HAL
open science

La phosphatase alcaline en milieu marin : ses caractéristiques, son évolution spatiotemporelle, son origine et sa régulation en relation avec le métabolisme des composés phosphorés dans la rade de Toulon

Lespilette Magali

To cite this version:

Lespilette Magali. La phosphatase alcaline en milieu marin : ses caractéristiques, son évolution spatiotemporelle, son origine et sa régulation en relation avec le métabolisme des composés phosphorés dans la rade de Toulon. Sciences de l'environnement. Université du Sud Toulon Var, 2009. Français. NNT : . tel-00641975

HAL Id: tel-00641975

https://theses.hal.science/tel-00641975v1

Submitted on 17 Nov 2011

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.

THESE

Pour obtenir le titre de Docteur de l'Université du SUD TOULON-VAR

U.F.R. Sciences et Techniques
Spécialité : Sciences de l'environnement
Année 2009

Présentée et soutenue publiquement le 10 décembre 2009 par

Magali LESPILETTE

La phosphatase alcaline en milieu marin : ses caractéristiques, son évolution spatiotemporelle, son origine et sa régulation en relation avec le métabolisme des composés phosphorés dans la rade de Toulon

Composition du Jury :

Gérard Bogé, Maître de Conférences, Directeur de thèse.	**Examinateur**
Didier Debroas, Professeur d'université.	**Rapporteur**
Yves Collos, Directeur de Recherches CNRS.	**Rapporteur**
Jean Louis Jamet, Professeur d'université, Co-Directeur de thèse.	**Examinateur**
Hélène Roche, Ingénieur de Recherche CNRS.	**Examinateur**

A ma fille Eléa

« *La science ne sert guère qu'à nous donner une idée de l'étendue de notre ignorance ...mais c'est encore ce qu'on a trouvé de mieux pour expliquer notre Univers* »

Félicité de Lamennais

"*If you* try *the best you can*. *The best you can is good enough*"

Radiohead- *Optimistic*

REMERCIEMENTS

La toute première expression de ma gratitude en cet incontournable exercice de remerciements ne saurait être destinée à nul autre qu'à Gérard Bogé, mon directeur de thèse. Sa bienveillance alliée à son enthousiasme scientifique intarissable a accompagné et soutenu sans faillir les longues et angoissantes années de thèse qui s'achèvent.

Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon admiration.

Je n'oublie pas que la chance m'a pourvue de deux directeurs de thèse et je souhaite remercier Jean Louis Jamet pour m'avoir fait bénéficier de son expérience et de son chaleureux soutien.

Un grand merci à Yves Lucas pour m'avoir accueillie dans son laboratoire et pour m'avoir soutenue dans les dernières années, certes un peu difficiles, de ma thèse. Je suis vraiment reconnaissante pour toutes les dérogations dont j'ai pu bénéficier.

Je tiens à remercier Yves Collos et Didier Debroas pour m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse. L'attente de l'envoi de mon manuscrit fut longue mais j'espère qu'elle en valait la peine !

Je remercie Hélène Roche pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse.

Je remercie également le conseil régional de Provence-Alpes-Côte d'Azur pour les trois années d'allocation de recherche dont j'ai bénéficié pour mener à bien mes travaux, ainsi que Guirec Queffeulou pour avoir réalisé l'interface avec le Contrat de Baie de la Rade de Toulon, partenaire socio-économique de notre travail.

Ces remerciements sont pour moi l'occasion d'un retour nostalgique en arrière. Le chemin parcouru, n'aurait pu l'être sans l'intervention de nombreuses personnes que je souhaite ici remercier plus personnellement.

Je remercie à nouveau Yves Collos pour avoir accepté de diriger mes travaux de DEA qui m'ont ouvert la voie vers la planctonologie et l'écophysiologie, que Gérard Lasserre soit également remercié pour m'avoir recommandée à Jean Louis Jamet dans l'optique de cette thèse.

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire PROTEE, en particulier l'équipe EBMA ; l'enthousiasme, le bonheur évident à la recherche, l'ouverture d'esprit et la bonne humeur qui y règnent ont indéniablement développé mon goût pour la recherche. Je me dois de souligner en particulier le souci remarquable de ses membres aux nombreux problèmes matériels que peut rencontrer un doctorant. Des remerciements tout particuliers à Dominique Jamet pour son initiation à la détermination phytoplanctonique et pour ses connaissances sur la phosphatase alcaline, mais aussi pour tous les moments amicaux que nous avons passés ensemble. Merci à Simone Richard pour m'avoir initiée à la taxonomie zooplanctonique mais aussi pour nos discussions philosophiques autour d'un repas.

Un grand merci à Nadège pour avoir partagé ce statut de doctorante pendant quelques années avec moi, je peux témoigner de son enthousiasme débordant pour la recherche et de sa rigueur scientifique, je lui souhaite autant de réussite que possible pour la suite.

Je remercie également Natacha Jean et Romain Garrouste pour leur présence et leur soutien.
Au sein de l'équipe CAPTE je tiens à remercier plus particulièrement Stéphane Mounier, Gaël Durrieu et Yoann Louis pour m'avoir expliqué avec beaucoup de patience le fonctionnement du minéralisateur à micro-ondes. Je suis également reconnaissante envers Christophe Le Poupon pour ses dosages de nitrates.
Je n'oublie pas Marien Mas, à l'origine du programme de calcul pour les constantes cinétiques.
Nul doute que j'englobe tous les visiteurs du projet, assidus ou inconstants (ou stagiaires et étudiants) dans ces remerciements. Ils contribuent à l'activité scientifique bouillonnante qui y règne.
Je tiens également à souligner que ce travail de thèse n'aurait pu avoir lieu sans l'IUT Génie Biologique de l'USTV, qui m'a fourni les moyens matériels, notamment les salles de travail. Merci donc à Bruno Rossetto et son successeur Robert Chanu à la direction de cet institut mais aussi aux directeurs de département de Génie Biologique qui se sont succédés depuis mon arrivée : Michel Camail, Joël Grillasca et Sebastien Frizzi.
J'en profite pour remercier également tout le personnel enseignant, technique, administratif et d'entretien du département de Génie Biologique, en particulier Denise, Lydie, Sophie, Gisèle, Françoise et Sylvie pour leur soutien technique et administratif mais aussi pour avoir partagé des moments inoubliables de rires et de bonne humeur, lors des nombreux repas et pots en tous genres. Il est bien difficile de ne pas faire que la thèse envahisse peu à peu sa vie privée, à commencer par les collègues qui deviennent des amis, heureusement que les amis ne deviennent pas des collègues...
Enfin ces quelques lignes de remerciements plus personnels s'adressent en premier lieu à Laëtitia et Véronique qui ont suivi cette thèse en même temps que les leurs et dont l'indéfectible soutien n'est pas étranger à sa réussite. Je tiens aussi à les remercier pour leurs conseils avisés et bien sur pour leur amitié.
Mes amis se reconnaîtront certainement et je les remercie de leur présence et de leur soutien.
Pour terminer, ces dernières lignes sont dédiées à ma famille, et plus particulièrement à ma mère et mon compagnon Olivier qui ont toujours soutenu mon projet sans me juger, j'espère les avoir rendus fiers de ce que j'ai accompli.
L'angoisse m'étreint, que ces dernières lignes ne sanctionnent un impardonnable oubli de ceux que je n'aurais pas dû oublier. Qu'ils reçoivent ici l'expression de mon estime et de ma gratitude.

GLOSSAIRE et ABREVATIONS

Activité spécifique : Activité par litre/ Concentration Protéines
Activité totale : Activité particulaire + Activité dissoute
Km : Constante de Michaelis Menten, concentration en substrat correspondant à Vmax/2
Km1 : Constante de Michaelis Menten de la composante à faible affinité
Km2 : Constante de Michaelis Menten de la composante à forte affinité
Vmax : Activité correspond à une concentration infinie
Vm1 : Vitesse maximale de la composante à faible affinité
Vm2 : Vitesse maximale de l'activité à forte affinité
Vmax totale : Vm1 + Vm2

Substrats de la phosphatase alcaline :
MUF-P : méthylumbelliféryl phosphate
MUF : méthylumbelliferone
pNPP : paranitrophényl phosphate
pNP : paranitrophénol
ELF-97-P: Enzyme-labelled fluorescence-97- phosphate (2-(5'-chloro-2-phosphoryloxyphenyl)-6-chloro-4(3H)-quinzanolinone)

DIN : Azote inorganique dissous
PID : Phosphore inorganique dissous
PHPase : phosphore organique dissous hydrolysable par la phosphatase alcaline
PNHPase : phosphore organique dissous hydrolysable par d'autres enzymes que la phosphatase alcaline
PNH : phosphore organique dissous non hydrolysable (oxydable)
POD : Phosphore organique dissous
POH : phosphore organique hydrolysable dissous
PP : Phosphore particulaire
PT ; Phosphore total
SRP : Phosphore réactif au molybdate, équivalent du PID.
SNP : phosphore non réactif au molybdate (PT – SRP)

PT: PP + PD
PD: PID + POD
POD: POH + PNH
POH: PHPase + PNHPase

MAGIC: MAGnesium Induced Coprecipitation
AFNOR: Association Française de NORmalisation
ATPase: Adenosine Tri-Phosphatase

SOMMAIRE

Introduction **10**
1. La Méditerranée, mer oligotrophe 10
2. Le cycle du phosphore 12
3. La reminéralisation du phosphore organique par les phosphoestérases 16
4. Objectifs de la thèse 21
5. Plan d'organisation du manuscrit 22

Présentation des sites d'études **25**
1. La Méditerranée : rappels d'océanographie régionale 25
2. La rade de Toulon, contexte géographique et description des sites d'études 26

Matériel et méthodes **31**
1. Echantillonnage 32
2. Etude des paramètres physicochimiques 32
3. Mesures des activités phosphatasiques 38
4. Etude des communautés planctoniques 47
5. Analyse statistique des données 53

Résultats, Chapitre I : Le phosphore et les paramètres abiotiques **55**
1. Précipitations,vents, température 56
2. Paramètres physico-chimiques de la qualité de l'eau 58
3. Relations entre l'évolution des concentrations en nutriments et les précipitations 70
4. Résumé 71

Résultats, Chapitre II : Etude des caractéristiques biochimiques de l'activité phosphatasique **73**
1. Etude des cinétiques des activités moyennes annuelles 74
2. Mise en évidence des activités intracellulaires et exoenzymatiques 81
3. Dépendances de pH de l'activité phosphatasique 85
4. Résumé 98

Résultats, Chapitre III : Analyse des activités phosphatasiques de l'eau de mer au cours d'un cycle annuel **101**
1. Evolution de la Vmax totale de l'activité de l'eau de mer 103
2 Evolution des activités phosphatasiques à fortes et faibles affinités 110
3 Résumé 124

Résultats, Chapitre IV : Analyse de l'activité particulaire des différentes fractions de taille au cours d'un cycle annuel **125**
Partie I: La Petite Rade de Toulon *126*
1. Activités du matériel particulaire broyé 127
2. Activités du matériel particulaire intact 153
Partie II: La Grande Rade de Toulon *159*
1. Activités du matériel particulaire broyé 160
2 Activités du matériel particulaire intact 185

Résultats, Chapitre V : mise en évidence des relations entre les activités phosphatasiques et les principaux groupes planctoniques **189**
1. Paramètres biotiques 191
2. Relations avec les activités phosphatasiques particulaires 201
3. Relations avec les activités phosphatasiques dissoutes 212
4. Résumé 214

Résultats, Chapitre VI : mise en évidence des relations entre les activités phosphatasiques et les composés phosphorés **215**
1. Relations avec les concentrations en orthophosphates 215
2. Relations avec les rapports NO_3^-/ PO_4^{3-} 221
3. Résumé 222

Discussion **225**
1. Méthodologie 225
2. Caractéristiques, évolution spatiotemporelle, origine et régulation de la phosphatase alcaline en relation avec le métabolisme des composés phosphorés 229

Synthèse **243**

Bibliographie **247**

Introduction

1. La Méditerranée, mer oligotrophe

La Méditerranée, en raison de ses spécificités (mer semi-fermée, pression anthropique croissante), est une zone vulnérable, particulièrement sensible aux forçages chimiques (Bethoux *et al.*, 2002) ou aux changements climatiques. Elle présente un environnement globalement oligotrophe (McGill, 1961). A toutes profondeurs, ses concentrations en nutriments sont très inférieures à celles de l'Océan Mondial. Cette situation *a priori* surprenante, est due à son régime hydrologique. Par le détroit de Gibraltar, elle reçoit un courant d'eau superficielle atlantique déjà appauvri en nutriments par l'activité biologique. A l'intérieur du bassin, les apports continentaux augmentent les teneurs initiales des eaux entrantes. Mais les nutriments ne s'accumulent pas ; ils sont captés et précipités par les organismes marins. Puis ils sont évacués par le contre courant profond sortant à Gibraltar, beaucoup plus riche que l'eau superficielle entrante. De ce fait, les concentrations en sels nutritifs en Méditerranée restent très inférieures à celles de l'Océan adjacent (Lacombe, 1988).

La Méditerranée reçoit également d'importantes charges de nutriments d'origine naturelle et anthropique, drainées par les eaux de son bassin versant. Elle est également (plus particulièrement la région Nord-Ouest) soumise à de nombreux apports atmosphériques impulsionnels (naturels et principalement sahariens) et continus (anthropiques) riches en éléments nutritifs (azote, phosphore) et micro-nutritifs (Fer) (Ridame, 2001 ; Migon, 2004 ; Bartoli *et al.,* 2005). Les sources atmosphériques proches, abondantes et contrastées semblent jouer un rôle important dans le forçage chimique de la production primaire, notamment en période de stratification quand l'atmosphère devient la principale source d'apport de nutriments

En raison de ce déficit en nutriments, la biomasse planctonique de Méditerranée est faible. La biomasse chlorophyllienne moyenne est équivalente à 18,5 µg C/l. La production primaire est essentiellement assurée par des organismes pico-autotrophes de taille inférieure à 5 µm tels que les cyanobactéries comme les *Prochlorococcus* (Vaulot *et al.,* 1996 ; Moutin *et al,.* 2002), en particulier en été. Les producteurs primaires excrèteraient sous forme de carbone organique dissous un peu moins de 20 % de leur production carbonée (Fernandez *et al.*, 1994).

La Méditerranée possède une autre particularité ; son rapport de Redfield N/P est voisin de 20 dans sa partie occidentale et de 22 dans sa partie orientale, voire même davantage (Mc Gill,

1969 ; Raimbault et Coste, 1990), alors qu'il n'est de 15 à 16 pour l'Océan mondial (Redfield *et al.,* 1963). Un taux de fixation élevé de l'azote atmosphérique par l'écosystème méditerranéen (posidonies, bactérioplancton pélagique) pourrait en être à l'origine (1986 ; Bonin *et al.,* 1989 ; Sachs et Repetta, 1999 ; Kerhervé *et al*. 2001). Au contraire de l'azote, le phosphore provient essentiellement des apports de cours d'eau (Froelich, 1988 ; Moutin *et al.,* 1998 ; Benitez-Nelson 2000), des apports atmosphériques d'origine continentale (Benitez-Nelson 2000), saharienne (Guerzoni *et al.,* 1999 ; Ridame et Guieu, 2002), ou anthropique (Migon et Sandroni, 1999 ; Migon *et al.,* 2001).

Un débat concernant la limitation de la production primaire de la Méditerranée par l'azote ou le phosphore existe. En raison des faits évoqués ci-dessus, de nombreux auteurs placent le phosphore comme étant l'élément essentiellement limitant (Berland *et al.,* 1980 ; Raimbault *et al.,* 1995 ; Bethoux *et al*, 1998 ; Moutin et Raimbault, 2002). Cette hypothèse est renforcée par le fait que les poussières atmosphériques riches en fer en provenance du Sahara, ainsi que les argiles, piègent les phosphates par adsorption (Krom *et al*., 1991, Ridame *et al.,* 2003). Une étude récente (Krom *et al.,* 2005) entreprise à une très large échelle en Méditerranée orientale et basée sur l'analyse de toutes les fractions du phosphore (PID, POD, PP), a permis de montrer que cet élément était limitant, plutôt par carence qu'en raison d'une trop forte assimilation par les organismes vivants.

L'éventualité d'une succession de limitations a été aussi envisagée. La limitation pourrait passer de l'azote au phosphore et vice-versa selon les conditions trophiques (Marty *et al.* 2002). Par ailleurs, il a été montré en Méditerranée, que l'absorption des nitrates par le phytoplancton est stimulée par l'addition de phosphate (Raimbault et Pujo-Pay 1993 ; Diaz *et al.*, 2001 ; Moutin et Raimbault, 2002), et que les apports de phosphate pouvaient favoriser la fixation d'azote atmosphérique par les cyanobactéries dominantes en période oligotrophe (Bethoux et Copin-Montegut, 1986 ; Bonin *et al.*, 1989).

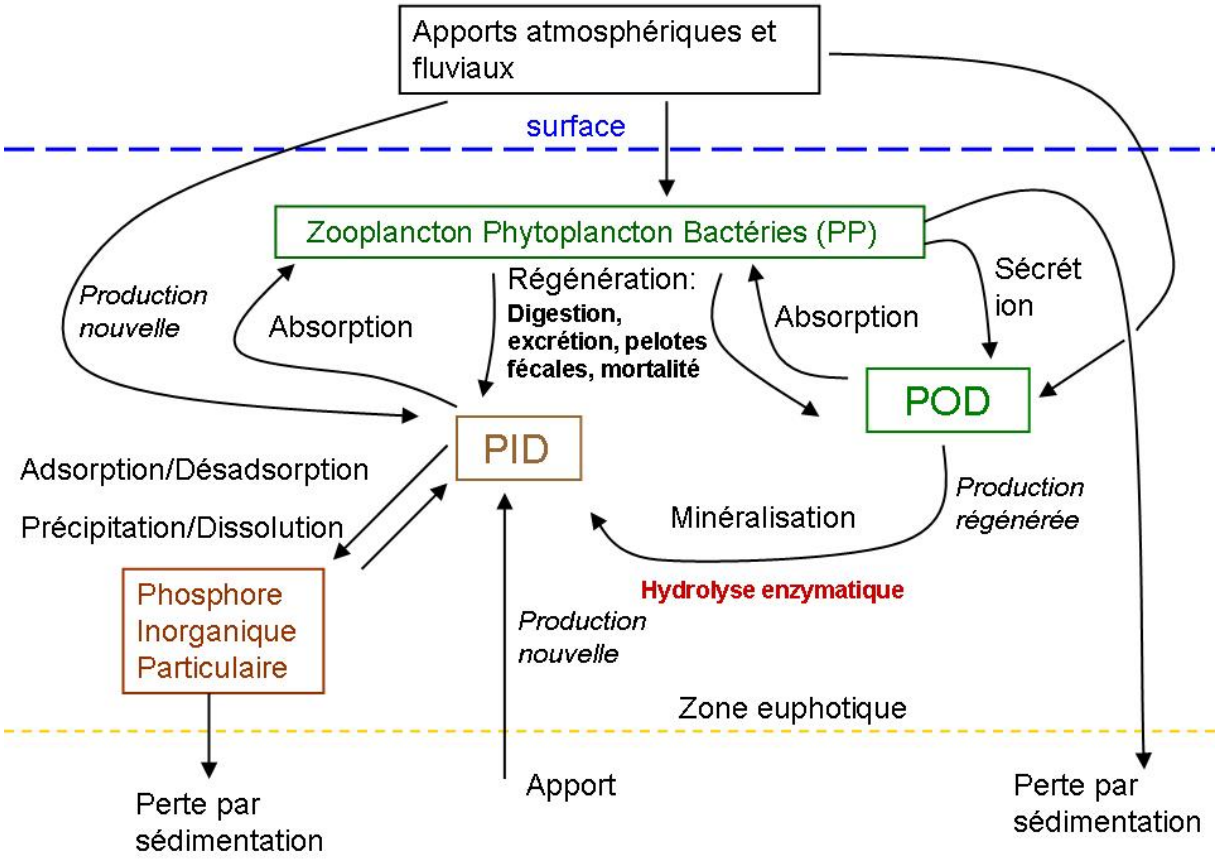

Figure 1 : le cycle du phosphore en milieu marin dans la zone euphotique de la colonne d'eau

2. Le cycle du phosphore

Le cycle biogéochimique du phosphore (figure 1) est beaucoup plus simple que celui de l'azote. En effet, contrairement aux nitrates, les phosphates ne présentent qu'un seul degré d'oxydation stable (degré V). En Méditerranée occidentale et orientale ces échanges ont été analysés par divers auteurs (Durrieu de Madron *et al.,* 2003 ; Krom *et al.*, 2005). Ce cycle est présenté de façon synthétique dans la figure 1.

Les entrées de phosphore sont liées aux apports fluviaux, atmosphériques et dans certaines parties du globe, volcaniques (Benitez-Nelson, 2000). En Méditerranée les entrées fluviales proviennent essentiellement du Rhône et du Nil, les apports du Nil étant de moindre importance depuis la construction du barrage d'Assouan. Concernant les apports atmosphériques, les travaux de Ridame (2001) ont montré que les aérosols sahariens constituent une source significative de phosphate à la couche de surface. L'impact de ces apports sahariens sur la production primaire est considéré comme négligeable à l'échelle annuelle. Cependant la production induite par un apport de phosphate saharien en période

d'oligotrophie peut représenter jusqu'à 15 % de la production primaire dans la couche mélangée de surface. La biomasse issue de ces apports extérieurs en phosphore constitue la production nouvelle.

Les principaux réservoirs de phosphore de la colonne d'eau du milieu marin sont des composés minéraux et organiques, dissous et particulaires. Les fractions mesurées analytiquement sont le phosphate soluble réactif (SRP), le phosphate soluble non réactif (SNP), le phosphate particulaire (PP) et le phosphate total (PT) (Benitez-Nelson, 2000).

Le phosphore inorganique se trouve essentiellement sous forme dissoute. Ce phosphore inorganique dissous (PID), assimilé au SRP, est présent dans l'eau sous forme d'ions phosphate correspondant à l'équilibre de dissociation de l'acide orthophosphorique :

$$H_3 PO_4 \leftrightarrow H_2PO_4^- + H^+ \leftrightarrow HPO_4^{2-} + 2H^+ \leftrightarrow PO_4^{3-} + 3H^+$$

Les constantes d'équilibre de ce triacide dans l'eau de mer ont pour valeur :

$$K_1 = 10^{-1,58} \quad K_2 = 10^{-5,98} \quad K_3 = 10^{-8,71}$$

Dans l'eau de mer, à pH 8,1, 19,6 % des ions phosphates se trouvent sous forme d'ion PO_4^{3-}, 79,8 % sous forme de HPO_4^{2-}, 0,6 % sous forme $H_2PO_4^-$ et rien sous forme neutre. D'autres formes de phosphore inorganique dissous existent au sein de l'eau de mer, notamment certains polyphosphates (qui proviennent généralement de détergents synthétiques).

Cet ion orthophosphate est la forme directement biodisponible, celle qui sera directement utilisée par les organismes autotrophes pour assurer leur croissance, et par les organismes hétérotrophes pour la synthèse des composés organiques phosphorés (figure 1).

L'assimilation des ions orthophosphate par le plancton est régie par les cinétiques de Michaelis-Menten, où la Vmax est la vitesse maximale d'assimilation, et le Km, la constante de demi saturation analogue à la constante de Michaelis. Ces constantes caractérisent le comportement des individus vis-à-vis de cet élément. En particulier le Km est un bon indicateur de leur compétitivité. En se basant sur leurs valeurs, Lovdal *et al.,* (2007) ont démontré en mésocosmes, la suprématie des bactéries (fraction 0,2-1 µm) sur les autres organismes du plancton en ce qui concerne l'assimilation du PID mais aussi du Phosphore Organique Dissous (POD). Certaines espèces, comme la cyanobactérie *Synechococcus* sp., sont même reconnues comme étant des compétiteurs extrêmes, capable de se développer lorsque les concentrations en PO_4 sont très basses (5 nM) (Moutin *et al.,* 2002). Une étude récente sur la lagune de Thau entreprise sur *Synechococcus* sp. (Collos *et al.*, 2009) a montré qu'une oligotrophie de la lagune, couplée a une augmentation de la température sur les 30 dernières années, a contribué au développement de cette cyanobactérie.

En Méditerranée, la concentration en phosphore minéral dissous (PID) atteint des niveaux très faibles dès la fin du printemps. Cette faible disponibilité en phosphate contrôle non seulement la production primaire (Diaz *et al.,* 2001 ; Moutin et Raimbault, 2002) mais également la production hétérotrophe bactérienne (Thingstad *et al.,* 1998, 2005 ; Van Wambeke *et al.,* 2002). En effet, dans des conditions de faible disponibilité, le phosphate est assimilé par les organismes de petite taille, qui ont une plus forte affinité pour les orthophosphates (un Km plus faible) que les organismes de plus grande taille. Dans ce cas, le réseau trophique est essentiellement de type microbien. Il est caractérisé par la compétition entre les algues de petite taille (picophytoplancton) et les bactéries hétérotrophes. La production de carbone se fait alors essentiellement sous forme dissoute (COD) qui s'accumule dans les eaux de surface.
Au printemps et en automne les concentrations en orthophosphate s'élèvent. Dans ces conditions, le phosphate est assimilé par des organismes de plus grande taille, qui ont une moins forte affinité (un Km plus élevé) pour les orthophosphates. On a alors des chaînes trophiques plus étendues et plus complexes, pouvant aller dans certaines situations jusqu'à l'eutrophisation. La matière carbonée est alors produite sous forme dissoute et particulaire, ce qui entraîne une sédimentation et une exportation du carbone particulaire vers les couches profondes (Thingstad et Rassoulzadegan ,1995). Il est à noter que le PID peut également être régénéré à partir de la fraction vivante par le biais de l'excrétion, notamment par le zooplancton (Hargrave et Geen, 1968).
Le phosphore organique est présent sous forme dissoute (POD) et particulaire (PP), analytiquement ces fractions correspondent au SNP et au PP.
Le phosphore organique dissous (POD) comprend deux fractions : la fraction rapidement hydrolysable par les acides et/ou par les phosphohydrolases, et la fraction oxydable, qui correspond à de la matière beaucoup plus réfractaire qui ne sera reminéralisée qu'en conditions oxydantes La fraction hydrolysable comporte des phosphomonoesters et des phosphodiesters. Parmi les phosphodiesters on compte les acides nucléiques (ADN, ARN), et parmi les phosphomonoesters, l'ATP, l'ADP ainsi que les sucres phosphorés (G_6P) et les phospholipides (Benitez-Nelson 2000). La fraction oxydable comporte des phosphonates. Ce sont des composés plus complexes, contenant des groupements $C\text{-}PO(OH)_2$ ou $C\text{-}PO(OR)_2$ (avec R = alkyle, aryle). Ils sont connus pour être d'efficaces agents chélateurs. Bien que ces composés soient moins rapidement dégradés, certaines bactéries pourraient utiliser les phosphonates naturels. En revanche, elles seraient incapables d'utiliser les composés de synthèse (Cook *et al.,* 1978 ; Dyhrman *et al.,* 2006).

Certains organismes planctoniques, en particulier le phytoplancton, secrètent des exsudats qui contribuent aux apports de POD. En outre, le POD peut être également produit par le zooplancton à partir des pelotes fécales et des excrétas. La lyse cellulaire, à la mort des organismes, est également un facteur de libération de POD (Agusti *et al.,* 1998).

Les organismes vivants ont la capacité d'utiliser le POD pour leur croissance, en particulier les organismes hétérotrophes. Cependant, Chu (1946) a montré sur des cultures non axéniques de *Phaeocystis poucheti*, phytoplancton autotrophe, qu'en condition de carence en orthophosphates, ces organismes pouvaient utiliser des phospholipides et des sucres phosphorés pour leur croissance. Le plancton produit alors des enzymes qui sont responsables de la conversion du phosphore organique en phosphore inorganique (Perry, 1972 ; Chrost et Overbeck, 1987 ; Benitez-Nelson, 2000). Les plus connues sont les phosphatases alcalines. Elles sont à l'origine de l'hydrolyse des phosphomonoesters. Mais d'autres activités participent à ce processus en particulier la 5' nucléotidase (Petterson 1980, Jansson *et al.,* 1988, Ammerman et Azam 1985) qui sont responsables de l'hydrolyse des ribonucléotides plus spécifiquement. La synthèse de phosphore minéral par ces voies enzymatiques constitue la production régénérée et sera détaillée de manière plus importante dans la troisième partie de cette introduction.

Le phosphore organique particulaire (PP) provient essentiellement de la matière « vivante », les zones de fortes concentrations en PP correspondant aux zones de forte production (zones côtières et océan de surface). La fraction détritique particulaire n'y contribue que faiblement.

La fraction vivante de la colonne d'eau est un immense réservoir en phosphore organique particulaire. Après sédimentation, cette fraction est minéralisée par voie enzymatique. Le phosphore minéral produit repasse dans la colonne d'eau où il constitue la production nouvelle, principale source de phosphore inorganique.

Enfin, comme l'élément phosphore ne présente pas de forme gazeuse stable, ses pertes proviennent de la sédimentation d'une partie de la matière organique de la colonne d'eau, de l'adsorption et la précipitation de phosphore dans les phases minérales des roches, au sein de complexes inorganiques comme les argiles, les carbonates et les hydroxydes ferreux, de la sédimentation des phosphorites (phosphates de chaux naturels) et de processus hydrothermaux (Benitez-Nelson, 2000). On estime que moins de 1 % du phosphore qui sédimente reste piégé dans les sédiments (Pant et Reddy, 2001). Par ailleurs, en condition d'anoxie et/ou de baisse de pH, du phosphore est remis en solution dans la colonne d'eau à partir des complexes ferriques et calciques (Gomez *et al.*, 1999).

Les études concernant les apports en phosphore dans la rade de Toulon sont rares. En effet, cet élément n'est pas encore considéré comme préoccupant car il ne semble pas susceptible d'entraîner de graves problèmes d'eutrophisation (Guillaud et Romaña, 1991).

Dans le cadre du contrat de baie de la rade de Toulon, une étude ponctuelle a permis de dresser un bilan de la contamination des sédiments de la baie du Lazaret (Petite Rade) par le phosphore (Rapport de TPM, 2007). Une forte concentration a été trouvée dans les sédiments prélevés devant Tamaris. Elle est probablement à mettre en relation avec un exutoire urbain. De fortes concentrations en phosphore ont été également trouvées sous les installations aquacoles. Elles proviendraient des granulés donnés aux poissons ou d'excrétas. Ces apports en phosphore au droit des concessions piscicoles contribueraient à hauteur de 23 % aux apports en nutriments de cette zone.Un suivi des concentrations en orthophosphate dissous de la Petite Rade a été réalisé par Jean en 2002 dans le cadre de sa thèse. Une concentration annuelle moyenne de 132,7 nM a été mesurée avec des valeurs extrêmes allant de 84 à 462 nM. Il a été suggéré que les fortes pluies auraient un effet sur l'enrichissement des eaux de la rade en nutriments, par ruissellement et lors des crues des cours d'eau environnants.

Les apports en phosphore d'un cours d'eau côtier, l'Eygoutier, qui débouche dans la Grande Rade, ont été étudiés en 2005 dans le cadre du programme ECOTDYN. Les concentrations en phosphore augmentent considérablement au voisinage du rejet lors des épisodes pluvieux d'automne. Ces concentrations atteignent 210 nM de SRP à la sortie de l'Eygoutier, le phosphore particulaire étant en proportion plus importante que le phosphore dissous.

En 1991, une étude réalisée par IFREMER (Guillaud et Romaña, 1991) a permis de montrer que les phénomènes d'upwelling qui résultent d'un coup de mistral dans la Grande Rade apporteraient 3 tonnes de phosphore. La même étude rapporte que les apports en provenance de la station d'épuration de Toulon Est, estimés à 0,06 t/j, seraient bien moindres que les apports naturels dus à ces remontées d'eaux profonde.

3. La reminéralisation du phosphore organique par les phosphoestérases

3.1 Les enzymes responsables de l'hydrolyse des composés phosphorés

L'hydrolyse des monoesters est contrôlée par l'activité d'hydrolases dont les plus étudiées sont les phosphatases alcalines et acides, et la 5'nucléotidase. Ces enzymes sont des phosphomonoestérases. La phosphatase alcaline peut hydrolyser une large gamme de

monoesters vis à vis desquels elle est peu spécifique (par exemple, le Glucose-6 phosphate et l'ATP). Sa capacité à hydrolyser ces substrats est importante (Suzumura *et al.,* 1998). Son optimum de pH se situe au dessus de 7, le plus souvent entre 9 et 10 (Jansson *et al.,* 1988). La phosphatase acide présente un pH optimum compris entre 4 et 6. La nucléotidase est beaucoup plus spécifique que les phosphatases vis à vis des monoesters et son action porte principalement sur les 5'ribonucléotides dissous.

Le phosphore peut être également libéré dans le milieu à partir de diesters phosphorés comme l'ADN et l'ARN. Les phosphohydrolases qui les hydrolysent sont les PhosphoDiesterases (Suzumura *et al.,* 1998). Elle ont été mises en évidence dans certaines espèces planctoniques (Yamaguchi *et al.,* 2005).

3.2 Localisation des activités phosphatasiques

Les phosphatases sont présentes sous forme dissoute ou particulaire.

Une activité alcaline dissoute a été mise en évidence pour la première fois dans le milieu lacustre en 1967 (Reichardt *et al.,* 1967). Elle a été retrouvée par la suite dans la plupart de ces milieux. Cette activité dissoute provient des bactéries hétérotrophes et autotrophes qui la sécrètent. Une autre partie provient d'enzymes intracellulaires libérées dans le milieu aquatique après la mort des cellules (Jansson *et al.,* 1988 ; Hoppe, 2003 ; Nausch et Nausch, 2004) ou après lyse virale (Middelboe *et al.*, 1996). Liu *et al.* (1995) ont montré que l'activité de la phosphatase dissoute est relativement stable, sa durée de vie pouvant dépasser le temps de renouvellement moyen d'une génération de cellules phytoplanctoniques. Ainsi, la PA dissoute pourrait rester active plus d'un mois (Li *et al.,* 1998), en particulier lorsqu'elle est adsorbée sur des colloïdes comme cela a été montré dans les sols (Burns, 1978) et en eaux douces (Boon, 1993). Par conséquent, l'activité phosphatasique dissoute, pourrait refléter d'anciens épisodes de limitation en phosphates (Chrost, 1991 ; Cotner *et al.,* 1997 ; Li *et al.,* 1998).

L'activité particulaire est présente sur l'ensemble des fractions planctoniques. Les fractions traditionnellement étudiées, d'après Tregouboff et Rose (1957), sont le Femtoplancton < 0,2 µm (Virus), le Picoplancton 0,2-2 µm (Bactérioplancton), le Nanoplancton 2-20 µm (Phytoplancton), le Microplancton 20-200 µm (Zooplancton et Phytoplancton) et le Mésoplancton 0,2 mm à 2 cm (Zooplancton et Macroalgues)

Chez les bactéries, la phosphatase est localisée à la périphérie des cellules et dans le périplasme, tandis que chez le phytoplancton elle est insérée dans les membranes cellulaires

(Reichardt *et al.* 1967, Petterson 1980, Jansson *et al*., 1988; Ammerman and Azam 1991, Hoppe 2003). Ces ectoenzymes participeraient directement à l'hydrolyse des composés phosphorés dissous dans le milieu aquatique. La 5' nucléotidase se concentre essentiellement dans la fraction bactérienne où elle est liée à la membrane cellulaire (Ammerman et Azam ,1991).

Une nouvelle approche permet de détecter l'activité phosphatasique de cellules particulières (Dyhrman et Palenik, 1999 ; Nicholson *et al.,* 2006; Huang *et al.*, 2007). Elle a été développée initialement par González-Gil *et al.* (1998). Elle repose sur l'utilisation de l'ELF-97-phosphate comme substrat. Le composé fluorescent issu de l'hydrolyse de ce substrat soluble dans l'eau, précipite autour et à l'intérieur des cellules actives. La fluorescence peut ensuite être détectée par observation directe au microscope ou bien par cytométrie de flux.

Cette approche a permis d'apporter des informations complémentaires sur les cellules algales productrices de phosphatase et sur sa localisation cellulaire. Il a été ainsi montré dans les baies de Monterey et de San Francisco en Amérique du Nord, que l'activité des Dinoflagellés est en général beaucoup plus élevée que celle des Diatomées (Nicholson *et al.,* 2006). Par ailleurs, les travaux avec l'ELF-97 ont montré qu'une activité intracellulaire importante existait chez le Dinoflagellé *Prorocentrum minimum*, en plus de l'activité liée aux membranes, et qu'il s'agissait de la phosphatase alcaline (Dyhrman et Palenik, 1999).

Le zooplancton n'est généralement pas associé à l'hydrolyse des composés phosphorés du milieu aquatique. Mais dès 1951, Margaleff a émis l'hypothèse que des phosphatases solubles pouvaient être produites par le zooplancton (Boavida, 2005). En eaux douces, des activités phosphatasiques secrétées par les genres *Daphnia*, *Bosmina*, *Holopedium* et *Cyclops* ont été caractérisées (Jansson *et al.,* 1988). En milieu marin, de très fortes activités spécifiques intracellulaires ont été observées dans la rade de Toulon chez des larves de Cirripèdes (Gambin *et al.,* 1999 ; Bogé *et al.,* 2002 ; Jean *et al.,* 2003 ; Bogé *et al.,* 2006 ; Lespilette *et al.,* 2007).

Le plancton est également le siège d'une activité phosphatasique acide (Price 1962 ; Blum 1965). On la retrouve généralement à l'intérieur des cellules algales plutôt qu'en contact avec le milieu externe (Wynne, 1977 ; Schmitter et Jurkiewicz, 1981 ; Suida, 1984).

3.3 Rôle du phosphore, de l'azote et du carbone dans l'activité de la phosphatase alcaline

Les activités phosphatasiques des communautés planctoniques dépendent des concentrations en phosphore, en azote inorganiques, et en carbone organique.

En milieu marin, comme en eau douce, il a été souvent rapporté que l'activité phosphatasique des communautés planctoniques varie à l'inverse des concentrations en phosphore inorganique (Cembella *et al.,* 1984a, Jansson *et al.,* 1988, Nausch, 1993 ; Vidal *et al.,* 2003). Ainsi, cette activité est souvent plus élevée dans les milieux présentant des carences en ions orthophosphate, en particulier dans les milieux oligotrophes (Perry, 1972 ; Chrost et Overbeck, 1987 ; Benitez-Nelson, 2000). Cette activité permettrait aux communautés d'utiliser le phosphore organique pour produire du phosphore inorganique qui serait ensuite rapidement assimilé par les cellules. A l'inverse, lorsque les concentrations en phosphore inorganique sont fortes, les activités phosphatasiques des communautés planctoniques sont souvent basses. C'est notamment le cas dans les milieux eutrophes. Cette relation entre les concentrations en phosphore inorganique et les activités phosphatasiques en fait de bons indicateurs du niveau trophique des milieux aquatiques (Cembella *et al.,* 1984b ; Hoppe 2003).

Ces variations d'activité résultent d'une sélection d'espèces dont l'activité phosphatasique est constitutivement adaptée aux concentrations en orthophosphate, ou d'espèces chez lesquelles la synthèse de l'enzyme est régulée au niveau moléculaire par le phosphore inorganique. Le premier type d'activité est qualifié de constitutif et le deuxième de répressible.

Les activités phosphatasiques de type répressif existent chez les espèces phytoplanctoniques ou bactériennes des eaux douces comme des eaux marines (Perry, 1972 ; Chrost et Overbeck, 1987 ; Benitez-Nelson, 2000, Cembella *et al.,* 1984a, Jansson *et al.,* 1988, Nausch, 1993 ; Vidal *et al.,* 2003). Chez ces espèces, les ions orthophosphate présents dans les milieux extracellulaires ou intracellulaires répriment la synthèse de l'enzyme, laquelle est déréprimée lorsque ces ions sont en faible concentration (Jansson *et al.,* 1988). Le mécanisme moléculaire de ce contrôle a été étudiée notamment sur *Escherichia coli* (Wanner, 1986), *Saccharomyces cerevisiae* (Lenburg et O'Shea, 1996) et une Prasinophycée marine : *Tetraselmis chui* (Chung *et al.,* 2003) ainsi que sur des souches d'eau douce de la cyanobactérie *Synechococcus* sp. (Ray *et al.,* 1991 ; Aiba et Mizuno 1994 ; Nagaya *et al.,* 1994). Les auteurs ont mis en évidence un ensemble de gènes : le régulon *pho* qui répond aux limitations en phosphore en augmentant l'expression de la phosphatase alcaline, mais aussi celle du transporteur du phosphore inorganique. Deux sortes de phosphatase ont été identifiées : une enzyme P-

irrépressible (constitutive) encodée par le régulon *phoV* (Wagner *et al.,* 1995) et une forme P-répressible qui est le produit du régulon *phoA* (Ray *et al.,* 1991). Le régulon *phoA* est contrôlé par les concentrations en orthophosphate du milieu externe et non par celles du cytoplasme (Rao *et al.,* 1994). En outre, Scanlan et West (2002) ont montré qu'il existerait une hétérogénéité dans les séquences génomiques codant pour les phosphatases chez *Prochlorococcus* sp. Ils ont mis en évidence deux souches, *Prochlorococcus* MED4 et *Prochlorococcus* MIT9313, dont la première possède le régulon *phoA* alors que la seconde en est dépourvue. Rao *et al.,* 1994 ont montré que la phosphatase encodée par le régulon *phoA* est localisée dans l'espace périplasmique. Une étude récente (Gillor *et al.,* 2002) basée sur une construction génique associant le régulon *phoA* et le gène codant pour une luciférase (*luxAB*) à permis de créer des souches transgéniques de *Synechococcus* sp. qui émettent de la lumière dès lors que les concentrations en phosphore deviennent limitantes.

Les activités de la phosphatase alcaline et de la phosphatase acide sont également inhibées par les ions phosphates au niveau des sites actifs de l'enzyme. L'inhibition est alors de type compétitif. La 5'nucléotidase est également sensible à ces ions mais les concentrations efficaces sont 100 fois plus élevées que pour la phosphatase alcaline (Ammerman et Azam, 1985 ; Jansson *et al.,* 1988).

Les composés azotés, par le biais du rapport de Redfield N/P, peuvent avoir une influence sur l'activité phosphatasique des communautés planctoniques. Tanaka *et al.,* (2006) ont montré qu'un apport en azote inorganique entraîne une augmentation de l'activité phosphatasique au sein de monocultures ou de populations planctoniques élevées en mésocosmes. Nausch et Nausch (2004) ainsi que Neddermann et Nausch (2004) ont également montré, en mer Baltique, qu'un enrichissement en azote stimulait l'activité de la phosphatase alcaline des communautés planctoniques lors des périodes de forte productivité. Ces observations pourraient résulter d'une sélection d'espèces présentant une faible affinité pour l'azote (un fort Km) et une forte activité phosphatasique constitutive nécessaire au maintien du rapport N/P intracellulaire. L'activité phosphatasique serait alors associée à celle de l'aminopeptidase bactérienne (Nausch, 2000).

Enfin l'activité de la phosphatase de communautés planctoniques est également influencée par les composés carbonés. Des expériences effectuées en mer Baltique dans des mésocosmes par Tanaka *et al.,* (2006) le démontrent. En effet l'activité de la phosphatase des communautés planctoniques, qu'elle soit rapportée au volume d'eau de mer ou à la biomasse planctonique, augmente dans les milieux enrichis en glucose, en particulier lorsqu'ils ont été préalablement enrichis en azote. Cette action du carbone sur l'activité phosphatasique des communautés

planctoniques serait plus efficace chez les bactéries (Sebastiàn *et al.,* 2004a). Ces observations indiquent que l'activité phosphatasique serait impliquée dans les équilibres entre les concentrations en carbone, azote et phosphore. Des travaux ont également montré qu'en milieu eutrophe, l'activité phosphatasique pouvait être plus élevée lors de carence en carbone (Azam *et al.*, 1983 ; Chrost 1990 ; Hernàndez *et al.,* 1996 ; Benitez-Nelson et Buesseler 1999 ; Caron *et al.,* 2000 ; Sebastiàn *et al.,* 2004b). L'activité phosphatasique, en déphosphorylant les composés organiques phosphorés carbonés, permettrait leur assimilation par les cellules. Les milieux eutrophes carencés en carbone auraient ainsi favorisé les espèces possédant une forte activité phosphatasique constitutive.

4. Objectifs de la thèse

Notre travail a eu pour objectif de mieux comprendre le statut du phosphore dans la rade de Toulon, laquelle peut être considérée comme un bon modèle d'écosystème littoral méditerranéen.

Les résultats obtenus permettront de mieux comprendre le rôle des éléments nutritifs et du phosphore en particulier dans la dynamique des peuplements planctoniques de cette zone littorale particulièrement menacée. Ils permettront également de proposer des indicateurs biologiques pouvant être utilisés pour caractériser l'état de stress des cellules planctoniques vis à vis du phosphore.

Les prélèvements d'eau de mer ont été effectués mensuellement entre avril 2005 et mars 2006 dans deux sites: la Petite Rade et la Grande Rade. Le choix de ces sites repose sur des études comparatives préalables qui ont conclu à l'existence d'un gradient de pollution décroissant de la Petite Rade vers la Grande Rade, tant au niveau de la pollution biologique que de la pollution chimique par les métaux et les composés organiques anthropiques.

Notre travail a consisté dans un premier temps à faire un suivi annuel des concentrations en orthophosphates (SRP) ainsi que des différents réservoirs du phosphore organique (POD et PP) de la rade de Toulon. En effet, une meilleure compréhension du cycle du phosphore requiert non seulement la connaissance des fractions particulaires et dissoutes, fréquemment mesurées, mais aussi celle de la disponibilité biologique des composés phosphorés en relation avec leur interconversion enzymatique. C'est pourquoi la fraction du phosphore organique enzymatiquement hydrolysable a été également mesurée et plus particulièrement la fraction hydrolysable par la phosphatase.

Si le rôle de l'activité phosphatasique dans la conversion du phosphore organique en phosphore inorganique a été très étudié en eau douce (Istvanovics *et al.,* 1992 ; Bowman *et al.,* 2003), les études sont plus rares en milieu marin (Hoppe, 2003) et en particulier en Méditerranée. Pourtant l'intérêt d'une approche associant le suivi de cette activité à celui des différentes fractions phosphorées à été récemment relancé (Sebastiàn *et al.,* 2004a ; Tanaka *et al.,* 2006). Une attention particulière a été portée ensuite à l'analyse des cinétiques des activités phosphatasiques et à l'étude de leur dépendance vis à vis du pH. Les constantes cinétiques des activités dissoutes et particulaires ont été calculées et mises en relation avec diverses classes de taille de matériel particulaire afin de préciser le rôle du zooplancton, du phytoplancton et du bactérioplancton dans la production de ces activités et dans leurs contrôle par le phosphore. Ce travail a été effectué en se plaçant dans des conditions aussi proches que possibles du milieu naturel. Pour ce faire les substrats (le MUF-P et le pNPP) ont été dissous dans de l'eau de mer provenant des sites étudiés et les expériences ont été effectuées à 20°C.
Ce travail a été réalisé en partenariat avec le Contrat de Baie de la rade de Toulon, géré par la communauté d'agglomération Toulon-Provence-Méditerranée (TPM). Ce contrat consiste en un programme d'actions environnementales sur 5 ans qui vise à restaurer et gérer la qualité des eaux et des milieux aquatiques de la rade et de son bassin versant.

5. Plan d'organisation du manuscrit

Après la présentation des sites, les méthodes analytiques utilisées pour la mesure des paramètres abiotiques (température, oxygénation, salinité, conductivité, orthophosphates, phosphore organique et nitrates) et biotiques (communautés bactériennes, phytoplanctoniques et zooplanctoniques, biomasses) seront détaillées.
Les résultats obtenus lors du cycle annuel seront ensuite présentés et analysés. En premier, nous présenterons l'évolution spatiotemporelle des paramètres abiotiques et en particulier des formes inorganiques et organiques du phosphore.
Un chapitre sera ensuite consacré à la présentation des caractéristiques générales (Km et Vmax) de l'activité phosphatasique basée sur les moyennes annuelles des activités dissoutes et particulaires. Le rôle du pH de ces activités sera également étudié.
Les chapitres suivants concerneront l'étude des variations annuelles des activités phosphatasiques dissoute et particulaire. Les activités particulaires par classe de taille seront ensuite détaillées.

La dernière partie sera consacrée à une recherche des corrélations entre les activités phosphatasiques et les principales classes planctoniques ainsi qu'avec les concentrations en orthophosphate.

Présentation des sites d'études

1. La Méditerranée : rappels d'océanographie régionale **25**
2. La rade de Toulon, contexte géographique et description des sites d'études **26**
2.1 Le littoral toulonnais 26
2.2 La Petite Rade de Toulon 28
2.3 La Grande Rade de Toulon 30

1. La Méditerranée : rappels d'océanographie régionale

La Méditerranée est une mer intérieure profonde. Sa superficie totale est de 3 millions de km2. Séparée de l'Atlantique par l'étroit goulet de Gibraltar (12 milles de large, 300 m de fond), sa profondeur moyenne est de 1500 m avec un maximum de 5100 m dans la fosse de Matapan.

La Méditerranée est dans son ensemble une succession de bassins séparés par des seuils. Le bassin occidental comprend la mer d'Alboran à l'entrée de la Méditerranée, le bassin algéro-provençal dont la plus grande part est constituée par des fonds de 2700 à 2800 m et le bassin tyrrhénien à l'est de la Corse et de la Sardaigne qui atteint 3630 m.

Les marées en Méditerranée sont très faibles. Il existe dans le bassin occidental une marée correspondant à la co-oscillation d'une vague Atlantique entrant par Gibraltar et d'une vague Est-méditerranéenne passant par le détroit sicilien. L'amplitude des marées est généralement très faible, de l'ordre de quelques dizaines de cm, sauf dans des régions bien particulières comme le nord de l'Adriatique ou le golfe de Gabès.

Mer chaude, la Méditerranée est soumise à une météorologie présentant deux caractéristiques essentielles : des vents violents et froids dans le nord des bassins, une forte évaporation sur l'ensemble de la Méditerranée mais s'accentuant suivant des gradients ouest-est et nord-sud.

Les vents dominants pour les côtes françaises sont le mistral et la tramontane. Le mistral souffle en moyenne 135 à 150 jours par an. Il repousse les eaux chaudes de surface vers le sud en les refroidissant et provoque la remonté à la côte d'eaux froides profondes (phénomène d'upwelling). Les vents de secteur est, sud-est fonctionnent comme des vents de mer et relèvent le niveau du plan d'eau. Les vents de sud à sud-ouest soulèvent parfois de fortes houles susceptibles de modifier les fonds.

Zone de forte évaporation (environ 1 m par an) non compensée par le ruissellement (350 km3) et les précipitations (850 km3), la Méditerranée est un bassin dont le bilan hydrique est

négatif, compensé par de faibles apports venant de la Mer Noire (200 km3) et importants venant de l'Atlantique (35000 km3). Le renouvellement est malgré tout relativement faible (1 % par an) puisqu'on estime le volume de la Méditerranée à 3,7 millions de km3.

L'entrée des eaux atlantiques, moins denses, est à l'origine du courant général ou courant géostrophique qui, dévié vers la droite par la force de Coriolis, prend un caractère cyclonique et longe les côtes d'Afrique du Nord avant de se diviser en plusieurs branches. L'une d'elles remonte vers le nord le long des côtes de la Sardaigne et de Corse. Une autre passe le long des côtes de la Sicile pour décrire également un système cyclonique dans la Mer Tyrrhénienne et remonter le long de la péninsule italienne vers le golfe de Gêne. Une troisième branche s'engage en Méditerranée orientale entre la Sicile et la Tunisie. Le retour des masses d'eau vers Gibraltar le long des côtes d'Italie et de France est connu sous le nom de courant Liguro-Provençal.

A l'échelle du bassin, la côte méditerranéenne s'étend sur environ 46 000 km avec à l'exception des plaines deltaïques et du rebord saharien, un arrière pays montagneux, à relief plus ou moins puissant mais à fortes pentes. Les plaines côtières y sont extrêmement réduites, parfois inexistantes. On peut estimer que les trois quart du littoral relève de ce type de configuration.

2. La rade de Toulon, contexte géographique et description des sites d'études

2.1 Le littoral toulonnais

La région toulonnaise présente une grande diversité de reliefs terrestres. Elle est cernée de collines et de montagnes constituant une barrière naturelle, d'altitudes comprises entre 150 et 800 mètres, et de pente moyenne 12 %.

La côte de l'aire Toulonnaise est constituée, sur plus de 50 km de linéaire d'une alternance de falaises, de plages de galets, de plages de sable et de constructions artificielles. Plusieurs portions rocheuses, caps et pointes, jalonnent la Grande Rade, mais la zone de falaise du cap Sicié est la zone rocheuse la plus étendue.

Dans la continuité du littoral rocheux, l'étroit plateau continental possède une pente élevée de valeur moyenne 2,4 %. Cependant, une étude bathymétrique réalisée entre 20 et 40 mètres de profondeur met en évidence de vastes baies aux pentes faibles. La rade de Toulon de pente 1,5 % en est un exemple caractéristique (Paillard *et al.,* 1993). Les fonds, de faible profondeur (entre 0 et 10m) sont essentiellement constitués de substrat rocheux, socles, blocs ou éboulis.

En revanche, de grandes zones sableuses sont présentes au droit des plages, dans l'anse des Sablettes (hors rade), dans la baie du Lazaret (Petite Rade), et dans la baie de la Garonne (Grande Rade). La rade de Toulon (43°04'N ; 6°00'E), bien que proche de l'embouchure du Rhône, ne subit aucunement l'influence rhodanienne qui est le principal fleuve de Méditerranée depuis la construction du barrage d'Assouan, sur le Nil. En effet, sous l'action de la force de Coriolis et de la circulation cyclonique, l'influence rhodanienne ne dépasse guère à l'est du Golfe du Lion : le golfe de Fos, et n'atteint qu'exceptionnellement la région de Marseille (Coste *et al.,* 1977 ; Broche *et al.,* 1998).

L'étude a été menée dans deux stations géographiquement proches (figure 2) mais reconnues pour comporter des différences d'un point de vue écologique (Jamet *et al.,* 2001, 2005; Despiau *et al.*, 2002). La station 1 est située dans la Petite Rade de Toulon (S1 : Lat. 43° 06' 50'' N et Long 05° 55' 00'' E ; 12 mètres de profondeur). La station 2 est localisée au large des plages du Mourillon, dans la Grande Rade (S2 : Lat. 43° 05' 75''N et Long 05° 56' 30''E ; 17 mètres de profondeur).

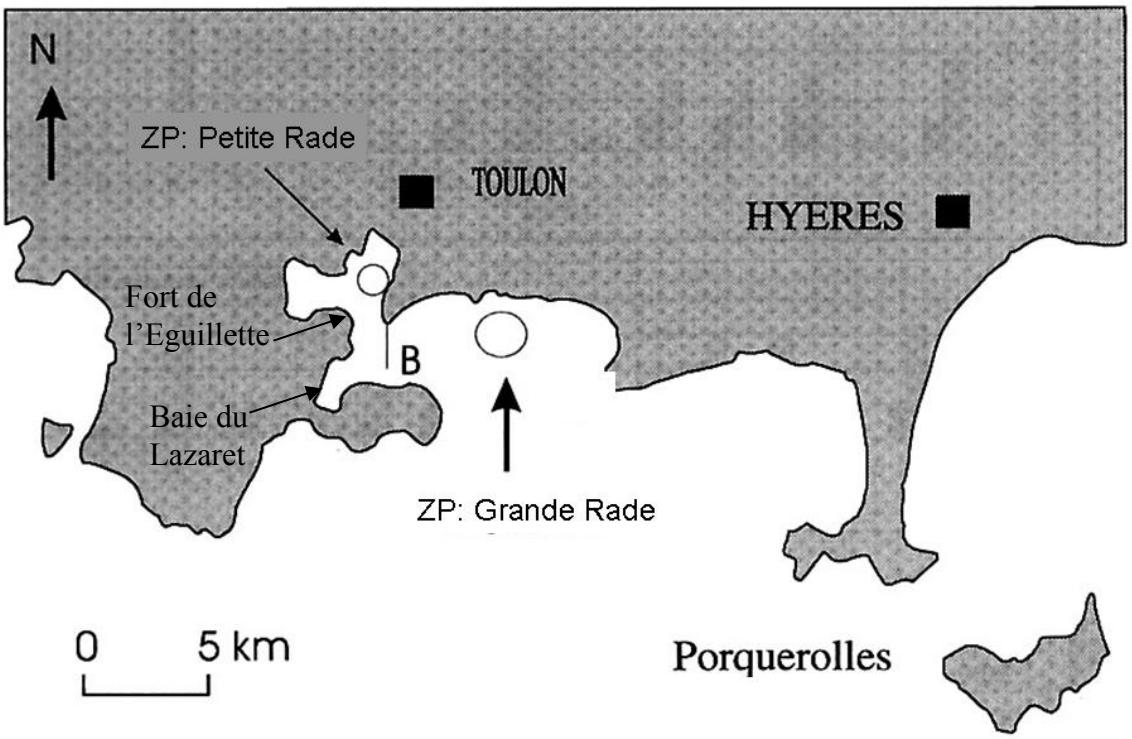

Figure 2 : localisation des zones de prélèvements (ZP) dans la baie de Toulon, les deux rades sont séparées par la petite et la grande passe (B).

2.2 La Petite Rade de Toulon

La Petite Rade est bordée de côtes rocheuses datant du Permien (280 à 230 millions d'années). Elle constitue un milieu semi-fermé, confiné au Sud par la presqu'île de Saint Mandrier et à l'Est par la Grande passe. Dans la Petite Rade, des courants de surface (D'Ouest en Est et d'Est en Ouest) sont générés par des vents dominants (respectivement NW et SE). La présence de courants de fond résulte de la sortie de masses d'eau de la Petite Rade, qui est orientée NW-SE (Paillard *et al.,* 1993). Les principales caractéristiques hydrodynamiques de la Petite Rade de Toulon sont présentées dans le tableau 1.

Superficie	11 km^2
Volume	1.10^8 m^3
Niveau de marée	15 cm
Entrée et sortie d'eau en 24 heures	$3,3.10^6$ m^3
Temps de résidence de l'eau	3 à 6 jours
Flux moyen à la « Grande Passe »	76 $m^3.s^{-1}$
Vitesse maximale du courant à la « Grande Passe »	0,66 $cm.s^{-1}$

Tableau 1 : caractéristiques hydrodynamiques de la Petite Rade de Toulon d'après Tine *et al.,* 1981.

