuki et al. 1995, Zubkov et al. 1998).

Prochlorococcus se situe exclusivement dans une bande latitudinale entre 40°N et 40°S et représente un genre du picoplancton très sensible à la température qui semble létale pour sa croissance dans les valeurs basses. Il s'accommode des eaux dont la température est comprise entre 15 et 30°C et disparaît de celles dont la température devient inférieure à 12°C (Olson et al. 1990, Shimada et al. 1999, Fig. I.4A). Sa présence a exceptionnellement été enregistrée par 60°N au large de l'Islande avec des températures de l'ordre de 10°C (Buck et al. 1996). *Synechococcus* est, quant à lui, encore bien présent dans des eaux à 2°C (Shapiro & Haugen 1988) et peut proliférer à des températures de 6 à 8°C (Neuer 1992). Il est clairement absent dans les eaux polaires (Shimada et al. 1999). Globalement, les taux de croissance maximum des populations naturelles de *Synechococcus* et *Prochlorococcus* sont mesurés entre 22 et 27°C (Moore et al. 1995, Furnas & Crosbie 1999). Les communautés picoeucaryotiques semblent s'accommoder comme *Synechococcus* d'une grande variété de température, puisqu'on enregistre la présence de ces populations jusque dans les eaux polaires (Thomsen 1982, Smith et al. 1985, Throndsen & Kristiansen 1991). La question toutefois se pose de savoir si les communautés tropicales et polaires sont les mêmes bien que l'on se doute qu'il n'en est rien.

Le broutage et l'action virale constituent d'importants facteurs de distribution et de régulation des populations picoplanctoniques. Le broutage est en effet la cause principale de mortalité des cellules phytoplanctoniques et donc de régulation de la production de biomasse nouvelle. Le picoplancton est brouté ou capté par un grand nombre d'organismes à commencer par le nano- et le microzooplancton comme les flagellés hétérotrophes (Christoffersen 1994, Caron et al. 1999) ou les ciliés (Christaki et al. 1999, Dolan & Simek 1999) mais également par les éponges (Pile et al. 1996, Yahel et al. 1998), les ascidies (Ribes et al. 1998a), les coraux (Ribes et al. 1998b), les annélides filtreurs (Esther et al. en préparation) ou encore les appendiculaires (Blanchot et al. en préparation). Au laboratoire, nous avons démontré que les populations de ciliés broutaient de manière préférentielle *Synechococcus* par rapport à *Prochlorococcus* (Christaki et al. 1999, voir annexe 1). Inversement, le plus petit hétérotrophe eucaryote (2 µm) décrit à ce jour, *Picophagus flagellatus*, semble préférer *Prochlorococcus*. Son fort taux de division (2 divisions/jour) lui permet de s'adapter très rapidement aux changements de biomasse picoplanctonique et l'existence de tels organismes pourrait expliquer la grande stabilité des populations naturelles du picoplancton (Guillou et al. soumis, voir annexe 3). La contribution virale à la mortalité phytoplanctonique est encore mal connue mais elle pourrait également jouer un rôle prépondérant dans la distribution et le contrôle de la biomasse en raison de sa spécificité (Suttle et al. 1990, Bratbak et al. 1993, Zingone et al. 1999). Il est toutefois intéressant de noter que les procaryotes photosynthétiques semblent peu

touchés par l'action virale par comparaison au broutage (Waterbury & Valois 1993, Suttle & Chan 1993) et que l'on n'a pas trouvé à ce jour de virus chez *Prochlorococcus*, contrairement à *Synechococcus* (voir § I.3.4.3 pour plus de détails).

Les études expérimentales portant sur l'effet de la turbulence sur les communautés microbiennes sont encore limitées et parfois contradictoires. En fait, l'effet de la turbulence sur les bactéries dans le milieu naturel doit être considéré sous deux angles. L'effet direct sur la croissance tout d'abord. Théoriquement, la turbulence qui assure le renouvellement nutritif autour des cellules devrait favoriser leur croissance. Il semble que, dans la pratique, l'accroissement du flux de nutriments est trop faible pour avoir un effet quelconque sur la croissance (Karp-Boss et al. 1996). L'autre effet (indirect) se traduit au niveau de la pression de prédation. Peters et al. (1998) ont en effet montré qu'en milieu turbulent, un changement s'opère au niveau de l'impact des prédateurs et les microflagellés délaissent le pico- et le nanoplancton au profit d'organismes de taille supérieure. La conséquence est l'augmentation de la concentration des organismes de taille bactérienne.

La stratification, la déstratification des eaux en réponses aux mélanges verticaux sont également des processus physiques qui interviennent significativement dans la distribution des organismes. Ces phénomènes, complexes, ne sont pas discutés ici.

I.2.3.3 Profils de distribution du picoplancton.

Dans l'océan ouvert, oligotrophe, les concentrations typiques de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et des picoeucaryotes sont respectivement de l'ordre de 10^5 , 10^4 et 10^3 cell.ml⁻¹ (Campbell et al. 1994a, Partensky et al. 1999a). Les bactéries hétérotrophes atteignent des concentrations de 5×10^5 cell.ml⁻¹ (Ducklow 1999). Il s'agit là bien entendu de valeurs moyennes qui peuvent varier considérablement avec le moment de l'année et la latitude, avec les saisons et la géographie, la stratification des eaux et la disponibilité en nutriments.

Si l'on se limite à la distribution des populations de *Prochlorococcus* et de *Synechococcus*, trois types de distribution se détachent nettement comme représenté sur la figure I.5 extraite de Partensky et al. (1999b) ci-dessous :

- le premier type de profil vertical est rencontré essentiellement dans les environnements côtiers. *Prochlorococcus* est concentré dans la couche mélangé de surface et son abondance chute brutalement sous la thermocline où un maximum peut parfois être observé. *Synechococcus* a une distribution similaire ou légèrement plus forte en nombre.

- Le deuxième type de distribution voit un maximum de l'ordre de 10^5 cell.ml⁻¹ pour *Prochlorococcus* à la base de la couche euphotique et sa concentration en surface est plus faible (approximativement 10^4 cell.ml⁻¹). *Synechococcus* présente des concentrations similaires à un ordre de grandeur inférieur. Il descend moins profondément que *Prochlorococcus*.
- Dans le troisième type, *Prochlorococcus* s'étend de la surface au bas de la couche euphotique à des concentrations quasi constantes de l'ordre de 10^5 à 3×10^5 cell.ml⁻¹. Dans ce cas, la concentration de *Synechococcus* est près de 100 fois plus faible.

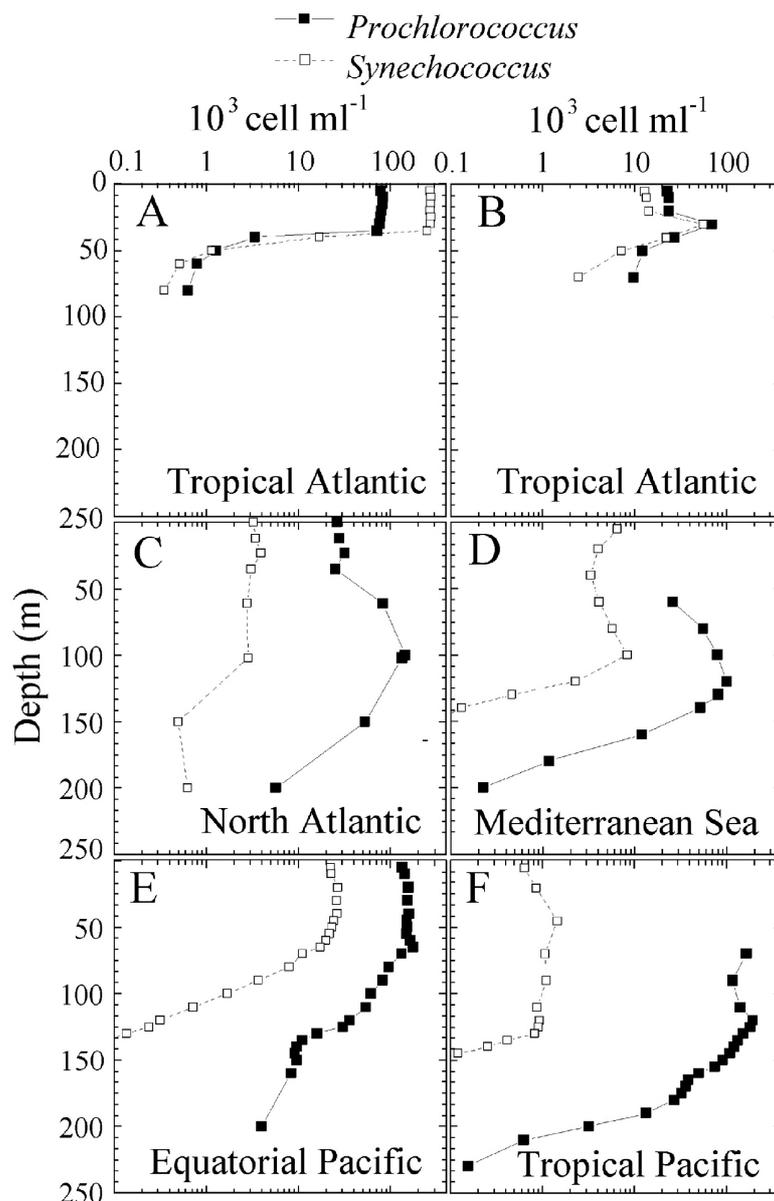


Fig. 1.5 Distributions verticales typiques de *Prochlorococcus* et *Synechococcus*. A-B. maximum dans la couche de surface. C-D. Maximum profond. E-F. Distribution uniforme sur la couche euphotique. A-B. Atlantique tropical Nord, EUMELI3 (Partensky et al. 1996). A. site EU, au large de la Mauritanie (20 °N, 18 °W). B. site MESO (18 °N, 21 °W). C. Atlantique N, 30° N, 23 °W (Buck et al. 1996). D. Méditerranée E, 34 °N 18 °E, MINOS (données non publiées). E. Pacifique Equatorial, 150° W, 5° S (Vaulot & Marie 1999). F. Pacifique tropical, 150° W, 16° S (Vaulot & Marie 1999). Dans les panneaux D et F, la fluorescence rouge de *Prochlorococcus* était trop faible pour être détectée en surface (repris de Partensky et al. 1999b).

I.2.3.4 Biomasse et production du picoplancton.

I.2.3.4a Vue synoptique.

La quantité de carbone organique produite en moyenne chaque année par les océans est estimée entre 45 et 50 gigatonnes alors que la production primaire totale de la biosphère est de l'ordre de 110 gigatonnes de carbone par an (Falkowski 1994, Falkowski et al. 1998, Antoine et al. 1996, Field et al. 1998). Les écosystèmes aquatiques, qui couvrent 70% de la surface terrestre, contribuent donc à 45% de la production primaire globale. Les organismes phytoplanctoniques, acteurs de cette production, ne représentent pourtant que 25% de l'ensemble de la végétation planétaire et contribuent à 1-2% du carbone végétal et à 0,2% du carbone photosynthétiquement actif (Falkowski 1994). Ces quelques chiffres révèlent combien le renouvellement de la biomasse phytoplanctonique est rapide. La croissance du phytoplancton est de l'ordre de la journée par comparaison avec celle des végétaux terrestres, qui est plutôt de l'ordre de la semaine ou de l'année. *L'échelle de la journée est donc particulièrement importante pour l'étude fine des variations de la biomasse et de la production des populations phytoplanctoniques.*

I.2.3.4b Contribution du picoplancton à la biomasse et à la production globales.

Le picoplancton domine les eaux centrales des océans. Ces régions oligotrophes, en recouvrant 90% de la surface de l'océan mondial (Antoine et al. 1996), jouent un rôle prépondérant dans les grands cycles biogéochimiques et comptent pour approximativement 40% de la production primaire globale (Killops et Killops 1993). Dans le Pacifique équatorial comme en mer d'Arabie, le picoplancton participe à 90% de la biomasse chlorophyllienne et les procaryotes contribuent à plus de 50% de la production primaire (Chavez 1989, Campbell et al. 1994a, 1999). Dans les régions subtropicales océaniques, les producteurs primaires procaryotes ont montré par le passé qu'ils pouvaient intervenir jusqu'à 95% de l'incorporation de carbone 14 (Waterbury et al. 1986, Itturiaga & Marra 1988). Globalement, le picophytoplancton contribue à hauteur de 10% au moins à la productivité primaire océanique nette avec 3 gigatonnes de carbone par an (Raven 1998).

Plus spécifiquement, la contribution à la biomasse phytoplanctonique totale de *Prochlorococcus* peut s'élever à 30% (Campbell et al. 1997). Dans le Pacifique Nord équatorial, l'Atlantique tropical oriental, la Méditerranée orientale, la Mer d'Arabie pour lesquels des conditions oligotrophes à ultra-oligotrophes sont enregistrées, la contribution de *Prochlorococcus* à la biomasse totale de carbone peut être la plus élevée au sein de la communauté picoplanctonique. Campbell et al. (1994a) rapporte $96 \mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-2}$ soit 67% de la contribution en carbone du picophytoplancton et 36% de l'ensemble du picoplancton (c'est à dire en tenant compte des

bactéries hétérotrophes). Partensky et al. (1996) rapporte également, pour la partie oligotrophe de l'océan Atlantique, un chiffre identique.

Dans les eaux oligotrophes à ultra-oligotrophes, la contribution de *Synechococcus* à la biomasse phytoplanctonique totale est négligeable par rapport à celle des *Prochlorococcus* et des picoeucaryotes. Campbell et al. (1994a) pour le Pacifique Nord et Partensky et al. (1996) pour l'Atlantique oriental rapportent les chiffres de 6 et 7 $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-2}$ soit une contribution à la biomasse totale de carbone du compartiment picophytoplanctonique inférieure à 5%. La biomasse de *Synechococcus* augmente avec l'enrichissement des eaux, notamment du large vers la côte, en périphérie des eaux à upwelling ou des zones frontales. Il remplace petit à petit *Prochlorococcus* en allant vers les pôles. Sa contribution est la plus élevée dans les eaux mésotrophes à eutrophes avec des concentrations et contributions en carbone atteignant respectivement 250 $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-2}$ et 60% (Partensky et al. 1996). D'un point de vue global, la biomasse de *Synechococcus* reste en général inférieure à 10% de celle des picoeucaryotes et est estimée à moins d'un tiers de la biomasse phytoplanctonique en zone océanique (Campbell et al. 1994a, Li 1995).

Les picoeucaryotes, comme les *Synechococcus*, prédominent dans les eaux mésotrophes à eutrophes (Partensky et al. 1996) avec des concentrations de l'ordre de 130 $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-2}$ soit une contribution à la biomasse picophytoplanctonique de 40%. Pour autant, la biomasse de cette communauté dans les eaux oligotrophes est plus importante que celle de *Synechococcus*. Elle correspond approximativement à la moitié de celle des *Prochlorococcus* (soit 40-50 $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-2}$) dans le Pacifique équatorial (Campbell et al. 1994a). Dans l'Atlantique Nord, Li (1995) rapporte que les picoeucaryotes dominent la biomasse et la productivité du picoplancton avec pour cette dernière une contribution de 68% même si les abondances de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* l'emportent.

La biomasse bactérienne domine dans de nombreux endroits du globe (Furhman et al. 1989, Gasol et al. 1997). Les bactéries hétérotrophes représentent 30 à 50% de la biomasse totale en carbone en milieu océanique (Li et al. 1992, Binder et al. 1996, Campbell et al. 1997). Ducklow (1999) rapporte que le stock bactérien dans la couche euphotique est remarquablement stable tout autour du globe (Atlantique Nord, Pacifique Nord, grands tourbillons océaniques, upwellings du Pacifique équatorial et de la mer d'Arabie) avec en moyenne 100 $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-2}$. En zone oligotrophique, Campbell et al. (1994a) rapporte le chiffre de 125 $\mu\text{gC}\cdot\text{cm}^{-2}$. Par contraste, la production et les taux de croissance sont beaucoup plus variables, suggérant que biomasse et production sont régulées de manière indépendante. Il est aujourd'hui accepté qu'environ 50% de la production primaire marine et limnique sont assimilés et/ou régénérés par les bactéries chaque jour (Cole et al. 1988, Ducklow & Carlon 1992). Enfin, on estime que 84% de la production bactérienne

est océanique (Ducklow & Carlson 1992) et que la biomasse des procaryotes marins est 10 fois plus élevée que celle des procaryotes terrestres (Withman et al. 1998).

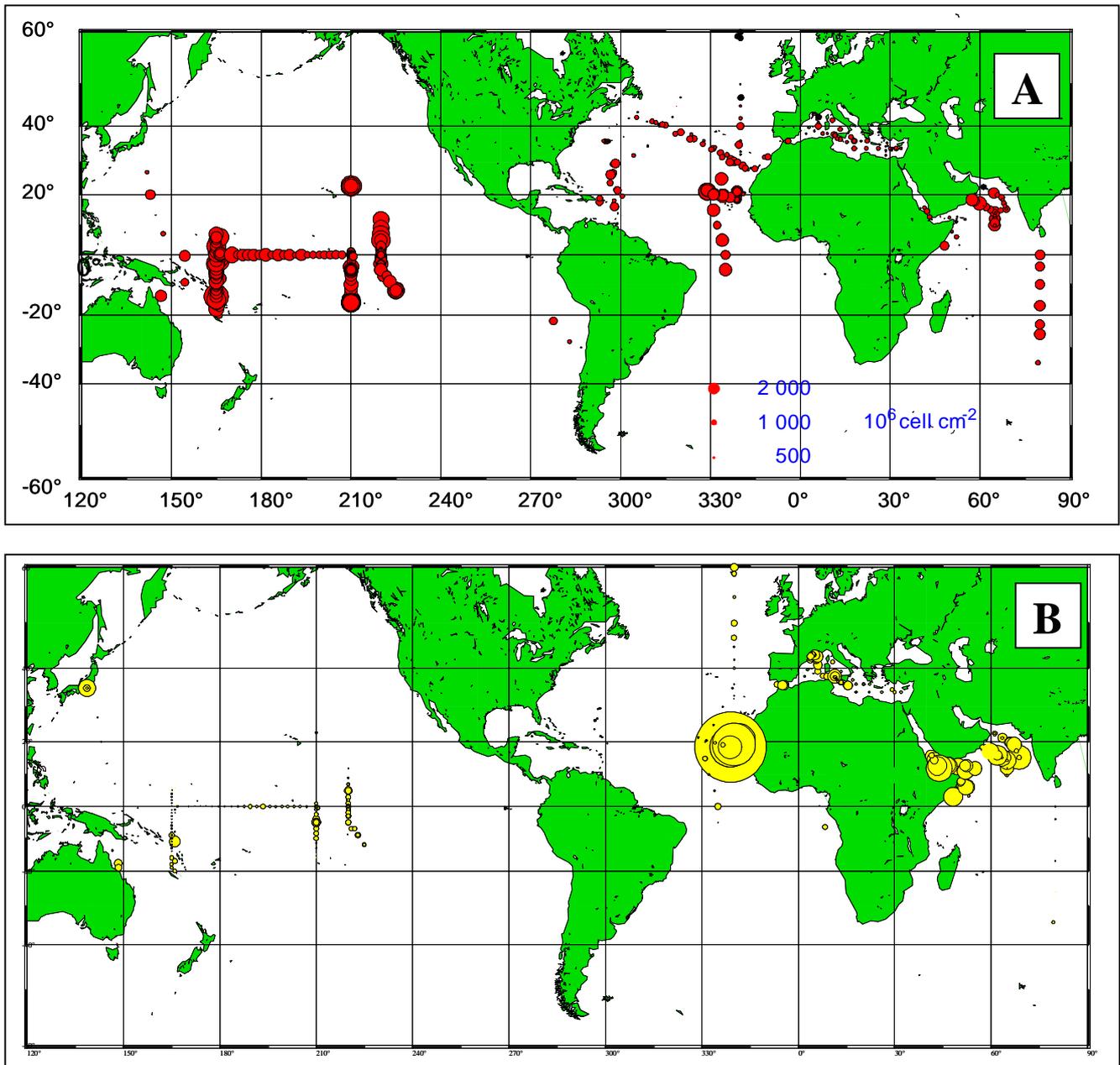


Fig. 1.6 Cartes représentant les concentrations intégrées le long de la colonne d'eau et le type de distribution au niveau mondial de *Prochlorococcus* (A) et *Synechococcus* (B) mesurée par cytométrie en flux. On observe la dominance numérique de *Prochlorococcus* dans les eaux à caractère oligotrophe (Pacifique central) alors que *Synechococcus* domine dans des eaux plus riches comme celles de l'Atlantique équatorial oriental (d'après Partensky et al. 1999a).

Au regard de l'importance numérique du picoplancton et de sa contribution à la biomasse et à la productivité océanique, il apparaît comme déterminant de pouvoir comprendre les facteurs responsables de la structure et du fonctionnement des écosystèmes dominés par ces populations et d'évaluer leur rôle dans les grands cycles de la matière. Comprendre comment la croissance du picoplancton est régulée est donc essentiel pour construire des modèles de prédiction

du cycle du carbone, et pour comprendre comment le premier maillon vital des océans répondrait à des changements climatiques globaux. *Il est donc important d'étudier la dynamique de ces populations et ceci à des échelles appropriées.*

I.3 La dynamique des populations.

I.3.1 Définition.

Dans le monde vivant, rien n'est statique. Les organismes, qui accomplissent leur cycle de vie, naissent, croissent, se reproduisent et meurent. Pendant tout ce temps, ils se nourrissent, interagissent avec d'autres organismes et leur environnement abiotique. Toutes ces activités, accomplies par des individus formant une population, déterminent la dynamique des populations, c'est à dire qu'elles déterminent la croissance, la diminution ou la stabilité de la population, ainsi que les modifications de sa structure. La dynamique des populations étudie donc du point de vue quantitatif les variations d'abondance des populations dans le temps et/ou l'espace et les facteurs qui en sont responsables. Pour les organismes unicellulaires, d'autres paramètres (quantitatif et/ou qualitatif) comme la taille ou la fluorescence pigmentaire des cellules, les constituants cellulaires (ADN, ARN, protéines) peuvent servir de descripteurs de la population pour appréhender sa dynamique. En effet, la cellule est l'échelle fondamentale à laquelle la population planctonique interagit avec son environnement. Ainsi, obtenir une compréhension détaillée à l'échelle cellulaire des facteurs environnementaux peut permettre de comprendre le comportement de la population. Pour ce type d'approche, et quand la taille des cellules le permet, la cytométrie en flux est un outil privilégié car chaque cellule de la population est analysée individuellement (voir chapitre 2).

I.3.2 Les échelles d'étude.

Les populations planctoniques évoluent sur des échelles de temps et d'espace variées en réponse aux processus physiques et biologiques. Les grandes échelles d'espace et de temps (bassins, saisons) ont été longtemps privilégiées en océanographie et encore très récemment dans les grands programmes internationaux comme JGOFS (Karl & Lucas 1996, Michaels & Knap 1996, Karl 1999). Ces échelles d'observation et d'analyses (obtenues au moyen de campagnes à la mer répétitives ou par l'imagerie satellitaire) restent importantes pour avoir une vision synoptique des océans. Elles se révèlent d'un grand intérêt pour mieux comprendre le rôle joué par l'océan dans la régulation climatique globale, dans la réponse aux activités humaines, dans les grands processus naturels lents ou encore caractérisés par des changements faibles. La fréquence d'observation utilisée au cours de ces séries est de l'ordre du mois ou de la semaine, rarement plus haute.

Toutefois, de nombreux processus ou stocks présentent une forte variabilité à mésoéchelle (structures frontales par exemple) et à microéchelle (échelle diurne, variations sur l'axe vertical). La dernière échelle n'a été que peu étudiée jusqu'à présent notamment en raison d'un manque d'outils et de méthodes adaptées favorisant les hautes fréquences d'acquisition (Dickey et al. 1991). Pourtant elle est reconnue depuis quelques années comme étant particulièrement critique pour les populations planctoniques car souvent plus importante que la variabilité à l'échelle de la semaine (Stramska et al. 1995) voire même de l'année dans les zones oligotrophes non soumises au mélange hivernal (Campbell et al. 1997).

I.3.3 La variabilité à petite échelle.

Depuis la fin des années 80, un certain nombre d'études ont révélé des variations journalières marquées pour les abondances en particules (Siegel et al. 1989), la fluorescence de la chlorophylle (Dandonneau & Neveux 1997) et l'on s'est vite rendu compte que ces variations régulières pouvaient permettre d'estimer la productivité phytoplanctonique (Cullen et al. 1992, Walsh et al. 1992, Prézelin 1992, Stramska & Dickey 1998). Les premières données de surface obtenues en continu l'ont été au moyen des systèmes tractés comme l'enregistreur de plancton (ou CPR pour *Continuous Plankton Recorder*) qui, bien qu'ancien (apparition dans les années 50), est toujours en activité et a permis d'acquérir une base de données inégalée pour l'océan Atlantique nord sur la répartition horizontale des populations planctoniques de surface (Planque & Ibanez 1997, Reid et al. 1998). La reconnaissance de l'importance des phénomènes à petite échelle s'est alors accompagnée de la mise en œuvre de méthodologies innovantes et compatibles avec des descriptions à haute résolution temporelle (heure) et spatiale (5-10 m) pour tenter de mieux cerner la variabilité à petite échelle spatiale et/ou temporelle et permettant d'étudier de nouvelles variables, de nouveaux processus. On peut citer les "profileurs multivariés" qui constituent la meilleure illustration de l'effort réalisé pour augmenter la fréquence d'échantillonnage, jusqu'à la minute (Hamilton et al. 1990, Dickey 1991, Dickey et al. 1991, Moline & Prézelin 1997). Ces derniers en mesurant l'atténuation particulaire, la fluorescence de la chlorophylle, l'oxygène dissous permettent d'estimer la biomasse et la productivité des systèmes échantillonnés. D'autres appareils, comme, par exemple, la bouée carbone "CARIOCA" (Hood et al. 1999), permet la mesure de nombreuses variables à haute fréquence (la température et la salinité de l'eau, le vent, la pression atmosphérique, la pCO₂, le pH, l'alcalinité des carbonates, le carbone inorganique total dissous, la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle *a*). D'autres types d'appareils permettent d'obtenir des séries temporelles à très haute fréquence pour des paramètres bio-optiques et physiques *in situ* comme la grappe optique (Claustre et al. sous presse) qui est un profileur mesurant en continu des profils d'atténuation à

différentes longueurs d'ondes permettant d'accéder à la charge particulaire et végétale, et des matières dissoutes de la colonne d'eau. Des méthodes plus classiques ont été améliorées pour acquérir des séries à haute fréquence d'acquisition comme l'automatisation de la procédure de comptage des particules (Sciandra et al. 1998, Claustre et al. sous presse). Le principal désavantage de toutes ces méthodes est qu'elles ne donnent qu'une information globale. L'obtention de données *in situ* et individuelles pour les populations phytoplanctoniques nécessitait donc la réalisation d'un système de prélèvement efficace permettant les hautes fréquences d'échantillonnage puis d'un système d'analyse performant pour ce type d'acquisition, de traitement et d'enregistrement des données (voir matériels et méthodes). A la même époque, le couplage entre un système de prélèvement automatisé à haute fréquence et une analyse par cytométrie en flux naissait avec le projet européen « CYTOBUOY », l'équivalent d'un cytomètre en flux monté sur une bouée océanographique permettant d'analyser les populations de surface (Duubelaar et al. 1998, 1999).

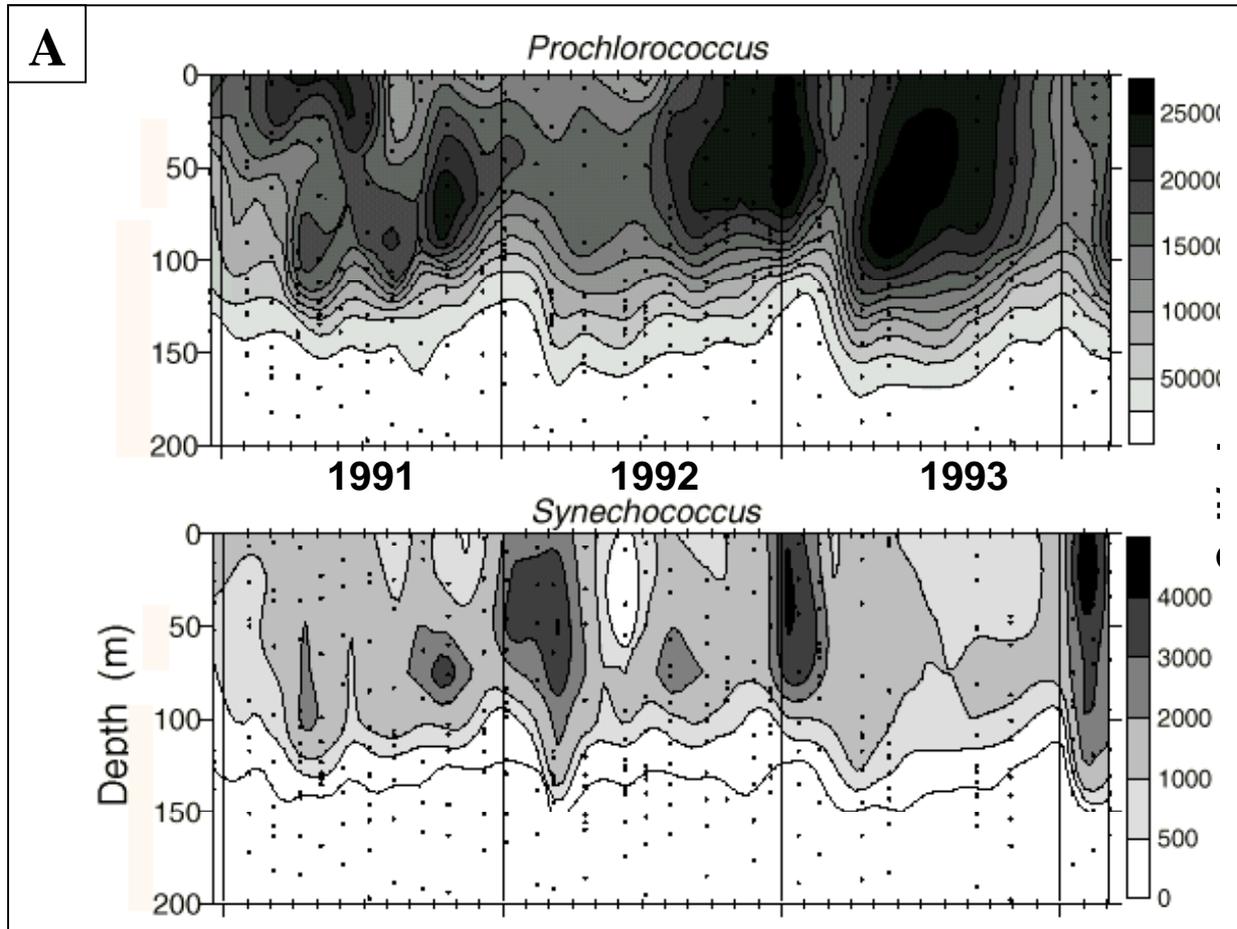
I.3.4 La dynamique des populations picoplanctoniques.

Une grande majorité des études sur le picoplancton effectuées à ce jour a porté soit sur l'estimation de sa biomasse soit sur sa caractérisation taxonomique. Par contre, la dynamique des populations picoplanctoniques et des facteurs qui en sont responsables restent encore mal connus. Dans ce thème de recherche, on peut clairement distinguer plusieurs « volets » au regard de la littérature existante. Se distinguent en effet la dynamique des populations marines (la seule que l'on considérera ici), la dynamique des populations dulçaquicoles, la dynamique à long terme (échelle annuelle ou saisonnière), la dynamique à court terme (échelle journalière et hebdomadaire), la dynamique des autotrophes, la dynamique des bactéries hétérotrophes. La littérature concernant le dernier point est plus fournie que le précédent, probablement en raison d'une connaissance beaucoup plus ancienne du compartiment bactérien et de l'intérêt porté à ce dernier bien avant la découverte de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et des picoeucaryotes.

Les études de dynamique des populations microbiennes hétérotrophes sur le long comme sur le court terme ont porté sur les abondances, la biomasse et la production bactérienne avec, dans la majorité des cas, l'idée de relier cette activité à celle du compartiment phytoplanctonique (résumé dans Cole et al. 1988 et voir Delmas et al. 1992, Li 1998 pour l'échelle annuelle, Ducklow et al. 1995, Leackey et al. 1996, Uitto et al. 1997 pour l'échelle saisonnière). L'enregistrement de variations journalières notables dans l'abondance et l'activité de production des bactéries hétérotrophes en relation avec l'activité phytoplanctonique, la prédation, les enrichissements nutritifs, les facteurs environnementaux (comme les UV par exemple) ont vu la publication d'un

nombre non négligeable d'articles, par exemple Hagström & Larson (1984), Furhman et al. (1985), Jeffrey et al. (1996), Gasol et al. (1998), Shiah (1999).

Pour le compartiment autotrophe, les études portant sur la dynamique des populations picoplanctoniques sont presque inexistantes avant le milieu des années 80. A partir de 1985, leur nombre s'est accrue (revue dans Weisse 1993). Les études portant sur le long terme s'intéressent essentiellement à la relation entre les abondances des populations et les paramètres environnementaux (la température des eaux de surface, le niveau d'éclairement) ou, plus rarement, à la relation avec les autres paramètres biotiques et abiotiques (chlorophylle, prédateurs, sels nutritifs). Par exemple, Waterbury et al. (1986) décrivent l'évolution des concentrations de *Synechococcus* entre 1978 et 1985 pour un site côtier de la côte est des Etats-Unis. Bustillos-Guzman et al. (1995) rapportent l'évolution annuelle des populations picoplanctoniques en Méditerranée Nord-occidentale. Campbell et al. (1997) montrent l'évolution des abondances picoplanctoniques sur 3 ans dans le Pacifique central. Agawin et al (1998) ou encore Li (1998) rapportent également pour la Méditerranée l'évolution des abondances de *Synechococcus*. Zingone et al. (1999) se sont intéressés pendant 2 ans aux variations du picoeucaryote *Micromonas pusilla* et de ses virus.