La Petite Rade est la zone d'activité principale du port de Toulon. Elle est le siège d'un trafic maritime intense résultant d'activités industrielles, commerciales, militaires et touristiques (Jamet *et al.,* 2001). La ville de Toulon, qui compte une population de 166 000 habitants, se caractérise par une urbanisation marquée, de plus, la communauté d'agglomération toulonnaise (TPM) compte 500 000 habitants et s'intensifie en été. Par ailleurs, la rivière Las (rivière Neuve) qui draine une région fortement anthropisée, débouche dans cet écosystème. De plus, la Petite Rade et la Grande Rade communiquant de part et d'autre de la grande digue par la « Petite Passe » au Nord et la « Grande Passe » (au Sud), la Petite Rade reçoit les apports fluviaux et pluviaux de la rivière Eygoutier, par le biais de la Grande rade, qui ont traversé des zones urbaines, industrielles et agricoles situées en amont.

Des analyses physiques et chimiques menées par IXSurvey (2007) dans le cadre du Réseau Intégrateur Biologiques (RINBIO) du Contrat de Baie (TPM) montrent une mauvaise qualité de l'eau dans la Petite Rade de Toulon. Celle-ci est l'objet de plusieurs types de pollutions

plus ou moins « chroniques ». En effet, la Petite Rade se distingue nettement par des concentrations en contaminants chimiques élevées pour lesquelles l'influence des activités anthropiques et la proximité de sources portuaires est manifeste (Tableau 2). C'est le cas dans la Baie du Lazaret et du Fort de l'Eguillette situées dans la Petite Rade.

Contaminant	RNO	RINBIO	TPM 2007	
	août	2000 - 2003	Baie du Lazaret	Fort de l'Eguillette
Cadmium	0.26 - 0.8	0.5 - 0.7	0.92	0.78
Chrome	0.66 - 0.9	0.2 - 0.9	0.56	1.39
Cuivre	4 - 6.9	4.6 - 6.5	5.1	9.64
Mercure	0.14 - 0.49	0.23 - 0.25	0.16	0.34
Plomb	2.2 - 7.5	3.4 - 5.4	2.09	6.2
Zinc	96 - 239	178 - 180	173.47	192.77
PCB 138	30.3 - 72.5	14 - 61	40.82	168.67
PCB 153	65.1 - 97.5	21 - 71.6	61.22	210.84

Tableau 2 : Comparaison des concentrations en polluants mesurées dans la chair de moules (en mg.Kg-1 poids sec pour les métaux et en µg.kg-1 PS pour les PCB.) de la Petite Rade.
Les valeurs du RNO correspondent aux périodes 1994 –2002 pour les métaux et 1994 – 1997 pour les PCB

Par ailleurs, il apparaît clairement un gradient de concentration en contaminants métalliques et organiques décroissant de la Petite Rade au large (Mercure, Plomb, Zinc, PCB 153 et fluoranthène). Les travaux de Rossi et Jamet (2008) ont montré qu'une bioaccumulation du cuivre, du plomb et du cadmium se produit au sein du réseau trophique planctonique.

D'un point de vue planctonique, Jamet *et al.,* 2001 ont montré que la Petite Rade est également perturbée par les apports anthropiques et présente de fortes teneurs en Chlorophylle *a* ainsi qu'une forte abondance zooplanctonique et un index de diversité bas. Ils ont également noté la présence d'*Oithona nana* (copépode Cyclopoïde) en quantités plus importantes que dans la Grande rade. Une pollution biologique due a du phytoplancton toxique (*Dinophysis* spp., *Alexandrium minutum*) a également été rapportée occasionnellement dans la Petite Rade (Belin *et al.*, 1995 ; Jamet *et al*., 2001, 2005).

Une étude du benthos a été réalisée par le GIS posidonie et IFREMER (SIAT, 2002, toujours pour le contrat de baie), de la pointe de l'Eperon au cap de Carqueiranne, dans la tranche bathymétrique comprise entre la surface et 50m. L'herbier à *Posidonia oceanica* est absent dans la Petite Rade et dans la baie du Lazaret. Il a complètement disparu lors de ces dernières décennies (Paillard *et al.,* 1993). Généralement, ces herbiers se dégradent ou disparaissent lorsque les nuisances sont trop importantes (probablement en raison de la forte pollution chimique), ce qui fait un bon indicateur de la qualité du milieu. De plus, une tache de *Caulerpa taxifolia* a été identifiée au centre de la baie du Lazaret.

2.3 La Grande Rade de Toulon

La Grande Rade de Toulon, est ouverte sur la Méditerranée et de profonds courants de Nord-ouest à Sud-est en chassent les eaux vers le courant Liguro-Provençal (Est-Ouest) ce qui permet leur renouvellement.

Dans la zone du Mourillon débouche la rivière Eygoutier qui circule à travers une zone très urbanisée.

Les analyses menées par IXSurvey (2007) dans le cadre du Réseau Intégrateur Biologiques (RINBIO) du Contrat de Baie (TPM) montrent qu'à la différence de la Petite Rade, la Grande Rade affiche des concentrations en polluants métalliques et organiques proches des valeurs médianes de la façade méditerranéenne. Du point de vue de ces paramètres, son état est donc moins préoccupant que celui la Petite Rade. Les travaux de Rossi et Jamet (2008), montrent que les concentrations du Plomb, du Cuivre, et du Cadmium bioaccumulées dans le plancton sont inférieures à celles de la Petite Rade.

Les études réalisées sur le plancton de la colonne d'eau (Jamet *et al.,* 2001) dans la Grande Rade (La Garonne) ont également révélé des niveaux de concentrations en chlorophylle plus faibles que dans la Petite Rade, une faible abondance zooplanctonique avec un indice de diversité élevé ainsi qu'un faible indice de dominance. De plus, le copépode *Oithona nana* qui prolifère dans la Petite Rade est moins abondant.

L'étude réalisée sur le benthos par le GIS posidonie et IFREMER a montré que l'herbier à *Posidonia oceanica,* est présent sur l'ensemble du de la Grande Rade. Il présente des extensions et des états de vitalité extrêmement variables selon le contexte géomorphologique et anthropologique des secteurs. Dans la rade de Toulon, un très important développement des *Caulerpa taxifolia* et *C. racemosa* a été observé depuis de nombreuses années. Ces deux espèces ont colonisé l'ensemble de la Grande Rade, de la grande digue à la baie de la Garonne. Une surveillance accrue de la vitalité des herbiers et de l'expansion d'espèces invasives est donc un enjeu important pour la sauvegarde de cette rade.

Matériel et méthodes

Sommaire

1. Echantillonnage 32
2. Etude des paramètres physicochimiques 32
2.1 Température 32
2.2 Oxygène dissous 33
2.3 Conductivité 33
2.4 Salinité 33
2.5 Dosage des nitrates $N\text{-}NO^{3-}$ 33
2.6 Dosage des différentes fractions du phosphore organique 34
2.7 Dosage des orthophosphates $P\text{-}PO_4^{3-}$ 34
2.8 Analyse des composés phosphorés organiques 35
3. Mesures des activités phosphatasiques 38
3.1 Choix des substrats 39
3.2 Préparation des échantillons 40
3.3 Mesure des activités enzymatiques 42
3.4 Etude des activités en fonction du pH 44
3.5 Rappels de Cinétiques enzymatiques et principes des Calculs 44
4. Etude des communautés planctoniques 47
4.1 Étude de la densité bactérienne 47
4.2 Étude de la communauté phytoplanctonique 48
4.3 Étude de la communauté zooplanctonique 49
4.4 Estimation de la biomasse du matériel particulaire et planctonique 50
5. Analyse statistique des données 53

1. Echantillonnage

Les échantillons d'eau de mer ont été récoltés lors de sorties mensuelles dans la Grande Rade et la Petite Rade, du 19 avril 2005 au 14 mars 2006.

L'eau de mer a été collectée grâce à une bouteille fermante Niskin d'une capacité de10 litres, à 3 m de profondeur.

Le zooplancton a été récolté avec un filet à plancton Général Oceanic 5125 (longueur : 2,5m ; diamètre : 0,5 m ; vide de maille : 90 µm) muni d'un volucompteur électronique sur plusieurs traits verticaux.

Les prélèvements ainsi collectés dans la matinée, ont ensuite été transportés au laboratoire à 12h environ pour être analysés immédiatement ou pour être traités en vue d'analyses ultérieures.

Pour les études complémentaires au cycle annuel (dépendances de pH notamment), l'eau de mer et le zooplancton ont été récoltés dans la Petite Rade. Ils ont été ensuite analysés immédiatement.

Tous les récipients ayant servi au prélèvement et au transport des échantillons ont été préalablement lavés à l'acide chlorhydrique dilué puis rincés à l'eau ultra pure.

2. Etude des paramètres physicochimiques

La température, l'oxygénation, la conductivité et la salinité ont été mesurées *in situ* lors des sorties mensuelles. Des profils verticaux ont été effectués dans la petite et la Grande Rade de Toulon.

2.1 Température

La température de l'eau ainsi que celle de l'air (en °C± 0,1) ont été mesurées avec un conductimètre WTW modèle LF 197.

2.2 Oxygène dissous

Les teneurs en oxygène dissous de l'eau ont été mesurées avec un oxymètre à microprocesseur WTW modèle OXI 196i. Elles ont été exprimées en $mg.l^{-1}$ à 0,1 près, ainsi qu'en pourcentage de saturation à 1 % près.

2.3 Conductivité

La conductivité (en $mS.cm^{-1}$ ± 0,1) a été mesurée avec un conductimètre-salinomètre WTW modèle LF 197.

2.4 Salinité

La salinité (en ‰ ± 0,1) a été mesurée avec un conductimètre-salinomètre WTW modèle LF 197.

2.5 Dosage des nitrates $N\text{-}NO^{3-}$

Les échantillons d'eau de mer destinés à l'analyse des nitrates ont été conservés dans des fioles de 20 ml après avoir été filtrés sur 0,45µ (filtres Acrodisc stériles avec membrane en polyethersulfone hydrophile montés sur seringues de 20 ml stériles). Les échantillons ont ensuite été conservés au congélateur à -80°C en attente de l'analyse.
Le dosage des nitrates a été réalisé selon la méthode de Wood *et al.* (1967) modifiée par Le Poupon (1994). Il a été effectué par le Dr Le Poupon, Ingénieur d'Etudes, de l'équipe CAPTE du laboratoire PROTEE.
La technique met en jeu la conversion des nitrates en nitrites sur une colonne cadmium-cuivre, puis le dosage des nitrites par méthode spectrophotométrique. Cette méthode est basée sur la diazotation de la sulfanilamide à pH acide. Après réaction avec le dichlorure de N-naphtyléthylènediammonium, on mesure une substance colorée qui est détectée à 540 nm.
Le domaine de détection des nitrates va de 0 à 1mg d'azote par litre.

2.6 Dosage des différentes fractions du phosphore organique

L'étude des différents réservoirs du phosphore organique et du phosphore inorganique biodisponible a été entreprise.

Le phosphore inorganique dissous comprend le phosphore réactif au molybdate (SRP) et le phosphore non réactif (SNRP).

Comme il n'est possible de doser que le SRP, il convient de convertir au préalable les différentes fractions du phosphore organique en SRP pour pouvoir mesurer leurs concentrations.

2.7 Dosage des orthophosphates P-PO_4^{3-}

Le phosphore inorganique dissous est surtout présent sous forme d'ion orthophosphate libre ($H_2PO_4^-$ et HPO_4^{2-}), élément clé du fait de sa grande biodisponibilité. Il est en équilibre dynamique avec l'orthophosphate des composés chimiques solides, cristallins ou amorphes. De ce fait, la concentration en orthophosphates, à un moment donné, dépend du pH qui agit sur la solubilité des phosphates, et du potentiel redox qui agit sur la valence ionique de certains éléments métalliques (fer, manganèse) susceptibles de complexer le phosphore.

La méthode Murphy et Riley (1962) revue par Jean (2002) a été employée pour doser les SRP. Elle repose sur le principe que les orthophosphates réagissent à pH acide avec le molybdate d'ammonium et le tartrate double d'antimoine et de potassium pour former un complexe phosphomolybdique.

Ce complexe, réduit par l'acide ascorbique produit un complexe de molybdène de couleur bleue. L'absorbance du complexe, mesurée par spectrophotométrie à 885 nm, permet déterminer la concentration en orthophosphates présents.

Une courbe d'étalonnage avec des étalons compris entre 50 et 500 mM, a été réalisée lors de chaque dosage.

Ce protocole expérimental permet de détecter des concentrations d'orthophosphates comprises entre 0,04 et 30 µM (Buscemi, 1999). En utilisant des cuves de 10 cm, les concentrations minimales décelables atteignent 0,02 µM.

Des aliquotes de 50 ml d'eau de mer brute ou d'eau filtrée sur 0,45µ (filtres Acrodisc stériles avec membrane en polyethersulfone hydrophile montés sur seringues de 20 ml stériles), ont été conservés à -20°C dans des flacons en polypropylène aseptiques.

2.8 Analyse des composés phosphorés organiques

Le phosphore organique se présente sous forme dissoute et sous forme particulaire. La forme dissoute est dosée après passage d'eau de mer sur des filtres de 0,45 µm (Acrodisc).

Le phosphore dissous

Les composés organiques phosphorés dissous ont été regroupés en 3 classes

-Le phosphore organique enzymatiquement hydrolysable (PHPase):
-Le phosphore organique hydrolysable (POH)
-Le phosphore organique oxydable (PNH)

Le phosphore organique enzymatiquement hydrolysable dissous (PHPase)

Il correspond au phosphore organique qui peut être hydrolysé par les phosphatases présentes dans l'eau de mer. Pour le dosage de cette fraction, une hydrolyse a été effectuée *in vitro* par addition de phosphatase alcaline purifiée à de l'eau de mer.

Les conditions de cette hydrolyse ont été optimisées notamment le temps d'incubation et les concentrations d'enzyme nécessaires. Pour cela, nous avons utilisé de la phosphatase alcaline purifiée issue de l'intestin de veau (Sigma P-3877) et du paranitrophényl phosphate (pNPP) comme substrat spécifique. La concentration de pNPP était de7 µM. Cette concentration est beaucoup plus élevée que celle des composés phosphorés du milieu naturel. Elle permettra de s'assurer que la durée d'hydrolyse des composés phosphorés naturels est suffisante. Cinq concentrations en enzyme ont été testées allant de 9 à 0,035 mg/l. Afin d'accélérer la vitesse de réaction, les tubes sont placés au bain marie à 37°C. La vitesse de la réaction est mesurée par le dosage du paranitrophénol (PNP) produit au cours de la réaction, à 410 nm (Voir technique de dosage plus loin). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure 1.

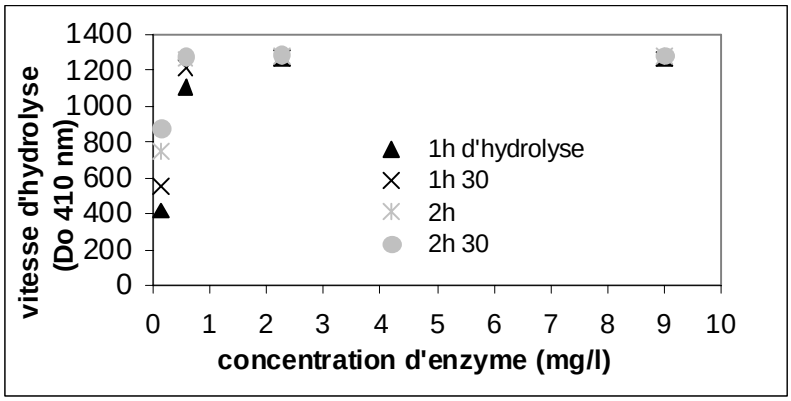

Figure 1 : test de la vitesse d'hydrolyse du pNPP en fonction des concentrations de phosphatase

La figure 1 montre qu'une concentration en enzyme d'au moins 0,56 mg/l est suffisante pour hydrolyser en moins de deux heures tout le pNPP

Toutefois cette addition d'enzyme peut interagir avec le dosage des ions orthophosphates. En effet les protéines inhibent la formation des composés phosphomolybdiques. Pour apprécier l'importance de ces interactions, des dosages de phosphore ont été réalisés en présence de concentrations de phosphatase comprises entre 0,035 et 9 mg/l mises en présence d'une concentration en orthophosphate de 0,5 µM.

Phosphatase mg/l	9 mg/l	2,25 mg/l	0,56 mg/l	0,14 mg/l	0,035 mg/l	Témoin	Témoin
Do 885	18	104	130	139	154	140	145

Tableau 1: influence de la concentration de phosphatase sur le dosage des orthophosphates (DO mesurées à 885 nm)

Le tableau 1 montre que lorsque la concentration en phosphatase dépasse 0,56 mg/l une interaction avec le dosage du phosphore se produit. Pour nos expériences, nous utiliserons une concentration de phosphatase alcaline de 0,56 mg/l qui limite les interactions avec le dosage du phosphore, et une durée d'incubation de 2h à 37 °C pour hydrolyser la totalité des composés phosphorés organiques hydrolysables. Une gamme étalon de phosphore contenant la même concentration de phosphatase est également effectuée à chaque dosage.

Les concentrations de PHPase sont ensuite calculées par différence entre les concentrations en orthophosphate libérées après addition de phosphatase bovine et les concentrations initiales de chaque échantillon.

Le phosphore organique hydrolysable dissous (POH)

Il représente le phosphore organique qui peut être hydrolysé facilement par les organismes vivants. Cette matière organique est très labile par opposition à la matière organique réfractaire.

Cette fraction est constituée par le phosphore hydrolysable par la phosphatase estimée grâce à la technique exposée ci-dessus (PHPase), et par le phosphore hydrolysable par d'autres enzymes (PNHPase).

La méthode utilisée pour la mesure de la fraction POH est inspirée de la norme AFNOR. La norme NF-EN 1189 « *Qualité de l'eau– Dosage du phosphore – Dosage spectrométrique à l'aide du molybdate d'ammonium* » spécifie des méthodes de dosage des orthophosphates, des polyphosphates hydrolysables, et du phosphore total.

Des aliquotes de 50 ml d'eau filtrée sont mis dans des flacons hermétiques résistants en téflon, et sont acidifiés avec 0,210ml de H2SO4 à 98 % puis passés à l'autoclave pendant 30 minutes à 120 degrés.

Le phosphore organique oxydable dissous (PNH)

Il représente le phosphore organique réfractaire qui ne peut être reminéralisé qu'à très long terme au sein de l'environnement.

On l'obtient pour chaque prélèvement par différence entre le phosphore organique total (PT), dont la technique de dosage sera détaillée plus bas, et le phosphore hydrolysable (POH).

Le dosage du phosphore organique total (PT) est inspiré de la norme AFNOR NF-EN 1189 : oxydation au perxodisulfate de potassium (50g/l) et à l'acide sulfurique (0,210ml de H2SO4 à 98 %). L'hydrolyse est réalisée dans un minéralisateur à micro ondes (Multiwave 3000 Digesteur, Anton Paar).

Le temps d'oxydation ainsi que la puissance du micro-onde ont a été optimisés sur un même échantillon d'eau. Le tableau 4 présente les résultats d'une expérience au cours de laquelle différentes puissances de chauffage et différentes durées de traitement ont été comparées sur un même échantillon d'eau de mer.

Echant	Blc réact	Blanc réact +catalyseurs	10'+5' 1400W	10'+5' 900W	20'+5' 900W	30'+5' 900W
Do 885	2	13	50	49	46	45

Tableau 2 : influence de durée d'expérience et de la puissance du micro-ondes sur le dosage des orthophosphates (DO à 885 nm)

Le tableau 2 montre qu'une puissance de 900 watts et une montée en puissance de 10 minutes suivie d'un maintien à cette puissance pendant 5 minutes, sont suffisantes pour réaliser une hydrolyse totale des échantillons. Ce sont ces conditions que nous retiendrons pour nos expériences.

Le minéralisateur à micro-ondes mesure à chaque passage de la cuve devant le detecteur la température et la pression dans la cuve. Lors de nos expériences, une température maximale moyenne de 140°C ainsi qu'une pression maximale moyenne de 35 bars ont été enregistrées.

Le phosphore particulaire (PP)

Nous avons dosé le phosphore organique oxydable particulaire. Il représente la forme particulaire du phosphore organique réfractaire qui ne peut être reminéralisé qu'à très long terme dans un écosystème. Il est obtenu par différence entre le phosphore organique oxydable total de l'eau de mer et le phosphore organique oxydable dissous.

Le phosphore organique oxydable total est mesuré au moyen de la même technique que celle employée pour le dosage du phosphore organique oxydable dissous, mais en utilisant les aliquotes d'eau brute non filtrée.

3. Mesures des activités phosphatasiques

La phosphatase est une enzyme qui agit sur les mono esters phosphoriques (un ester est une combinaison acide - alcool) par hydrolyse (décomposition de la molécule en utilisant une ou plusieurs molécules d'eau) en libérant des ions orthophosphates. Certaines phosphatases sont spécifiques d'un ester phosphorique donné. C'est le cas de la glucose-6-phosphatase ou de la fructose-1-6-phosphatase. Mais la plupart des phosphatases sont peu spécifiques, c'est-à-dire qu'elles agissent sur un grand nombre d'esters phosphoriques. C'est le cas de la phosphatase alcaline.

La réaction impliquant la phosphatase alcaline comporte quatre étapes (figure 2)

Etape 1 : liaison non covalente du substrat et de l'enzyme

Etape 2 : libération d'un alcool et formation du complexe covalent « phosphoryl enzyme »

Etape 3 : conversion grâce à une molécule d'eau en un composé non covalent

Etape 4 : relargage de l'ion orthophosphate et régénération de l'enzyme libre

R= Radical

E= Enzyme

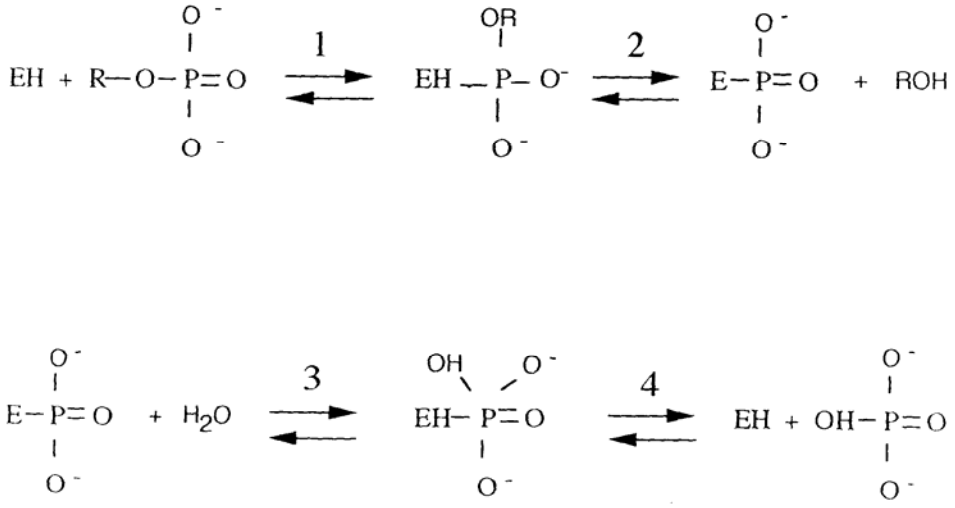

Figure 2 : Schéma du processus d'hydrolyse des composés phosphorés organiques par la phosphatase alcaline (Mc Comb *et al.*, 1979)

3.1 Choix des substrats

Les substrats généralement utilisés pour mesurer les activités de la phosphatase alcaline sont les suivants (Petterson et Janson, 1978):

1- le méthylumbelliféryl phosphate (MUF-P)

2- le 3.o. méthylfluoresceine phosphate

3- le paranitrophényl phosphate (pNPP)

4- le glycérophosphate

5- le phénol-phtaléine phosphate

Il est admis que les substrats présentant la plus grande sensibilité sont les substrats fluorescents (substrats n°1 et 2), en particulier le méthylumbelliféryl phosphate (MUF-P). Ce substrat offre la meilleure sensibilité pour la mesure de l'activité phosphatasique dans les eaux douces et saumâtres (Petterson et Jansson, 1978 ; Peterson, 1980 ; Hoppe, 1983 ; Chrost et Overbeck, 1987 ; Carr et Goulder, 1990 ; Olsson, 1990 ; Cotner et Wetzel, 1992), mais également en milieu marin (Chrost, 1990 ; Martinez et Azam, 1993 ; Christian et Karl, 1995 ; Koike et Nagata, 1997).

L'autre substrat fluorescent, le 3.o. méthylfluoresceine phosphate, est également fréquemment utilisé (Hill *et al.,* 1968 ; Perry, 1972 ; Jansson, 1976, 1977 ; Wetzel, 1981 ; Francko, 1983 ; Newman et Reddy, 1992, 1993). Mais il entraîne un fort bruit de fond de fluorescence qui oblige d'utiliser de trop faibles concentrations.

Le glycérophosphate et le phénol-phtaléine phosphate sont souvent employés en biologie cellulaire pour caractériser la phosphatase acide, mais beaucoup plus rarement pour la mesure de l'activité de la phosphatase alcaline.

Le para-nitrophényl phosphate ou p-NPP, est le substrat le plus classique, notamment dans de le domaine de l'hydrobiologie (Reichardt *et al.,* 1967 ; Heath et Cooke, 1975 ; Stevens et Parr, 1977 ; Halemejko et Chrost, 1984 ; Boavida et Heath, 1988, Jamet *et al.,* 1994).

Nous avons utilisé deux de ces substrats : le méthylumbelliféryl phosphate et le paranitrophényl-phosphate pour en comparer la sensibilité.

3.2 Préparation des échantillons

Mesure de l'activité de l'eau de mer

L'eau de mer renferme une activité phosphatasique dissoute et une activité particulaire. L'ensemble de ces deux activités constitue l'activité totale. Cette activité totale est mesurée en solubilisant le substrat dans 30 ml d'eau de mer provenant des deux sites.

L'activité dissoute est mesurée sur l'eau de mer passée sur des filtres GELMAN de 0,45 µm en ester de cellulose. Par différence avec l'activité totale, on obtient l'activité particulaire. Ces mesures sont pratiquées sur les échantillons d'eau fraîchement prélevés.

Ces expériences ont été réalisées à l'aide du MUFP et du pNPP.

Contribution des classes de taille du matériel particulaire intact :

Afin de préciser l'activité des principales classes de taille responsables de l'activité particulaire, des filtrations inverses d'échantillons d'eau de mer ont été réalisées. Le principe de cette expérience appliquée au zooplancton est présenté dans la figure 3.

Six litres d'eau sont d'abord filtrés en utilisant une membrane SEFAR de 90 µm. On concentre ainsi au moins 20 fois le zooplancton.

Deux litres d'eau de mer sont également concentrés par filtration inverse environ 10 fois grâce à une membrane de 6 µm. Le zooplancton et le phytoplancton sont ainsi concentrés simultanément.

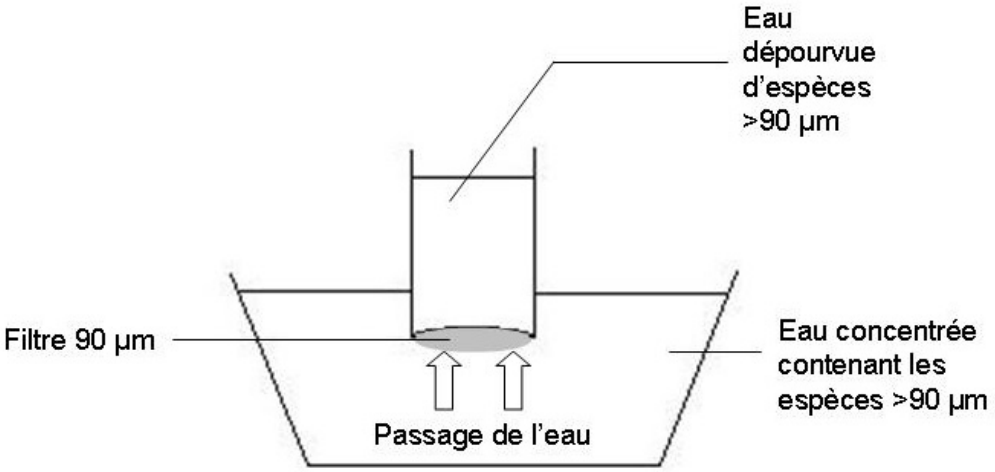

Figure 3: schéma d'une filtration inverse appliquée aux espèces de taille >90 µm

Enfin, 1 litre d'eau de mer est concentré environ 5 fois avec une membrane de 1 µm, ce qui permet de concentrer le zooplancton et le phytoplancton de plus petite taille.

En parallèle, on mesure l'activité dissoute sur un filtrat d'eau de mer passée sur 0,45 µm, ainsi que l'activité totale de l'eau de mer.

On peut ainsi connaître le rôle de ces trois classes de taille sur du plancton non broyé.

Le substrat utilisé pour ces expériences a été le pNPP. Afin d'avoir un meilleur échantillonnage, le volume de milieu concentré final est de 30 ml.

Contribution des classes de taille du matériel particulaire broyé

Des filtrations successives ont été réalisées (Taft *et al.,* 1977 ; Stewart et Wetzel, 1982 ; Chrost *et al.,* 1984, 1989 ; Chrost et Overbeck, 1987 ; Currie *et al.,* 1986 ; Boon, 1993). Pour cela, des échantillons d'eau de mer de 1 à 10 litres selon la densité planctonique, sont filtrés sur des membranes SEFAR de mailles décroissantes : 90 µm, 50 µm, 6 µm, 1 µm et sur des filtres GELMAN de maille 0,45 µm en ester de cellulose.

Ces filtrations sont réalisées dès l'arrivée des échantillons au laboratoire.

Le matériel recueilli sur les filtres de 90 et 50 µm est essentiellement composé de grosses cellules phytoplanctoniques et de zooplancton. Celui recueilli sur les filtres de 6 et 1 µm est surtout composé de cellules phytoplanctoniques, et celui recueilli sur les filtres de 0,45 µm de bactérioplancton.

Les filtres sont ensuite placés dans des fioles de 20ml et congelés à -80°C.

Lors du dosage, 15 ml d'eau distillée sont ajoutés dans les fioles afin de bien immerger les filtres. Puis ils sont soniqués, en maintenant la température à 2°C pour préserver les activités

enzymatiques. La durée de sonication est de 30 secondes pour les filtres de 1 à 90µ et de 1mn30 pour les filtres à 0,45µ. On réalise ainsi un homogénat qui sera utilisé comme source d'enzymes.

Isolement d'organismes zooplanctoniques

L'activité phosphatasique de différentes espèces et classes de zooplancton a été également étudiée. Pour ce faire le zooplancton de la Petite Rade à été collecté grâce à un filet de maille 90 µm. Ce concentrat de zooplancton a été ensuite transféré au laboratoire et placé à -20°C pendant 2 à 4 heures dans l'eau de mer naturelle. Ce traitement a tué tous les organismes sauf certaines larves de Cirripèdes qui nageaient encore après décongélation à température ambiante. Les organismes ainsi immobilisés ont pu être ainsi isolés plus facilement, sous une loupe binoculaire et grâce un mandrin sur lequel un fil de tungstène en forme de lasso a été fixé.

Des spécimens de Nauplii, Copépodites et adultes de Copépodes (Calanoïdes et Cyclopoïdes) de Cladocères (Evadné, Podon), de Nauplii de Cirripèdes et de Zoés de Malacostracés ont été ainsi collectés séparément dans des tubes Eppendorf contenant 250 µl d'eau distillée.

Les échantillons ont ensuite été soniqués en maintenant la température à 2°C afin de réaliser un homogénat qui sera utilisé comme source d'enzyme.

Des prélèvements de zooplanctontes vivants ont également été réalisés sans congélation et avec le même appareillage. Pour mesurer l'activité exoenzymatique sécrétée par le zooplancton, des organismes vivants ont été placés pendant 24h à 20°C dans de l'eau de mer filtrée sur 0,45 µm dans laquelle la mesure de l'activité phosphatasique a été effectuée avec et après incubation.

3.3 Mesure des activités enzymatiques

Avec le paranitrophényl-phosphate (pNPP)

Principe du dosage

L'hydrolyse enzymatique du paranitrophényl phosphate par la phosphatase alcaline libère du PO_4^{3-} et un alcool (le paranitrophénol ou pNP) coloré en jaune, présentant une absorbance maximale à 410nm :

$$pNPP + H_2O \rightarrow p\text{-}NP + PO_4^{3-}$$

Technique de Dosage

Les incubations sont faites à 20°C dans une enceinte thermostatée.

Quatre concentrations de pNPP sont utilisées (10, 5, 2,5 et 1,25mM). Pour les mesures de l'activité totale, le substrat est préparé dans de l'eau de mer du même prélèvement, préfiltrée sur 0,45µ.

Des blancs substrats à des concentrations de 10, 5, 2,5, 1,25mM sont également réalisés.

La suspension d'enzyme est ensuite ajoutée aux substrats (0,4ml pour 4ml de substrat). Puis la concentration de pNP libérée est mesurée au spectrophotomètre (Hélios Gamma, Thermo Electron Corporation) à 410 nm pendant 4 heures, à intervalles réguliers.

Une gamme étalon du produit de la réaction (le paranitrophénol) est également réalisée avec une solution mère à 1mM et par dilutions successives dans l'eau de mer afin d'obtenir des concentrations de 15, 7,5 et 3,75 µM.

Pour les mesures des activités phosphatasiques de l'eau filtrée ou non filtrée, le substrat est ajouté directement dans les échantillons.

Pour les mesures de l'activité des individus zooplanctoniques isolés, les différentes concentrations en substrat (0,01, 0,1, 1 et 10 mM) sont préparées dans de l'eau de mer filtrée sur 0,45 µm et les incubations se déroulent à 25°C.

<u>Avec le méthylumbelliféryl-phosphate (MUF-P)</u>

Principe du dosage

L'hydrolyse enzymatique du méthylumbelliféryl-phosphate par la phosphatase alcaline libère du PO_4^{3-} et un alcool : le méthylumbelliferone ou MUF, qui émet une fluorescence à 450 nm lorsqu'il est excité à 340 nm.

$$\text{MUF-P} + H_2O \rightarrow \text{MUF} + PO_4^{3-}$$

Technique de Dosage

Les concentrations en MUF-P sont de 10, de 3,33, de 1,11, de 0,37, de 0,12, de 0,041 et de 0,013 µM. Elles sont préparées dans l'eau de mer filtrée ou non. Pendant l'incubation, les tubes sont placés à l'obscurité dans une enceinte thermostatée à 20°C.

Une gamme étalon avec le MUF (méthylumbelliferone) est également réalisée à des concentrations comprises entre 50 et 200 nM.

Un fluorimètre SFM 25, de Bio-tek instruments a été utilisé pour les mesures des concentrations de MUF.

3.4 Etude des activités en fonction du pH

Afin de différentier les principales phosphatases, une étude des effets du pH sur les activités dissoutes et particulaire a été effectuée. Dans le cas des activités particulaires, des mesures sont pratiquées sur le plancton intact ainsi que sur du plancton broyé par passage au sonicateur.

Pour la préparation des échantillons, le protocole est le même qu'au chapitre 3.2.

Les substrats sont préparés dans de l'eau filtrée sur 0,45 µm ou non filtrée.

Les pH sont les suivants : 9,5, 9, 8,5, 7 et 5,5. Au-delà de 9,5 un précipité se forme qui empêche les mesures au spectrophotomètre. Ces pH ont été stabilisés à l'aide de tampons spécifiques. Nous avons retenu pour les pH 7 et 5,5 un tampon Tris-Maléate 0,2 M et pour les pH 9,5, 9 et 8,5 un tampon glycine 0,1 M.

Les pH ont été ajustés avec de la soude commerciale à 33 %.

3.5 Rappels de cinétiques enzymatiques et principes des calculs

Les activités phosphatasiques ont été rapportées soit au volume d'eau de mer, soit au volume d'eau à partir duquel le matériel particulaire a été filtré, soit à la biomasse planctonique dans le cas des activités particulaires spécifiques.

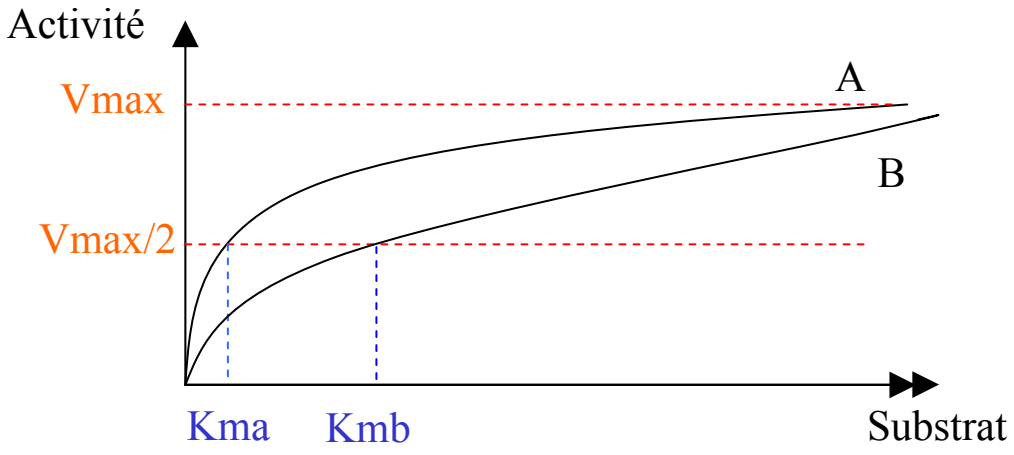

Figure 4 : Exemples de Cinétiques de Michaelis-Menten.
Courbe A : Activité à forte affinité,
Courbe B : Activité à faible affinité.

La mesure des activités à différentes concentrations de substrat permet de tracer la courbe de Michaelis Menten qui représente la quantité de produit formé en fonction de la concentration en substrat, par unité de temps.

$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Cette courbe se caractérise par sa vitesse maximale (ou Vmax) et sa constante de Michaelis (ou Km) (figure 4). La Vmax correspond à l'activité pour une concentration infinie. Le Km est la concentration en substrat correspondant à une activité égale à Vmax/2. Lorsque le Km est élevé l'enzyme est peu active aux faibles concentrations de substrat et son affinité est qualifiée de faible. Lorsque le Km est bas, l'enzyme est active aux faibles concentrations en substrat et son affinité pour le substrat est forte.

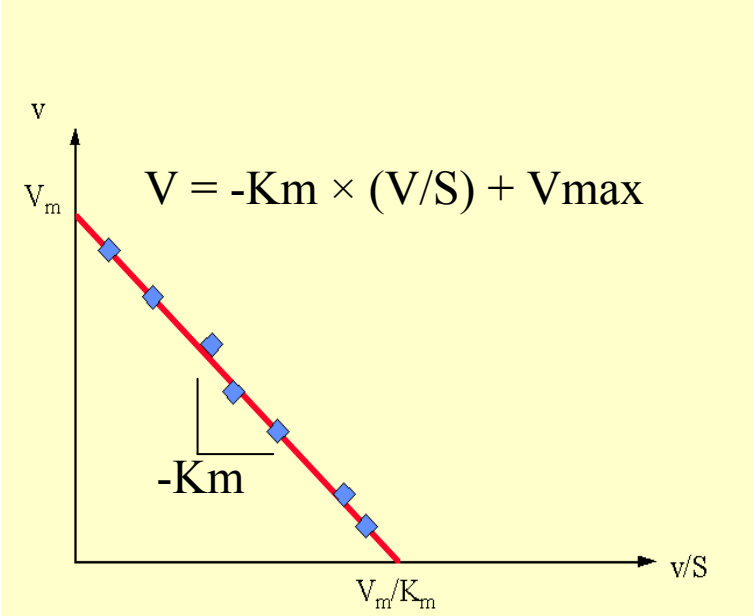

Figure 5 : Représentation d'Eadie Hofstee d'une simple activité michaelienne

Pour calculer les constantes cinétiques (Km et Vmax) les activités sont représentées en fonction du rapport entre ces activités et les concentrations de substrat (transformation d'Eadie Hofstee, figure 5). L'intersection de la droite ainsi obtenue avec l'axe des ordonnées correspond à la Vmax et l'inverse de la pente, au Km (figure 5).

Dans bien des cas, la courbe obtenue lors de nos expériences n'était pas une droite. Nous avons montré que ce type de cinétique résulte de la somme de deux composantes michaeliennes, l'une à forte et l'autre à faible affinité, dont nous justifierons l'intérêt dans la

présentation des résultats. Pour calculer les constantes biochimiques de chacune de ces composantes, un modèle informatique a été développé basé sur un programme d'itérations successives. Par ailleurs, nous avons utilisé en parallèle le logiciel Table Curve qui permet également de résoudre ce type d'équations.

Pour que le calcul des constantes de Michaelis soit précis, il est nécessaire que les mesures soient pratiquées pendant la phase linéaire d'évolution des quantités de produit formé. Comme l'activité phosphatasique est inhibée de façon compétitive par les ions orthophosphate qui peuvent être produits pendant l'hydrolyse de composés phosphorés intracellulaires du materiel particulaire, les équations des cinétiques enzymatiques ont été remaniées.

La vitesse initiale de la réaction en présence d'inhibiteur se calcule ainsi :

$$\mathbf{V_i = [(Vm_i * S) / (Km((F_i /K_f) + 1) + S)]}$$

Avec :

S = concentration en MUF-P

$\mathbf{F_i}$ = concentration d'inhibiteur initiale (PO_4)

$\mathbf{F_t}$ = concentration d'inhibiteur à l'instant t

F(t) = facteur d'augmentation de la concentration en inhibiteur en fonction du temps

$\mathbf{K_f}$ = constante d'affinité de l'inhibiteur pour l'enzyme

$\mathbf{Vm_t}$ = vitesse maximale à l'instant t

$\mathbf{Vm_i}$ = vitesse initiale maximale

À l'instant t on a:

$$\mathbf{V_t = [(Vm_t * S) / (Km((F_t /K_f) + 1) + S)]}$$

[F] dépend du temps (le PO_4 est produit à partir de l'homogénat de façon régulière au cours du temps) : $\mathbf{F_t = F_i * t}$

La Vm dépend également du temps : $\mathbf{Vm_t = Vm_i * t}$

On a alors :

$$\mathbf{V(t) = [(Vm_i * S * t) / (Km((F_i * t) /K_f) + 1) + S)]}$$

On pose:

$\mathbf{a = Vm_i * S}$

$\mathbf{b = (Km * F_i) / K_f}$

$\mathbf{c = Km + S}$

L'équation précédente devient alors :

$$\mathbf{V(t) = [(Vm_i * S * t) / (Km / K_f) * F * t + Km + S)] = (a * t) / (b * t + c)}$$

Si on linéarise, on obtient:

$$\mathbf{1/V(t) = b/a + c/a * 1/t}$$ or **c/a** est la pente

et a / c = $(Vm_i * S) / (Km + S)$ c'est à dire la vitesse initiale sans inhibiteur

En pratique, pour chaque concentration on trace la courbe 1/v en fonction de 1/t. Puis on calcule la valeur de la pente (c/a), qui correspond à l'inverse de la vitesse initiale sans inhibiteur.

Expression des activités :

Les Vmax ainsi calculées ont été rapportées aux volumes d'eau de mer ou aux concentrations en protéines du matériel particulaire (Activités spécifiques). Les Km, qui sont des concentrations de substrat, sont indépendants des systèmes de référence.

Le logiciel *Table Curve* permet de calculer les écarts types des Vmax. Nous les avons indiqués chaque fois que la précision de ce calcul était suffisante.

Rapport Vm/Km, calcul et signification :

Nous avons également calculé le rapport Vm/Km. Il correspond à la pente de la courbe de Michaëlis-Menten lorsque la concentration en substrat tend vers 0 (et que S << Km). En effet, l'équation (Vm * S) / (Km +S) tend alors vers (Vm/Km) * S. Ce rapport sera utilisé pour comparer les activités enzymatiques dans des conditions non saturantes en substrat. Il sera présenté sans dimentions.

4. Etude des communautés planctoniques

4.1 Étude de la densité bactérienne

La densité bactérienne a été estimée sur des échantillons d'eau de mer brute prélevés à 2 mètres de profondeur dans les deux stations d'échantillonnage. Des aliquotes de 50 ml d'eau de mer brute ont été conservés dans des tubes stériles en polypropylène. Ils ont été fixés avec 0,5 ml de formaldéhyde à 37 % complémenté en CaCO3. Ils ont ensuite été placés en chambre froide (2°C) et analysés dans le mois qui a suivi le prélèvement.

En vue de l'analyse microscopique, les bactéries ont été colorées au DAPI (4,6-DiAmidino-2-PhénylIndole) et dénombrées à l'aide d'un microscope inverse à épifluorescence de type Leica DMI 4000 (Porter et Feig, 1980 ; Robertson et Button, 1989 ; Velji et Albright, 1993).
La densité bactérienne D a été exprimée en nombre de bactéries par ml d'eau de mer selon la formule suivante :

$$\mathbf{D = (N * n) / V}$$

Avec : **N** = nombre de bactéries dénombrées dans un champ.

n = nombre total de champs = $\prod * (d/2)^2$, avec d diamètre de la membrane, exprimé en nombre de champs.

V = volume du sous-échantillon d'eau de mer, en ml.

4.2 Étude de la communauté phytoplanctonique

Les volumes d'eau de mer permettant l'étude du phytoplancton ont été prélevés à 2 mètres de profondeur dans les deux stations d'échantillonnage à l'aide de bouteilles Niskin. Après le prélèvement, l'eau de mer brute a été immédiatement additionnée de Lugol fort afin de préserver et de colorer les organismes phytoplanctoniques (Bourrelly, 1966).
Compte tenu des faibles densités phytoplanctoniques, nous avons concentré 5 litres d'eau de la Petite Rade de Toulon et 7 litres d'eau de la Grande Rade (moins riche en phytoplancton) par filtration inverse.
L'échantillon d'eau de mer lugolée a ainsi été concentré jusqu'à obtenir un volume final de 100 ml. Puis, ce volume a été mis à sédimenter pendant 48 heures dans une colonne à sédimentation sur laquelle a été adaptée une lame de comptage (Utermöhl, 1958).
Après leur sédimentation, les cellules phytoplanctoniques ont été dénombrées suivant la méthode d'Utermöhl (1958), modifiée par Legendre et Watt (1971-1972).
Le dénombrement des cellules algales a été effectué sur 40 champs au minimum avec un microscope inversé à contraste de phase Leica DMI 4000.
L'identification puis le dénombrement des organismes phytoplanctoniques ont été réalisés par Nadège Rossi, doctorante de l'équipe EBMA, de mars à décembre 2005 dans le cadre de son DEA, la suite du cycle annuel (jusqu'en mars 2006) a été effectuée par mes soins.
La densité phytoplanctonique D a été exprimée en nombre de cellules par litre d'eau de mer échantillonné, selon la formule suivante :

$$\mathbf{D = (N * n) / V}$$

Avec : **N** = nombre de cellules algales dénombrées dans un champ.

n = nombre total de champs = $\prod$ * $(d/2)^2$, avec d diamètre de la lame, exprimé en nombre de champs.

V = volume d'échantillon d'eau de mer avant la concentration par filtration inverse, exprimé en litres.

La fréquence d'une espèce phytoplanctonique donnée, notée f_i a également été calculée selon la formule suivante :

$$f_i = D_i / D_t$$

Avec : **Di** = densité d'une espèce phytoplanctonique donnée, exprimée en nombre de cellules par litre d'eau de mer.

D_t = densité phytoplanctonique totale, exprimée en nombre de cellules par litre d'eau de mer.

La diversité de la communauté phytoplanctonique peut se calculer à l'aide de différents indices (Frontier et Pichod-Viale, 1993). Nous avons utilisé l'indice de Shannon et Weaver (1949), noté **H'** et défini par :

$$H' = \sum_{i=1}^{S} f_i * \log_2 f_i$$

Avec f_i, la fréquence des *i* espèces.

4.3 Étude de la communauté zooplanctonique

Le zooplancton a été collecté à l'aide d'un filet à plancton modèle General Oceanic 5125 (longueur : 2,5 m ; diamètre : 0,5 m ; vide de maille : 90 µm) en réalisant plusieurs traits verticaux pour chaque échantillon. Le volume d'eau filtré a été déterminé par un compteur de litre modèle Général Oceanic 2003 R. L'échantillon d'eau résultant de cette filtration est concentré en zooplancton. Il est recueilli au fond du filet et représente un volume d'environ 3 litres.

Ces échantillons de zooplancton ont été fixés dans une solution de formol à 5 %, tamponnée avec du CaCO3, afin d'éviter la contraction musculaire trop brusque des organismes. Des sous échantillons de 1 ml ont été réalisés sur l'échantillon initial ajusté à 250 ml, avec une pipette de Hensen.

L'identification puis le dénombrement des organismes zooplanctoniques ont été réalisés sur les sous-échantillons par le Dr Richard de l'équipe EBMA.

Le dénombrement des organismes zooplanctoniques a été effectué de façon à compter 250 individus au minimum. Ces organismes ont été identifiés au niveau taxonomique le plus précis et lorsque cela a été possible jusqu'au niveau de l'espèce.

L'abondance zooplanctonique totale A, exprimée en nombre d'individus par mètres cube d'eau de mer, est telle que :

$$\mathbf{A = (N * V_f) / (V_x * Vi)}$$

Avec : **N** = nombre d'organismes zooplanctoniques dénombrés dans les sous-échantillons.

$\mathbf{V_x}$ = volume des sous échantillons, exprimé en litres.

Vf = volume de l'échantillon d'eau de mer recueilli avec le filet et concentré en zooplancton, exprimé en litres.

Vi = volume d'eau de mer filtré avec le filet, exprimé en m^3

La fréquence d'une espèce zooplanctonique donnée, notée f_i a également été calculée selon la formule :

$$\mathbf{f_i = A_i / A_t}$$

Avec : **Ai** = Abondance d'une espèce zooplanctonique, en nombre d'individus par m^3 d'eau de mer.

$\mathbf{A_t}$ = Abondance zooplanctonique totale, en nombre d'individus par m^3 d'eau de mer.

Comme pour le phytoplancton, nous avons caractérisé la diversité zooplanctonique par l'indice de Shannon et Weaver (voir partie 4.2).

4.4 Estimation de la biomasse du matériel particulaire et planctonique

De nombreuses méthodes sont généralement proposées pour mesurer la biomasse du matériel particulaire et planctonique (Bonin et Travers, 1992). Aucune n'est entièrement satisfaisante (Amblard, 1987). C'est la raison pour laquelle plusieurs méthodes ont été retenues dans ce travail. Certaines sont spécifiques de la communauté planctonique, c'est le cas du dosage de la chlorophylle *a* ou du calcul de la biomasse à partir du biovolume phytoplanctonique (Bougis, 1974). D'autres ne sont pas spécifiques, et permettent d'estimer la biomasse de l'ensemble du matériel particulaire (planctonique et détritique). Il s'agit du dosage des protéines (Bonin et Travers, 1992).

Dosage de la chlorophylle *a*

Nous avons prélevé l'eau de mer destinée au dosage de la chlorophylle *a* à 2 mètres de profondeur dans les deux stations d'échantillonnage. Le volume d'eau de mer échantillonné a été de 2 litres dans la petite et la Grande Rade de Toulon. L'eau de mer a été filtrée sur une membrane en microfibres de verre de type GF/F Whatman (porosité : 0,8 µm, diamètre 47 mm) préalablement conditionnée par l'ajout de 2 ml de solution saturée de carbonate de magnésium ($MgCO_3$). L'échantillon à été filtré avec une pression maximum de 380 mm d'Hg. Le filtre obtenu a été immédiatement immergé dans 15 ml d'acétone à 90 %, puis laissé au moins 24h à -20°C avant sonication et dosage au fluorimètre.

La méthode de dosage de la chlorophylle par fluorométrie a été mise au point par Yentsch et Menzel (1963) puis décrite par Holm-Hansen *et al*. (1965) et par Strickland et Parsons (1972). Elle est destinée au milieu marin, et a l'avantage d'être très sensible et ne nécessite qu'un faible volume d'échantillon. Nous l'avons préférée à la méthode spectrophotométrique, laquelle manque de sensibilité.

La concentration de chlorophylle *a* est déterminée en mesurant la fluorescence émise à une longueur d'onde de 664 nm, à la suite d'une excitation à une longueur d'onde de 430 nm.

L'appareil utilisé (SFM 25, Bio-tek instruments) n'étant pas suffisamment précis pour mesurer les phéopigments, les résultats présentés correspondent aux concentrations en chlorophylle a sans la correction par les phéopigments (notamment la phéophytine *a,* laquelle absorbe à une longueur d'onde voisine de la chlorophylle *a* et interfère avec elle (Trees *et al*., 1985 ; Arar, 1994).

La concentration finale de chlorophylle *a* exprimée en µg/l, se calcule avec la formule suivante :

$$\mathbf{[Cchl] = (FR * p * V_{ac}) / V}$$

Avec : **FR** = Fluorescence brute

p = coefficient directeur de la courbe d'étalonnage

$\mathbf{V_{ac}}$= Volume d'acétone ajouté au filtre (en ml)

V = Volume d'eau de mer filtrée (en litres)

Biovolume et biomasse phytoplanctonique

La détermination du biovolume a été réalisée après dénombrement des cellules phytoplanctoniques. Le biovolume a été calculé selon la méthode de Lohman (1908) qui assimile les cellules planctoniques à des formes géométriques de type sphérique ou cylindrique.

Ainsi, le biovolume des cellules d'une espèce phytoplanctonique donnée, exprimée en μm^3 est :

$$\mathbf{V = Vi * N}$$

Avec : **Vi** = biovolume d'une cellule de l'espèce phytoplanctonique, exprimée en μm^3.

N = nombre de cellules d'une même espèce phytoplanctonique.

La biomasse se calcule à partir des biovolumes en supposant que la densité algale est voisine de 1. Il existe une relation entre le biovolume et la biomasse des cellules phytoplanctoniques, telle que : 1.10^6 μm^3 = 1 µg.

La biomasse B d'une espèce phytoplanctonique donnée, exprimée en $\mu g.l^{-1}$ est donc :

$$\mathbf{B = (V) / (V' * 1.10^6)}$$

Avec : **V** = biovolume des cellules de l'espèce phytoplanctonique, exprimée en μm^3.

V' = volume d'eau de mer échantillonné, en litres.

<u>Dosage des Protéines</u>

Afin de déterminer la teneur en protéines associée aux diverses classes de taille du matériel particulaire planctonique, nous avons réalisé des filtrations successives (Taft *et al.,* 1977 ; Stewart et Wetzel, 1982 ; Chrost *et al.*, 1984, 1989 ; Chrost et Overbeck, 1987 ; Currie *et al.,* 1986 ; Boon, 1993). Pour cela, des échantillons d'eau de mer de 1 à 10 litres selon la densité planctonique, ont été filtrés sur des membranes SEFAR de mailles décroissantes : 90 µm, 50 µm, 6 µm, 1 µm et sur des filtres GELMAN de maille 0,45 µm en ester de cellulose. Ces filtrations sont réalisées dès l'arrivée des échantillons au laboratoire. Les filtres sont ensuite placés dans des fioles de 20ml et congelés sans eau à -80°C. Ces échantillons après resuspension dans de l'eau distillée et sonication, serviront à réaliser la mesure de l'activité des différentes fractions particulaires.

La méthode de Lowry (Lowry *et al.,* 1951) a été retenue pour sa bonne sensibilité vis à vis des protéines du plancton.

L'acide phosphotungstomolybdique contenu dans le réactif (Folin) est réduit par les protéines. On obtient ainsi plusieurs produits ayant une coloration bleue caractéristique dont l'absorbance à 660 nm sera mesurée au spectrophotomètre.

Les résidus de la tyrosine, du tryptophane et, dans une moindre mesure, ceux de la cystéine, de la cystine et de l'histidine interviennent dans la réaction. La liaison peptidique est aussi impliquée.

L'addition de sulfate de cuivre rend la réaction nettement plus sensible en favorisant le transfert d'électrons.

On réalise une gamme étalon à partir d'une solution mère d'albumine à 250µg/ml.

La concentration C en protéines de l'eau de mer est donc :

$$\mathbf{C = (Q_p * V) / V_x}$$

Avec : $\mathbf{Q_p}$ = quantité de protéines contenues dans 1 ml de suspension protéique calculée à partir de la gamme étalon et l'absorbance brute – le blanc réactif.

V = Volume de la suspension protéique, en ml.

Vx = Volume d'eau de mer échantillonné, en litres.

Une bonne corrélation a été mise en évidence entre les concentrations en protéines de la fraction correspondant au phytoplancton et celles de la chlorophylle. Elle confirme l'intérêt de la mesure des protéines pour estimer la biomasse, en particulier lorsque l'on ne dispose pas d'une méthode spécifique (cas des fractions bactériennes ou zooplanctoniques).

5. Analyse statistique des données

Le traitement des données a été effectué à l'aide du test de Spearman lorsqu'il a été nécessaire de comparer des séries de données chronologiques. Ce test de rang non paramétrique analyse les corrélations entre les profils temporels de deux paramètres. Les corrélations sont considérées comme significatives lorsque p est inférieur ou égal à 0,05, tandis qu'on parlera de relation si p est compris entre 0,06 et 0,1.

Le test non paramétrique de Wilcoxon a été utilisé pour comparer la différence entre deux séries de données. Le test de Wilcoxon estime le degré de significativité de ces différences par un coefficient p. Lorsque p est inférieur à 0,05, les différences entre les deux séries sont considérées significatives. Ce test a été surtout utilisé pour comparer les données de la petite et de la Grande Rade.

Ces analyses ont été effectuées avec le logiciel *Statview*.

Résultats, Chapitre I : Le phosphore et les paramètres abiotiques

Présentation

Dans ce chapitre, nous présenterons l'évolution temporelle des concentrations des principales formes de phosphore (inorganique et organique) ainsi que celles des nitrates et du rapport de Redfield (N/P). Au préalable nous détaillerons l'évolution des précipitations et des vents, de la température de l'eau, de l'oxygène dissous, de la salinité, et de la conductivité dans les deux sites d'étude.

Sommaire

1. Précipitations, vents, températures 56
2. Paramètres physico-chimiques de la qualité de l'eau 58
2.1 Température 58
2.1.1 Dans la Petite Rade de Toulon 58
2.1.2 Dans la Grande Rade de Toulon 58
2.2 Oxygène dissous 58
2.2.1 Dans la Petite Rade de Toulon 58
2.2.2 Dans la Grande Rade de Toulon 58
2.3 Conductivité 60
2.3.1 Dans la Petite Rade de Toulon 60
2.3.2 Dans la Grande Rade de Toulon 60
2.4 Salinité 60
2.4.1 Dans la Petite Rade de Toulon 60
2.4.2 Dans la Grande Rade de Toulon 61
2.5 Les nitrates $N\text{-}NO_3^-$ 61
2.5.1 Dans la Petite Rade de Toulon 61
2.5.2 Dans la Grande Rade de Toulon 61
2.6 Le phosphore inorganique $P\text{-}PO_4^{3-}$ 62
2.6.1 Dans la Petite Rade de Toulon 62
2.6.2 Dans la Grande Rade de Toulon 62
2.7 Rapport de Redfield N/P 62
2.7.1 Dans la Petite Rade de Toulon 62
2.7.2 Dans la Grande Rade de Toulon 63
2.8 Le phosphore organique dissous (POD) 63
2.8.1 Dans la Petite Rade de Toulon 64
Le phosphore organique hydrolysable (POH) 65
Le phosphore organique dissous non hydrolysable (PNH) 65
2.8.2 Dans la Grande Rade de Toulon 67
Le phosphore organique hydrolysable (POH) 68
Le phosphore organique dissous non hydrolysable (PNH) 68
2.9 Le phosphore particulaire (PP) 69
2.9.1 Dans la Petite Rade de Toulon 69
2.9.2 Dans la Grande Rade de Toulon 70
3. Relations entre évolution des concentrations en nutriments et les précipitations 70
4. Résumé 71

1. Précipitations, vents, températures

Les valeurs de la figure 1 ont été fournies par Météo France.