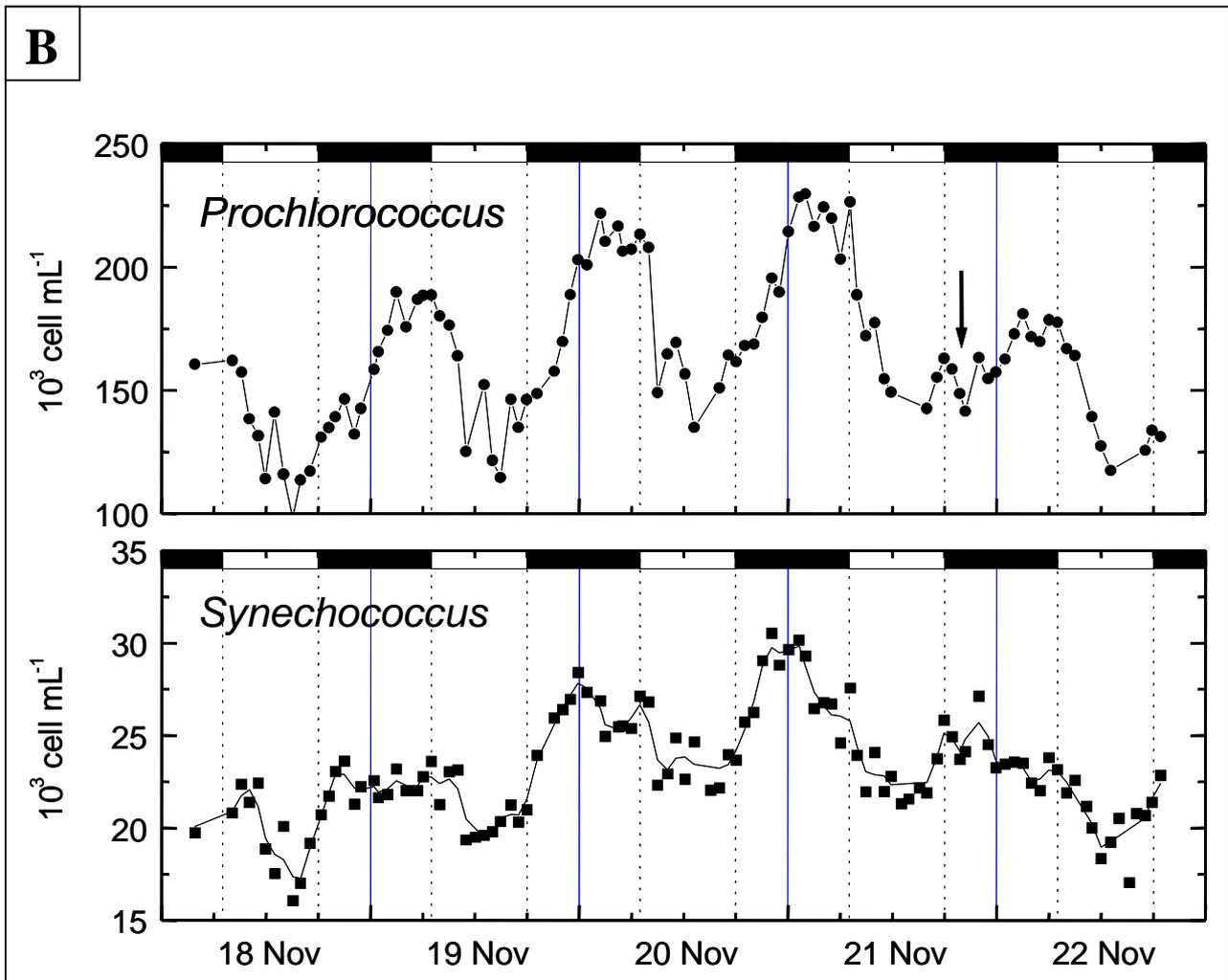


Fig. I.7 Variabilité inter-annuelle (A) et la variabilité journalière (B) des concentrations cellulaires des populations de *Prochlorococcus* et de *Synechococcus* mesurées par cytométrie en flux dans l'océan Pacifique (extrait de Campbell et al. 1997 et Vaultot & Marie 1999).

Dans les océans oligotrophes où les populations picoplanctoniques dominent, les abondances enregistrées pour ces dernières sont relativement constantes sur de grandes échelles d'espace et de temps (Landry et al. 1996, Campbell et al. 1997, Fig. I.7A) suggérant un équilibre global entre processus de croissance (production) et de perte (mortalité). Toutefois, à l'échelle de la journée, ces populations se sont révélées particulièrement dynamiques avec des taux de croissance pouvant être égaux ou supérieurs à une division par jour (voir revue dans Furnas & Crosbie 1999). Ainsi, des variations journalières marquées ont été observées pour les abondances cellulaires (Waterbury et al. 1986, Vaultot & Marie 1999, Fig. I.7B), la division cellulaire (Campbell & Carpenter 1986a, Vaultot et al. 1995), les paramètres cellulaires comme la taille et les pigments (Blanchot et al. 1997, Vaultot & Marie 1999), la photosynthèse (Prézelin et al. 1986, Glover & Smith 1988), la croissance et le métabolisme (Prézelin et al. 1987, Neuer 1992), l'activité de broutage (Wilkner et al. 1990, Dolan & Simek 1999), l'expression des gènes (Pichard et al. 1996,

Wyman 1999) du picoplancton. Enfin, les années 90 ont vu l'explosion des études portant sur l'horloge circadienne de *Synechococcus* et donc de son influence sur les variations journalières des processus physiologiques de ces cellules (thème développé au chapitre 4). L'interprétation des cycles biologiques qui se font à plus grande échelle repose sans nul doute sur la compréhension des facteurs qui régulent les processus à l'échelle journalière. Il est donc primordial de les étudier en détail.

I.3.4.1 Le cycle cellulaire.

L'analyse du cycle cellulaire permet aujourd'hui de mieux comprendre la dynamique des populations phytoplanctoniques. Cette méthode offre en effet la possibilité d'estimer rapidement le taux de croissance (Carpenter & Chang 1988) et l'effet des facteurs environnementaux (sels nutritifs, lumière) sur la croissance des cellules. Elle est particulièrement bien adaptée pour des espèces tels que les procaryotes photosynthétiques.

I.3.4.1a Rappels sur le cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire consiste en la succession d'un nombre limité d'étapes (voir Fig. IV.1) menant de la naissance d'une cellule à sa division en deux cellules filles identiques (Murray & Hunt 1993). Chez les organismes eucaryotes, de la levure à l'homme, il est composé de quatre phases, appelées G1, S, G2 et M, extrêmement bien conservées au cours de l'évolution. Les phases G1 et G2 préparent les cellules respectivement à la réplication de leur ADN et à la division cellulaire. La phase S caractérise la synthèse l'ADN afin de dupliquer le génome et la phase M, pour mitose, comporte une succession d'états conduisant à la division de la cellule. Le cycle cellulaire des procaryotes est moins bien compris. Il n'y a pas de mitose et l'on distingue des organismes ayant une croissance rapide (division < 1 h) de ceux ayant une croissance lente. Pour les cultures d'organismes ayant une croissance lente, 3 phases nommées B, C et D ont été définies pour décrire les intervalles de temps où l'ADN présente des caractéristiques remarquables (Cooper & Helmstetter 1968). B est la période entre la division cellulaire et l'initiation de la réplication du chromosome, C est la période entre l'initiation de la réplication de l'ADN et la terminaison de la synthèse du chromosome, D est la période entre la fin de la réplication du matériel chromosomique et la prochaine division cellulaire. La similitude entre les phases B, C et D de *Prochlorococcus* et *Synechococcus* avec respectivement les phases G1, S et G2 des eucaryotes font que l'on emploie plus volontiers la seconde terminologie pour ces procaryotes photosynthétiques à croissance lente. A l'extrême conservation des mécanismes et des contrôles du cycle chez les eucaryotes correspond sans nul doute une plus grande diversité chez les procaryotes. Par exemple chez la bactérie

entérique *Escherichia coli*, caractérisée par un temps de génération court en conditions de développement optimal, la division peut être découplée de la réplication de l'ADN, ce qui se traduit par un contenu en ADN par cellule, supérieur à deux équivalents génome (Helmstetter & Cooper 1968). On observe également, chez certains mutants de la forme sauvage de *E. coli* et quelques souches de la cyanobactérie marine *Synechococcus*, un "phénotype asynchrone" caractérisé par un nombre multiple de copies du génome, conséquence de l'initiation asynchrone de la réplication du chromosome (Skarstad et al. 1986, Binder & Chisholm 1990, Binder & Chisholm 1995).

I.3.4.1b Mesure de l'ADN des cellules par cytométrie en flux.

L'utilisation de colorants spécifiques des acides nucléiques dans les cellules permet la mesure rapide et quantitative du contenu en ADN des cellules sans extraction de ce dernier (Boucher et al. 1991). Il est ainsi possible d'apprécier la répartition des cellules entre les phases G1, S et G2+M du cycle cellulaire (Baish et al. 1982, Fig. I.8) et leur variation au cours du temps renseigne sur la physiologie et le statut environnemental des cellules plus rapidement et de manière plus précise que la numération ou la variation de la teneur en chlorophylle *a* (Vaulot & Partensky 1992). La méthode permet en plus une bonne estimation du taux de croissance des populations (voir plus loin).

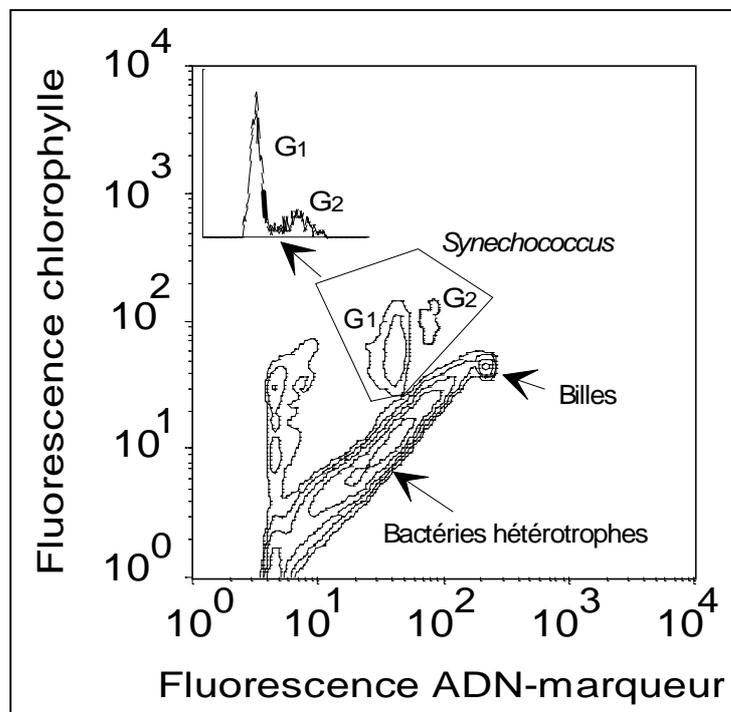


Fig. I.8 Cellules d'une population naturelle de *Synechococcus* dont l'ADN est marqué par un fluorochrome des acides nucléiques, le SYBR Green I. On observe la répartition des cellules dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire sur le cytogramme représentant la fluorescence du complexe ADN-marqueur en fonction de la fluorescence de la chlorophylle. L'insert représente l'histogramme de distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire. Extrait de Jacquet et al. (1998b).

Le choix d'un colorant dépend de plusieurs conditions (Boucher et al. 1991). Les spectres d'excitation doivent être compatibles avec les sources lumineuses des appareils. Pour l'étude du cycle cellulaire, le fluorochrome doit se lier de manière stœchiométrique à la molécule d'ADN pour que le rapport de fluorescence des cellules en G2 et G1 soit le plus proche possible de la valeur 2. L'ADN est présent en faible quantité dans les cellules procaryotes et sa détection nécessite des marqueurs performants (utilisation à faible concentration, rendement quantique élevé, Marie et al. 1996, 1997). Bien que les acides nucléiques puissent être marqués par de nombreux colorants, les procaryotes marins autotrophes et hétérotrophes ont surtout été analysés au moyen de deux fluorochromes: le DAPI (4', 6-Diamidino-2-phénylindole, Robertson & Button 1989) et le Hoechst 33342 (dérivé bis-benzimide, Monger & Landry 1993, Campbell et al. 1994a, Binder et al. 1995) tous deux excitable dans l'UV. L'analyse dans le visible à 488 nm (longueur d'onde qui caractérise la plupart des cytomètres existants aujourd'hui) est désormais rendue possible par la disponibilité de nouveaux fluorochromes sur le marché (développés par la société Molecular Probes). A l'origine conçus pour le marquage de l'ADN dans les gels d'électrophorèse, ils commencent à être utilisés en biologie marine (Li et al. 1995, Marie et al. 1996). Nous avons testé puis utilisé en routine l'un d'entre eux, le SYBR™Green-I. Les caractéristiques de ce fluorochrome, excitable à 488 nm, et notamment sa formule chimique et son mode de liaison à l'ADN, sont tenues secrètes par Molecular Probes. Il est toutefois présenté comme un des marqueurs disponibles parmi les plus sensibles pour la détection des acides nucléiques dans les gels d'agarose et de polyacrylamide. Il a une forte affinité pour l'ADN double-brin mais il peut également se lier aux molécules simple brin d'ADN ou d'ARN. Il peut être excité aussi bien dans l'UV que dans le visible mais son maximum d'excitation se situe à 497 nm (Molecular Probes). Il est insensible à la force ionique de l'eau de mer ce qui rend son utilisation simple et rapide pour les analyses sur le terrain par exemple. Une publication a été réalisée et a paru dans *Applied and Environmental Microbiology* (Marie et al. 1997). Son résumé en français et la reproduction de l'article sont donnés à la fin du chapitre 2. Ce colorant a permis récemment la détection des virus marins aussi bien en microscopie à épifluorescence qu'en cytométrie en flux (Noble & Furhman 1998, Marie et al. 1999).

I.3.4.1c Estimation du taux de croissance par la méthode du cycle cellulaire.

La mesure du taux de croissance des organismes phytoplanctoniques est une donnée capitale. Son estimation renseigne sur l'importance d'une espèce au sein de la chaîne trophique et sur sa contribution à la production primaire océanique (Furnas 1990). Le taux de croissance est de plus un excellent indicateur du statut environnemental et de l'influence des facteurs forçants sur la

physiologie des cellules. De nombreux moyens d'estimation du taux de croissance des populations naturelles ont été mis au point. On peut citer des méthodes d'estimation indirectes nécessitant l'utilisation de marqueurs biochimiques et radioactifs (la zéaxanthine et le ^{14}C par exemple, Caillau et al. 1996) et l'incubation des échantillons. Ces approches ont cependant des inconvénients majeurs: artefacts dus au confinement et à l'empoisonnement des cellules (Williams & Robertson 1989), estimation globale moyennant la contribution des différentes populations. Les méthodes directes sont plus difficiles à mettre en œuvre. La méthode la plus simple, basée sur les comptages cellulaires, sous-estime le taux de croissance brut en raison du broutage. Cela est particulièrement vrai pour le picoplancton dont la biomasse reste pratiquement inchangée d'un jour à l'autre, les cellules étant mangées par de minuscules prédateurs au fur et à mesure qu'elles se divisent. Pour venir à bout de ce problème, différentes méthodes d'estimation du taux de croissance ont été développées comme celle d'éliminer l'influence de la prédation par dilution (Campbell & Carpenter 1986b, Landry et al. 1995, Verity et al. 1996) ou par l'utilisation d'inhibiteur (Campbell & Carpenter 1986b, Liu et al. 1995) et enfin la méthode du cycle cellulaire (McDuff & Chisholm 1982, Carpenter & Chang 1988).

La méthode du cycle cellulaire est basée sur la détermination de la fréquence des cellules d'une population se divisant. Cette idée, qui date du début du siècle (Gough 1905), repose sur une constatation simple. Les populations phytoplanctoniques sont entraînées par le rythme d'alternance jour-nuit et la division cellulaire a lieu à un moment préférentiel de la journée sur un intervalle de temps restreint (Swift & Durbin 1972, Weiler & Chisholm 1976, Chisholm 1981). La méthode consiste à mettre en relation la fraction de cellules en division avec le taux de division cellulaire (Fig. I.9). Cette méthode a été appliquée dans un premier temps à l'estimation du taux de croissance des dinoflagellés caractérisés par des étapes facilement identifiables en microscopie (Swift & Durbin 1972, Weiler & Chisholm 1976). Une formulation clarifiée de cet indice mitotique a été proposée par McDuff & Chisholm (1982) :

$$\mu = \frac{\sum_{i=1}^n \ln[1 + f(t_i)]}{n \times t_D}$$

où μ est le taux de croissance; t_D , la durée de la phase de division;

n , le nombre d'échantillons; $f(t_i)$, la fraction de cellules en division à chaque temps t_i .

Toutefois, ce modèle s'est révélé peu fiable en raison de l'incertitude existant sur la durée de la division t_D . Celle-ci peut en effet être relativement courte et la détermination du moment réel de la division et de sa durée très subjective (McDuff & Chisholm 1982). Par ailleurs, il arrive qu'elle varie en fonction du taux de croissance (Videau & Partensky 1990). En 1988, Carpenter & Chang

(1988) ont proposé un modèle plus sophistiqué consistant à remplacer le paramètre t_D par le calcul de la durée d'événements terminaux du cycle cellulaire comme G_2+M ou $S+G_2+M$. L'application du modèle nécessite la synchronie de la population, c'est à dire que toutes les cellules progressent en phase à la manière d'une cohorte à travers les phases du cycle cellulaire. Si la division se déroule de manière asynchrone, il devient en effet impossible d'estimer la durée de chacune des phases. Cette méthode a d'abord été testée sur des cultures de dinoflagellés (Chang & Carpenter 1988), puis sur des populations naturelles (Chang & Carpenter 1991). Le modèle s'applique parfaitement aux procaryotes caractérisés par une croissance lente car ils présentent des phases analogues aux phases G_1 , S et G_2 des cellules eucaryotes (Murray & Hunt 1993). Ce modèle est indépendant du broutage hétérotrophe avec l'hypothèse que le zooplancton consomme avec la même probabilité toutes les cellules, quelle que soit leur position dans le cycle (Chang & Dam 1993).

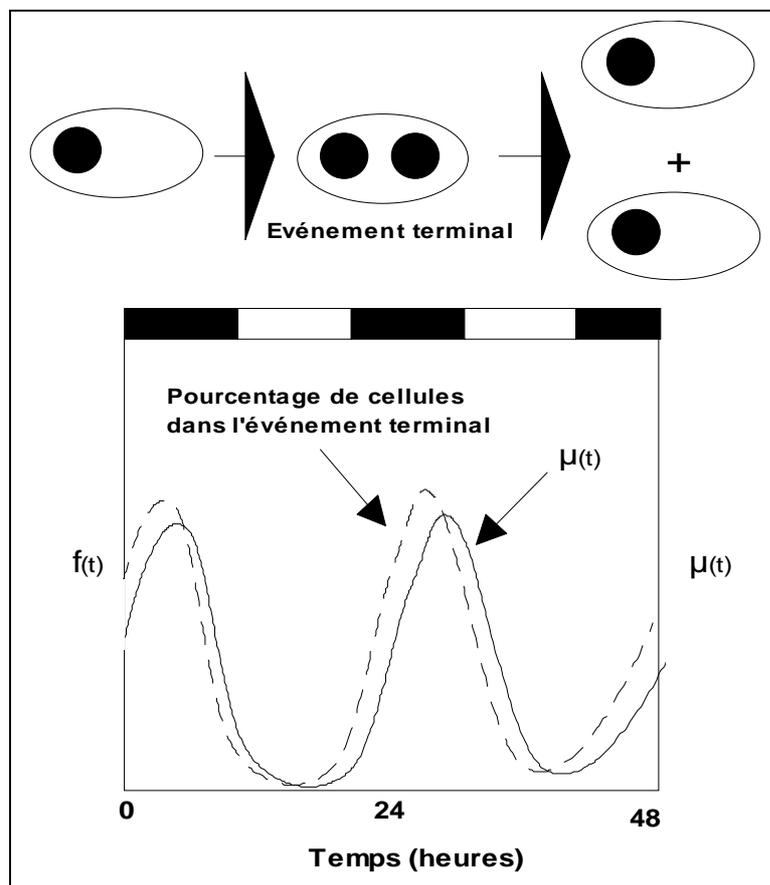


Fig. I.9 Schéma résumant la méthode d'estimation du taux de croissance basée sur le cycle cellulaire. La fraction de cellules en division $f(t)$ est mise en relation avec le taux de division cellulaire $\mu(t)$.

Le système d'équations du modèle de Carpenter & Chang (1988) est le suivant :

$$T_S + T_{G2+M} = \frac{(t_2 - t_1)}{2}$$

$$\frac{T_S}{T_{G2+M}} = \frac{\sum_{i=1}^n \ln[1 + f_S(t_i) + f_{G2+M}(t_i)]}{\sum_i \ln[1 + f_{G2+M}(t_i)]}$$

où $t_2 - t_1$ est l'intervalle de temps entre les pics des cellules en S et en G2+M

$f_S(t_i)$ et $f_{G2+M}(t_i)$ représentent les fractions de cellules dans les phases S et G2+M à l'instant t_i .

De la formule de McDuff & Chisholm (1982), on déduit que :

$$\mu_{G2+M} = \frac{\sum_{i=1}^n \ln[1 + f_{G2+M}(t_i)]}{n \times T_{G2+M}}$$

$$\mu_{S+G2+M} = \frac{\sum_{i=1}^n \ln[1 + f_S(t_i) + f_{G2+M}(t_i)]}{n \times (T_S + T_{G2+M})}$$

où n est le nombre d'échantillons

μ_{G2+M} et μ_{S+G2+M} sont des estimations du taux de croissance de la même population.

La méthode du cycle cellulaire a été appliquée avec succès sur les populations naturelles de *Prochlorococcus* (Vaulot et al. 1995, Liu et al. 1998) et de *Synechococcus* (Vaulot et al. 1996, Jacquet et al. 1998b). Très récemment, la méthode du cycle cellulaire a pu être appliquée à quelques genres picoeucaryotiques en culture (Jochem & Meyerdieks 1999, Brussaard et al 1999, Jacquet et al. en prép.).

Il est à noter que d'autres marqueurs que l'ADN peuvent être utilisés pour obtenir des estimations du taux de croissance comme le contenu des cellules en ARN (Binder & Liu 1998) ou certaines protéines qui sont exprimées pendant la réplication de l'ADN et le cycle de division (Lin & Carpenter 1995, Lin et al. 1995).

I.3.4.2 Le broutage du picoplancton.

Comme le picoplancton atteint des taux de croissance de l'ordre de 1 division par jour dans les eaux océaniques et que son abondance reste très stable sur de larges échelles spatio-temporelles, les taux de mortalité sont du même ordre de grandeur (Liu et al., 1995). La nature des

principaux processus de mortalité est cependant mal connue. Au cours de ma thèse, je me suis également intéressé aux phénomènes de broutage qui sont nécessaires pour interpréter la dynamique du picoplancton. Au cours des deux études effectuées en mer Méditerranée (rade de Villefranche-sur-mer, chapitre 5, et mer d'Alboran, chapitre 6), l'étude de la dynamique des populations picoplanctoniques a clairement révélé que les populations, bien que se divisant à des taux supérieurs à une fois par jour, se maintenaient à des niveaux quasi constants (en terme de stocks) suggérant un équilibre dynamique entre les processus menant à la production des cellules et ceux menant à leur disparition. Cette remarque a été confirmée tout d'abord par la mesure du taux de mortalité des cellules de *Synechococcus* en rade de Villefranche-sur-mer. Ce taux s'est avéré être corrélé au taux de croissance avec un jour de décalage, suggérant une prédation très efficace et l'adaptation très rapide des prédateurs à la biomasse disponible. Bien que l'effet de la prédation sur les micro-organismes ait été étudié en détail, des questions comme la spécificité de la prédation et sa dynamique sont encore peu documentées. J'ai participé activement à deux études expérimentales ayant regardé de près ces questions. Elles ne sont pas développées dans le corps de ce manuscrit mais simplement fournies en annexe. En résumé, avec Urania Christaki du Centre National de la Recherche Marine d'Hellinikon en Grèce, nous avons démontré que les populations de ciliés broutaient de manière préférentielle *Synechococcus* par rapport à *Prochlorococcus*, suggérant que la communauté des brouteurs pourrait être différente dans les écosystèmes dominés par *Prochlorococcus* de ceux dominés par *Synechococcus* (Christaki et al. 1999, annexe 1). Plus récemment, avec Laure Guillou (Roscoff), nous avons établi que le plus petit eucaryote hétérotrophe connu à ce jour, *Picophagus flagellatus* (organisme < 2 μm), était un prédateur redoutable pour le picoplancton (Guillou et al. soumis, annexe 3). L'existence d'un brouteur si efficace et de si petite taille remet en question le paradigme couramment accepté que les bactéries (de taille comprise entre 0,4 et 1 μm) sont broutées par des nano-flagellés d'environ 5 μm , eux mêmes mangés par des ciliés de 10-20 μm . L'existence et l'efficacité de broutage de *P. flagellatus* démontrent que la boucle microbienne possède de nombreux niveaux et que le transfert de la matière et de l'énergie aux niveaux trophiques supérieurs (c'est à dire jusqu'au zooplancton comme les copépodes) est probablement plus faible que ce qui était supposé jusqu'alors (Guillou et al. soumis).

Notons que les organismes filtreurs de grande taille, tels que les éponges (Pile et al., 1996), les coraux (Yahel et al., 1998) ou les appendiculaires (Goksky et al. 1999), pourraient également avoir un impact important sur la disparition du picoplancton.

I.3.4.3 L'action virale.

La dynamique des populations picoplanctoniques est contrôlée par toute une panoplie de facteurs abiotiques et biotiques. Parmi les seconds, les virus jouent sûrement un rôle déterminant mais ce dernier reste encore peu connu. Comme l'écrivaient Bratbak & Heldal en 1995: “*viruses are the new players in the game*”.

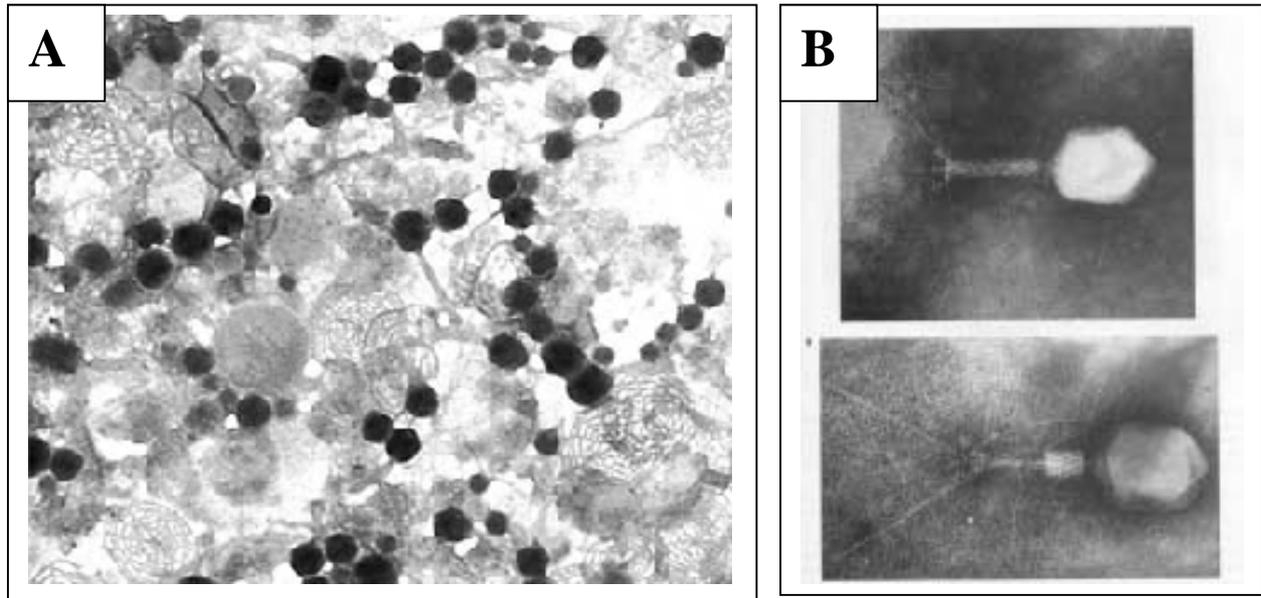


Figure I.10 (A) Photographie en microscopie électronique d'une communauté virale préalablement concentrée, échantillonnée dans la Baie de Chesapeake, Virginie, Etats-Unis (source : <http://www.umbi.umd.edu/~wommack/>). (B) Agrandissements d'un virus montrant la réduction de sa queue après injection de son matériel génétique dans la cellule hôte (extrait de Tom Garison. 1995. *Oceanography: an invitation to marine science*, 2nd edition, Wadsworth Publishing Company, 567 p.).

Apparentés au femtoplankton (c'est à dire les particules dans la classe de taille 0,02 – 0,2 μm , Fig. I.10), les virus marins sont aujourd'hui reconnus comme les entités biologiques marines les plus abondantes et leur rôle au sein des écosystèmes pourrait être particulièrement important (Furhman 1999). L'existence des virus en milieu marin est connue depuis les années 50 (Kriss & Rukina 1947, Spencer 1955). Bien que quelques études portant sur les virus marins aient été rapportées avant les années 1980 (Levin et al. 1977, Zachary 1978, Mayer & Taylor 1979), ce sont les années 1989–90 qui marquent véritablement l'essor de leur étude (Bergh et al. 1989, Proctor & Furhman 1989, Bratbak et al. 1990, Suttle et al. 1990). Les virus sont extrêmement abondants en milieu marin. Ils atteignent des concentrations de 10^{7-8} par millilitre (Bratbak & Heldal 1995, Furhman 1999) et infectent spécifiquement les cellules planctoniques (Suttle et al. 1990, Waterbury & Valois 1993). En théorie, toutes les organismes sont susceptibles d'infection, souvent par plusieurs types de virus. C'est le cas de *Synechococcus* (Suttle & Chan 1993) ou du picoeucaryote *Micromonas pusilla* (Chen et al. 1996). On ne sait que peu de choses en milieu marin sur leur biologie, leur cycle de vie, leur activité lytique vis à vis des cellules ni sur les implications

écologiques qui en découlent. L'activité virale semble avoir un impact important au niveau i) de la mortalité bactérienne et de certains producteurs primaires favorisant de la sorte les flux de nutriments entre compartiments (Furhman & Suttle 1993, Bratbak et al. 1994, Cottrell & Suttle 1995), ii) du contrôle de la phase finale des efflorescences algales (Bratbak et al. 1993, 1995), iii) du contrôle de la diversité spécifique (Bratbak et al. 1993, 1994, Furhman & Suttle 1993, Waterbury et Valois 1993), et du maintien des proportions relatives des différentes espèces ou variétés de la communauté (Waterbury & Valois 1993, Hennes et al. 1995), iv) de la dynamique des populations (Bratbak et al. 1996, Wilson et al. 1998, Brussaard et al. 1999, Zingone et al. 1999). L'activité virale est fortement liée au statut nutritionnel des cellules qui pourrait être déterminant dans le type de processus: lytique ou lysogène (Wilson & Mann 1997, voir glossaire). L'intervention virale dans la lyse des cellules phytoplanctoniques productrices de dymethylsulfonio-propionate dont la décomposition donne le diméthylsulfide ou DMS (un gaz qui influence la condensation nuageuse et qui peut être la source de production de pluies acides) a été clairement démontrée (Brussaard et al. 1996, Hill et al. 1998, Malin et al. 1998). Le rôle le plus incertain des virus en milieu marin concerne les échanges génétiques entre les micro-organismes et leur effet sur l'adaptation, la génétique des populations et l'évolution à court terme (Ripp et al. 1994, Chiura 1997, Jiang & Paul 1998).

L'action des virus sur la biomasse et la production phytoplanctoniques a été moins étudiée que celle sur les bactéries (voir la revue de Furhman 1999). Pourtant un simple enrichissement de 20% en particules virales d'un échantillon d'eau de mer se traduit par une chute de 50% de la biomasse et de la production phytoplanctonique. Cette expérience suggère clairement que les virus infectent une proportion significative de la communauté phytoplanctonique (Suttle et al. 1990, Suttle 1992). Les études portant sur les virus qui infectent les organismes phytoplanctoniques importants du point de vue écologique sont facilitées car ces espèces sont disponibles en culture et facilement reconnaissables par microscopie ou par cytométrie en flux. Les virus de *Synechococcus* ont été analysés (Waterbury & Valois 1993, Suttle & Chan 1995a) mais ces cyanophages ne semblent pas responsables d'une part importante de la mortalité cellulaire (<15%). Comme les cyanobactéries semblent résistantes aux virus qui leur sont associées, les cyanophages pourraient affecter plus la composition spécifique de la communauté que son abondance. A ce jour, aucun virus spécifique à *Prochlorococcus* n'a été décrit. Les virus marins affectent également le phytoplancton eucaryote: Diatomées, Chrysophytes, Prymnesiophytes, Haptophytes, Rhaphidophytes, et Cryptophytes (Proctor 1997, Proctor & Fuhrman 1991, Suttle et al. 1991, Bratbak et al. 1993, Mulligan & Cosper 1994, Nagasaki & Yamaguchi 1998, Suttle & Chan 1995b). A ce jour, la prasinophycée picoplanctonique *Micromonas pusilla* a été l'espèce phytoplanctonique

la plus étudiée (voir Zingone et al. 1999). Au moins 5 géotypes différents de virus peuvent l'infecter (Chen et al. 1996). Cette diversité au sein de la communauté virale a également été montrée chez 18 souches de la Raphidophycée *Heterosigma akashiwo* avec 14 souches virales (Nagasaki & Yamaguchi 1998). Dans le cas du coccolithophoridé *Emiliana huxleyi*, la contribution virale au déclin du bloom varie entre 25 et 100%.

I.4 Les questions posées.

Comme nous l'avons vu plus haut, le picoplancton est sous la dépendance d'un grand nombre de facteurs biotiques et abiotiques. Parmi eux, la lumière est particulièrement importante puisque indispensable aux processus associés à la photosynthèse et donc à la croissance et à la production de matière par les organismes autotrophes. Ainsi, l'alternance journalière de lumière et d'obscurité est sans aucun doute le stimulus le plus important pour expliquer les variations journalières de l'activité des cellules. Pour autant, son effet n'a été que peu étudié sur la dynamique de croissance des populations planctoniques.

Les questions fondamentales abordées au cours de cette étude ont été les suivantes:

- Quel est l'effet d'un rythme jour-nuit sur le cycle de division des représentants les plus typiques du picoplancton en culture?
- Comment s'effectue la synchronisation des populations par la lumière?
- Dans le milieu naturel, quels sont les facteurs qui peuvent expliquer la variabilité d'un jour à l'autre du cycle cellulaire (et donc du taux de croissance)?

I.5 Organisation du travail de thèse.

Cette thèse est divisée en plusieurs parties:

- **Matériels et méthodes.** Dans le **chapitre 2**, les techniques utilisées au cours de cette thèse (la cytométrie en flux, la microscopie confocale) et les matériels réalisés (préleveurs automatiques) sont développés. Ce chapitre est illustré par deux articles qui ont été publiés dans les revues *Applied and Environmental Microbiology* et *Aquatic Microbial Ecology*. Le premier article décrit une nouvelle méthode de coloration de l'ADN du picoplancton et le second la fabrication et l'utilisation d'un préleveur automatique d'échantillons d'eau de mer ou de cultures.

- ❑ **Travail expérimental.** Le **chapitre 3** correspond à l'étude comparative d'un rythme lumière-obscurité sur la synchronisation de la croissance de 12 variétés picoplanctoniques (3 *Prochlorococcus*, 4 *Synechococcus* et 5 picoeucaryotes). Le **chapitre 4** décrit la régulation du cycle cellulaire par la lumière de *Prochlorococcus*. Le corps de chaque chapitre est constitué par un article en préparation qui sera soumis pour le premier à *Journal of Phycology* et pour le second à *Applied and Environmental Microbiology*.
- ❑ **Milieu naturel.** Deux chapitres résument les résultats acquis au cours de travaux effectués sur le terrain, en mer Méditerranée. Au cours d'un atelier de travail européen, qui a eu lieu à Villefranche-sur-mer, la dynamique picoplanctonique a été étudiée de façon localisée et pour une situation trophique donnée (**chapitre 5**). Cette étude a été publiée dans la revue *Limnology and Oceanography*. Pendant la campagne en mer Almofront-2, l'influence d'une structure à méso-échelle (le système jet-front géostrophique Oran-Almería) sur la distribution et la dynamique picoplanctonique a été étudiée en détail (**chapitre 6**). L'article est en préparation pour la revue *Limnology and Oceanography*.
- ❑ **Conclusions et perspectives.**

A la fin du manuscrit, la liste des références bibliographiques utilisées dans le texte est donnée ainsi qu'un **glossaire**.

Une **annexe** à ce volume a été réalisée réunissant les publications non utilisées dans le texte.

- CHAPITRE II -
MATÉRIELS et MÉTHODES

- CHAPITRE II -

MATÉRIELS et MÉTHODES

“The question why study phytoplankton is obviously dependent on the particular scientific question which has to be answered. There is one important fact, however, which holds true for all phytoplankton work: the need for simultaneous sampling and analysis of collateral parameters in order to acquire an understanding of phytoplankton ecology” (Zeitzschel, 1978).

II.1 Présentation générale.

Pour tenter de comprendre l'écologie du picoplancton, l'idéal serait de pouvoir accéder à la variabilité enregistrée par les populations (du point de vue quantitatif et qualitatif) en continu, en tenant compte des facteurs environnementaux qui en sont responsables. Cependant, de telles mesures à très haute fréquence sont rares. Pour accéder à la variabilité haute fréquence des populations picoplanctoniques, il a donc été nécessaire dans un premier temps de mettre au point des méthodes d'échantillonnage appropriées. Dans ce but, nous avons construit des **dispositifs de prélèvement automatiques** d'échantillons d'eau de mer ou de cultures (voir § II.2).

En raison de l'importante variabilité des paramètres cellulaires et physiologiques (abondance, taille, fluorescence pigmentaire, cycle cellulaire, ...) du picoplancton sur des échelles de temps très courtes, l'étude des populations en culture comme dans le milieu naturel nécessite, en plus de moyens de prélèvement adéquats, des techniques d'analyse et d'enregistrement à haute fréquence. La **cytométrie en flux** est l'appareil d'analyse et d'acquisition de données répondant le mieux à cette problématique. Il a donc constitué l'outil de travail principal utilisé au cours de cette thèse. Un paragraphe de ce chapitre est consacré au principe général de son fonctionnement puis plus spécifiquement à l'appareil utilisé (voir § II.3).

Une autre technique optique très performante a été utilisée au cours de cette thèse: la **microscopie confocale**. J'ai pu obtenir des images de *Prochlorococcus* (permettant par exemple d'effectuer des mesures de taille des cellules), ce que la microscopie classique ou à épifluorescence seule (c'est à dire sans l'adjonction de caméra très sensible) ne permettent pas. Le principe de la

microscopie confocale et son intérêt à l'étude de l'échelle sub-micromique est également le lieu d'un paragraphe de ce chapitre (voir § II.4).

Une approche très fructueuse dans le domaine de l'étude de la dynamique des populations est celle liée à l'utilisation du **cycle cellulaire**, développée dans l'introduction générale. Après marquage de l'ADN des cellules par un fluorochrome, le cycle cellulaire des populations peut être facilement visualisé par cytométrie en flux. La répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire et son évolution au cours du temps renseignent sur l'état physiologique des cellules et leur réponse aux fluctuations de l'environnement. De plus, il est possible d'obtenir via l'analyse du cycle cellulaire des estimations très précises du taux de croissance des populations. Pour l'analyse du cycle cellulaire des populations autotrophes et le marquage des bactéries hétérotrophes, une technique de coloration des acides nucléiques a été mise au point (Marie et al. 1997, parue dans la revue *Applied and Environmental Microbiology* donnée à la fin du chapitre).

II.2 Préleveurs automatiques.

Ils peuvent être définis comme l'équivalent d'un collecteur de fractions constitué par une carte à microprocesseurs qui contrôle par l'intermédiaire d'une interface appropriée une pompe péristaltique, un jeu d'électrovannes ou un moteur pas à pas, éventuellement une diode photoélectrique et des éléments Pelletier. La description d'un prototype servant à l'échantillonnage des populations naturelles avec ses caractéristiques mécaniques et électroniques, ses avantages et inconvénients par comparaison avec l'instrumentation océanographique usuelle et récente ont donné matière à une publication parue dans la revue *Aquatic Microbial Ecology* (Jacquet et al. 1998a) qui apparaît en fin de chapitre. Dans cet article, un certain nombre de caractéristiques n'ont pas été mentionnées et ont été mis à disposition sur le site internet de l'équipe phytoplancton océanique à l'adresse suivante: http://www.sb-roscoff.fr/Phyto/SJ_sampler_98.html. Ces renseignements sont joints à la suite de l'article. Un second article plus complet que le premier en terme de représentation de données et réservé à la communauté océanographique française a été récemment publié dans la revue *Journal de Recherche Océanographique* (Jacquet & Lennon 1999, annexe 2). Le prototype présenté dans ces articles a été utilisé au cours d'un atelier de travail (Chapitre 5) et de deux campagnes à la mer, en Méditerranée (Chapitre 6). D'autres prototypes ont été réalisés car plus adaptés au travail en laboratoire. La figure II.1 ci-dessous montre l'ensemble du dispositif qui a servi à l'acquisition des échantillons dont l'analyse a donné lieu aux deux publications des chapitres 3 et 4. En bref, il s'agit d'un appareil linéaire permettant l'échantillonnage de 4 cultures en

simultané. Il était placé dans une cuve permettant le refroidissement des échantillons à 4°C à partir d'un bain circulant d'eau froide extérieur au dispositif.

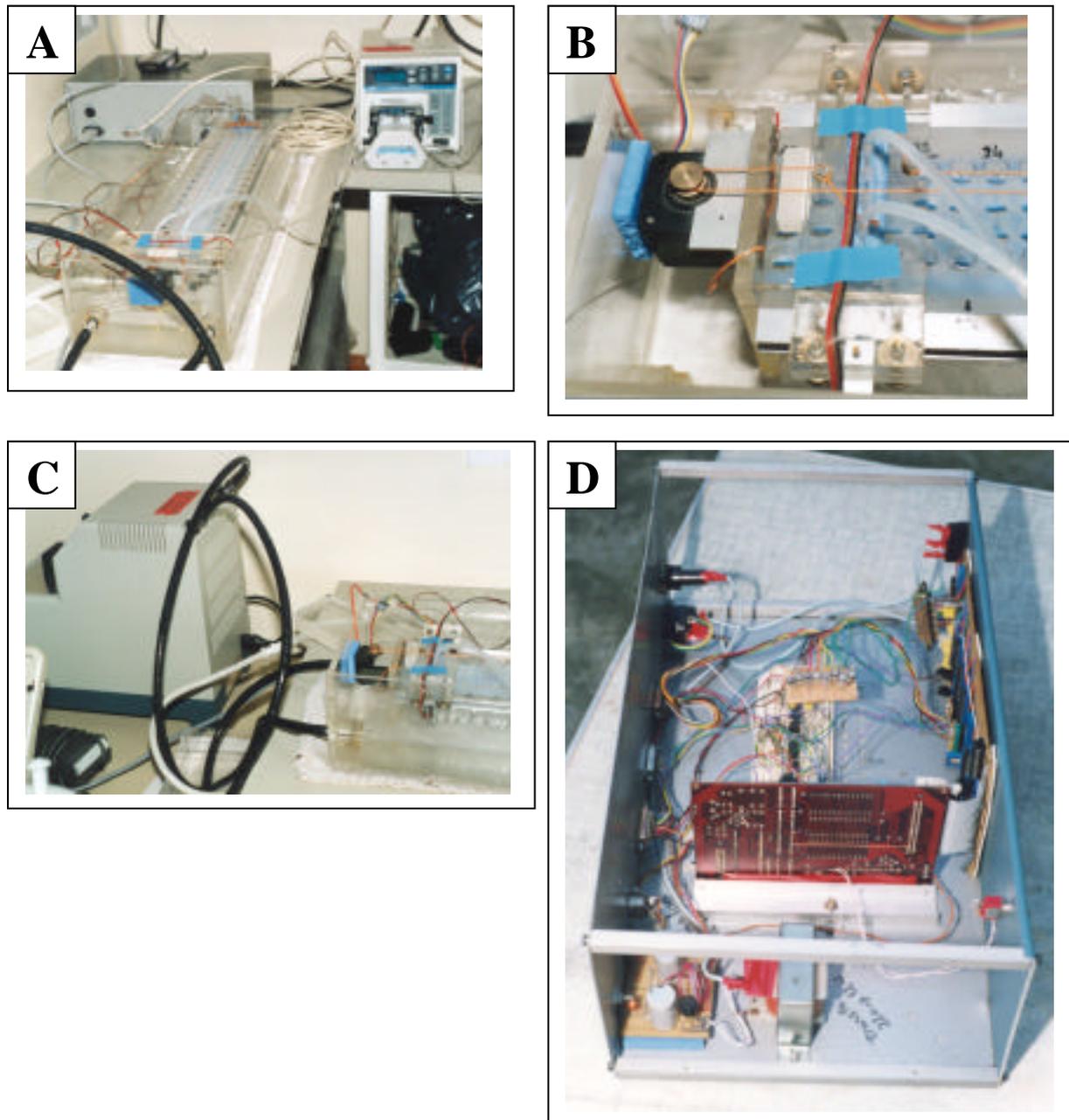


Fig. II.1 Photographie d'ensemble de l'échantillonneur linéaire permettant le prélèvement simultané de 4 cultures (A). Il est placé dans une cuve en plexiglass alimentée par un bain circulant d'eau froide (C) permettant le refroidissement des tubes de prélèvement. Les prélèvements sont assurés par le fonctionnement d'une pompe péristaltique dont le contrôle est géré par informatique (D). Les tuyaux de prélèvement des cultures arrivent au niveau d'un chariot qui se déplace le long de rails parallèles et se place au-dessus des tubes de prélèvement. Son positionnement est donné par la lecture précise d'une diode photoélectrique et le contrôle de son déplacement dépend d'un moteur électrique qui fonctionne pas à pas (B).

II.3 La cytométrie en flux.

En 1984, Yentsch & Yentsch font le paronama des techniques optiques nouvellement apparues permettant la résolution des problèmes biologiques à l'échelle micrométrique et globale. Dès cette époque, la cytométrie en flux, empruntée au domaine médical, apparaissait particulièrement prometteuse pour l'échelle cellulaire. D'application relativement récente à l'océanographie (Yentsch et al. 1983, Olson et al. 1985), cette technique est aujourd'hui incontournable et constitue un outil d'analyse rapide et fiable particulièrement bien adapté à l'étude des organismes phytoplanctoniques. Moyen performant pour discriminer les différentes populations entre elles, sur la base de la fluorescence du contenu pigmentaire des cellules (chlorophylle, phycoérythrine) ou de leurs caractéristiques de diffusion lumineuse (taille), il s'est également révélé d'un très grand intérêt pour l'étude du cycle cellulaire. Récemment, il a été adapté à l'analyse des virus marins (Marie et al. 1999). Ces domaines d'application sont résumés dans l'encadré II.1 ci-dessous.

Encadré II.1 Liste non exhaustive des applications de la cytométrie en flux à l'étude du plancton marin.

- Identification taxinomique par marquage au moyen de sondes spécifiques de l'ARN (Simon et al. 2000)
- Détermination de la taille du génome (Marie et al. 2000)
- Composition pigmentaire du phytoplancton (Olson et al. 1993)
- Photophysiole, ecophysiole, toxicologie, activité métabolique du phytoplancton (Furuya & Li 1992)
- Etude d'impact du broutage, de la sélection (compétition) pour la nourriture (Christaki et al. 1999)
- Variabilité journalière de la concentration, de la fluorescence, de la taille des cellules (Vaulot & Marie 1999)
- Dynamique des populations: cycle cellulaire et taux de croissance (Vaulot et al. 1995)
- Détection et énumération des virus marins (Marie et al. 1999)
- Tri cellulaire pour discriminer les cellules actives, obtenir des distributions de taille, isoler des variétés cellulaires différentes (Davey & Kell 1996)

II.3.1 Instrumentation et principe général.

La cytométrie en flux est une technique qui permet de compter une par une les cellules d'un échantillon en suspension dans un liquide, de discriminer des sous-populations homogènes sur des critères de fluorescence et de taille, et éventuellement de les trier en fonction de leurs propriétés optiques, géométriques et électriques. Le cytomètre en flux se compose de trois parties: une partie fluidique, une partie optique et une partie électronique et informatique. Pour certains appareils, il existe en plus une fonction de tri (Fig. II.2).

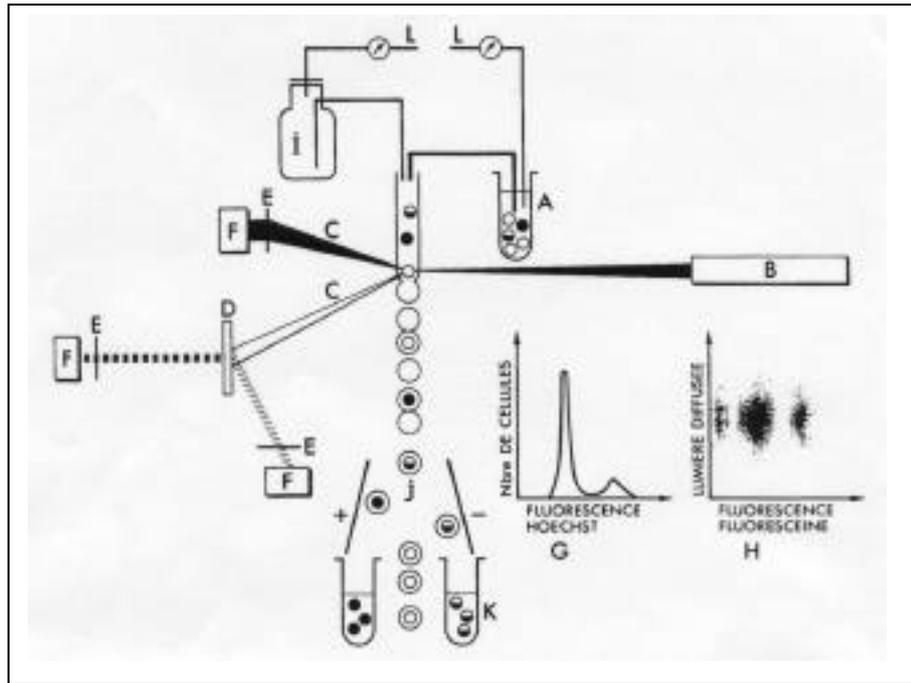


Fig. II.2 Schéma de principe du cytomètre en flux. Les cellules en suspension sont soumises à une surpression (L) qui les injecte au centre de la veine liquide (I) appelée liquide de gaine. Les cellules entraînées s'alignent et défilent une par une devant le laser (B). Les cellules émettent alors des signaux optiques qui sont récoltés par des détecteurs photosensibles (photodiodes ou photomultiplicateurs F). Les cellules peuvent sur certains appareils (EPICS) être séparées, triées et récoltées après avoir été chargées électriquement en passant devant un champ électrique (J). Sur d'autres appareils (FacSORT) le tri peut également se faire à partir soit par un "catchertube" qui se déplace à grande vitesse pour aspirer la cellule d'intérêt. Les résultats de l'analyse apparaissent sous forme d'histogramme monoparamétrique (G) ou biparamétrique (H). D'après Métézeau et al. (1988).

II.3.1.1 La partie fluïdique.

Une veine liquide stable s'écoule à vitesse constante à l'intérieur d'un tube en plastique ou un tuyau sous l'effet de la pression. Le conduit contenant le liquide se termine par une buse de section étroite dont l'orifice est calibré avec grande précision. L'échantillon est introduit en légère surpression dans l'axe de la veine liquide à l'aide d'une aiguille métallique dont le diamètre interne est finement calibré. Le rapport des pressions imprimées à l'échantillon d'une part et au liquide entraîneur d'autre part détermine la vitesse de défilement des particules.

II.3.1.2 La partie optique.

La veine liquide est illuminée à 90° par un faisceau de lumière monochromatique émis en général par un laser et focalisé au travers d'une lentille positionnée à l'aide de vis micrométriques. Les particules sont analysées au moment où elles traversent le faisceau de lumière, c'est à dire pendant 1 microseconde. Perpendiculairement à la fois à l'axe de la veine liquide et à l'axe du faisceau laser, un objectif dirige vers les photomultiplicateurs les impulsions lumineuses qui résultent de l'interaction des particules fluorescentes et du faisceau laser. Devant chaque photomultiplicateur, un jeu de filtres sélectionne les longueurs d'onde spécifiques des pigments

naturels ou des fluorochromes utilisés et élimine le rayonnement excitateur. Les filtres peuvent être de différentes natures et de spécificité variée (voir plus loin). Dans l'axe du laser, une photodiode collecte la lumière diffusée aux petits angles ($<15^\circ$) au delà d'une barre d'obscurisation qui masque le faisceau incident.

II.3.1.3 La partie électronique et informatique.

Le passage d'une particule devant le faisceau laser s'accompagne d'une modulation lumineuse. Les photomultiplicateurs détectent un signal de fluorescence qui correspond à la quantité de pigment ou de colorant associée à la particule. La diffusion du rayon incident est détectée par la photodiode et le signal est, pour la plupart des objets, proportionnel à leur surface. La surface d'une impulsion (intégrale de fluorescence) correspond à la quantité totale de fluorochrome associée à la particule; la valeur crête de cette impulsion quantifie l'intensité de fluorescence maximum. Les impulsions électriques digitalisées sont traitées par un analyseur multicanaux et classées par canal en fonction de leur amplitude. Les impulsions s'accumulent sous forme d'histogramme (1 paramètre, 256 à 1024 canaux disponibles) ou de cytogramme (2 paramètres, 64x64 à 256x256 canaux). La combinaison des paramètres de fluorescence et de diffusion dans l'axe du laser permettent la discrimination entre populations de particules de suspension cellulaire ou subcellulaire (noyaux, chromosomes, débris cellulaires, virus). Les différentes populations de l'échantillon constituent des histogrammes de répartition (en taille et fluorescence) et sont identifiés sous forme de pics.

II.3.2 La fonction de tri.

Lorsque le diamètre de la veine liquide qui s'échappe de la buse n'excède pas une certaine taille, la fragmentation du fluide en gouttelettes est stable et il est possible d'isoler un type donné d'objet du reste de l'échantillon. Sur les cytogrammes, une (ou plusieurs fenêtres) de tri sélectionne(nt) la (les) zone(s) d'inérêt. Les particules qui répondent à la totalité des critères de tri sélectionnés sont purifiées du reste de l'échantillon quelques micro-secondes après leur analyse. Dans les appareils type EPICS (voir plus loin), chaque gouttelette qui contient un objet sélectionné reçoit une charge électrique (positive ou négative) au moment même de sa formation. Celle-ci est créée par une impulsion électrique appliquée entre deux électrodes portées chacune à un potentiel alternativement négatif ou positif. Les gouttelettes chargées sont déviées de leur trajectoire initiale sous l'influence d'un champ électrique. Le champ électrique est créé par deux plaques de déflexion portées chacune à un potentiel élevé. La déviation des gouttelettes est proportionnelle à leur charge électrostatique et à l'intensité du champ électrique. Les gouttelettes et les particules qu'elles

contiennent peuvent ainsi être recueillies à l'intérieur d'un récipient. Pour le FACSort (voir plus loin), le tri est réalisé à partir d'un système (en anglais "catchertube") qui attrape les particules d'intérêt.

II.3.3 Les filtres chromatiques.

L'analyse en cytométrie en flux d'une suspension de particules est possible quand l'appareil est capable de discriminer les différentes populations ou sous-populations fluorescentes. Le choix des filtres introduit dans le système optique devant les photomultiplicateurs est donc primordial. Les filtres sont soit de type absorbant, soit de type interférentiel. La spécificité spectrale du filtre optique est préalablement définie par sa courbe de transmission déterminée par spectrophotométrie. Les filtres absorbants sont des filtres en verre coloré. Ils sont tous de type « long pass ». Ils transmettent donc la lumière dont la longueur d'onde est supérieure à leur valeur nominale et absorbent les rayonnements de longueurs d'ondes inférieures. Les filtres interférentiels sont constitués par une surface de verre sur laquelle de multiples couches fines de sels métalliques sont uniformément réparties. Le domaine de réflexion et de transmission d'un filtre est relié à l'épaisseur et à l'indice de réfraction de chaque dépôt. Ces filtres transmettent ou suppriment certaines longueurs d'onde de façon très spécifique par les phénomènes d'interférences des rayons lumineux réfléchis sur chaque couche. Ils sont de type « long pass » ou « short pass », c'est à dire que leur pouvoir de transmission s'exerce sur l'ensemble de la gamme de longueurs d'ondes respectivement supérieures et inférieures à la valeur nominale. Le domaine spectral spécifiquement transmis par les filtres « band pass » se limite à une portion réduite du spectre. Placés à 45° dans le trajet du rayonnement lumineux, les filtres interférentiels se comportent en miroirs sélectifs. Les miroirs dichroïques sont utilisés pour séparer deux rayonnements lumineux distincts issus d'une même source.

II.3.4 Etalonnage de l'appareil, coefficient de variation.

Une analyse précise de la fluorescence et de la taille des particules d'un échantillon n'est possible que lorsque l'intersection du rayon laser et de la veine liquide est réalisée précisément dans le plan des photodétecteurs (photomultiplicateurs et photodiode). Cette mise au point est obtenue au moyen de vis micrométriques qui permettent de déplacer lentement la lentille focale devant le rayon laser. Un mauvais alignement du dispositif optique devant le flux de particules a pour conséquence un manque de précision dans l'excitation des fluorochromes et une faible résolution des mesures de fluorescence. L'alignement rigoureux du laser sur la veine liquide est réalisé au moyen d'un standard de taille et de fluorescence: des microbilles sphériques de diamètre déterminé et identique

et dont le contenu en fluorochrome est connu. Ces microbilles sont généralement en polystyrène, latex ou polyvinyl toluène. Le fluorochrome est le plus souvent la coumarine ou la fluorescéine. La fluorescence des microbilles est proportionnelle à la quantité de fluorochrome fixé. Lors de l'utilisation de ces microbilles uniformes, les signaux recueillis sont stables, identiques en amplitude et se superposent exactement lorsque la focalisation du laser est optimale. Ce signal est matérialisé par un pic net et parfaitement reproductible sur les histogrammes de répartition en fluorescence et en taille. La base de ce pic s'étend sur un nombre de canaux d'autant plus réduit que l'alignement du laser est réussi. La résolution du pic est exprimé par le calcul de son coefficient de variation (CV) sur les histogrammes de fluorescence ou de taille. Pour une courbe gaussienne, le CV est le rapport de la déviation standard à la moyenne. La valeur du coefficient de variation est relative puisqu'elle varie avec le type de standard utilisé, la mesure effectuée (taille ou fluorescence) et la longueur d'onde du rayonnement d'excitation.

II.3.5 Appareils utilisés.

Le cytomètre utilisé au cours de cette thèse a été un cytomètre de type FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA). Certains résultats exploités au cours de cette thèse ont également été obtenus avec un autre appareil de type Coulter EPICS 541 (Hialeah, FL, 33010). Le tableau II.1 ci-dessous résume brièvement les caractéristiques d'utilisation des deux cytomètres.

Tableau II.1 Principales caractéristiques des deux cytomètres en flux FACSort (Becton Dickinson) et EPICS (Coulter).

	EPICS 541	FACSort
Mise en route	1 heure	10 minutes
Puissance Laser	400 mW	15-40 mW
Marqueur ADN	Hoechst 33342	SYBR-I, PicoGreen
d'excitation	UV 353-357 nm	
	Visible 457, 488, 515 nm	Visible 488 nm
Miroirs dichroïques	400 LP 590 SP	488-LP 560-SP 590-SP
rouge	690 LP	650-LP
Filtres { orange	-	585/42
vert	530 SP	530/30



Fig. II.3 Photographie d'ensemble d'un cytomètre en flux de type FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

II.3.5.1 Utilisation du FACSORT.

Les cellules contenues dans l'échantillon sont mises sous pression et aspirées à l'intérieur de la gaine liquide constituée d'eau désionisée ou d'eau de mer filtrée. La configuration particulière de la chambre d'injection permet d'aligner en file indienne les cellules qui passent l'une après l'autre devant le faisceau lumineux laser à ions argon, et l'intersection de chaque cellule orthogonale à l'axe de défilement provoque la diffusion de la lumière et l'émission de la fluorescence des cellules dans toutes les directions. La diffusion est traduite en signal électrique par une photodiode dans l'axe du laser (FALS: Forward Angle Light Scatter, proportionnel au diamètre des cellules) et par un photomultiplicateur (PMT) à 90° via un premier miroir dichroïque (RALS: Right Angle Light Scatter, fonction du volume et de l'indice de réfraction des cellules). La lumière est ensuite renvoyée vers deux autres miroirs dichroïques, eux-mêmes renvoyant l'intensité lumineuse vers deux filtres de bandes passantes de longueurs d'ondes 530/30 (fluorescence verte) et 585/42 (fluorescence orange de la phycoérythrine). Le dernier filtre "Long Pass" sélectionne les longueurs d'onde supérieures à 650 nm (fluorescence rouge de la chlorophylle). L'alignement optique a été contrôlé par le signal obtenu à partir de billes fluorescentes calibrées de 0,95 µm de diamètre (Réf. 17154, Polyscience, Warrington, Pensylvanie) servant également de standard interne. Les valeurs

types de CV (%) obtenues pour ces billes sont données dans l'encadré II.2. Les échantillons peuvent être délivrés à des taux variables (« low, medium et high »), qui correspondent en moyenne à 6-8 (low), 25-30 (medium) et 80-90 (high) microlitres par minute. La connaissance du débit et la durée de l'analyse permet de calculer la concentration des populations généralement donnée en nombre de cellules par millilitre. Les différents paramètres mesurés sont recueillis sur une échelle logarithmique. La fluorescence de l'ADN est également collectée sur une échelle linéaire. Cela est rendu possible par l'utilisation d'un connecteur en T qui se branche sur le photomultiplicateur collectant la fluorescence verte. Ensuite, le photomultiplicateur collectant normalement la fluorescence orange est utilisé pour collecter le signal linéaire de fluorescence verte grâce à un convertisseur analogue-digital. Le cytomètre est couplé à un ordinateur qui permet de visualiser l'ensemble des paramètres (Logiciel Lysis II, Hewlett Packard 98785A). Les données sont représentées sous forme monoparamétrique (histogramme) ou biparamétrique (cytogramme) permettant d'apprécier la distribution des différentes populations sur la base de leur niveau de fluorescence, de la taille des cellules, de leur répartition dans les différentes phases G1, S, G2+M du cycle cellulaire. Après transfert des fichiers, l'analyse est réalisée au moyen du logiciel Cytowin (Vaulot 1989).

Encadré II.2 Valeurs obtenues pour la mesure du coefficient de variation (%) des différents paramètres cytométriques pour des billes de 0,95 μm de diamètre dans des situations différentes d'utilisation, en eau de mer ou en eau distillée. Les valeurs entre parenthèses pour le FALS, RALS ... correspondent à la tension en volts appliquée aux photomultiplicateurs.

Liquide de gaine : eau distillée
(moyenne faite sur 45 analyses)

Liquide de gaine : eau de mer filtrée
(moyenne faite sur 220 analyses)

FALS (E01)	8.7		
RALS (400)	4.5	RALS (450)	4.9
FL1 (500)	2.9	FL1 (650)	3.6
FL2 (600)	3.4	FL2 (650)	3.6
FL3 (700)	7.0	FL3 (650)	6.0

II.4 La microscopie confocale.

II.4.1 Présentation.

Par ses capacités de réaliser des coupes optiques verticales ou obliques, point par point, la microscopie confocale représente sûrement le développement le plus important de la microscopie optique au cours des 10 dernières années. Elle permet d'améliorer considérablement le pouvoir de

résolution des marquages cellulaires par fluorochromes et d'abaisser le seuil de détection puisqu'il devient possible de voir quelques molécules de fluorochrome (Pawley 1995). La microscopie de fluorescence en mode confocale a pour principe de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans un plan. Cette technique a permis de pallier l'inconvénient majeur de la microscopie en fluorescence, à savoir la perte de résolution due à l'émission de fluorescence des objets (marqués ou pas) défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. Le traitement informatique associé permet d'afficher des images provenant du signal enregistré par un détecteur très sensible et de reconstituer la distribution tridimensionnelle de la fluorescence.

II.4.2 Principe optique.

Alors que la microscopie photonique classique capte simultanément tous les points de l'objet, le microscope à balayage utilise une configuration optique dans laquelle la source est fortement focalisée sur un point. Le principe de cette nouvelle application repose sur la confocalisation extrême sur l'échantillon d'un faisceau laser d'excitation et du champ de l'objet perçu par le détecteur généralement constitué d'un photomultiplicateur de haute sensibilité, l'échantillon étant éclairé et interrogé point par point, et cela de façon successive grâce au mécanisme de balayage (Fig. II.3). Ce point joue le rôle de foyer excité et renvoie une lumière, réfléchiée ou de fluorescence, selon le mode d'observation choisie, laquelle est d'abord captée, puis filtrée afin de s'assurer de sa nature (lumière de réflexion ou de fluorescence) avant d'être de nouveau focalisée sur un autre foyer situé devant le détecteur. On obtient ainsi une amélioration du contraste et une meilleure résolution avec une très faible profondeur de champ. L'association de la microscopie confocale au mode d'épifluorescence permet de mesurer point par point la quantité de fluorescence émise par une préparation et ainsi de réaliser une véritable imagerie microscopique à trois dimensions. La résolution des images avoisine la taille minimale d'une tache de diffraction à trois dimensions, c'est à dire de l'ordre de 0,2 à 0,5 μm dans les plans perpendiculaire et axial du microscope dans le visible grâce à des objectifs à immersion de forte ouverture numérique.

II.4.3 Préparation des échantillons.

Les cellules sont fixées au glutaraldéhyde (0,25% final) puis la culture est filtrée sur un disque anopore de 0,2 μm de vide de maille. Le filtre est placé dans une solution 50-50% PBS-Glycérol et placé entre lame et lamelle. La figure ci-dessous montre l'image obtenue pour une préparation réalisée à partir d'une culture de *Prochlorococcus* (Fig. II.5).

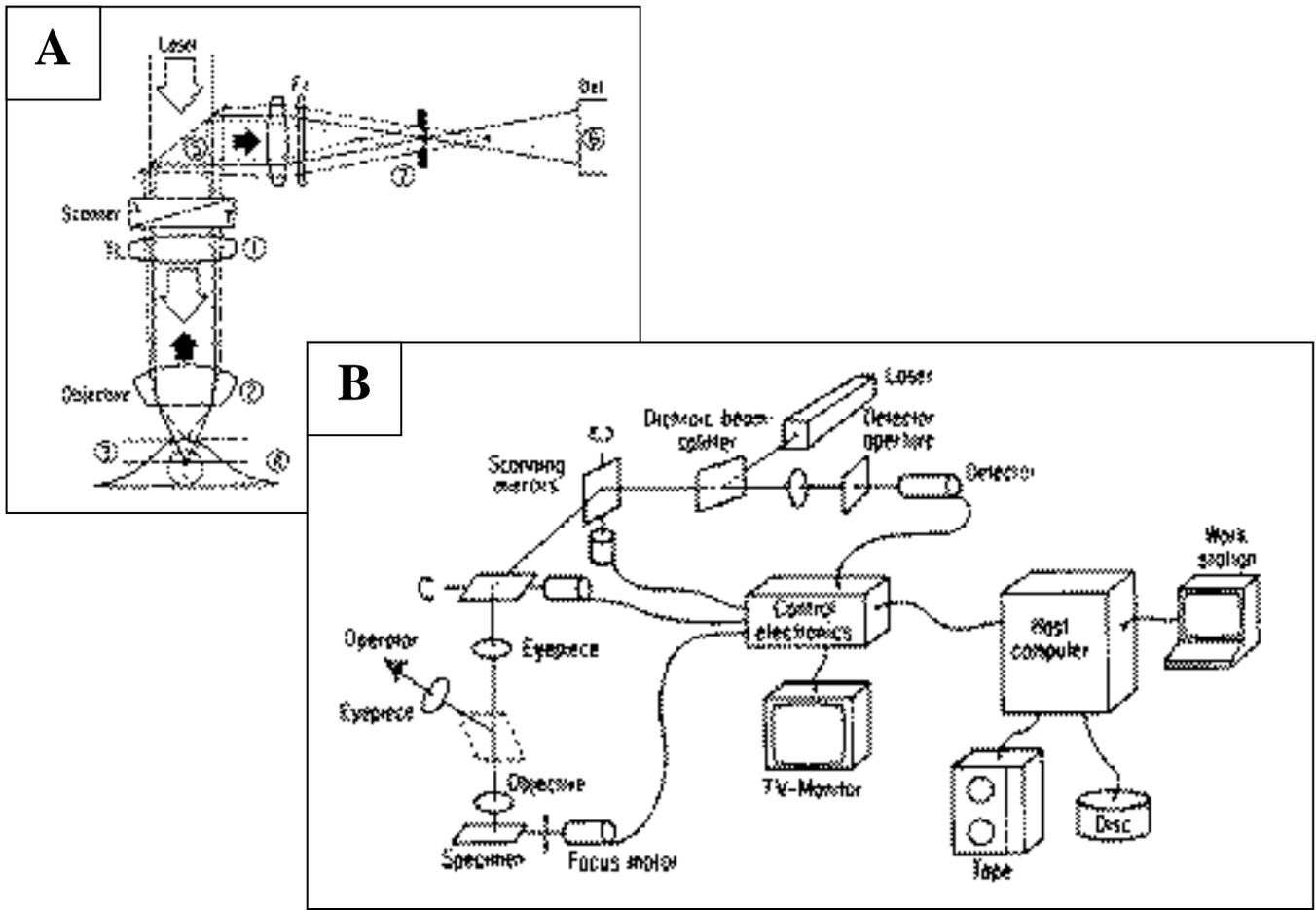


Figure II.4 A : Principe du microscope confocal, en mode « épifluorescence ». L'objectif (2) focalise le faisceau du Laser sur un plan (4) de l'objet. Le faisceau fluorescent émis est séparé du faisceau d'excitation par un miroir dichroïque (5) et focalisé sur le diaphragme de sélection (7), avant d'atteindre le détecteur (6), le plus souvent un photomultiplicateur. La fluorescence émise par les plans de l'objet différents du plan de focalisation (par exemple (3)), est étalée sur le diaphragme de sélection et seule une infime partie atteint le détecteur. Le scanner xy permet de balayer tous les points du plan de focalisation. B : Schema général du microscope confocal à balayage laser. Cette figure reprend les éléments du microscope décrit à la figure A en y rajoutant ce qui permet de commander le balayage en xy (scanning motors) et en profondeur (focus motor), de lire le signal fourni par le détecteur et d'afficher, traiter et sauvegarder les images. La pièce principale est un micro-ordinateur (host computer) relayé par un boîtier de contrôle (schémas extraits de Handbook of biological confocal microscopy, 2nd edition (1995) J. B. Pawley (Ed.), Plenum Press N.Y. & London, 632 p.).

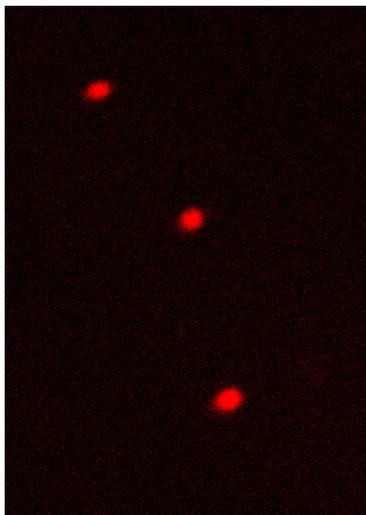


Fig. II.5 Photographie en microscopie confocale de *Prochlorococcus*. La longueur d'onde d'excitation du laser a été fixé à 488 nm et l'image obtenue grandie 5 fois au moyen du logiciel de traitement (Fluoview, Olympus Optical Co, Tokyo).