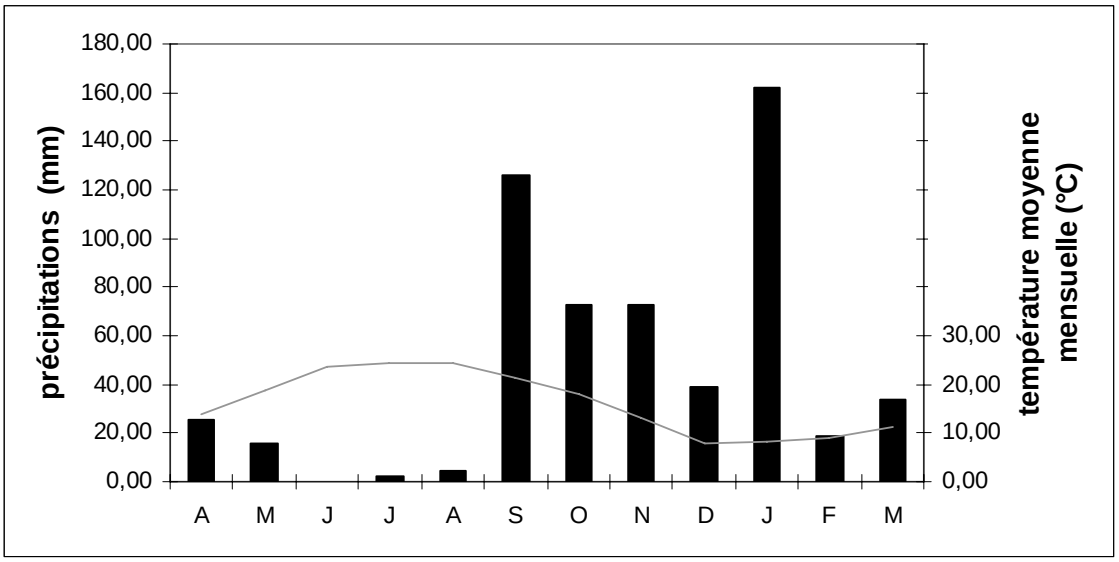

Figure 1: diagramme ombrothermique de la région Toulonnaise.

L'aire Toulonnaise présente un climat méditerranéen avec une saison sèche très marquée d'avril à août (figure 1). Les précipitations hivernales sont importantes mais très irrégulières. La figure 2 montre qu'il est tombé près de 100 mm de pluie en une seule journée au mois de janvier, ce qui représente près de 1/6 des précipitations totales de l'année (573 mm).

Les températures sont relativement douces, le mois le plus froid étant le mois de décembre avec en moyenne 8°C et le mois le plus chaud étant le mois d'août avec une température moyenne de 24,5°C.

Les dates de prélèvement sont reportées sur la figure 2. Certaines sorties en mer (mai, octobre et novembre) ont été effectuées lors d'épisodes pluvieux, rendant parfois difficiles les prélèvements d'eau et de plancton.

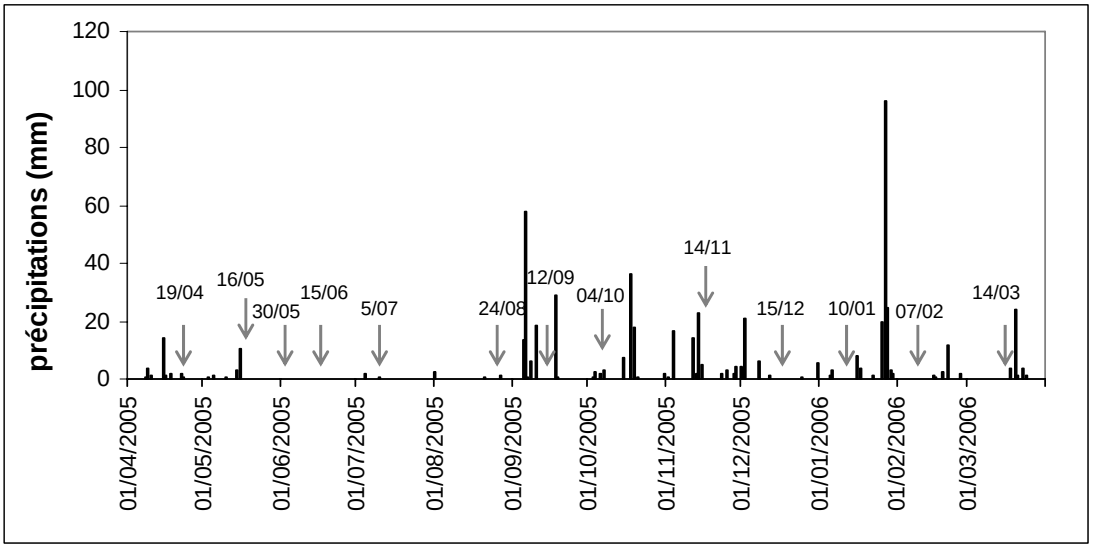

Figure 2: précipitations tombées sur l'aire Toulonnaise durant le cycle annuel. Les flèches représentent les dates de prélèvements.

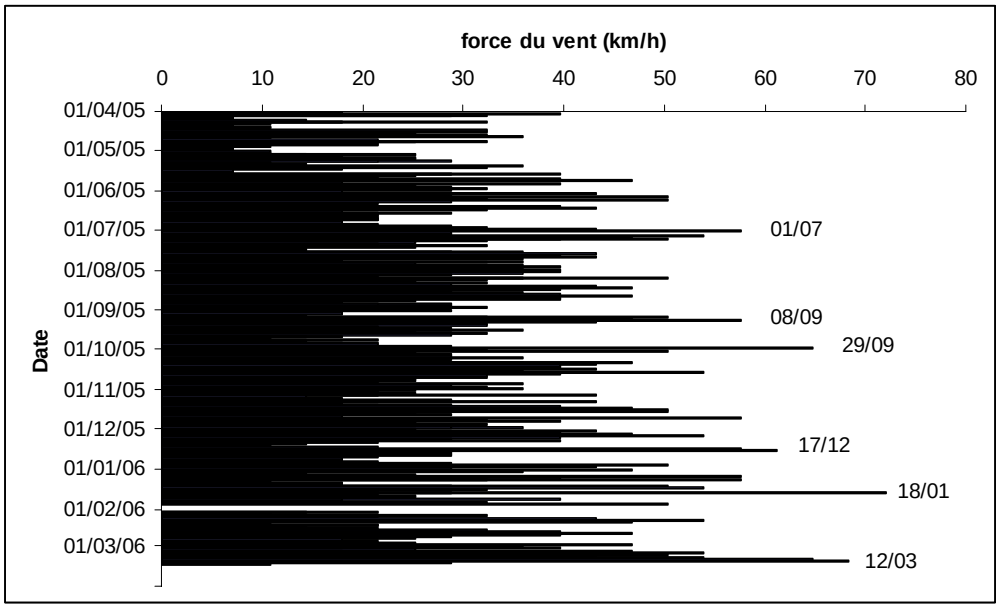

Figure 3: évolution de la force du vent (en km/h) au cours du cycle.

La figure 3 présente l'évolution de la force du vent en km/h au cours de l'année. Sur cette figure sont précisées les dates des principaux coups de vents (vents force 8, d'après l'échelle de Beaufort, cela représente des vents > 62 km/h).

La sortie du 14 mars 2006 a été précédée d'un fort coup de vent ainsi que celles du 12 septembre et du 5 juillet 2005.

2. Paramètres physico-chimiques de la qualité de l'eau

2.1 Température

2.1.1 Dans la Petite Rade de Toulon

La température de l'eau à 3 m de profondeur dans la Petite Rade de Toulon, a varié de 22,8°C en septembre 2005 à 10,7 °C en mars 2006 (figure 4A). Le maximum a été relevé en septembre et le minimum, en février. Ponctuellement des baisses de températures se sont produites en été à la suite d'épisodes de mistral, en particulier en juillet.

2.1.2 Dans la Grande Rade de Toulon

L'évolution des températures dans la Grande Rade de Toulon est proche de celle de la Petite Rade avec un maximum de 22,4 °C en septembre 2005 à un minimum de 11,5 en février 2006 (figure 4A). Des refroidissements ponctuels sont également produits en période estivale, comme dans la Petite Rade.

2.2 Oxygène dissous

Les variations de ce paramètre au cours de l'année dans les 2 rades à 3 m de profondeur sont représentées dans la figure 4B.

2.2.1 Dans la Petite Rade de Toulon

Dans la Petite Rade de Toulon, les teneurs en oxygène dissous les plus basses ont été observées de juin (8,94 $mg.l^{-1}$) à septembre 2005 (8,95 $mg.l^{-1}$). Les plus fortes concentrations ont été enregistrées en février-mars 2006 (respectivement 10,51 $mg.l^{-1}$ et 10,76 $mg.l^{-1}$).

2.2.2 Dans la Grande Rade de Toulon

Dans la Grande Rade, les fluctuations de la concentration en oxygène dissous de l'eau ont suivi la même tendance que dans la Petite Rade. Dans l'ensemble, les valeurs sont un peu plus élevées que dans la Petite Rade.

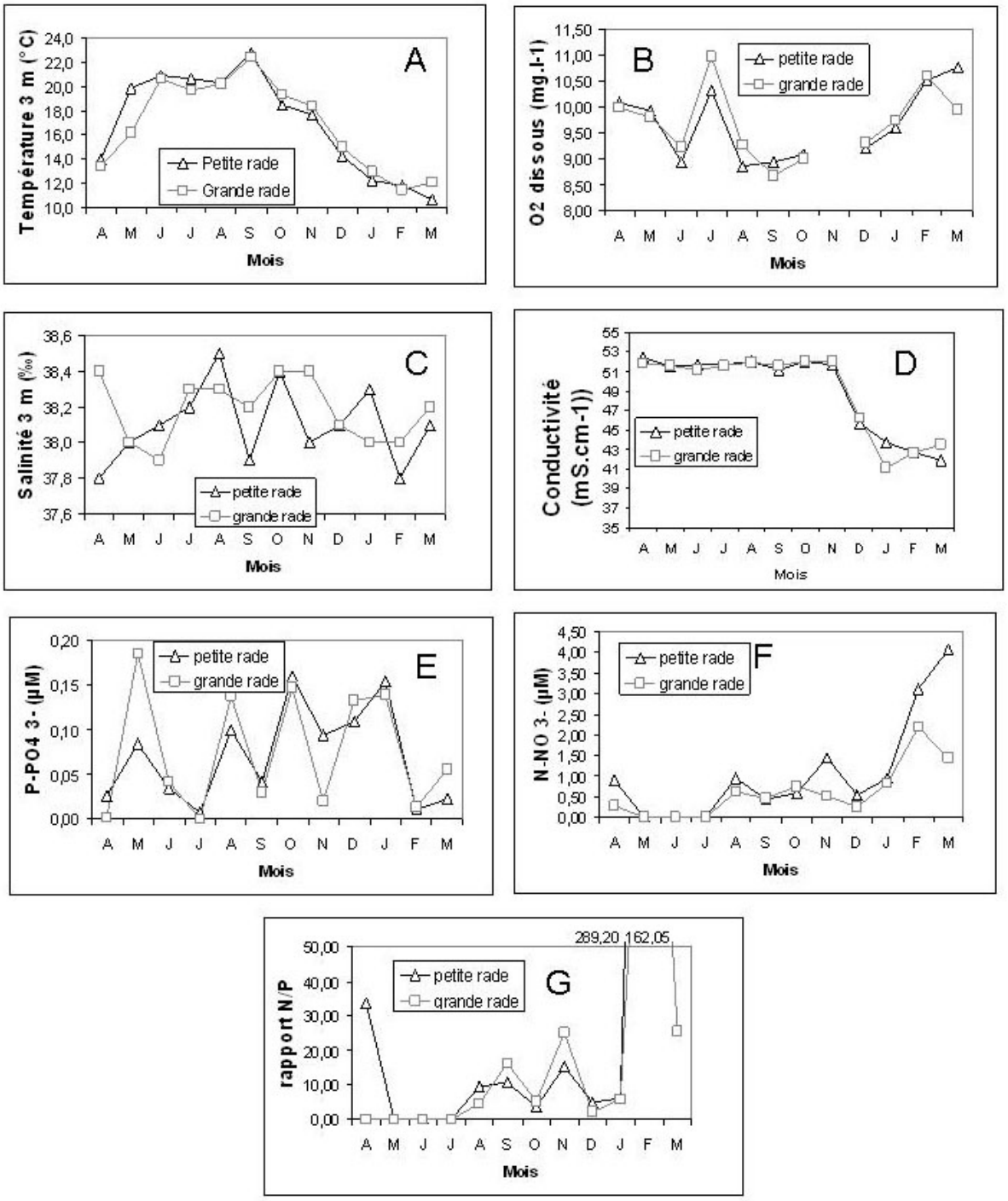

Figure 4: les différents paramètres de la qualité de l'eau pour les deux sites d'étude au cours de l'année à 3 m de profondeur. A : température de l'eau (°C), B : O2 dissous (mg/l), C : salinité (‰), D : conductivité (mS/cm), E : concentations en orthophosphates (µM), F : concentrations en nitrates (µM), G : rapport N/P (NO_3^-/ PO_4^{3-}).

Comme dans la Petite Rade, un pic de forte concentration en oxygène a été relevé au mois de juillet (10,96 $mg.l^{-1}$) et les plus faibles niveaux ont été observés entre juin (9,22 $mg.l^{-1}$) et septembre (8,7 $mg.l^{-1}$). Les différences les plus notables entre les deux rades concernent les mois de mars qui présente un niveau d'oxygénation plus faible dans la Grande Rade que dans la Petite Rade, et les mois de juillet et d'août où les concentrations en oxygène sont plus élevées dans la Grande Rade.

2.3 Conductivité

2.3.1 Dans la Petite Rade de Toulon

Les mesures de la conductivité à 3m de profondeur sont présentées dans la figure 4D. Pour la Petite Rade, la conductivité est stable d'avril à novembre avec des valeurs s'échelonnant de 52,2 à 52,5 $mS.cm^{-1}$. Puis on observe une nette diminution à partir de décembre jusqu'en mars avec 41,9 $mS.cm^{-1}$. Il n'y a aucune corrélation entre cette baisse de la conductivité et la salinité. En revanche on peut la mettre en relation avec la baisse de la température de l'eau

2.3.2 Dans la Grande Rade de Toulon

Dans la Grande Rade, la conductivité présente le même profil que dans la Petite Rade (figure 4D) jusqu'au mois de décembre. En janvier, la conductivité diminue (41,1 $mS.cm^{-1}$) puis elle remonte à partir de février, ce qui est en accord avec la remontée des températures dans cette rade à partir de mars et l'augmentation de la salinité en février. Comme la Petite Rade, la conductivité semble n'avoir aucun lien avec la salinité et les précipitations à l'exception des deux derniers mois du cycle.

2.4 Salinité

2.4.1 Dans la Petite Rade de Toulon

La salinité mesurée à 3 m de profondeur a beaucoup fluctué dans la Petite Rade, tout au long de l'année. La figure 4C montre qu'elle a augmenté régulièrement d'avril 2005 (37,8 ‰) à août (38,5 ‰). Puis elle chute en septembre (37,9 ‰). Cette chute de la salinité résulte des fortes pluies qui se sont abattues sur l'aire toulonnaise à cette période. Par la suite, les

fluctuations sont plus fréquentes et elles font toujours suite aux pluies qui sont toutefois plus modérées, le minimum étant enregistré au mois de février 2006 (37,8 ‰).
Des valeurs supérieures à la moyenne de 38 ‰ ont été mesurées en été, probablement en relation avec l'évaporation de l'eau de mer due aux fortes températures.

2.4.2 Dans la Grande Rade de Toulon

Dans la Grande Rade, de nombreuses fluctuations de la salinité ont été également enregistrées (figure 4C). Elles sont de moindre amplitude que dans la Petite Rade, la salinité ne variant que de 37,9 ‰ en juin 2005 à 38,4 ‰ avril, octobre et novembre 2005. Les pluies de septembre et de février semblent avoir eu peu d'incidence sur la variation de la salinité. On peut remarquer que la valeur la plus basse enregistrée en juin 2005 ne correspond à aucun évènement pluvieux.

2.5 Les nitrates $N\text{-}NO_3^-$

2.5.1 Dans la Petite Rade de Toulon

Les teneurs en nitrates de la Petite Rade à 3m de profondeur, sont indétectables de mars à juillet 2005. Puis elles augmentent par paliers du mois d'août 2005 à mars 2006. Une forte augmentation de ces concentrations est constatée de décembre 2005 (0,55 µM) à mars 2006 (4,06 µm) (figure 4F).
Sur l'ensemble de l'année la valeur moyenne des teneurs en nitrates est de 1,08 µM. Cette valeur est plutôt faible, notamment par rapport à ce qui a été mesuré les années précédentes (8,8 µM, année 1999-2000, thèse de Natacha Jean).

2.5.2 Dans la Grande Rade de Toulon

Une évolution similaire à celle de la Petite Rade est observée dans la Grande Rade (figure 4F), avec des valeurs en nitrates indétectables de mars à juillet 2005 ainsi qu'une forte augmentation des teneurs de décembre 2005 (0,27 µM) à février 2006 (2,18 µM). La seule différence notable s'observe pendant le mois de mars 2006 où les teneurs en nitrates sont plus faibles dans la Grande Rade (1,44 µM).
Dans l'ensemble, les teneurs en nitrates de la Grande Rade sont inférieures à celles de la Petite Rade, avec une valeur moyenne annuelle de 0,61 µm. L'application du test de

Wilcoxon confirme que ces différences sur l'ensemble de l'année sont significatives ($p<0,05$). L'application du test de Spearman indique que l'évolution des concentrations en nitrate est identique dans les deux sites ($p<0,05$).

2.6 Le phosphore inorganique $P\text{-}PO_4^{3-}$

2.6.1 Dans la Petite Rade de Toulon

Les teneurs en phosphore inorganique dissous (PID) de la Petite Rade à 3 m de profondeur sont présentés dans la figure 4E et 6.

Ces teneurs sont très fluctuantes et l'amplitude de ces fluctuations est souvent importante, en particulier entre avril et septembre. La valeur la plus basse est enregistrée en juillet 2005 (0,01 µM) Dès le mois d'août, cette concentration a déjà fortement augmenté (0,10 µM). La valeur maximale est enregistrée en octobre 2005 avec 0,16 µM. La période d'octobre à janvier est caractérisée par une plus grande stabilité avec des valeurs plus élevées qui ne sont jamais inférieures à 0,09 µM. La moyenne des teneurs en orthophosphates sur l'année est de 0,07 µM.

Ces concentrations en phosphore inorganique dissous représentent sur l'ensemble de l'année 21 % du phosphore total et 35 % de l'ensemble du phosphore dissous (PID+POD) (figure 5).

2.6.2 Dans la Grande Rade de Toulon

L'évolution des concentrations en orthophosphates de la Grande Rade est identique à celle de la Petite Rade (figure 4E et 6). Comme dans la Petite Rade, le phosphore inorganique est indétectable en juillet 2005. Par contre entre octobre et janvier, ses concentrations fluctuent davantage que dans la Petite Rade avec des valeurs assez faibles en novembre (0,02 µM).

Sur l'ensemble du cycle, les concentrations moyennes (0,08 µM) sont comparables à celles de la Petite Rade, les différences n'étant jamais significatives (test de Wilcoxon $p=0,48$).

2.7 Rapport de Redfield N/P

Ce rapport a été calculé à partir des concentrations en Nitrites-Nitrates et Phosphates.

2.7.1 Dans la Petite Rade de Toulon

Dans la Petite Rade, le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} (figure 4G) présente une valeur élevée en avril 2005 (33,7) du fait de la faible teneur en orthophosphates par rapport à celle des nitrates. Par la suite, de mai à juillet 2005 les concentrations en nitrates sont indétectables, et le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} n'est pas calculable. Ensuite, d'août à janvier, le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} est plus stable, sa valeur étant comprise entre 3,68 et 15,22. Les mois de février et de mars 2006 sont caractérisés par des valeurs très élevées du rapport NO_3^-/ PO_4^{3-}, respectivement de 289 et 176. Ceci est du au fait que la concentration en nitrates est très élevée par rapport à celle des orthophosphates.

2.7.2 Dans la Grande Rade de Toulon

Dans la Grande Rade, d'avril à juillet 2005, le rapport de Redfield varie beaucoup du fait des faibles concentrations en phosphate et en azote. Elles sont même parfois indétectables (figure 4G). Par la suite, d'août 2005 à janvier 2006 le rapport évolue entre 2,03 en décembre et 25,06 en novembre. En novembre, ce sont les nitrates qui sont en concentration élevée par rapport aux orthophosphates, ce qui déséquilibre le rapport de Redfield. Enfin, au mois de février, le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} atteint 162 en raison de plus fortes concentrations en nitrate.

2.8 Le phosphore organique dissous (POD)

Contrairement aux orthophosphates qui représentent la fraction phosphorique immédiatement biodisponible par les organismes photosynthétiques, le phosphore organique dissous représente un réservoir qui peut devenir disponible par reminéralisation.

Il comporte plusieurs fractions:

La fraction facilement hydrolysable par les organismes vivants (POH), et qui représente une forme de phosphore labile, est constituée par le phosphore organique dissous qui est hydrolysé uniquement grâce à la phosphatase, (PHPase), et par le phosphore organique dissous qui est hydrolysé par d'autres enzymes ou d'autres mécanismes que la phosphatase (PHNPase).

Le phosphore organique comporte enfin une fraction plus réfractaire et donc plus difficilement reminéralisable. Elle correspond au phosphore organique oxydable dont nous avons mesuré la forme dissoute, appelée PNH (pour non hydrolysable).

2.8.1 Dans la Petite Rade de Toulon

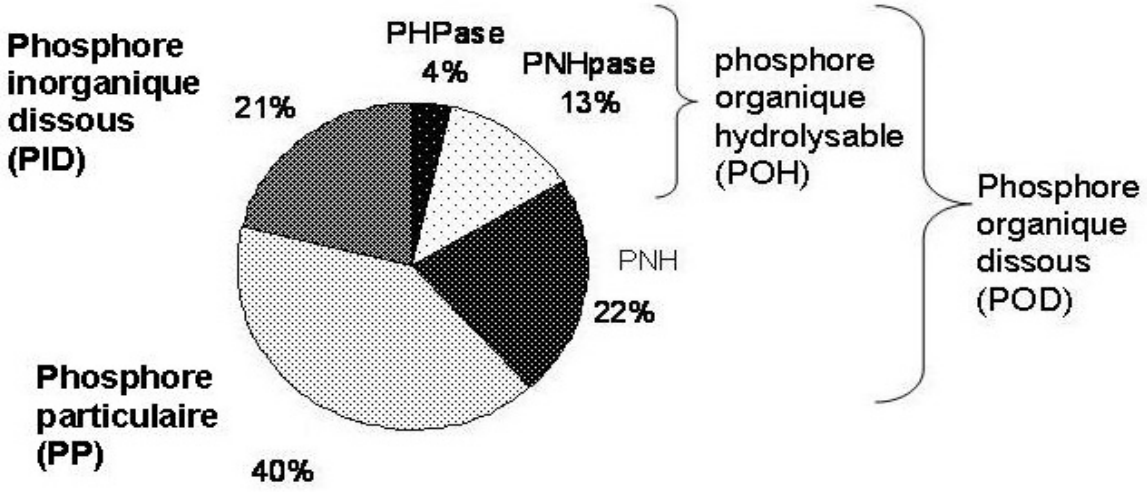

Figure 5: répartition moyenne annuelle des différents compartiments du phosphore total pour la Petite Rade. PP : phosphore particulaire, PID : phosphore inorganique dissous, PHPase : phosphore organique hydrolysable par la phosphatase, PNHPase : phosphore organique non hydrolysable par la phosphatase, PNH : phosphore non hydrolysable.

Sur l'ensemble de l'année, les concentrations en POD représentent approximativement 65 % du phosphore dissous (PID+POD) et approximativement 39 % du phosphore total (PT) (figure 5). Les concentrations de phosphore organique dissous (POD) sont proches de zéro en août et restent très basses en octobre (0,05 µM). En revanche, elles ont fortement augmenté en février 2006 et en mai 2005 mais surtout en novembre 2005 (0,329 µM) (figure 6).

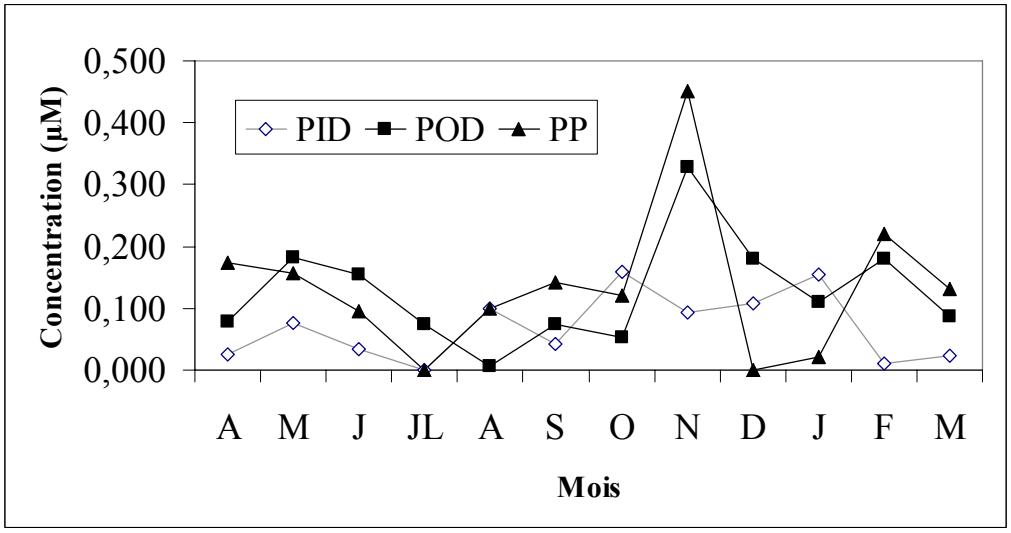

Figure 6: évolution des concentrations des divers compartiments de phosphore total au cours de l'année dans la Petite Rade. PID : phosphore inorganique dissous, POD : phosphore organique dissous, PP : phosphore particulaire.

Le phosphore organique hydrolysable (POH)

Sur l'année, cette fraction représente en moyenne 43 % du POD (figure 5). Tout comme le phosphore inorganique, les concentrations en POH ont beaucoup fluctué pendant l'année avec des valeurs maximales en mai et juin, novembre et février (figure 7). En juillet et août les concentrations sont proches de zéro.

La fraction du POH hydrolysable par la phosphatase alcaline (PHPase) est surtout conséquente pendant les mois de juin, juillet, septembre et février. La fraction hydrolysable par d'autres enzymes que la phosphatase alcaline (PNHPase) peut représenter jusqu'à 35 % du phosphore total en janvier. Cette fraction est particulièrement faible en juillet, août et septembre (figure 8).

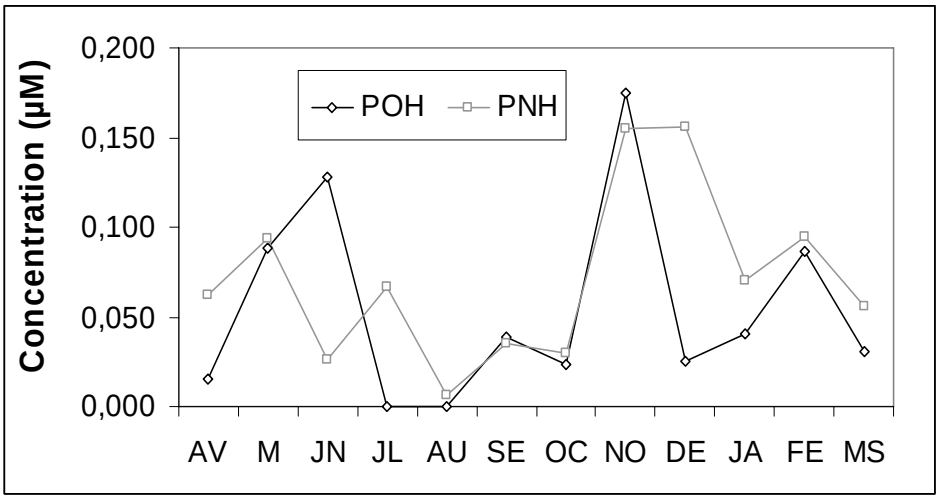

Figure 7: concentrations des différentes fractions de phosphore organique dissous (POD) au cours de l'année dans la Petite Rade. POH : phosphore organique hydrolysable, PNH : phosphore organique non hydrolysable.

Le phosphore organique dissous non hydrolysable (PNH)

En moyenne, sur l'année, le PNH, représente 57 % du phosphore organique dissous (figure 5). Les concentrations en PNH ont une saisonnalité assez marquée avec une valeur minimale en août et maximale en novembre et décembre (0,155 µM) (figure 7).

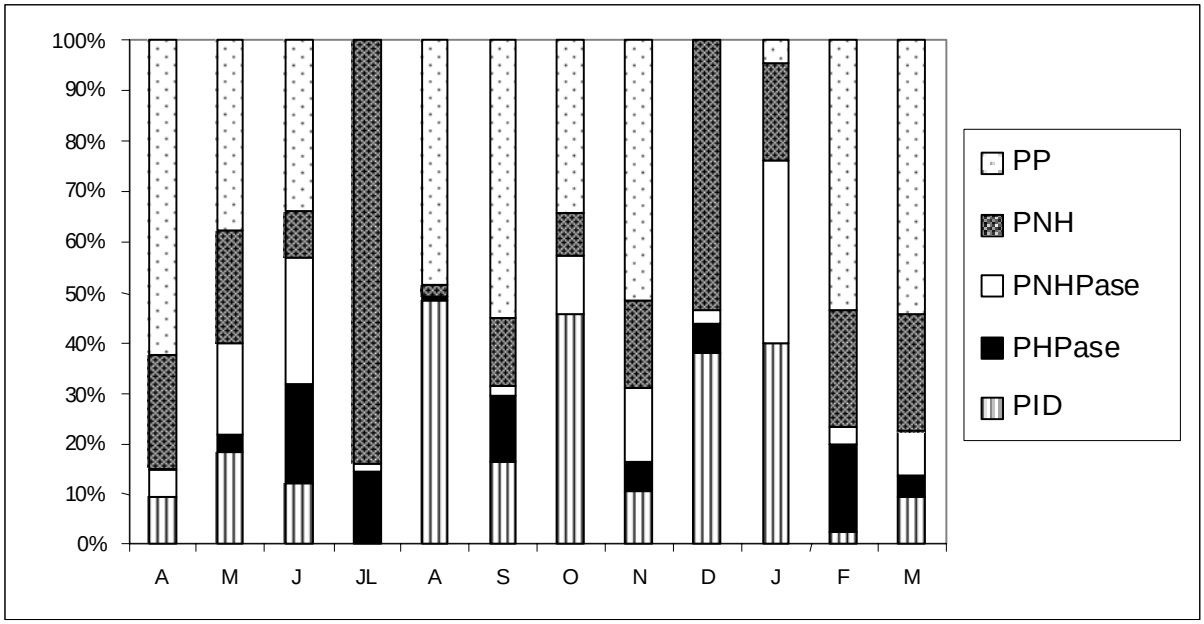

Figure 8: répartition des différentes fractions de phosphore total au cours de l'année en % dans la Petite Rade. PP : phosphore particulaire, PID : phosphore inorganique dissous, PHPase : phosphore organique hydrolysable par la phosphatase, PNHPase : phosphore organique non hydrolysable par la phosphatase, PNH : phosphore organique non hydrolysable.

Lors du mois de juillet, le phosphore non hydrolysable (PNH) représente près de 85 % du phosphore total et en décembre sa part relative est aussi très importante avec plus de 50 % (figure 8).

2.8.2 Dans la Grande Rade de Toulon

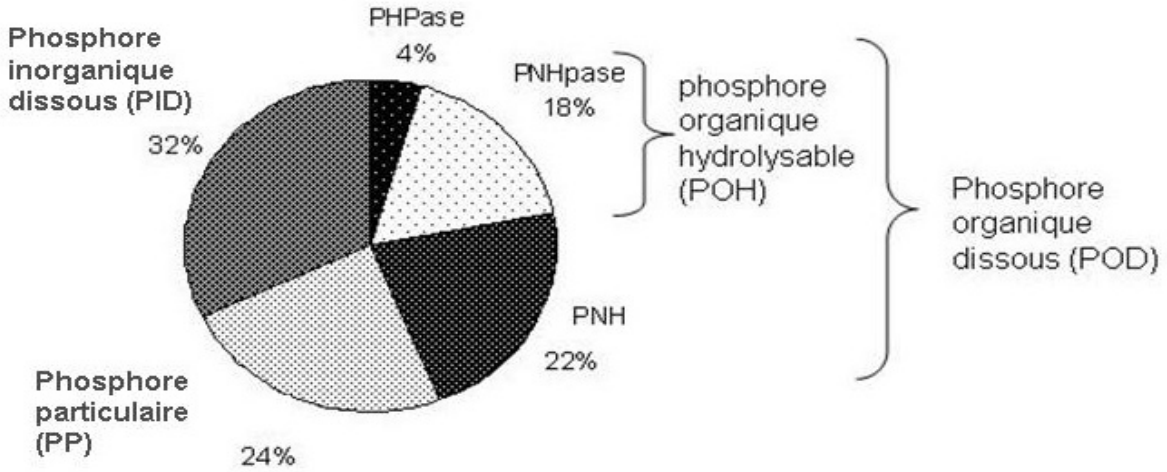

Figure 9: répartition moyenne annuelle des différents compartiments du phosphore pour la Grande Rade. PP : phosphore particulaire, PID : phosphore inorganique dissous, PHPase : phosphore organique hydrolysable par la phosphatase, PNHPase : phosphore organique non hydrolysable par la phosphatase, PNH : phosphore non hydrolysable.

En moyenne, les concentrations en POD représentent approximativement 57 % du phosphore dissous (PID+POD) et approximativement 44 % du phosphore total (PT) (figure 9). Les plus faibles concentrations de phosphore organique dissous (POD) ont été relevées en août ainsi qu'en juin, en septembre et en octobre (< 0,05 µM). Inversement, les plus fortes ont été relevées en mai (0,26 µM) en novembre (0,25 µM) et en février (0,20 µM) (figure 10).

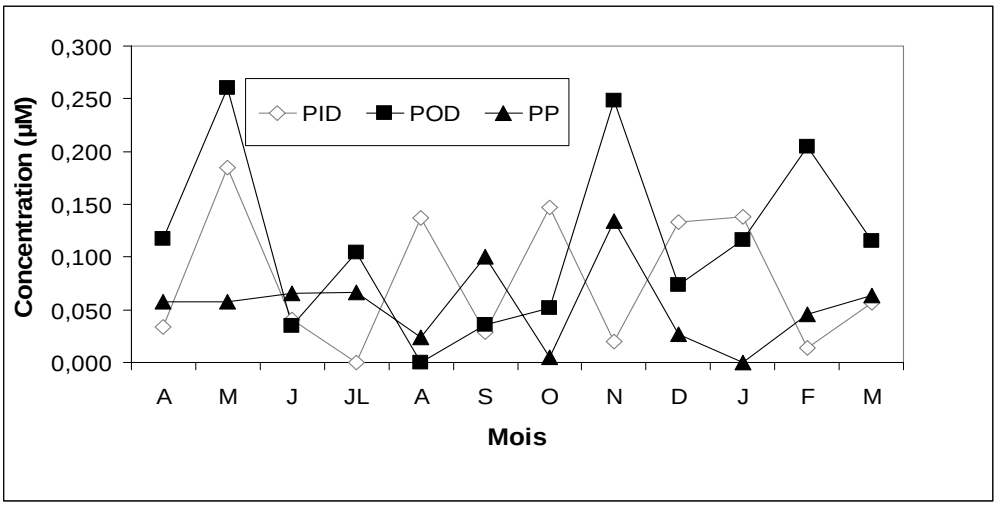

Figure 10: évolution des concentrations des divers compartiments de phosphore au cours de l'année dans la Grande Rade. PID : phosphore inorganique dissous, POD : phosphore organique dissous, PP : phosphore particulaire.

Le test de Spearman indique que l'évolution des concentrations en orthophosphate est la même dans les deux sites. Le test de Wilcoxon montre que ces concentrations ne sont pas significativement différentes sur l'ensemble de l'année.

Le phosphore organique hydrolysable (POH)

Au cours de l'année cette fraction représente en moyenne 50 % du POD (figure 9). Comme dans la Petite Rade, les concentrations en POH ont beaucoup fluctué pendant l'année avec des valeurs maximales en mai, novembre et février (figure 11). En juillet et août les concentrations sont proches de zéro. Des deux fractions qui composent le POH (PHPase et PNHPase), la fraction PHPase est la moins importante sauf pendant les mois de mai, septembre, novembre et février. En revanche la fraction PNHPase peut représenter jusqu'à 48 % du phosphore total en janvier mais elle indécelable en mars et en juillet (figure 12).
Sur l'ensemble de l'année, l'évolution des concentrations de ces fractions est identique dans les deux sites (test de Spearman) et les concentrations ne sont pas significativement différentes (test de Wilcoxon).

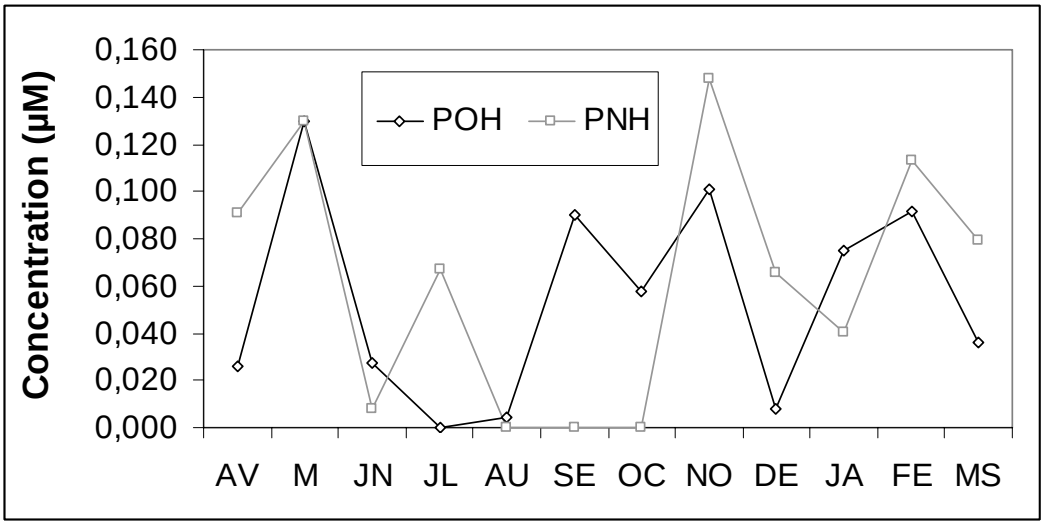

Figure 11: concentration des différentes fractions de phosphore organique dissous (POD) au cours de l'année dans la Grande Rade. POH : phosphore organique hydrolysable, PNH : phosphore organique non hydrolysable.

Le phosphore organique dissous non hydrolysable (PNH)

Cette fraction représente environ 50 % du phosphore organique dissous (figure 9). Les concentrations en PNH ont beaucoup fluctué, sans rapport avec la saisonnalité, avec de faibles valeurs d'août à octobre et une valeur maximale en novembre (0,148 µM) (figure 11). La répartition des composés phosphorés dissous au cours de l'année dans la Grande Rade montre

qu'il y a de fortes périodes de carences en phosphore biodisponible mais également en phosphore organique facilement reminéralisable. Comme pour la Petite Rade c'est le cas au mois de juillet, où les concentrations en phosphore inorganique dissous et en phosphore organique hydrolysable sont indétectables (figure 12).

Comme pour les composés précédents, l'évolution des concentrations de ces fractions phosphorées est identique dans les deux sites (test de Spearman) et les concentrations ne sont pas significativement différentes (test de Wilcoxon).

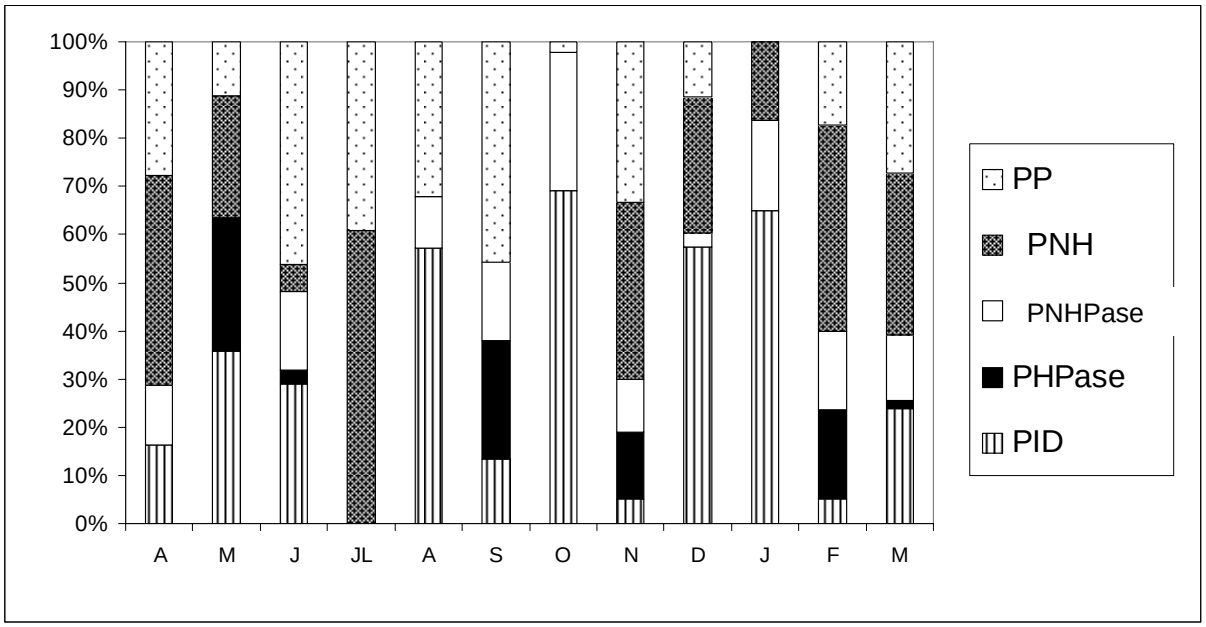

Figure 12: répartition des différentes fractions de phosphore au cours de l'année en % dans la Grande Rade. PP : phosphore particulaire, PID : phosphore inorganique dissous, PHPase : phosphore organique hydrolysable par la phosphatase, PNHPase : phosphore organique non hydrolysable par la phosphatase, PNH : phosphore organique non hydrolysable.

2.9 Le phosphore particulaire (PP)

Le phosphore particulaire représente une réserve de phosphore encore plus difficile à reminéraliser que les précédentes car il est associé à de la matière vivante, détritique ou bien minérale qui rentre dans le cadre d'un cycle de la matière plus long. Sa concentration a été calculée par différence entre celles du Phosphore total et du Phosphore dissous.

2.9.1 Dans la Petite Rade de Toulon

Les concentrations en PP représentent en moyenne 40 % du phosphore total sur l'année (figure 5). Ces concentrations sont très basses en juillet, décembre et janvier alors qu'en avril, septembre, novembre et février elles ont beaucoup augmenté (figure 6). On peut noter que de fortes précipitations en novembre pourraient expliquer les fortes concentrations et PP et en POD. Le mois de juillet qui était déjà carencé en phosphore assimilable, présente l'une des concentrations les plus basses (>0,02 µM), ce qui montre que ce mois est particulièrement critique dans la nutrition phosphorée.

2.9.2 Dans la Grande Rade de Toulon

Sur l'année, la moyenne des concentrations en PP représente seulement 24 %, de celles du Phosphore total, la part du PID étant plus importante dans cette rade (figure 9).

La concentration moyenne en PP est bien plus élevée dans la Petite Rade (0,134 µM) que dans la grande (0,054 µM). Les valeurs les plus élevées ont été observées en mai et en Novembre avec des valeurs de 0,260 µM et 0,249 µM respectivement alors que les concentrations sont pratiquement nulles en octobre 2005 et janvier 2006 (figure10).

Le test de Spearman montre que l'évolution des concentrations du phosphore particulaire est identique dans les deux sites. En revanche le test de Wilcoxon indique que ces concentrations sont plus élevées dans la Petite Rade ($p<0,05$)

3. Relations entre l'évolution des concentrations en nutriments et les précipitations

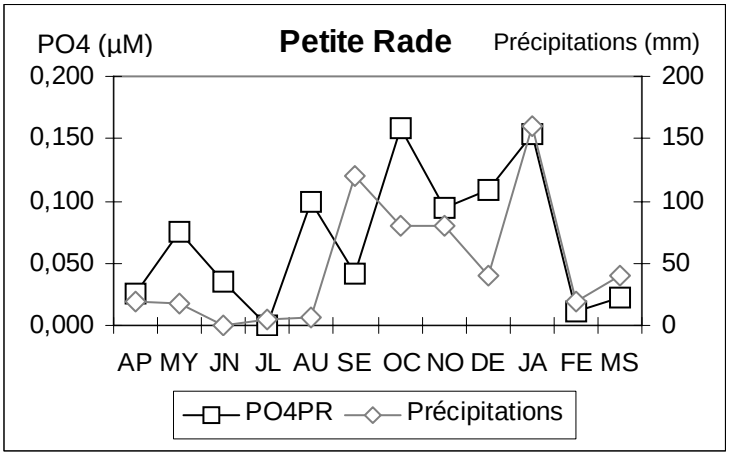

Figure13 : Relations entre les concentrations en orthophosphates de la petite rade (en µM) et les précipitations (en mm).

Une relation avec les précipitations a été dégagée concernant les composés phosphorés inorganiques. La figure 13 montre que ces précipitations pourraient expliquer le niveau plus élevé des concentrations en orthophosphates de la Petite Rade, entre septembre à janvier

(p=0,08 sur l'ensemble de l'année). Mais en revanche les augmentations des concentrations en phosphore observées entre avril et août ont certainement une autre origine. L'étude des activités phosphatasiques nous permettra de la préciser.

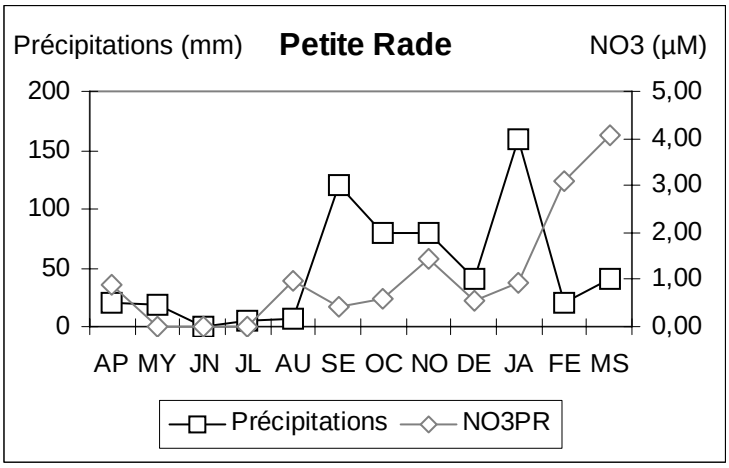

Figure 14 : Relations entre les concentrations en nitrates de la petite rade (en µM) et les précipitations (en mm).

Ces précipitations pourraient également contribuer ponctuellement à l'enrichissement du milieu en azote en particulier entre septembre et décembre (figure 14). Mais la relation est moins nette que pour les composés phosphorés. En revanche les fortes augmentations des concentrations en nitrates observées dans la Petite Rade comme dans la Grande Rade à partir de janvier ont certainement une autre origine.

4. Résumé

Des évènements pluvieux ont été observés en septembre, octobre, novembre mais surtout à la fin du mois de janvier, ainsi que de forts coups de vent en juillet, septembre, décembre, en janvier et mars.

La température de l'eau de mer a varié de 10,7 à 22,8°C dans la Petite Rade et de 11,5 à 22,4°C dans la Grande Rade. Les maximas ont été observés en septembre et les minimas en février dans la Grande Rade et en mars dans la Petite Rade.

La teneur en oxygène dissous a présenté des valeurs élevées en juillet. Par ailleurs son profil est identique dans les deux rades à l'exception du mois de mars 2006 où la teneur en oxygène a été plus basse dans la Grande Rade.

La conductivité a été stable jusqu'en novembre dans les deux rades puis elle a chuté.

La salinité a varié de 37,8 à 38,5 ‰ dans la Petite Rade et de 37,9 à 38,4 ‰ dans la Grande Rade.

Les concentrations en nitrates ont varié de 0 à 4,06 µM dans la Petite Rade et de 0 à 1,44 µM dans la Grande Rade. Leur plus bas niveau s'est situé de mai à juillet où elles sont

indétectables. L'évolution de ces concentrations a été similaire dans les deux sites, mais leurs niveaux ont été significativement plus bas dans la Grande Rade.

Les teneurs en orthophosphates dissous ont été généralement très basses et comprises entre 0 et 0,185 µM. Leur évolution et leurs niveaux ont été assez similaires dans les deux sites. Cette évolution est caractérisée par des fluctuations importantes et rapides entre avril et octobre et des concentrations proches de zéro en juillet. De novembre à mars, les concentrations ont été sensiblement plus élevées en particulier dans la Grande Rade.

Le rapport de Redfield a présenté des valeurs très variables, comprises entre 0 et 289, selon les périodes de l'année dans les deux rades.

Les concentrations en phosphore organique dissous ont varié de 0 à 0,329 µM. Leurs fluctuations ont été synchrones avec celles des orthophosphates. En juillet et en août ces concentrations ont été particulièrement basses. La fraction hydrolysable, source de phosphore minéral après reminéralisation par les organismes, a représenté en moyenne 43 % du POD. Ses plus bas niveaux se sont situés en août dans la Petite Rade.et en juillet dans la Grande Rade.

Résultats, Chapitre II : Etude des caractéristiques biochimiques de l'activité phosphatasique

Présentation

Ce chapitre est destiné à présenter les caractéristiques cinétiques (Km et Vmax) de l'activité phosphatasique de l'eau de mer, du matériel particulaire et de l'activité dissoute. Pour ce faire nous nous référerons aux moyennes annuelles des activités mesurées sur l'ensemble du cycle. L'analyse des cinétiques enzymatiques à partir des transformations d'Eadie-Hofstee sera détaillée dans une première partie. Une deuxième partie sera consacrée à préciser la localisation cellulaire des activités phosphatasiques du matériel particulaire. Enfin dans une troisième partie nous étudierons les dépendances de pH des activités particulaires ainsi que celles des activités dissoutes.

Sommaire

1. Etude des cinétiques des activités moyennes annuelles 74
1.1 Cinétique de l'activité totale de l'eau de mer 74
1.1.1 Avec le MUF-P 74
Avec le pNPP 76
1.2 Cinétiques des activités dissoutes 77
1.2.1 Avec le MUF-P 77
1.2.2 Avec le pNPP 78
1.3 Cinétique des activités particulaires 78
1.3.1 Avec le MUF-P 79
1.3.2 Avec le pNPP 79
1.4 Comparaison des activités particulaires et dissoutes 80
1.4.1 Avec le MUF-P 80
1.4.2 Avec le pNPP 80
2. Mise en évidence des activités intracellulaires et exoenzymatiques 81
1.5 Fraction >90 µm 81
1.6 Fraction 0,45-1 µm et 1-90 µm 85
3. Dépendances de pH de l'activité phosphatasique 85
1.7 Activité dissoute 86
3.1.1 Avec le MUF-P comme substrat 86
3.1.2 Avec le pNPP comme substrat 87
1.8 Activité particulaire totale 88
3.2.1 Activités de la classe de taille >90 µm 88
3.2.2 Activités de la classe de taille 1-90 µm 90
3.2.3 Activités de la classe de taille 0,45-1 µm 92
1.9 Activités intracellulaires et exoenzymatiques 94
3.3.1 Avec le MUF-P comme substrat 94
Cas de la fraction >90 µm 94
Cas de la fraction 1-90 µm 95
Cas de la fraction 0,45-1 µm 96
3.3.2 Avec le pNPP comme substrat 96
Cas de la fraction >90 µm 96
Cas de la fraction 1-90 µm 97
Cas de la fraction 0,45-1 µm 98
4. Résumé 98

1. Etude des cinétiques des activités moyennes annuelles

1.1 Cinétique de l'activité totale de l'eau de mer

L'activité totale de l'eau de mer est due à l'activité du matériel particulaire et à l'activité dissoute.

L'activité totale de l'eau de mer a été étudiée avec les deux substrats : le MUF-P et le pNPP, dissous dans l'eau de mer. Pour chaque substrat, plusieurs concentrations ont été utilisées : sept dans le cas du MUF-P (entre 0,013 – 30 µM) et quatre dans le cas du pNPP (10-5-2,5-1,25 mM).

1.1.1 Avec le MUF-P

La figure 1 représente l'activité annuelle moyenne (en nM MUF/h ou en µM pNPP/h) en fonction des concentrations en substrat (en µM MUF-P ou en mM pNPP). Elle montre que l'activité totale se sature progressivement lorsque la concentration en substrat s'élève.

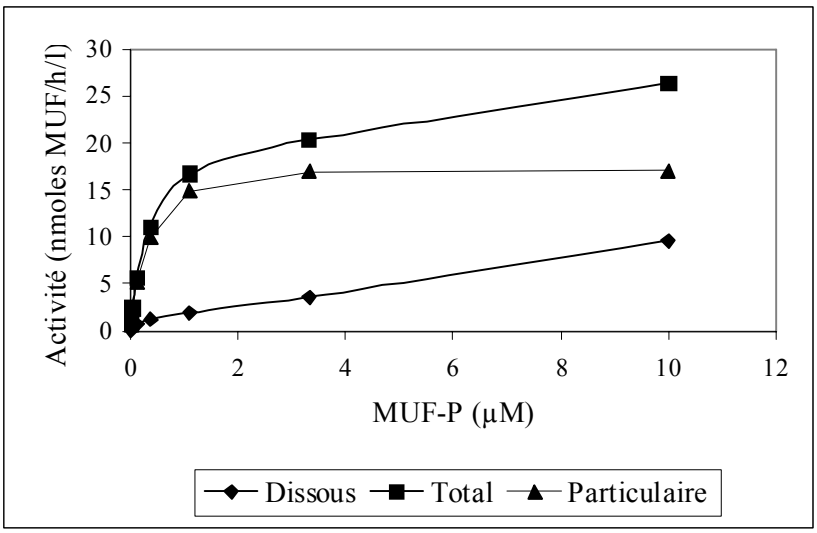

Figure 1 : Courbes de Michaelis-Menten de l'activité moyenne annuelle Dissoute, Totale et Particulaire.

Les courbes des cinétiques enzymatiques ont ensuite été tracées afin de calculer la constante de Michaelis-Menten (Km) et la Vmax. Pour ce faire, nous avons utilisé la transformation d'Eadie-Hofstee pour laquelle on représente l'activité en fonction du rapport entre l'activité et les concentrations en substrat.

La figure 2 montre que dans le cas des activités phosphatasiques de l'eau de mer la courbe de l'activité totale est particulière ; en effet au lieu d'obtenir une droite, nous obtenons une courbe complexe. L'analyse de cette courbe a montré qu'elle résultait de la somme de deux composantes michaeliennes.

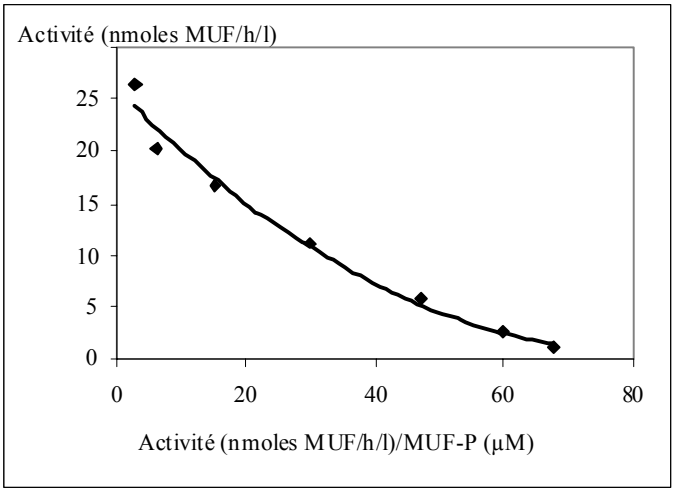

Figure 2 : Représentation d'Eadie-Hofstee de l'activité totale de l'eau de mer.

Grâce à un programme d'itérations successives il a été possible de calculer les paramètres cinétiques (Km et Vmax) de chacune d'elle. La première composante (V1) se caractérise par un Km de 4,5 µM et une Vmax de 13 nM MUF/h. Pour la deuxième composante (V2) on obtient un Km de 0,26 µM et une Vmax de 17 nM MUF/h (tableau 1).

	Km1	Vm1	Km2	Vm2	Vm1/Km1	Vm2/Km2
Total	4,5	13	0,26	17	2,9	65,4
Particulaire	-		0,33	18,5		56,1
Dissous	4	9,5	0,68	0,5	2,4	0,7

Tableau 1: valeurs des constantes michaeliennes (Km en µM et Vm nM MUF/h) pour l'eau de mer, les fractions particulaires et dissoutes et le rapport Vm/Km.

Les Km des deux types d'activité sont éloignés d'un facteur 20 environ. On peut alors associer la première composante à une activité à faible affinité car son Km est le plus élevé, et la seconde composante à une activité à forte affinité car son Km est plus bas.

Les équations de ces deux composantes permettent de calculer, pour chaque concentration de substrat, la part de chacune d'elle dans l'activité totale (figure 3). On observe ainsi que plus de 60 % de l'activité est due à la composante à forte affinité. Par ailleurs, lorsque la concentration en substrat diminue la contribution de la composante à forte affinité augmente (V2) ; alors que lorsque la concentration en substrat augmente la contribution de la composante à faible affinité (V1) augmente également.