II.5 Article 1 : Application of a compact automatic sea water sampler to high frequency picoplankton studies (*Aquatic Microbial Ecology* 1998, 14:309-314).

II.5.1 Résumé en français.

En raison de l'importante variabilité enregistrée par les paramètres cellulaires et physiologiques (abondance, taille, fluorescence pigmentaire, cycle cellulaire, ...) du picoplancton sur des échelles de temps très courtes, l'étude des populations en culture comme dans le milieu naturel nécessite des moyens de prélèvement et d'analyse à haute fréquence (de l'ordre de l'heure). Cette note décrit un échantillonneur automatique compact fabriqué afin de collecter de petites quantités d'eau de mer (environ 3 ml) à haute fréquence (de quelques minutes à quelques heures), particulièrement utile pour l'acquisition de données concernant la communauté microbienne. L'appareil consiste en une carte à microprocesseurs qui contrôle, au travers d'une interface et d'un programme écrit en BASIC, une pompe péristaltique et un jeu d'électrovannes. Les échantillons sont conservés à 4°C avant analyse ou fixation, ce qui se traduit par un minimum d'effets sur les paramètres telles que l'abondance des cellules, la taille ou la fluorescence des pigments.

II.5.2 Publication en anglais

Jacquet S., Lennon J-F, Vaultot D. 1998. Application of a compact automatic sea water to high frequency picoplankton studies. *Aquatic Microbial Ecology*. 14 : 309-314

II.5.3 Informations supplémentaires sur le site Internet de l'équipe.

Sampler design and implementation

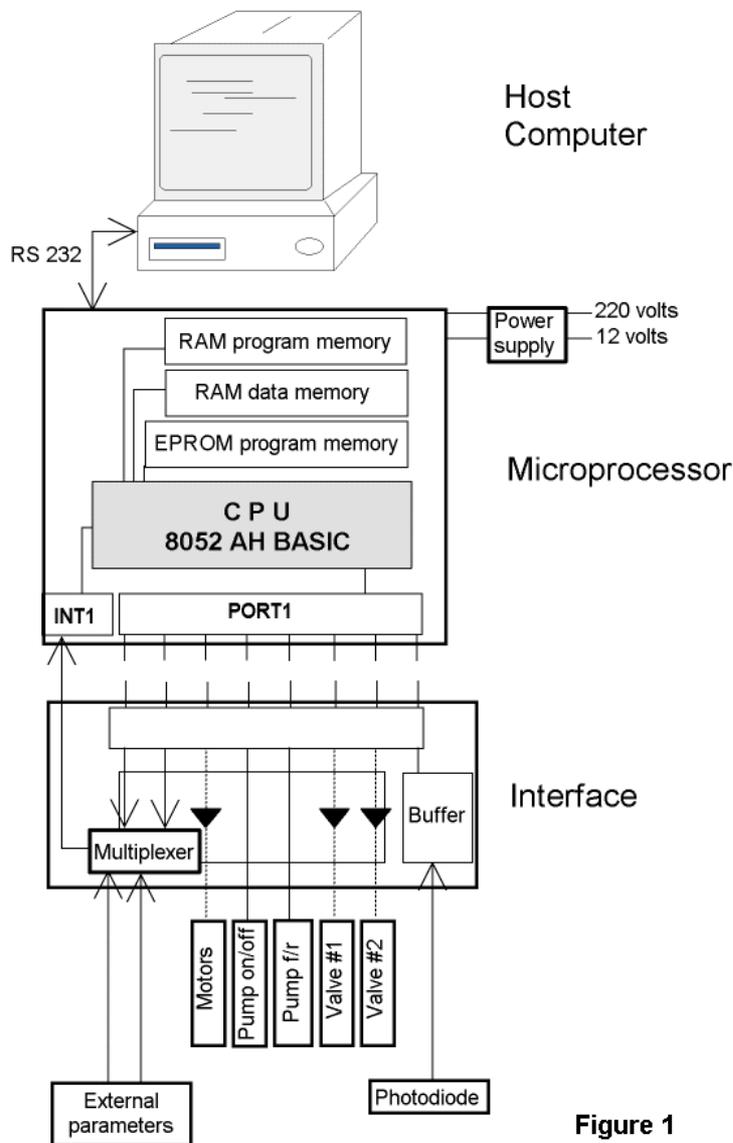


Figure 1

Microprocessor board. The system is controlled by a microcomputer board (see Elektor Electronics, Nov 1987, p 24-31), built around the Intel 8052 AH Basic microprocessor and its peripherals (mainly memory for programs and data). It implements all necessary computer functions, including hardware as well as software: clock, in/out parallel port, complete bus (i.e. with address, data and control) serial port and counters BASIC interpreter. Programs, written in BASIC and stored in ASCII format on any PC-compatible computer, are sent to the microcomputer board through a RS-232 link by any communication software such as Telemate (Hu 1990). Programs trigger the different operations such as the on/off switching and motor direction of the peristaltic pump, the electrovalves, and the rotation of the tube holder (see Figure 1). Programs can either be loaded and used in RAM (Random Access Memory), which is handy for debugging or burned into an EPROM (Erasable Programmable Read Only Memory), making the device completely independent from an external computer once the

program has been satisfactorily tested and sent. The interface, between the microcomputer board and the system to be controlled, could be built by using the bus (see the microprocessor scheme in Elektor Electronics) but our system is just simple enough to be entirely driven through the lines of PORT1. The eight input/output lines of the later are directly controlled by a BASIC instruction (PORT1) and a counter input (INT1). An input line reads the state of the photodiode monitoring the position of the sampler. Other lines, programmed as outputs, control respectively the rotation of the sampler, the state of the two electrovalves, the rotation of the pump and its direction (forward and reverse). There is two lines left, which can be used to control the temperature regulation if it is chosen to control it by software, and a multiplexer, used to monitor some environment parameters. To implement this function, the easiest way is to use sensors having a frequency modulated response, which is fed to the counter input, INT1. The TTL (Transistor Transistor Logic) logic levels, provided by PORT1, can be used directly, for instance to control the Masterflex pump or the multiplexer, but have sometimes to be boosted, using amplifiers, to control the electrovalves or the

motors of the sampler. Depending hence on the complexity of the system to be driven, two approaches can be used. First, the microprocessor bus can be controlled through decoding of the address lines. Second, and it is what we used, PORT1 with 8 bits can be directly operated by the processor, what gives just enough flexibility to drive the whole parameters. The power supply is provided by the main line (220 volts) when available, or by a 12 volt car battery which can also automatically take the relay in case of main supply failure.

Fraction collector It consists of a Perspex disk with 24 holes in which are inserted 24 hemolysis tubes (75x12mm, 4.5ml, CML, Nemours, France). A ring of plastic foam is glued to the disk and pierced by holes slightly smaller than the diameter of the tubes to maintain them in position. The disk rotates around a virtual axis driven by 3 gear box motors pressing against the external circumference of the disk, 120 degrees apart, and by means of three fixed pulleys placed between the motors, 120 degrees apart as well. To allow the disk to rotate, it is critical to maximize its contact with the axes of the motors, which is achieved by inserting an appropriate piece of rubber tubing onto motor axes. Since the disk must rotate slowly enough in order the photodiode to read its position (see below), it is critical to use either step by step or gear box motors. This system is quite simple to build and allows an easy change of the rotating disk. This set up allows easy cooling of the sampling tubes in the tank below the disk (see below). The position of the disk is given by a photoelectric device consisting of a reflective opto-coupler (CNY70, Selectronic, Lille, France), providing isolation between input and output. The photodiode detects the presence of black and white indexes drawn on the reverse face of the disk. When meeting a black band, corresponding to the position of each tube, the motors stop running, whereas motors run as soon as the photodiode detects a white band. This information is tested by one bit of the parallel port of the microprocessor.

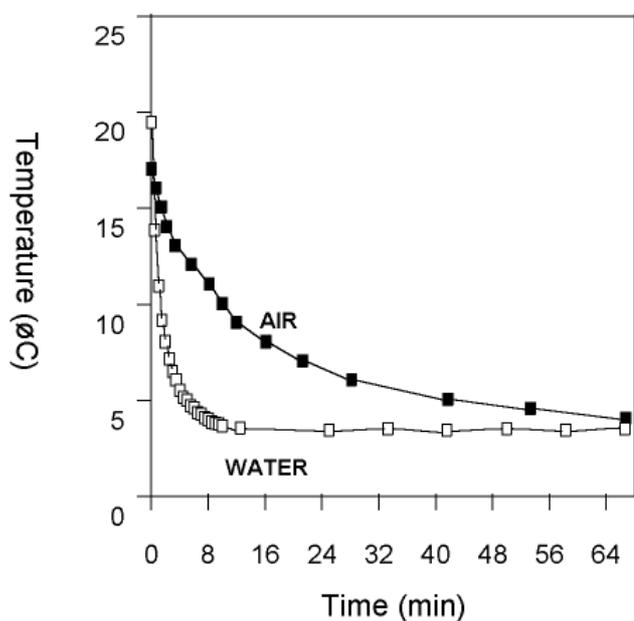


Figure 2

collector tank (the part to be cooled) as well as the heat radiator largely overlap the size of the Peltier modules (5 by 10 cm). To get a reasonable thermal insulation between the "hot" and the "cold" part of the system, it is necessary to increase their spacing well beyond the thickness, around 5 mm, of the Peltier modules. A thermal shunt, the same dimensions as the thermoelectric device (5 by 10 cm) and some 2 cm thick, sandwiched between the thermo-electric device and the bottom of

Thermal regulation For optimal samples preservation before analysis or fixation (see below), the tank must be refrigerated. Thermal regulation is achieved by means of two Peltier thermoelectric elements (Thermoelectricidad, Bertotza SL, Navarra, Spain) in line (capacity of 50W each) supplied with the 12V power source. The principle consists of an electrical current passing through the junction of two dissimilar conductors in one direction that produces a cooling effect, and in the opposite direction a heating effect. The rates of both heat generation and absorption are proportional to the current and dependent on the temperature of the junction (for more details, see The Cambion Thermoelectric Handbook, Second edition, 1972, Cambridge Thermionic Corporation, p 9-32). In the bottom of the tank, a heat sensor allows measurement (after appropriate calibration) and regulation of temperature by means of a comparator with hysteresis (around 0.5°C). The bottom of the

the tank can do the trick, without degrading too much the overall heat transfer. It is made preferentially of copper but aluminium is acceptable, and it is what we used. This allows the required thermal insulation between the bottom of the tank and the radiator (see below) towards which the heat flow is driven. The insulation, made with polystyrene plaques which take the exact shape of the bottom of the tank, the aluminium bloc and the thermoelectric couple, prevents thermal loss between the tank and the Peltier elements. The radiator, also made of aluminium and directly in contact with the thermoelectric elements, plays the role of a heat exchanger. The heat is evacuated by means of an air flow generated by a couple of fans placed in a box. Such a design allows the tank to be rapidly refrigerated. The thermistor, embedded in the bottom of the tank, measures and controls the temperature. Two techniques have been successfully used, one stressing more on hardware, the other one on software. In the first method, the thermistor is part of voltage divider, the tension of which is compared to a reference calibrated to get the required temperature (usually around 4°C) in a Schmitt trigger with an hysteresis adjusted to some 0.5°C. In the second method, the thermistor modulates the frequency of an oscillator, which is readily measured by the counter input of the micro-controller. In both cases, the information about the temperature switches on or off a relay acting on the Peltier modules. The advantage of the hardware solution is that it works independently from any running program, allowing, for instance, to keep the samples cold even in case of a program failure. The software solution is simpler to build and more flexible to use.

Required temperature. To keep the samples at 4°C, we tested both thermal regulation using pre-cooled water in the tank or not. The temperature was measured inside the tank by means of a pre-calibrated captor that was not in contact with the bottom of the tank. In both cases, the action of Peltier elements facilitates a rapid decrease in temperature (see [Figure 2](#)) and the maximum temperature difference that can be obtained is about 30°C. This is a critical point because it would allow to work even with hot weather (see below). The use of the two modes (water or no water in the tank) is hence possible and depends on several factors, including the weather conditions of the place where the device is used. For instance, if the weather is hot, water will be required to avoid temperature differential whereas it will be not necessary if it is cold. If the tank is filled with approximately 300 ml tap water, corresponding to 3 cm water in depth, the temperature decrease is the same than when using no water but the time to obtain it depends on the original air and water temperatures. When fixed at 4°C with water in the tank, a 3 ml tube full of water placed on the disk requires 7 min to get 4°C. As shown in the figure 2, the temperature reaches 3,5 °C in the bottom of the tube as a consequence of a temperature gradient in the tank due to very slow convection if there is no homogenisation. Indeed, the deep water is directly in contact with the bottom of the tank. It refrigerates faster and, because of density properties, the convection acts very slowly. In spite of this, it seems more advantageous to get refrigeration using pre-cooled water in the tank to get a faster temperature equilibrium. In addition, the thermal regulation is improved because water is less sensitive than air to temperature change as it can occur when a series of tubes is replaced by the next one (not shown). Several experiments employing agitation of the device allowed us to see that the engendered turbulence permitted to get the equilibrium more rapidly because of a better homogenisation of the water temperature in the tank and in the tube (not shown). Hence, during oceanic cruises, because of the turbulence on board, it could be very useful to use a little volume of water in the bottom of the tank. However, it must be stressed that filling the tank with water can be risky because of possible overflowing that could spoil mechanical or electric components. For this reason, we tested a Cardan system that can be employed to maintain the tank in a horizontal position (not shown). By comparison, when fixed at 4°C without water in the tank, the 3 ml tube full of water requires 1 h to reach 4°C. If, on first hand, the problem of overflowing is avoided, on second hand, temperature drop is longer and thermal regulation is worse than in the former case with water in the tank.

Programs

Program 1

```

10 rem Program using controls through decoding of the address lines
20 dim HA(6), HX(6), HE(6)
30 input "DEPARTURE (0) : "HJ
40 input "PERIODICITY, in seconds : "PS
50 input "SAMPLING (1) OR ONLY LIGHT REGULATION (0) : "C
60 input "HOUR, MINUTE : "H, M
70 gosub 600
80 gosub 700
100 T0=3600*H + 60*M : I=0 : D=0
110 clock1
120 TIME =T0
130 T=Time
140 IF T>=T0+I*PS then gosub 800 else 150
150 IF T>=3600 then gosub 900 else 160
160 A=get
170 if A=115 then end else 130
180 end
500 rem SWITCH ON AND OFF
510 X=0
520 for l=0 to 5
530 if H>=HA(l) .and. H<HE(l) then HX(l)=1 else HX(l)=0
540 X=X+HX(l)*2**l
550 next l
560 XBY(32766)=X
570 A=get : if A=115 then end
575 if A=99 then C=1
580 return
600 rem TABLE OF VALUES FOR LIGHT REGULATION
610 HA(0)=3 : HE(0)=8
620 HA(1)=0 : HE(1)=12
630 HA(2)=3 : HE(2)=10
640 HA(3)=1 : HE(3)=9
650 HA(4)=2 : HE(4)=7
660 HA(5)=3 : HE(5)=7
670 return
700 rem INITIALISATION
710 xby(32766)=128+X
720 do
730 until (XBY(32762) .and. 64)=0
740 xby(32766)=X
750 return
800 rem MAIN CONTROL
810 I=I+1
820 print I, H, D
830 gosub 500
840 return
900 rem GESTION OF TIME
910 Time=Time-3600 : T0=T-3600 : T=T-3600 : H=H+1 : I=0
920 if H>23 then D=D+1 : H=0
930 M=int(T/60)
940 return

```

Program 2

```

10 rem Program using control through PORT1
15 rem Bit 0:diode, 1:valve1, 2:valve2, 3:valve 3,

```

```
20 rem 4:Peltier, 5:motors, 6:pumping direction, 7: On/Off pumping
25 rem INITIALIZATION
30 a0=1:a1=0:a2=0:a3=0:a4=1:a5=1:a6=0:a7=1
35 Gosub 1000
40 Port1=Octet
60 rem INPUT PARAMETERS
70 input "Periodicity of sampling, in minutes: "Pprelev
80 Pprelev=Pprelev*60
90 input "Number of samples: "Nprelev
100 input "Duration of initial pumping in seconds: "d1
110 input " Duration of sampling in seconds: "d2
120 input " Duration of tubing rinsing in seconds: "d3
130 rem MAIN PROGRAM
150 For I=1 to Nprelev
160 Clock1
170 Time=0
190 Sample=1
200 DO
210 A=get :IF A=115 then end
220 T=Time : Gosub 700
230 Print "Freq = ",Freq : Print "I = ",I
235 IF T<d1 then gosub 300
240 If T>=d1 .and. T<d1+d2 then gosub 400
250 If T>=d1+d2 .and. T<d1+d2+d3 then gosub 500
260 If ((T>=d1+d2+d3) .and. (Sample=1)) then gosub 600
270 Until T>=Pprelev
280 Next I
290 End
300 rem INITIAL PUMPING
310 a5=0
320 Gosub 1000
330 Port1=Octet
340 Return
400 rem SAMPLING
410 Z=INT((I-1)/20)
420 IF ((Z/2)-INT(Z/2))=0 then a1=1:a3=1 else a1=0:a2=1:a3=1
430 Gosub 1000
440 Port1=Octet
450 Return
500 rem RINSING
510 rem Valves poubelle fermee, 1 ou 2 ouverte
520 Z=INT((I-1)/20)
530 IF ((Z/2)-INT(Z/2))=0 then a1=1:a2=0:a6=1 else a1=0:a2=1:a6=1
540 Gosub 1000
550 Port1=Octet
560 Return
600 rem MOTOR
610 a1=0:a2=0:a3=0:a5=1:a6=0:a7=0
620 Gosub 1000
630 Port1=Octet
640 For J=1 TO 1000 : Next J
650 If (Port1.and.1)=0 then 660 else 650
660 a7=1
670 Gosub 1000
680 Port1=Octet
690 For K=0 to 1000 : next K
692 Sample=0
695 Return
700 rem THERMAL REGULATION
710 Gosub 1000
720 Port1=Octet
730 Timer1=0 : Tmod=80
```

```
740 For X=0 TO 100 : Next X
750 Freq=Timer1
760 If Freq<1100 then RegTherm=16
770 If Freq>1110 then RegTherm=0
780 Return
1000 rem OCTET VALUE
1010 a0=1
1020 Octet=a0*1+a1*2+a2*4+a3*8+a4*RegTherm+a5*32+a6*64+a7*128
1030 Return
```

II.6 Article 2 : Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBRTM Green I (*Applied and Environmental Microbiology* 1997, 63:186-193).

II.6.1 Résumé en français.

Le nouveau colorant SYBRTM Green I se lie spécifiquement aux acides nucléiques et peut être excité en lumière bleue (488 nm). Les concentrations cellulaires des procaryotes marqués mesurés dans des échantillons marins au moyen d'un cytomètre en flux de faible cout sont comparables à celles obtenues avec le colorant Hoechst 33342 excitable dans l'UV sur des cytomètres plus onéreux. Par contraste avec d'autres colorants: TOTO-1 et TO-PRO-1, le SYBRTM Green I a l'avantage permet la discrimination nette entre les bactéries hétérotrophes et les cellules de *Prochlorococcus*. Tout comme les résultats obtenus avec TOTO-1 et TO-PRO-1, deux groupes de bactéries hétérotrophes (types B-I et B-II) peuvent être distingués. De plus, la résolution obtenue pour les distributions d'ADN marqués avec le SYBRTM Green I est similaire à celle obtenue avec Hoechst 33342 permettant l'analyse du cycle cellulaire des procaryotes photosynthétiques sur l'ensemble de la colonne d'eau.

II.6.2 Publication en anglais.

Marie, D., Partensky, F., Jacquet S., Vaultot, D. 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 186-193

- CHAPITRE III -

**COMPORTEMENT CIRCADIEN
du PICOPLANCTON en CULTURE**

- CHAPITRE III -

COMPORTEMENT CIRCADIEN DU PICOPLANCTON EN CULTURE

“Division patterns in response to particular entraining forces (e.g. the Light:Dark cycle) are commonly considered to be a conservative property of species, each species possessing its own circadian chronotype which is the temporal analogue of the phenotype” (Chisholm 1981).

III.1 Introduction.

Un des événements les plus répétitifs dans la nature est l’alternance du jour et de la nuit, c’est à dire de la lumière et de l’obscurité, de la chaleur et du froid sur une période de 24 h. La conséquence directe de ce phénomène qui se répète depuis la nuit des temps est que les organismes vivants, des bactéries aux hommes, présentent des rythmes d’activité journaliers dont la périodicité est proche de 24 heures (Johnson et al. 1996, Czeiler et al. 1999). Les organismes picoplanctoniques ne font pas exception à cette règle: *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et les picoeucaryotes photosynthétiques présentent des rythmes journaliers marqués liés aux processus de photosynthèse et de division des cellules (Campbell & Carpenter 1986a, Vaultot et al. 1995, Durand & Olson 1996). Deux processus interviennent dans la croissance des populations phytoplanctoniques ou bactériennes: la croissance cellulaire (la production de biomasse), et la division cellulaire (la production de nouvelles cellules). Bien que ces deux processus soient intimement liés, ils peuvent être régulés différemment par les facteurs environnementaux. Typiquement, les processus de photosynthèse et de division se déroulent généralement à différents moments de la journée. Peu d’études ont tenté de reproduire ces comportements circadiens au laboratoire pour les souches picoplanctoniques les plus représentatives du milieu marin.

Les variations circadiennes (du latin *circa* : environ et *dies* : jour) des propriétés bio-optiques dans l’océan sont bien connues (Hamilton et al. 1990, Dickey et al. 1991, Stramska & Dickey 1992, Walsh et al. 1995, Kinkade et al. 1999). Elles ont été, la plupart du temps, enregistrées à partir de paramètres globaux tels que l’atténuation particulière ou la fluorescence de la chlorophylle. A partir de ces variations circadiennes de la matière en suspension, certains auteurs ont proposé des

estimations de la production primaire dans certaines régions océaniques. Cela a notamment été effectué en considérant une valeur constante quelque soit l'espèce pour l'atténuation particulière du carbone (Siegel et al. 1989, Cullen et al. 1992). Toutefois, on sait aujourd'hui qu'il n'en est rien, que ce soit pour les diatomées ou le picoplancton, et que ce paramètre connaît lui aussi une périodicité journalière (Stramski & Reynolds 1993, Stramski et al. 1995, Durand & Olson 1998). Il apparaît donc déterminant, pour mieux comprendre l'ensemble des variations optiques globales et pour pouvoir les utiliser pour l'estimation de la production primaire, de connaître les variations journalières enregistrées par chaque espèce et par l'ensemble de leurs paramètres (typiquement la taille des cellules). Cette problématique est particulièrement importante pour la communauté picoplanctonique qui domine les régions centrales des océans et constitue l'essentiel de la production. A ce jour, peu d'auteurs ont mesuré conjointement les variations optiques globales de fluorescence et d'atténuation et les variations des paramètres cellulaires des communautés picoplanctoniques pour tenter de déterminer leur importance relative (Claustre et al. 1999).

Dans ce chapitre est présenté un article en préparation pour la revue *Journal of Phycology*. Il décrit les variations journalières d'un certain nombre de paramètres biologiques et physiologiques pour différentes souches représentatives du picoplancton (12 au total) en réponse à un rythme d'entraînement lumière-obscurité. Ces paramètres (diffusion angulaire de la lumière à petit et grand angle, fluorescence de la chlorophylle, cycle cellulaire) ont été obtenus au moyen de la cytométrie en flux. Cette étude avait pour finalité de :

- déterminer si les réponses physiologiques sont les mêmes pour les différents organismes,
- mieux comprendre le comportement des populations naturelles,
- mieux interpréter les rythmes journaliers des propriétés optiques globales enregistrées dans les environnements où le picoplancton domine.

L'étude proprement dite de la régulation du cycle cellulaire par la lumière a été détaillée chez *Prochlorococcus*. Elle est présentée dans le chapitre 4.

III.2 Article 3 : Diel patterns of picoplankton in culture (en préparation pour soumission à *Journal of Phycology*).

III.2.1 Résumé en français.

Une étude comparative de l'effet d'un cycle de 12 h de lumière : 12 h d'obscurité sur l'entraînement des paramètres cellulaires de représentants picoplanctoniques tels que la diffusion de

la lumière, la fluorescence des pigments et le cycle cellulaire a été réalisée par cytométrie en flux. L'étude a été effectuée sur une large variété de souches picoplanctoniques marines : 3 *Prochlorococcus* (souches MED 4, PCC 9511, SS 120), 4 *Synechococcus* (souches ALMO 03, ROS 04, WH 7803, WH 8103) et 5 eucaryotes (*Bathycoccus prasinos*, *Bolidomonas pacifica*, *Micromonas pusilla*, *Pelagomonas calceolata*, *Pycnococcus provasolii*). La croissance et la division des cellules apparaissent étroitement couplées au cycle jour-nuit. Pour *Prochlorococcus* et les picoeucaryotes, la croissance se traduit par une synthèse de la chlorophylle et une croissance en taille des organismes durant la période éclairée alors que ces mêmes paramètres diminuent régulièrement pendant la période sombre, exception faite de *B. pacifica* et *M. pusilla*. Par contraste, l'augmentation de la fluorescence de la chlorophylle enregistrée pour les souches de *Synechococcus* s'arrête soit de jour, soit à la transition jour-nuit, soit en début de nuit. Pendant la nuit, les paramètres cellulaires de *Synechococcus* baissent ou restent constants comme si l'obscurité provoquait un arrêt de l'activité cellulaire. Le moment de la division cellulaire est très similaire pour tous les picoeucaryotes et localisé juste avant le passage à l'obscurité. Il est beaucoup plus variable chez *Prochlorococcus* et surtout chez *Synechococcus*. *Synechococcus* ALMO 03, ROS 04 et WH 7803 qui ont un rapport PUB/PEB faible, se divisent plus tôt pendant la journée. Inversement la souche WH 8103 qui présente un rapport PUB/PEB élevé se divise dans la nuit. La division de *Prochlorococcus* SS 120 et PCC 9511 est enregistrée à la transition jour-nuit alors que la souche MED 4 se divise plus tard de nuit. De part l'importance du picoplancton dans les systèmes marins, ces résultats devraient aider à une meilleure interprétation des propriétés optiques dans les régions où le picoplancton domine.

III.2.2 Publication en anglais.

- CHAPITRE IV -

**RÉGULATION par la LUMIÈRE du
CYCLE CELLULAIRE de
PROCHLOROCOCCUS**

- CHAPITRE IV -

RÉGULATION PAR LA LUMIÈRE DU CYCLE CELLULAIRE DE *PROCHLOROCOCCUS*

“A considerable effort has been made to elucidate the nature of the signals that commit a cell to DNA replication and to nuclear division, but the problem remains unsolved” (Zachleder & Setlik 1988).

IV.1 Introduction.

La possibilité de mesurer l'ADN des cellules après marquage des acides nucléiques (Steen et al. 1982, Yentsch et al. 1983, Boucher et al. 1991, Marie et al. 1996) a largement contribué ces dernières années à l'étude du cycle cellulaire des populations phytoplanctoniques en culture et dans le milieu naturel (Yee & Bartholomew 1988, Brzezinski et al. 1990, Marie et al. 1997). Prédire les réponses physiologiques des cellules aux changements de l'environnement nécessite de comprendre la régulation du cycle cellulaire. En effet, l'environnement influence la progression des cellules à travers les phases du cycle et par conséquent affecte la durée du cycle. L'effet des nutriments (enrichissement, limitation, privation) sur le cycle cellulaire a donc été étudié (Olson et al. 1986, Parpais et al. 1996) tout comme le mécanisme d'action de la lumière sur la régulation de la synthèse de l'ADN des cellules phytoplanctoniques. Parmi les résultats importants obtenus sur le sujet, il a été montré que les organismes phytoplanctoniques sont généralement entraînés par un rythme lumière-obscurité (Chisholm et al. 1984), sont sensibles à l'obscurité qui entraîne un arrêt des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire (Spudich et Sager 1980, Vaultot et al. 1986), plus rarement en G2 (Vaultot et al. 1986, Armbrust et al. 1989). Yee & Bartholomew (1988) ont rapporté que pour *Euglena gracilis*, entraîné par un cycle 12 h:12 h de lumière et d'obscurité, l'initiation de la synthèse de l'ADN est dépendante de la lumière par opposition à la mitose. Gerath & Chisholm (1989) ont montré que le cycle cellulaire a peu d'influence par rapport au rythme d'entraînement jour : nuit pour expliquer la variation journalière enregistrée pour la photosynthèse.

Pour le picoplancton, quelques études ont concerné l'effet des rythmes jour-nuit sur la croissance et la division cellulaire (voir chapitre précédent) mais très peu d'auteurs se sont intéressés au mécanisme d'action de la lumière sur la synchronisation du cycle cellulaire. Citons les travaux

d'Armbrust et al. (1989) qui ont montré que la progression de *Synechococcus* dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire est dépendante de la lumière. En 1995, Binder & Chisholm ont confirmé l'existence des points de blocage dans les phases G1 et G2 du cycle cellulaire chez *Synechococcus* quand la cyanobactérie est privée de lumière. Dans le cas de *Prochlorococcus*, aucune étude, avant celle présentée dans ce chapitre, n'avait porté sur l'analyse de la régulation du cycle cellulaire par la lumière.

IV.2 Régulation du cycle cellulaire par la lumière.

Pendant tout l'histoire de la vie, les organismes ont perçu les éclaircissements et les assombrissements périodiques du ciel, au rythme incessant de la rotation de la planète. Dès lors, il n'y a rien d'étonnant à ce que les organismes se soient accoutumés à ce rythme et que son harmonie soit ancrée au plus profond d'eux. Si l'on comprend bien que les organismes présentent un rythme d'activité qui se calque sur l'événement quotidien qui se répète le plus régulièrement, l'alternance du jour et de la nuit, il est nécessaire de comprendre comment les rythmes circadiens sont correctement synchronisés par la lumière, par quel signal, et comment un tel comportement journalier peut persister en l'absence du phénomène d'entraînement.

Pour expliquer l'effet d'entraînement des cycles de lumière-obscurité sur le cycle cellulaire du phytoplancton, deux hypothèses ont été avancées: celle prônant que la lumière a un rôle localisé dans la progression des cellules au sein de leur cycle cellulaire (c'est l'hypothèse du segment dépendant de la lumière de Spudich & Sager 1980) et celle faisant intervenir une horloge biologique calée sur la périodicité naturelle circadienne (Adams et al. 1984) entraînant à son tour le cycle. Brièvement, Spudich & Sager (1980) ont montré chez les cellules phytoplanctoniques, l'existence au cours de leur cycle cellulaire d'un segment dépendant de la lumière pour la croissance. Selon ce principe, une cellule doit recevoir une certaine quantité de lumière durant cette partie du cycle pour croître et se diviser ultérieurement. Ce segment est délimité par deux points A et T (de l'anglais "*Arrest and Transition points*", Fig. IV.1). En l'absence de lumière, les cellules se trouvent bloquées au point A. Sans une nouvelle exposition à la lumière, les cellules restent bloquées. Avec une quantité suffisante de lumière, le segment peut être traversé. Une fois le point T franchi, les cellules n'ont plus besoin de lumière pour se diviser. Dans la plupart des cas, il a été trouvé que ces points d'arrêt se situent dans les étapes intermédiaires du cycle cellulaire, essentiellement G1 et parfois G2 (Spudich & Sager 1980, Vaultot et al. 1986, Armbrust et al. 1989). Pour certains auteurs, cette explication suffisait très largement à comprendre la synchronisation obtenue pour la plupart

des espèces, sans avoir à faire appel à une horloge endogène (Chisholm et al. 1984, Vaultot et al. 1986, Vaultot & Chisholm 1987).

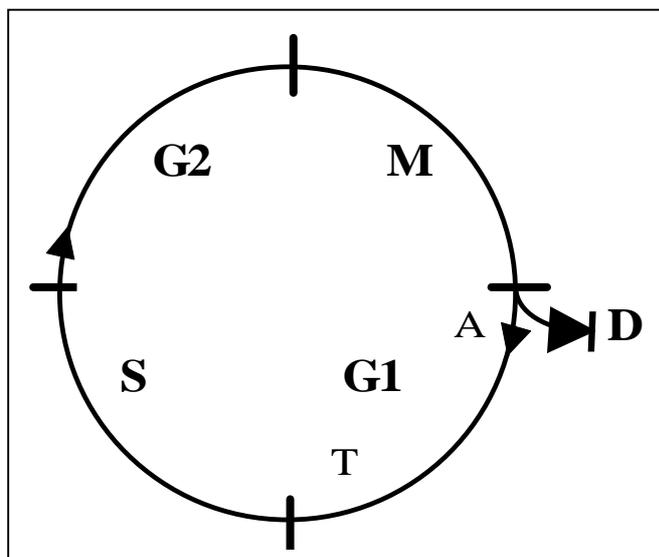


Fig. IV.1 Représentation schématique du cycle cellulaire eucaryote avec le segment A-T dépendant de la lumière inséré en G1. D correspond à la division de la cellule (d'après Spudich & Sager 1980).

L'hypothèse alternative met en jeu l'existence d'une horloge endogène inscrite dans le patrimoine génétique de l'organisme et qui, entraînée par le cycle naturel, contrôle la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle et conduit à la division de la cellule (voir Encadré IV.1). L'existence d'une horloge biologique a été révélée chez l'algue unicellulaire *Gonyaulax polyedra* à la fin des années 50 par Sweeney & Hastings et par la suite de nombreux travaux ont montré que c'était également le cas d'autres eucaryotes unicellulaires (voir Lloyd 1998 pour une revue de la littérature). Avant 1985, on pensait que les procaryotes ne pouvaient disposer de tels systèmes de régulation endogène, notamment en raison de leur taux de croissance élevé rendant à priori inutile un « calage » de l'activité cellulaire sur la période journalière. Il faut attendre les travaux de Stal & Brumbein (1985) qui montrent que, chez la cyanobactérie filamenteuse *Oscillatoria*, la séparation de l'activité photosynthétique (de jour) de celle de fixation de l'azote (de nuit) est sûrement liée à une horloge circadienne. L'année suivante, des travaux portant également sur le découplage de la photosynthèse et de la fixation d'azote chez *Synechococcus* sont publiés par Mitsui et al. (1986). Toutefois, à l'époque, ces auteurs préférèrent expliquer leur résultat comme étant un contrôle directement lié au cycle cellulaire. Ce sont Grobbelaar et al. qui confirment la même année pour *Synechococcus* l'existence d'une horloge biologique en révélant ses trois propriétés fondamentales, soit l'entrainabilité, la persistance et la compensation (voir Encadré IV.1). En 1989, Sweeney & Borgese montrent que le cycle de division cellulaire de *Synechococcus* est

probablement contrôlé par une horloge biologique puisque la périodicité de ce dernier persiste clairement en conditions de lumière continue. Dès lors, des scientifiques comme Susan Golden, Carl Johnson, Takao Kondo et Masahiro Ishiura vont s'emparer de cette thématique et définitivement démontrer l'existence d'une horloge biologique circadienne chez ce procaryote (voir par exemple Kondo et al. 1993, Johnson et al. 1996, Golden et al. 1997). En 1998, les gènes codant pour l'horloge biologique de *Synechococcus*, dénommés *kaiA*, *kaiB* et *kaiC* (du japonais *kai* : tourner) ont été identifiés par Ishiura et ses collaborateurs. Leur fonction a été démontrée par la délétion de cet ensemble de gènes ou de chaque gène pris séparément qui n'affecte pas la viabilité cellulaire mais entraîne la perte de toute activité périodique même quand les cellules sont entraînées.

Comparativement à *Synechococcus* qui a été étudiée de manière intensive sur ce thème, aucun travail n'avait porté jusqu'alors sur l'étude de la régulation du cycle cellulaire de *Prochlorococcus* en réponse à la lumière. Une première étude (celle qui suit présentée sous la forme d'une publication en préparation pour soumission à la revue *Applied and Environmental Microbiology*) nous a permis d'observer chez *Prochlorococcus* l'existence de points de contrôle et l'existence probable d'une horloge biologique. A partir de là, l'expression des gènes du cycle cellulaire (*dnaA* et *ftsZ* intervenant respectivement dans la réplication et la division des cellules) de *Prochlorococcus* entraîné par un rythme lumière-obscurité a été examinée (voir annexe 7). Enfin, les gènes *kaiB* et *kaiC* viennent d'être trouvés dans la séquence du génome de *Prochlorococcus* qui est presque complètement séquencé (pour plus d'informations, voir le site Internet à l'adresse suivante: http://bbrp.llnl.gov/jgi/microbial/prochlorococcus_homepage.html), démontrant définitivement l'existence d'une horloge endogène chez l'organisme procaryote photosynthétique le plus abondant de la biosphère.

Encadré IV.1 Définition et propriétés des horloges biologiques circadiennes.

Les horloges circadiennes sont des programmes biologiques endogènes, avec trois propriétés particulières, qui font que les organismes présentent des activités cellulaires, des processus physiologiques ou des comportements à des moments précis de la journée. Ces trois propriétés qui servent de diagnostic à l'existence d'une horloge moléculaire sont l'entraînabilité, la persistance et la compensation. Le programme est en effet entraîné par un rythme de périodicité équivalente à celle la journée, typiquement le rythme jour-nuit de 24 heures. Quand ce rythme d'entraînement cesse et que l'organisme se retrouve en conditions de conditions dites constantes ou continues, le programme continue à « cycler » avec une période proche mais différente de 24 heures. Enfin, la période reste la même pour des conditions de température variables tant qu'elles restent dans une gamme où la physiologie est active.

Le sujet est vaste et j'invite le lecteur intéressé à lire l'excellent ouvrage de Winfree A. (1994) intitulé « Les horloges de la vie, les mathématiques des rythmes biologiques ».

IV.3 Article 4 : Cell cycle regulation by light in marine *Prochlorococcus* (en fin de préparation pour soumission à *Applied and Environmental Microbiology*).**IV.3.1 Résumé de l'article en français.**

L'effet de la lumière sur la synchronisation du cycle cellulaire, du RALS et de la fluorescence de la chlorophylle de *Prochlorococcus* a été examinée par le biais de la cytométrie en flux. Quatre types d'expériences ont été menées incluant: i) la comparaison entre deux cycles lumière:obscurité avec pour l'un la lumière fixée constante à $25 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ et l'autre présentant un régime dynamique entre 8 et $45 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pendant la photopériode, ii) l'effet de l'avance et du retard du début de la période claire sur des populations acclimatées à un rythme jour:nuit, iii) l'effet sur des populations entraînées par le rythme jour:nuit de l'obscurité ou de conditions de lumières continue, iv) l'effet de changements dans le niveau d'intensité lumineuse. Pour toutes les situations, le cycle cellulaire et les paramètres cytométriques ont été examinés sur de courtes échelles de temps (30 à 60 minutes) pendant au moins un cycle journalier. Exposé à un régime dynamique de lumière et d'obscurité, les cellules de *Prochlorococcus* PCC 9511 comparativement à celles de SS 120 semblent mieux synchronisées que par le cycle classique de lumière et d'obscurité au regard de la durée des phases S et G2 et du temps de génération plus courts. De plus, l'ampleur des oscillations du RALS et de la

fluorescence de la chlorophylle est plus grande. Tous les autres expériences ont été effectuées avec les souches adaptées aux fortes lumière (c'est à dire soit MED 4 soit PCC 9511). Les expériences examinant l'effet de l'avance ou du retard de l'allumage des néons ont révélé un comportement similaire (c'est à dire l'avance ou le retard) de l'initiation de la réplication et de la division cellulaire, suggérant fortement que ce signal est primordial dans la synchronisation du cycle cellulaire. Lors du passage d'un rythme jour-nuit à des conditions de lumière constante, *Prochlorococcus* continue à « cycler » suggérant la possibilité d'un contrôle endogène du cycle cellulaire (c'est à dire une horloge circadienne). L'obscurité entraîne un arrêt des cellules en phase G1 et semble t-il en S. Finalement, le transfert des cellules d'un niveau d'intensité lumineuse faible à élevée se traduit par un passage très rapide des cellules de G1 à S et par un accroissement de la proportion des cellules dans les phases actives S et G2 du cycle cellulaire et par l'élévation du taux de croissance. Inversement, le passage des cellules à des conditions de lumière limitante se traduit par une diminution importante de la proportion des cellules en S et G2 et du taux de croissance suggérant donc un couplage étroit entre niveau d'irradiance et cycle cellulaire. Cette étude synoptique des mécanismes de la synchronisation du cycle cellulaire de *Prochlorococcus* devrait aider à une meilleure interprétation des variations journalières et des différents comportements observés pour les populations naturelles en réponse à des régimes de lumière variés.

IV.3.2 Publication en anglais.

- CHAPITRE V -

**DYNAMIQUE des POPULATIONS
PICOPLANCTONIQUES dans les
EAUX CÔTIÈRES de la MER
MEDITERRANÉE NORD-
OCCIDENTALE**

- CHAPITRE V -

DYNAMIQUE DES POPULATIONS PICOPLANCTONIQUES DANS LES EAUX CÔTIÈRES DE LA MER MÉDITERRANÉE NORD-OCCIDENTALE (RADE DE VILLEFRANCHE-SUR-MER)

“Knowledge about environmental and ecological controls on growth rates of Synechococcus and Prochlorococcus is ultimately central to developing a robust and quantitative understanding of pelagic food webs in which picoplankton cells are a major currency of particulate organic production, nutrient utilisation and trophic transfer” (Furnas & Crosbie 1999).

V.1 Introduction.

La dynamique des populations planctoniques est contrainte par un grand nombre de facteurs environnementaux (voir introduction générale). Comme nous l’avons montré précédemment, le signal forçant le plus évident pour la plupart des organismes vivants de la biosphère est la succession incessante du jour et de la nuit. Pour autant, son influence sur les populations picoplanctoniques naturelles a été peu étudiée. Dans les environnements pauvres en éléments nutritifs, qui constituent la grande majorité des systèmes océaniques, la variabilité journalière est très prononcée et elle est beaucoup plus importante que celle observée à l’échelle de la semaine, du mois ou de l’année (Campbell et al. 1997). Ainsi, les populations microbiennes sont fortement synchronisées au cycle jour-nuit, c’est à dire que certaines fonctions physiologiques se déroulent à des moments précis de la journée. La première étude majeure, publiée dans la revue *Science*, révélant ces processus et leur complexité a été réalisée par Vaulot et al. (1995). Ces auteurs ont montré que la division cellulaire de *Prochlorococcus*, dans le Pacifique équatorial, ne dure que quelques heures, juste avant le coucher du soleil. Ils ont également montré que le moment (en anglais « timing ») de certains événements (début de la synthèse de l’ADN, division des cellules) varie en fonction de la profondeur, c’est à dire en fonction de l’éclairement reçue par les cellules. De nombreuses questions restent cependant en suspens. Dans les eaux de surface, la forte intensité lumineuse, l’action des ultraviolets, l’influence de la couverture nuageuse sont des variables enregistrées par les cellules, mais de quelle façon? Toutes les populations picoplanctoniques

présentent-elles un comportement similaire à celui de *Prochlorococcus*? Comment le taux de croissance est-il influencé par le degré d'éclairement (la couverture nuageuse)? Comment les brouteurs répondent-ils aux taux de croissance de leurs proies?

Dans le cadre du programme européen MEDEA dévoué à l'étude de la dynamique des écosystèmes microbiens, une thématique importante consistait à étudier et à mieux comprendre la signification des cycles journaliers enregistrés pour les populations naturelles. Au cours du premier atelier de travail de ce programme (juillet 1996), nous nous sommes intéressés à l'étude de la dynamique des populations picoplanctoniques dans la rade de Villefranche-sur-mer (Méditerranée Nord-Occidentale). Pour accéder à la variabilité journalière, l'effort d'échantillonnage a consisté à prélever les eaux de surface pendant 8 jours avec un pas de temps de 30 minutes. Il a été possible d'accéder à l'analyse du cycle cellulaire de *Synechococcus* après marquage de l'ADN des cellules par le colorant SYBR Green I. Le suivi de la distribution de l'ADN des cellules au cours du temps par cytométrie en flux a permis d'observer la très bonne synchronisation de la réplication et de la division de la cyanobactérie marine, et surtout la forte variation du taux de croissance d'un jour à l'autre. La dynamique des communautés eucaryotes et des bactéries hétérotrophes a également été suivie. Les résultats obtenus ont donné matière à la publication parue dans la revue *Limnology and Oceanography* présentée ci-dessous.

V.2 Article 5 : Picoplankton population dynamics in coastal waters of the NW Mediterranean Sea (*Limnology and Oceanography*, 1998, 43:1916-1931).

V.2.1 Résumé en français de l'article.

Un échantillonnage haute fréquence des populations picoplanctoniques de surface a été réalisé en rade de Villefranche-sur-mer (Méditerranée nord-occidentale) pendant la première semaine du mois de juillet 1996. L'évolution de l'abondance et des paramètres cellulaires a été suivie une fois par heure par cytométrie en flux pour chacune de ces populations: la cyanobactérie *Synechococcus*, les picoeucaryotes photosynthétiques et les bactéries hétérotrophes plus *Prochlorococcus*. Certains paramètres sont caractérisés par une périodicité de 24 heures très nette telle que la diffusion aux grands angles des cellules de *Synechococcus* et des picoeucaryotes ou la fluorescence de la chlorophylle des picoeucaryotes. Pour d'autres paramètres, tels que la fluorescence pigmentaire de *Synechococcus*, seule une analyse de Fourier a permis d'établir sans ambiguïté la périodicité journalière. L'analyse de Fourier a révélé pour d'autres paramètres tels que l'abondance, la diffusion aux grands angles et la fluorescence de la chlorophylle des picoeucaryotes, ou la fluorescence

pigmentaire (chlorophylle et phycoérythrine) de *Synechococcus*, l'existence d'une période de 17-18 heures, correspondant à la fréquence inertielle à cette latitude. Le cycle de division cellulaire de *Synechococcus*, échantillonné deux fois par heure, est fortement synchronisé par le cycle jour-nuit, permettant d'estimer finement le taux de croissance de cette population, soit en moyenne $0,95 \pm 0,16 \text{ j}^{-1}$ ($n=7$). La forte variabilité journalière enregistrée pour le taux de croissance s'explique par les variations de la durée des phases du cycle cellulaire et notamment l'intervalle entre les maxima des deux phases, soit de 2 à 3,5 heures. D'une manière générale, le taux de croissance décroît les jours les plus ensoleillés. Le taux de disparition de *Synechococcus* est plus faible que le taux de croissance et il suit l'évolution du taux de division avec un jour de retard, comme si les brouteurs s'adaptaient très rapidement aux changements du taux de croissance de leur proie. Au cours de cette étude, nous avons également trouvé une corrélation entre l'abondance de *Synechococcus* et celle des bactéries hétérotrophes ($r^2=0,60$, $p<0,01$, $n=340$) suggérant l'existence d'un facteur de contrôle commun aux deux communautés, tel que le phosphore ou le broutage.

V.2.2 Publication en anglais.

Jacquet S., Lennon J.-F., Marie D. and Vaultot, D. 1998 . Picoplankton population dynamics in coastal waters of the NW Mediterranean Sea. *Limnology and Oceanography*. 43: 1916-1931

- CHAPITRE VI-

**DYNAMIQUE des POPULATIONS
PICOPLANCTONIQUES en MER
d'ALBORAN
(MÉDITERRANÉE
OCCIDENTALE)**

- CHAPITRE VI -

DYNAMIQUE DES POPULATIONS PICOPLANCTONIQUES EN MER D'ALBORAN (MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE)

« Il convient d'optimiser l'effort d'échantillonnage en sachant que le temps permet l'expression des potentialités biologiques tandis que l'espace joue le rôle de séparateur » (Binet 1997).

VI.1 Introduction.

La mer Méditerranée, bien que ne constituant que 0,8% de la surface océanique mondiale (Antoine et al. 1995), se comporte comme un modèle réduit de l'océan global (Margalef 1984) dans le sens où toutes les situations trophiques peuvent y être rencontrées, avec des parties centrales oligotrophes à ultraoligotrophes (Berland et al. 1980, Dugdale & Wilkerson 1988). Une biomasse et une production plus élevées existent localement, suivant la saison, à la côte et au nord du bassin occidental par exemple où des conditions favorables de « bloom » peuvent apparaître (Estrada et al. 1984, Azov 1986). La mer Méditerranée présente toutefois des caractères uniques tels que son rapport N/P élevé (Berland et al. 1980) ou l'existence d'espèces endémiques. Ainsi, la mer Méditerranée présente un intérêt évident pour l'étude de la dynamique des populations picoplanctoniques naturelles et l'élaboration de concepts sur la variabilité à petite échelle.

L'hétérogénéité des paramètres océanographiques (température, salinité) et biologiques (composition spécifique, biomasse, productions primaire et secondaire) de la mer Méditerranée est parfaitement illustrée sur l'échelle spatiale réduite qui caractérise la mer d'Alboran. Celle-ci est le premier bassin de la Méditerranée Occidentale, délimité par le détroit de Gibraltar à l'ouest, le bassin des Baléares à l'est, l'Espagne au nord et les côtes algériennes au sud (Fig. VI.1). Dénommé le couloir de la Méditerranée, elle est caractérisée par un fort hydrodynamisme car c'est ici que se rencontrent et interagissent l'océan Atlantique et la mer Méditerranée. Brièvement, les eaux atlantiques enrichies en sels nutritifs entrent dans la mer d'Alboran par le détroit de Gibraltar en surface. Inversement, les eaux méditerranéennes sortent vers l'Atlantique en profondeur. La rencontre de ces masses d'eau de propriétés différentes entraîne la création d'une structure frontale géostrophique (localisée entre Oran, Algérie et Almería, Espagne) et la mise en place de structures tourbillonnaires présentant un caractère dynamique. Il résulte de cette hydrodynamisme une

élévation de la production primaire qui est ici en moyenne plus élevée que partout ailleurs en Méditerranée (Tableau VI.1).

Tableau VI.1 Biomasse et production primaire annuelles moyennes en mer d'Alboran et dans les bassins occidental, oriental et méditerranéen tout entier (d'après Antoine et al. 1995).

Province	Biomasse [Chl] mg.m ⁻³	Production gC.m ⁻² .an ⁻¹	Production 10 ¹² gC. an ⁻¹
Mer d'Alboran	0,5	200	11
Bassin occidental	0,35	158	128
Bassin oriental	0,18	109	180
Mer Méditerranée	0,23	125	308



Figure VI.1 Photographie aérienne du détroit de Gibraltar séparant l'océan Atlantique de la mer d'Alboran (extrait de Tom Garison. 1995. Oceanography: an introduction to marine science, Wadsworth Publishing Company, 567 p.).

VI.2 Structures frontale et tourbillonnaire: rappels.

Les courants océaniques dépendent de l'influence du vent, de la température, des différences de densité entre les couches d'eau, de l'effet de Coriolis, de la gravité, des forces de friction. Sous l'influence de ces paramètres et de la forme des bassins, les grands courants de surface (ou « jets ») se déplacent, sont déviés et se referment sur eux même. Une illustration simple est donnée par la

circulation océanique de l'Atlantique Nord. Le Gulf Stream naît dans la mer des Sargasses et traverse l'Atlantique d'ouest en est. Le jet de surface se déforme au contact des eaux adjacentes présentant des caractéristiques physiques (essentiellement température et salinité) différentes. Ces zones de contact, caractérisées par un fort gradient horizontal, sont appelées des fronts. La résultante de ces contacts peut être la création de structures particulières qui sont des coudes ou méandres puis éventuellement le piégeage d'une masse d'eau au sein de ce que l'on appelle un tourbillon. Quand le courant principal est chaud par rapport aux eaux adjacentes, le tourbillon qui se forme est dit chaud et tourne dans le sens des aiguilles d'une montre (Fig. VI.2). Cette situation est exactement celle que nous avons rencontrée en mer d'Alboran en hiver: le jet correspondant aux eaux atlantiques légères (chaudes et peu salées) qui entrent en surface par le détroit de Gibraltar, le front entre Almería et Oran correspondant à la rencontre avec les eaux denses méditerranéennes (froides et salées) (Fig. VI.3).

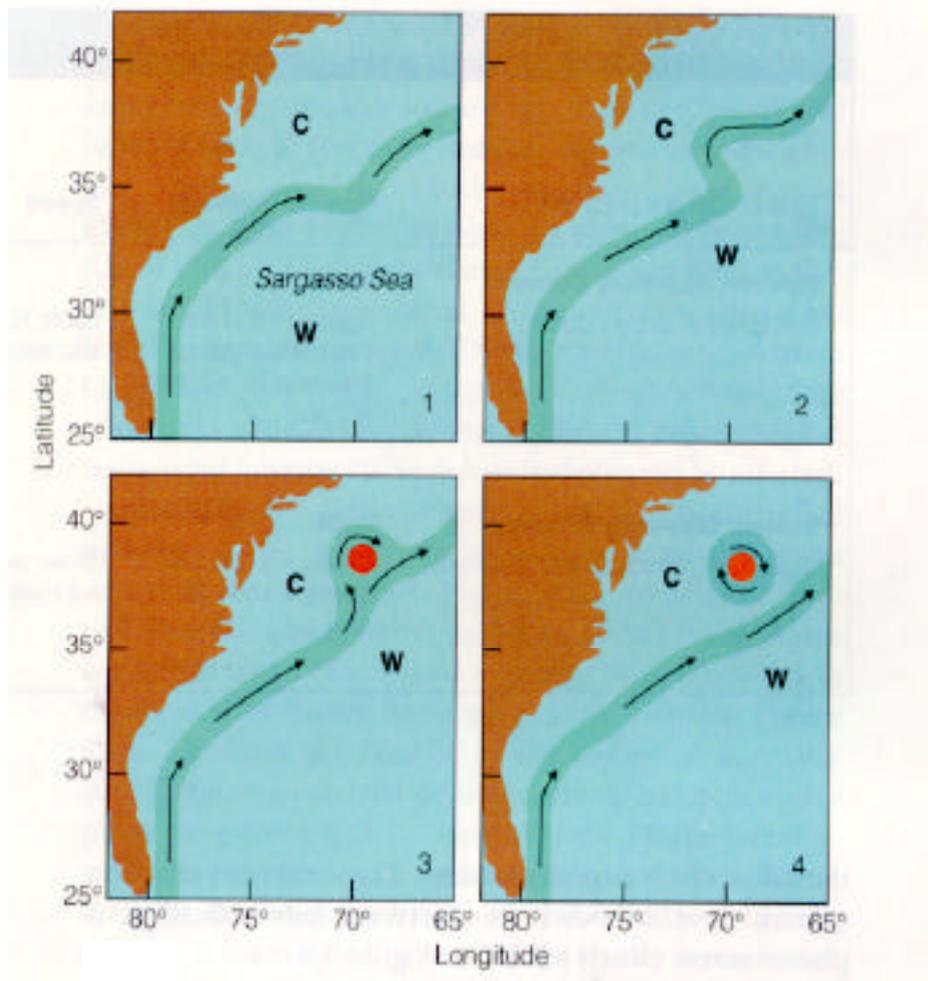


Figure VI.2 Schémas représentant la mise en place d'une structure tourbillonnaire chaude à partir de l'effondrement d'un méandre créé par la rencontre des eaux atlantiques avec le jet du « Gulf Stream » (extrait de Tom Garison. 1995. *Oceanography: an introduction to marine science*, Wadsworth Publishing Company, 567 p.).

VI.3 Objectifs de la campagne en mer Almofront-2.

La campagne en mer Almofront-2 s'est déroulée à bord du navire océanographique français l'Atalante du 22 novembre 1997 au 18 Janvier 1998. Son objectif était i) de définir les processus physiques, chimiques et biologiques liés à la rencontre ou à la juxtaposition de deux masses d'eau superficielles, et d'évaluer les effets de ces processus, ii) d'établir le bilan des sources et des puits de diverses formes d'énergie et de matière (biomasse incluse) de ces singularités locales ou régionales, iii) de confronter ce bilan à celui, plus global, d'une mer (la Méditerranée par exemple) ou d'un océan (Atlantique par exemple). Cette mission localisée en mer d'Alboran a donc documenté en détail la structure interne et les circulations secondaires du système jet-front géostrophique et tourbillonnaire de cette zone afin de comprendre les origines d'une biomasse et d'une production plus élevée dans ce système qu'ailleurs en Méditerranée.

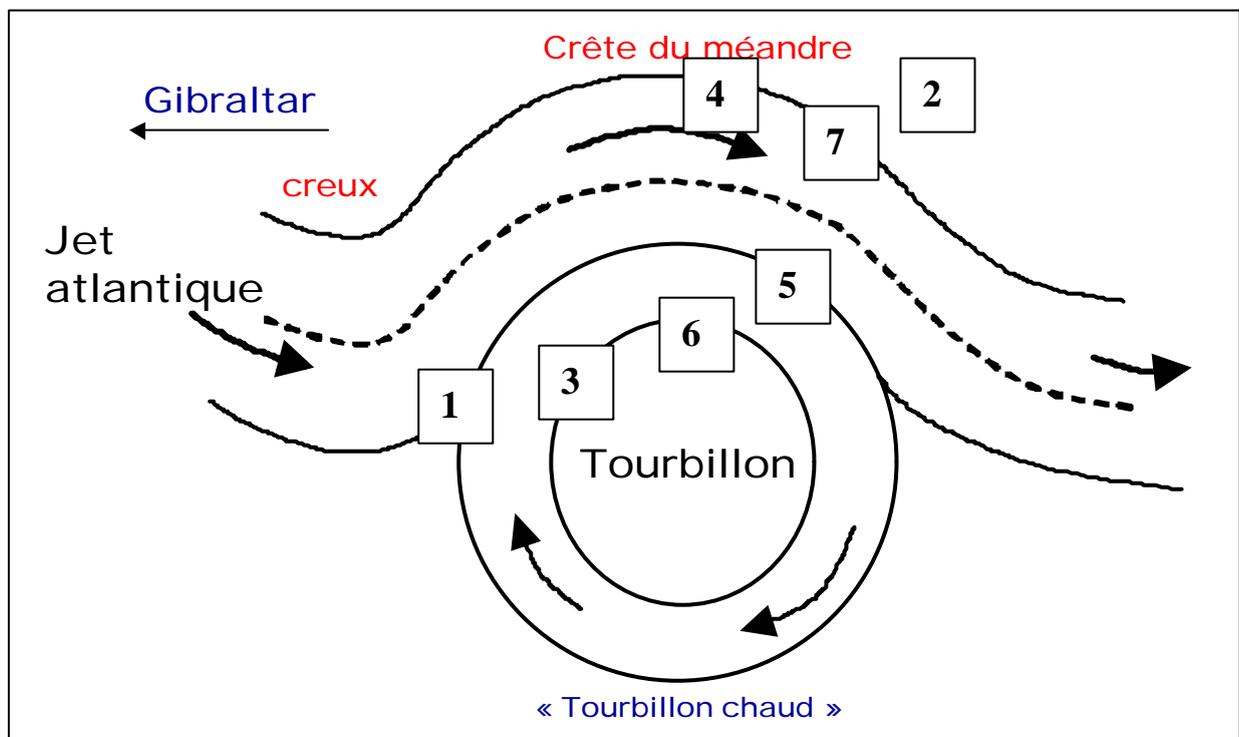


Figure VI.3 Schéma symbolisant la structure jet-front géostrophique et le tourbillon de la mer d'Alboran ainsi que les sites échantillonnés pendant le leg 2 de la mission en mer Almofront-2.

VI.4 Contribution de l'équipe de Roscoff.

Mon travail a consisté à décrire la structure et le fonctionnement du compartiment picoplanctonique de la mer d'Alboran. Nous avons tenté de déterminer, pour chaque partie du système frontal et de ses zones adjacentes, l'importance en terme de biomasse des populations de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et de la communauté picoeucaryotique mais également celle des communautés de bactéries hétérotrophes et virales. La campagne en mer Almofront-2 a été divisée

en deux parties : la première a étudié la structure dynamique du jet contournant le tourbillon à l'est de la mer d'Alboran, la seconde a concerné le fonctionnement de l'écosystème dans les différentes parties de la structure dynamique rencontrée. Ma participation a permis la réalisation de deux publications (en préparation pour les revues *Journal of Geophysical Research* et *Limnology and Oceanography*). L'une d'elle est présentée ci-après et correspond aux données obtenues exclusivement au cours du second leg. Elle analyse la dynamique des populations picoplanctoniques de surface.

VI.5 Article 6 : Picoplankton populations dynamics in surface waters of the Alboran Sea (W Mediterranean Sea) in winter (en préparation pour soumission à *Limnology and Oceanography*).

VI.5.1 Résumé de l'article en français.

En mer d'Alboran, en hiver, les populations picoplanctoniques (c'est à dire *Prochlorococcus*, *Synechococcus*, les picoeucaryotes et les bactéries hétérotrophes) se distribuent différemment en réponse à la pression de l'environnement (voir Jacquet et al. en préparation pour *Journal of Geophysical Research*). En résumé, nous avons trouvé que la biomasse de *Prochlorococcus* est en général faible (variant entre 0.5 et 15.5 $\mu\text{gC.cm}^{-2}$). Les concentrations les plus élevées ont été enregistrées dans les eaux typiquement méditerranéennes et celles influencées par le front entre Alméria et Oran. Les concentrations les plus élevées de *Synechococcus* ont été enregistrées dans les eaux atlantiques modifiées, surtout dans le tourbillon anticyclonique à l'est de la mer d'Alboran, avec 65 $\mu\text{gC.cm}^{-2}$. *Synechococcus* et *Prochlorococcus* étaient sensibles à l'exportation en profondeur dans la zone frontale. Les picoeucaryotes étaient faiblement représentés dans les eaux méditerranéennes par contraste avec les eaux atlantiques. Leur abondance était corrélée avec celle des bactéries hétérotrophes et la concentration maximale pour les deux communautés a été enregistrée dans les eaux tourbillonnaires avec respectivement 300 et 200 $\mu\text{gC.cm}^{-2}$. Ici, nous nous sommes intéressés à la distribution et à la dynamique des populations picoplanctoniques en surface. Un échantillonnage à haute fréquence (toutes les 30 min) a été réalisé pendant 17 jours au moyen d'un dispositif automatisé de prélèvement d'échantillons. Les paramètres cellulaires, c'est à dire le FALS, le RALS, la fluorescence de la phycoérythrine [PE] et de la chlorophylle [Chl], mesurés par cytométrie en flux, ont révélé une périodicité marquée de 24 h suggérant un couplage étroit avec le cycle journalier en dépit des fortes variations hydrographiques. La croissance de *Synechococcus* et des picoeucaryotes démarrait au lever du jour et s'arrêtait au crépuscule. Par contre, l'augmentation du RALS pour *Prochlorococcus* ne commençait que quelques heures après l'aube suggérant des

processus de croissance plus complexes chez le procaryote. Parallèlement, la fluorescence de la chlorophylle de *Prochlorococcus* baissait pendant les premières du jour suggérant un phénomène de "quenching" des cellules. Ce phénomène était fort probable chez *Synechococcus* mais pas chez les picoeucaryotes. Une analyse de Fourier a permis de montrer sans ambiguïté la périodicité circadienne des différents paramètres cellulaires et de l'abondance des cryptophytes (qui semble se diviser de nuit) mais pas pour celle des autres populations picoplanctoniques. La division des cellules, déduite à partir de la valeur maximale du RALS, a été enregistrée au crépuscule pour *Synechococcus* et pour les picoeucaryotes alors que *Prochlorococcus* se divisait pendant les premières heures de la nuit. Ces résultats et l'absence de variations importantes dans les variations journalières des paramètres en dépit de forts gradients (de température et de salinité) suggèrent que i) les cellules présentent une activité physiologique quasi optimale, ii) des conditions plus extrêmes (comme les conditions oligotrophes de la Méditerranée orientale ou celles du Pacifique central nord) sont requises pour enregistrer une activité amoindrie des cellules.

VI.5.2 Publication en anglais.

- CHAPITRE VII-

**CONCLUSIONS GÉNÉRALES et
PERSPECTIVES**

- CHAPITRE VII -

CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

“The surface of the sea is so complex that only a poet can describe it.” (Anonyme, dans: Western Mediterranean, 1984, Margalef ed., Pergamon press).

VII.1 Conclusions générales.

Avant même la découverte de *Prochlorococcus* par Chisholm et al. (1988), le picoplancton était déjà reconnu, avec *Synechococcus* et la communauté picoeucaryotique, comme une composante importante des écosystèmes marins (Li et al. 1983, Fogg 1986, Gieskes & Kraay 1986, Li & Platt 1987). Tout naturellement, la dernière décennie a vu un nombre croissant d'études portant sur la physiologie et l'écologie de ces organismes pour tenter de mieux comprendre leur comportement et leur implication au sein de la boucle microbienne (par exemple Hagström et al. 1988, Burkill et al. 1993). Jusqu'à très récemment, la majorité des études consacrées au picoplancton a porté soit sur l'estimation de sa biomasse soit sur sa caractérisation taxonomique. Par contre, la dynamique de ces populations et les facteurs qui les contrôlent restent encore mal connus. Dans ce contexte, nous avons voulu contribuer à une meilleure compréhension de la dynamique de croissance de ces populations, plus particulièrement en réponse à l'action de la lumière et du rythme d'alternance jour-nuit. Faisant suite à l'étude de Vaultot et al. (1995) ayant révélé l'extrême synchronie du cycle de division cellulaire de *Prochlorococcus* au rythme jour-nuit, nous avons tenté de répondre à quelques questions soulevées par cette étude comme celles de savoir i) quel signal était responsable d'une telle synchronisation? ii) si le taux de croissance des populations pouvait varier de manière significative d'un jour à l'autre?

Pour répondre à ces questions, il a été crucial d'obtenir des données à haute fréquence d'acquisition et nous avons donc développé des appareils automatisés de prélèvements d'échantillons (Chapitre 2). Le prototype utilisé en mer d'Alboran (campagne Almofront2) et au cours de l'atelier de travail dans la rade de Villefranche-sur-mer a montré qu'il présentait de multiples avantages. En premier lieu, il est petit et compact, ce qui le rend particulièrement

commode à transporter et à installer sur un navire océanographique. Deuxièmement, son utilisation et sa réparation sont simples, encore un avantage lorsque l'on est sur "le terrain". Troisièmement, le langage de programmation (BASIC), est d'utilisation et de compréhension faciles. Finalement, son indépendance le rend complémentaire des méthodes d'échantillonnage classiques et il est possible de prélever à n'importe quel intervalle de temps. La stratégie de préservation choisie (la conservation des échantillons à 4°C) est très efficace et n'induit pas de changement significatif des paramètres cellulaires (sur un laps de temps n'excédant pas 10 heures), évitant la présence continue d'un opérateur auprès de l'instrument. Un certain nombre d'améliorations techniques et pratiques peuvent être envisagées (voir § VII.2.1).

En employant cette méthode d'échantillonnage (Chapitre 2), l'analyse de la dynamique des populations de *Synechococcus* dans les eaux de surface de la rade de Villefranche-sur-mer (Chapitre 5) nous a permis d'observer une synchronisation très marquée du cycle cellulaire de ce procaryote par le rythme jour-nuit bien qu'à un degré moindre de celle rapportée pour *Prochlorococcus* dans le Pacifique équatorial (Vaulot et al. 1995) ou en mer d'Arabie (Shalapyonok et al. 1998). En effet, on observait toujours une proportion non négligeable de cellules en phase G1 ou G2 au cours d'un cycle journalier. Ce résultat, que nous avons confirmé à partir d'expériences au laboratoire (Jacquet et al. en préparation, Chapitre 3), apparaît comme une caractéristique propre à *Synechococcus* pour qui l'obscurité semble provoquer un arrêt partiel ou complet du processus de division (Armbrust et al. 1989, Binder & Chisholm 1995). Un résultat important révélé par l'étude de la dynamique de *Synechococcus* dans les eaux côtières de la Méditerranée Nord occidentale a été la variation marquée du taux de croissance d'un jour à l'autre. Cette variation est sans doute liée au degré d'éclairement perçu par les cellules, c'est à dire à l'influence de la couverture nuageuse locale. Les cellules et leur taux de croissance répondent donc rapidement aux fluctuations de leur environnement. Un certain nombre de facteurs a conditionné la possibilité d'utiliser cette méthode, dans le cas des populations à Villefranche-sur-mer (alors que l'analyse du cycle cellulaire n'a pas été possible en mer d'Alboran, Chapitre 6): une population de *Synechococcus* homogène, un nombre suffisant de cellules, la possibilité de marquage de l'ADN des cellules par le colorant SYBR-I. S'il n'y a pas de difficulté majeure pour marquer les cellules de *Prochlorococcus*, l'accès des marqueurs à l'ADN de certaines souches de *Synechococcus* et de certaines espèces picoeucaryotes reste encore difficile, voire impossible (Chapitre 3). Pour ces groupes, il sera nécessaire de mettre au point des protocoles de marquage (voir § VII.2.3).

Bien que l'analyse du cycle cellulaire des populations picoplanctoniques en mer d'Alboran ait été impossible, les données obtenues lors de cette campagne ont permis de démontrer l'importance de l'alternance jour-nuit sur la synchronisation des cellules dans le cas d'un milieu très hétérogène

(Chapitre 6). Jusqu'alors, les rythmes journaliers observés dans le milieu naturel pour les abondances et/ou les paramètres cellulaires l'avaient été essentiellement dans des eaux homogènes peu ou pas influencées par le mélange hivernal. Ces résultats et l'absence de fortes variations des paramètres cellulaires en dépit de forts gradients (température, salinité), suggèrent une activité physiologique quasi optimale. Des conditions beaucoup plus extrêmes (milieux oligotrophes de la Méditerranée orientale ou du Pacifique) sont nécessaires pour que l'activité physiologique des cellules soit réduite.

La comparaison des réponses physiologiques de différentes souches picoplanctoniques vis à vis d'un rythme d'entraînement lumière-obscurité et l'étude détaillée de la régulation du cycle cellulaire de *Prochlorococcus* par la lumière ont révélé la complexité du phénomène de synchronisation (Chapitres 3 & 4). La phase et l'amplitude des différents paramètres mesurés (nombre de cellules, taille, contenu en chlorophylle, cycle cellulaire) peuvent varier considérablement d'une population à l'autre, mais aussi entre le haut et le bas de la couche euphotique, d'un jour à l'autre (Vaulot et al. 1995, Jacquet et al. 1998b, Jacquet et al. en préparation, Vaulot & Marie 1999). Ces résultats sont importants pour l'interprétation des propriétés optiques globales de l'océan. Les expériences en laboratoire ont ainsi montré que le début de la période éclairée est probablement le signal de synchronisation le plus important, ce qui confirme les résultats acquis sur le terrain (Jacquet et al. 1998b, Vaulot & Marie 1999, Jacquet et al. en préparation). De plus, nous avons obtenu quelques données suggérant un possible contrôle de la synchronisation par une horloge circadienne. Si l'existence d'une telle horloge a été démontrée récemment chez *Synechococcus*, pour *Prochlorococcus*, seule l'étude de Pichard et al. (1996) a montré que l'expression du gène *rbcL* (codant pour la ribulose biphosphate carboxylase) présente un rythme circadien persistant en conditions de lumière constante après entraînement par un cycle jour-nuit. Finalement, dans les processus d'entraînement par le cycle de lumière et d'obscurité, *Prochlorococcus* apparaît, comme *Synechococcus* (Armbrust et al. 1989, Binder & Chisholm 1995), être sensible à la durée d'exposition à la lumière ou à une certaine quantité d'énergie, révélant l'existence de points de contrôle dans son cycle cellulaire. Nous avons montré que le manque de lumière provoquait un arrêt des cellules dans la phase G1 du cycle cellulaire. Il semble néanmoins que certaines cellules soient encore capables de transiter au travers de la phase S en conditions d'obscurité, phénomène rare. En 1996, Parpais et al. ont montré que la croissance de *Prochlorococcus* peut s'arrêter dans n'importe quelle partie du cycle cellulaire (G1, G2 ou S) en réponse à la carence des cellules en phosphore, suggérant également que les contrôles du cycle cellulaire ne sont pas très stricts chez le procaryote (les cellules n'étant pas empêchées d'entrer dans la phase critique de duplication du chromosome en l'absence de phosphore).