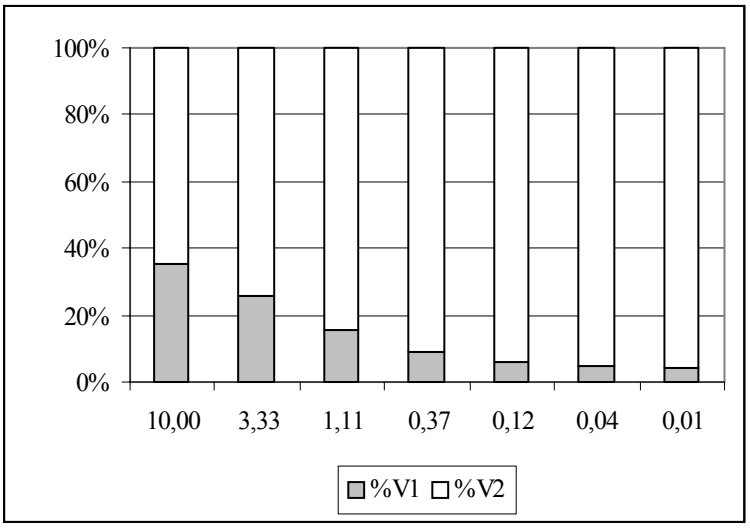

Figure 3 : Pourcentage des activités à faible affinité (V1) et à (forte affinité (V2) pour l'activité totale de l'eau de mer pour différentes concentrations de substrat.

Ce calcul permet également de montrer que le modèle à deux équations retenu pour rendre compte de l'activité phosphatasique de l'eau de mer est satisfaisant puisque pour toutes les concentrations de substrat la différence entre les valeurs mesurées et calculées (V1+V2) est inférieure à 5 % (Figure 4).

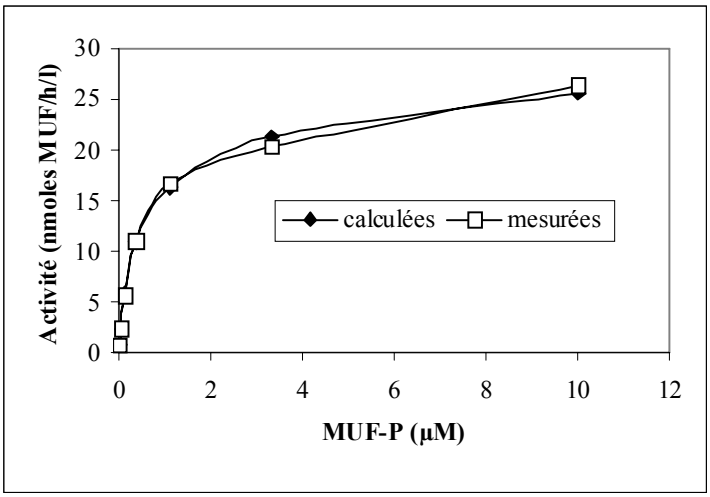

Figure 4 : activité phosphatasique pour différentes concentrations de substrat (mesurées et calculées pour chaque concentration de substrat au moyen des équations des deux composantes)

Les paramètres cinétiques de chaque composante permettent également de calculer le rapport Vm/Km de chacune d'elle. Ce calcul montre que le rapport Vm/Km de la composante à forte affinité est beaucoup plus élevé que celui de la composante à faible affinité (Tableau 1).

Avec le pNPP

Les résultats des activités moyennes concernant l'activité totale de l'eau de mer sont indiqués dans la figure 5. Ils représentent la Vmax de cette activité car elles ont été calculées à partir de concentrations élevées. L'activité totale est due à une activité particulaire et à une activité dissoute. L'activité particulaire moyenne est bien plus élevée que l'activité dissoute. Comme

les expériences ont été faites avec seulement trois concentrations de substrat, il n'a pas été possible d'analyser ces données selon Eadie Hofstee comme on l'a fait pour l'autre substrat.

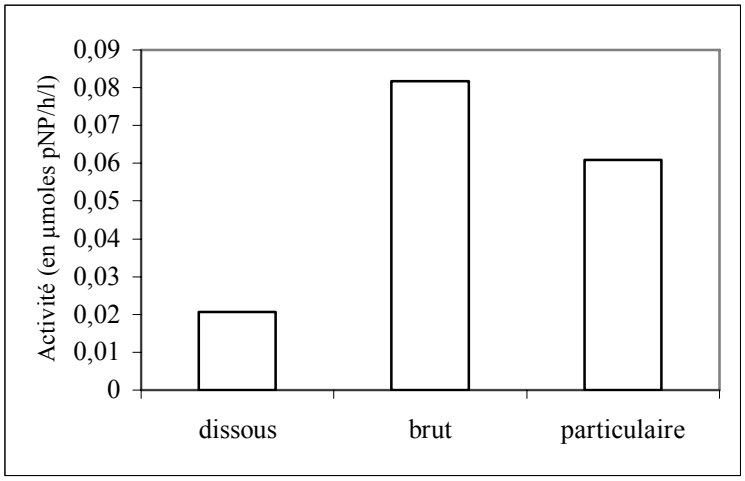

Figure 5 : Activité phosphatasique moyenne annuelle des fractions dissoute, particulaire et totale (brute).

1.2 Cinétiques des activités dissoutes

L'activité dissoute est l'activité de filtrats d'eau de mer passée sur des membranes de 0,45 µm de porosité. Les activités annuelles moyennes de cette fraction ont été représentées en fonction des diverses concentrations de MUF-P et de pNPP.

1.2.1 Avec le MUF-P

L'activité dissoute responsable de l'hydrolyse du MUF-P augmente lorsque les concentrations de substrat s'élèvent (Figure 1). Elle se sature beaucoup plus lentement que l'activité totale.

La représentation de ces cinétiques en coordonnées d'Eadie-Hofstee montre que l'activité dissoute comporte deux composantes michaeliennes très distinctes qui sont révélatrices de deux types d'activités : l'une à forte et l'autre à faible affinité (figure 6).

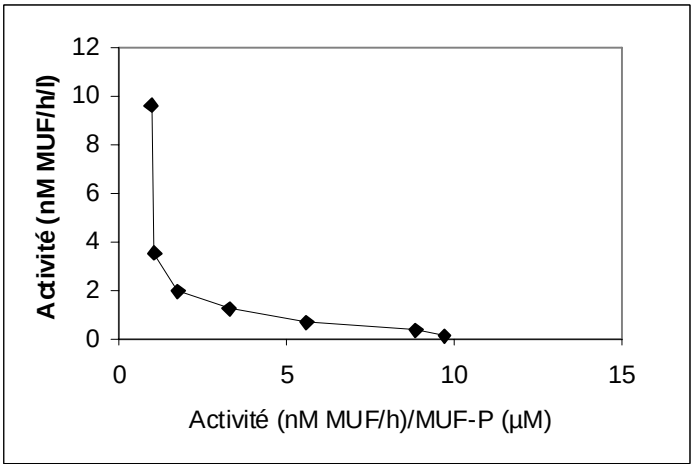

Figure 6 : Représentation d'Eadie-Hofstee de l'activité dissoute.

Le calcul de leurs constantes cinétiques indique que la première a un Km de 4 µM et une Vmax de 9,5 nanomole/h/L et la deuxième, un Km de 0,68 µM et une Vmax de 0,5 nanomoles/h/L (Tableau 1). Comme nous l'avons fait précédemment, il est possible à partir des équations de ces deux composantes de calculer la part de chacune des activités pour chaque concentration. Ce calcul montre que l'essentiel de l'activité dissoute provient de la composante à faible affinité et que sa contribution diminue lorsque la concentration en substrat diminue (figure 7).

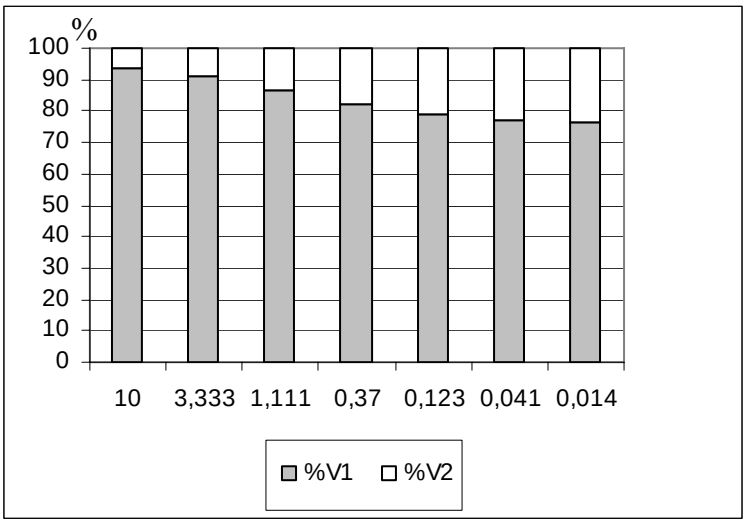

Figure 7 : Pourcentage des activités dissoutes à faible affinité (V1) et à forte affinité (V2) pour différentes concentrations de substrat

Nous avons également calculé le rapport Vm/Km des différents types d'activité. Comme pour l'activité totale celui ci est plus élevé pour la composante à forte affinité que pour la composante à faible affinité. Toutefois le rapport Vm/Km de l'activité dissoute à forte affinité est bien plus faible que celui de l'activité totale de l'eau de mer (tableau 1).

1.2.2 Avec le pNPP

Les résultats concernant l'activité dissoute mesurée avec le pNPP sont rassemblés dans la figure 5. Comme pour l'activité totale ils correspondent aux Vmax. Ils confirment que l'activité particulaire est plus élevée que l'activité dissoute.

1.3 Cinétique des activités particulaires

L'activité particulaire a été tout d'abord calculée par différence entre l'activité totale de l'eau de mer et l'activité dissoute

Comme pour les fractions précédentes, le MUF-P et le pNPP ont été testés.

1.3.1 Avec le MUF-P

Lorsque la concentration en substrat s'élève, l'activité particulaire annuelle moyenne présente une saturation beaucoup plus rapide que celle de l'activité dissoute (figure 1). La représentation de ces résultats en coordonnées d'Eadie-Hofstee permet de montrer qu'une seule composante en est responsable car les points sont alignés. Son Km est de 0,33 µM et sa Vmax de 18,5 nM de MUF/h/l (figure 8, tableau 1).

Ce Km est voisin de celui de la composante à forte affinité de l'activité totale de l'eau de mer. Son rapport Vm/Km est beaucoup plus élevé que celui de l'activité dissoute (tableau 1).

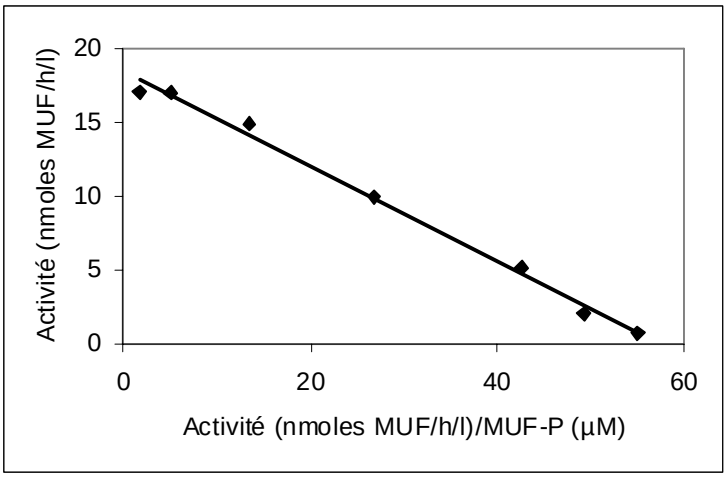

Figure 8 : Représentation d'Eadie-Hofstee pour l'activité de la fraction particulaire.

1.3.2 Avec le pNPP

Les résultats concernant l'activité dissoute mesurée avec le pNPP sont rassemblés dans la figure 5. On observe que l'activité particulaire est plus élevée que l'activité dissoute.

<u>Contribution des classes de tailles à l'activité particulaire :</u>

Des filtrations inverses ont permis de concentrer le matériel particulaire de taille supérieure à 90 µm puis celui de taille comprise entre 6 et 90 µM et enfin celui de taille comprise entre 1 et 6 µm. L'activité de la classe de taille 0,45-1 µm a été obtenue par différence entre l'activité particulaire totale (mesurée par différence entre l'activité d'eau de mer non filtrée et filtrée sur des membranes de 0,45 µm) et celle de ces trois fractions (voir matériel et méthodes).

Cette expérience montre que l'essentiel de l'activité particulaire est due à la plus petite classe de taille (Figure 9).

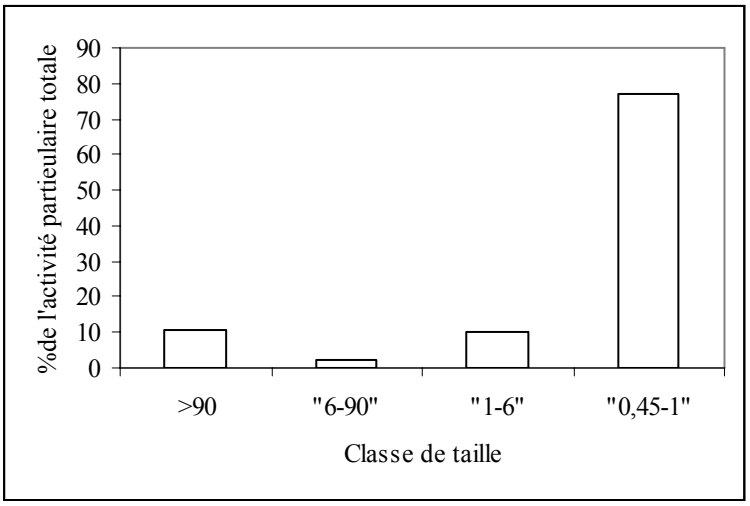

Figure 9: contribution annuelle moyenne (en %) des différentes classes de taille à l'activité particulaire exoenzymatique.

1.4 Comparaison des activités particulaires et dissoutes

1.4.1 Avec le MUF-P

Les pourcentages des activités dissoutes et particulaires ont été représentés pour différentes concentrations de substrat. Les données montrent que la contribution de l'activité particulaire à l'activité totale est plus importante que celle de l'activité dissoute. Elle dépasse en général 60 %. Par ailleurs cette contribution de l'activité particulaire augmente lorsque la concentration en substrat diminue (Figure 10).

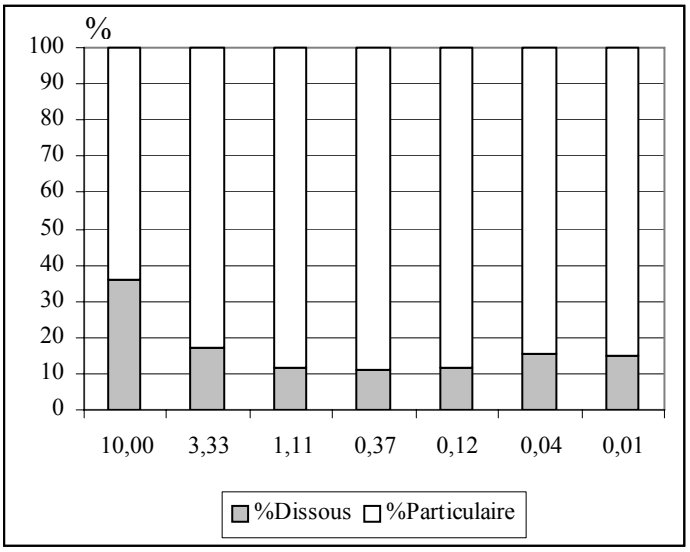

Figure 10 : contribution (en %) des fractions dissoutes et particulaires à l'activité totale.

1.4.2 Avec le pNPP

Comme pour le MUF-P, l'essentiel de l'activité phosphatasique annuelle moyenne revient à la fraction particulaire avec une valeur moyenne proche de 75 %. L'activité dissoute moyenne

annuelle ne représente que 25 %. Ces valeurs sont proches de celles obtenues avec le MUF-P aux plus fortes concentrations (Figure 5).

2. Mise en évidence des activités intracellulaires et exoenzymatiques

Les activités phosphatasiques sont présentes soit à la surface (activités exoenzymatiques) soit à l'intérieur (activités intracellulaires) des cellules. Des expériences ont été réalisées à partir de matériel particulaire broyé et non broyé provenant de mêmes prélèvements afin de caractériser ces divers types d'activité. Les prélèvements ont été effectués dans la Petite Rade au cours du mois de mai 2006.

1.5 Fraction >90 µm

De l'eau de mer a été passée sur des filtres de 90 µm. Une partie du matériel particulaire retenu sur les filtres a été soniquée, une autre a été utilisée intacte. L'activité de ces deux extraits a été mesurée avec le MUF-P comme substrat.

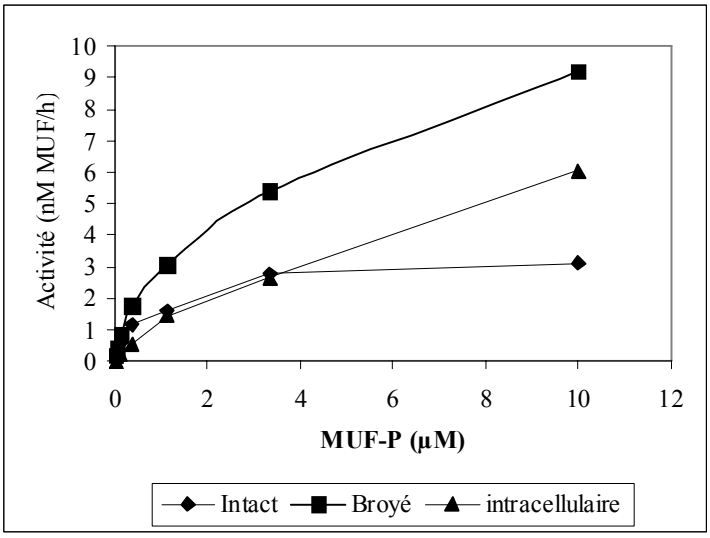

Figure 11 : Courbes de Michaelis-Menten de l'activité du Zooplancton intact, broyé et intracellulaire

Les activités du matériel broyé sont toujours plus élevées que celle du matériel intact en raison de la libération dans le milieu d'incubation d'une forte activité intracellulaire (Figure 11). Cette dernière activité a été quantifiée par différence les activités du materiel broyé et intact. L'analyse des cinétiques a montré que cette activité intracellulaire est essentiellement due à une activité à faible affinité (tableau 2, Figure 12). En revanche l'activité du matériel intact comporte une activité à forte affinité caractéristique.

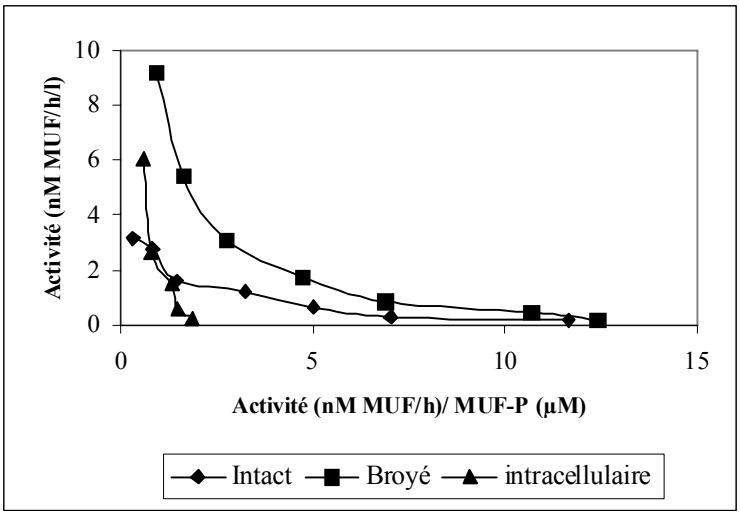

Figure12 : Représentation d'Eadie-Hofstee de l'activité de la fraction >90 µm intacte, broyée et intracellulaire (=broyé-intact).

	Km1	Vm1	Km2	Vm2
Intact	8	3,5	0,23	1,5
Interne	55	22	2	3

Tableau 2: valeurs des constantes michaeliennes (Km en µM et Vm nM MUF/h) pour les pour les activités totales (intactes) et intracellulaires.

Cette classe de taille > 90 µm est essentiellement composée du zooplancton.

Une analyse approfondie de ses activités a été effectuée en relation avec les principaux groupes taxonomiques zooplanctoniques (Copépodes, Calanoïdes et Cyclopoïdes, Cladocères, Cirripèdes et Malacostracés) ainsi qu'avec leurs stades de développements (Nauplii, Copépodites et adultes). Pour permettre la comparaison entre ces différents groupes, les activités ont été rapportées aux quantités de protéines des échantillons (activités spécifiques). Le substrat utilisé a été le pNPP.

Ces activités ont tout d'abord été mesurées sur les échantillons broyés.

Une activité phosphatasique de faible et forte affinité a été détectée dans tous les groupes taxonomiques. Le Km pour l'activité à faible affinité est compris entre 0,3 et 1 mM, celui de l'activité forte affinité est inférieur à 0,02 mM. Au moins 70 % de l'activité phosphatasique (exprimée par la Vmax) est représentée par l'activité à faible affinité (figure 13). La figure 13 montre que la contribution de cette composante à faible affinité à l'activité totale est plus importante chez les Zoés (Décapodes: ZDec) et les Nauplii (Cyclopoïdes: Ncycl et Cirripèdes: NCir) que chez les adultes (Cyclopoïdes: ACycl and Calanoïdes: ACal) et les Copépodites (Calanoïdes: CCala). Pour les Nauplii de Cirripèdes (NCir), plus de 99 % de l'activité phosphatasique est due à la composante à faible affinité.

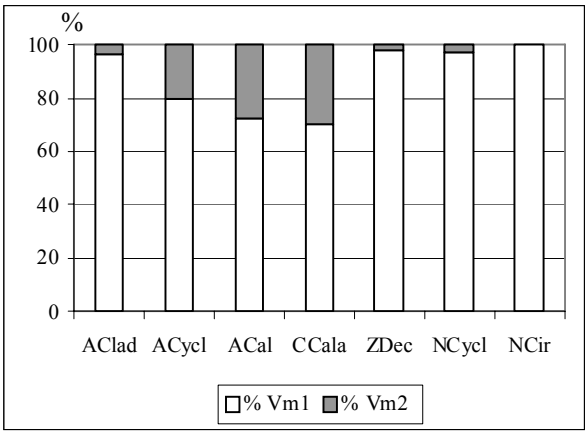

Figure 13: Contribution, en pourcentage des Vmax des activites à forte affinité (Vm2) et à faible affinité (Vm1) mesurées sur : -des larves isolées (N: Nauplii, Z: Zoé), Copépodites (C) -des adultes (A) de Cladocères (Clad), Cyclopoides (Cycl), des Calanoides (Cal), des Cirripèdes (Cir) et des Décapodes (Dec).

La Vmax de l'activité à faible affinité présente des différences considérables entre les stades de développement (figure 14). Chez les Copépodes (Cyclopoïdes et Calanoïdes), les valeurs sont relativement basses pour les adultes et les Copépodites (ACycl, ACal et CCala). Pour les Nauplii (NCycl), elles sont jusqu'à 50 fois plus élevées que pour les adultes. Cependant, il existe une certaine variabilité au sein de ce dernier groupe.

On retrouve des activités significativement plus élevées chez les Cladocères adultes que chez les Copépodes ($p<0,05$). Mais les activités les plus remarquables sont décelées chez les Nauplii de Cirripèdes ; l'activité spécifique y est 70 fois plus élevée que pour les Nauplii de Copépodes et plus de 1000 fois plus élevées que chez les Copépodes adultes. La différence avec les autres groupes taxonomiques est hautement significative ($p<0,05$).

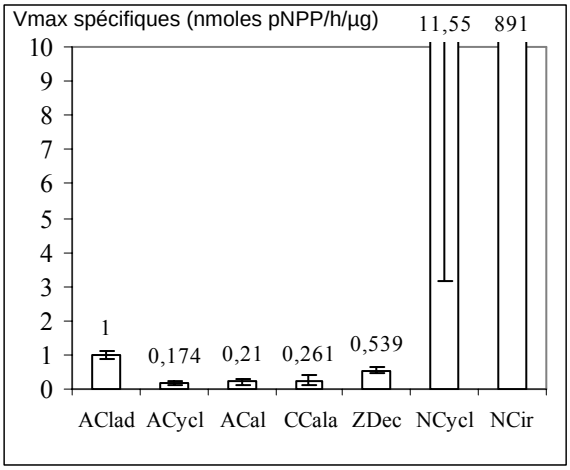

Figure 14: Vmax spécifiques (en nmol h^{-1} μg^{-1} protéines) de la composante à faible affinité de l'activité phosphatasique :

-des larves isolées (N: Nauplii, Z: Zoé, Cir : Cirripèdes), des Copépodites (C)

- et des adultes (A) de Cladocères (Clad), Cyclopoïdes (Cycl), Calanoïdes (Cal), et Décapodes (Dec) (± erreur standart).

La Vmax de l'activité à forte affinité est toujours plus basse que celle de la composante à faible affinité (figure 15). Les larves de Copépodes et les Copépodites (Copépodites de Calanoïdes: CCal et les Nauplii de Cyclopoïdes : NCycl) ainsi que les Nauplii de Cirripèdes (NCir) ont les activités les plus élevées, ces différences étant significatives dans le cas des Nauplii de cirripède ($p<0,05$). Cependant, les valeurs élevées de l'activité à faible affinité ont rendu le calcul de l'activité à forte affinité plus difficile.

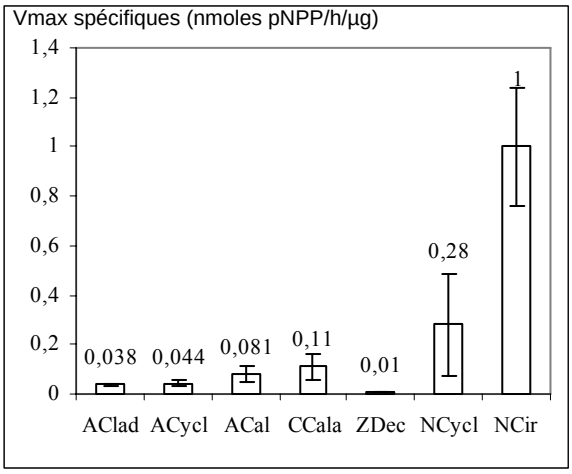

Figure 15: Vmax spécifiques (en nmol h^{-1} μg^{-1} protéines) de la composante à forte affinité de l'activité phosphatasique

-des larves isolées (N: Nauplii, Z: Zoé, Cir : Cirripèdes), de Copépodites (C)

- et d'adultes (A) de Cladocères (Clad), Cyclopoïdes (Cycl), Calanoïdes (Cal), et Décapodes (Dec) (± erreur standart).

Une étude spécifique a été ensuite effectuée sur les larves de Cirripèdes broyées ou intactes. Elles ont été isolées manuellement sous binoculaire, le plus rapidement possible. Une partie d'entre elles a été broyée, une autre a été utilisée intact. De très fortes activités ont été trouvés sur les homogénats alors qu'avec les larves intactes, une faible activité a été mesurée (figure 16).

Nous avons également recherché l'activité de la phosphatase sécrétée par les larves incubées vivantes dans de l'eau de mer pendant 24h. Une très faible activité a été mesurée, ce qui montre que l'activité phosphatasique associée aux Cirripèdes est essentiellement intracellulaire (Figure 16).

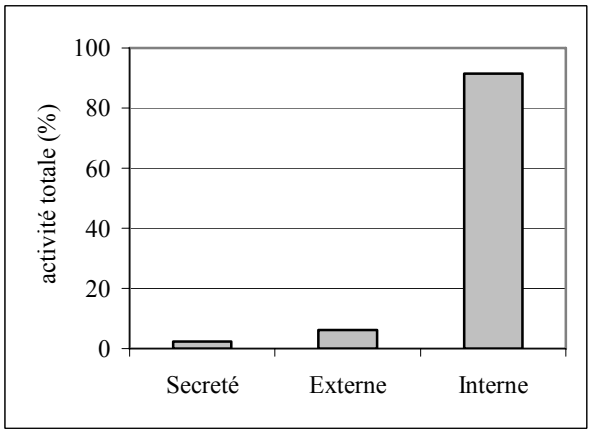

Figure 16 : Contribution respective des divers types d'activités phosphatasiques des Nauplii de Cirripèdes.

1.6 Fraction 0,45-1 µm et 1-90 µm

Une expérience a été effectuée avec du matériel particulaire recueilli par filtration d'eau de mer sur des filtres de 90 µm, 1 µm et 0,45 µm. Deux fractions ont ainsi été constituées : 0,45-1 µm et 1-90 µm.

Comme pour les fractions précédentes, une partie des cellules a été broyée et une autre a été utilisée intacte. Les activités phosphatasiques de ces échantillons ont été mesurées à l'aide de MUF-P ajouté dans l'eau de mer.

Les données obtenues avec les deux fractions (figure 17) dénotent que le broyage n'a qu'une incidence très limitée sur l'activité phosphatasique. De ce fait, contrairement à ce qui a été observé pour la fraction de taille >90 µm, l'activité intracellulaire est probablement très faible par rapport à l'activité exoenzymatique lorsque ces activités sont mesurées dans l'eau de mer.

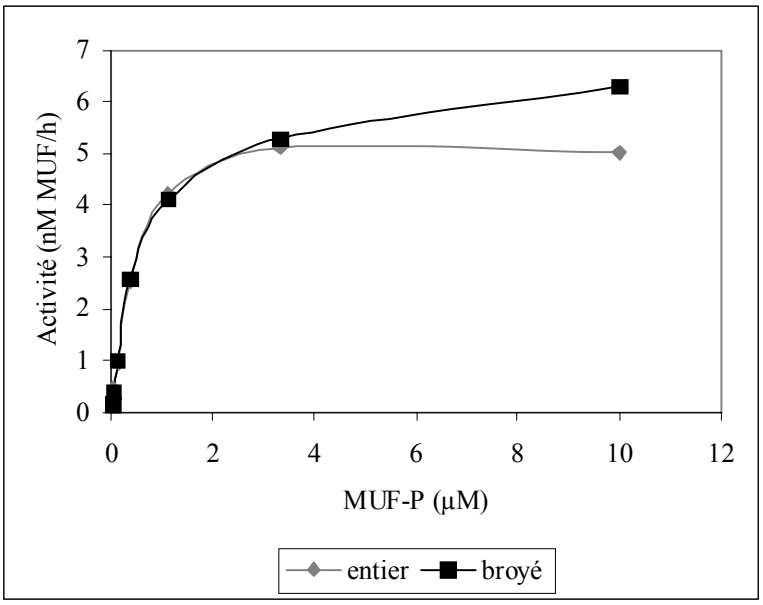

Figure 17 : comparaison des activités phosphatasiques des classes de taille 1-90 µm, intactes ou broyées, en fonction de la concentration de MUF-P.

3. Dépendances de pH de l'activité phosphatasique

Les activités phosphatasiques se caractérisent par des dépendances spécifiques de pH qui permettent de les différencier. Afin de préciser la nature des activités phosphatasiques dissoutes et particulaires, de discriminer les différentes formes de phosphatases et de les mettre en relation avec un type planctonique particulier, nous avons mesuré les activités phosphatasiques à différents pH (7, 8,1, 8,5, 9, 9,5). La préparation de ces pH est précisée dans matériel et méthodes. Il n'a pas été possible de tester des pH supérieurs à 9,5 ; le phosphore de l'eau de mer précipitant alors. Les pH ont été mesurés sur de l'eau de mer filtrée après avoir dissous les substrats. Le pH de l'eau de mer non ajustée est de 8,1.

Le MUF-P et le pNPP ont été utilisés comme substrats.

1.7 Activité dissoute

3.1.1 Avec le MUF-P comme substrat

Les activités dissoutes et leurs optimums de pH sont représentés dans la figure 18 pour des concentrations de substrat comprises entre 0,041 µM et 30 µM. Elles correspondent à deux prélèvements effectués les 17 et 18 juillet 2006.

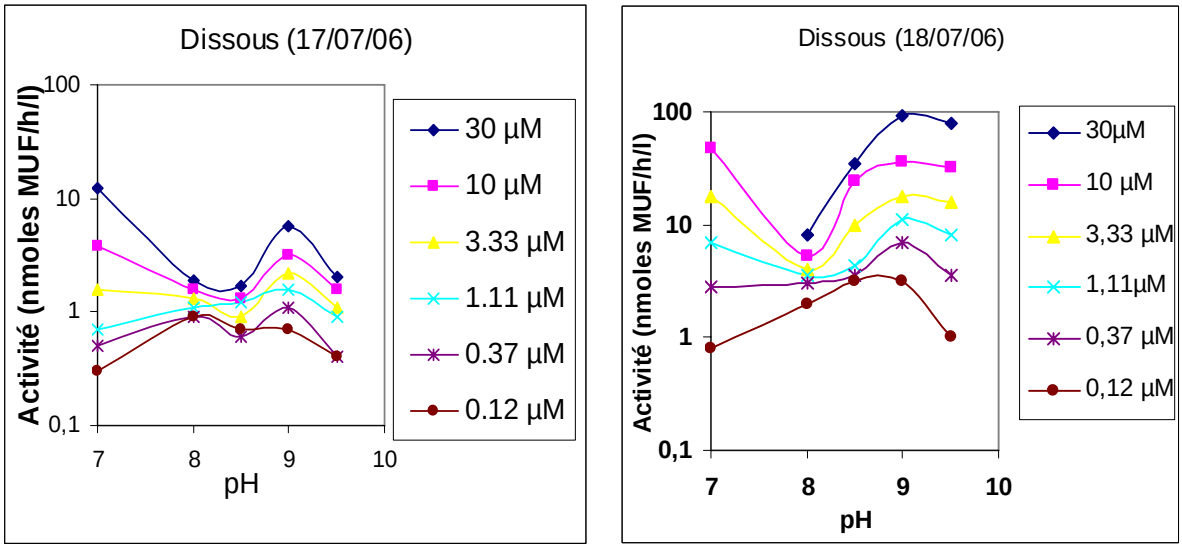

Figure 18 : Dépendance de pH des activités dissoutes à différentes concentrations de substrat lors de deux prélèvements (17 et 18 juillet), échelle logarithmique.

Pour les deux expériences, un optimum d'activité a été observé aux pH les plus alcalins (9, 9,5). Ce pic est plus marqué aux plus fortes concentrations en substrat. Par ailleurs, la première expérience montre qu'il existe un autre optimum d'activité. Il est situé à des pH moins basiques (8) et il est d'autant plus marqué que les concentrations en substrat sont faibles. Pour les deux expériences une forte activité a été également détectée à pH 7. L'effet de ce pH est surtout net aux plus fortes concentrations de substrat.

	Km1	Vm1	Km2	Vm2	Vm1/Km1	Vm2/Km2
pH7	43,90	43,90	0,50	4,50	1,00	9,00
pH8	10,00	4,00	0,05	4,38	0,40	87,60
pH8,5	10,50	5,50	0,08	2,53	0,52	31,63
pH9	28,50	31,50	0,21	5,90	1,11	28,10
pH9,5	8,00	6,00	0,25	3,14	0,75	12,56

	Km1	Vm1	Km2	Vm2	Vm1/Km1	Vm2/Km2
pH7	44,40	284,00	1,00	1,00	6,40	1,00
pH8	20,00	8,00	0,05	2,90	0,40	58,00
pH8,5	56,00	85,00	0,50	9,00	1,52	18,00
pH9	107,00	388,50	0,50	11,50	3,63	23,00
pH9,5	74,60	261,90	0,50	8,00	3,51	16,00

Tableau 3: constantes des activités à forte (Km2 et Vm2) et faible (Km1 et Vm1) affinités (Km en µM et Vm en nM MUF/h/l) de la fraction dissoute à différents pH, et rapports Vm/Km correspondants. A gauche : prélèvement du 17/07/2006 ; à droite : prélèvement du 18/07/2006.

Pour chaque pH, des composantes à forte et faible affinités ont été caractérisées. Leurs constantes sont présentées dans le tableau 3. Les équations de ces deux types d'activité ont rendu possible le calcul, pour chaque concentration de substrat et pour chaque pH, de la contribution respective de ces deux composantes. Les résultats obtenus montrent que la contribution de la composante à faible affinité s'accroît lorsque la concentration et le pH augmentent et qu'inversement celle de la composante à forte affinité diminue (figure 19).

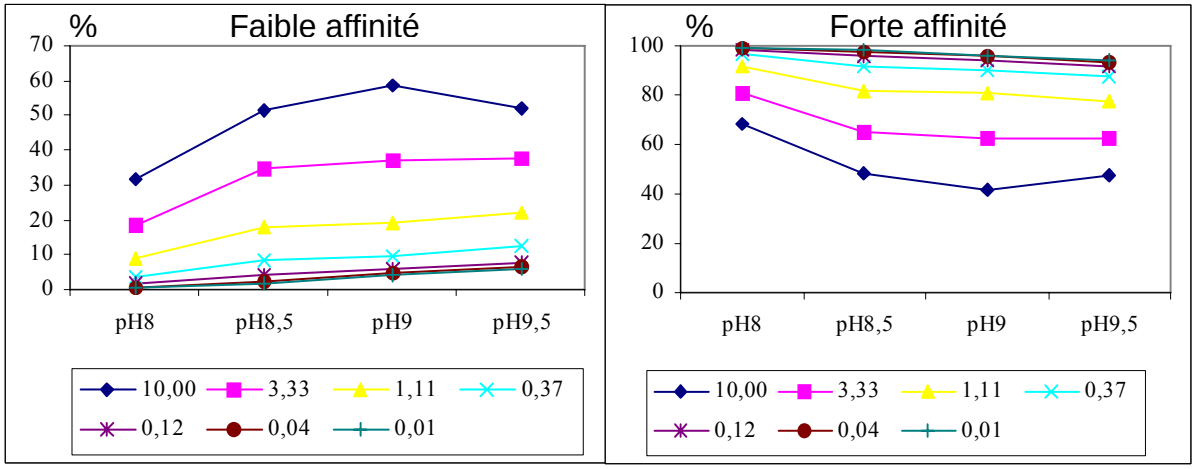

Figure 19 : Contribution (en %) de la composante à faible affinité (à gauche) et à forte affinité (à droite) pour la fraction dissoute, à différentes concentrations de substrat (µM)

3.1.2 Avec le pNPP comme substrat

Deux concentrations de substrat ont été testées (2,5 et 5 mM de pNPP).

Avec le pNPP, comme précédemment avec le MUF-P, deux optimums de pH ont été caractérisés, l'un au pH de l'eau de mer et l'autre au-delà de 9,5 (Figure 20).

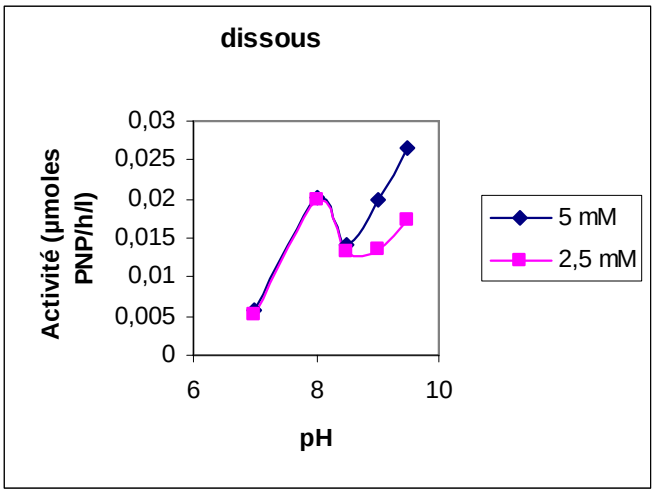

Figure 20: activité dissoute en fonction des différents pH pour 2 concentrations de substrat (pNPP).

1.8 Activité particulaire totale

Elle a été mesurée sur du matériel particulaire filtré puis soniqué ce qui permet de mesurer l'ensemble des activités phosphatasiques, intracellulaires et exoenzymatiques.

3.2.1 Activités de la classe de taille >90 µm

Cette étude a été réalisée les 20 juin et 3 juillet. Le matériel particulaire a été recueilli sur des filtres de mailles 90 µm puis broyé dans l'eau de mer filtrée. Six concentrations de substrat ont été testées pour chaque expérience ; elles sont comprises entre 0,041 et 30 µM.

Ces activités ont été suivies pendant deux périodes de deux heures. Sur l'ensemble des résultats obtenus, l'activité au cours de la deuxième période est égale à 73 % de l'activité de la première. Pour cette raison nous avons considéré les résultats de la première période.

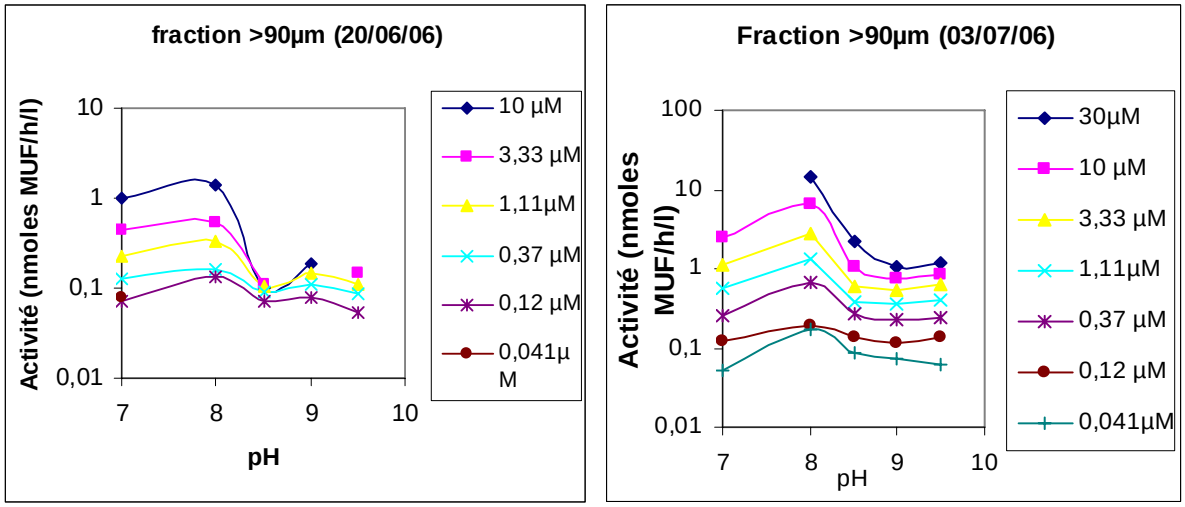

Figure 21: Activité particulaire de la fraction >90 µm à différentes concentrations de substrat et à différents pH, de deux prélèvements (20 juin 2006 et 3 juillet 2006).

pH	Km1	Vm1	Km2	Vm2	Vm1/Km1	Vm2/Km2
pH 7	17,00	5,03	0,50	0,50	0,3	1
pH 8	53,00	36,00	1,00	3,50	0,7	3,5
pH 8,5	29,50	4,50	0,24	0,47	0,2	2
pH9	16,00	1,00	0,23	0,40	0,1	1,7
PH9,5	17,00	1,00	0,30	0,52	0,1	1,7

Tableau 4: constantes michaeliennes (Km en µM et Vm en nM MUF/h/l) du matériel particulaire >90 µm à différents pH, et rapports Vm/Km correspondants.

Les deux expériences indiquent que pour toutes les concentrations l'activité présente un optimum au voisinage du pH de l'eau de mer (figure 21). On peut noter que cette activité tend à augmenter également à pH 9-9,5 pour les plus fortes concentrations.

L'activité phosphatasique du de la fraction >90 µm présente des composantes à forte et faible affinité dont nous avons calculé les constantes biochimiques Km et Vm (tableau 4). Comme nous l'avons fait pour l'activité dissoute, il est possible de calculer pour chaque pH et pour chaque concentration la contribution de chaque composante. Les courbes sont analogues à celles présentées dans la figure 19, elles n'ont pas été représentées. Elles permettent de conclure que la contribution de la composante à faible affinité s'accroît lorsque la concentration et le pH augmentent et qu'inversement celle de la composante à forte affinité augmente lorsque la concentration et le pH diminuent.

Une autre expérience a été réalisée pour préciser le rôle des pH acides et pour comparer les deux substrats (MUF-P et pNPP) sur les mêmes extraits enzymatiques (figure 22). Pour cela nous avons étudié l'activité à pH 5,5 en plus des autres pH, sur des extraits de fraction >90 µm broyés.

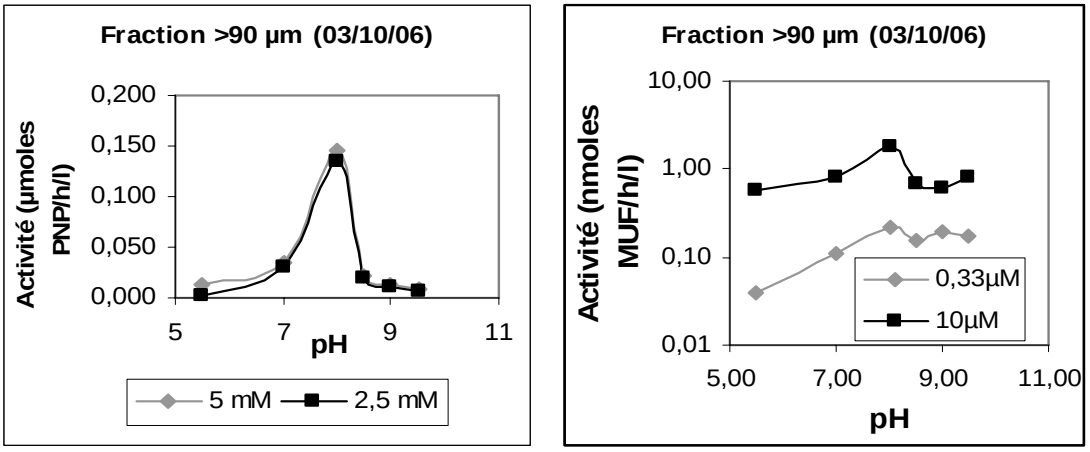

Figure 22: dépendance de pH de l'activité particulaire d'un même échantillon de taille >90 µm avec le MUF-P (à droite) et le pNPP (à gauche) pour deux concentrations de substrat.

L'optimum d'activité au pH de l'eau de mer se retrouve avec les deux substrats. On peut noter qu'avec le MUF-P le pic est moins prononcé, surtout aux faibles concentrations de substrat.

Une étude spécifique avec comme substrat le pNPP a été également entreprise sur les larves de Cirripèdes, organisme zooplanctonique présent dans cette fraction, dont l'activité phosphatasique intracellulaire est considérable, comme nous l'avons vu précédemment. On trouve alors un optimum de pH de 8,4 qui est proche du pH de l'eau de mer (figure 23).

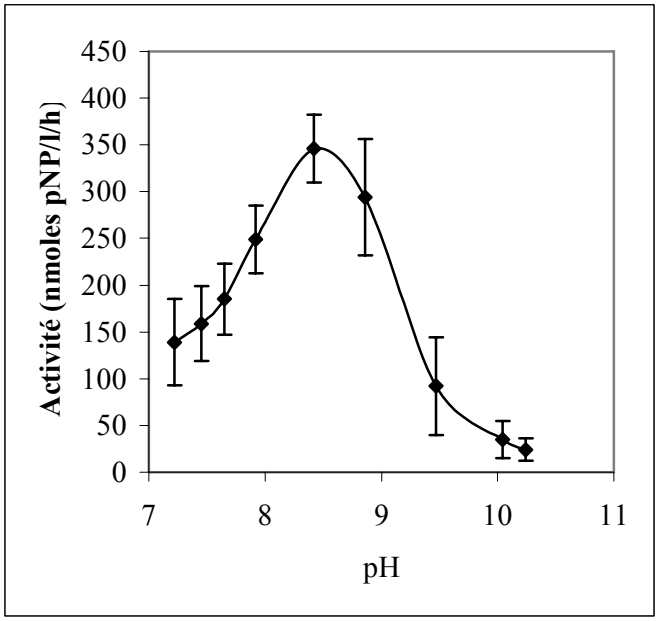

Figure 23: activités des larves de Cirripèdes avec le pNPP (5 mM) et à différents pH.

3.2.2 Activités de la classe de taille 1-90 µm

Cette étude a été réalisée le 3 juillet en parallèle avec celle menée sur la fraction >90 µm. Les mesures ont été pratiquées au cours de deux périodes de deux heures. Le matériel particulaire de taille comprise entre 1 et 90 µm a été recueilli sur des filtres puis broyé dans de l'eau filtrée par sonication. Comme pour la fraction précédente, l'activité de la classe de taille 1-90 µm diminue d'environ 30 % au cours de la deuxième période. Pour cette raison nous avons utilisé les résultats de la première période.

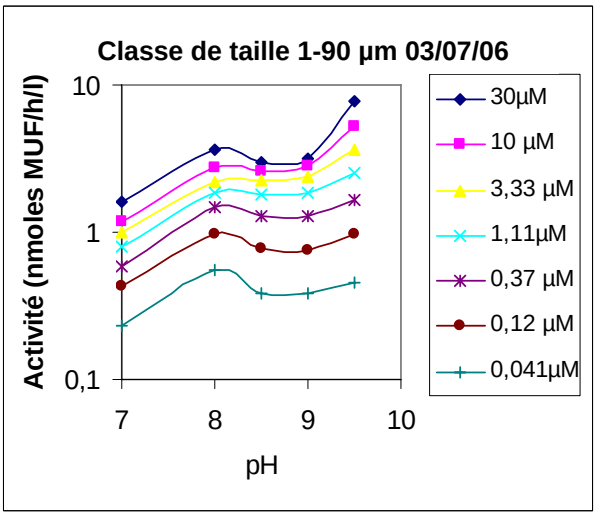

Figure 24:Activité des classes 1-90 µm à différents pH et a différentes concentrations de substrat, avec le MUF-P.

pH	Km1	Vm1	Km2	Vm2	Vm1/Km1	Vm2/Km2
pH 7	1,90	1,00	0,16	0,92	0,5	5,8
pH 8	1,35	2,50	0,13	1,80	1,9	14
pH 8,5	5,50	1,50	0,19	1,75	0,3	9,2
pH 9	5,50	1,50	0,21	1,93	0,3	9,2
pH 9,5	1,65	8,00	0,23	2,42	4,8	11

Tableau 5 : constantes michaeliennes (Km en µM et Vm en nM MUF/h/l) des activités à forte (Km2 et Vm2) et faible (Km1 et Vm1) affinités du matériel particulaire de taille 1-90 µm à différents pH et rapports Vm/Km correspondants.

L'activité de la classe de taille 1-90 µm présente un optimum de pH voisin du pH de l'eau de mer à toutes les concentrations (figure 24). On peut également observer que pour les plus fortes concentrations en substrat, l'activité remonte nettement aux pH plus alcalins jusqu'à devenir supérieure a celle obtenue au pH de l'eau de mer.

L'activité phosphatasique présente des composantes à forte et à faible affinité dont les constantes Km et Vmax sont présentées dans le tableau 5. Les équations de l'activité phosphatasique permettent de calculer, pour chaque pH et pour chaque concentration de substrat, la part des activités à fortes et faibles affinités. Les courbes sont analogues à celles présentées dans la figure 19 et elles n'ont pas été représentées. On peut ainsi montrer que, comme pour la plus grande classe de taille, la contribution de la composante à faible affinité s'accroît lorsque la concentration de substrat et le pH augmentent et que celle de la composante à forte affinité augmente quand la concentration de substrat et le pH diminuent. En conséquence comme pour la classe précédente, l'optimum au pH de l'eau de mer correspond à une activité à forte affinité et l'optimum à pH 9 correspond à une activité à faible affinité. L'activité à faible affinité aurait un rapport Vm/Km plus faible que celui de l'activité à forte affinité.

Une étude comparative des deux substrats a été également effectuée sur le même échantillon (figure 25). Avec le MUF-P on observe un seul optimum au pH de l'eau de mer aux faibles concentrations et un deuxième optimum, plus alcalin aux fortes concentrations. Avec le pNPP, un optimum à pH 9 a été retrouvé. De plus, avec le pNPP une activité à pH acide (5,5) a été mise en évidence.

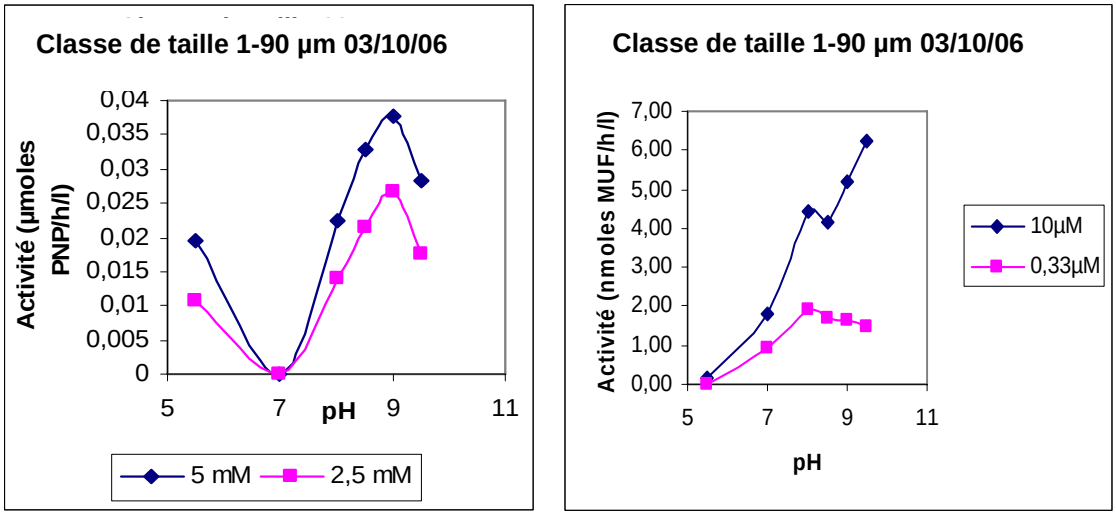

Figure 25: activité du matériel particulaire de taille 1-90 µm à différents pH et mesurée à deux concentrations de MUF-P et de pNPP, sur le même échantillon.

3.2.3 Activités de la classe de taille 0,45-1 µm

Cette dernière classe de taille a été obtenue à partir d'échantillons d'eau de mer prélevés le 3 juillet et préalablement passés sur des filtres de 1 µm puis sur des filtres de 0,45 µm. Le matériel recueilli sur le dernier filtre a été utilisé comme source d'enzyme.

Les résultats (figure 26) sont comparables à ceux obtenus avec ceux de la classe 1-90 µm. A toutes les concentrations l'activité présente un optimum de pH proche de celui de l'eau de mer. Par ailleurs, aux plus fortes concentrations, l'activité remonte aux pH plus alcalins.

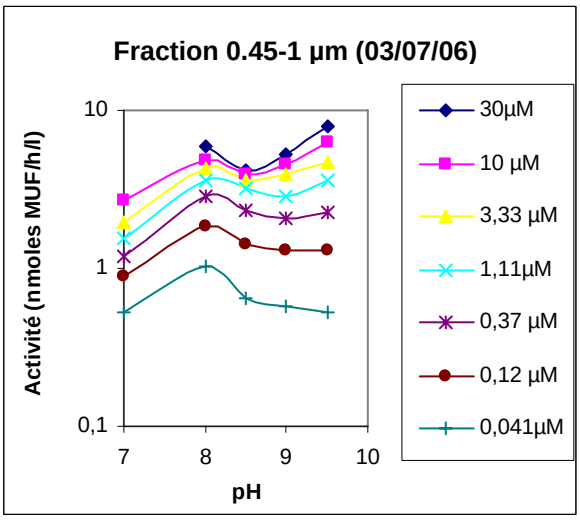

Figure 26: activité particulaire du matériel particulaire de taille 0,45-1 µm à différents pH et a différentes concentrations, mesurée avec le MUF-P.

pH	Km1	Vm1	Km2	Vm2	Vm1/Km1	Vm2/Km2
pH 7	5	2	0,1	1,3	0,4	13
pH 8	1,35	3	0,15	3,8	2,2	25
pH 8,5	9,5	0,5	0,24	3,82	0,1	16
pH 9	6,5	2,5	0,23	3,17	0,4	14
pH 9,5	1,5	5,5	0,3	3,85	3,7	13

Tableau 6 : constantes (Km en µM et Vm en nM MUF/h/l) des activités à forte (Km2 et Vm2) et faible (Km1 et Vm1) affinités du matériel particulaire de taille comprise entre 0,45-1 µm, à différents pH et rapports Vm/Km correspondants.

Comme pour la classe précédente, l'activité de la plus petite classe présente deux composantes à forte et faible affinité dont la contribution dépend de la concentration en substrat et du pH des expériences (tableau 6). Comme pour les autres groupes planctoniques, le rapport Vm/Km de la composante à forte affinité est plus élevé que celui de la composante à faible affinité.

On peut calculer la part de chaque composante à partir des équations des activités à faible et forte affinité comme on l'a fait pour les fractions précédentes (Figure 19). Ce calcul confirme que la part de la composante à faible affinité augmente quand la concentration en substrat et le pH augmentent. Cette observation atteste que, comme pour les autres classes, l'activité à forte affinité aurait un optimum de fonctionnement à un pH voisin de celui de l'eau de mer et que l'activité à faible affinité aurait un optimum beaucoup plus alcalin.

L'étude, sur les mêmes extraits, des deux substrats (figure 27) ne montre pas de différence notable dans les effets du pH. Toutefois une activité non négligeable à pH 5,5 a été mise en évidence avec le pNPP.

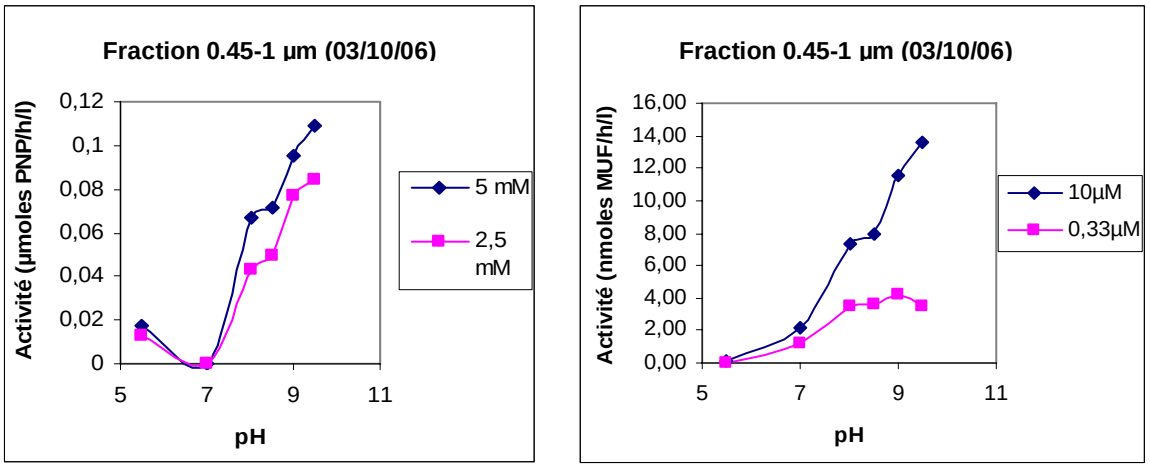

Figure 27: effet du pH sur l'activité d'un même échantillon de taille comprise 0,45-1 µm, pour deux concentrations de MUF-P (à droite) et de pNPP (à gauche).