L'ensemble des résultats obtenus et présentés dans cette thèse a permis de révéler la complexité des mécanismes de synchronisation à l'échelle de la cellule picoplanctonique. Pour comprendre beaucoup plus finement ces processus, l'influence des facteurs environnementaux, les raisons de la variabilité enregistrée entre organismes, le rôle de l'horloge endogène, il reste à répondre à un certain nombre de questions constituant des perspectives d'étude (voir § VII.2.4,5).

VII.2 Perspectives.

VII.2.1 Le prélèvement des échantillons.

L'échantillonnage haute fréquence est aujourd'hui une réalité pour étudier la dynamique des populations planctoniques sans risquer de perdre des informations importantes sur des échelles de temps et d'espace variées. Nous avons apporté une solution originale et de coût modique à cette question de l'échantillonnage. Toutefois, nos appareils, particulièrement ceux "adaptés" au travail sur le terrain, ont clairement montré leur limite du point de vue mécanique. Typiquement, le collecteur de fraction est constitué par un disque de Plexiglas percé pour y insérer la ou les rangées de tubes à prélèvement (Chapitre 2) et c'est l'action d'un ou plusieurs moteurs (pas à pas par exemple) dont l'axe de rotation presse sur le rebord du disque qui permet de le faire tourner. Ne s'agissant pas d'une mécanique de haute précision, il est arrivé que la rotation soit difficile, en particulier en fin de campagne. Des améliorations techniques sont tout à fait envisageables, à commencer par la confection même du plateau (disque parfaitement rond) et la qualité des moteurs employés (ne rouillant et ne grippant pas). Un autre exemple concerne le refroidissement de la cuve où sont préservés les échantillons. On pourrait imaginer ici un système n'utilisant pas les éléments Pelletier afin d'obtenir un contrôle plus précis de la température (Chapitre 2). Un système de refroidissement au moyen d'un bain circulant d'eau froide externe au dispositif principal parfaitement régulé et qui alimenterait la cuve (à la manière du système utilisé pour le prototype adapté au travail au laboratoire) serait une solution idéale mais sûrement difficile à mettre en œuvre. Ces quelques améliorations techniques pourraient être accompagnées d'améliorations pratiques. D'autres fonctions pourraient être associés à l'appareil comme celles de pouvoir mesurer au moment de chaque prélèvement des paramètres comme la position du navire (couplage avec un GPS), la température, la salinité. Pour ces deux derniers, on peut très bien imaginer que des capteurs de mesure de fréquence préalablement calibrée soient intégrés dans les tuyaux de prélèvement ou à leur sortie. Le système SCALP (Système de Conception Assisté par un Langage Populaire) qui assure le contrôle électronique de l'appareil a comme caractéristique de fonctionner en mode lecture

mais également en mode écriture si bien que l'enregistrement des paramètres dans une base de données (avec le numéro d'échantillons, le volume prélevé, la position du navire, ...) serait donc possible. L'exemple de la mesure de la température et la salinité n'est pas forcément le plus intéressant dans le contexte d'une campagne en mer où les appareils du bord réalisent déjà ces mesures de manière très fine. Par contre, il le devient dans le cas d'études ne faisant pas intervenir de moyens lourds, comme cela peut être le cas au cours d'ateliers de travail à la côte (l'enregistrement de l'évolution des masses d'eau pouvant être particulièrement important pour expliquer des variations dans la dynamique des populations).

VII.2.2 Discrimination des populations.

Pour accéder à la diversité des communautés picoplanctoniques, la cytométrie en flux utilisée seule montre clairement ses limites pour la discrimination des populations procaryotes et eucaryotes, autotrophes et hétérotrophes. La biologie moléculaire, avec l'utilisation de sondes nucléotidiques fluorescentes permettant la reconnaissance de groupes voire de taxons (par exemple avec la méthode d'hybridation fluorescente *in situ*), apporte une solution. Son couplage avec la cytométrie en flux serait particulièrement intéressant pour i) étudier la distribution et l'importance relative des différents groupes du picophytoplancton, ii) obtenir la dynamique de chacun de ces groupes (Fuchs et al. 1998, Simon et al. sous presse). L'utilisation d'anticorps ciblant des protéines spécifiques de la surface des cellules peut constituer un autre moyen de discriminer les différents groupes (Campbell & Iturriaga 1988, Campbell et al. 1994b). Là encore, un couplage avec la cytométrie en flux permettrait la détection rapide de certains organismes par immunofluorescence. Pour les bactéries hétérotrophes, il est important de comprendre, par exemple, quels sont les taxons qui participent majoritairement à la dégradation de la matière organique (Pinhassi et al. 1999), quels sont ceux qui sont véritablement actifs au sein des communautés (Gasol et al. 1999). Les mêmes questions se posent pour la communauté picoeucaryotique pour déterminer par exemple quelles espèces sont majoritairement responsables de la production primaire (océanique et côtière) et quel est leur taux de croissance.

VII.2.3 Mesurer l'ADN des cellules picophytoplanctoniques.

Comme nous l'avons montré au cours de cette thèse, l'analyse du cycle cellulaire est particulièrement bien adaptée à l'étude de la dynamique des populations. Toutefois, elle n'est possible aujourd'hui que pour les populations de *Prochlorococcus* et de quelques *Synechococcus*. Au laboratoire, il n'a pas été possible de réaliser un marquage efficace de l'ADN de nombreuses souches de *Synechococcus* et de picoeucaryotes en raison soit d'une mauvaise pénétration du

colorant des acides nucléiques au sein des cellules soit d'une contamination trop importante par les bactéries hétérotrophes. Dans le cas des picoeucaryotes, il devrait être possible au moyen d'un traitement antibiotique d'éliminer la communauté bactérienne des cultures. Dans le cas de *Synechococcus*, cela est beaucoup plus difficile puisqu'elle est elle-même une bactérie. Un traitement au lysozyme (Kim et al. 1999) pourrait être efficace dans le cas de l'axénisation des cultures de *Synechococcus* mais cela reste à démontrer. Mesurer l'ADN et accéder au cycle cellulaire des populations picoeucaryotiques dans le milieu naturel semble être relativement difficile de par le nombre peu élevé de cellules et le mélange de populations qui caractérise cette communauté. Toutefois, comme nous l'avons vu plus haut, il est fort probable que certaines espèces soient typiques des eaux de surface, les autres de la base de la couche euphotique si bien qu'une population assez concentrée et homogène puisse se discriminer clairement des autres. Analyser son cycle cellulaire pour accéder à la mesure de son taux de croissance serait d'un grand intérêt.

VII.2.4 Les questions en suspens concernant la synchronisation.

L'ensemble des résultats acquis au cours de cette thèse a confirmé l'importance du stimulus lumineux et du cycle périodique jour-nuit dans les processus de synchronisation de la croissance des organismes les plus caractéristiques du picoplancton. Un certain nombre de questions reste en suspens pour comprendre dans le détail les mécanismes de synchronisation des cellules.

VII.2.4.1 Qualité de la lumière et perception.

Nos expériences sur la synchronisation ont été réalisées en lumière bleue dans une gamme de longueur d'onde identique à celle rencontrée *in situ* en profondeur. Dans de telles conditions, les taux de croissance sont similaires à ceux obtenus en lumière blanche (Moore et al. 1995, Partensky com. person.). On peut toutefois se poser la question de savoir quelle partie du spectre assure la meilleure synchronisation du cycle cellulaire. En effet, dans la nature (Vaulot et al. 1995, Shalapyonok et al. 1998) comme en culture (Partensky et al. en préparation), les souches adaptées aux fortes intensités lumineuses présentent une synchronisation très marquée. Est-ce uniquement la lumière bleue qui en est responsable sachant que dans les eaux de surface, l'ensemble des longueurs d'onde du spectre visible est encore présent? Quel est l'effet de la lumière rouge dont certains auteurs ont montré l'efficacité dans la synchronisation de cellules phytoplanctoniques (voir Roenenberg & Deng 1997)? Il apparaît fondamental de comprendre comment les cellules s'adaptent aux changements de la composition spectrale de la lumière qui varie au cours de la journée et avec la profondeur. Chez *Gonyaulax*, Roenenberg & Hastings (1988) et Roenenberg & Deng (1997) ont clairement montré l'importance du spectre lumineux sur le programme circadien de l'algue, en

particulier dans le bleu et le rouge. De manière plus fondamentale, comment se fait au niveau moléculaire la perception du signal et sa transduction au sein de la cellule? Les plantes supérieures perçoivent leur environnement lumineux grâce à deux senseurs, un photorécepteur à la lumière bleue et un phytochrome (Millar et al. 1995). Il a été démontré récemment que certaines bactéries photosynthétiques disposent du phytochrome (Hugues et al. 1997, Yeh et al. 1997). Une telle molécule est encore inconnue chez *Prochlorococcus* et reste donc à découvrir.

VII.2.4.2 L'effet du rayonnement ultraviolet

En plus de l'influence de la quantité et de la qualité de la lumière visible sur les mécanismes de synchronisation, un paramètre environnemental susceptible de jouer un rôle déterminant dans ces processus et dans la variabilité enregistrée entre les différentes populations en haut de la couche éclairée est le rayonnement ultraviolet. Mostajir et al. (1999) ont montré que les UV-B provoquent un retard de la division cellulaire des Prymnesiophycées de taille comprise entre 2,7 et 4 μm et une inhibition du taux de photosynthèse, provoquant une augmentation de la taille des cellules. Vaultot et al. (1995) ont suggéré que les UV pouvaient être responsables du retard de la division cellulaire et de la diminution du taux de croissance de *Prochlorococcus* en surface. Bien que n'ayant pas testé directement l'effet d'un rayonnement UV sur la croissance du picoplancton en culture, nous avons toutefois montré que l'application d'un cycle jour-nuit avec un régime de lumière dynamique d'intensité élevée (c'est à dire atteignant des intensités de $1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ simulant celles enregistrées dans les eaux de surface) suffit à provoquer un retard de la réplication de l'ADN et de la division cellulaire chez *Prochlorococcus* (Partensky et al. en préparation). Ce retard semble donc être une conséquence des fortes intensités et non des UV comme suggéré par Vaultot et al. (1995). Néanmoins, les UV ont un effet délétère sur la croissance cellulaire, pouvant entraîner la lyse des cellules (Vincent & Roy 1993, Müller-Niklas & Herndl 1996). Comment et à quel degré les différentes populations picoplanctoniques sont-elles affectées? L'étude de l'action des UV, en plus de renseigner sur la sensibilité des populations, pourrait faciliter la compréhension de leur distribution relative. Joux et al. (1999) ont ainsi montré qu'il existe une grande variation dans la réponse des communautés bactériennes dans les eaux de surface aux UV: ces derniers pourraient influencer non seulement la dynamique mais aussi la structure de la communauté microbienne.

VII.2.4.3 L'horloge biologique circadienne.

Nous avons obtenu pour *Prochlorococcus* quelques données suggérant l'existence d'une horloge circadienne. Pour démontrer véritablement que le cycle de division du procaryote puisse être en effet contrôlé par un oscillateur endogène, il reste à tester dans un premier temps que le

rythme circadien persiste dans une large gamme de température physiologique. Nous pensons que la compensation à la température de la croissance de *Prochlorococcus* devrait être rapidement confirmé dans le sens où les gènes nécessaires à l'horloge circadienne semblent exister chez cet organisme (voir Chapitre 4). La mise en évidence de gènes nécessaires à l'horloge circadienne chez *Prochlorococcus* ouvre un nouveau champ d'exploration. Alors que *Synechococcus* et *Prochlorococcus* possèdent des gènes *kai*, cela ne semble pas être le cas chez la cyanobactérie d'eau douce *Synechocystis* dont le génome a été entièrement séquencé. Quelle en est la raison? N'y a-t-il qu'un seul mécanisme d'horloge chez les cyanobactéries? Pourrait-il y avoir plusieurs oscillateurs comme chez *Gonyaulax* (Roelenberg & Morse 1993)? Qu'en est-il des autres procaryotes à l'exemple des bactéries hétérotrophes qui montrent également des activités périodiques journalières? Ces questions sont particulièrement intéressantes pour expliquer les différences enregistrées dans les modes de régulation du cycle cellulaire de *Prochlorococcus*, de *Synechococcus* et des picoeucaryotes. Comme ces organismes occupent généralement les mêmes niches écologiques (Campbell et al. 1994a, Partensky et al. 1999a) mais présentent des comportements différents (Jacquet et al. en préparation), posséder une horloge biologique différente de celle des autres peut être un avantage compétitif pour séparer les processus biologiques dans le temps (vis à vis des éléments nutritifs notamment) et pour anticiper les changements environnementaux résultant des cycles jour-nuit.

VII.2.5 L'analyse détaillée du cycle cellulaire.

Comprendre au niveau moléculaire comment est régulé le cycle cellulaire du picoplancton est important pour prédire quelles sont les réponses physiologiques des cellules aux changements de l'environnement. Chez *Prochlorococcus*, les gènes *dnaA* et *ftsZ*, respectivement impliqués dans l'initiation de la réplication de l'ADN et de la division des cellules, ont été séquencés chez *Prochlorococcus* (Richter et al. 1998, Holtzendorff et al. en préparation, annexe 6). Il a été possible d'étudier leur régulation pour des populations bien synchronisées par l'alternance lumière-obscurité. Julia Holtzendorff de l'Institut de Biologie et de Génétique de l'Université Humboldt de Berlin a ainsi trouvé que *dnaA* et *ftsZ* sont des gènes faiblement exprimés et surtout que leur maximum d'expression se situe dans la même phase du cycle cellulaire, la phase S (voir annexe 7). Ainsi, il apparaît que ces deux gènes sont co-exprimés et que cela doit se faire avant que la division ne se mette en place. Ces résultats ouvrent des perspectives d'étude comme celle de s'intéresser dans un premier temps de savoir si l'expression de ces gènes est dépendante ou pas de la lumière ou si elle est gouvernée par une horloge biologique. Dans un deuxième temps, on peut penser qu'il faille s'intéresser à d'autres gènes, notamment chez *Prochlorococcus* dont le génome

est presque entièrement séquencé. La question de savoir si tous les gènes du cycle cellulaire sont régulés de la même manière et au même moment apparaît comme crucial pour mieux comprendre le cycle cellulaire de l'organisme photosynthétique le plus abondant de la biosphère.

BIBLIOGRAPHIE

RÉFÉRENCES CITÉES

(exceptées celles des articles)

A

- Abbott, M. R., K. H. Brink, C. R. Brooth, D. Blasco, L. A. Codispoti, P. P. Nüler et S. R. Ramp (1990). Observations of phytoplankton and nutrients from a Lagrangian drifter off northern California. *J. Geophys. Res.* 95:9393-9409.
- Adams, K. J., C. S. Weiler et L. N. Edmunds (1984). Photoperiodic control of cell division in *Euglena* and *Ceratium*. Dans: *Cell Cycle clocks*, L. N. Edmunds (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp 395-429.
- Agawin, N. S. R., C. M. Duarte et S. Agusti (1998). Growth and abundance of *Synechococcus* sp. in a Mediterranean Bay: seasonally and relationship with temperature. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 170:45-53.
- Alberte, R. S., A. M. Wood, T. A. Kursar et R. R. L. Guillard (1984). Novel phycoerythrins in marine *Synechococcus* spp. *Plant. Physiol.* 75:732-739.
- Amann, R. I. (1995). *In situ* identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. *Mol. Microb. Ecol. Manual* 3.3.6: 1-15.
- Amann, R. I., J. Snaird, M. Wagner, W. Ludwig et K. H. Schleifer (1996). *In situ* visualization of high genetic diversity in a natural bacterial community. *J. Bact.* 178:3496-3500.
- Andersen, R. A., G. W. Saunders, M. P. Paskind et J. Sexton (1993). Ultrastructure and 18S rRNA gene sequence for *Pelagomonas calceolata* gen. and sp. nov. and the description of a new algal class, the Pelagophyceae classis nov. *J. Phycol.* 29:701-715.
- Antoine, D., A. Morel et J. M. André (1995). Algal pigment distribution and primary production in the eastern Mediterranean as derived from coastal zone color scanner observations. *J. Geophys. Res.* 100:16193-16209.
- Antoine, D., J. M. André et A. Morel (1996). Oceanic primary production. 2. Estimation at global scale from satellite (CZCS) chlorophyll. *Global Biog. Cyc.* 10:57-69.
- Armbrust, E. V., J. D. Bowen, R. J. Olson et S. W. Chisholm (1989). Effect of light on the cell cycle of a marine *Synechococcus* strain. *Appl. Env. Microbiol.* 55:425-433.
- Azam, F., T. Fenchel, J. G. Field, J. S. Gray, L. A. Meyer-Reil and F. Thingstad (1983). The ecological role of water-column microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10:257-263.

Azov, Y. (1986). Seasonal patterns of phytoplankton productivity and abundance in nearshore oligotrophic waters of the Levant Basin (Mediterranean). *J. Plank. Res.* 8:41-53.

B

Baish, H., H. P. Beck et I. J. Christensen (1982). A comparison of mathematical methods for the analysis of DNA histograms obtained by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet.* 15:235-249.

Beijerinck, M. W. (1889). *Le Photobacterium luminosum*, bactérie lumineuse de la Mer du Nord. *Arch. Neerl. Sci. Exactes Nat. Harlem* 23:401-405.

Bergh, O., K. Y. Borsheim, G. Bratbak et M. Heldal (1989). High abundances of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340:467-468.

Berland, B. R., D. J. Bonin et S. Y. Maestrini (1980). Azote ou Phosphore? Considérations sur le paradoxe nutritionnel de la mer Méditerranée. *Oceanologica Acta* 3:135-142.

Binder, B. J. et S. W. Chisholm (1990). Relationship between DNA cycle and growth rate in *Synechococcus* sp. *J. Bacteriol.* 172:2313-2319.

Binder, B. J. et S. W. Chisholm (1995). Cell cycle regulation in marine *Synechococcus* sp. strains. *Appl. Env. Microbiol.* 61:708-717.

Binder, B. J., S. W. Chisholm, R. J. Olson, S. L. Frankel et A. Z. Worden (1996). Dynamics of picophytoplankton, ultraphytoplankton and bacteria in the central equatorial Pacific. *Deep-Sea Res.* 43:907-931.

Binder, B. J. et Y. C. Liu (1998). Growth rate regulation of rRNA content of a marine *Synechococcus* (cyanobacterium) strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:3346-3351.

Binet 1997

Blanchot, J., J.-M. André, C. Navarette et J. Neveux (1997). Picophytoplankton dynamics in the equatorial Pacific: diel cycling from flow-cytometer observations. *C. R. Acad. Sci.* 320:925-931.

Boucher, N., D. Vaultot et F. Partensky (1991). Flow cytometric determination of phytoplankton DNA in cultures and oceanic populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 71:75-84.

Bratbak, G., M. Heldal, S. Norland et T. F. Thingstad (1990). Viruses as partners in spring bloom microbial trophodynamics. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:1400-1405.

Bratbak, G., J. K. Egge et M. Heldal (1993). Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 93:39-48.

Bratbak, G., T. F. Thingstad et M. Heldal (1994). Viruses and the microbial loop. *Microb. Ecol.* 28:209-221.

- Bratbak, G. et M. Heldal (1995). Viruses: The new players in the game, their ecological role and could they mediate genetic exchange by transduction ? Dans : Molecular ecology of aquatic microbes, I Joint (Ed.), NATO ASI Series vol G38, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 249-264.
- Bratbak, G., M. Heldal, T. F. Thingstad et P. Tuomi (1996). Dynamics of virus abundance in coastal seawater. FEMS Microb. Ecol. 19:263-269.
- Brown, S. L., M. R. Landry, R. T. Barber, L. Campbell, D. L. Garrison et M. M. Gowing (1999). Picophytoplankton dynamics and production in the Arabian Sea during the 1995 southwest monsoon. Deep-Sea Res. 46:1745-1768.
- Brussaard, C. P. D., R. S. kemper, A. J. Kop, R. Riegman et M. Heldal (1996). Virus-like particles in a summer bloom of *Emiliana huxleyi* in the North Sea. Aquat. Microb. Ecol. 10:105-113.
- Brussaard, C. P. D., R. Thyraug, D. Marie et G. Bratbak (1999). Flow cytometric analyses of virus infection in two marine phytoplankton species, *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and *Phaeocystis pouchetti* (Prymnesiophyceae). J. Phycol. 35:941-948.
- Brzezinski, M. A., R. J. Olson et S. W. Chisholm (1990). Silicon availability and cell cycle progression in marine diatoms. Mar. Ecol. Prog. Ser. 67:83-96.
- Buck, K. R., F. P. Chavez et L. Campbell (1996). Basin-wide distributions of living carbon components and the inverted trophic pyramid of the central gyre of the North Atlantic Ocean, summer 1993. Aquat. Microb. Ecol. 10:283-298.
- Burkill, P. H., R. J. G. Leakey, N. J. P. Owens et R. F. C. Mantoura (1993). *Synechococcus* and its importance to the microbial foodweb of the northwestern Indian Ocean. Deep-Sea Res. 40:773-782.
- Bustillos-Guzman, J., H. Claustre et J. C. Marty (1995). Specific phytoplankton signatures and their relationship to hydrographic conditions in the coastal northwestern Mediterranean sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 124:247-258.

C

- Caillaud, C., H. Claustre, F. Vidussi, D. Marie et D. Vaultot (1996). Carbon biomass and gross growth rates as estimated from ^{14}C pigment labeling, during photoacclimation in *Prochlorococcus* CCMP 1378. Mar. Ecol. Prog. Ser. 145:209-221.
- Campbell, L. et E. J. Carpenter (1986a). Diel patterns of cell division in marine *Synechococcus* spp.: use of the frequency of dividing cells technique to measure growth rate. Mar. Ecol. Prog. Ser. 32:139-148.

- Campbell, L. et E. J. Carpenter (1986b). Estimating the grazing pressure of heterotrophic nanoplankton on *Synechococcus* spp. using the seawater dilution and selective inhibitor techniques. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 33:121-129.
- Campbell, L. et R. Iturriaga (1988). Identification of *Synechococcus* spp. in the Sargasso Sea by immunofluorescence and fluorescence excitation spectroscopy performed on individual cells. *Limnol. Oceanogr.* 33:1196-1201.
- Campbell, L. et D. Vaultot (1993). Photosynthetic picoplankton community structure in the subtropical North Pacific Ocean near Hawaiï (Station Aloha). *Deep-Sea Res.* 40:2043-2060.
- Campbell, L., H. A. Nolla et D. Vaultot (1994a). The importance of *Prochlorococcus* to community structure in the central North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* 39:954-961.
- Campbell, L., L. P. Shapiro et E. Haugen (1994b). Immunochemical characterization of eukaryotic ultraplankton from the Atlantic and Pacific oceans. *J. Plank. Res.* 16:35-51.
- Campbell, L., H. Liu, H. A. Nolla et D. Vaultot (1997). Annual variability of phytoplankton and bacteria in the subtropical North Pacific Ocean at station ALOHA during the 1991-1994 ENSO event. *Deep-Sea Res.* 44:167-192.
- Campbell, L., M. R. Landry, J. Constantinou, H. A. Nolla, S. L. Brown, H. Liu et D. A. Caron (1998). Response of microbial community structure to environmental forcing in the Arabian Sea. *Deep-Sea Res.* 45:2301-2325.
- Caron, D. A., E. R. Peele, E. L. Lim et M. R. Dennett (1999). Picoplankton and nanoplankton and their trophing coupling in surface waters of the Sargasso Sea south of Bermuda. *Limnol. Oceanogr.* 44:259-272.
- Carpenter, E. J. et L. Campbell (1988). Diel patterns of cell division and growth rates of *Synechococcus* spp. in Long Island Sound. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 47:179-183.
- Carpenter, E. J. et J. Chang (1988). Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. I. Concept of the method. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 43:105-111.
- Chang, J. et E. J. Carpenter (1988). Species-specific phytoplankton growth rates via diel DNA synthesis cycles. II. DNA quantification and model verification in the dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 44:287-296.
- Chang, J. et E. J. Carpenter (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.
- Chang, J. et H. G. Dam (1993). The influence of grazing on the estimation of phytoplankton growth via cell cycle analysis: modelling and experimental evidence. *Limnol. Oceanogr.* 38:202-212.

- Charpy, L. et J. Blanchot (1999). *Synechococcus* and *Prochlorococcus* dominance estimated by flow cytometry in Tuamotu atoll lagoons. Dans: Marine Cyanobacteria, Charpy, L., et Larkum, A. W. D. (Eds.), Bull. Inst. Océanogr., Monaco, n° spécial 19, pp. 369-375.
- Charpy, L. et J. Blanchot (1998). Photosynthetic picoplankton in French Polynesian atoll lagoons: estimation of taxa contribution to biomass and production by flow cytometry. Mar. Ecol. Prog. Ser. 162:57-70.
- Chavez, F. P. (1989). Size distribution of phytoplankton in the central and eastern tropical Pacific. Global Biogeochem. Cyc. 3:27-35.
- Chen, F., C. A. Suttle et S. M. Short (1996). Genetic diversity in marine algal virus communities as revealed by sequence analysis of DNA polymerase genes. Appl. Environ. Microb. 62:2869-2874.
- Chisholm, S. W. (1981). Temporal patterns of cell division in unicellular algae. In Platt, T. (ed.) Physiological bases of phytoplankton ecology. Can. bull. Fish. Aquat. Sci. 210:150-181.
- Chisholm, S. W., D. Vaultot et R. J. Olson (1984). Cell cycle controls in phytoplankton. Comparative physiology and ecology. Dans: Cell Cycles Clocks, L. N. Edmunds Jr. (Ed.), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 365-394.
- Chisholm, S. W., R. J. Olson, E. R. Zettler, R. Goericke, J. B. Waterbury et N. A. Welschmeyer (1988). A novel free-living prochlorophyte abundant in the oceanic euphotic zone. Nature 334:340-343.
- Chisholm, S. W. (1992). What limits phytoplankton growth ? Oceanus 36-46.
- Chiura, H. X. (1997). Generalized gene transfer by virus-like particles from marine bacteria. Aquat. Microb. Ecol. 13:75-88.
- Christaki, U., S. Jacquet, J. R. Dolan, D. Vaultot et F. Rassoulzadegan (1999). Growth and grazing on *Prochlorococcus* and *Synechococcus* by two marine ciliates. Limnol. Oceanogr. 44:52-61.
- Christoffersen, K. (1994). Variations of feeding activities of heterotrophic nanoflagellates on picoplankton. Mar. Microb. Food Webs 8:111-123.
- Claustre, H., A. Morel, M. Babin, C. Caillau, D. Marie, J.-C. Marty et D. Vaultot (1999). Variability in particle attenuation and stimulated fluorescence in the tropical and equatorial Pacific: scales, patterns and some biogeochemical implications. J. Geophys. Res. 104:3401-3422.
- Claustre, H., F. Fell, K. Oubelkheir, L. Prieur, A. Sciandra et M. Babin. (sous presse). Variations in particle size and abundance, scattering and absorption in the vicinity of a geostrophic front. Limnol. Oceanogr.
- Cole, J. J., S. Findlay et M. L. Pace (1988). Bacterial production in fresh and seawater ecosystem: a cross-system overview. Mar. Ecol. Prog. Ser. 43:1-10.

- Cooper, S. et C. E. Helmstetter (1968). Chromosome replication and division cycle in *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* 31:519-5540.
- Cottrell, M. T. et C. A. Suttle (1995). Dynamics of a lytic virus infecting the photosynthetic marine picoflagellate *Micromonas pusilla*. *Limnol. Oceanogr.* 40:730-739.
- Courties, C., A. Vaquer, M. Trousselier, J. Lautier, M. J. Chrétiennot-Dinet, J. Neveux, C. Machado et H. Claustre (1994). Smallest eukaryotic organism. *Nature* 370:255.
- Cullen J. J., M. R. Lawis, C. O. Davis et R. T. Barber (1992). Photosynthetic characteristics and estimated growth rates indicate grazing is the proximate control of primary production in the Equatorial Pacific. *J. Geophys. Res.* 97:639-654.
- Czeiler, C. A. et co-auteurs (1999). Stability, precision, and near 24-hour period of the human circadian pacemaker. *Science* 284:2177-2181.

D

- Dajoz, R. (1974). *Dynamique des populations*. Masson et cie. (Ed.), 301 p.
- Dandonneau, Y. et J. Neveux (1997). Daily variations of fluorescence in the eastern equatorial Pacific: an unvarying pattern. *Deep-Sea Res.* 44:1869-1880.
- Davey, H. M. et D. B. Kell (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analysis. *Microb. Reviews* 641-696.
- Delmas, D., M.-G. Frikha, H. Reymond, E. A. S. Linley et Y. Collos (1992). Long-term microbial community dynamics in a coastal marine pond. *Mar. Microb. Food Webs* 6:39-54.
- DeLong, E. F., K. Y. Wu, B. B. Prézelin et R. V. M. Jovine (1994). High abundance of Archae in Antarctic marine picoplankton. *Nature* 371:605-697.
- Dickey T. (1991). The emergence of concurrent high resolution bio-optical and physical measurements in the upper ocean and their applications. *Rev. Geophys.* 29:383-413.
- Dickey, T., J. Marra, T. Granata, C. Langdon, M. Hamilton, J. Wiiggert, D. Siegel et A. Bratkovitch (1991). Concurrent high resolution bio-optical and physical time series observations in the Sargasso Sea. *J. Geophys. Res.* 96:8643-8663.
- Dolan, J. R. et K. Simek (1999). Diel periodicity in *Synechococcus* populations and grazing by heterotrophic nanoflagellates: analysis of food vacuole content. *Limnol. Oceanogr.* 44:1565-1570.
- Donachie, W. D. (1993). The cell cycle of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47:199-230.
- Dubelaar, G. B. J., K. Tangen, P. L. Gerritzen, A. E. R. Beeker et R. R. Jonker (1998). CytoBuoy: *In situ* optical scanning of individual particles with a buoy mounted flow cytometer. Third

- European Marine Science and Technology Conference, Lisbon, 23-27 May 1998, Project Synopses (K.-G. BARTHEL et al.: Eds.), Volume IV: Advanced Systems, 1500-1511, EUR 18220 EN, ISBN 92-828-2896-4
- Dubelaar, G. B. J., P. L. Gerritzen, A. E. R. Beeker, R. R. Jonker et K. Tangen (1999). Design and first results of CytoBuoy : a wireless flow cytometer for *in situ* analysis of marine and fresh waters. *Cytometry* 37:247-254.
- Ducklow, H. W. et C. A. Carlson (1992). Oceanic bacterial productivity. *Adv. Microb. Ecol.* 12:113-181.
- Ducklow, H. W., H. L. Quinby et C. A. Carlson (1995). Bacterioplankton dynamics in the equatorial Pacific during the 1992 El Niño. *Deep-Sea Res.* 42:621-638.
- Ducklow, H. W. (1999). The bacterial component of the oceanic euphotic zone. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30:1-10.
- Dugdale, R. C. et F. P. Wilkerson (1998). Silicate regulation of new production in the equatorial Pacific upwelling. *Nature* 391:270-273.
- Durand, M. et R. J. Olson (1996). Contributions of phytoplankton light scattering and cell concentration changes to diel variations in beam attenuation in the Equatorial Pacific from flow cytometric measurements of pico-, ultra-, and nanoplankton. *Deep-Sea Res.* 43:891-906.
- Durand, M. et R. J. Olson (1998). Diel patterns in optical properties of the chlorophyte *Nanochloris* sp.: Relating individual cell to bulk measurements. *Limnol. Oceanogr.* 43:1107-1118.

E

- Eikrem, W. et J. Throndsen (1990). The ultrastructure of *Bathycoccus* gen. nov. and *B. prasinos* sp. nov., a non motile picoplanktonic alga (Chlorophyta, Prasinophyceae) from the Mediterranean and Atlantic. *J. Phycol.* 29:344-350.
- Estrada, M., F. Vives et M. Alcaraz (1984). Life and the productivity of the open sea. Dans: *Western Mediterranean*, Pergamon press, pp 148-197.

F

- Falkowski, P. G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Res.* 39:235-258.
- Falkowski, P. G., R. T. Barber et V. Smetacek (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* 281:200-206.
- Field, C. B., M. J. Behrenfeld, J. T. Randerson et P. G. Falkowski (1998). Primary production of the biosphere: Integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281:237-240.

- Fogg, G. E. (1986). Photosynthetic picoplankton. Proc. R. Soc. Lond. 228:1-30.
- Frankland, P. et G. P. Frankland (1894). Micro-organisms in Water. Longmans, Gree & Company Ltd, pp 112-116 (bactéries dans le Golfe de Naples). Dans: Marine Microbiology, C. Litchfield (Ed), 1976, Benchmark papers in microbiology, Vol. 11. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc. Stroudsburg, Pennsylvania
- Fuchs, B. M., G. Wallner, W. Beisker, I. Schwiapl, W. Ludwige R. Amann (1998). Flow cytometric analysis of the *in situ* accessibility of *Eischerichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. Appl. Environ. Microb. 64:4973-4982.
- Fuhrman J. A., R. W. Eppley, A. Hagström et F. Azam (1985). Diel variations in bacterioplankton, phytoplankton, and related parameters in the Southern California bight. Mar. Ecol. Progr. Ser. 27:9-20.
- Furhman, J. A., T. D. Sleeter, C. A. Carlson et L. M. Proctor (1989). Dominance of bacterial biomass in the Sargasso Sea and its ecological implications. Mar. Ecol. Prog. Ser. 57:207-217.
- Furhman, J. A., K. McCallum et A. A. Davis (1992). Novel major Archae-bacteria group from marine plankton. Nature 356:148-149.
- Furhman, J. A. et C. A. Suttle (1993). Viruses in marine planktonic systems. Oceanogr. 6:51-63.
- Furhman, J. A., .K. McCallum et A. A. Davis (1993). Phylogenetic diversity of subsurface marine microbial communities from the Atlantic and Pacific oceans. Appl. Environ. Microb. 59:1294-1302.
- Furhman, J. A. (1999). Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. Nature 399:541548.
- Furnas, M. J. (1990). *In situ* growth rates of marine phytoplankton: approaches to measurement, community and species growth rates. J. Plank. Res.12:1117-1125.
- Furnas, M. et N. Crosbie (1999). *In situ* growth dynamics of the photosynthetic prokaryotic picoplankters *Synechococcus* and *Prochlorococcus*. Dans : Marine Cyanobacteria, Charpy, L., et Larkum, A. W. D. (Eds), Bull. Inst. Océanogr., Monaco, n° spécial 19, pp. 387-417.
- Furuya, K. et W. K. W. Li (1992). Evaluation of photosynthetic capacity in phytoplankton by flow cytometry analysis of DCMU-enhanced chlorophyl fluorescence. Mar. Ecol. Prog. Ser. 88:279-287.

G

- Garczarek, L., W. R. Hess, J. Holtendorff, G. W. M. van der Staay et F. Partensky (accepté). Multiplication of antenna genes as a major adaptation to low light in a prokaryote. Proc. Natl. Acad. Sci. USA

- Garison, T. (1995). *Oceanography: an invitation to marine science*, 2nd edition, Wadsworth Publishing Company, 567 p.
- Gasol, J. M., P. A. del Giorgio et C. M. Duarte (1997). Biomass distribution of marine planktonic communities. *Limnol. Oceanogr.* 42:1353-1363.
- Gasol, J. M., M. D. Doval, J. Pinhassi, J. I. Calderon-Paz, N. Guixa-Boixareu, D. Vaqué, and C. Pedros-Alio (1998). Diel variations in bacterial heterotrophic activity and growth in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 164:107-124.
- Gasol, J. M., U. L. Zweifel, F. Peters, J. A. Furhman et A. Hagström (1999). Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 65:4475-4483.
- Gerath, M. W. et S. W. Chisholm (1989). Change in photosynthetic capacity over the cell cycle in light-dark synchronized *Amphidinium carteri* is due solely to the photocycle. *Plant Physiol.* 91:999-1005.
- Gieskes, W. W. C. et G. W. Kraay (1986). Floristic and physiological differences between the shallow and the deep nanophytoplankton community in the euphotic zone of the tropical Atlantic revealed by HPLC analysis of pigments. *Mar. Biol.* 91:567-576.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer et K. G. Field (1990). Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60-63.
- Glöckner, F. O., B. M. Fuchs et R. Amann (1999). Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl. Environ. Microb.* 65:3271-3276.
- Glover, H. E., M. D. Keller et R. W. Spinrad (1987). The effects of light quality and intensity on photosynthesis and growth of marine eukaryotic and prokaryotic phytoplankton clones. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 105:137-159.
- Glover, H. E. et A. E. Smith (1988). Diel patterns of C incorporation into biochemical constituents of *Synechococcus* spp. and larger algae in the northwest Atlantic Ocean. *Mar. Biol.* 97:259-267.
- Goericke, R. et D. J. Repeta (1992). The pigments of *Prochlorococcus marinus* : the presence of divinyl-chlorophyll *a* and *b* in a marine prokaryote. *Limnol. Oceanogr.* 37:425-433.
- Golden, S. S., M. Ishiura, C. H. Johnson et T. Kondo (1997). Cyanobacterial circadian rhythms. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48: 327-354.

- Gorsky G., M.-J. Dinet, J. Blanchot et I. Palazzoli (1999). Picoplankton and nanoplankton aggregation by appendicularians: fecal pellet contents of *Megalocercus huxleyi* in the equatorial Pacific (2°N, 165°E). *J. Geophys. Res.* 104:3381-3390.
- Gough, L. H. (1905). Report of the plankton of the English Channel in 1903. Report of the North Sea Fisheries Investigatory Commission (South Area) 1:325-377.
- Grobbelaar, N., T. C. Huang, H. Y. Lin et T. J. Chow (1986). Dinitrogen-fixing endogenous rhythm in *Synechococcus* RF-1. *FEMS Microbiol. Let.* 37:173-177.
- Guillard, R. R. L., M. D. Keller, C. J. O'Kelly et G. L. Floyd (1991). *Pycnococcus pravasolii* Gen. et Sp. Nov., a coccoid prasinoxanthin-containing phytoplankter from the Western North Atlantic and Gulf of Mexico. *J. Phycol.* 27:39-47.
- Guillou, L. (1999). Diversité des picoeucaryotes océaniques: description, phylogénie et écologie de nouvelles espèces. Thèse de doctorat de l'Université de Paris 6, 172 p.
- Guillou, L., M.-J. Chrétiennot-Dinet, L. K. Medlin, H. Claustre, S. Loiseaux-de Goër et D. Vaultot (1999a). *Bolidomonas*: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokonta). *J. Phycol.* 35:368-381.
- Guillou, L., S. Moon-van der Staay, H. Claustre, F. Partensky et D. Vaultot (1999b). Diversity and abundance of Bolidophyceae (Heterokonta) in two oceanic regions. *Appl. Environ. Microb.* 65:4528-4536.
- Guillou, L., S. Jacquet, M. J. Chrétiennot-Dinet et D. Vaultot (soumis). Smallest oceanic predator. *Nature*.

H

- Hagström, A., U. Larsson, P. Horstedt et S. Normak (1979). Frequency of dividing cells: a new approach to the determination of bacterial growth in aquatic environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 37:805-812.
- Hagström, A. et U. Larsson (1984). Diel and seasonal variation in growth rate of pelagic bacteria. Dans : J. E. Hobbie & P. J. Williams (Eds.), *Heterotrophic activity in the sea*. Plenum Press, New York, p. 249-262.
- Hagström, A., F. Azam, A. Anderson, J. Wikner et F. Rassoulzadegan (1988). Microbial loop in an oligotrophic pelagic marine ecosystem: possible roles of cyanobacteria and nanoflagellates in the organic fluxes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 49:171-178.
- Hagström, A., J. Pinhassi et U. L. Zweifel (soumis). Biogeographical diversity among marine bacterioplankton. *Aquat. Microb. Ecol.*

- Hamilton, M., T. Granata, T. Dickey, J. Wiggert, D. Siegel, J. Marra et C. Langdon (1990). Diurnal variations of bio-optical properties in the Sargasso Sea . Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng. 10:214-224.
- Helmstetter, C. E. et S. Cooper (1968). DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing *Escherichia coli* B/r. J. Mol. Biol. 31:507-518.
- Henley, W. J. et Y. Wing (1998). Growth and photosynthesis of marine *Synechococcus* (cyanophyceae) under iron stress. J. Phycol. 34: 94-103.
- Hennes, K. P., C. A. Suttle et A. M. Chan (1995). fluorescently labeled virus probes show that natural virus populations can control the structure of marine microbial communities. Appl. Environ. Microb. 61:3623-3627.
- Hess, W. R., F. Partensky, G. W. M. van der Staay, J. M. Garcia-Fernandez, J. M. Börner et D. Vaultot (1996). Coexistence of phycoerythrin and a chlorophyll *a/b* antenna in a marine prokaryote. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 93:11126-11130.
- Hill, R. W., B. A. White, M. T. Cottrell et J. W. H. Dacey (1998). Virus-mediated total release of dimethylsulfoniopropionate from marine phytoplankton: a potential climate process. Aquat. Microb. Ecol. 14:1-6.
- Hood, E. M., L. Merlivat et T. Johannessen (1999). Variations of fCO₂ and air-sea flux of CO₂ in the Greenland Sea gyre using high-frequency time-series data from CARIOCA drift-buoys. J. Geophys. Res. 104:20571-20583.
- Hugues, J., T. Lamparter, F. Mittmann, E. Hartmann, W. Gärtner, A. Wilde et T Börner (1997). A prokaryotic phytochrome. Nature 386:663.

I

- Iriarte, A. et D. A. Purdie (1993). Photosynthesis and growth response of the oceanic picoplankter *Pycnococcus provasolii* Guillard (clone 48-23) (Chlorophyta) to variations in irradiance, photoperiod and temperature. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 168:239-257.
- Ishiura, M., S. Kutsuna, S. Aoki, H. Iwasaki, C. R. Andersson, A. Tanabe, S. S. Golden, C. H. Johnson et T. Kondo (1998). Expression of a gene cluster *kaiABC* as a circadian feedback process in cyanobacteria. Science 281:1519-1523.
- Iturriaga, R. et J. Marra (1988). Temporal and spatial variability of chroococcoid cyanobacteria *Synechococcus* spp. specific growth rates and their contribution to primary production in the Sargasso Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 44:175-181.

J

- Jacquet, S., J.-F. Lennon et D. Vaultot (1998a). Application of a compact automatic sea water sampler to high frequency picoplankton studies. *Aquat. Microbiol. Ecol.* 14:309-314.
- Jacquet, S., J.-F. Lennon, D. Marie et D. Vaultot (1998b). Picoplankton population dynamics in coastal waters of the northwestern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 43:1916-1931.
- Jacquet, S. et J.-F. Lennon (1999). Dynamique haute fréquence du picoplancton. *J. Rech. Oceanogr.* 24:77-86.
- Jacquet, S., F. Partensky, J.-F. Lennon, D. Vaultot (en préparation). Diel patterns of picoplankton in culture. *J. Phycol.*
- Jacquet, S., F. Partensky, D. Marie, R. Casotti, R. Rippka, D. Vaultot (en préparation). Cell cycle regulation by light on marine *Prochlorococcus*. *Appl. Environ. Microb.*
- Jacquet, S., D. Marie, L. Prieur, P. Morin et D. Vaultot (en préparation). Microbial community in the Alboran Sea (W Mediterranean Sea). II. Picoplankton population dynamics in surface waters. *J. Geophys. Res.*
- Jeffrey, S. W. (1976). A report of green algal pigments in the central North Pacific Ocean. *Mar. Biol.* 37:33-37.
- Jeffrey, W. H., R. J. Pledger, P. Aas, S. Hager, R. B. Coffin, R. V. Haven et D. L. Mitchell (1996). Diel and depth profiles of DNA photodamage in bacterioplankton exposed to ambient solar ultraviolet radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 137:283-291.
- Jerlov, N. G. (1976). *Marine Optics*. Elsevier Scientific Publ., New York, 231 p.
- Jiang, S. C. et J. H. Paul (1998). Significance of lysogeny in the marine-environment—studies with isolates and a model of lysogenic phage production. *Microb. Ecol.* 35:235-243.
- Jochem, F. J. et D. Meyerdierks (1999). Cytometric measurement of the DNA cell cycle in the presence of chlorophyll autofluorescence in marine eukaryotic phytoplankton by the blue-light excited dye YOYO-1. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 185:301-307.
- Johnson, C. H., S. S. Golden, M. Ishiuran et T. Kondo (1996). Circadian clocks in prokaryotes. *Molecular Microbiol.* 21:5-11.
- Johnson, P. W. et J. Mc N. Sieburth (1979). Chroococcoid cyanobacteria in the sea: an ubiquitous and diverse phototrophic biomass. *Limnol. Oceanogr.* 24:928-35.
- Johnson, P. W. et J. Mc N. Sieburth (1982). *In situ* morphology and occurrence of eukaryotic phototrophs of bacterial size in the picoplankton of estuarine and oceanic waters. *J. Phycol.* 18:318-327.

Joux, F. et P. Lebaron (1995). Applications en écologie bactérienne des sondes oligonucléotidiques fluorescentes par les techniques d'hybridation et de cytométrie. *Océanis* 21:125-138.

Joux, F., W. H. Jeffrey, P. Lebaron et D. L. Mitchell (1999). Marine bacterial isolates display responses to UV-B radiation. *Appl. Environ. Microb.* 65:3820-3827.

K

Kana, T. M. et P. M. Gilbert (1987). Effect of irradiances up to 2000 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ on marine *Synechococcus* WH7803 - I. Growth, pigmentation and cell composition. *Deep-Sea Res.* 34:479 - 496.

Karl, D. M. et R. Lukas (1996). The Hawaii Ocean time series (HOT) program: background, rationale and field implementation. *Deep-Sea Res.* 43:129-156.

Karl, D. M. (1999). A sea of change: biogeochemical variability in the north pacific subtropical gyre. *Ecosystems* 2: 181-214.

Karp-Boss, L., E. Boss et P. A. Jumars (1996). Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 34:71-107.

Killops, S. D. et V. J. Killops (1993). An introduction to organic geochemistry. R. C. O. Gill (ed.), Dans : Longman Geochemistry Series, New York.

Kim, J.-S., Y.-H. Park, B.-D. Yoon et H.-M. Oh (1999). Establishment of axenic cultures of *Anabaena flos-aquae* and *Aphanothece nidulans* (Cyanobacteria) by lysozyme treatment. *J. Phycol.* 35:865-869.

Kinkade, C. S., J. Marra, T. D. Dickey, C. Langdon, D. E. Sigurdson et R. Weller (1999). Diel bio-optical variability observed from moored sensors in the Arabian Sea. *Deep Sea Res.* 46:1813-1831.

Kondo, T., C. A. Strayer, R. D. Kulkarni, W. Taylor, M. Ishiura, S. S. Golden et C. A. Johnson. 1993. Circadian rhythms in prokaryotes: luciferase as a reporter circadian gene expression in Cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5672-5676.

Kriss, A. E et E. A Rukina (1947). Bacteriophages in the sea. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* 57:833-836.

L

Landry, M. R., J. Kirshtein et J. Constantinou (1995). A refined dilution technique for measuring the community grazing impact of microzooplankton; with experimental tests in the central equatorial Pacific. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 120:53-63.

- Landry, M. R., J. Kirshtein et J. Constantinou (1996). Abundances and distributions of picoplankton populations in the central equatorial Pacific From 12°N to 12°S, 140°W. *Deep-Sea Res.* 43:871-890.
- LaRoche, J., H. Murray, M. Orellana et J. J. Newton (1995). Flavodoxin expression as an indicator of iron limitation in marine diatoms. *J. Phycol.* 31:520-530.
- Leackey, R. J. G., S. D. Archer et J. Grey (1996). Microbial dynamics in coastal waters of east Antarctica: bacterial production and nanoflagellates bacterivory. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142:3-17.
- Le Bouteiller, A., J. Blanchot et M. Rodier (1992). Size distribution patterns of phytoplankton in the western Pacific: towards a generalization for the tropical open ocean. *Deep-Sea Res.* 39:805-823.
- Levin, B. R., F. R. Steward et L. Chao (1977). Resource-limited growth, competition and predation : a model and experimental studies with bacteria and bacteriophages. *Am. Nat.* 111:3.
- Li, W. K. W., D. V. Subba Rao, W. G. Harrison, J. C. Smith, J. J. Cullen, B. Irwin et T. Platt (1983). Autotrophic picoplankton in the tropical ocean. *Science* 219:292-295.
- Li, W. K. W. (1986). Experimental approaches to field measurements: methods and interpretation. pp251-286. Dans: *Photosynthetic picoplankton*. T. Platt & W.K.W. Li (Eds.), *Can. Bull. Fish. Aquat. Sci.* 214, 583 p.
- Li, W. K. W. et T. Platt (1987). Photosynthetic picoplankton in the ocean. *Sci. Prog.* 71:117-132.
- Li, W. K. W., P. M. Dickie, B. D. Irwin et A. M. Wood (1992). Biomass of bacteria, cyanobacteria, prochlorophytes and photosynthetic eukaryotes in the Sargasso Sea. *Deep-Sea Res.* 39:501-519.
- Li, W. K. W. (1995). Composition of ultraphytoplankton in the central North Atlantic. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 122 :1-8.
- Li, W. K. W., J. F. Jellet et P. M. Dickie (1995). DNA distributions in marine bacteria stained with TOTO or TO-PRO. *Limnol. Oceanogr.* 40:1485-1495.
- Li, W. K. W. (1998). Annual average abundance of heterotrophic bacteria and *Synechococcus* in surface ocean waters. *Limnol. Oceanogr.* 43:1746-1753.
- Lin, S. et E. J. Carpenter (1995). Growth characteristics of marine phytoplankton determined by cell cycle proteins: The cell cycle of *Ethmodiscus rex* (Bacillariophyceae) in the southwestern north Atlantic Ocean and Carribean Sea. *J. Phycol.* 31:778-785.

- Lin, S., J. Chang et E. J. Carpenter (1995). Growth characteristics of phytoplankton determined by cell cycle proteins: PCNA immunostaining of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 31:388-395.
- Liu, H., L. Campbell et M. R. Landry (1995). Growth and mortality rates of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* measured with a selective inhibitor technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116:277-287.
- Liu, H., L. Campbell, M. R. Landry, H. A. Nolla, S. L. Brown et J. Constantinou (1998). *Prochlorococcus* and *Synechococcus* growth rates and contributions to production in the Arabian Sea during the 1995 southwest and northeast monsoons. *Deep-Sea Res.* 45:2327-2352.
- Lloyd, D. (1998). Circadian and ultradian clock-controlled rhythms in unicellular microorganisms. *Adv. Microbial. Physiol.* 39:291-338.
- Lokstein, H., C. Steglich et W. R. Hess (1999). Light-harvesting antenna function of phycoerythrin in *Prochlorococcus marinus*. *Biochem. Biophys.* 1410:97-98.
- Longhurst, A., S. Sathyendranath, T. Platt et C. Caverhill (1995). An estimate of global primary production in the ocean from satellite radiometer data. *J. Plank. Res.* 17:1245-1271.

M

- Magazzù, G. et F. Decembrini (1995). Primary production, biomass and abundance of phototrophic picoplankton in the Mediterranean Sea: a review. *Aquat. Microb. Ecol.* 9:97-104.
- Malin, G., S. M. Turner, P. S. Liss et Aiken (1992). Sulfur—the plankton climate connection. *J. Phycol.* 28:590-597.
- Malin, G., W. H. Wilson, G. Bratbak, P. S. Liss et N. H. Mann (1998). Elevated production of dimethylsulfide from viral infection of cultures of *Phaeocystis pouchetii*. *Limnol. Oceanogr.* 43:1389-1393.
- Manton, I. et M. Parke (1960). Further observations on small green flagellates with special reference to possible relatives of *Chromulina pusilla* Butcher. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 39:275-298.
- Margalef, R. (1984). Introduction to the Mediterranean. Dans: *Western Mediterranean*, R. Margalef (Ed.), Pergamon press, pp 1-16.
- Marie, D., D. Vaultot et F. Partensky (1996). Application of the novel Nucleic-acid stains YOYO-1, YO-PRO-1 and PicoGreen for flow cytometric analyses of marine prokaryotes. *Appl. Env. Microbiol.* 62:1649-1655.

- Marie, D., F. Partensky, S. Jacquet et D. Vaultot (1997). Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:186-193.
- Marie, D., C. P. D. Brussaard, R. Thyrhaug, G. Bratbak et D. Vaultot (1999). Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:45-52.
- [Marie, D., N. Simon, L. Guillou, F. Partensky et D. Vaultot \(2000\). DNA/RNA analysis of phytoplankton by flow cytometry.](#) Dans : [Current protocols in cytometry.](#) J. P. [Robinson et al. \(Eds.\), John Wiley & Sons, Inc., NY, p. 11.12.1-11.12-14.](#)
- Massana, R., A. E. Murray, C. M. Preston et E. F. DeLong (1997). Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic *Archae* in the Santa Barbara Channel. *Appl. Environ. Microb.* 63:50-56.
- Massana, R., L. T. Taylor, A. E. Murray, K. Y. Wu, W. H. Jeffrey et E. F. DeLong (1998). Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic archae in the Gerlache strait, Antarctica, during early spring. *Limnol. Oceanogr.* 43:607-617.
- Mayer, J. A. et F. J. R. Taylor (1979). A virus which lyses the marine nanoflagellate *Miromonas pusilla*. *Nature* 281:299-301.
- McDuff, R. E. et S. W. Chisholm (1982). The calculation of *in situ* growth rates of phytoplankton populations from fractions of cells undergoing mitosis: a clarification. *Limnol. Oceanogr.* 27:783-788.
- Metezeau, Ph., X. Ronot, G. Le Noan-Merdrignac et M. H. Ratinaud (1988). La cytométrie en flux pour l'étude de la cellule normale ou pathologique. *Medsi/McGraw-Hill*, vol. 1, 561 p.
- Michaels, A. F. et A. H. Knap (1996). Overview of the US JGOFS Bermuda Atlantic times series study and the hydrostation S program. *Deep-Sea Res.* 43:157-198.
- Millar, A. J., M. Straumer, J. Chorry, N.-H. Chua et S. A. Kay (1995). The regulation of circadian period by phototransduction pathways in *Arabidopsis*. *Science* 267:1163-1166.
- Milligan, K. L. D. et E. M. Coper (1994). Isolation of virus capable of lysing the brown tide microalga, *Aureococcus anophagefferens*. *Science* 266:805-807.
- Mitsui, A., S. Kumazakawa, A. Takahashi, H. Ikemoto, S. Cao et T. Arai (1986). Strategy by which unicellular cyanobacteria grow photoautotrophically. *Nature* 323:720-722.
- Moline, M. A. et B. B. Prézelin (1997). High-resolution time series data for primary production and related parameters at a Palmer LTER coastal site: implications for modelling carbon fixation in the Southern Ocean. *Polar Biol.* 17:39-53.
- Monger, B. C. et M. R. Landry (1993). Flow cytometric analysis of marine bacteria with Hoechst 33342. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:905-911.

- Moore, L. R., R. Goericke et S. W. Chisholm (1995). Comparative physiology of *Synechococcus* and *Prochlorococcus*: influence of light and temperature on growth, pigments, fluorescence and absorptive properties. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116:259-275.
- Moore, L. R., G. Rocapp et S. W. Chisholm (1998). Physiology and molecular phylogeny of distinct ecotypes of *Prochlorococcus* coexisting in the oceanic euphotic zone. *Nature* 393:464-467.
- Moore, L. R. et S. W. Chisholm (1999). Photophysiology of the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*: Ecotypic differences among cultured isolates. *Limnol. Oceanogr.* 44:628-638.
- Mostajir, B., T. Simengando, S. Demers, C. Belzile, S. Roy, M. Grosselin, J. P. Chanut, S. deMora, J. Fauchot, F. Vidussi et M. Levasseur (1999). Ecological implications of changes in cell size and photosynthetic capacity of marine Prymnesiophyceae induced by ultra-violet-B radiation. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187:89-100.
- Müller-Niklas, G. et G. J. Herndl (1996). Dynamics of bacterioplankton during a phytoplankton bloom in the high Arctic waters of the Franz-Joseph land archipelago. *Aquat. Microb. Ecol.* 11:111-118.
- Murray, A. et T. Hunt (1993). *The cell cycle : an introduction*. W.H. Freeman & Company, 250 p.
- Muyzer, G., Waal E.C. et A.G. Uitterlinden (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes encoding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:695-700.
- Muyzer, G. et K. Smalla K (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. A. van Leeuwenhoek (Ed.), Kluwer Academic publishers, 73:127-141.

N

- Nagasaki, K. et M. Yamaguchi (1998). Intra-species host specificity of HaV (*Heterosigma akashiwo* virus) clones. *Aquat. Microb. Ecol.* 14:109-112.
- Neuer, S. (1992). Growth dynamics of marine *Synechococcus* spp. in the gulf of Alaska. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 83:251-262.
- Noble, R. et J. A. Furhman (1998). Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 14:113-118.
- Norton, T. A., M. Melkonian et R. A. Andersen (1996). Algal biodiversity. *Phycologia* 35:308-326.

O

- Olson, R. J., D. Vaultot et S. W. Chisholm (1985). Marine phytoplankton distribution measured using shipboard flow cytometry. *Deep-Sea Res.* 32:1273-1280.
- Olson, R. J. et S. W. Chisholm (1986). Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri*. *J. Plank. Res.* 8:785-793.
- Olson, R. J., S. W. Chisholm, E. R. Zettler, M. A. Altabet et J. A. Dusenberry (1990). Spatial and temporal distributions of prochlorophytes picoplankton in the North Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* 37:1033-1051.
- Olson, R. J., E. R. Zettler et M. D. Durand (1993). Phytoplankton analysis using flow cytometry. Dans: *Aquatic microbial ecology*, Lewis Publishers, pp 175-186.
- Ong, L. J., A. N. Glazer et J. B. Waterbury (1984). An unusual phycoerythrin from a marine cyanobacterium. *Science* 224:80-83.

P

- Palenik, B., G. Toledo et M. Ferris (1999). Cyanobacterial diversity in marine ecosystems as seen by RNA polymerase (*rpoC1*) gene sequences. Dans : *Marine Cyanobacteria*, L. Charpy & A. W. D. Larkum (Eds). *Bull. Inst. Océanogr., Monaco*, n° spécial 19, pp. 101-105.
- Parpais, J., D. Marie, F. Partensky, P. Morin et D. Vaultot (1996). Effect of phosphorus starvation on the cell cycle of the photosynthetic prokaryote *Prochlorococcus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132:265-274.
- Partensky, F., N. Hoepffner, W. K. W. Li., O. Ulloa et D. Vaultot (1993). Photoacclimatation of *Prochlorococcus* sp. (Prochlorophyta) strains isolated from the North Atlantic and the Mediterranean Sea. *Plant Physiol.* 101:285-296.
- Partensky, F., J. Blanchot, F. Lantoine, J. Neveux et D. Marie (1996). Vertical structure of picoplankton at different trophic sites of the subtropical Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.* 43:1191-1213.
- Partensky, F., J. Blanchot et D. Vaultot (1999a). Differential distribution and ecology of *Prochlorococcus* and *Synechococcus*: a review. Dans : *Marine Cyanobacteria*, L. Charpy & A. W. D. Larkum (Eds.). *Bull. Inst. Océanogr., Monaco*, n° spécial 19, pp. 431-449.
- Partensky, F., W. R. Hess et D. Vaultot (1999b). *Prochlorococcus*, a marine photosynthetic prokaryote of global significance. *Mol. Microb. Ecol. Rev.* 63:106-127.

- Pawley, J. B. (1995). Handbook of biological confocal microscopy (2nd edition). Plenum Press, New York, 632 p.
- Pérès, J. M. et L. Devéze (1963). Océanographie biologique et biologie marine. II. La vie pélagique. Press Univ. Fr., Paris, 514 p.
- Peters, F., C. Marrasé, J. M. Gasol, M. M. Sala et L. Arin (1998). Effects of turbulence on bacterial growth mediated through food web interactions. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 172:293-303.
- Pichard, S. L., L. Campbell, J. B. Kang, F. R. Tabita et J. H. Paul (1996). Regulation of ribulose biphosphate carboxylase gene expression in natural phytoplankton communities. I. Diel rhythms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 139:257-265.
- Pile, A. J., M. R. Patterson et J. D. Witman (1996). *In situ* grazing on plankton <10 µm by the boreal sponge *Mycale lingua*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141:95-102.
- Pinhassi, J., F. Azam, J. Hemphälä, R. A Long, J. Martinez, U. L. Zweifel et A. Hagström (1999). Coupling between bacterioplankton species composition, population dynamics and organic matter degradation. *Aquat. Microb. Ecol.* 17:13-26.
- Planque, B. et F. Ibanez (1997). Long-term time series in *Calanus finmarchicus* abundance – a question of space ? *Oceanol. Act.* 20:159-164.
- Potter, D., T. C. Lajeunesse, G. W. Saunders et R. A. Andersen (1997). Convergent evolution masks extensive biodiversity among marine coccoid picoplankton. *Biodiv. Conserv.* 6:99-107.
- Prézélin, B. B., M. Putt et H. E. Glover (1986). Diurnal patterns in photosynthetic capacity and depth- dependent photosynthesis-irradiance relationships in *Synechococcus* spp. and larger phytoplankton in three water masses in the northwest ocean. *Mar. Biol.* 91:205-217.
- Prézélin, B. B., H. E. Glover et L. Campbell (1987). Effects of light intensity and nutrient availability on diel patterns of cell metabolism and growth in populations of *Synechococcus* spp. *Mar. Biol.* 95: 469-480.
- Prézélin, B. B. (1992). Diel periodicity in phytoplankton productivity. *Hydrobiol.* 238:1-35.
- Proctor, L. M. et J. A. Fuhrman (1989). Viral mortality of marine bacteria and cyanobacteria. *Nature* 343:60-62.
- Proctor, L. M. et J. A. Fuhrman (1991). Roles of viral infection in organic particle flux. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69:133-142.
- Proctor, L. M. (1997). Advances in the study of marine viruses. *Microsc. Res. Tech.* 37:136-161.

R

- Raven, J. A. (1998). The twelfth Tansley lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Funct. Ecol.* 12:503-513.
- Reid, P. C., B. Planque et M. Edwards (1998). Is observed variability in the long-term results of the continuous plankton recorder survey a response to climate change? *Fish. Oceanogr.* 7:282-288.
- Ribes, M., R. Coma et J.-M. Gili (1998a). Seasonal variation of *in situ* feeding rates by the temperate ascidian *Halocynthia papillosa*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 175:201-213.
- Ribes, M., R. Coma et J.-M. Gili (1998b). Heterotrophic feeding by gorgonian corals with symbiotic zooxanthella. *Limnol. Oceanogr.* 43:1170-1179.
- Richter, S., W. R. Hess, M. Krause et W. Messer (1998). Unique organization of the *dnaA* region from *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375, a marine cyanobacterium. *Mol. Gen. Genet.* 257:534-541.
- Riemann, L., G. F. Steward, L. B. Fandino, L. Campbell, M. Landry et F. Azam (1999). Bacterial community composition during two consecutive NE Monsoon periods in the Arabian Sea studied by DGGE of rRNA genes. *Deep-Sea Res* 46:1791-1811.
- Ripp, S., O. A. Ogunseitan et R. V. Miller (1994). Transduction of a freshwater microbial community by a new *Pseudomonas aeruginosa* generalized transducing phage. *Mol. Ecol.* 3:121-126.
- Rippka, R., J. Deruelles, J. B. Waterbury, M. Herdman et R. Y. Stainer (1979). Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* 111:1-61.
- Robertson, B. R. et D. K. Button (1989). Characterizing aquatic bacteria according to population cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* 10:70-76.
- Roenneberg, T. et J. W. Hastings (1988). Two photoreceptors influence the circadian clock of a unicellular alga. *Naturwissenschaften* 75:206-207.
- Roenneberg, T. et D. Morse (1993). Two circadian oscillators in one cell. *Nature* 362: 362-364.
- Roenneberg, T. et T.-S. Deng (1997). Photobiology of the *Gonyaulax* circadian system. Different phase response curves for red and blue light. *Plant* 202:494-501.
- Ryther, J. H. (1969). Photosynthesis and fish production in the sea. *Science* 166:72-76.

S

- Scanlan, D. J., W. R. Hess, F. Partensky, J. Newman et D. Vaultot (1996). High degree of genetic variation in *Prochlorococcus* (Prochlorophyta) revealed by RFLP analysis. *Eur. J. Phycol.* 31: 1-9.
- Schopf, J. W. (1993). Microfossils of the early Archean apex chert: New evidence of the antiquity of life. *Science* 260:640-646.
- Schut, F., R. A. Prins et J. C. Gottschal (1997). Oligotrophy and pelagic marine bacteria: facts and fiction. *Aquat. Microb. Ecol.* 12:177-202.
- Sciandra, A., J. Gostan, Y. Collos, C. Descolas-Gros, C. Lebouranger, V. Martin-Jézéquel, M. Denis, D. Lefèvre, C. Copin et B. Avril (1998). Growth compensating phenomena in continuous cultures of *Dunaliella tertiolecta* limited simultaneously by light and nitrate. *Limnol. Oceanogr.* 46:1325-1339.
- Shalapyonok, A., R. J. Olson et L. S. Shalapyonok (1998). Ultradian growth in *Prochlorococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1066-1069.
- Shapiro, L. P. et E. M. Haugen (1988). Seasonal distribution and temperature tolerance of *Synechococcus* in Boothbay Harbor, Maine. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 26:517-525.
- Shiah, F.-K. (1999). Diel cycles of heterotrophic bacterioplankton abundance and production in the ocean surface waters. *Aquat. Microb. Ecol.* 17:239-246.
- Shimada, A., M. Nishijima et T. Maruyama (1995). Seasonal appearance of *Prochlorococcus* in Suruga Bay, Japan in 1992-1993. *J. Oceanogr.* 51:289-300.
- Shimada, A., S. Kawaguchi, T. Maruyama et M. Naganobu (1999). Flow cytometry analysis of picoplankton in the south Pacific and Atlantic oceans. In *Marine Cyanobacteria*, Charpy, L., et Larkum, A. W. D. (Eds), *Bull. Inst. Océanogr.*, Monaco, n° spécial 19, pp. 477-480.
- Sieburth, J. McN., V. Smetacek et J. Lenz (1978). Pelagic ecosystem structure: heterotrophic compartments of the plankton and their relationships to plankton size fractions. *Limnol. Oceanogr.* 23:1256-1263.
- Siegel, D. A., T. D. Dickey, L. Washburn, M. K. Hamilton et B. G. Mitchell (1989). Optical determination of particulate and production variations in the oligotrophic ocean. *Deep-Sea Res.* 36:211-222.
- Simon, N. (1995). Les picoeucaryotes photosynthétiques océaniques: caractérisation morphologique, biochimique et génétique. Thèse de doctorat. Université de Paris VI. 178 p.
- Simon, N., L. Campbell, E. Ornlófsdóttir, R. Groben, L. Guillou, D. Vaultot, M. Lange et L. Medlin (2000). Oligonucleotide probes for the identification of three algal groups by dot blot and fluorescent whole-cell hybridization. *J. Euk. Microbiol.* (sous presse).

- Skarstad, K., H. B. Steen et E. Boye (1986). Cell cycle studies of slowly growing *E.coli* B/r studied by flow cytometry. *J. Bacteriol.* 656-662.
- Smith, J. C., T. Platt, W. K. W. Li, E. P. W. Horne, W. G. Harrison, D. V. Subba Rao et B. D. Irwin (1985). Arctic marine photoautotrophic picoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 20:207-220.
- Spencer, R. (1955). A marine bacteriophage. *Nature* 175:690.
- Spudich J. L. et R. Sager (1980). Regulation of the *Chlamydomonas* cell cycle by light and dark. *J. Cell Biol.* 85:136-145.
- Stal, L. J. et W. E. Krumbein (1985). Nitrogen activity in the non-heterocystous cyanobacterium *Oscillatoria* sp. grown under altering light/dark cycles. *Arch. Microbiol.* 143:61-71.
- Steen, H. B., E. Boyle, K. Skarstad, B. Bloom, T. Godal et S. Mustafa. 1982. Applications of flow cytometry on bacteria: cell cycle kinetics, drug effects and quantification of antibody binding. *Cytometry* 2:249-257.
- Stramska, M. et T. D. Dickey (1992). Short-term variations of the bio-optical properties of the ocean in response to cloud-induced irradiance fluctuations. *J. Geophys. Res.* 97:5713-5721.
- Stramska, M., T. D. Dickey, A. Plueddemann, R. Weller, C. Langdon et J. Marra (1995). Bio-optical variability associated with phytoplankton dynamics in the North Atlantic Ocean during spring and summer of 1991. *J. Geophys. Res.* 100:6621-6632.
- Stramska, M. et T. D. Dickey (1998). Short-term variability of the underwater light field in the oligotrophic ocean in response to surface waves and clouds. *Deep-Sea Res.* 45:1393-1410.
- Stramski, D. et R. A. Reynolds (1993). Diel variations in the optical properties of a marine diatom. *Limnol. Oceanogr.* 38:1347-1364.
- Stramski, D., A. Shalapyonok et R. A. Reynolds (1995). Optical characterization of the oceanic unicellular cyanobacterium *Synechococcus* grown under a day-night cycle in natural irradiance. *J. Geophys. Res.* 100:13295-13307.
- Strehl B., J. Holtzendorff, F. Partensky et W. R. Hess (1999). A small and compact genome in the marine cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* CCMP 1375: lack of an intron in the gene for tRNA(Leu)^{UAA} and a single copy of the rRNA operon. *FEMS Microbiol. Let.* 181:261-266.
- Suttle, C. A., A. M. Chan et M. T. Cottrell (1990). Infection of phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature* 347:467-469.
- Suttle, C. A., A. M. Chan et M. T. Cottrell (1991). Use of ultrafiltration to isolate viruses from seawater which are pathogens of marine phytoplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:721-726

- Suttle, C. A. (1992). Inhibition of photosynthesis in phytoplankton by the submicron size fraction concentrated from seawater. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 87:105-112.
- Suttle, C. A. et A. M. Chan (1993). Marine cyanophages infecting oceanic and coastal strains of *Synechococcus*: abundance, morphology, cross-infectivity and growth characteristics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 92:99-109.
- Suttle, C. A. et A. M. Chan (1995a). Dynamics and distribution of cyanophages and their effect on marine *Synechococcus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:3167-3174.
- Suttle, C. A. et A. M. Chan (1995b). Viruses infecting the marine prymnesiophyte *Chrysochromulina* spp.: isolation, preliminary characterization and natural abundance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 118:275-282.
- Suzuki, K., N. Handa, H. Kiyosawa et J. Ishizaka (1995). Distribution of the prochlorophyte *Prochlorococcus* in the central Pacific Ocean as measured by HPLC. *Limnol. Oceanogr.* 40:983-989.
- Sweeney, B. M. et J. W. Hastings (1958). Rhythmic cell division populations of *Gonyaulax polyedra*. *J. Protozool.* 5:217-224.
- Sweeney, B., M. et M. B. Borgese (1989). A circadian rhythm in cell division in a prokaryote, the cyanobacterium *Synechococcus* WH7803. *J. Phycol.* 25:183-186.
- Swift, E. et E. G. Durbin (1972). The phased division and cytological characteristics of *Pyrocystis* can be used to estimate doubling times of their populations in the sea. *Deep-Sea Res.* 19:189-198.
- T**
- Thingstad, T. F., U. L. Zweifel et F. Rassoulzadegan (1998). Indications of P-limitation for heterotrophic bacteria and phytoplankton in the NW Mediterranean summer surface waters. *Limnol. Oceanogr.* 43:88-94.
- Thomsen, H. A. (1982). Planktonic choanoflagellates from Disko Bugt, West Greenland, with a survey of the marine nanoplankton of the area. *Meddr. Gronlnd, Biosci.* 8:1-36.
- Thronsen, J. (1976). Occurrence and productivity of small marine flagellates. *Norw. J. Bot.* 23:269-293.
- Thronsen, J. et S. Kristiansen (1982). *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) as part of pico- and nanoplankton of the Barents Sea. *Polar Res.* 10:201-207.
- Toledo, G. et B. Palenik (1997). *Synechococcus* diversity in the California current as seen by RNA polymerase (*rpoC1*) gene sequences of isolated strains. *Appl. Environ. Microb.* 63:4298-4903.