1.9 Activités intracellulaires et exoenzymatiques

Cette étude a été entreprise sur du matériel particulaire broyé et non broyé afin de préciser l'effet du pH sur les activités exoenzymatiques et intracellulaires.

Pour ce faire nous avons étudié l'activité de cellules planctoniques concentrées par la technique de filtration inverse, et celle d'un homogénat de cellules préalablement soniquées provenant d'un même prélèvement. L'activité exoenzymatique correspond à celle des cellules intactes. L'activité intracellulaire est obtenue par différence entre l'activité de l'homogénat et celle des cellules intactes.

3.3.1 Avec le MUF-P comme substrat

<u>Cas de la fraction >90 µm</u>

Cette fraction a été préconcentrée par filtration inverse en utilisant des filtres de 90 µm. L'activité exoenzymatique de cette classe présente un optimum d'activité au pH de l'eau de mer. Lorsque la concentration en substrat augmente un deuxième optimum apparaît à pH 9 (figure 28).

L'activité intracellulaire présente un optimum à un pH voisin de 9. De plus, cette activité intracellulaire peut représenter jusqu'à 50 % de l'activité totale.

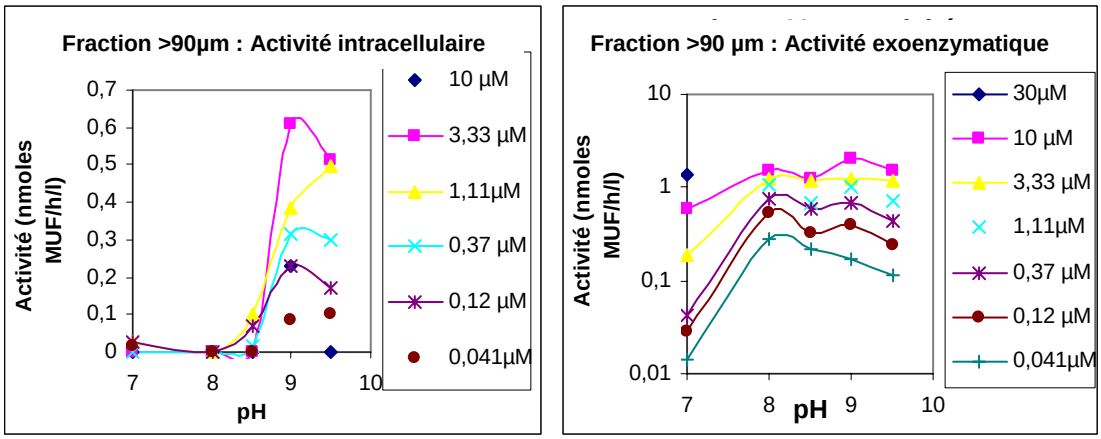

Figure 28: comparaison de l'activité intracellulaire et exoenzymatique de la fraction >90 µm avec le MUF-P.

<u>Cas de la fraction 1-90 µm</u>

Cette fraction est obtenue après préfiltration sur 90 µm et concentration par filtration inverse sur une membrane de 1 µm.

L'activité exoenzymatique mesurée sur les cellules intactes fait apparaître un optimum au pH de l'eau de mer. Un autre optimum, plus alcalin, existe lorsque la concentration en substrat augmente (figure 29). Par ailleurs, à ces fortes concentrations en substrat, une activité non négligeable a été mise en évidence à pH 7.

L'activité intracellulaire mesurée sur un homogénat, présente un optimum à un pH de 8,5 pour les plus faibles concentrations de substrat. Pour les plus fortes concentrations, l'activité augmente nettement aux pH plus alcalins. Cette activité intracellulaire est beaucoup plus faible que l'activité exoenzymatique.

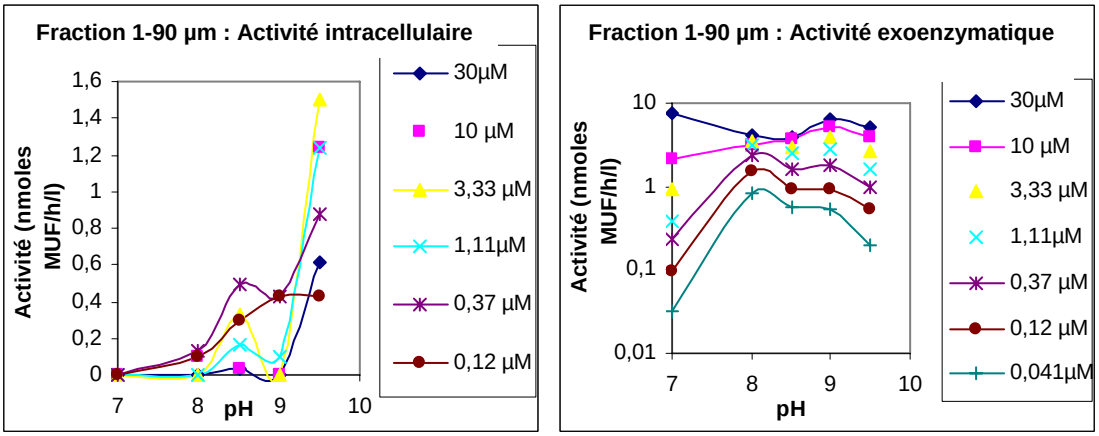

Figure 29: comparaison de l'activité intracellulaire et exoenzymatique de la fraction 1-90 µm avec le MUF-P.

Cas de la fraction 0,45-1 µm

L'activité de cette classe a été étudiée sur de l'eau préfiltrée sur 1 µm.

L'activité exoenzymatique présente le même profil que celle de la classe précédente avec un optimum assez marqué au pH de l'eau de mer pour toutes les concentrations, et un optimum plus alcalin pour les plus fortes concentrations (figure 30).

En ce qui concerne l'activité intracellulaire obtenue par différence entre l'activité d'un homogénat et celle des cellules intactes, on observe un seul optimum situé dans la zone de pH la plus alcaline. Par ailleurs comme pour la classe précédente l'activité intracellulaire est beaucoup plus faible que l'activité exoenzymatique.

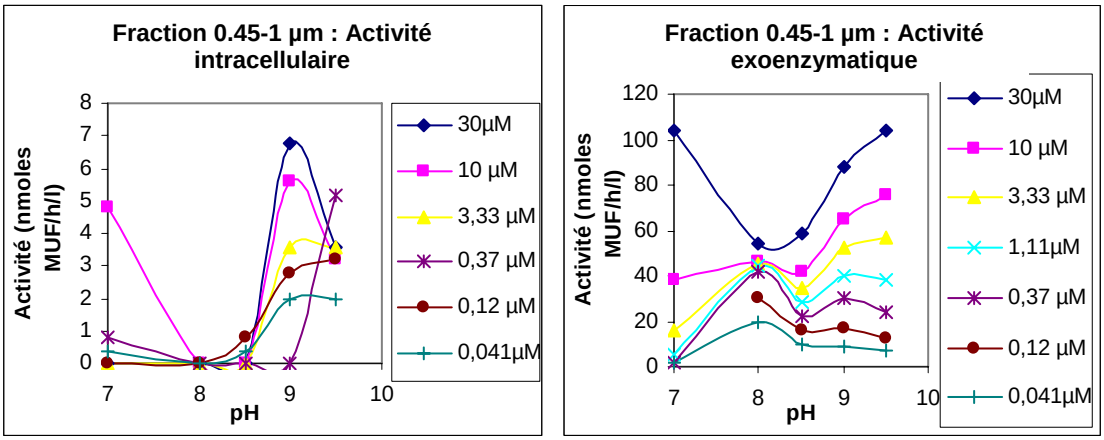

Figure 30: comparaison de l'activité intracellulaire et exoenzymatique de la fraction 0,45-1 µm avec le MUF-P.

3.3.2 Avec le pNPP comme substrat

Avec le pNPP il n'a pas été possible d'utiliser une gamme de concentration aussi large qu'avec le MUF-P. Seules deux fortes concentrations ont été testées : 2,5 et 5 mM.

Cas de la fraction >90 µm

Comme avec les fortes concentrations de MUF-P, l'activité exoenzymatique mesurée avec le pNPP se caractérise par un optimum au pH de l'eau de mer et second optimum aux pH plus alcalins (figure 31). Ce dernier est nettement moins marqué que le premier.

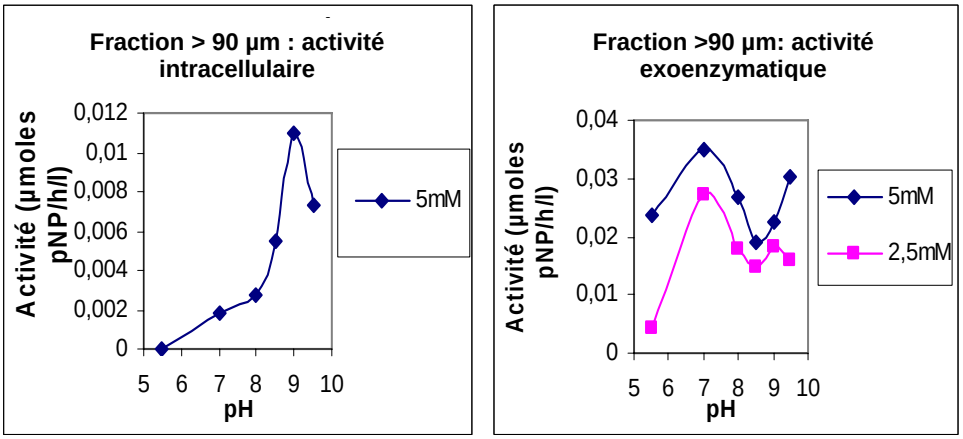

Figure 31: comparaison de l'activité intracellulaire et exoenzymatique de la fraction >90 µm avec le pNPP

Les résultats de l'activité intracellulaire sont sensiblement identiques à ceux obtenus avec le MUF-P. En effet une forte activité a été mise en évidence à pH 9. Cette activité s'atténue ensuite rapidement aux pH plus élevés.

<u>Cas de la fraction 1-90 µm</u>

Dans le cas de l'activité exoenzymatique, des pics de plus forte activité ont été observés au pH de l'eau de mer ainsi qu'a pH 9 (figure 32). Aux pH acides une activité non négligeable a été également trouvée, ce que l'on avait déjà observé pour l'activité totale avec le même substrat (figure 6). Enfin l'activité intracellulaire est caractérisée par un seul optimum, situé à pH 9.

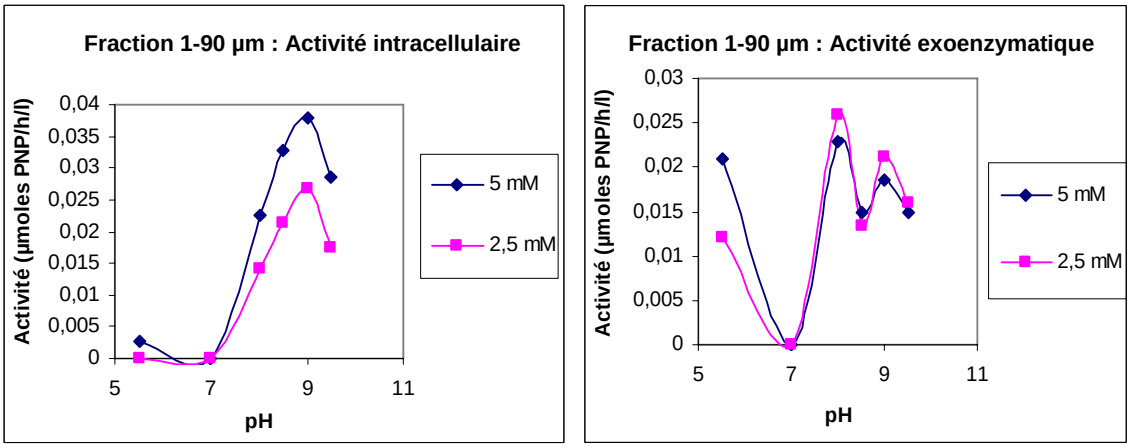

Figure 32: comparaison de l'activité intracellulaire et exoenzymatique de la fraction 1-90 µm pour deux concentrations de pNPP

Cas de la fraction 0,45-1 µm

L'activité exoenzymatique de cette classe (figure 33), présente un optimum à pH 7 à la plus forte concentration et à pH 9 pour les deux concentrations.

L'activité intracellulaire ne présente qu'un seul optimum de pH : il est très basique et probablement plus élevé que le dernier pH qui a pu être testé (pH 9,5).

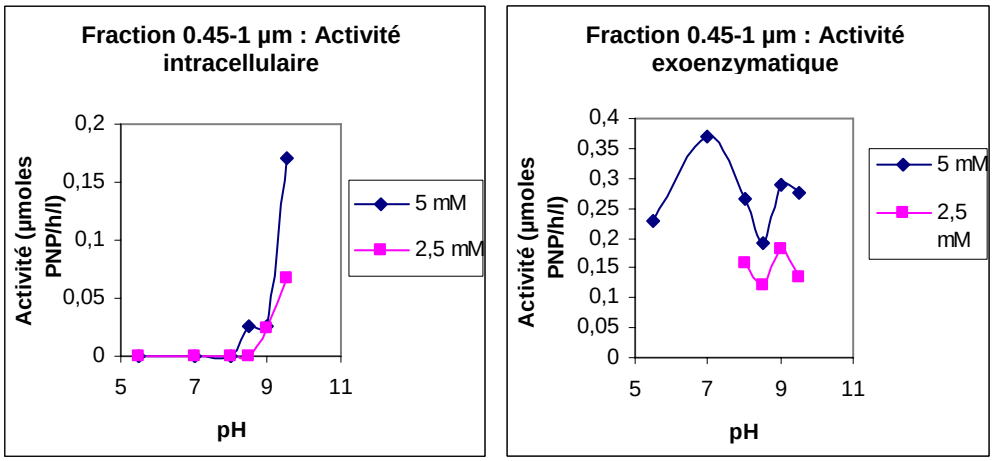

Figure 33: comparaison de l'activité intracellulaire et exoenzymatique de la fraction 0,45-1 µm pour deux concentrations de pNPP

4. Résumé

L'activité phosphatasique mesurée avec le pNPP ou avec le MUFP comporte une fraction dissoute et une fraction particulaire.

L'activité dissoute participe à moins de 45 % de l'activité totale. Elle est due à des activités à forte et faible affinité. La Vmax de l'activité à faible affinité est plus élevée que celle de l'activité à forte affinité.

Pour les fortes concentrations en substrat, la contribution de l'activité dissoute à l'ensemble de l'activité phosphatasique est maximale.

L'activité particulaire participe à plus de 65 % de l'activité totale. Sa contribution augmente lorsque la concentration en substrat diminue.

Quand elle est mesurée sur du matériel intact, cette activité particulaire ne comporte qu'une seule composante : elle est à forte affinité. Elle est surtout due aux plus petites classe de taille (0,45-1 µm).

Lorsqu'elle est mesurée sur du matériel broyé, l'activité particulaire comporte en plus une activité à faible affinité.

Le rapprochement des données obtenues sur le matériel particulaire intact et broyé a montré que les activités particulaires à forte affinité sont exoenzymatiques et que les activités particulaires à faible affinité sont intracellulaires.

Les activités intracellulaires à faible affinité sont plus elevées sur le matériel particulaire de taille >90 µm, et leur optimum de pH est voisin de celui de l'eau de mer. Ce sont principalement les larves et les stades jeunes du zooplancton qui participent a cette activité à faible affinité et plus particulièrement les Nauplii de Cirripèdes dont l'activité est considérable. Chez ces derniers l'optimum de pH est voisin de celui de l'eau de mer.

Pour toutes les classes, des activité particulaires intracellulaires à faible affinité ayant un optimum de pH beaucoup plus alcalin, ont été également mises évidence.

Pour l'ensemble des classes, l'activité particulaire exoenzymatique à forte affinité a un optimum de pH souvent proche du pH de l'eau de mer.

L'activité dissoute présente un optimum d'activité à un pH voisin de l'eau de mer et un optimum à des pH plus alcalins. Le premier correspondrait à l'activité à forte affinité, le second à l'activité à faible affinité.

Résultats, Chapitre III : Analyse des activités phosphatasiques de l'eau de mer au cours d'un cycle annuel

Présentation :

Ce chapitre est consacré à l'étude de l'évolution des activités phosphatasiques de la Petite Rade et de la Grande Rade au cours du cycle annuel.

L'activité totale sera d'abord présentée. Elle correspond à l'activité de l'eau de mer avant toute filtration. L'activité dissoute sera ensuite analysée. Elle est mesurée sur de l'eau de mer après passage sur des filtres de 0,45 µm. La différence entre l'activité totale et l'activité dissoute permettra d'étudier l'évolution de l'activité particulaire exoenzymatique. L'activité phosphatasique mesurée sur du matériel particulaire retenu sur des filtres de 0,45 µm, congelé et broyé, sera enfin décrite. Cette activité correspond à l'ensemble des activités intracellulaires et exoenzymatiques.

Pour ces expériences, les deux substrats, pNPP et MUF-P, ont été utilisés en parallèle. Dans le cas du MUF-P, 8 concentrations comprises entre 30 et 0,01 µM ont été employées. Pour le pNPP seules quatre concentrations ont été préparées : 10, 5, 2,5 et 1,25 mM.

Les résultats ont été ensuite analysés en coordonnées d'Eadie-Hofstee. Cette analyse permettra de mettre en évidence des activités à forte et à faibles affinités caractérisées chacune par des Vmax et des Km spécifiques. La somme des Vmax de ces composantes correspond à la Vmax totale. Elle peut être mesurée directement par l'intersection des courbes d'Eadie Hofstee avec l'axe des ordonnées. Toutes les Vmax ont été rapportées au volume d'eau de mer.

Sommaire

1. Evolution de la Vmax totale de l'activité de l'eau de mer 103
1.1 Activité totale 103
1.1.1 Dans la Petite Rade 103
Avec le MUF-P 103
Avec le pNPP 104
1.1.2 Dans la Grande Rade 104
Avec le MUF-P 104
Avec le pNPP 104
1.2 Activité dissoute 105
1.2.1 Dans la Petite Rade 105
Avec le MUF-P 105
Avec le pNPP 105
1.2.2 Dans la Grande Rade 106
Avec le MUF-P 106
Avec le pNPP 106
1.3 Activité particulaire 106
1.3.1 Matériel particulaire intact 106
Dans la Petite Rade 107
Dans la Grande Rade 107
1.3.2 Matériel particulaire broyé 108
Dans la Petite Rade 108
Dans la Grande Rade 109
2 Evolution des activités phosphatasiques à fortes et faibles affinités 110
2.1 Activité totale 110
2.1.1 Dans la Petite Rade 111
2.1.2 Dans la Grande Rade 112
2.2 Activité dissoute 113
2.2.1 Dans la Petite Rade 113
2.2.2 Dans la Grande Rade 114
2.3 Activité particulaire 116
2.3.1 Matériel particulaire intact 116
Dans la Petite Rade 116
Dans la Grande Rade 117
2.3.2 Matériel particulaire broyé 118
Dans la Petite Rade 118
Dans la Grande Rade 120
2.3.3 Localisation cellulaires des activités à faible et forte affinité 121
Dans la Petite Rade 122
Dans la Grande Rade 123
3 Résumé 124

1. Evolution de la Vmax totale de l'activité de l'eau de mer

Nous décrirons l'évolution des Vmax totales des activités totale, dissoute et particulaire.

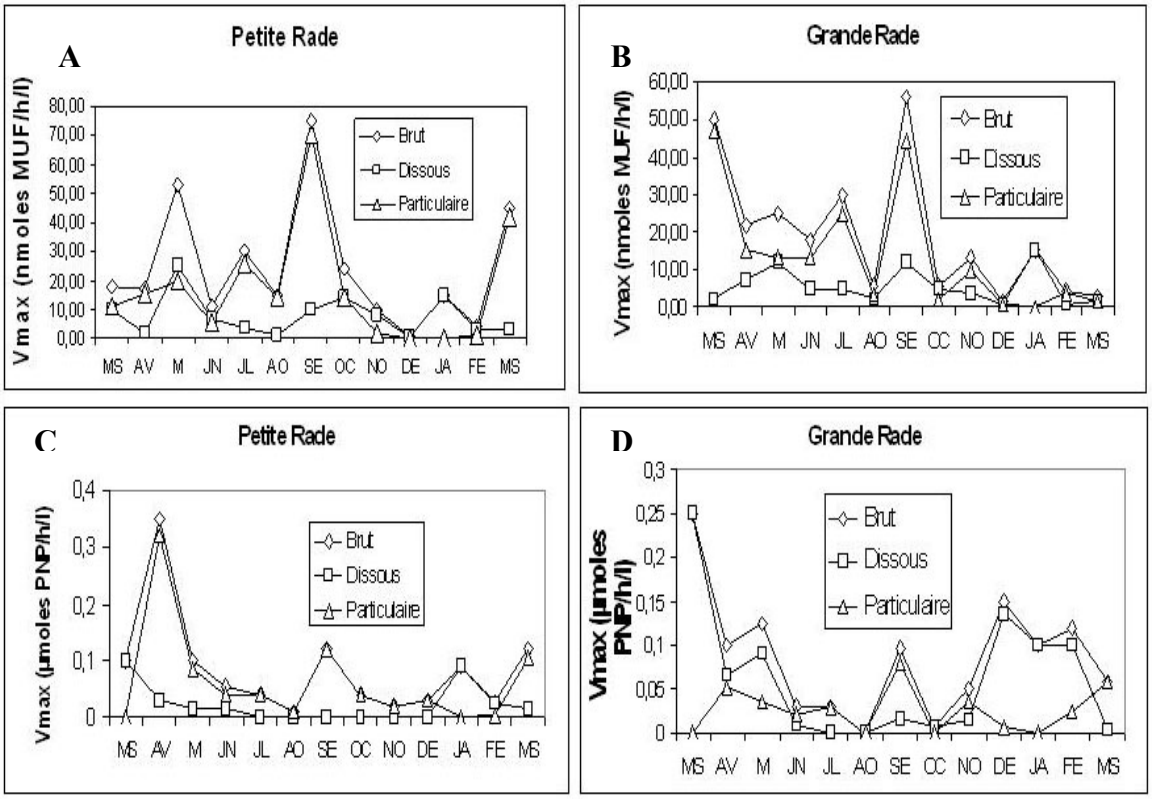

Figure 1: évolution temporelle des Vmax totales (en nmoles MUF/h/l (A) et (B) et en µmoles pNPP/h/l (C) et (D)) de l'eau de mer (Brut), de la fraction dissoute et particulaire, dans la petite et la Grande Rade

1.1 Activité totale

L'activité totale correspond à la somme des activités dissoute et particulaire.

1.1.1 Dans la Petite Rade

<u>Avec le MUF-P</u>

L'activité totale de l'eau de mer (figure 1A) présente des fluctuations importantes de mars à octobre 2005 avec des valeurs relativement hautes, notamment en mai (53 nmoles MUF/h/l) et en septembre (75 nmoles MUF/h/l). Ensuite, d'octobre 2005 à février 2006, les valeurs se stabilisent à des niveaux très bas, sauf en janvier où l'activité s'est accrue (15 nmoles MUF/h/l). Cette activité augmente encore en mars, où une valeur relativement élevée a été enregistrée (45 nmoles MUF/h/l).

Avec le pNPP

Avec le pNPP (figure 1C), le profil est différent en début de cycle avec un pic plus précoce en avril (0,35 µmoles PNP/h/l). Ensuite les niveaux diminuent sauf en septembre (0,12 µmoles PNP/h/l), en janvier (0,09 µmoles PNP/h/l) et en mars (0,12 µmoles PNP/h/l). Sur l'ensemble de l'année, les profils d'évolution des activités mesurées avec les deux substrats sont globalement comparables.

1.1.2 Dans la Grande Rade

Avec le MUF-P

L'activité est relativement élevée de mars à septembre 2005 avec des valeurs supérieures ou égales à 18 nmoles MUF/h/l (figure 1B), sauf au mois d'août (6 nmoles MUF/h/l) où on observe une baisse importante. Pour le reste du cycle, d'octobre 2005 à mars 2006, les activités restent basses et ne dépassent pas 15 nmoles MUF/h/l.

Globalement, les niveaux et l'évolution des activités phosphatasiques totales sont donc semblables à ceux de la Petite Rade et l'on ne peut pas mettre en évidence de différences significatives entre ces deux sites sur l'ensemble de l'année. Toutefois les maxima d'activité sont sensiblement plus bas dans la Grande Rade.

Avec le pNPP

Avec le pNPP (figure 1D), l'activité de la Grande Rade reste à un niveau comparable à celui de la Petite Rade. Elle est la plus forte en mars 2005 (0,25 µmoles PNP/h/l) et la plus faible en août et en octobre (0 et 0,006 µmoles PNP/h/l).

Sur l'ensemble de l'année, et comme dans la Petite Rade, les profils d'évolutions des activités phosphatasiques mesurées avec le MUF-P et avec le pNPP sont assez comparables.

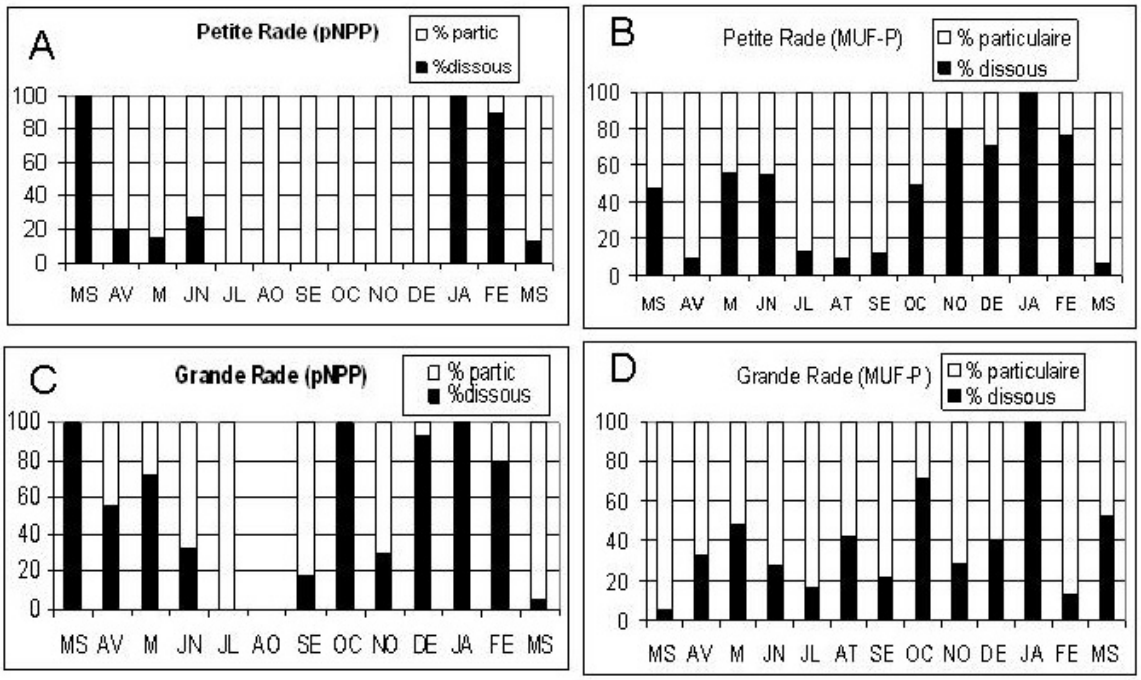

Figure 2: contribution (en %) de l'activité dissoute et de l'activité particulaire mesurées avec le pNPP(A) et (C) et avec le MUF-P (B) et (D), dans la petite et la Grande Rade au cours d'un cycle annuel.

1.2 Activité dissoute

1.2.1 Dans la Petite Rade

Avec le MUF-P

L'activité dissoute se caractérise par des niveaux variables, avec trois maxima, en mai, octobre et janvier. Le niveau d'activité le plus élevé est atteint en mai avec des valeurs de 25 nmoles MUF/h/l. Les activités les plus basses sont enregistrées en avril, août et décembre, la valeur la plus faible étant de 0,7 nmoles MUF/h/l (figure 1C).

La contribution de l'activité dissoute à l'ensemble de l'activité totale est en moyenne de 48 % sur l'ensemble de l'année (figure 2B). C'est en mai mais surtout entre novembre et février que cette activité devient prépondérante avec une contribution supérieure à 50 %.

Avec le pNPP

Avec le pNPP (figure 1C), l'évolution annuelle de l'activité phosphatasique est la même qu'avec le MUF-P avec des niveaux élevés au cours des mois de mars (0,1 µmoles PNP/h/l) et de janvier (0,09 µmoles PNP/h/l), et très faibles entre juillet et décembre. La contribution de l'activité dissoute à l'activité totale est sensiblement moins importante que pour le MUF-P (figure 2A, 2B), avec une valeur moyenne de 28 %. C'est entre juillet et décembre que ces pourcentages sont les plus faibles (0 %).

1.2.2 Dans la Grande Rade

Avec le MUF-P

Dans la Grande Rade, l'activité dissoute mesurée grâce au MUF-P, (figure 1B) présente des niveaux et des évolutions annuels assez semblables à ceux décrits dans la Petite Rade. Les différences intersites ne sont d'ailleurs pas statistiquement significatives. On observe de fortes activités dissoutes durant les mois de mai (13 nmoles MUF/h/l) et septembre (12 nmoles MUF/h/l) et surtout en janvier avec des valeurs de 15 nmoles MUF/h/l. A cette période, la totalité de l'activité de l'eau de mer provient de cette fraction. Pour les autres périodes de l'année, cette contribution ne dépasse pas 40 % (figure 2D).

Avec le pNPP

L'évolution et les niveaux des activités suivent ceux de la Petite Rade avec des valeurs plus élevées entre mars (0,25 µmoles PNP/h/l) et mai (0,09 µmoles PNP/h/l) puis entre décembre (0,13 µmoles PNP/h/l) et février (0,10 µmoles PNP/h/l). Comme dans la Petite Rade les activités dissoutes sont faibles entre juin et novembre. En effet elles ne dépassent pas 0,017 µmoles PNP/h/l. A la différence de ce qui avait été observé avec le MUF-P, les différences intersites sont significatives avec le pNPP (p Wilcoxon : 0,017) (figure 1D).

La contribution de l'activité dissoute à l'activité totale est notablement plus importante que dans la Petite Rade, en particulier en décembre et en janvier elle représente l'essentiel de l'activité phosphatasique. Cette contribution est assez importante (plus de 60 %) au printemps et en hiver (figure 2C), ce qui diffère sensiblement des résultats obtenus avec le MUF-P.

1.2 Activité particulaire

Nous avons distingué l'activité particulaire mesurée sur du matériel intact de l'activité mesurée sur du matériel broyé.

1.3.1 Matériel particulaire intact

Cette activité a été calculée par différence entre l'activité de l'eau de mer non filtrée et filtrée. Elle correspond à l'activité exoenzymatique.

Dans la Petite Rade

Avec le MUF-P, les niveaux de l'activité particulaire évoluent de la même manière que ceux de l'activité totale, avec des fluctuations régulières et rapides. Des pics d'activité ont été enregistrés en mai (20 nmoles MUF/h/l), en juillet (26 nmoles MUF/h/l) mais surtout en septembre (70 nmoles MUF/h/l) et en mars 2006(42 nmoles MUF/h/l). En revanche l'activité particulaire atteint des niveaux très bas entre novembre et février où elle ne dépasse pas 2 nmoles MUF/h/l (Figure 1A).

Cette activité particulaire est prépondérante, par rapport à l'activité dissoute pendant la première partie du cycle, c'est à dire de mars à octobre 2005. Sa contribution (figure 2B) est particulièrement importante entre juillet et septembre où elle représente près de 85 %. Cette contribution est du même ordre de grandeur en mars et avril. En revanche elle est faible entre octobre et février où elle ne dépasse pas 30 %.

Lorsqu'elle est mesurée avec le pNPP (figure 1C), l'activité particulaire présente une évolution assez semblable à celle enregistrée avec le MUF-P. Elle est élevée en avril (0,28 µmoles PNP/h/l), en septembre (0,12 µmoles PNP/h/l) et en mars (0,10 µmoles PNP/h/l). Elle diminue entre novembre et février et plus particulièrement en janvier (0 µmoles PNP/h/l) et février (0,003 µmoles PNP/h/l), à l'inverse de l'activité dissoute. La contribution de l'activité particulaire est comme pour le MUF-P souvent plus importante que celle de l'activité dissoute (figure 2A), particulièrement entre juillet à décembre où elle représente la totalité de l'activité phosphatasique (100 %).

Dans la Grande Rade

L'activité particulaire mesurée avec le MUF-P (figure 1B), suit la même évolution que dans la Petite Rade avec des pics en juillet (25 nmoles MUF/h/l) et septembre (44 nmoles MUF/h/l). La forte activité observée en mars 2006 dans la Petite Rade n'a pas été retrouvée. En revanche, une forte activité a été mise en évidence dans la Grande Rade en mars 2005 (47 nmoles MUF/h/l). Comme dans la Petite Rade, les niveaux de cette activité sont particulièrement bas entre décembre et février. Ils ne dépassent pas 3,9 nmoles MUF/h/l. Toutefois les différences intersites ne sont pas significatives.

A l'exception des mois d'octobre (33 %) mais surtout de janvier où elle nulle (figure 2D), la contribution de l'activité particulaire à l'activité totale est souvent plus importante que celle de l'activité dissoute ce qui confirme ce qui avait été déjà observé dans la Petite Rade.

L'évolution de l'activité particulaire de la Grande Rade mesurée avec le pNPP est assez voisine de celle mesurée dans la Petite Rade mais ses niveaux sont plus faibles. On retrouve les mêmes pics d'activité en avril (0,052 µmoles PNP/h/l), septembre (0,08 µmoles PNP/h/l) et mars 2006 (0,058 µmoles PNP/h/l). Des activités nulles ont été enregistrées en mars 2005, août, octobre et janvier. Sur l'ensemble de l'année les différences intersites sont significatives (pWilcoxon : 0,013).

La contribution de l'activité particulaire à l'activité totale paraît moins importante que dans la Petite Rade (figure 2C). Sur l'ensemble de l'année elle est en effet de 40 % contre 71 % dans la Petite Rade. Toutefois, comme dans la Petite Rade, l'essentiel de l'activité de juillet, de septembre et de mars 2006 en provient.

1.3.2 Matériel particulaire broyé

L'activité phosphatasique mesurée sur cet homogénat comprend l'activité exoenzymatique et l'activité intracellulaire.

Dans la Petite Rade

Cette activité phosphatasique est exprimée par la Vmax obtenue à partir des intersections des courbes d'Eadie-Hofstee avec l'axe des ordonnées. Ses niveaux sont plus élevés que ceux mesurés précédemment sur le matériel particulaire intact, car une activité phosphatasique intracellulaire a été libérée dans le milieu au cours de la sonication (Figure 3).

Cette activité présente trois pics, en juillet (35 nmoles MUF/h/l), septembre (40 nmoles MUF/h/l) et mars (41 nmoles MUF/h/l). Elle est particulièrement basse entre novembre et février. Cette évolution est sensiblement la même avec les deux substrats sauf en juillet où elle augmente beaucoup plus avec le MUF-P qu'avec le pNPP (Figure 3).

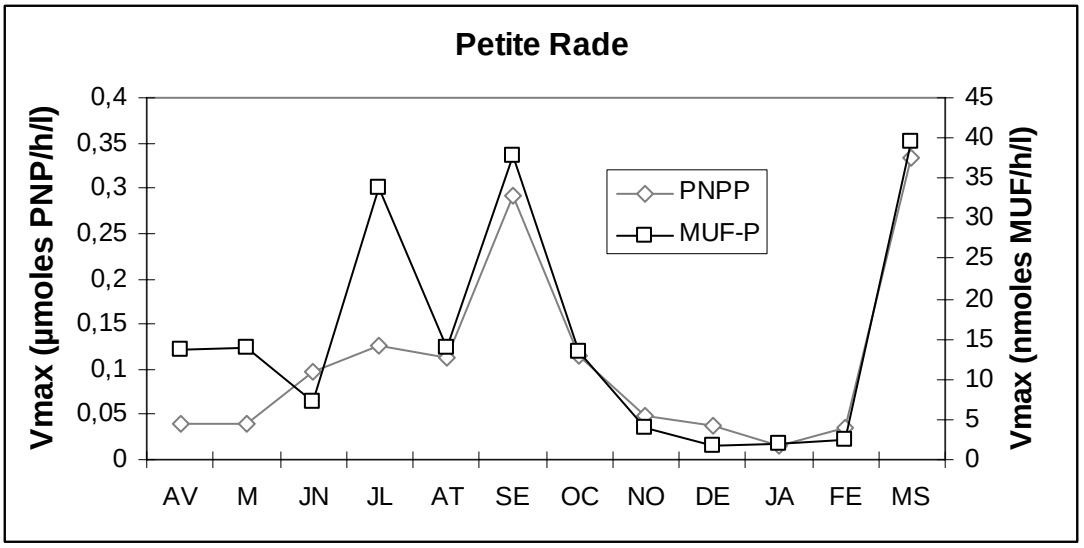

Figure 3: Représentation de l'activité par litre d'eau de mer dans la Petite Rade pour le matériel particulaire broyé au cours d'un cycle annuel avec les deux substrats (MUF-P et pNPP)

Dans la Grande Rade

Comme dans la Petite Rade, l'activité particulaire du matériel broyé est plus élevée que celle du matériel intact.

L'activité particulaire de la Grande Rade présente un pic avec les deux substrats au mois de septembre 2005 (39,4 nmoles MUF/h/l et 0,18 µmoles pNP/h/l). Avec le MUF-P un autre pic est observé au mois d'avril 2005 (81,1 nmoles MUF/h/l) et avec le pNPP, en juin (0,12 µmoles pNP/h/l) et en février 2006 (0,08 µmoles pNP/h/l) (figure 4).

Sur l'ensemble de l'année l'activité de la Petite Rade est plus élevée que celle de la Grande Rade mais les différences ne sont pas statistiquement significatives. Avec le pNPP c'est surtout entre octobre et décembre que la différence est la plus forte. Avec le MUF les activités sont voisines si l'on écarte l'activité du mois de mars particulièrement élevée dans la Petite Rade.

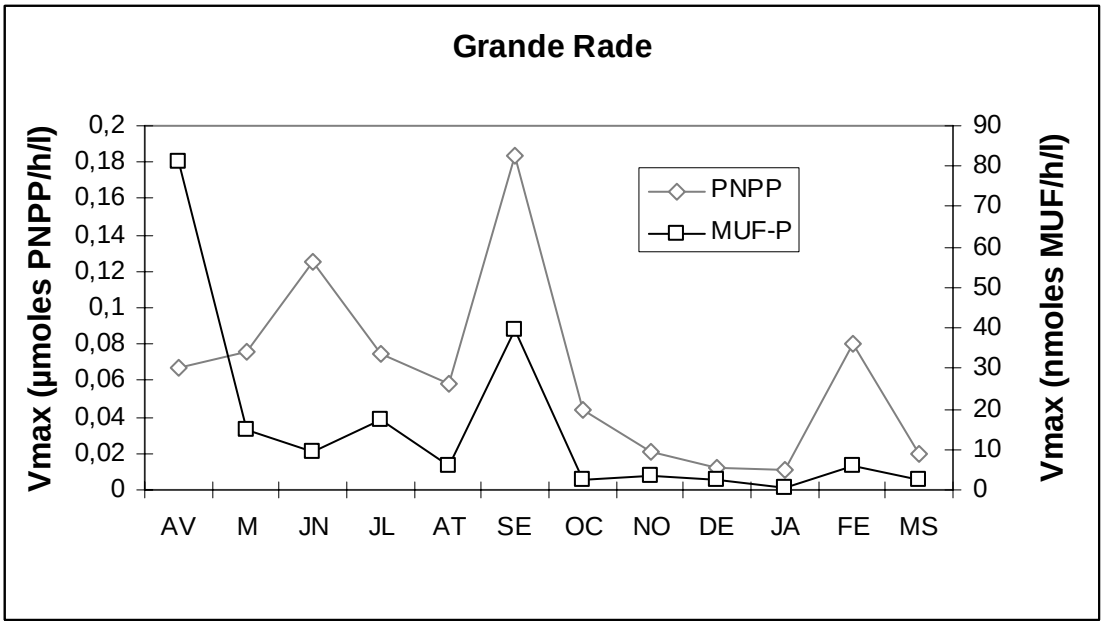

Figure 4: Représentation de l'activité par litre d'eau de mer dans la Grande Rade sur le matériel particulaire broyé au cours d'un cycle annuel avec les deux substrats utilisés pour le dosage (MUF-P et pNPP)

2 Evolution des activités phosphatasiques à fortes et faibles affinités

Une analyse des courbes d'Eadie Hofstee a été effectuée en vue de rechercher l'existence de composantes à forte et faible affinités qui contribuent, comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, aux diverses formes d'activité phosphatasique. Cette analyse a été effectuée avec le MUF-P.

2.1 Activité totale

Les courbes d'Eadie Hofstee de l'activité totale de l'eau de mer (dissoute + particulaire) ne sont pas linéaires et révèlent l'existence d'activités à forte et faible affinités. Une analyse effectuée mois par mois confirme que la plupart des prélèvements présente ces deux types d'activité dans les deux sites.

2.1.1 Dans la Petite Rade

	MS	AV	M	JN	JL	AO	SE
Km1	ND	1,50	8,50	29,50	5,00	ND	ND
EC1	ND	6,67	1,76	0,07	ND	ND	ND
Km2	0,89	0,93	0,87	0,81	0,88	0,92	0,90
EC2	20,22	7,53	43,68	11,11	34,09	16,30	83,33
	OC	**NO**	**DE**	**JA**	**FE**	**MS**	
Km1	1,50	29,50	ND	30,00	16,00	0,86	
EC1	6,67	0,29	ND	0,50	0,22	ND	
Km2	0,94	0,87	0,65	ND	0,87	0,50	
EC2	14,89	1,72	1,23	ND	0,92	52,33	

Tableau 1: valeurs des constantes de Michaelis en µM (Km1 : faible affinité, Km2 : forte affinité) et du rapport Vm/Km (EC) dans la Petite Rade (ND : Non Déterminable), pour l'activité totale.

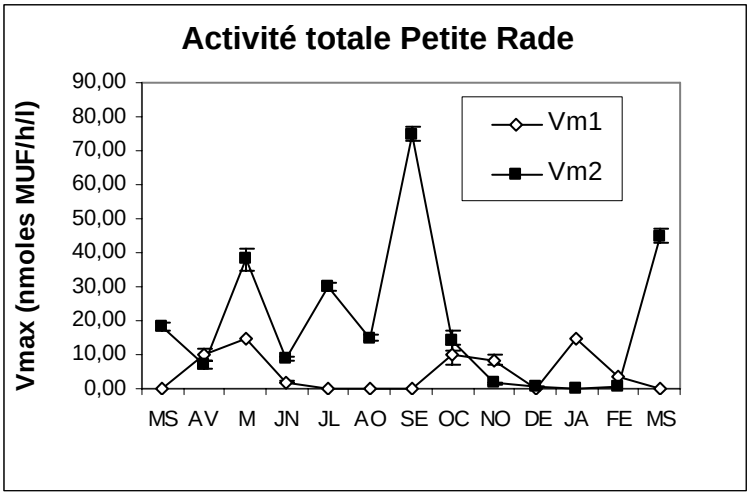

Figure 5: évolution annuelle de l'activité totale dans la petite rade (Vm1:faible affinité, Vm2: forte affinité).

Les Km de l'activité à faible affinité sont compris entre 0,86 µM (mars 2006) et 30 µM (janvier), ceux de l'activité à forte affinité sont beaucoup plus faibles et varient entre 0,5 µM (janvier) et 0,94 µM (octobre) (Tableau 1).

Les Vmax de l'activité à faible affinité fluctuent au cours du cycle annuel (Figure 5). Trois cycles successifs peuvent être observés, chacun culminant à des niveaux assez voisins. Le premier se déroule de mars à juin et culmine en mai (15 nmoles MUF/h/l), le deuxième va de septembre à décembre et culmine en octobre (10 nmoles MUF/h/l) et le troisième se déroule entre décembre et mars avec un pic en janvier (15 nmoles MUF/h/l).

La Vmax de l'activité à forte affinité est également très fluctuante mais ses pics d'activité ne sont pas synchrones de ceux de l'activité à faible affinité. De fortes activités ont été relevées en mai (38 nmoles MUF/h/l), juillet (30 nmoles MUF/h/l), septembre (75 nmoles MUF/h/l), et mars (45 nmoles MUF/h/l). En revanche entre novembre et février ces activités présentent un niveau extrêmement faible. Par ailleurs sur l'ensemble du cycle, le niveau de l'activité à forte

affinité (19,5 nmoles MUF/h/l) est bien plus élevé que celui de l'activité à faible affinité (4,9 nmoles MUF/h/l).

Le calcul du rapport Vm/Km de l'activité à forte affinité est beaucoup plus élevé que celui de l'activité à faible affinité (Tableau 1). Pour l'activité à faible affinité ce rapport est compris entre 0,07 (en juin) et 6,67 (en octobre), alors que celui de l'activité à forte affinité varie entre 0,92 (février) et 83,3 (septembre).

2.1.2 Dans la Grande Rade

	MS	AV	M	JN	JL	AO	SE
Km1	16,50	1,00	17,00	24,50	9,50	17,50	ND
EC1	1,48	16,00	0,65	0,14	0,05	0,11	ND
Km2	0,38	0,10	0,16	0,15	0,22	0,15	0,46
EC2	67,11	63,16	87,50	96,67	134,1	26,67	121,74
	OC	**NO**	**DE**	**JA**	**FE**	**MS**	
Km1	29,50	10,50	0,50	30,00	ND	13,50	
EC1	0,02	0,19	ND	0,50	ND	0,11	
Km2	0,18	1,00	0,25	ND	0,09	0,16	
EC2	30,56	11,00	6,00	ND	50,00	9,38	

Tableau 2: valeurs des constantes de Michaelis en nmoles MUF (Km1 : faible affinité, Km2 : forte affinité) et du rapport Vm/Km (EC) dans la Grande Rade (ND : Non Déterminable), pour l'activité totale.

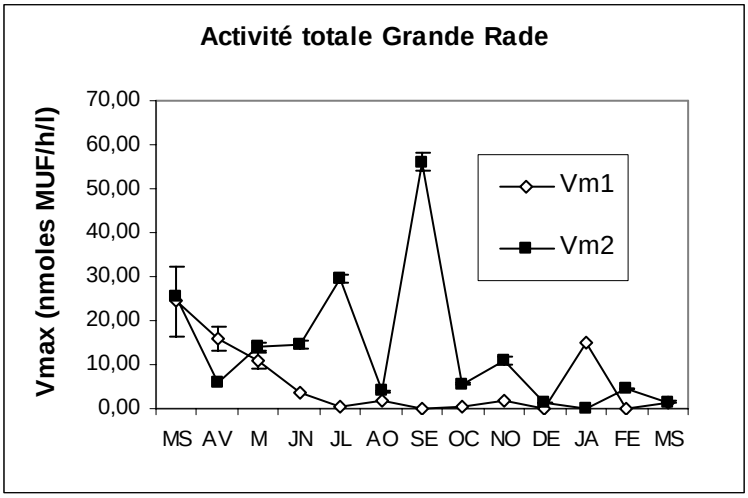

Figure 6: évolution annuelle de l'activité totale dans la grande rade (Vm1:faible affinité, Vm2: forte affinité).

L'activité de la Grande Rade comporte comme celle de la Petite Rade des composantes à forte et faible affinités. Leurs Km sont de même ordre de grandeur. Ils varient de 0,5 µM (décembre) à 29,5 µM (octobre) pour la faible affinité et de 0,09 µM (février) à 1 µm (novembre) pour la forte affinité (Tableau 2).

L'activité à faible affinité a un niveau beaucoup plus faible que dans la Petite Rade, en particulier entre juillet et mars 2006 (Figure 6). A cette période, sa Vmax est en effet de 2,6 nmoles MUF/h/l contre de 4,1 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade. Elle augmente beaucoup

entre mars et juin 2005, passant de 24,5 nmoles MUF/h/l à 3,5 nmoles MUF/h/l. Sur l'ensemble de l'année, son évolution est assez semblable à celle de la Petite Rade.

L'activité à forte affinité de la Grande Rade est, comme c'était le cas dans la Petite Rade, beaucoup plus élevée que celle de l'activité à faible affinité. Ses valeurs sont comprises entre 0 nmoles MUF/h/l (janvier) et 56 nmoles MUF/h/l (septembre) alors que dans le cas de l'activité à faible affinité elles fluctuent de 0 nmoles MUF/h/l (septembre, décembre, février) à 24,5 nmoles MUF/h/l (mars 2005). Le niveau de l'activité à forte affinité de la Grande Rade et son évolution sont par ailleurs tout à fait comparables à ceux de la Petite Rade. Sur l'ensemble de l'année le niveau moyen de l'activité à forte affinité de la Grande Rade est de 13,3 nmoles MUF/h/l et de 19,5 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade.
Comme dans la Petite Rade, le rapport Vm/Km de l'activité à forte affinité est beaucoup plus élevé que celui de l'activité à faible affinité. Il est en moyenne de 58,6 alors qu'il n'est que de 1,75 dans le cas de celui de la composante à faible affinité.

2.2 Activité dissoute

2.2.1 Dans la Petite Rade

	MS	AV	M	JN	JL	AO	SE
Km1	13,50	0,50	6,00	17,00	3,00	ND	14,50
EC1	0,59	ND	3,33	0,38	1,17	ND	0,62
Km2	0,56	0,36	0,29	0,11	0,75	0,57	0,05
EC2	3,57	4,44	17,24	4,55	0,67	2,63	20,00
	OC	**NO**	**DE**	**JA**	**FE**	**MS**	
Km1	10,50	29,50	1,00	30,00	15,00	6,50	
EC1	1,05	0,24	0,50	0,50	0,17	0,23	
Km2	0,24	0,14	0,19	ND	0,45	0,06	
EC2	12,50	7,14	1,05	ND	1,78	23,44	

Tableau 3: valeurs des constantes de Michaelis en nmoles MUF (Km1 : faible affinité, Km2 : forte affinité) et du rapport Vm/Km (EC) dans la Petite Rade (ND : Non Déterminable), pour l'activité dissoute.

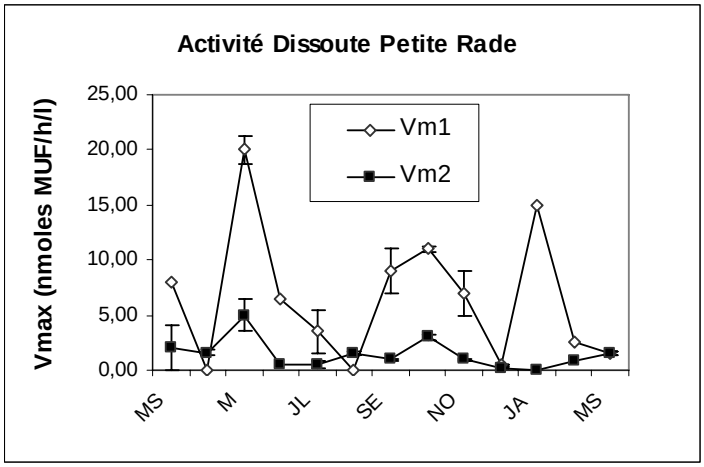

Figure 7: évolution annuelle de l'activité dissoute dans la petite rade (Vm1:faible affinité, Vm2: forte affinité).

Des composantes à fortes et faible affinités ont été mises en évidence pour les activités dissoutes.

Les activités à forte affinité de la Petite Rade sont caractérisées par des Km qui vont de 0,05 µM en septembre à 0,75 µM en juillet. Les activités à faibles affinités ont des Km qui vont de 0,5 µM en avril à plus de 30 µM en janvier (tableau 3). Il est à noter qu'en janvier le Km n'a pas pu être calculé avec précision du fait de son fort niveau. Il est probablement plus élevé que la plus forte concentration testée (30 µM).

Les Vmax de la composante à faible affinité (Vm1) présentent des pics d'activité en mai (20 nmoles MUF/h/l), entre septembre et novembre (valeur moyenne : 9 nmoles MUF/h/l), et en janvier (15 nmoles MUF/h/l) (figure 7). Les Vmax de l'activité à forte affinité (Vm2) sont en général plus basses que celles de l'activité à faible affinité. Elles sont en moyenne de 1,43 nmoles MUF/h/l alors que celle de l'activité à faible affinité sont en moyenne de 6,5 nmoles MUF/h/l. Elles présentent des niveaux élevés en mai (5 nmoles MUF/h/l), octobre (3 nmoles MUF/h/l) et mars 2006 (1,5 nmoles MUF/h/l). En revanche leurs valeurs sont très faibles en juin et en juillet (0,5 nmoles MUF/h/l) en décembre (0,2 nmoles MUF/h/l) mais surtout janvier où l'activité est nulle.

Le rapport Vm/Km de la composante à forte affinité est beaucoup plus élevé que celui de la composante à faible affinité. Sa valeur moyenne est en effet de 8,25 alors que celui de l'activité à faible affinité est de 0,73.

2.2.2 Dans la Grande Rade

	MS	AV	M	JN	JL	AO	SE
Km1	2,00	0,50	6,50	1,00	12,00	9,00	4,00
EC1	1,00	ND	1,77	4,50	0,38	0,22	2,63
Km2	0,03	0,50	0,02	0,02	0,05	1,48	0,10
EC2	16,67	15,00	27,78	25,00	10,00	0,34	15,00
	OC	**NO**	**DE**	**JA**	**FE**	**MS**	
Km1	1,00	11,00	0,50	30,00	0,50	5,00	
EC1	4,50	0,23	1,00	0,50	1,00	0,30	
Km2	0,04	0,22	0,28	ND	0,01	0,16	
EC2	12,50	5,91	0,36	ND	10,00	1,25	

Tableau 4: valeurs des constantes de Michaelis en nmoles MUF (Km1 : faible affinité, Km2 : forte affinité) et du rapport Vm/Km (EC) dans la Grande Rade (ND : Non Déterminable), pour l'activité dissoute.

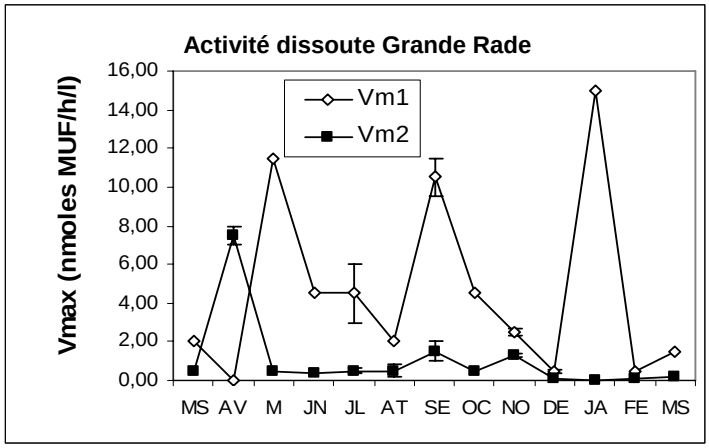

Figure 8: évolution annuelle de l'activité dissoute dans la grande rade (Vm1:faible affinité, Vm2: forte affinité).

Les Km des activités à forte affinité de la Grande Rade sont compris entre 0,01 µmoles MUF en février et 1,48 µmoles MUF en août. Les Km des activités à faibles affinités vont de 0,5 µmoles MUF en avril et février à 30 µmoles MUF en janvier (tableau 4). Comme dans la Petite Rade, les Km de l'activité à forte affinité de janvier de la Grande Rade sont plus élevés que la plus forte concentration testée (30 µM).

Les Vmax de l'activité à faible affinité (Vm1) (figure 8) culminent en mai (11,5 nmoles MUF/h/l), en septembre (10,5 nmoles MUF/h/l), et surtout en janvier 2006 (15 nmoles MUF/h/l). Ces Vmax sont en revanche très basses en avril (0 nmoles MUF/h/l), en août (2 nmoles MUF/h/l), en décembre (0,5 nmoles MUF/h/l) et en février (0,5 nmoles MUF/h/l). L'évolution de cette activité à faible affinité est tout à fait synchrone de celle décrite précédemment dans la Petite Rade. Ses niveaux sont également comparables avec des valeurs moyennes de 6,5 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade et de 4,58 nmoles MUF/h/l dans la Grande Rade. Les différences ne sont d'ailleurs pas statistiquement significatives.

Comme dans la Petite Rade, les Vmax de l'activité à forte affinité (Vm2) (figure 8) sont en général plus basses que celles de la composante à faible affinité. Les valeurs moyennes de l'activité à faible affinité sont en effet de 4,58 nmoles MUF/h/l alors que celles de l'activité à forte affinité sont de 1,05 nmoles MUF/h/l. L'activité à forte affinité de la Grande Rade est élevée en avril (7,5 nmoles MUF/h/l), en septembre (1,5 nmoles MUF/h/l) et en novembre (1,3 nmoles MUF/h/l). En revanche entre mai et août ses Vmax présentent des valeurs très basses (0,5 nmoles MUF/h/l) ; entre décembre et mars l'activité est presque nulle. Sur l'ensemble de l'année l'évolution et le niveau de cette activité sont assez comparables dans les deux sites. Dans la Grande Rade sa valeur moyenne est en effet de 1,05 nmoles MUF/h/l, elle est de 1,43 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade.

Comme dans la Petite Rade, le rapport Vm/Km de la composante à forte affinité est beaucoup plus élevé que celui de la composante à faible affinité avec une moyenne de 1,39 contre une moyenne de 11,65 pour la composante à faible affinité.

2.3 Activité particulaire

Cette activité a été mesurée sur le matériel particulaire intact et broyé.

2.3.1 Matériel particulaire intact

Dans la Petite Rade

	MS	AV	M	JN	JL	AO	SE
Km1	ND	2,00	ND	ND	ND	ND	ND
EC1	ND	4,25	ND	ND	ND	ND	ND
Km2	0,10	0,06	0,21	0,41	0,30	0,19	0,60
EC2	114,58	109,52	95,24	14,15	86,67	73,68	116,67
	OC	**NO**	**DE**	**JA**	**FE**	**MS**	
Km1	ND	12,00	ND	ND	29,50	ND	
EC1	ND	0,13	ND	ND	0,02	ND	
Km2	0,13	0,14	0,02	ND	0,04	0,53	
EC2	107,69	3,57	13,33	ND	11,90	79,25	

Tableau 5: valeurs des constantes de Michaelis en nmoles MUF (Km1 : faible affinité, Km2 : forte affinité) et du rapport Vm/Km dans la Petite Rade (ND : Non Déterminable), pour l'activité particulaire exoenzymatique.

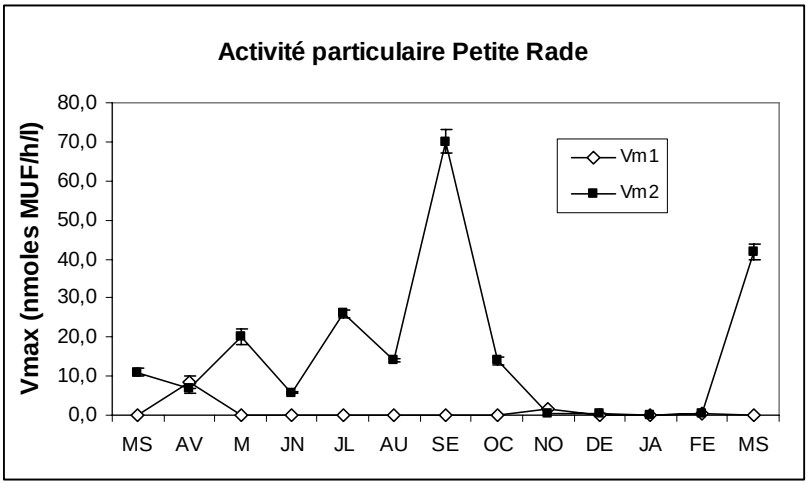

Figure 9: évolution annuelle de l'activité particulaire exoenzymatique dans la grande rade (Vm1:faible affinité, Vm2: forte affinité).

Les activités du matériel particulaire intact ne présentent le plus souvent qu'une seule composante : elle est à forte affinité. L'analyse mois par mois des cinétiques d'Eadie Hofstee (tableau 5) montre toutefois qu'en novembre, avril et février une activité à faible affinité a pu être mise en évidence. Ses Km vont de 2 µmoles à 29 µmoles. A l'exception du mois d'avril

(8,50 nmoles MUF/h/l), les Vmax de cette activité à faible affinité sont très faibles (<1,5 nmoles MUF/h/l).

Les Km de l'activité à forte affinité vont de 0,02 µmoles en décembre à 0,6 µmoles en septembre. Ses Vmax sont beaucoup plus élevées que celle de l'activité à faible affinité (figure 9). Leur moyenne sur l'année est en effet de 16,23 nmoles MUF/h/l alors que celle de l'activité à faible affinité n'est que de 0,81 nmoles MUF/h/l. Cette activité fluctue beaucoup au cours de l'année avec des niveaux plus importants en mai (20 nmoles MUF/h/l), juillet (26 nmoles MUF/h/l), mars 2006 (42 nmoles MUF/h/l) et surtout septembre (70 nmoles MUF/h/l).

Par ailleurs le rapport Vm/Km de cette composante à forte affinité est bien plus élevé que celui de l'activité à faible affinité. Il est en moyenne de 68,8 alors que celui de l'activité à faible affinité n'est que de 1,46. Il est surtout beaucoup plus élevé que celui de la fraction dissoute qui est en moyenne de 8,25.

Dans la Grande Rade

	MS	AV	M	JN	JL	AO	SE
Km1	0,50	1,00	29,50	29,50	ND	ND	ND
EC1	50,00	10,50	0,07	0,05	ND	ND	ND
Km2	ND	0,07	0,15	0,15	0,20	0,14	0,42
EC2	ND	64,29	73,33	76,67	125,00	25,00	104,76
	OC	**NO**	**DE**	**JA**	**FE**	**MS**	
Km1	ND	ND	ND	ND	ND	29,50	
EC1	ND	ND	ND	ND	ND	0,02	
Km2	0,10	1,20	0,14	ND	0,11	0,10	
EC2	15,00	6,67	6,43	ND	35,45	10,00	

Tableau 6: valeurs des constantes de Michaelis en nmoles MUF (Km1 : faible affinité, Km2 : forte affinité) et du rapport Vm/Km (EC) dans la Grande Rade (ND : Non Déterminable), pour l'activité particulaire exoenzymatique.

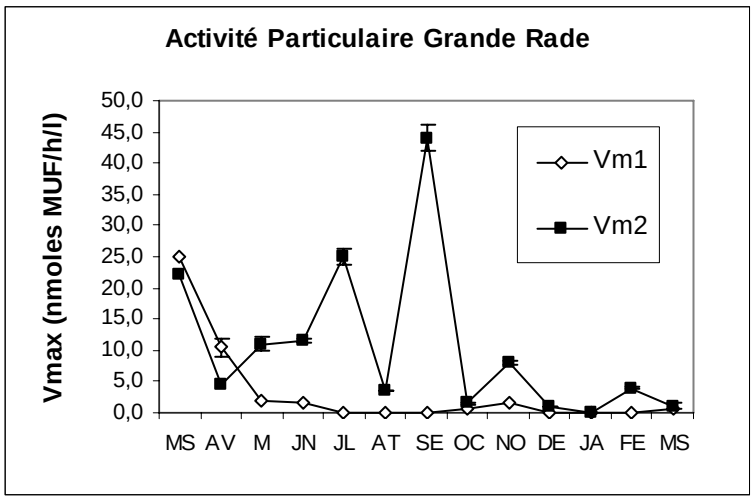

Figure 10: évolution annuelle de l'activité particulaire exoenzymatique dans la grande rade (Vm1:faible affinité, Vm2: forte affinité).

Comme dans la Petite Rade l'activité phosphatasique du matériel particulaire intact provient surtout d'une activité à forte affinité (figure 10). L'activité à faible affinité est épisodique. Elle a été mise en évidence de mars à juin 2005, comme dans la Petite Rade. Elle y est beaucoup plus élevée avec un maximum d'activité de 25 nmoles MUF/h/l au mois de mars 2005, alors que le maximum n'est que de 8,5 nmoles MUF/h/l au mois d'avril dans la Petite Rade. Comme dans la Petite Rade un deuxième pic d'activité existe également en novembre mais son importance est limitée par rapport à celle de l'activité à forte affinité.

Les Km de l'activité à forte affinité sont compris entre 0,07 µmoles en avril à 0,42 µmoles en septembre (tableau 6). Sa Vmax fluctue régulièrement durant l'année avec des valeurs plus importantes en mars 2005 (22 nmoles MUF/h/l), juillet (25 nmoles MUF/h/l), novembre (8 nmoles MUF/h/l) février (3,9 nmoles MUF/h/l) et plus particulièrement en septembre (44 nmoles MUF/h/l) (figure 10). Son évolution est tout fait similaire à celle de l'activité à forte affinité de la Petite Rade. Son niveau est sensiblement plus bas en revanche.

Comme nous l'avons constaté dans la Petite Rade, l'activité de la composante à forte affinité est bien plus élevée que celle de la composante à faible affinité (avec une moyenne annuelle de 10,52 nmoles MUF/h/l pour la forte contre 3,19 nmoles MUF/h/l pour la faible). Elle est également bien plus importante que celle de l'activité à forte affinité de la fraction dissoute (1,05 nmoles MUF/h/l).

Enfin comme dans la Petite Rade, le rapport Vm/Km de l'activité à forte affinité de l'activité à forte affinité est plus élevé que celui de l'activité à faible affinité. Il est également plus élevé que celui de l'activité à forte affinité de la fraction dissoute. En effet ses valeurs annuelles moyennes sont de 49,3 contre 11,65 pour l'activité dissoute.

2.3.2 Matériel particulaire broyé

<u>Dans la Petite Rade</u>

Comme précédemment, les activités ont été mesurées avec le MUF-P comme substrat.

L'analyse des courbes d'Eadie Hofstee a montré que l'activité totale résulte d'activités à faible et forte affinités dont nous présenterons les Km et les Vmax.

Pour l'activité à faible affinité, les Km moyen (Km1) sont de 7,9 µM. Pour l'activité à forte affinité (Km2), ils sont de 1,35 µM (tableau 7).

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE
Km1	1	7,88	9,5	5,83	3,1	2,75	8,75	9,93	6,5	29,2	3,22
Km2	0,18	2,84	2,82	0,41	0,14	0,13	0,17	5,92	0,6	0,83	0,85

Tableau 7 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel dans la Petite Rade

Les plus fortes activités proviennent de la composante à forte affinité dont les niveaux sont particulièrement élevés en juillet, septembre et mars. En revanche de novembre à février les activités à faible et forte affinité sont très basses (figure 11).

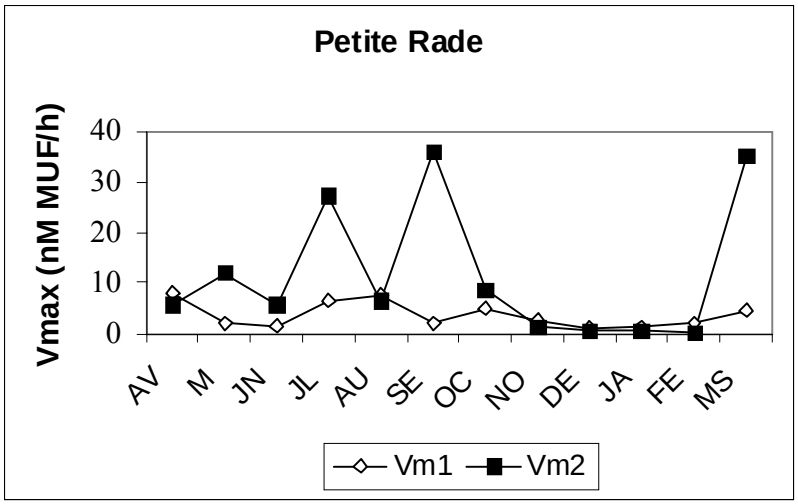

Figure 11 : évolution des activités à faible affinité (Vm1) et à forte affinité (Vm2), au cours du cycle annuel dans la Petite Rade sur le matériel particulaire broyé

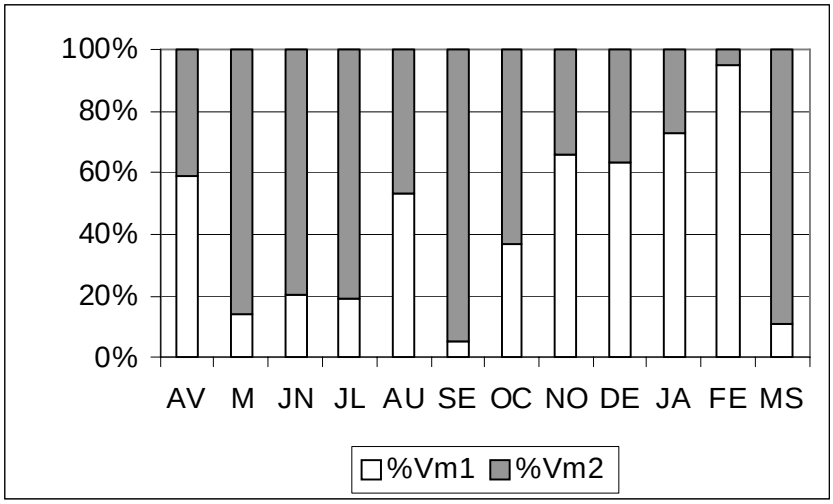

Figure 12 : Contribution (en %) des composantes à faible affinité (Vm1) et forte affinité (Vm2) dans la Petite Rade au cours d'un cycle annuel, sur le matériel particulaire broyé

Sur l'ensemble de l'année la contribution de l'activité à forte affinité est sensiblement plus élevée que celle de l'activité à faible affinité (figure 12). Elle est proche de 57 % contre 43 % pour la composante à faible affinité. Aux périodes de forte activité, la composante à forte

affinité est nettement prépondérante. En revanche aux périodes de faible activité c'est plutôt l'activité à faible affinité qui est plus élevée.

Dans la Grande Rade

Comme dans la Petite Rade, l' activité phosphatasique particulaire est la somme d'activités à faible et à forte affinités que l'analyse des courbes d'Eadie Hofstee a permis de différencier.

	AP	MY	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	16,84	6,17	3,67	3	8,17	5,2	11,17	12,25	11,1	6,7	15,5	5,33
Km2	0,43	0,44	0,43	0,07	0,53	0,13	0,83	0,84	0,61	0,7	0,68	0,53

Tableau 8 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel dans la Grande Rade

L'activité à faible affinité (Km1) se caractérise par un Km moyen de 8,75 µM, l'activité à forte affinité (Km2) par un Km moyen de 0,52 µM (tableau 8).

L'évolution des Vmax de chacune des composantes est présentée dans la figure 13.

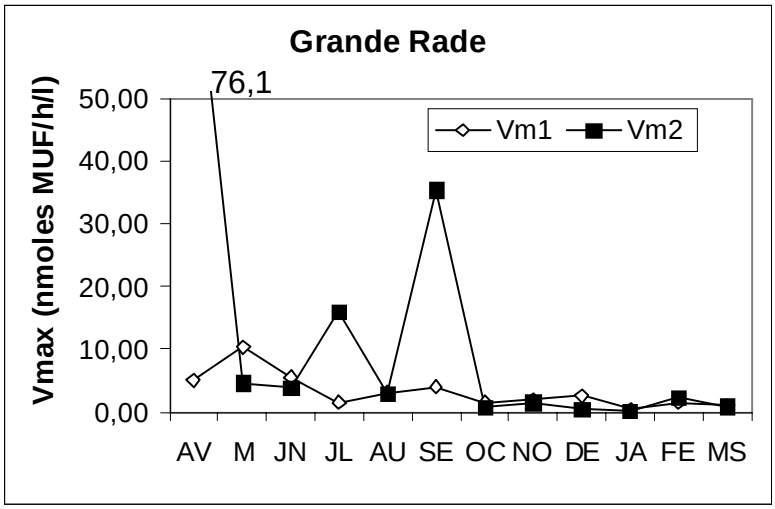

Figure 13 : évolution des activités à faible affinité (Vm1) et à forte affinité (Vm2), au cours du cycle annuel dans la Grande Rade sur le matériel particulaire broyé

Sur l'ensemble de l'année, l'activité à forte affinité est en général plus élevée que l'activité à faible affinité. Ceci est particulièrement net au cours des mois d'avril, de juillet et de septembre. Entre avril et septembre l'activité à faible affinité présente également ses valeurs les plus élevées. En revanche d'octobre à mars, les deux types d'activités ont des niveaux particulièrement bas.

L'évolution annuelle et les valeurs des activités à faible affinité sont globalement assez semblables à celles de la Petite Rade. L'activité moyenne annuelle à faible affinité est de

3,7 nM MUF/h dans la Petite Rade et de 3,2 nM MUF/h dans la Grande Rade et les différences d'activité ne sont pas statistiquement significatives sur l'ensemble de l'année.
L'évolution et les niveaux des activités à forte affinité sont également similaires dans les deux sites à l'exception des mois d'avril où cette activité est nettement plus élevée dans la Grande Rade et du mois de mars où l'activité est plus forte dans la Petite Rade.

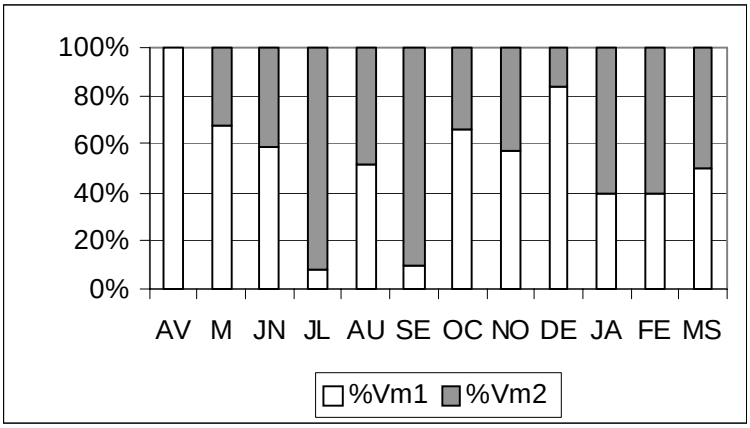

Figure 14: Contribution (en %) des composantes à faible affinité (Vm1) et forte affinité (Vm2) dans la Grande Rade au cours d'un cycle annuel, sur le matériel particulaire broyé

Sur l'ensemble de l'année la contribution de l'activité à forte affinité (Vm2) est sensiblement moins élevée que celle de l'activité à faible affinité (Vm1) (figure 14). Elle est proche de 47 % contre 53 % pour la composante à faible affinité. Elle est beaucoup plus élevée par contre au mois de juillet et septembre, ce qui correspond aux périodes de forte activité, tout comme dans la Petite Rade. En revanche aux périodes de faible activité c'est plutôt l'activité à faible affinité qui est plus élevée (décembre).

2.3.3 Localisation cellulaires des activités à faible et forte affinité

L'analyse des cinétiques des activités à fortes et faibles affinités mesurées sur le matériel particulaire intact (cf. figure1) et broyé (cf. figures 11 et 13) permettra de préciser leur localisation cellulaire.

Dans la Petite Rade

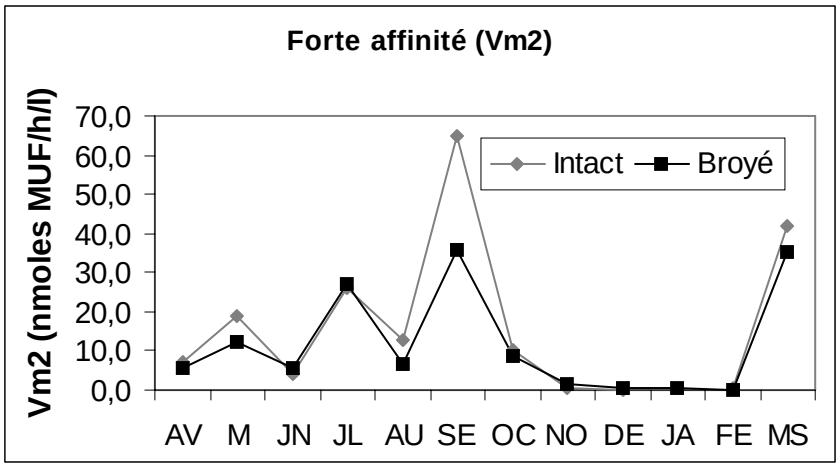

Figure 15 : évolution annuelle de l'activité a forte affinité (Vm2) du matériel particulaire broyé et intact dans la Petite Rade

L'évolution et les niveaux des activités à forte affinité du matériel particulaire intact et broyé sont tout à fait comparables (figure 15). Cette observation montre que l'activité à forte affinité est localisée sur la face externe des cellules planctoniques du matériel particulaire.

Le rapprochement des activités mesurées sur le matériel particulaire intact et broyé indique que ces activités à faibles affinités (Vm1) sont la plupart du temps beaucoup plus élevées sur le matériel broyé (figure 16). Ces résultats montrent que l'activité à faible affinité est présente à l'intérieur des cellules planctoniques.

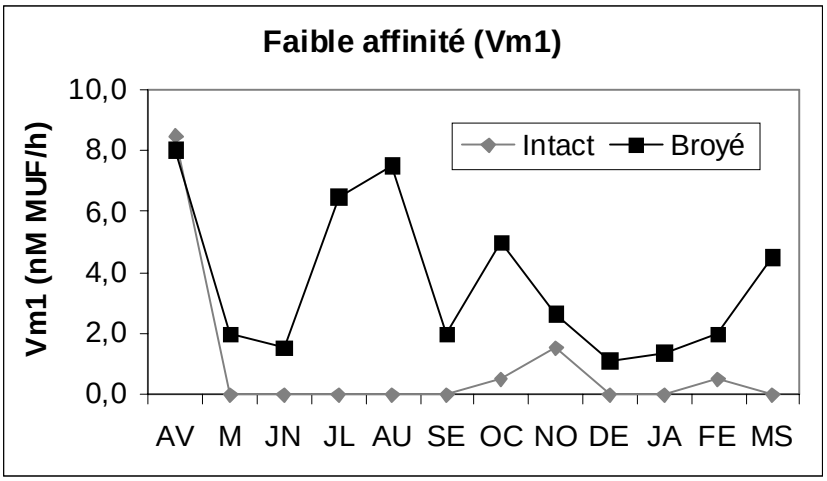

Figure 16 : évolution annuelle de l'activité a faible affinité (Vm1) du matériel particulaire broyé et intact dans la Petite Rade

Dans la Grande Rade

L'évolution et le niveau des activités phosphatasique à forte affinité du matériel particulaire intact ou broyé sont tout à fait comparables (figure 17). Ceci indique que comme dans la Petite Rade, l'activité à forte affinité est présente à l'extérieur des cellules planctoniques du matériel particulaire.

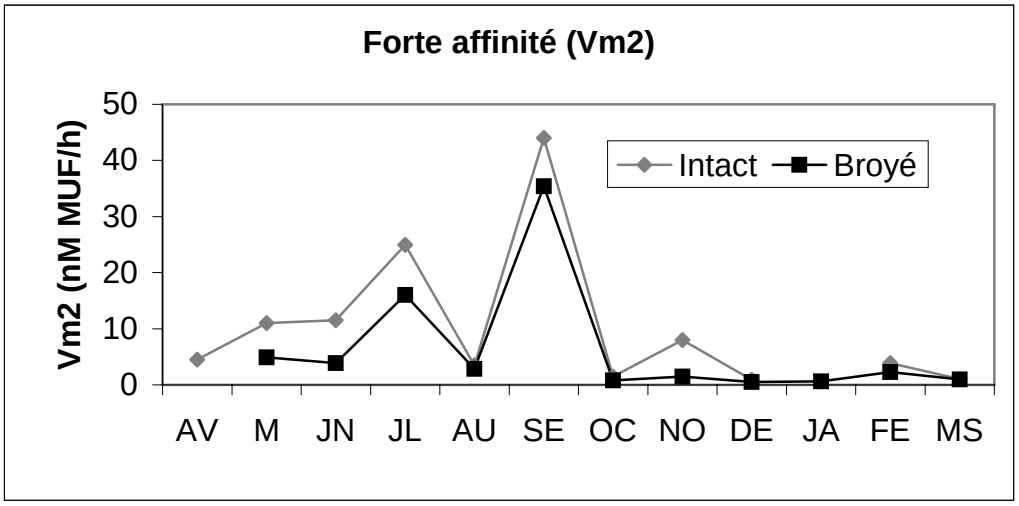

Figure17 : évolution annuelle de l'activité a forte affinité (Vm2) du matériel particulaire broyé et intact dans la Grande Rade

Comme dans la Petite Rade, l'activité à faible affinité (figure 18) est dans la plupart des cas beaucoup plus élevée dans les extraits broyés que dans les extraits intacts. Cette observation est l'indication que comme dans la Petite Rade, l'activité phosphatasique à faible affinité est essentiellement intracellulaire.

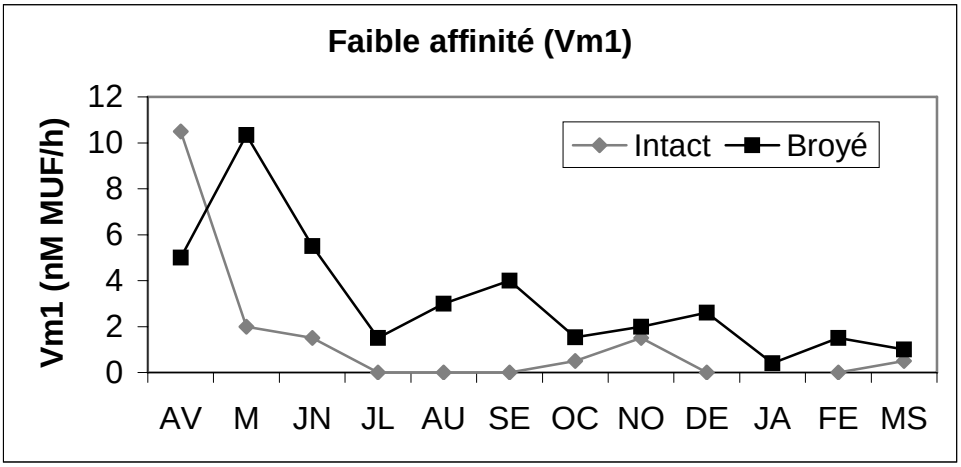

Figure 18: évolution annuelle de l'activité a faible affinité (Vm1) du matériel particulaire broyé et intact dans la Grande Rade

3 Résumé

La Vmax de l'activité phosphatasique de l'eau de mer présente des fluctuations marquées dans la Petite Rade comme dans la Grande Rade : ses valeurs sont relativement élevées en mai, juillet et septembre. En revanche d'octobre à mars ses activités sont faibles.

L'essentiel de cette activité phosphatasique provient de l'activité particulaire. L'activité phosphatasique mesurée sur du matériel particulaire non broyé est majoritairement due à une activité à forte affinité (Vm2, Km2). Cette activité est responsable des pics observés au début du printemps, en été et en automne. Par ailleurs, elle est très basse en hiver. Elle proviendrait d'ectoenzymes.

Quand elle est mesurée sur du matériel particulaire broyé, l'activité phosphatasique augmente. Ce supplément provient surtout d'activités à faible affinité (Vm1, Km1). Les niveaux de cette activité à faible affinité augmentent en été et en automne. Ces activités seraient surtout intracellulaires.

L'activité dissoute présente le même profil d'évolution que l'activité particulaire, mais ses niveaux sont en moyenne trois fois plus faibles sauf en hiver, où cette activité dissoute constitue l'essentiel de l'activité de l'eau de mer.

Cette activité dissoute est surtout due à une composante à faible affinité (Vm1, Km1)

Des activités particulaires sensiblement plus faibles ont été constatées dans la Grande Rade.

Aucune différence majeure n'a été constatée entre les deux substrats. Cependant le MUFP présente une meilleure sensibilité que le pNPP, ce qui est appréciable lors de la mesure de l'activité dissoute.

Résultats, Chapitre IV : Analyse de l'activité particulaire des différentes fractions de taille au cours d'un cycle annuel

Présentation :

Ce chapitre est destiné à préciser le rôle de différentes classes de tailles dans l'activité phosphatasique particulaire au cours du cycle annuel dans les deux rades.

La somme des activités phosphatasiques intracellulaires et exoenzymatiques de 5 classes de taille (>90 µm, 50-90 µm, 6-50 µm, 1-6 µm et 0,45-1 µm) seront d'abord présentées. Elles ont été mesurées sur du matériel congelé et broyé. La Vmax totale sera d'abord analysée. Elle correspond à la Vmax de l'ensemble des activités à faible et forte affinités. Elle est déterminée par l'intersection de la courbe d'Eadie Hofstee avec l'axe des ordonnées. Les Vmax sont exprimées par litre d'eau de mer.

Pour mieux comparer l'activité des différentes fractions, cette activité sera également rapportée à la concentration de protéines de chaque échantillon (Activité spécifique). Une analyse des cinétiques enzymatiques permettra ensuite de calculer les constantes cinétiques des composantes à forte et faible affinités qui contribuent à l'activité phosphatasique totale. L'activité phosphatasique est mesurée à l'aide du MUF-P et du pNPP.

Une étude complémentaire effectuée sur le matériel particulaire intact, permettra de préciser la contribution de quatre classe de taille (>90 µm, 90>t>6 µm, 6>t>1 µm, <1 µm) à l'activité particulaire exoenzymatique exclusivement. L'activité phosphatasique est mesurée en utilisant le pNPP comme seul substrat. Trois concentrations sont testées ce qui permet le calcul des Vmx totales, somme des activités à faibles et forte affinités.

Les activités des deux sites, la petite et la Grande Rade, seront présentées séparément.

Chapitre IV, Partie I : Activités phosphatasiques particulaires de la Petite Rade

1. Activités du matériel particulaire broyé 127
1.1 Activité de la fraction >90 µm 127
1.1.1 Evolution des Vmax totales 127
Activité par litre d'eau de mer 127
Activité spécifique 128
1.1.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 128
Activités par litre d'eau de mer 129
Contribution des activités à faible et forte affinités 130
Activités spécifiques 130
1.2 Activité de la fraction 50-90 µm 131
1.2.1 Evolution des Vmax totales 131
Activité par litre d'eau de mer 131
Activité spécifique 132
1.2.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 132
Activité par litre 133
Contribution respective des deux types d'activité 134
Activités spécifiques 134
1.3 Activité de la fraction 6-50 µm 135
1.3.1 Evolution des Vmax totales 135
Activités par litre d'eau de mer 135
Activité spécifique 136
1.3.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 136
Activité par litre d'eau de mer 137
Contribution respectives des deux types d'activité 138
Activités spécifiques 139
1.4 Activité de la fraction 1-6 µm 140
1.4.1 Evolution des Vmax totales 140
Activités par litre d'eau de mer 140
Activité spécifique 141
1.4.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 141
Activité par litre d'eau de mer 142
Contribution respectives des deux types d'activité 143
Activités spécifiques 143
1.5 Activité de la fraction 0,45-1 µm 144
1.5.1 Evolution des Vmax totales 144
Activité par litre d'eau de mer 144
Activité spécifique 145
1.5.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 145
Activité par litre d'eau de mer 146
Contribution respective des deux types d'activité 146
Activités spécifiques 147
1.6 Résumé pour le matériel particulaire broyé 148
1.6.1 Contributions des classes de taille à la Vmax totale 148
1.6.2 Contribution des classes de taille à l'activité à faible affinité (Vm1) 149
1.6.3 Contribution des classes de taille à l'activité à forte affinité (Vm2) 150
1.6.4 Comparaison des Vmax totales spécifiques des différentes classes de taille 151
1.6.5 Comparaison des activités spécifiques à faible affinité des classes de taille 152
1.6.6 Comparaison des activités spécifiques à forte affinité des classes de taille 153
2. Activités du matériel particulaire intact 153
2.1 Contribution des différentes classes de taille 153
2.2 Activité de la classe de taille >90 154
2.3 Activité de la classe de taille 6-90 µm 155
2.4 Activité de la classe de taille 1-6 µm 156
2.5 Activité de la classe de taille <1 µm 156
2.6 Résumé pour le matériel particulaire intact 157

1. Activités du matériel particulaire broyé

1.1 Activité de la fraction >90 µm

1.1.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

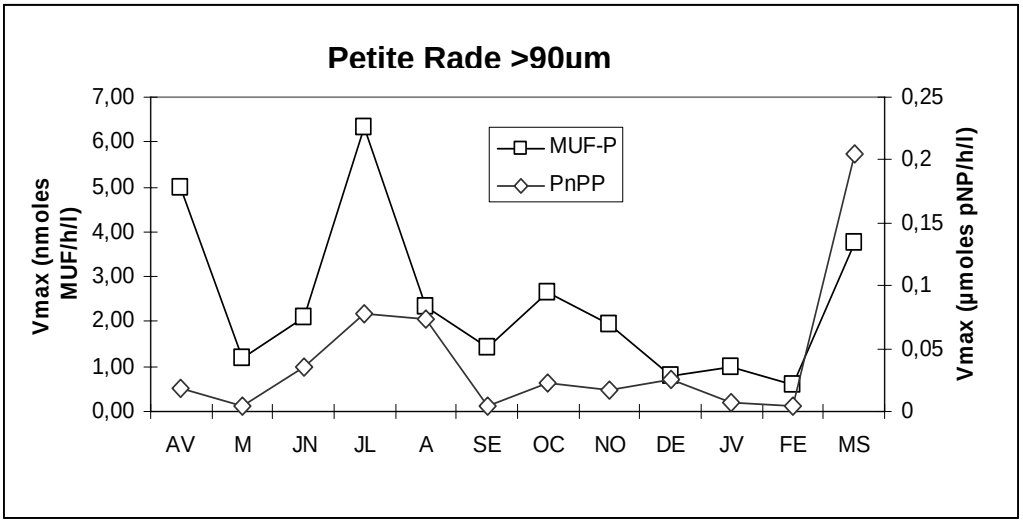

Figure 1 : évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer, pour la fraction >90 µm mesurée le MUF-P et le pNPP, dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 6,3 à 0,6 nmoles de MUF/h/l et de 0,2 à 0,003 µmoles de pNP/h/l avec respectivement le MUF-P et le pNPP.

L'activité liée aux particules de plus de 90 µm mesurée avec le MUF-P (figure 1) est surtout conséquente en avril et en juillet 2005, avec des valeurs respectivement de 5 et 6,33 nmoles de MUF/h/l. Ces activités diminuent ensuite fortement jusqu'en février. Puis elles augmentent de nouveau en mars 2006 (3,74 nmoles de MUF/h/l).

Les activités mesurées avec le pNPP (figure 1) sont très élevées de juin à août 2005 avec des valeurs supérieures à 0,03 µmoles pNP/h/l, ainsi qu'en mars 2006 avec 0,2 µmoles pNP/h/l. En janvier et février les activités sont particulièrement basses comme avec le MUFP.

Le profil d'évolution de ces activités est donc assez comparable avec les deux substrats.

Activité spécifique

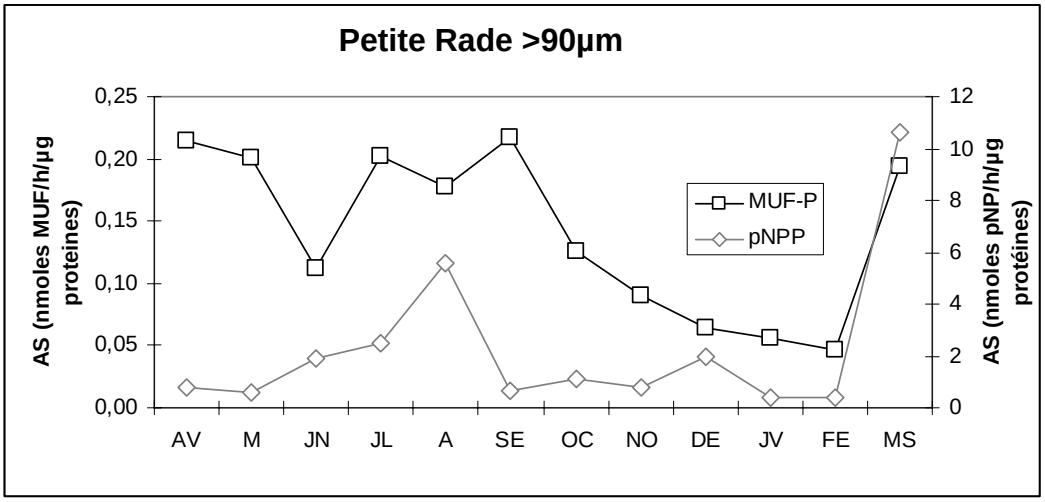

Figure 2 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction >90 µm mesurée le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les Vmax totales rapportées aux concentrations de protéines (activités spécifiques) varient de 0,22 à 0,05 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 10,6 à 0,37 nmoles pNP/h/ µg protéines avec le MUF-P et le pNPP.

L'activité spécifique mesurée avec le MUF-P, (figure 2) est assez élevée et constante au début du cycle (0,22 nmoles MUF/h/µg en septembre), puis elle diminue à partir d'octobre pour remonter en mars 2006.

Avec le pNPP (figure 2), l'activité spécifique est très forte en août 2005 avec des valeurs de 5,6 nmoles PNP/h/µg et en mars 2006 avec des valeurs de10,6 nmoles PNP/h/µg. En période hivernale, cette activité diminue et atteint son plus bas niveau en février avec 0,4 nmoles PNP/h/µg.

Les profils annuels de l'activité spécifique des deux substrats sont donc assez proches. Le pic estival (juillet-septembre) est cependant moins marqué avec le pNPP et l'activité est basse en période printanière.

1.1.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Cette analyse a été effectuée avec le MUF-P.

Pour cette classe de taille, des composantes à forte et à faible affinité ont été mises en évidence pour la plupart des prélèvements.

Le Km moyen de l'activité à forte affinité est de 1,1 µM et celui de l'activité à faible affinité est de 16,4 µM (Tableau 1)

	AV	M	JN	JL	A	SE	OC	NO	DE	JV	FE	MS
Km1	3	20,5	10	8	10	4	15	24,5	29,5	50	8,5	14
Km2	0,25	0,95	0,17	1,5	0,47	0,14	0,11	1,84	2,6	2,5	2,55	0,37

Tableau 1 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel dans la Petite Rade pour la fraction 90 µm

Activités par litre d'eau de mer

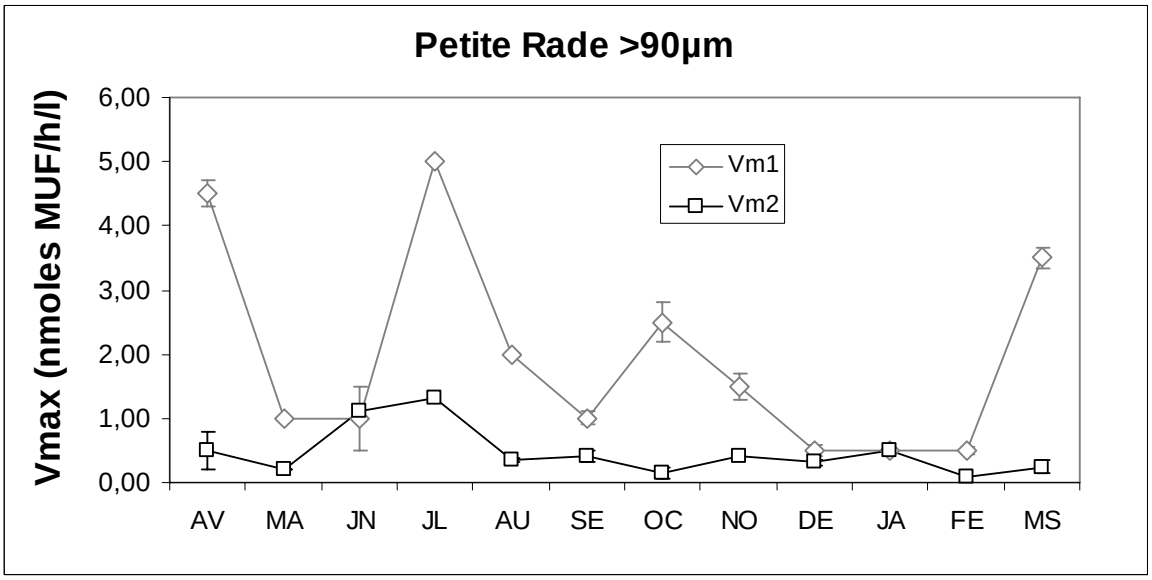

Figure 3 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction >90 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

Sur l'ensemble de l'année (Figure 3), l'activité à faible affinité (Vm1) est toujours plus élevée que l'activité à forte affinité (Vm2). Cette activité à forte affinité (Vm2) fluctue au cours de l'année avec des niveaux plus élevés au cours des mois de juin (1,1 nmoles MUF/h/l) et de juillet 2005 (1,33 nmoles MUF/h/l) et des valeurs très faibles de septembre a la fin du cycle. L'activité à faible affinité (Vm1) suit une évolution temporelle assez voisine de celle de l'activité précédente avec des niveaux plus élevés en en avril (4,5 nmoles MUF/h/l), juillet (5 nmoles MUF/h/l), octobre 2005 (2,5 nmoles MUF/h/l) et mars 2006 (3,5 nmoles MUF/h/l) et de faibles valeurs pendant le reste de l'année.

Contribution des activités à faible et forte affinités

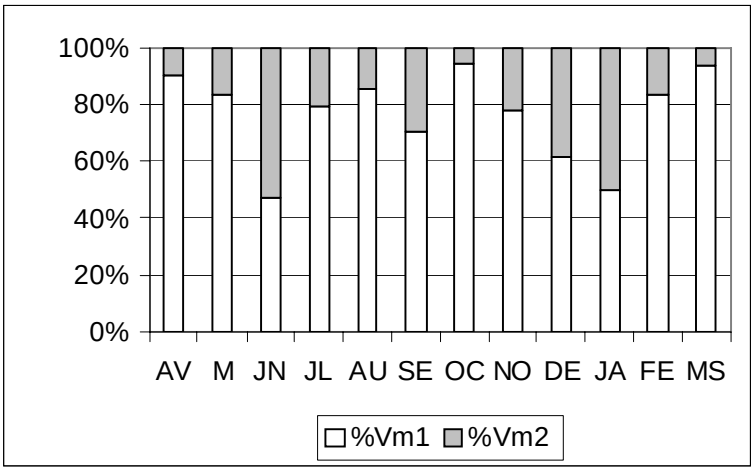

Figure 4 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction >90 µm dans la Petite Rade

Le calcul de la part respective de chacune des deux composantes à l'activité phosphatasique confirme que l'essentiel de l'activité provient de l'activité à faible affinité qui compte pour plus de 50 % dans l'activité totale. Sa contribution est particulièrement élevée en octobre (Figure 4).

Activités spécifiques

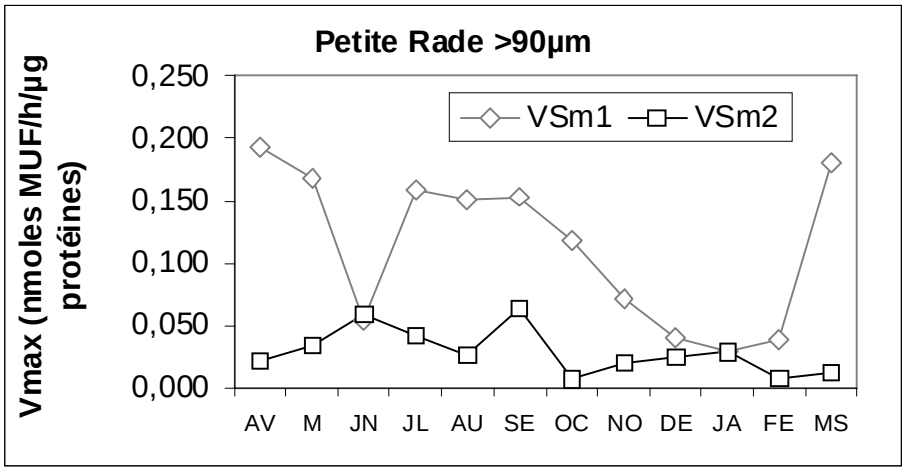

Figure 5 : évolution temporelle de l'activité spécifique à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction >90 µm, mesurée avec le MUF-P, dans la Petite Rade

Comme l'activité par litre, l'activité spécifique de la composante à faible affinité est généralement bien plus élevée que celle de l'activité à forte affinité, en particulier en avril, mai, de juillet à octobre ainsi qu'en mars (>0,150 nmoles MUF/h/µg). En revanche au cours

des mois d'hiver les activités spécifiques sont faibles et le niveau de l'activité à faible affinité se rapproche de celui de l'activé à forte affinité (Figure 5).

1.2 Activité de la fraction 50-90 µm

1.2.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

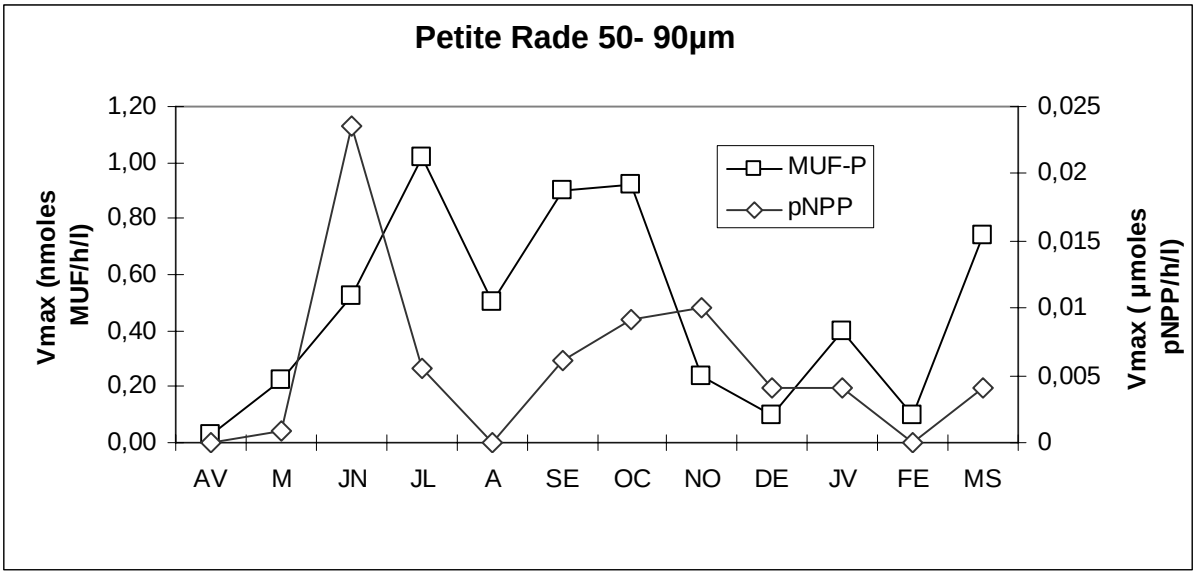

Figure 6 : évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 1,02 à 0,03 nmoles de MUF/h/l et de à µmoles pNP/h/l.
Avec le MUF-P (figure 6) les valeurs maximales n'excèdent pas 1,02 nmoles MUF/h/l en juillet. Avec le pNPP, les valeurs ne dépassent pas 0,023 µmoles pNP/h/l en juin. Les plus faibles activités se rencontrent au cours de l'hiver, en particulier en février pour les deux substrats, mais aussi en avril. En août l'activité mesurée avec le pNPP est particulièrement basse.

Activité spécifique

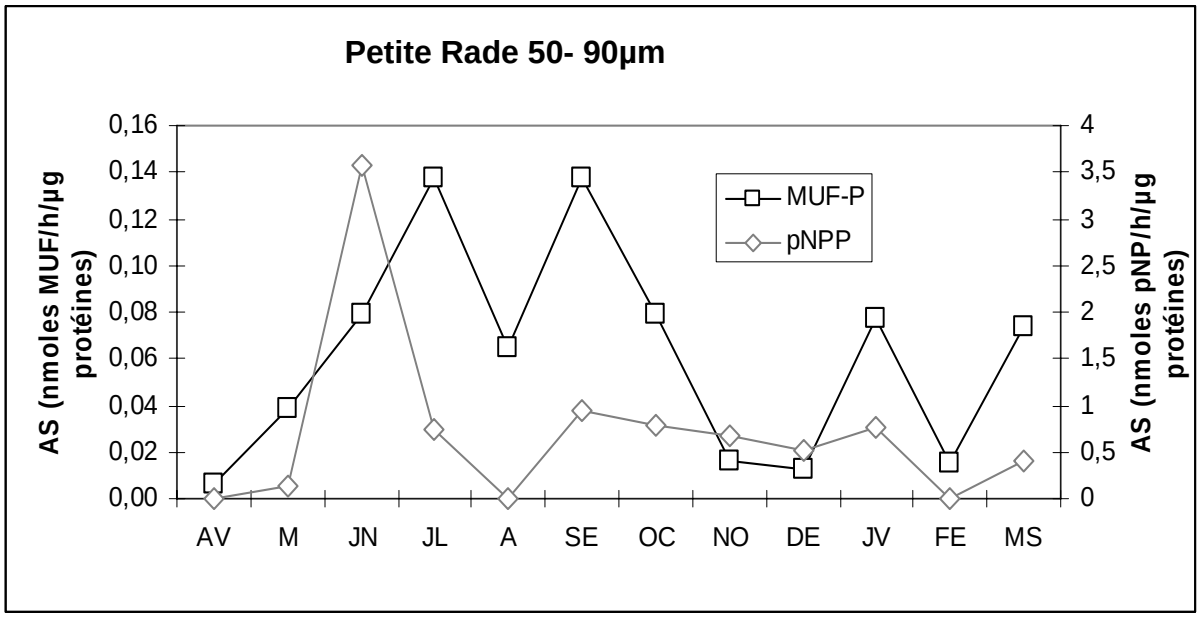

Figure 7 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 0,14 à 0,01 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 3,5 à 0 nmoles pNP/h/ µg protéines pour les deux substrats.

L'activité spécifique mesurée avec le MUF-P (figure 7) présente deux pics de mêmes niveaux en juillet et en septembre 2005 (0,13 nmoles MUF/h/µg) ainsi qu'un pic en janvier 2006 de moindre importance (0,08 nmoles MUF/h/µg).

Mesurée avec le pNPP, l'activité phosphatasique se caractérise par un pic très important en juin 2005 (3,5 nmoles PNP/h/µg). Puis l'activité baisse et se stabilise de septembre à janvier à des niveaux qui ne dépassent pas 0,8 nmoles PNP/h/µg. Elle diminue encore jusqu'à la fin du cycle.

La comparaison inter-substrat du profil annuel montre une évolution similaire des activités spécifiques, avec cependant un pic printanier plus précoce avec le pNPP et des différences entre les prélèvements plus marquées avec le MUF-P.

1.2.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Cette classe de taille présente des composantes à forte et faibles affinités. Le Km moyen de l'activité à forte affinité (Km2) est de 1,5 µM et celui de la composante à faible affinité (Km1) est de 15,5 µM (Tableau 2).

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	ND	13	13,7	9	4	6	16,5	15	1	90	1	1,5
Km2	ND	0,5	9,5	0,34	0,12	0,08	0,14	1,5	ND	ND	ND	0,18

Tableau 2 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 50-90 µm

Activité par litre

Ces activités sont faibles et les niveaux des composantes à forte et faible affinité sont assez comparables (Figure 8).

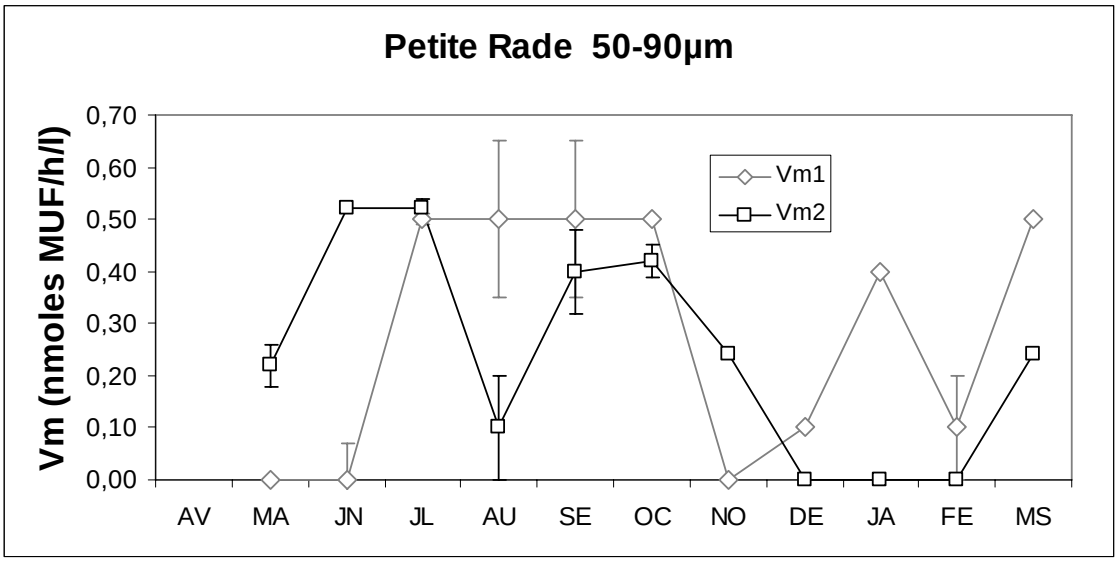

Figure 8 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

L'activité de la composante à faible affinité (Vm1), est plus élevée de juillet à octobre 2005 (0,5 nmoles MUF/h/l) mais également en janvier 2006 (0,5 nmoles MUF/h/l). L'activité à forte affinité (Vm2) augmente en juin, en juillet 2005 (0,52 nmoles MUF/h/l), en septembre-octobre 2005 (0,40 nmoles MUF/h/l) et en mars mais dans une moindre mesure.

Contribution respective des deux types d'activité

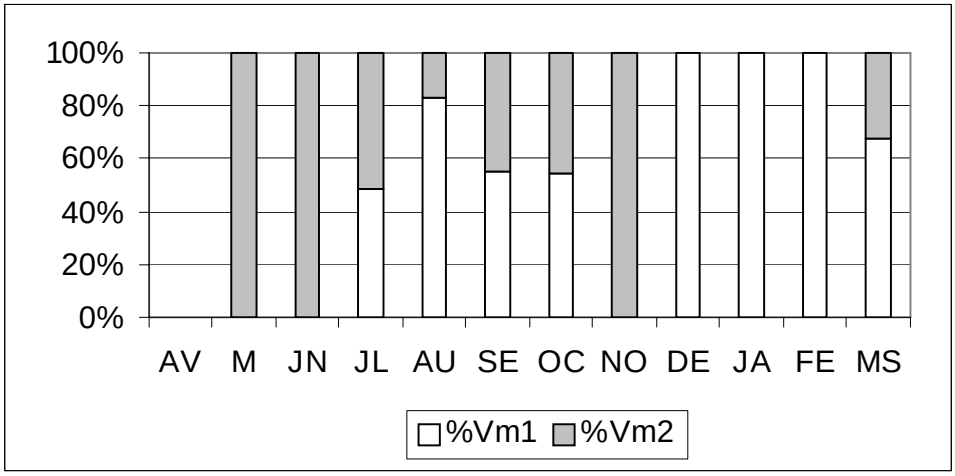

Figure 9 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 50-90 µm dans la Petite Rade

La contribution des deux types d'activité varie beaucoup d'un prélèvement à l'autre (figure 9). Aux périodes où les activités sont les plus fortes, c'est à dire de juillet à octobre l'activité provient surtout de la composante à faible affinité. Aux autres périodes c'est plutôt l'activité à forte affinité qui assure la plus grande partie de l'activité.

Activités spécifiques

Comme les activités par litre, le niveau des activités spécifiques est comparable pour les composantes à forte et faible affinité (Figure 10). Cette activité est en général plus élevée entre mai et octobre qu'entre novembre et février surtout en ce qui concerne l'activité à forte affinité (VSm2). Dans le cas de l'activité à faible affinité (VSm1) on retrouve un pic important en janvier 2006 (0,77 nmoles MUF/h/µg).

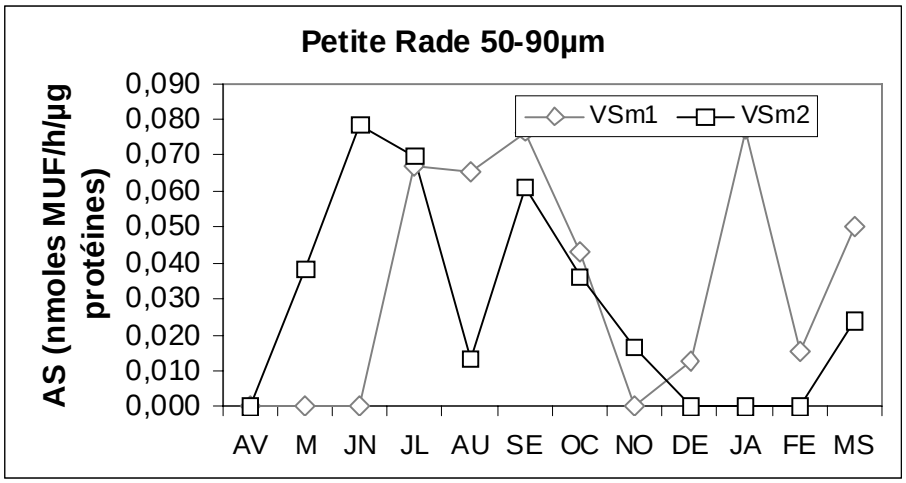

Figure 10: évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

1.3 Activité de la fraction 6-50 µm

1.3.1 Evolution des Vmax totales

Activités par litre d'eau de mer

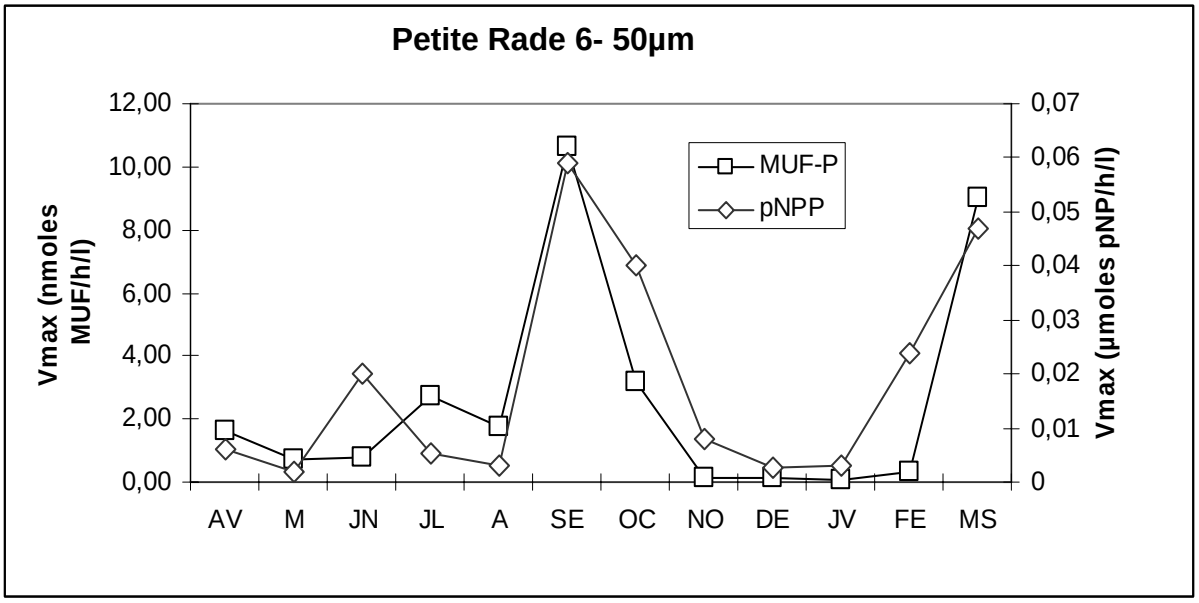

Figure 11 : évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 10,6 à 0,07 nmoles de MUF/h/l et de 0,059 à 0,002 µmoles pNP/h/l pour les deux substrats (Figure 11).

Avec le MUF-P (figure 11), l'activité est très élevée au mois de septembre 2005 (10,6 nmoles MUF/h/l) et au mois de mars 2006 (9 nmoles MUF/h/l). Pendant le reste de l'année elle n'excède pas 3,2 nmoles MUF/h/l (en juillet). En revanche cette activité est particulièrement basse de novembre à février.

Avec le pNPP (Figure 11), la plus forte activité a été enregistrée en septembre avec des valeurs proches de 0,06 µmoles pNP/h/l. En février et surtout en mars 2006, les niveaux d'activité sont également relativement élevés (0,024 et 0,047 µmoles pNP/h/l). Pendant le reste du temps, à l'exception du mois de juin, cette activité reste très faible.

L'évolution annuelle des activités est très semblable avec les deux substrats. Il est à noter toutefois que le pic printanier apparaît plus précocement avec le pNPP.