U

- Uitto, A., A.-S. Heiskanen, R. Lignell, R. Autio et R. Pajunieni (1997). Summer dynamics of the coastal planktonic food web in the northern Baltic Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151:27-41.
- Urbach, E. et S. W. Chisholm (1998). Genetic diversity in *Prochlorococcus* populations flow cytometrically sorted from the Sargasso Sea and Gulf Stream. *Limnol. Oceanogr.* 43:1615-1630.

V

- Vaulot, D., R. J. Olson et S. W. Chisholm (1986). Light and dark control of the cell cycle in two marine phytoplankton species. *Exp. Cell Res.* 167:38-52.
- Vaulot, D. et S. W. Chisholm (1987). A simple model of the growth of phytoplankton populations in light/dark cycles. *J. Plank. Res.* 9:345-366.
- Vaulot, D. (1989). CytoPC: processing software for flow cytometric data. *Signal Noise* 2:8.
- Vaulot, D. et F. Partensky (1992). Cell cycle distributions of Prochlorophytes in the North Western Mediterranean Sea. *Deep-Sea Res.* 39:727-742.
- Vaulot, D., D. Marie, R. J. Olson et S. W. Chisholm (1995). Growth of *Prochlorococcus*, a photosynthetic prokaryotic, in the equatorial Pacific Ocean. *Science.* 268:1480-1482.
- Vaulot, D., N. Lebot, D. Marie et E. Fukai (1996). Effect of phosphorus on the *Synechococcus* cell cycle in surface in Mediterranean waters during summer. *Appl. Env. Microb.* 132:265-274.
- Vaulot, D. et D. Marie (1999). Diel variability of photosynthetic picoplankton in the equatorial Pacific. *J. Geophys. Res.* 104:3297-3310.
- Verity, P. G., D. K. Stoecker, M. E. Sieracki et J. R. Nelson (1996). Microzooplankton grazing of primary production at 140°W in the equatorial Pacific. *Deep-Sea Res.* 43:1227-1255.
- Videau, C. et F. Partensky (1990). Variability in the growth characteristics of *Gymnodinium* cf. *nagasakiense* (Dinophyceae) and its consequence on the determination of *in situ* growth rates. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 142:169-182.
- Vincent, W. F. et S. Roy (1993). Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: damage, protection, and recovery. *Environ. Rev.* 1:1-12.

W

- Walsh, I. D., W. D. Gardner et M. J. Richardson (1992). Transmission meter profiles in the Equatorial Pacific during the JGOFS EQPAC program: estimates of primary production. *Eos* 73:295.
- Walsh, I. D., S. P. Chung, M. J. Richardson et W. D. Gardner (1995). The diel cycle in the integrated particle load in the equatorial Pacific: a comparison with primary production. *Deep-Sea Res.* 42:465-477.
- Waterbury, J. B., S. W. Watson, R. R. L. Guillard et L. E. Brand (1979). Widespread occurrence of a unicellular marine planktonic cyanobacterium. *Nature* 277:293-294.
- Waterbury, J. B., S. W. Watson, F. W. Valois et D. G. Franks (1986). Biological and ecological characterization of the marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus*. Dans : *Photosynthetic phytoplankton*, T. Platt & W. K. W. Li. (Eds.). *Can. Bull. Fish Aquat. Sci.* 214:71-210.
- Waterbury, J. B. et F. W. Valois (1993). Resistance to co-occurring phages enables marine *Synechococcus* communities to coexist with cyanophages abundant in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:3393-3399.
- Wauthy, B., R. Desrosières et J. Le Bourhis (1967). Importance présumée de l'ultraplancton dans les eaux tropicales oligotrophes du Pacifique central sud. *Cah. O.R.S.T.O.M., Sér. Océanogr.* 5:109-116.
- Weiler, C. S. et S. W. Chisholm (1976). Phased cell division in natural populations of marine dinoflagellates from shipboard cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 25:239-245.
- Weinbauer, M. G., S. W. Wilhelm, C. A. Suttle et D. R. Garza (1997). Photoreactivation compensates for UV damage and restores infectivity to natural marine viruses communities. *App. Environ. Microb.* 63 :2200-2205.
- Weisse, T. (1993). Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. Dans : *Advances in microbial ecology*, Vol 13, J. G. Jones (Ed.), Plenum Press, N. Y., pp 327-370.
- Wilhelm, S. W., M. G. Weinbauer, C. A. Suttle et W. H. Jeffrey (1998). The role of sunlight in thermoal and repair of viruses in the sea. *Limnol. Oceanogr.* 43:586-592.
- Williams, P. J. L. et J. I. Robertson (1989). A serious inhibition problem from a Niskin sampler during plankton productivity studies. *Limnol. Oceanogr.* 34:1300-1305.
- Wilkner, J., F. Rassoulzadegan et A. Hagström (1990). Periodic bacterivore activity balances bacterial growth in the marine environment. *Limnol. Oceanogr.* 35:313-324.

- Wilson, H. W. et N. H. Mann (1997). Lysogenic and lytic viral production in marine microbial communities. *Aquat. Microb. Ecol.* 13:95-100.
- Wilson, W. H., S. Turner et N. H. Mann (1998). Population dynamics of phytoplankton and viruses in a phosphate-limited mesocosm and their effect on DMSP and DMS production. *Estuarine, coastal and shelf Sci.* 46: 49-59.
- Winfree, A. (1994). *Les horloges de la vie, les mathématiques des rythmes biologiques*. Pour la Science, diffusion Belin, 187 p.
- Withman, W. B., D. C. Coleman et W. J. Wiebe (1998). Prokaryotes : the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:6578-6583.
- Wommack, K. E., R. T Hill, T. A. Muller et R. R. Colwell (1996). Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1336-11341.
- Wood, A. M., P. K. Horan, K. Muirhead, D. A. Phiney, C. M. Yentsch et J. M. Waterbury (1985). Discrimination between types of pigments in marine *Synechococcus* spp. by scanning spectroscopy, epifluorescence microscopy and flow cytometry. *Limnol. Oceanogr.* 30:1304-1315.
- Wood, A. M., D. A. Phinney et C. S. Yentsch (1998). Water column transparency and the distribution of spectrally distinct forms of phycoerythrin containing organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 162:25-31.
- Wyman, M. (1999). Diel rhythms in ribulose-1,5 biphosphate crboxylase/oxygenase and glutamine synthetase gene expression in a natural population of marine picoplanktonic cyanobacteria (*Synechococcus* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.* 65:3651-3659.

Y

- Yahel, G., A. P. Post, K. Fabricius, D. Vaultot D., D. Marie et A. Genin (1998). Phytoplankton distribution and grazing near coral reefs. *Limnol. Oceanogr.* 43:551-563.
- Yee, M. C. et J. C. Bartholomew (1988). Light regulation of the cell cycle in *Euglena gracilis bacillaris*. *Cytometry* 9:387-393.
- Yeh, K.-C., S.-H Wu, J. T. Murphy et J. C. Lagarias (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277:1505-1508.
- Yentsch, C. M. et co-authors (1983). Flow cytometry and cell sorting: a technique for analysis and sorting of aquatic particles. *Limnol. Oceanogr.* 28 :1275-1280.
- Yentsch, C. M et C. S. Yentsch (1984). Emergence of optical instrumentation for measuring biological properties. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 22:55-98.

Z

- Zachary, A. (1978). An ecological study of bacteriophages of *Vibrio natriegens*. *Can. J. Microbiol.* 24 :321–324.
- Zachleder, V. et I. Setlik (1988). Distinct controls of DNA replication and of nuclear division in the cell cycles of the chlorococcal alga *Scenedesmus quadricauda*. *J. Cell Sci.* 91:531-539.
- Zeitzschel, B. (1978). Why study phytoplankton ? In : *Phytoplankton manual: Monographs on oceanographic methodology*, A. Sournia (Ed.), UNESCO Paris, p 1-5.
- Zettler, E. R., R. J. Olson, B. J. Binder, S. W. Chisholm, S. E. Fitzwater et R. M. Gordon (1996). Iron-enrichment bottle experiments in the Equatorial Pacific: Responses of individual phytoplankton cells. *Deep Sea Res.* 43:1017-1029.
- Zingone, A., D. Sarno et G. Forlani (1999). Seasonal dynamics in the abundance of *Micromonas pusilla* (Prasinophyceae) and its viruses in the Gulf of Naples (Mediterranean Sea). *J. Plank. Res.* 21: 2143-2159.
- Zubkov, M. V., M. A. Sleight, G. A. Tarran, P. H. Burkill et R. J. G. Leackey (1998). Picoplanktonic community structure on an Atlantic transect from 50°N to 50°S. *Deep-Sea Res.* 45:1339-1355.

GLOSSAIRE

GLOSSAIRE

Acide nucléique longue chaîne polymérique où alternent des désoxyriboses ou riboses (qui sont des sucres) et des groupements phosphate avec des bases azotées (à savoir l'adénine, la cytosine, la guanine et la thymine ou l'uracile suivant qu'il s'agit de la molécule d'ADN ou celle d'ARN).

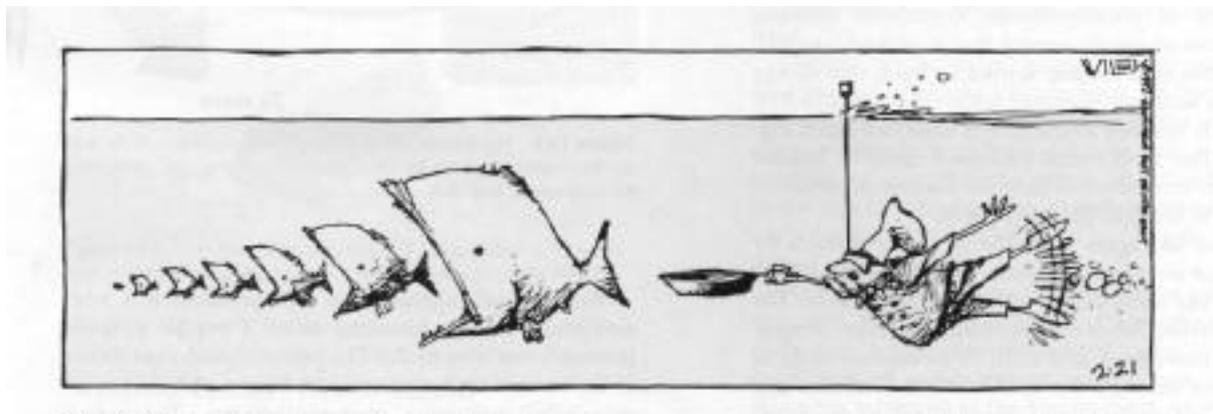
Adaptation structure particulière, processus physiologique ou encore comportement qui, dans l'évolution, permet à un organisme de mieux survivre ou de mieux se reproduire. C'est un processus évolutif.

Archéobactéries **micro-organismes** caractérisant une division d'origine ancienne, distincte des bactéries par des lipides spécifiques et l'absence de peptidoglycane dans leurs membranes. Les **bactéries** sont des **procaryotes**, c'est à dire des organismes dont les chromosomes ne sont dans une enveloppe nucléaire (par opposition aux **eucaryotes**).

Autotrophe (*auto* : soi-même, *trophe*: nourriture) se dit d'organismes capables de générer la matière organique à partir de substances minérales, d'eau et d'une source d'énergie (la lumière pour la **photosynthèse**, un composé réduit chimiquement pour la chimiosynthèse). Par opposition, les **hétérotrophes** (*hétéro*: autre, différent) n'en sont pas capables et dépendent directement ou indirectement des autotrophes, c'est à dire de molécules organiques déjà synthétisées.

Biomasse poids total de tous les organismes ou de l'un des groupes vivant dans une zone donnée.

Boucle microbienne traduit de l'anglais « **microbial loop** » ou « **microbial food web** »: caractérise les micro-organismes liés par des relations trophiques complexes (prédation, compétition, ...).



“Food web are never this simple!” Dessin extrait de Tom Garison. 1995. Oceanography: an invitation to marine science, 2nd edition, Wadsworth Publishing Company, 567 p.

Chlorophylle pigment vert associé aux chloroplastes des plantes et algues ou aux membranes de certaines bactéries, responsable de la capture de l'énergie solaire lors de la **photosynthèse**.

Ciliés organismes unicellulaires du phylum des protistes Ciliophora, se déplaçant au moyen de cils, c'est à dire d'organites semblables à des poils et plus petits que des flagelles.

Cohorte groupe d'organismes d'âge semblable.

Colorant, fluorochrome, marqueur se dit d'une substance chimique permettant la coloration du matériel biologique (typiquement les membranes, la chromatine, les protéines).

Communauté se dit des populations de toutes les espèces occupant un habitat particulier et interagissant avec ce dernier.

Couche (zone) euphotique zone comprise entre la surface et la profondeur où la lumière est encore suffisante pour que se déroule un processus photosynthétique effectif (d'après la définition de Pérès & Devéze 1963). Traditionnellement, cette profondeur est fixée au à celle recevant 1% de l'irradiance de surface. Cependant, la photosynthèse peut se dérouler à des intensités plus faibles (jusqu'à 0,1% de l'intensité lumineuse de surface).

CTD Conductivity, Temperature, Depth. Les capteurs mesurant ces différents paramètres sont associés à un système de bouteilles montées sur un support appelé rosette et qui s'ouvrent et se ferment en réponse à une commande électrique envoyée à partir du bateau pour assurer le prélèvement d'échantillons d'eau à une profondeur choisie.

Culture organismes cultivés en laboratoire dans des conditions contrôlées.

Cyanobactérie division des bactéries photosynthétiques n'ayant pas de reproduction sexuée, contenant de la chlorophylle *a* et des **phycobiliprotéines**.

Cycle biogéochimique cycle des éléments au sein des organismes et du milieu physique.

Cycle cellulaire étapes au cours desquelles une cellule passe de la naissance à la division.

DGGE technique permettant, après amplification de l'ARN 16S d'une communauté bactérienne par la réaction de polymérisation en chaîne (ou PCR de l'anglais Polymerisation Chain Reaction), de séparer les produits obtenus et d'estimer ainsi la diversité bactérienne au sein de communautés complexes.

Divinyl chlorophylle il s'agit d'un dérivé de la chlorophylle exclusivement présent chez les **prochlorophytes**.

Division cellulaire processus qui entraîne la séparation en deux cellules filles d'une cellule initiale, assurant ainsi la reproduction sous l'effet de la **mitose** ou de la **méiose**.

Ecologie étude des interactions entre les organismes et leur milieu de vie, y compris l'**environnement** physique et les autres organismes qui y vivent.

Ecosystème ensemble constitué des organismes d'un habitat particulier ainsi que leur milieu de vie.

Environnement tout ce qui entoure un organisme, de la matière vivante ou non ; la température, l'intensité lumineuse, les **espèces**... font partie de l'environnement ou milieu de vie.

Eucaryotes organismes dont le matériel génétique des cellules se trouve dans le noyau.

Facteur limitant se dit d'un facteur environnemental physique ou chimique dont l'absence ou la présence en quantité insuffisante limite la croissance normale des organismes.

FALS Forward Angle Light Scatter. En cytométrie en flux, correspond à la diffusion de la lumière à petit angle ($<15^\circ$)

Fenêtre en cytométrie en flux, terme désignant une zone ou région d'intérêt définie sur un cytogramme (représentation biparamétrique) ou un histogramme (représentation monoparamétrique) dans le but d'étudier une population ou un paramètre donné.

Flagellés eucaryotes unicellulaires qui se déplacent au moyen d'un ou plusieurs flagelles, c'est à dire de longs appendices en forme de fouet.

Front structure méso-échelle caractérisant la zone de transition, la frontière entre des masses d'eau ou d'air de densité différente. En milieu marin, un front se caractérise par un gradient horizontal marqué de salinité et de température.

Gène matériel génétique codant l'information pour une seule chaîne polypeptidique.

Génome ensemble des gènes (et des parties non codantes) d'un individu.

Géostrophique (littéralement de la terre qui tourne) se dit d'un phénomène résultant d'un équilibre entre la force de Coriolis et la gravité.

GLOBEC GLOBal Ocean ECosystems dynamics : Programme international ayant pour vocation de comprendre les causes des variations enregistrées par les populations d'organismes marins en réponse au changement climatique global et de poser la question de la diversité biologique.

Hétérocontes organismes planctoniques unicellulaires présentant deux flagelles de taille inégale. Ce groupe constitue fort probablement le groupe le plus diversifié des picoeucaryotes (eucaryotes de taille inférieure à $3 \mu\text{m}$). On y trouve des diatomées de tailles picoplanctonique, la classe des Chrysophyceae qui est une classe mixte contenant des autotrophes, des hétérotrophes et des mixotrophes, la classe des Pelagophyceae (Andersen *et al.* 1993) avec

Pelagomonas calceolata comme espèce type, et encore la classe nouvellement décrite des Bolidophyceae (Guillou *et al.* 1999a).

Histogramme biparamétrique ou cytogramme. En cytométrie en flux, histogramme représentant chaque événement par un point dont l'abscisse indique l'intensité du premier paramètre et l'ordonnée l'intensité du second paramètre.

Histogramme monoparamétrique en cytométrie en flux, histogramme de fréquence indiquant le nombre de cellules en ordonnées et la valeur du paramètre analysé en abscisses.

Hôte organisme qui héberge un parasite et lui assure son alimentation pour se développer et se reproduire.

Hybridation *in situ* technique employant des **sondes** moléculaires (fluorescentes dans le cas de l'hybridation fluorescente) permettant l'identification de séquences géniques spécifiques par appariement chimique grâce aux liaisons hydrogène entre la sonde et la séquence nucléotidique recherchée.

Indice mitotique la méthode dite de l'indice mitotique, formalisée par McDuff & Chisholm (1982) et Vaultot (1992) consiste à transformer la courbe de fréquence des cellules dans un événement terminal du cycle cellulaire (la mitose par exemple) en courbe du taux de division. Un dérivé de cette méthode est celle de la **fréquence de cellules se divisant** formalisée par Hagström *et al.* (1979) qui consiste à établir la relation entre la fraction de cellules se divisant (c'est à dire ayant un septum) et le taux de division. Ces deux méthodes présentaient de sérieux inconvénients et ont laissé la place à la méthode d'estimation basée sur le **cycle cellulaire** (Carpenter & Chang 1988).

JGOFS Joint Global Ocean Flux Study : Programme international de recherche océanographique. Le but de ce programme, en cours d'achèvement, a été de déterminer les processus contrôlant le flux du carbone entre l'océan et l'atmosphère et d'améliorer la capacité d'effectuer des prédictions à l'échelle globale de la réponse de l'océan et de l'atmosphère face à l'activité anthropique.

LASER vient de l'anglais *light amplification by stimulated emission of radiation* et désigne un appareil qui génère un faisceau lumineux très fin, très intense et cohérent.

Lyse, lysogénie la lyse correspond à l'éclatement d'une cellule. On parle de cycle lytique ou lysogène suivant que les **virus** infectant les cellules se reproduisent et font éclater leur cellule hôte ou bien que l'ADN viral est intégré dans le chromosome de la cellule hôte, le tout restant sous une forme relativement stable.

Métabolisme ensemble des processus biochimiques qui se produisent dans les cellules et dont la finalité est, en particulier, la production d'énergie et la synthèse de molécules nécessaires à leur bon fonctionnement.

Micro-organisme tout organisme microscopique telles que les bactéries et les algues unicellulaires.

Mitose la mitose est le processus de division cellulaire qui, contrairement à la méiose, produit deux cellules filles souvent très semblables à la cellule mère, en particulier dans la quantité et la qualité du matériel génétique.

Nutriments substances nutritives (organiques ou inorganiques) indispensables au cycle de vie des organismes.

Oligotrophe, mésotrophe, eutrophe se dit respectivement d'un milieu pauvre, moyennement riche et riche en nutriments. Les critères permettant de définir le niveau trophique d'une région océanique sont généralement la quantité de chlorophylle par unité de volume ou encore la concentration en nitrates. Il est plus difficile de déterminer les limites sur la base de la concentration en éléments inorganiques. On estime en général qu'en milieu oligotrophe, la concentration en nitrates est inférieure à $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ et qu'elle est supérieure à $5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ en milieu eutrophe. Le tableau ci-dessous résume, sur la base du premier critère, la surface océanique et la production biologique annuelle qui caractérisent chaque situation trophique (d'après Antoine et al. 1996).

Province	Chlorophylle mg.m^{-3}	Surface %	Production	
			%	$\text{gC.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$
Oligotrophique	$[\text{Chl}] < 0,1$	55,8	44,0	91,0
Mésotrophique	$0,1 < [\text{Chl}] < 1$	41,8	47,5	131,5
Eutrophique	$[\text{Chl}] > 1$	2,4	8,5	422,0

Organique relatif à la matière vivante.

Paradigme modèle théorique de pensée qui apporte son concours à la réflexion scientifique.

Photomultiplicateur cellule photoélectrique qui transforme l'énergie lumineuse en énergie électrique et qui assure l'amplification de l'énergie des électrons.

Photosynthèse réaction chimique utilisant l'énergie solaire pour effectuer la synthèse de matériel glucidique et la production d'oxygène à partir d'eau et de dioxyde de carbone.

Phycobiliprotéines famille de protéines caractéristiques des cyanobactéries liées de manière covalente avec des groupes prosthétiques tétrapyrrole (ou bilines). Il existe 4 types de biline : la phycocyanine, la phycobilivoline, la phycoérythrobiline et la phycourobiline.

Physiologie étude du fonctionnement normal et des propriétés des organes, tissus, cellules des êtres vivants.

Pigment composé qui absorbe la lumière visible. On parle de pigments accessoires pour ceux qui absorbent et transfèrent l'énergie à la chlorophylle pour la photosynthèse.

Plancton organismes marins ou d'eau douce, animal ou végétal, flottant librement et qui pour la plupart se déplacent passivement avec les courants.

Population tout groupe d'organismes qui coexistent en même temps et au même endroit et qui sont capables de se reproduire entre eux.

Procaryote se dit d'une cellule dont le génome n'est pas compartimenté dans le noyau. Par opposition, les eucaryotes disposent d'un véritable noyau délimité par une membrane.

Prochlorophyte organisme unicellulaire procaryote appartenant à la division des Cyanophyta présentant des dérivés chlorophylle *a* et *b* et pas de phycobiliprotéines à l'exception des souches de profondeur de *Prochlorococcus*. Les études de phylogénie moléculaire ont révélé qu'il s'agissait d'un groupe polyphylétique, ne présentant pas d'ancêtre propre commun.

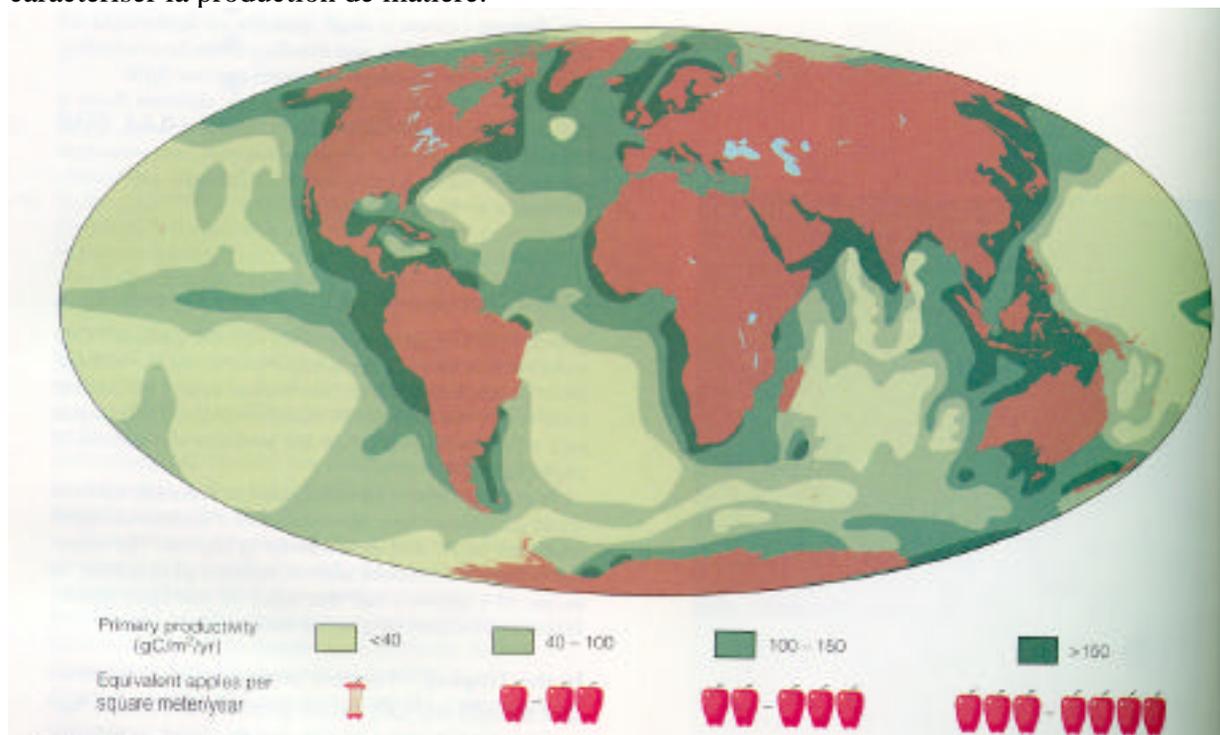
Production quantité de matière produite par unité de temps.

Production primaire nette quantité correspondant à la photosynthèse des organismes autotrophes sans la respiration. Sinon on parle de **production brute ou globale**.

Productivité capacité à produire par unité de temps ou taux de croissance relatif. L'inverse de la productivité est le taux de renouvellement de la biomasse (en anglais « turnover »).

A l'échelle du globe, on mesure la productivité primaire océanique en gramme de carbone par unité de surface (typiquement le mètre carré) et par unité de temps (typiquement l'année) : $\text{gC}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{an}^{-1}$

Les chiffres caractérisant la production primaire ne sont pas forcément très parlants. Dans son livre, « Oceanography: an invitation to marine science », Tom Garison propose un schéma de la productivité primaire océanique globale en associant celle-ci à un référent originale : la quantité de pomme produite sur la même unité de surface et de temps. La carte ci-dessous permet alors de mieux comprendre ce à quoi correspondent les chiffres donnés pour caractériser la production de matière.



Protéine molécule organique formée de quelques dizaines à quelques centaines d'acides aminés dont l'ordre et le nombre sont dictés par l'information contenue dans les gènes. Les enzymes sont des protéines.

Pycnocline couche intermédiaire de l'océan dans laquelle la densité augmente rapidement avec la profondeur. La température chute et la salinité augmente dans cette zone.

RALS Right Angle Light Scatter. En cytométrie en flux, correspond à la diffusion de la lumière à angle droit.

Seuil valeur d'un paramètre qui sert de limite inférieure retenue pour la prise en considération des objets analysés. On l'utilise souvent pour éliminer le bruit électronique ou des débris cellulaires.

Sonde nucléique ce sont des séquences nucléotidiques d'ADN ou ARN de taille variable permettant la reconnaissance et l'identification de séquences géniques spécifiques.

Sous-espèce sous division de l'espèce. Population ou ensemble de populations occupant une zone discrète et différant génétiquement des autres groupes géographiques de la même espèce.

Stress terme d'origine anglaise désignant un ensemble de perturbations, notamment physiques, qui agresse l'organisme.

Ultraviolets les rayons ultraviolets ou UV appartiennent au rayonnement électromagnétique émis par le soleil, absorbés par la couche d'ozone de la haute atmosphère. Ils sont invisibles à l'œil humain et se situent dans des longueurs d'onde comprises entre 200 et 400 nm.

Virus particule infectieuse ultramicroscopique composée d'un acide nucléique et de protéines (quelque fois de lipides) et qui ne peut se reproduire que dans des cellules vivantes hôtes. On parle de virion pour l'unité ou particule minimale virale capable d'infecter une cellule.

WOCE World Ocean Circulation Experiment : Programme international visant à fournir des modèles améliorés de la circulation océanique avec l'objectif final de pouvoir prédire les variations climatiques à long terme. Ce programme qui vient de se terminer a été le plus important jamais mis en place, réunissant plus de 40 nations.

RESUMÉ Dynamique des populations picoplanctoniques marines

Etablir comment la variabilité temporelle et spatiale de l'environnement structure les réponses biologiques à l'échelle de la population, de la cellule, et depuis peu au niveau moléculaire, est un thème central de l'océanographie biologique contemporaine. La boucle microbienne, c'est-à-dire la communauté formée par le picoplancton photosynthétique, les bactéries hétérotrophes et le microzooplancton, est extrêmement dynamique. L'échelle temporelle avec laquelle ces phénomènes ont été étudiés précédemment (celle de la semaine ou du mois) s'est révélée inadéquate pour cerner cette dynamique. En développant des méthodes d'échantillonnage appropriées et en utilisant la cytométrie en flux comme outil d'analyse, nous avons pu concentrer notre attention sur l'échelle de la journée pour tenter de mieux comprendre la variabilité à petite échelle car c'est elle qui *in fine* pourrait expliquer les évolutions à long terme des populations. Au laboratoire, nous nous sommes intéressés aux processus de synchronisation des populations par la lumière en étudiant l'effet d'entraînement d'un rythme circadien jour-nuit sur différentes souches et espèces de *Prochlorococcus*, *Synechococcus* et de picoeucaryotes. Cette étude a permis de révéler la complexité des processus de synchronisation, ces derniers variant considérablement entre les populations au regard de la phase, de l'amplitude des différents paramètres mesurés comme la taille, le contenu en chlorophylle et le cycle cellulaire mais également au regard du moment des événements remarquables (réplication de l'ADN, division). Ces résultats permettront de mieux interpréter les variations observées dans la nature pour ces populations. Une attention plus particulière portée à *Prochlorococcus* (l'organisme photosynthétique le plus abondant de la biosphère) nous a permis de montrer que le signal synchronisant la réplication de l'ADN chez ce dernier est lié au lever du jour. En rade de Villefranche-sur-mer, une approche très fructueuse pour l'étude de la dynamique haute fréquence du picoplancton a été celle liée à l'utilisation du cycle cellulaire. Après marquage de l'ADN des cellules par le SYBR-Green I (un nouveau colorant), le cycle cellulaire d'une population de *Synechococcus* a pu être facilement visualisé par cytométrie en flux, révélant la très bonne synchronisation de la réplication de l'ADN et de la division de la cyanobactérie, qui ont lieu en fin de journée. Cette étude a surtout permis de montrer que le taux de croissance pouvait varier d'un jour à l'autre en réponse aux fluctuations de l'environnement lumineux (c'est à dire de la couverture nuageuse) mais également que les consommateurs s'adaptaient très rapidement (en un jour) aux variations du taux de croissance. En mer d'Alboran, nous avons analysé comment la dynamique des populations était influencée par l'hydrologie locale (soit un système jet-front géostrophique marqué), l'alternance jour-nuit restant toutefois le stimulus majeur pour expliquer les rythmes journaliers enregistrés pour les paramètres cellulaires (taille et fluorescence pigmentaire).

ABSTRACT Dynamics of marine picoplankton populations

Variability is important in the upper ocean and concerns time and space as well as physical, chemical and biological parameters. Recently, the short time scale variability of biology-related parameters of the planktonic community such as cell abundance and size, pigment fluorescence or cell cycle has received increased attention with evidence of growth and loss processes occurring at the daily scale. Using high frequency data sampling, acquisition and analysis techniques, we concentrated our work on the short time scale variability of picoplankton since it is very relevant to long term evolution. First a comparative study of the effect of a light-dark cycle on the phasing of cell parameters such as scatter, pigment fluorescence and cell cycle on a variety of marine picophytoplanktonic strains and species of *Prochlorococcus*, *Synechococcus* and picoeukaryotes was investigated using flow cytometry. Processes of synchronization were complex and differed among species, as revealed by phase and magnitude of oscillations of scatter, fluorescence or cell cycle. These results should help to interpret diel variations in oceanic optical properties in regions where picoplankton dominate. Second, we concentrated our attention on the cell cycle regulation by light of *Prochlorococcus*, likely the most important photosynthetic organism on earth, and we showed that the onset of light is the signal responsible of cell cycle synchronization. In the field, one local study and one cruise study were performed to assess the high frequency variability of picoplanktonic populations. In Villefranche Bay, the cell cycle approach was very useful to study the dynamics of *Synechococcus*. Its cell division cycle was tightly coupled to the daily light cycle, allowing to estimate growth rate, which averaged 0.95 d^{-1} (SD = 0.16, n = 7). A major result was the day-to-day variability of division rate that could be related directly to irradiance and cloud cover influence. In addition, this study revealed that grazers could adapt very rapidly (in one day) to *in situ* growth rate changes. In the Alboran Sea, we showed that picoplankton were highly dynamic and affected by physical forcing, the day-night alternance being the main factor to explain clear diel patterns recorded for all the cellular parameters of the populations.

DISCIPLINE

Océanologie biologique et environnement marin

MOTS-CLÉS

Picoplancton, écologie, dynamique haute fréquence

INTITULÉ ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Station biologique, UPMC - CNRS - INSU, Equipe Phytoplancton Océanique, BP 74, 29680 Roscoff.