Activité spécifique

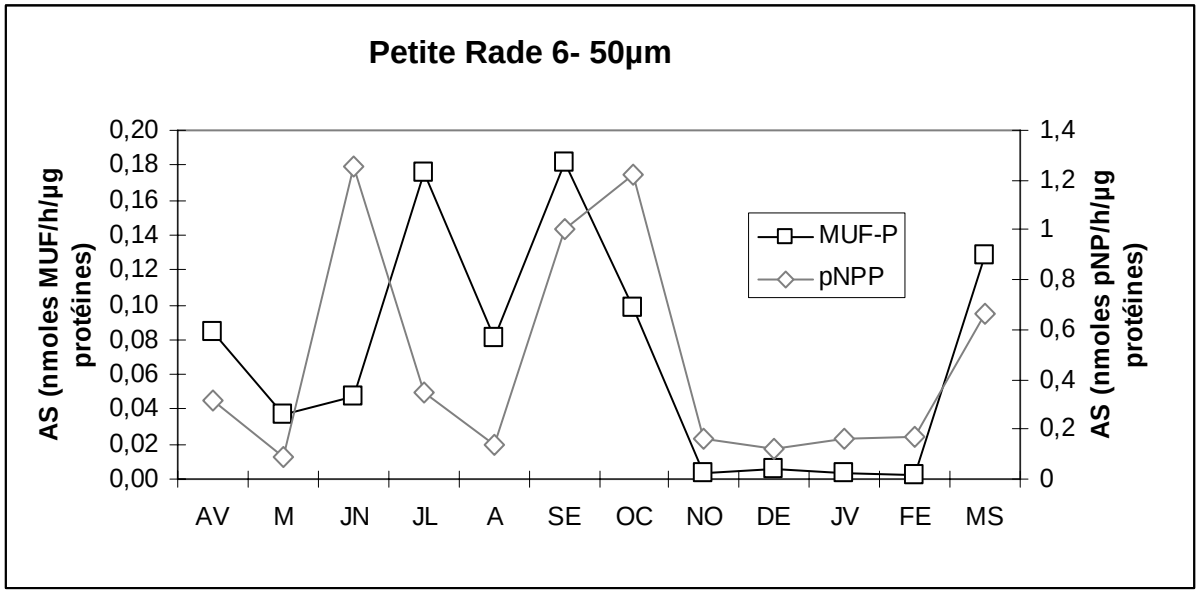

Figure 12 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 0,18 à 0 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 1,25 à 0,09 nmoles pNP/h/ µg protéines pour les deux substrats.

L'activité spécifique mesurée avec le MUF-P (figure 12) présente la même évolution que l'activité par litre, avec des valeurs plus élevées en juillet et septembre 2005 (0,18 nmoles MUF/h/µg) et des valeurs plus faibles entre novembre et février.

Avec le pNPP (Figure 12), des pics d'activité sont observés en juin (1,25 nmoles PNP/h/µg) puis en septembre-octobre (respectivement 0,9 et 1,2 nmoles PNP/h/µg). De novembre à février l'activité phosphatasique se maintient à un très faible niveau.

Les évolutions des activités sont donc assez comparables avec les deux substrats, bien que les maxima ne soient pas tout a fait synchrones.

1.3.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	0,5	1	9	0,5	0,5	0,5	0,5	3,2	0,5	3	3	ND
Km2	0,41	0,02	0,08	0,04	0,03	0,27	0,24	1,5	0,35	0	0	0,1

Tableau 3 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 6-50 µm

Des composantes à faible et forte affinité ont été mises en évidence dans cette classe de taille pour tous les prélèvements, à l'exception du mois de mars 2006 (Tableau 3).
Le Km moyen de l'activité à faible affinité est de 2,01 µM, celui de la composante à forte affinité est de 0,25 µM.

Activité par litre d'eau de mer

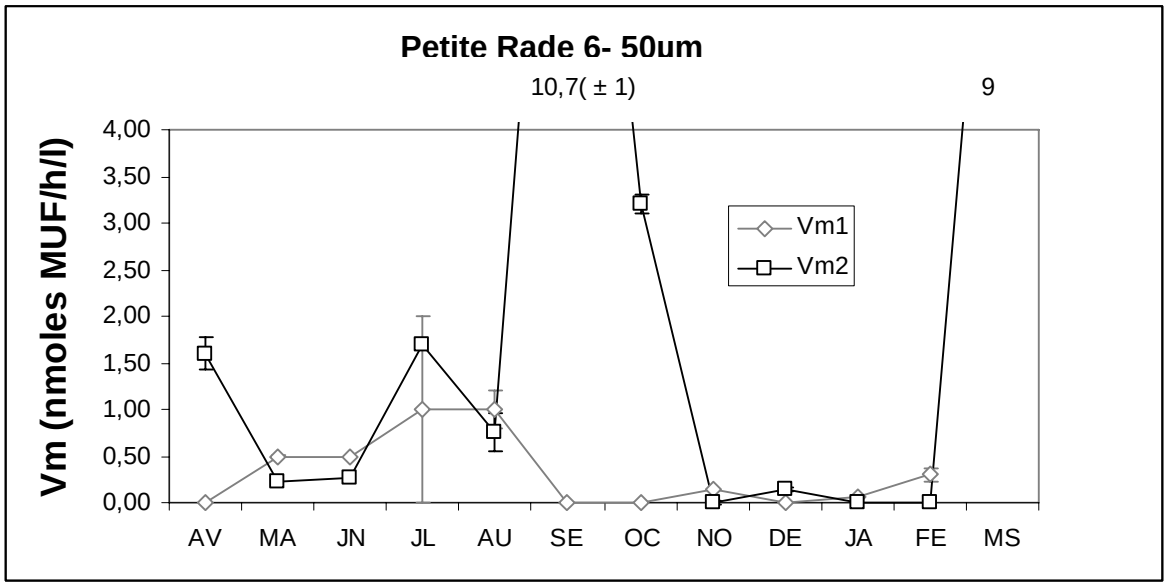

Figure 13 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

Pour cette fraction, comme pour la précédente, l'activité à forte affinité (Vm2) est souvent plus élevée que l'activité à faible affinité (Vm1) (figure 13). C'est plus particulièrement le cas en période de forte activité, notamment au mois d'octobre 2005 (3,2 nmoles MUF/h/l) ainsi qu'en mars 2006 (9 nmoles MUF/h/l), mais surtout en septembre (10,7 nmoles MUF/h/l). L'activité à faible affinité (Vm1) varie moins que la précédente au cours de l'année. Ses maxima ont été enregistrés en juillet et en août 2005 (1 nmoles MUF/h/l).
Les deux types d'activités présentent des niveaux particulièrement bas entre novembre et février.

Contribution respectives des deux types d'activité

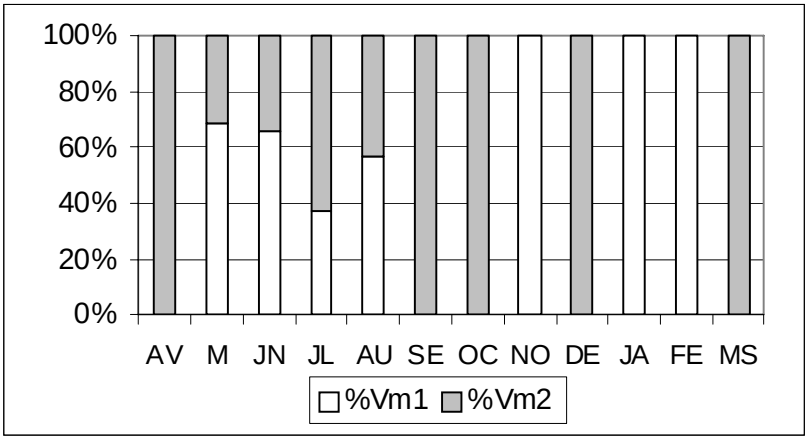

Figure 14 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 6-50 µm dans la Petite Rade

Sur l'ensemble de l'année la contribution de l'activité à forte affinité de cette classe est sensiblement plus élevée (52 %) que celle de l'activité à faible affinité (48 %) (Figure 14). La contribution de l'activité à forte affinité est surtout très importante aux périodes de forte activité en particulier en septembre, octobre et mars.

Activités spécifiques

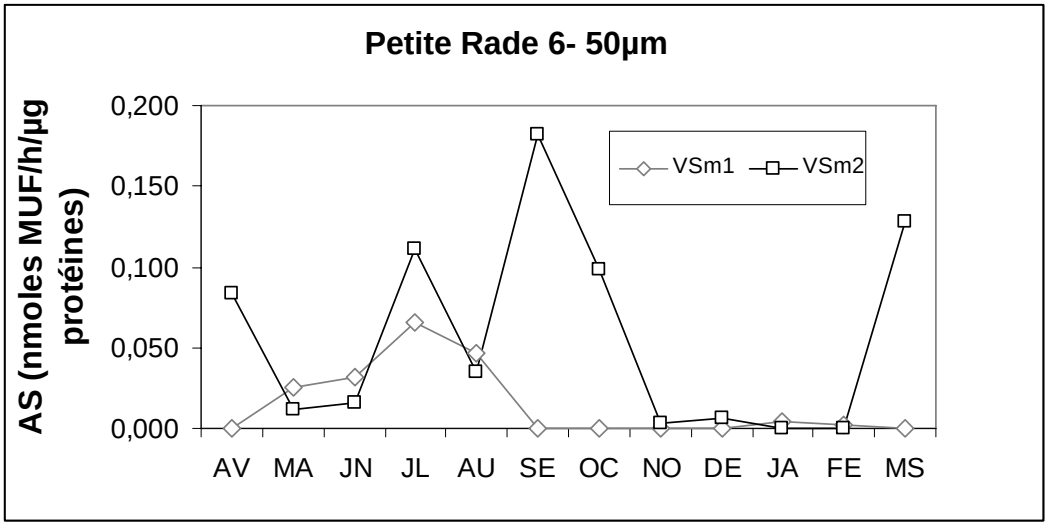

Figure 15: évolution temporelle de l'activité spécifique à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

Comme les activités par litre, les activités spécifiques des composantes à forte affinités sont souvent plus élevées que les activités à faible affinité (figure 15).

L'activité à faible affinité (VSm1) présente un pic en juillet (0,065 nmoles MUF/h/µg) Elle diminue ensuite et reste basse jusqu'à la fin du cycle.

L'activité à forte affinité (VSm2) présente des pics très marqués en juillet, en septembre (0,18 nmoles MUF/h/µg) et en mars 2006 (0,12 nmoles MUF/h/µg). En revanche, elle est très faible de novembre à février.

1.4 Activité de la fraction 1-6 µm

1.4.1 Evolution des Vmax totales

Activités par litre d'eau de mer

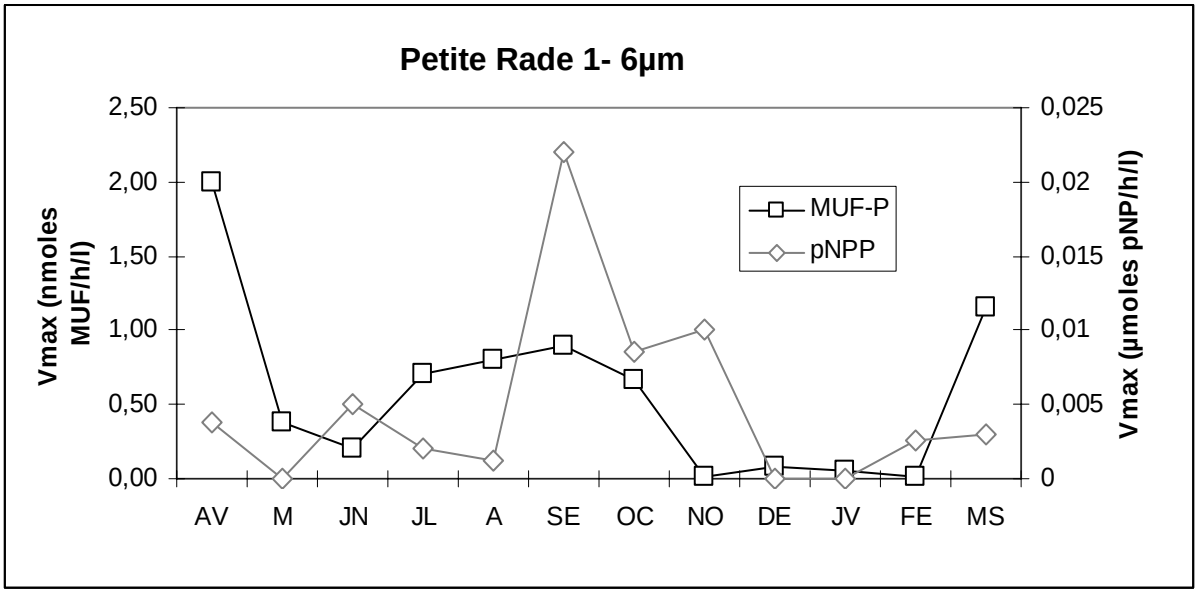

Figure 16 : évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 1-6 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 2 à 0,1 nmoles de MUF/h/l avec le MUF-P et de 0,02 à 0 µmoles pNP/h/l avec le pNPP.

Les activités mesurées avec le MUF-P comme avec le pNPP (figure 16), sont très faibles ; la valeur la plus élevée est enregistrée en avril 2005 avec le MUF (2 nmoles MUF/h/l) et en septembre avec le pNPP (0,022 µmoles pNP/h/l).

La comparaison de l'évolution annuelle entre les deux substrats est délicate, les deux profils étant assez différents. Toutefois avec les deux substrats, les activités les plus élevées correspondent à la période estivale et les plus faibles à la période hivernale.

Activité spécifique

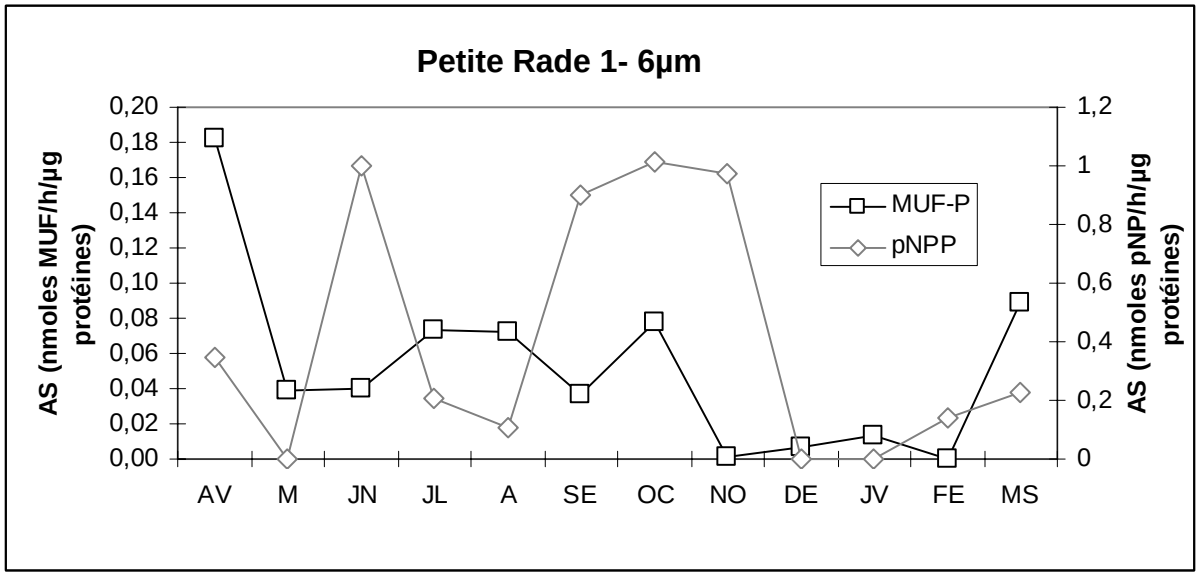

Figure 17 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction 1-6 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 0,18 à 0 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 1,01 à 0 nmoles pNP/h/ µg protéines.

L'activité spécifique de cette fraction est souvent très élevée (figure 17). Avec le MUF-P, le maximum est atteint en juillet, août et en octobre 2005 avec 0,08 nmoles MUF/h/µg. Les plus faibles activités ont été rencontrées en hiver, de novembre à février.

L'activité phosphatasique mesurée avec le pNPP (figure 17) suit sensiblement la même évolution. Son activité maximale se situe en octobre mais des niveaux élevés ont été enregistrés de septembre à novembre (1 nmoles PNP/h/µg), ainsi qu'en juin avec 1 nmoles PNP/h/µg. Comme avec le MUF-P, l'activité mesurée avec le pNPP est particulièrement faible au cours de certains mois d'hiver, en particulier en décembre et en janvier.

1.4.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	ND	3,5	0,5	0,5	0,5	0,5	7,5	ND	ND	ND	ND	0,5
Km2	0,01	0,03	0,1	0,07	0,08	0,05	0,26	ND	ND	ND	ND	0,08

Tableau 4 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 1-6 µm

Des activités à forte et faible affinités ont été retrouvées pour cette fraction (Tableau 4). Le Km moyen de l'activité à faible affinité est de 1,92 µM, celui de l'activité à forte affinité est de 0,08 µM.

Activité par litre d'eau de mer

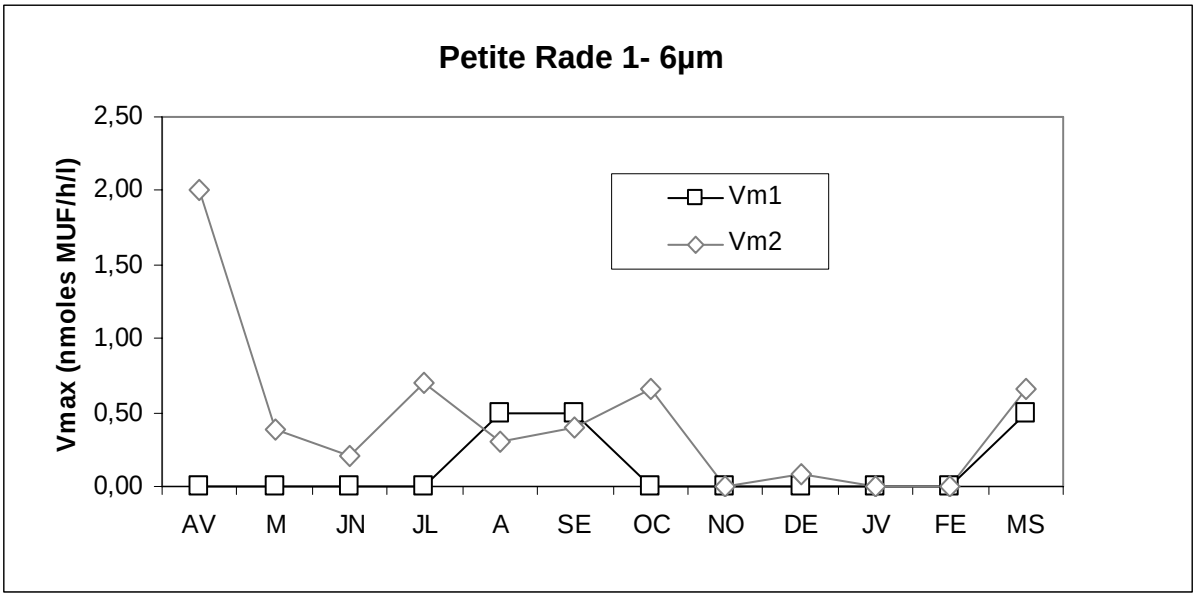

Figure 18 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 1-6 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

Comme pour la fraction de taille précédente, l'activité à forte affinité (Vm2) est généralement prépondérante (figure 18). C'est le cas au mois d'avril 2005 où son niveau est particulièrement fort (2 nmoles MUF/h/l), en juillet, en octobre et en mars 2006 (>0,65 nmoles MUF/h/l). En revanche de novembre à février l'activité de cette classe de taille est très basse.

Les activités à faible affinité (Vm1) sont la plupart du temps beaucoup plus faibles que celles des activités à forte affinité (Figure 18). Elles n'ont été détectées qu'en août, en septembre et en mars et sont alors comparables à celles de l'activité à forte affinité (0,5 nmoles MUF/h/l).

Contributions respectives des deux types d'activité

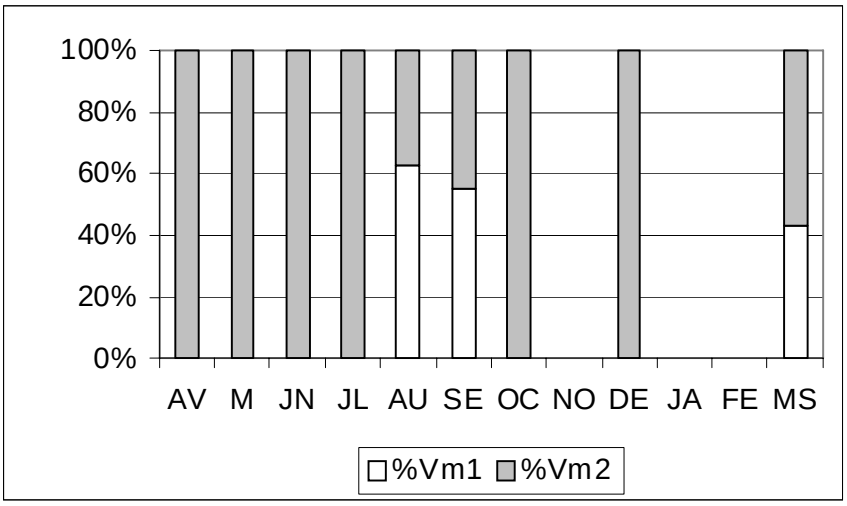

Figure 19 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 1-6 µm dans la Petite Rade

L'histogramme ci dessus (Figure 19) confirme qu'en dehors des mois d'août de septembre et de mars la totalité de l'activité de cette classe de taille provient de la composante à forte affinité.

Activités spécifiques

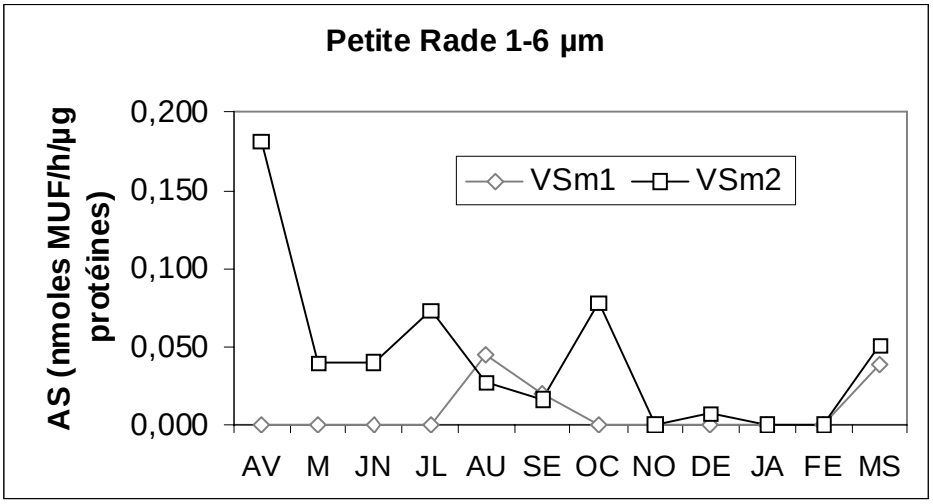

Figure 20: évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 1-6 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

L'activité spécifique de la composante à forte affinité est la plupart du temps beaucoup plus élevée que celle de l'activité à faible affinité. C'est le cas d'avril à octobre, période au cours de laquelle les activités phosphatasiques sont généralement fortes. En revanche au cours des

autres périodes, en particulier en hiver les activités spécifiques des deux composantes sont faibles (Figure 20).

1.5 Activité de la fraction 0,45-1 µm

1.5.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

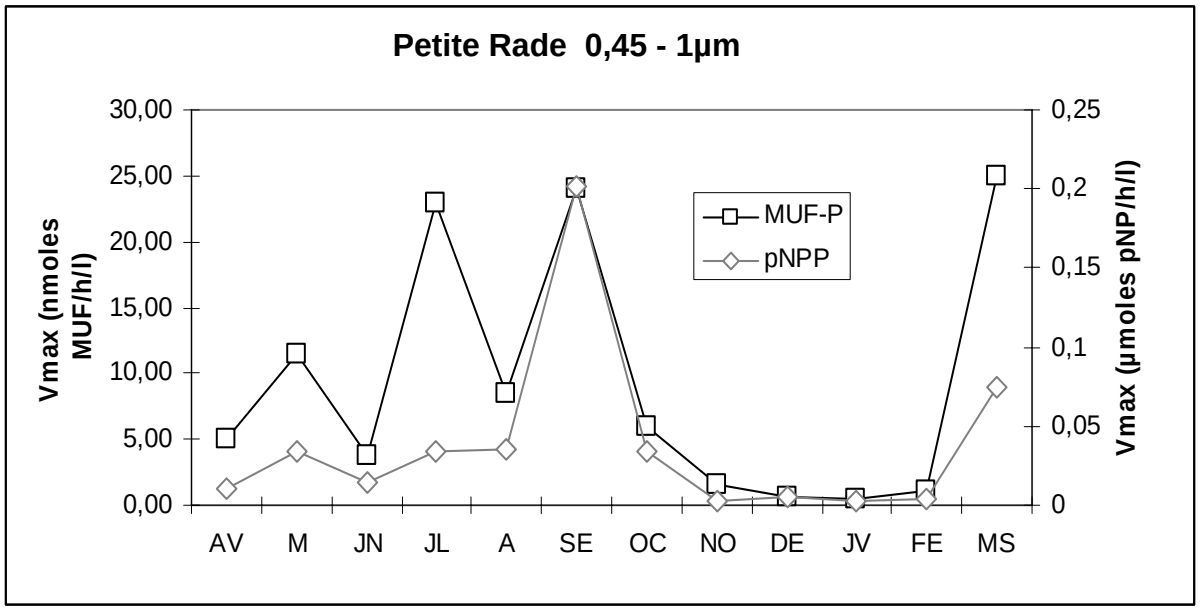

Figure 21: évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 25 à 0,4 nmoles de MUF/h/l et de 0,20 à 0,002 µmoles pNP/h/l.

L'évolution au cours de l'année de l'activité mesurée avec le MUF-P (figure 21) montre une forte variabilité avec des pics en mai, juillet, septembre 2005 et en mars 2006. La plus forte valeur est enregistrée au mois de mars avec 25 nmoles MUF/h/l. En revanche, la période allant de novembre à février est marquée par des activités très basses (<2 nmoles MUF/h/l).

Avec le pNPP (figure 21), un seul pic de forte activité a été observé : au mois de septembre avec 0,2 µmoles pNP/h/l. Aux autres périodes, les activités sont faibles en particulier entre novembre et février.

Activité spécifique

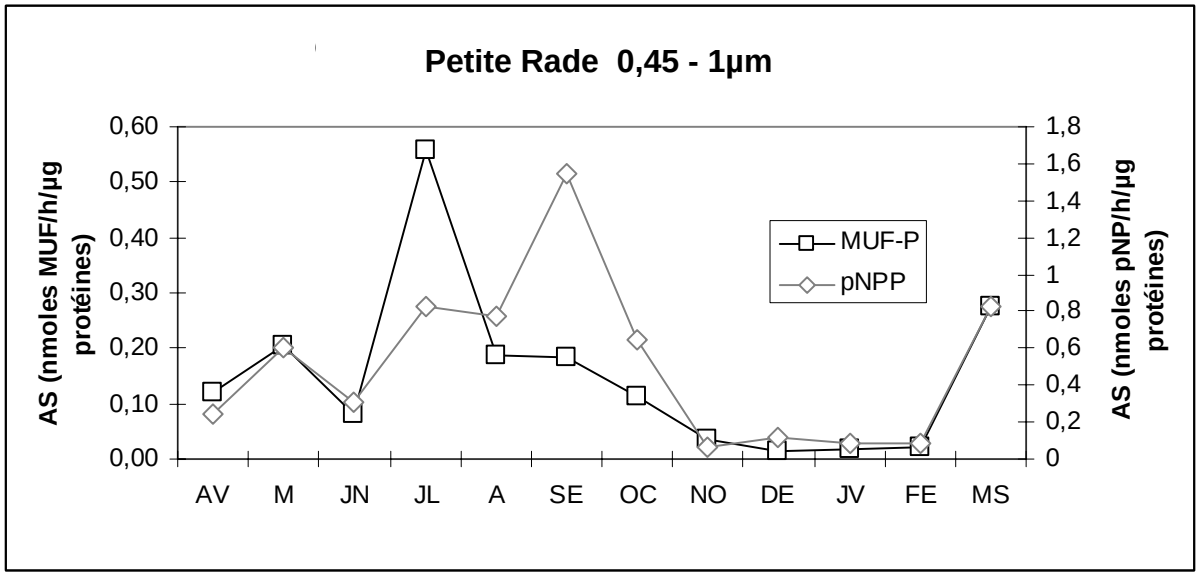

Figure 22 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Petite Rade

Les niveaux d'activités varient de 0,56 à 0,01 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 1,54 à 0,06 nmoles pNP/h/ µg protéines.

L'activité spécifique mesurée avec le MUF-P (figure 22) est particulièrement élevée en juillet (0,55 nmoles MUF/h/µg). La période hivernale présente les plus faibles niveaux d'activité.

L'activité spécifique mesurée avec le pNPP (Figure 22), augmente régulièrement jusqu'en septembre (1,5 nmoles PNP/h/µg) puis diminue pour atteindre de très faibles niveaux de novembre à février.

1.5.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Comme pour toutes les autres fractions, des activités à fortes et faible affinité ont été mises en évidence pour cette fraction (Tableau 5).

Le Km moyen de l'activité à faible affinité est de 3,31 µM, celui de la composante à forte affinité est de 0,17 µM.

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	0,5	9,5	ND	ND	0,5	0,5	3	10,5	1,5	3	3,6	0,5
Km2	0,06	0,21	0,04	0,12	0,02	0,1	0,1	0,92	0,04	ND	ND	0,09

Tableau 5 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 0,45-1 µm

Activité par litre d'eau de mer

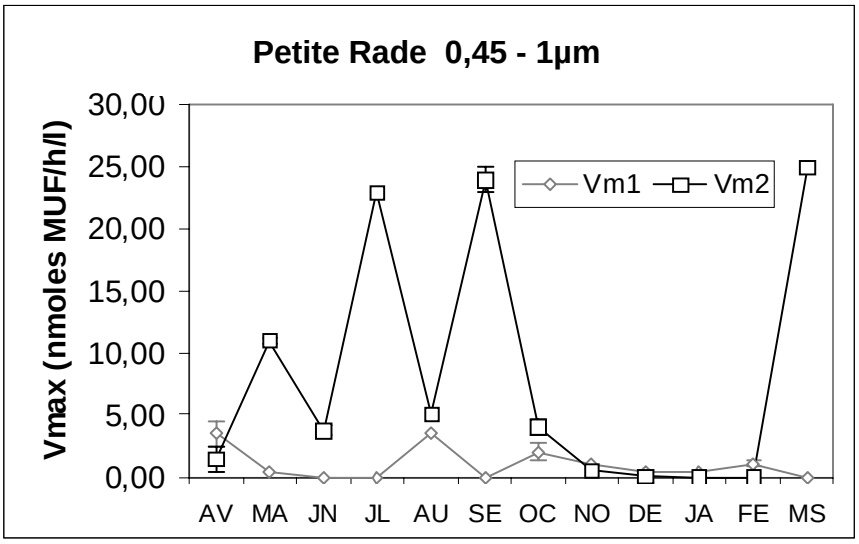

Figure 23 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

Pour cette dernière fraction, l'activité à forte affinité (Vm2) est souvent beaucoup plus élevée que l'activité à faible affinité (Vm1). C'est le cas en juillet (23 nmoles MUF/h/l) en septembre (24 nmoles MUF/h/l) et en mars (25 nmoles MUF/h/l). L'activité à faible affinité présente un pic en avril et en août (3,5 nmoles MUF/h/l). Les deux types d'activité ont des niveaux particulièrement bas entre novembre et février (Figure 23).

Contribution respective des deux types d'activité

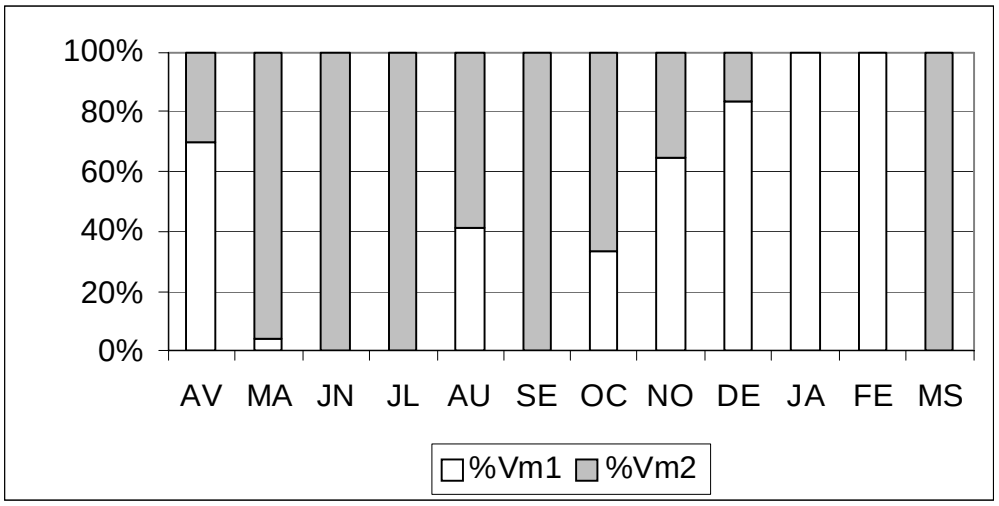

Figure 24 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 0,45-1 µm dans la Petite Rade

L'histogramme de la figure 24 confirme le rôle prépondérant de l'activité à forte affinité lors des périodes de forte activité phosphatasique. Ainsi en mai, juillet septembre et mars cette activité représente près de 100 % de l'activité totale. Aux périodes où l'activité phosphatasique est basse, la contribution de l'activité à faible affinité est souvent prépondérante. C'est le cas au cours des mois d'hiver

Activités spécifiques

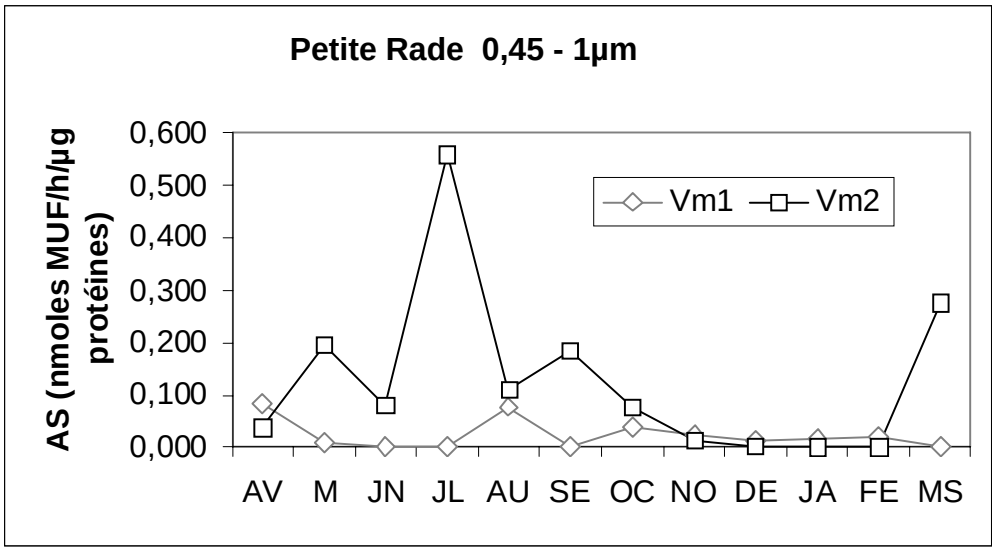

Figure 25 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade

Les activités spécifiques de la composante à forte affinité sont plus élevées que celles de la composante à faible affinité (figure 25). Elles sont particulièrement élevées entre mai et septembre avec un pic très marqué en juillet, ainsi qu'en mars, (0,55 nmoles MUF/h/µg). Entre novembre et février ces activités spécifiques sont très basses tout comme celles de l'activité à faible affinité.

1.6 Résumé pour le matériel particulaire broyé

1.6.1 Contributions des différentes classes de taille à la Vmax totale

Avec les deux substrats, deux classes de taille contribuent pour plus de 60 % à la Vmax totale : la classe de taille >90 µm et la classe 0,45 - 1 µm (Figure 26). Avec le MUF-P, la plus petite classe contribue pour 52 % à l'activité totale et la plus grande pour 26 %. Avec le pNPP, la contribution de la plus petite est de 29 % et celle de la plus grande est de 39 %.
Des trois autres classes, la fraction 6-50 µm est la plus importante : sa contribution est de 13 % avec MUF-P et de 19 % avec le pNPP.
Cette contribution varie toutefois beaucoup au cours de l'année comme le montrent les histogrammes suivants.

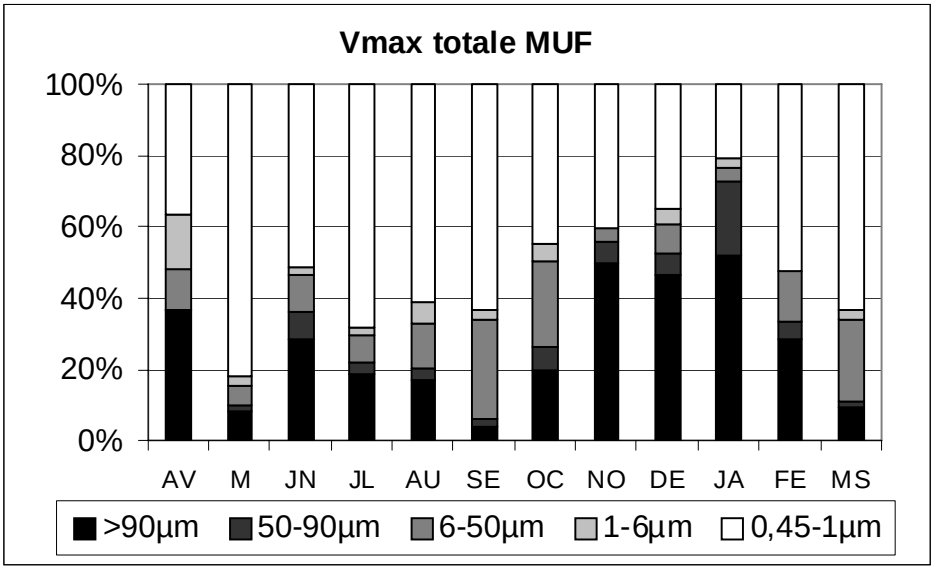

Figure 26 : contribution (en %) de chaque classe de taille à la Vmax totale mesurée avec le MUF-P, dans la Petite Rade

Avec le MUF-P la figure 26 montre que les fortes activités de juillet, de septembre et de mars (figure 11 page 117) sont dues à une forte contribution de la plus petite classe de taille, qui dépasse 60 %. Par ailleurs, la contribution de cette classe diminue nettement en période de faibles activités phosphatasiques comme c'est le cas entre les mois de novembre et de février. En contrepartie celle de la plus grande classe augmente.

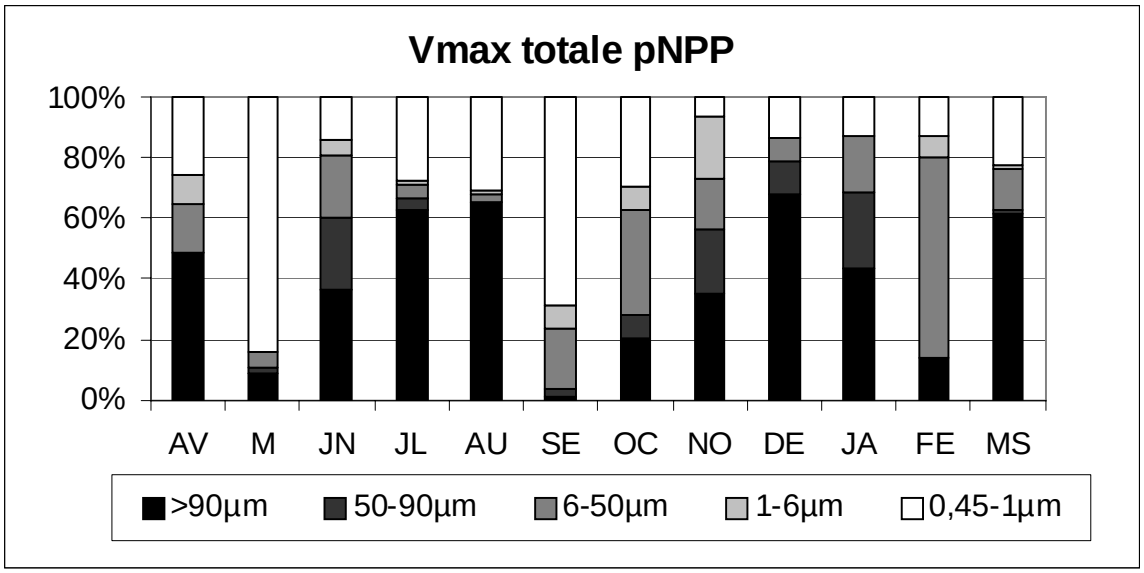

Figure 27 : contribution (en %) de chaque classe de taille à la Vmax totale mesurée avec le pNPP, dans la Petite Rade

Avec le pNPP la figure 27 montre que les fortes activités particulaires de septembre (figure 11 page 107) proviennent surtout de l'activité de la plus petite classe de taille dont la contribution dépasse 60 %. En mars, période de forte activité particulaire, la plus grande classe est responsable de près de 80 % de l'activité totale. Aux périodes de faibles activités, c'est à dire entre octobre et février, la contribution de la plus petite classe de taille tend à diminuer alors que celle des autres classes augmente de manière plus uniforme qu'avec le MUF-P.

1.6.2 Contribution des différentes classes de taille à l'activité à faible affinité (Vm1)

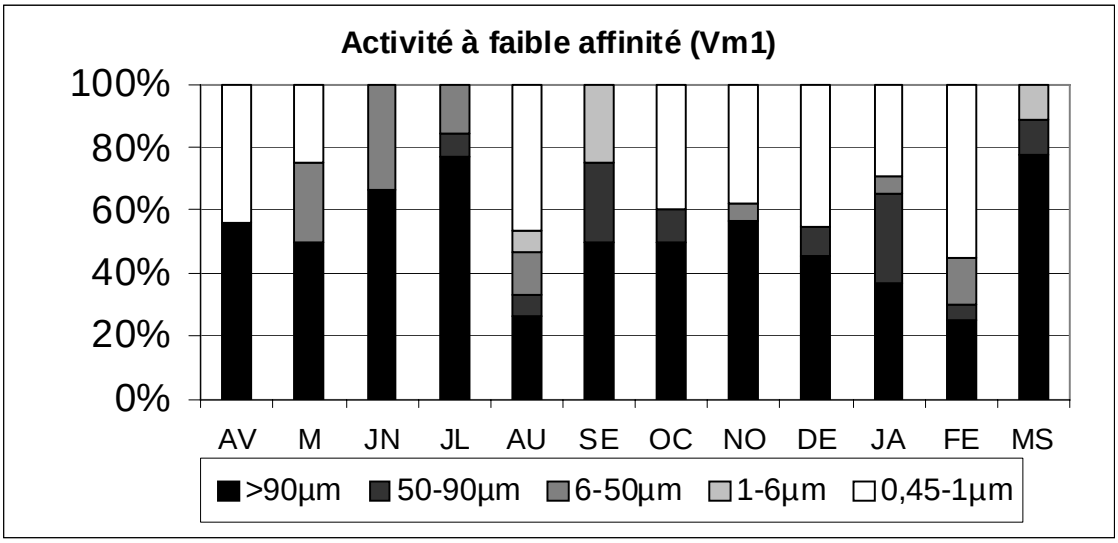

Figure 28 : contribution (en %) de chaque classe de taille à l'activité particulaire à faible affinité (Vm1) mesurée avec le MUF-P, dans la Petite Rade

Deux classes de taille contribuent de façon prépondérante à l'activité à faible affinité. Il s'agit tout d'abord de la classe >90 µm. Sur l'ensemble de l'année, elle contribue en moyenne pour plus de 51 % à l'activité de l'ensemble des classes de taille. Son rôle est particulièrement important en juin et juillet et mars où sa contribution dépasse 70 % (figure 28). En août, janvier et février elle ne dépasse pas 30 %.

La deuxième classe dont la contribution à l'activité à faible affinité est notable, est celle dont la taille varie de 0,45 à 1 µm. Sur l'ensemble de l'année sa contribution est voisine de 27 %. En avril, août, décembre et février elle dépasse même 40 %.

La contribution des autres classes varie beaucoup d'un prélèvement à l'autre. On notera l'importance de la classe 6-50 µm en mai juin et juillet et celle de la classe 1-6 µm en octobre. Ces données indiquent que l'activité phosphatasique intracellulaire serait surtout présente dans le matériel particulaire de la plus grande classe de taille, notamment entre avril et juillet. Une faible activité intracellulaire serait également présente dans le matériel de la plus petite classe.

1.6.3 Contribution des différentes classes de taille à l'activité à forte affinité (Vm2)

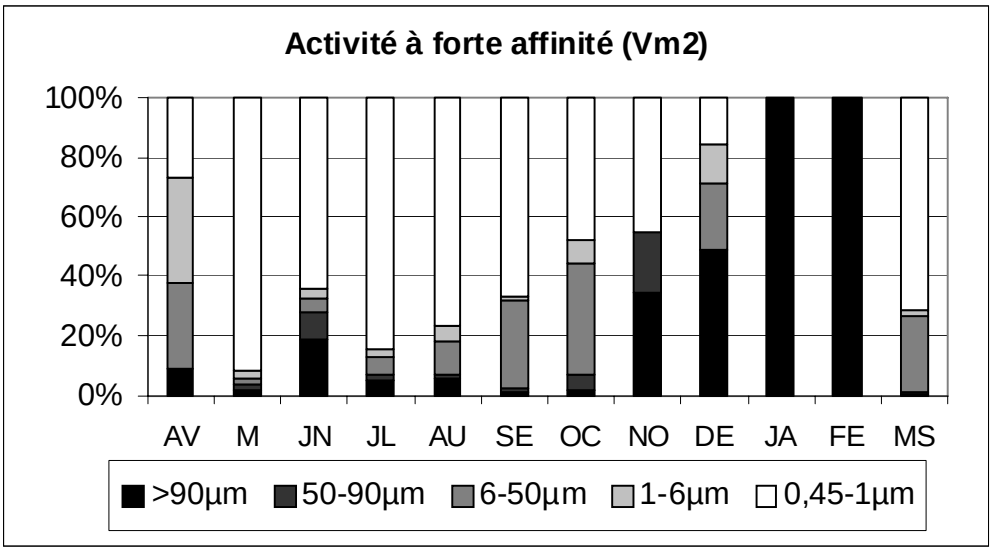

Figure 29 : contribution (en %) de chaque classe de taille à l'activité particulaire à forte affinité (Vm2) mesurée avec le MUF-P, dans la Petite Rade

La contribution principale à l'activité à forte affinité est celle de la plus petite classe de taille. Sur l'ensemble de l'année sa contribution dépasse 49 %. Elle est élevée en mai juin juillet septembre et mars (figure 29), périodes où l'activité phosphatasique est généralement élevée (figure 11 page 117). La plus grande classe de taille (>90 µm) contribue également beaucoup à cette activité puisque sa part moyenne annuelle est voisine de 27 %. Sa contribution est

particulièrement élevée de novembre à février, période où l'activité phosphatasique est généralement basse (figure 11 page 117). La troisième fraction est la classe 6-50 µm. Sur l'ensemble de l'année sa contribution moyenne est de 14 %. Elle est surtout importante en avril septembre octobre et mars.

Ces données indiquent que l'activité phosphatasique exoenzymatique serait surtout présente au niveau de la plus petite classe de taille, particulièrement entre mars et octobre, période de forte activité. Mais ces activités exoenzymatiques seraient également présentes dans les autres fractions bien qu'en moindres proportions.

1.6.4 Comparaison des Vmax spécifiques des différentes classes de taille

Nous avons rassemblé dans les figures suivantes, les activités spécifiques des différentes classes de taille déjà présentées individuellement, afin de faciliter leur comparaison.

Les activités spécifiques mesurées avec le MUF-P (figure 30), sont plus élevées pour les classes de taille >90 µm et 0,45-1 µm (respectivement 0,14 nmoles MUF/h/µg et 0,15 nmoles MUF/h/µg). Pour les autres fractions, les niveaux sont assez voisins (0,06 nmoles MUF/h/µg pour 50-90 µm, 0,07 nmoles MUF/h/µg pour 6-50 µm et 0,05 nmoles MUF/h/µg pour 1-6 µm).

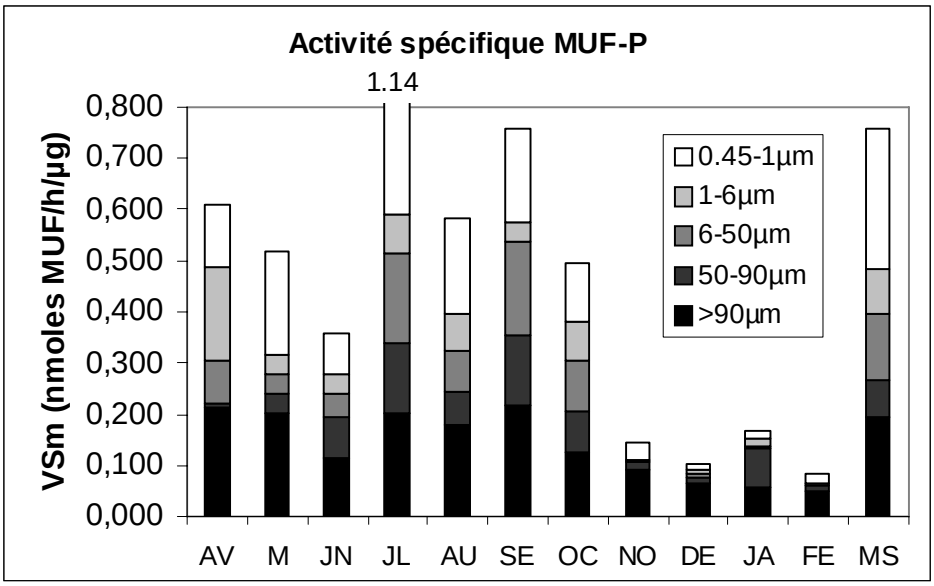

Figure 30 : Valeurs empilées de l'activité spécifique mesurée avec le MUF-P pour chaque classe de taille dans la Petite Rade

Avec le pNPP (figure 31), l'activité spécifique la plus forte est celle de la plus grande classe de taille (2,27 nmoles PNP/h/µg). Elle est particulièrement élevée en août (5,58 nmoles

PNP/h/µg) et surtout en mars (10,6 nmoles PNP/h/µg). L'activité des autres classes est assez voisine avec des valeurs annuelles de 0,71 nmoles PNP/h/µg pour la classe 50-90 µm, 0,47 nmoles PNP/h/µg pour la classe 6-50 µm, 0,41 nmoles PNP/h/µg pour la classe 1-6 µm et 0,51 nmoles PNP/h/µg pour la classe 0,45-1 µm.

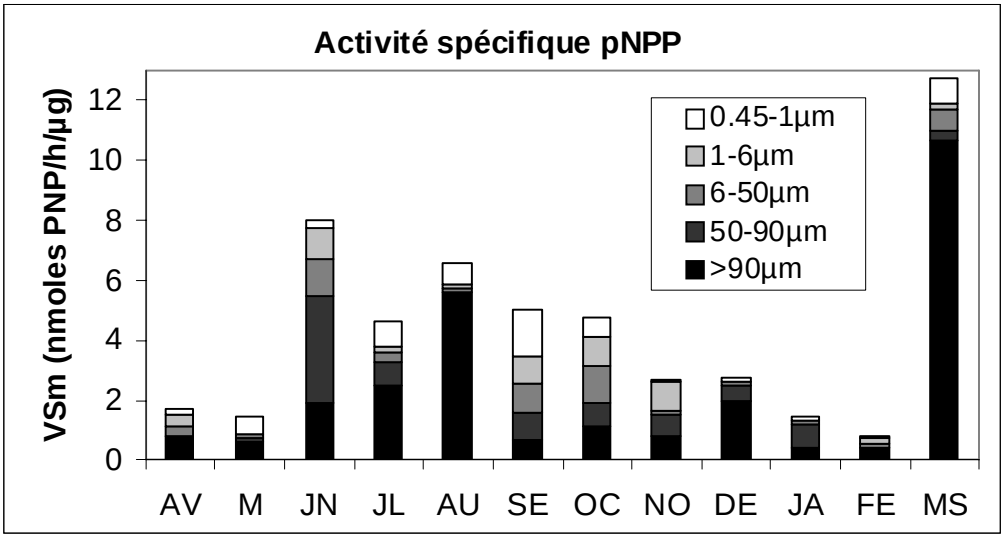

Figure 31 : valeurs empilées de l'activité spécifique mesurée avec le pNPP pour chaque classe de taille dans la Petite Rade

1.6.5 Comparaison des activités spécifiques à faible affinité des différentes classes de taille

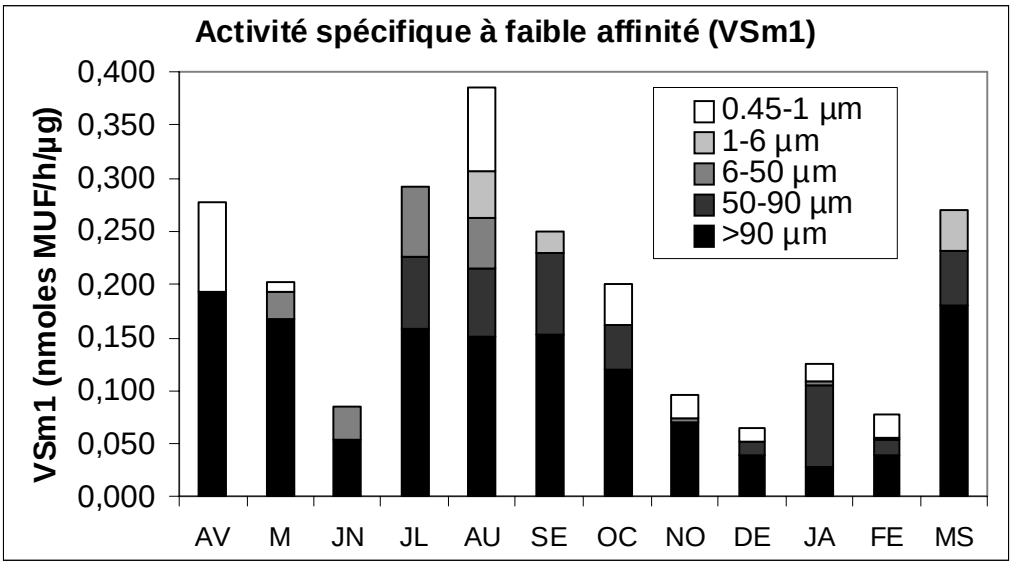

Figure 32 : valeurs empilées de l'activité spécifique à faible affinité (VSm1) pour chaque classe de taille, dans la Petite Rade

L'activité spécifique à faible affinité de la classe > 90 µm est généralement plus élevée que celles des autres classes, à l'exception de janvier. Elle est particulièrement forte entre mars et octobre (Figure 32).

1.6.6 Comparaison des activités spécifiques à forte affinité des différentes classes de taille

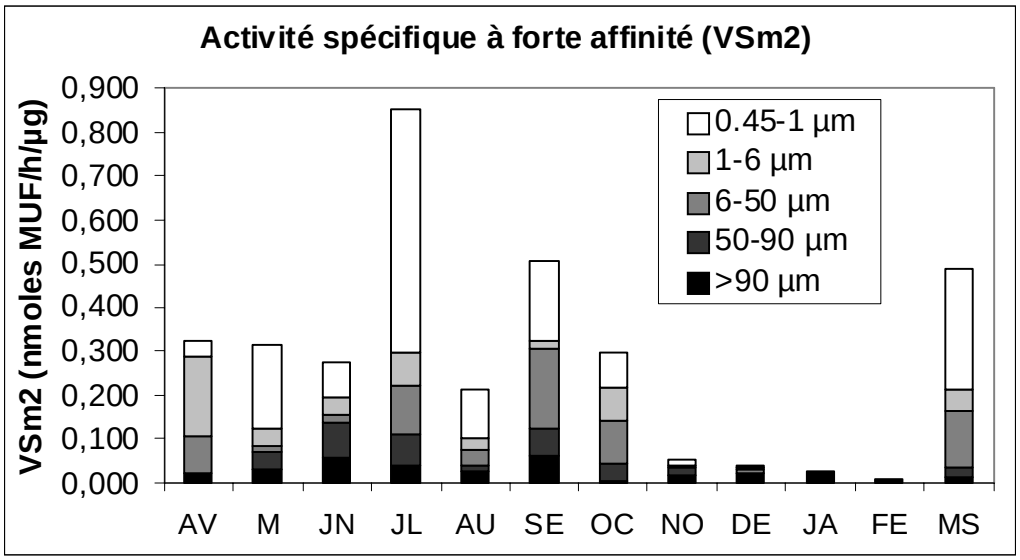

Figure 33 : valeurs empilées de l'activité spécifique à forte affinité (VSm2) pour chaque classe de taille dans la Petite Rade

L'activité spécifique à forte affinité de la plus petite classe de taille est beaucoup plus élevée que celle des autres classes, en particulier en mai juillet et mars. Des valeurs relativement élevées ont été relevées temporairement pour les classes 6-50 µm. Les activités les plus basses concernent les deux plus grandes classes de taille : >90 µm et 50-90 µm. Enfin les activités de toutes les fractions sont particulièrement basses entre novembre et février (Figure 33).

2. Activités du matériel particulaire intact

Une partie des échantillons d'eau de mer a été tout d'abord concentrée par filtration inverse sur des filtres de 90 µm. D'autres échantillons d'eau sont concentrés sur des membranes de 6 µm, de 1 µm. Un échantillon d'eau est également filtré sur des membranes de 0,45 µm pour la mesure de l'activité dissoute. Les mesures d'activité phosphatasique sont ensuite pratiquées sur chaque échantillon concentré ainsi que sur l'eau non filtrée (voir matériel et méthodes). Les mesures ont été effectuées en utilisant le pNPP comme seul substrat.

2.1 Contribution des différentes classes de taille

Les données de la figure 1 concernent la contribution des différentes classes de taille (>90 µm, 6-90 µm, 1-6 µm et >1) à l'activité phosphatasique particulaire exoenzymatique. Elles

soulignent le rôle prépondérant de la plus petite classe dont la contribution dépasse le plus souvent 60 % dans les deux sites (Figure 34).

Elles confirment le rôle des classes de taille intermédiaires dont la contribution fluctue beaucoup d'une période à l'autre avec des moyennes comprises entre 6 et 15 %.

Ces résultats confirment enfin la présence d'une activité phosphatasique exoenzymatique pour la plus grande classe de taille. Sa contribution moyenne est de l'ordre de 10 % mais elle peut atteindre ou dépasser 20 % notamment en mars, juillet et décembre.

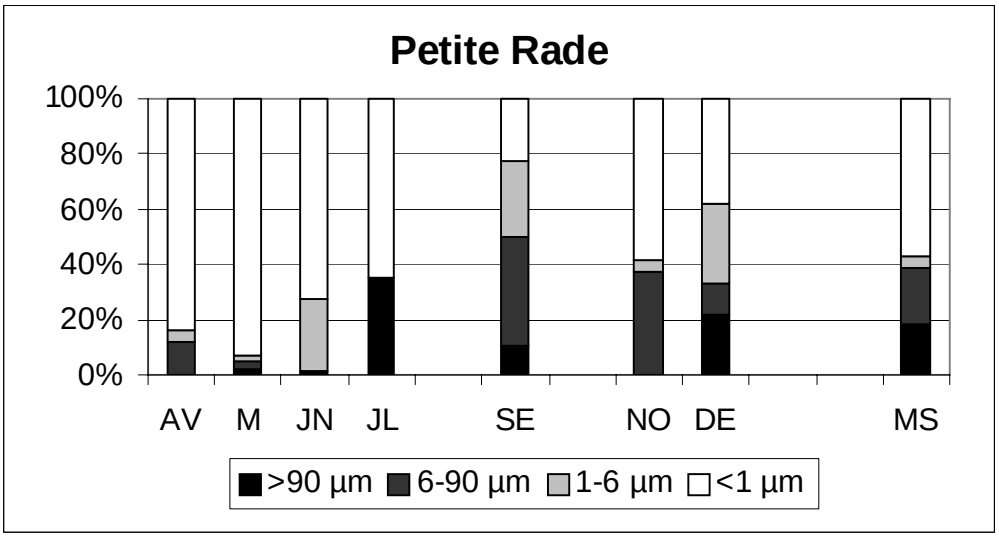

Figure 34: contribution (en %) au cours d'un cycle annuel des différentes fractions particulaires à l'activité exoenzymatique dans la Petite Rade

2.2 Activité de la classe de taille >90

L'activité de cette classe est surtout conséquente en juillet, en août et en mars (Figure 35).

Cette activité exoenzymatique a été rapprochée de celle mesurée sur du matériel particulaire broyé présentée plus haut. L'activité du matériel broyé présente la même évolution que l'activité exoenzymatique mais ses niveaux sont beaucoup plus élevés que ceux du matériel intact, notamment entre juin et septembre ainsi qu'en mars 2006 (Figure 35). Ces résultats indiquent qu'à ces périodes, l'activité intracellulaire de cette classe de taille est beaucoup plus élevée que l'activité exoenzymatique.

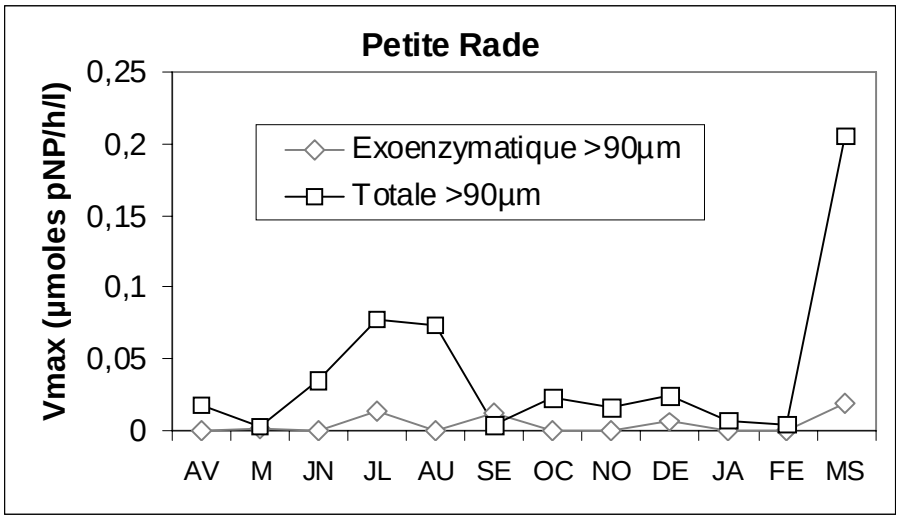

Figure 35: comparaison de l'activité exoenzymatique et de l'activité totale pour la fraction >90 µm dans la Petite Rade

2.3 Activité de la classe de taille 6-90 µm

Dans la Petite Rade, l'activité exoenzymatique de cette classe est dans l'ensemble plus élevée que celle de la classe précédente. Elle présente des niveaux élevés en septembre, en mars et en avril (Figure 36).

Comme pour la classe précédente nous avons comparé cette activité à celle du matériel particulaire broyé mesurée dans les mêmes conditions (Figure 36). Sur l'ensemble de l'année l'activité du matériel broyé est plus élevée que celle du matériel intact, ce qui indique que cette fraction comme la fraction précédente est le siège d'une activité phosphatasique intracellulaire. Mais, à l'exception du mois de juin, les différences entre les deux types d'activité sont moins prononcées que pour la fraction précédente.

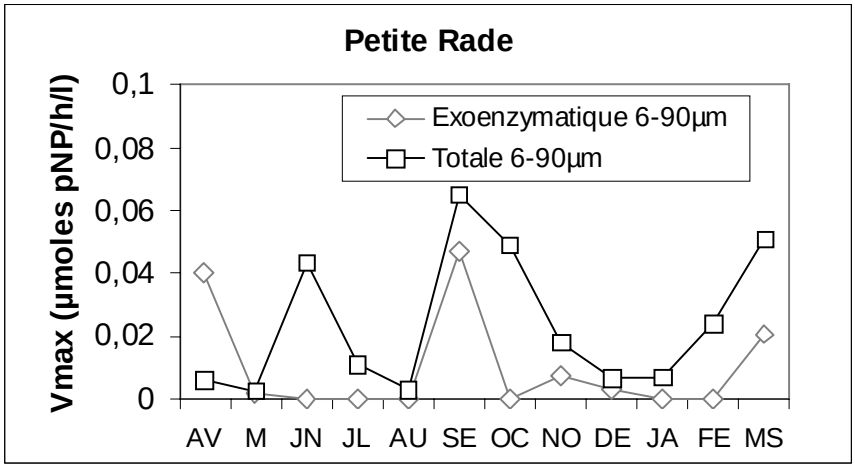

Figure 36: comparaison de l'activité exoenzymatique et de l'activité totale pour la fraction 6-90 µm dans la Petite Rade

2.4 Activité de la classe de taille 1-6 µm

Dans la Petite Rade, l'activité de cette classe est surtout conséquente en septembre (Figure 37). Contrairement à ce qui a été observé pour les autres classes, cette activité varie peu lorsque le matériel particulaire est broyé. Ces données montrent que l'activité intracellulaire de cette classe est négligeable.

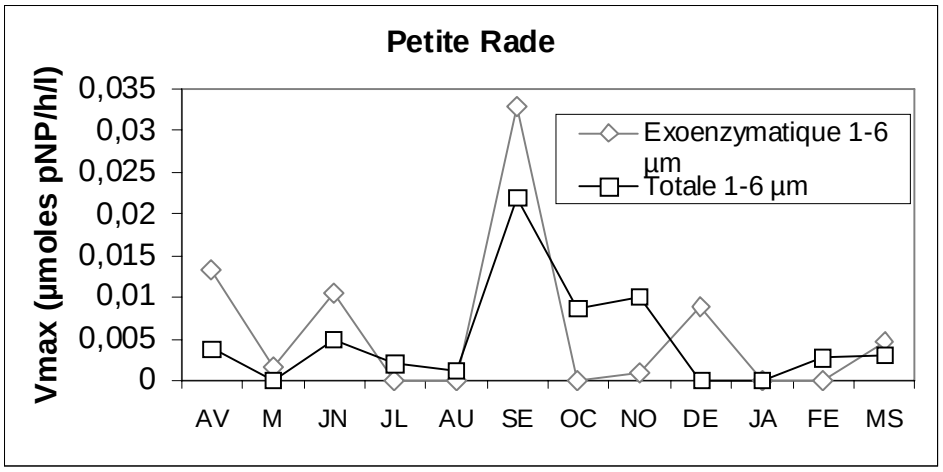

Figure 37: comparaison de l'activité exoenzymatique et de l'activité totale pour la fraction 1-6 µm dans la Petite Rade

2.5 Activité de la classe de taille <1 µm

L'activité exoenzymatique de cette classe s'élève fortement en septembre et en mars, dans la Petite Rade (figure 38). Les activités phosphatasiques augmentent plus fortement encore lorsque le matériel particulaire est broyé. Ces résultats témoignent de la présence d'une forte activité en septembre dans les deux sites et en mars dans la Grande Rade. En septembre l'activité phosphatasique semble surtout intracellulaire, alors qu'en mars elle est essentiellement exoenzymatique.

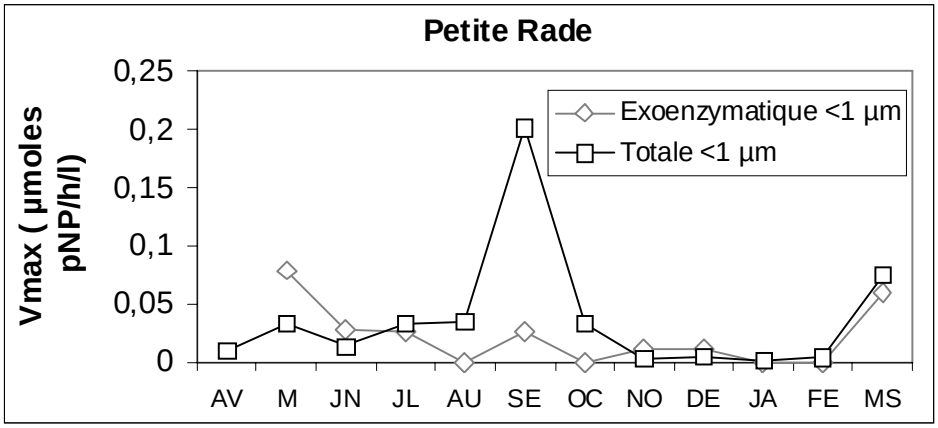

Figure 38: comparaison de l'activité exoenzymatique et de l'activité totale pour la fraction <1 µm dans la Petite Rade

2.6 Résumé pour le matériel particulaire intact

L'étude de l'activité du matériel particulaire intact a permis de préciser la contribution de différentes classes de taille dans l'activité exoenzymatique.

La contribution la plus importante provient de la classe de taille <1 µm dont l'activité représente en moyenne plus de 60 % de l'activité particulaire totale.

L'activité exoenzymatique de la fraction >90 µm culmine en juillet et en mars ; celle des classes de taille 6-90 µm et 1-6 µm est élevée en septembre et en mars.

La comparaison des activités mesurées sur le matériel broyé et intact a permis de confirmer que :

- la classe de taille >90 µm est le siège d'une activité intracellulaire plus élevée que l'activité exoenzymatique. Cette activité intracellulaire culmine entre mai et juillet.
- la classe <1 µm est également le siège d'une activité intracellulaire qui culmine en septembre.

Chapitre IV, Partie II : Activités phosphatasiques particulaires de la Grande Rade

1. Matériel particulaire broyé 160
1.1 Activité de la fraction >90 µm 160
1.1.1 Evolution des Vmax totales 160
Activité par litre d'eau de mer 160
Activité spécifique 161
1.1.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 161
Activités par litre d'eau de mer 162
Contribution respective des deux types d'activité 162
Activités spécifiques 163
1.2 Activité de la fraction 50-90 µm 164
1.2.1 Evolution des Vmax totales 164
Activité par litre d'eau de mer 164
Activité spécifique 165
1.2.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 165
Activités par litre 166
Contribution respective des deux types d'activité 166
Activités spécifiques 167
1.3 Activité de la fraction 6-50 µm 168
1.3.1 Evolution des Vmax totales 168
Activité par litre d'eau de mer 168
Activité spécifique 169
1.3.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 170
Activités par litre 170
Contribution respective des deux types d'activité 171
Activités spécifiques 171
1.4 Activité de la fraction 1-6 µm 172
1.4.1 Evolution des Vmax totales 172
Activité par litre d'eau de mer 172
Activité spécifique 173
1.4.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 173
Activité par litre 174
Contribution respective des deux types d'activité 174
Activités spécifiques 175
1.5 Activité de la fraction 0,45-1 µm 176
1.5.1 Evolution des Vmax totales 176
Activité par litre d'eau de mer 176
Activité spécifique 177
1.5.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités 177
Activité par litre 178
Contribution respective des deux types d'activité 178
Activités spécifiques 179
1.6 Résumé pour le matériel particulaire broyé 179
1.6.1 Contribution des classes de taille à la Vmax totale 179
1.6.2 Contribution des différentes classes de taille à l'activité à faible affinité (Vm1) 181
1.6.3 Contribution des différentes classes de taille à l'activité à forte affinité (Vm2) 182
1.6.4 Contribution des classes de taille à la Vmax spécifique totale 182
1.6.5 Contribution des classes de taille à l'activité spécifique à faible affinité 184
1.6.6 Contribution des classes de taille à l'activité spécifique à forte affinité 184
2 Matériel particulaire intact 185
2.1 Contribution des différentes classes de taille 185
2.2 Activité de la classe de taille >90 µm 185
2.3 Activité de la classe de taille 6-90 µm 186
2.4 Activité de la classe de taille 1-6 µm 186
2.5 Activité de la classe de taille <1 µm 187
2.6 Résumé pour le matériel particulaire intact 187

1. Activités du matériel particulaire broyé

1.1 Activité de la fraction >90 µm

1.1.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

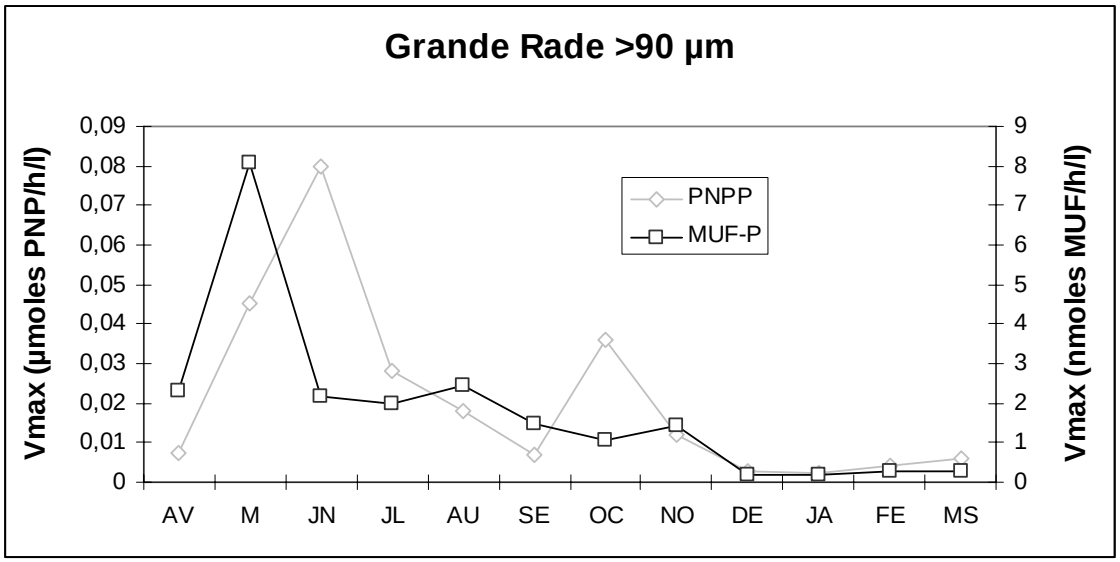

Figure 1: évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction >90 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les niveaux d'activités varient de 8,10 à 0,02 nmoles de MUF/h/l avec le MUF-P et de 0,08 à 0,0025 µmoles pNP/h/l avec le pNPP (figure 1).

L'évolution des activités phosphatasiques est dans l'ensemble assez voisine avec le MUF-P et le pNPP. Avec le MUF-P, un fort niveau d'activité a été observé en mai 2005 (8,1 nmoles MUF/h/l). En dehors de cette période, les activités sont basses avec des valeurs généralement inférieures à 2,5 nmoles MUF/h/l. Avec le pNPP, l'activité phosphatasique a beaucoup augmenté en juin 2005 avec 0,08 µmoles pNP/h/l et en octobre avec 0,035 µmoles pNP/h/l. Les activités de la Grande Rade sont en général plus basses que celle de la Petite Rade lorsqu'elles sont rapportées au volume d'eau de mer. La moyenne annuelle dans la Grande Rade est en effet de 0,02 µmoles pNP/h/l et de 1,83 nmoles MUF/h/l contre 0,041 µmoles pNP/h/l et de 2,43 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade. C'est en avril, en juillet, en décembre et surtout en mars que les différences sont les plus fortes dans le cas du pNPP. Avec le MUF-

P, les différences les plus fortes sont observées à des périodes sensiblement identiques à savoir en avril, juillet, octobre, décembre et mars. Toutefois sur l'ensemble du cycle ces différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique.

Activité spécifique

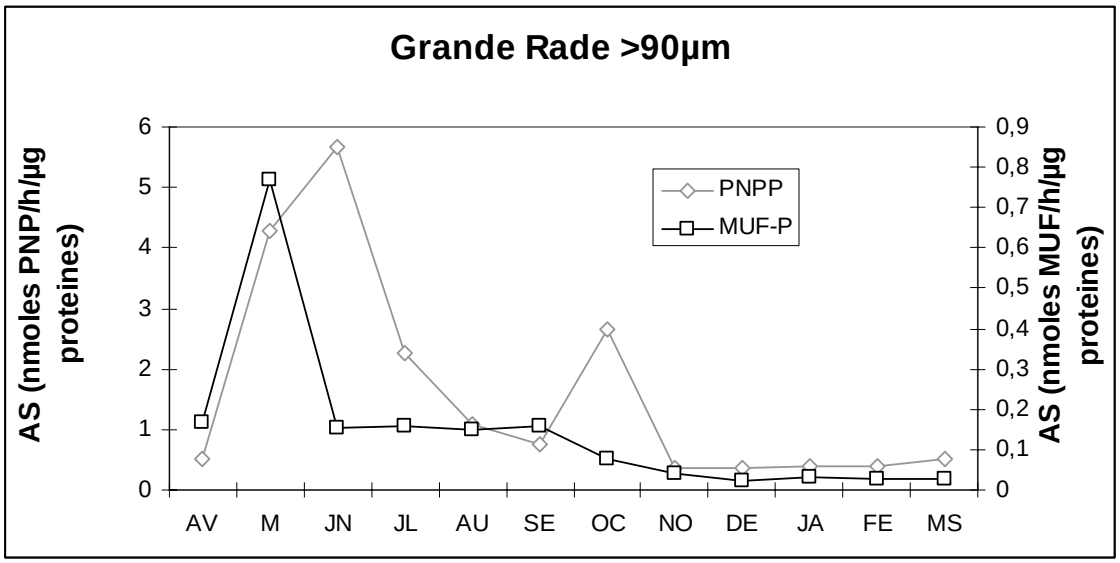

Figure 2: évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction >90 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les activités spécifiques (figure 2), varient de 0,77 à 0,02 nmoles de MUF/h/µg protéines avec le MUF-P et de 5,66 à 0,34 nmoles pNP/h/ µg protéines avec le pNPP.

Elles présentent le même profil d'évolution que les activités par litre avec des pics importants en mai pour le MUF-P (0,77 nmoles de MUF/h/µg protéines) et en juin pour le pNPP (5,66 nmoles de pNP/h/µg protéines). Les profils d'évolution des activités mesurées avec les deux substrats sont assez comparables.

Les activités spécifiques sont notablement plus faibles dans la Grande Rade que dans la Petite Rade. Les différences les plus notables sont relevées en août, novembre, décembre et surtout en mars avec le pNPP ainsi qu'en novembre, décembre et mars avec le MUF-P. Toutefois sur l'ensemble du cycle les différences intersites ne sont pas significatives d'un point de vue statistique

1.1.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Comme dans la Petite Rade, des activités à forte et faible affinité ont été mises en évidence dans la Grande Rade pour cette classe de taille (Tableau 1).

Les Km de l'activité de cette classe de taille sont en moyenne de 10,3 µm pour l'activité à faible affinité et de 1,1 µm pour l'activité à forte affinité.

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	14,5	11,5	9,5	8	22	6	19	9	1,5	ND	ND	2,5
Km2	7,7	0,39	0,21	0,12	0,9	0,16	0,39	0,86	0,5	0,7	0,5	0,75

Tableau 1 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel dans la Grande Rade pour la fraction 90 µm

Activités par litre d'eau de mer

Les Vmax de l'activité à faible affinité sont en général plus élevées que celle de l'activité à forte affinité, comme dans la Petite Rade. C'est plus spécialement le cas entre mai et novembre qui est la période où l'activité à faible affinité est la plus élevée (figure 3).

Comme l'activité à faible affinité, l'activité à forte affinité est plus élevée entre avril et septembre. En revanche, elle est particulièrement basse d'octobre à mars.

Aucune différence statistiquement significative n'existe sur l'ensemble de l'année entre les activités à forte comme à faible affinités de la Petite Rade et de la Grande Rade.

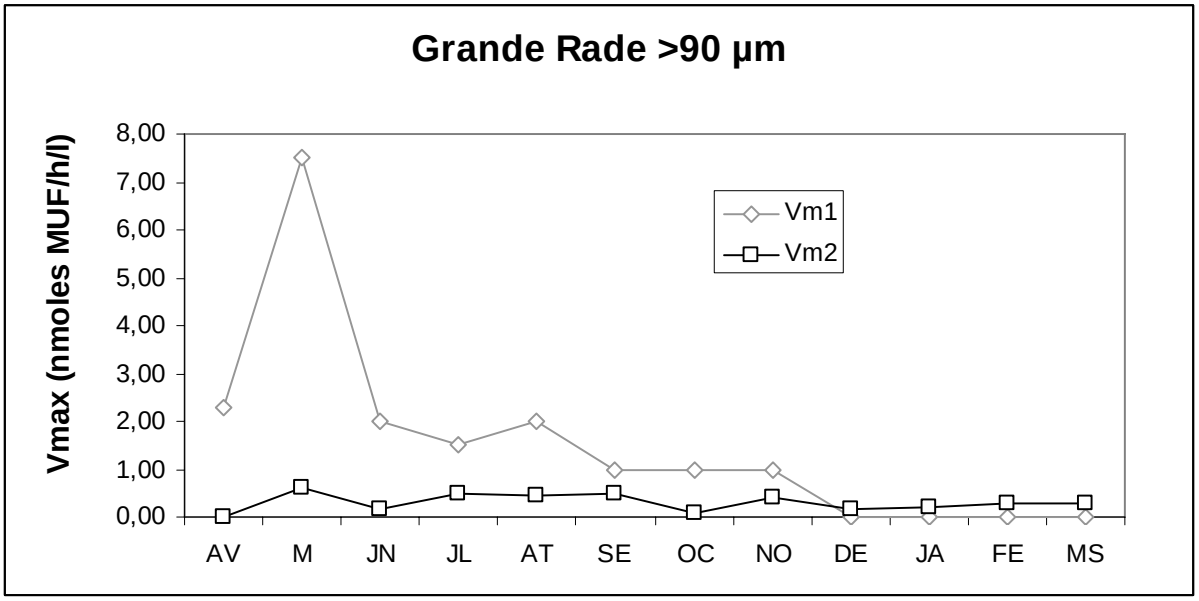

Figure 3: évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction >90 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

Contribution respective des deux types d'activité

L'essentiel de l'activité de la fraction >90 µm provient de la composante à faible affinité (Vm1). Celle ci compte pour plus de 60 % dans l'activité totale d'avril à novembre. De

décembre à mars, période où l'activité phosphatasique est très basse, sa contribution est plus faible car l'activité à forte affinité (Vm2) est prépondérante (Figure 4).

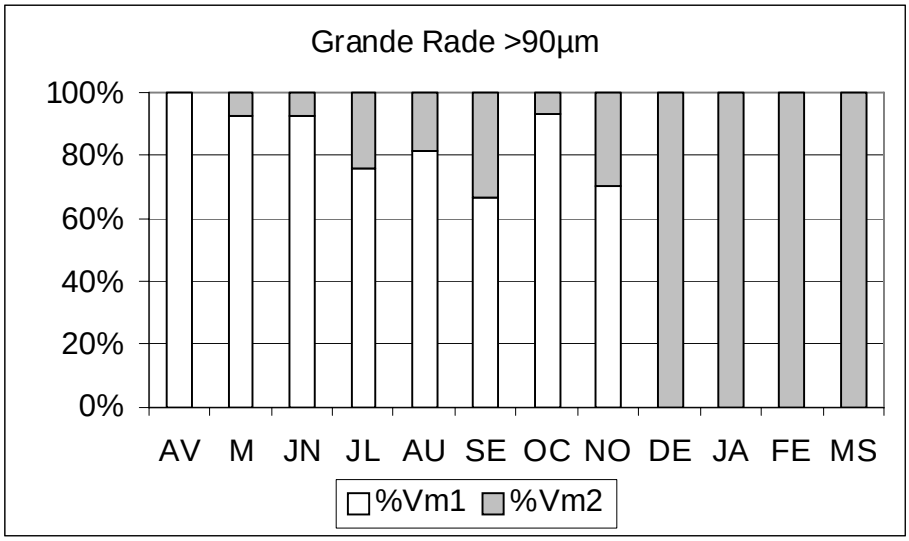

Figure 4: évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction >90 µm dans la Petite Rade

Activités spécifiques

L'évolution des activités spécifiques reflète assez fidèlement celle des activités rapportées au volume d'eau de mer. Elles sont en général élevées entre avril et septembre avec un pic très marqué en mai. Pendant cette période, l'activité à faible affinité est plus forte que l'activité à forte affinité (Figure 5).

Ces activités et leur évolution au cours de l'année sont comparables à celles de la Petite Rade.

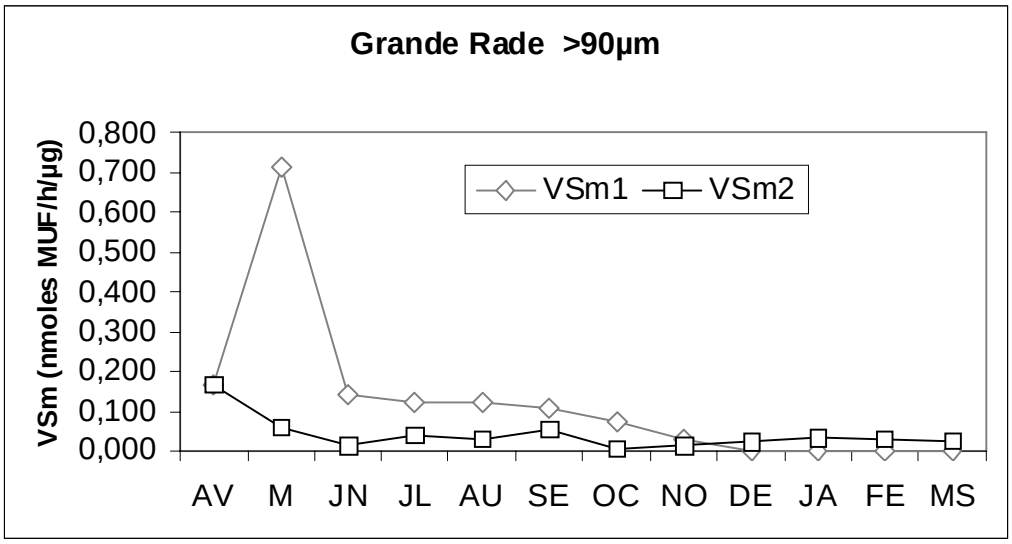

Figure 5: évolution temporelle de l'activité spécifique à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction >90 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

1.2 Activité de la fraction 50-90 µm

1.2.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

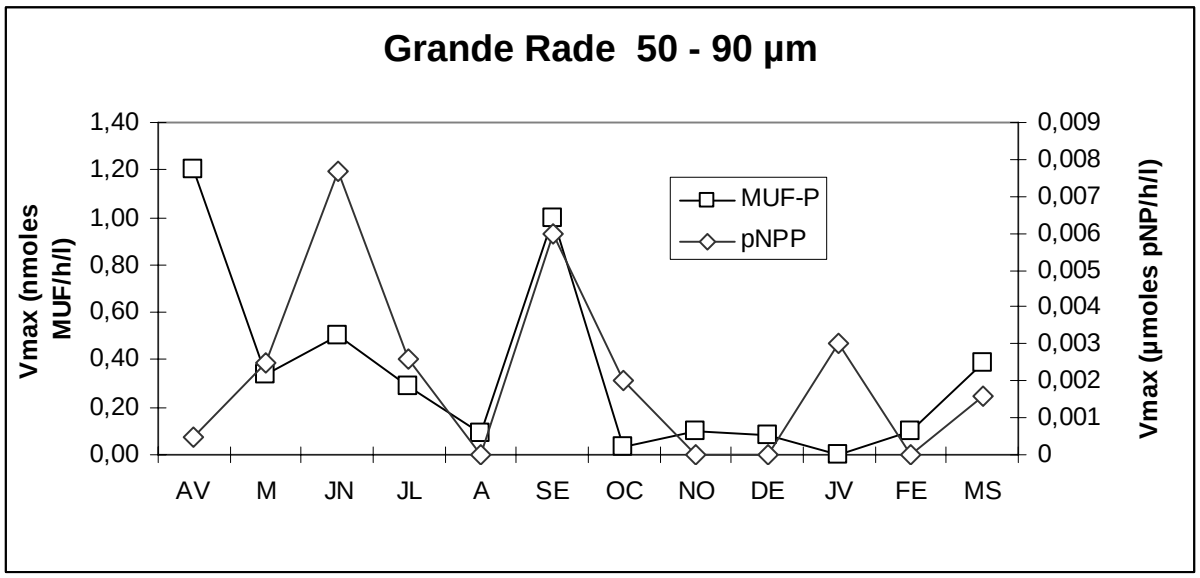

Figure 6: évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les niveaux d'activités varient de 1,2 à 0 nmoles de MUF/h/l et de 0,007 à 0 µmoles pNP/h/l pour les deux substrats (figure 6). Ces activités sont donc faibles toute l'année. Avec le MUF-P, le plus fort niveau est atteint en avril 2005 avec 1,2 nmoles MUF/h/l et avec le pNPP, au mois de juin, avec une valeur de 0,007 µmoles pNP/h/l. Avec les deux substrats de plus fortes activités ont été également enregistrées en septembre. En revanche, d'octobre à février ces activités sont généralement basses, sauf en janvier où l'activité mesurée avec le pNPP remonte momentanément.

Les activités annuelles moyennes sont en général plus élevées dans la Petite Rade que dans la Grande Rade, mais leur évolution annuelle est sensiblement la même. Avec le pNPP, la moyenne annuelle des activités de la Petite Rade est de 0,0055 µmoles pNP/h/l et de 0,0021 µmoles pNP/h/l dans la Grande Rade. Avec le MUF-P elle est de 0,47 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade et de 0,34 nmoles MUF/h/l dans la Grande Rade. C'est en juin, en juillet, en octobre et en mars que les différences intersites sont les plus fortes avec la pNPP, ainsi qu'en juillet, août, octobre et en novembre avec le MUF-P. Toutefois sur l'ensemble du cycle ces différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique

Activité spécifique

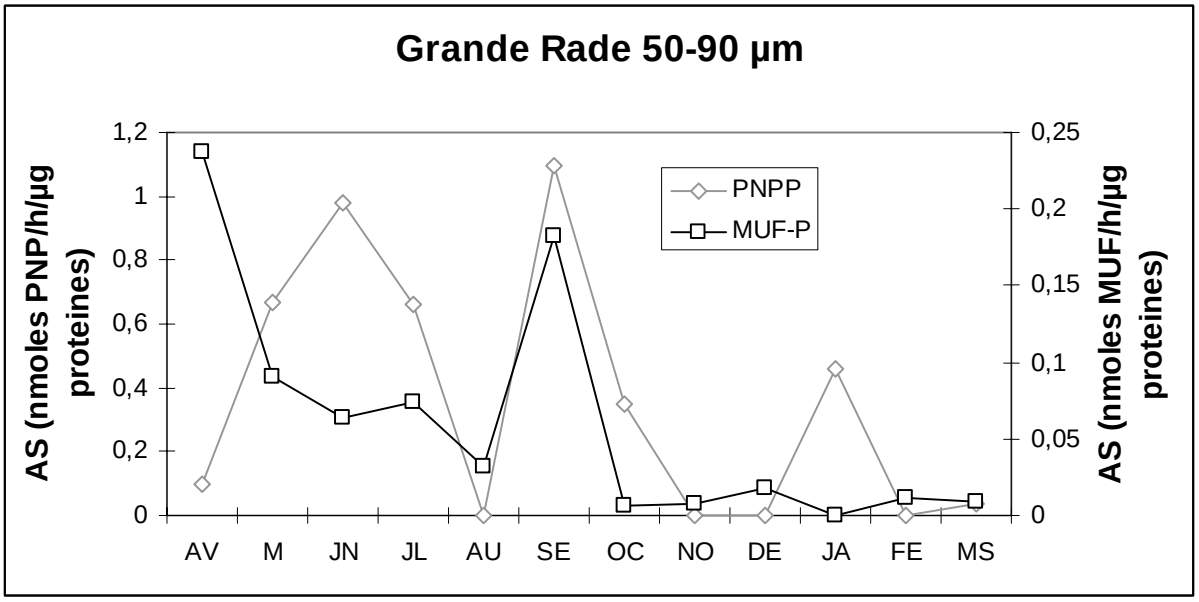

Figure 7: évolution temporelle de l'activité spécifique(AS) pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les niveaux d'activités varient de 0,24 à 0 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 1,09 à 0 nmoles pNP/h/ µg protéines avec respectivement le MUF-P et le pNPP (figure 7). L'évolution de l'activité spécifique est la même que celle de l'activité par litre, avec dans l'ensemble des niveaux plus élevés entre avril et septembre qu'entre octobre et mars.

Les activités spécifiques sont en moyenne plus basses dans la Grande Rade que dans la Petite Rade. Dans la Petite Rade elles sont de 0,71 nmoles PNP/h/µg et dans la Grande Rade de 0,32 nmoles PNP/h/µg. C'est en juin, octobre mais surtout en mars que les différences sont les plus marquées avec le pNPP et en août, novembre mais surtout en mars, avec le MUF-P. Toutefois sur l'ensemble du cycle ces différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique.

1.2.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Comme dans la Petite Rade, des activités à forte et faible affinité ont été mises en évidence dans la Grande Rade pour cette classe de taille (Tableau 2).

Le Km moyen de la composante à forte affinité est de 7,9 µm, le Km de l'activité à faible affinité est de 0,47 µm.

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	30	4	0,5	0,5	ND	16	ND	1	1,3	ND	ND	10,5
Km2	ND	0,5	0,26	0,08	1,1	0,1	ND	0,5	ND	ND	ND	0,78

Tableau 2 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 50-90 µm

Activités par litre

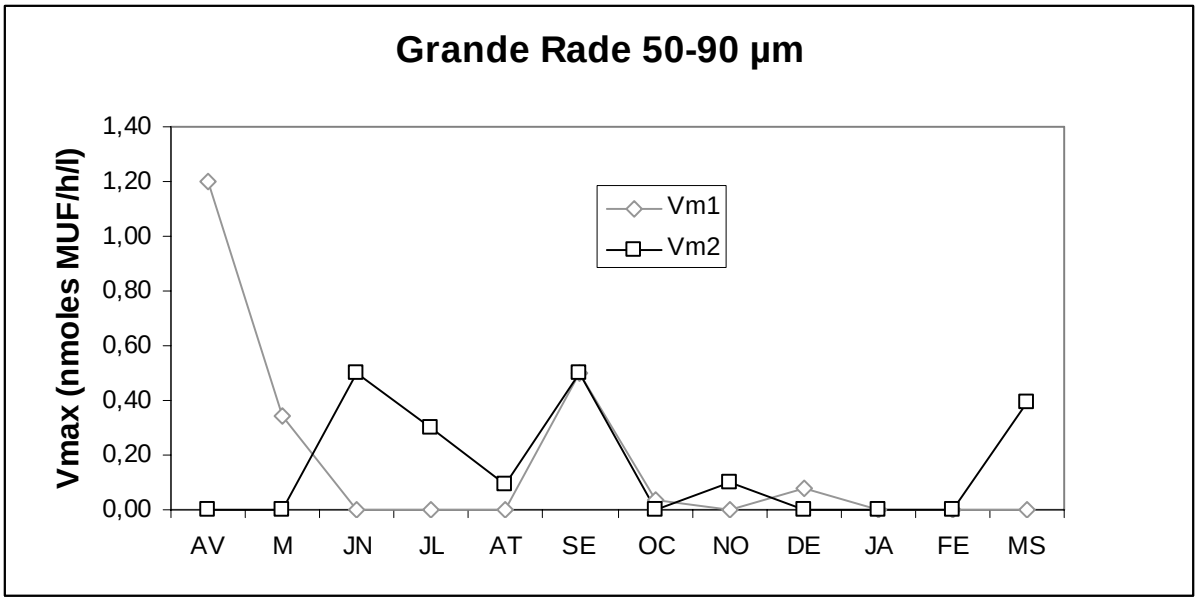

Figure 8 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

L'activité à faible affinité (Vm1) est très élevée en avril 2005 (1,2 nmoles de MUF/h/l), alors que l'activité à forte affinité (Vm2) est très basse. Puis cette tendance s'inverse de mai à juillet 2005. A partir d'août 2005 jusqu'en février 2006 les activités à forte et faible affinités évoluent parallèlement. Toutes les deux augmentent en septembre. A partir d'octobre, leur niveau baisse jusqu'en février (Figure 8).

L'activité à faible affinité moyenne de la Grande Rade (0,24 nmoles de MUF/h/l) est comparable à celle de la Petite Rade (0,28 nmoles de MUF/h/l) et leur évolution est assez semblable. Il en est de même de l'activité à forte affinité.

Contribution respective des deux types d'activité

Les activités de cette fraction étant très basses, l'évolution des parts respectives des deux composantes est assez fluctuante (figure 9). Il est à noter qu'en période de forte activité (de mai à septembre pour la Vm2) la contribution de l'activité à forte affinité est nettement plus élevée que celle de l'autre composante.

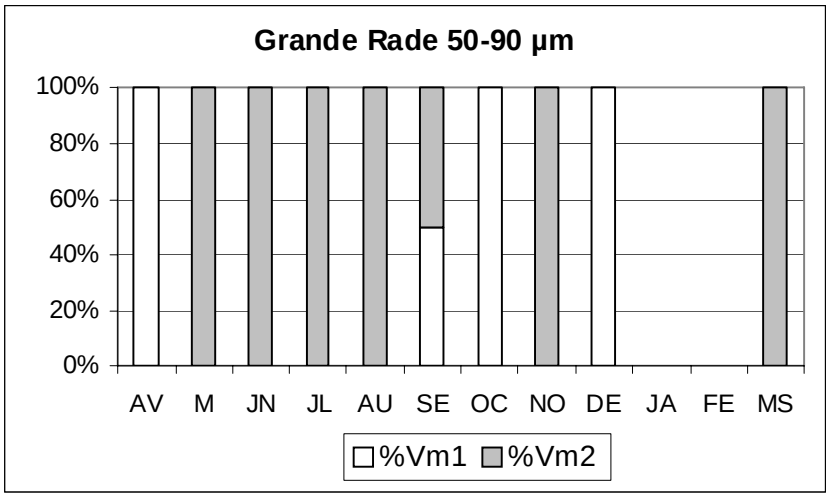

Figure 9: évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 50-90 µm dans la Grande Rade

Activités spécifiques

L'évolution des activités spécifiques reflète celle des activités par litre. Elles sont en général plus élevées dans la première partie du cycle (avril à septembre). A partir d'octobre et jusqu'à la fin du cycle, leur niveau est particulièrement bas.

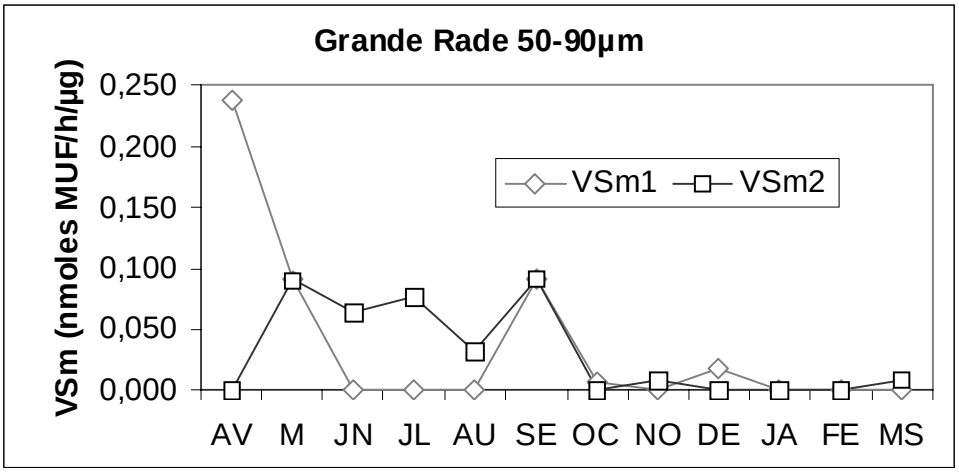

Figure 10 : évolution temporelle de l'activité spécifique à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 50-90 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

L'activité spécifique à faible affinité de la Grande Rade est nettement plus élevée que celle de la Petite Rade au début du cycle. Ensuite ces deux types d'activité évoluent de façon assez similaire. Par ailleurs, il n'existe pas de différences statistiquement significatives entre les deux sites sur l'ensemble de l'année. Il en est de même pour les activités à forte affinité (Figure 10).

1.3 Activité de la fraction 6-50 µm

1.3.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

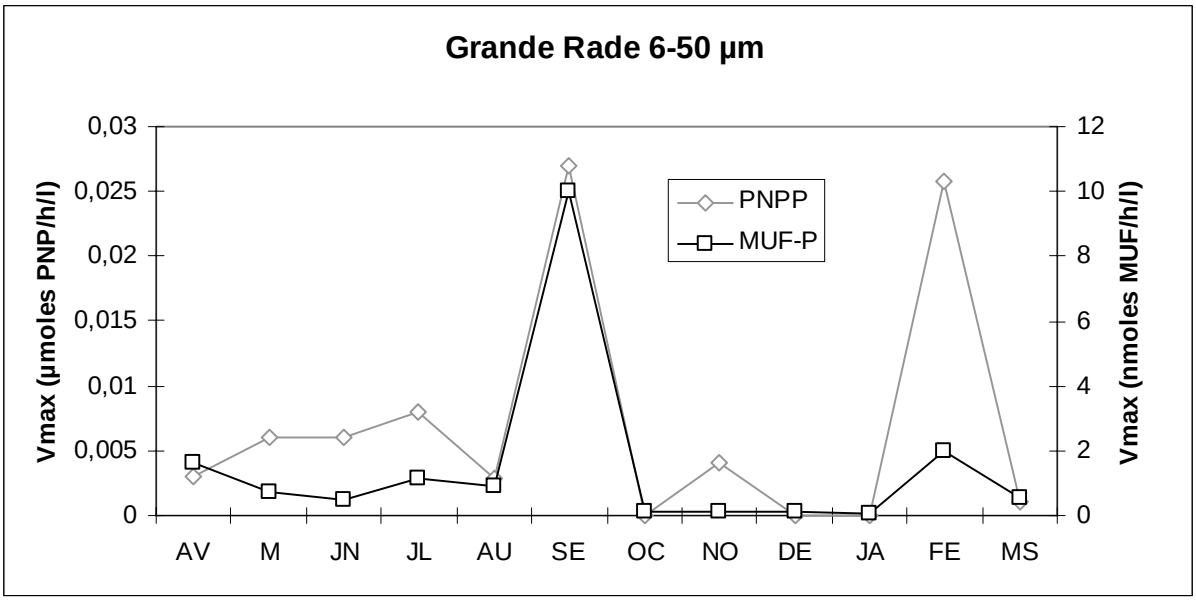

Figure 11 : évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les niveaux d'activités varient de 10 à 0,05 nmoles de MUF/h/l avec le MUF-P et de 0,025 à 0 µmoles pNP/h/l avec le pNPP (figure 11).

L'activité phosphatasique mesurée avec le MUF-P est particulièrement élevée en septembre 2005, avec 10 nmoles MUF/h/l, en avril 2005 et en février 2006, avec des valeurs voisines de 1,5 nmoles MUF/h/l. Pendant le reste de l'année, l'activité est très basse.

Le profil d'évolution de l'activité mesurée avec le pNPP est assez comparable au précédent. Il présente deux pics en septembre 2005 et en février 2006 avec 0,027 et 0,025 µmoles pNP/h/l.

En moyenne, l'activité de la Grande Rade est plus faible que celle de la Petite Rade avec le MUF-P (1,5 contre 2,6 nmoles MUF/h/l) et la différence entre les deux sites est significative (p Wilcoxon : 0,06). De même qu'avec le pNPP les activités annuelles moyennes sont plus élevées dans la Petite Rade (0,007 contre 0,018 µmoles pNP/h/l). Avec le MUF-P la différence entre les deux sites tient surtout aux activités particulièrement élevées enregistrées dans la Petite Rade en octobre et en mars. En dehors de ces deux périodes, l'évolution ainsi que les niveaux des activités sont voisins dans les deux sites.

Activité spécifique

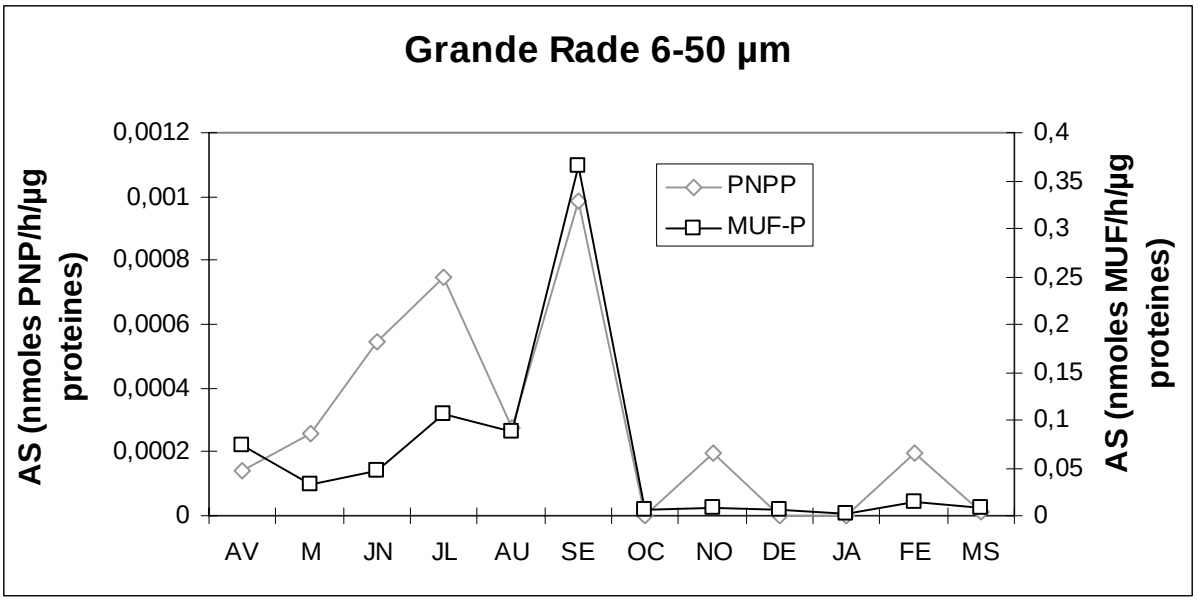

Figure 12 : évolution temporelle de l'activité spécifique(AS) pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les niveaux d'activités varient de 0,36 à 0 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 0,98 à 0 nmoles pNP/h/ µg protéines avec le MUF-P et le pNPP respectivement (figure 12).

Toutes les deux présentent un même pic en septembre mais l'activité mesurée avec le pNPP augmente plus fortement en juin et juillet. D'octobre à mars, ces activités sont particulièrement basses, quel que soit le substrat.

Avec le MUF-P les activités moyennes sur l'ensemble de l'année sont comparables dans les deux sites et leur profil d'évolution est identique. Ponctuellement des différences intersites peuvent être relevées. C'est notamment le cas en juillet et en mars où les activités spécifiques de la Petite Rade sont plus élevées que celles de la Grande Rade. En septembre ce sont celles de la Grande Rade qui sont les plus fortes. Mais sur l'ensemble du cycle ces différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique.

Avec le pNPP, les activités moyennes sont également comparables dans les deux sites avec des valeurs de 0,47 nmoles PNP/h/µg dans la Petite Rade et de 0,27 nmoles PNP/h/µg dans la Grande Rade. Leur profil d'évolution est également assez voisin.

1.3.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Comme dans la Petite Rade, des activités à forte et faible affinité ont été mises en évidence dans la Grande Rade pour cette classe de taille (Tableau 3).

Le Km moyen de l'activité à faible affinité est de 3,4 µm, celui de l'activité à forte affinité est de 0,43 µM.

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	7	ND	0,5	0,5	0,5	0,5	12,5	ND	2,5	ND	ND	ND
Km2	0,31	ND	ND	0,07	0,05	0,25	1,9	ND	0,03	ND	ND	ND

Tableau 3 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 6-50 µm

Activités par litre

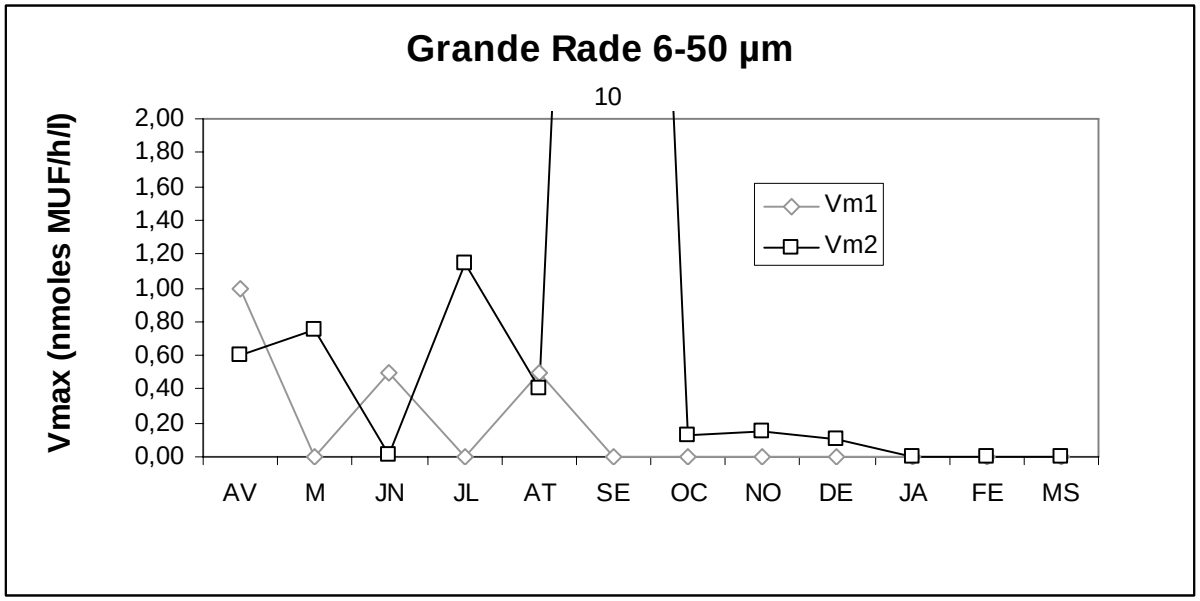

Figure 13 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

A l'exception des mois d'avril et juin 2005, l'activité à forte affinité est plus élevée que l'activité à faible affinité (Figure 13), ce qui a été déjà observé dans la Petite Rade. L'activité à forte affinité présente des valeurs élevées en juillet (1,15 nmoles MUF/h/l) mais surtout en septembre 2005 (10 nmoles MUF/h/l). A partir d'octobre les valeurs sont très basses pour les deux types d'affinité ; l'activité à faible affinité (Vm1) est même indécelable.

Sur l'ensemble de l'année, les différences intersites concernant l'activité à forte affinité sont significatives (p=0,05), les activités de la Petite Rade étant plus fortes que celles de la Grande Rade. C'est également le cas des activités à faible affinité, mais ces différences ne sont pas statistiquement significatives.

Contribution respective des deux types d'activité

A l'exception des mois d'avril, juin et août, la contribution de l'activité à forte affinité (Vm2) est la plus forte (Figure 14).

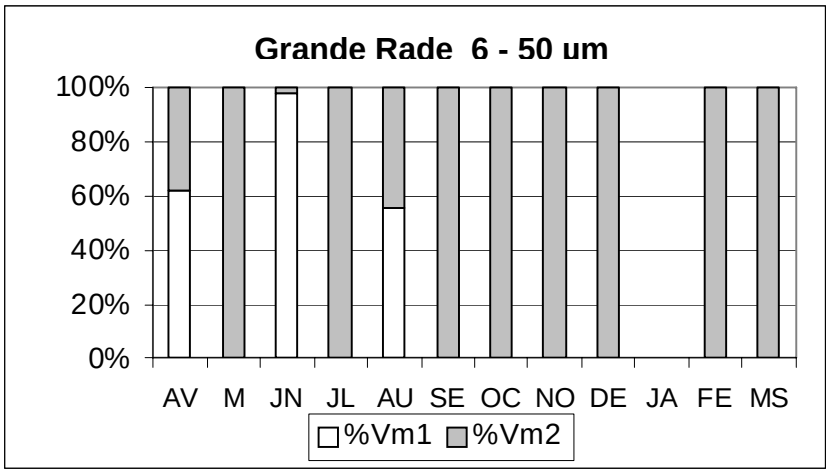

Figure 14 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 6-50 µm dans la Grande Rade

Activités spécifiques

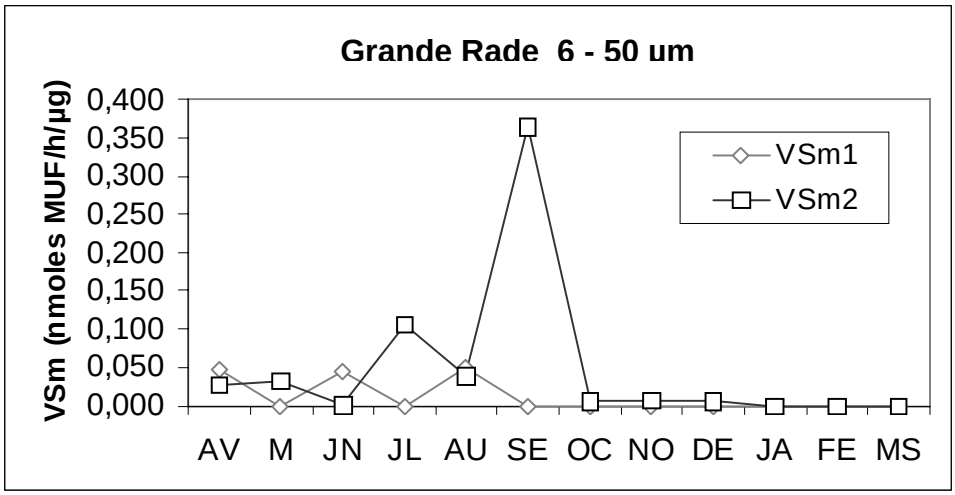

Figure 15 : évolution temporelle de l'activité spécifique à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 6-50 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

Comme les activités par litre, les activités spécifiques fluctuent d'avril à octobre, avec des valeurs souvent plus élevées en ce qui concerne l'activité à forte affinité (VSm2). En revanche à partir d'octobre et jusqu'à la fin du cycle, elles se maintiennent à des niveaux très bas. Aucune différence significative n'existe entre les deux sites de prélèvement (Figure 15).

1.4 Activité de la fraction 1-6 µm

1.4.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

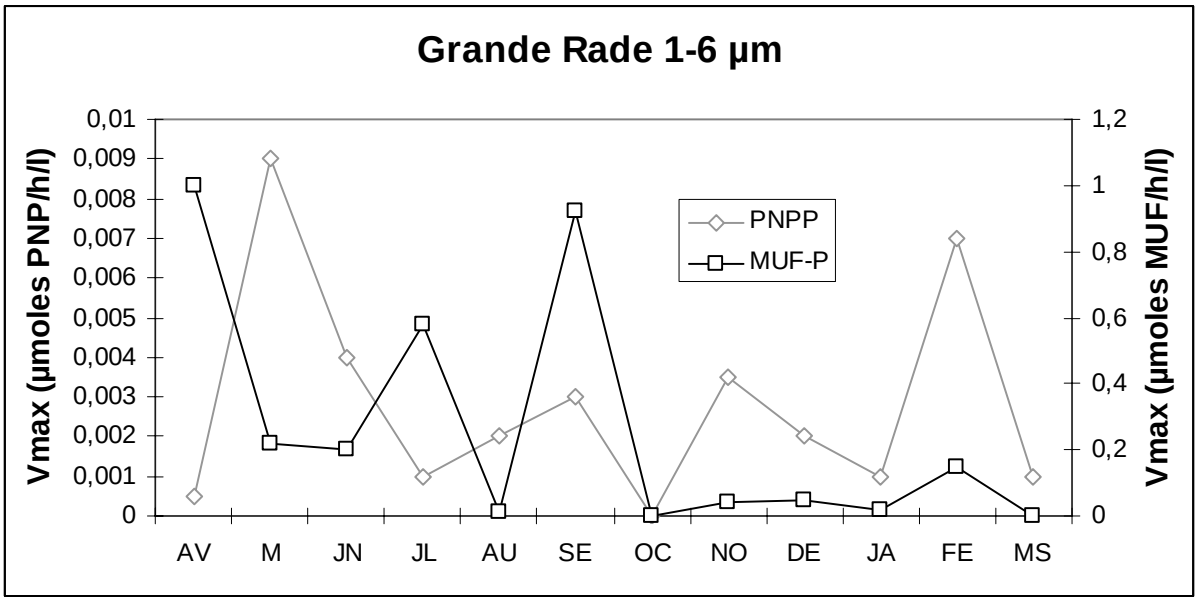

Figure 16 : évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 1-6 µm mesurée avec les deux substrats (MUF-P et pNPP) dans la Grande Rade

Avec le MUF-P, cette activité est très faible sur l'ensemble de l'année avec des valeurs maximales proches de 1 nmoles MUF/h/l en avril 2005 et en septembre 2006 (Figure 16). Il en est de même avec le pNPP, les valeurs maximales ne dépassant pas 0,009 µmoles pNP/h/l.

Avec le MUF-P la moyenne annuelle de ces activités est de 0,58 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade et 0,27 nmoles MUF/h/l. dans la Grande Rade. Sur l'ensemble du cycle ces différences intersites sont significatives d'un point de vue statistique (p=0,05).Elles sont surtout marquées au cours des mois de mars et d'octobre.

Avec le pNPP, les activités de la Petite Rade sont également plus élevées (0,0048 µmoles pNP/h/l) que celle de la Grande Rade (0,0028 µmoles pNP/h/l) (Figure 16).

Activité spécifique

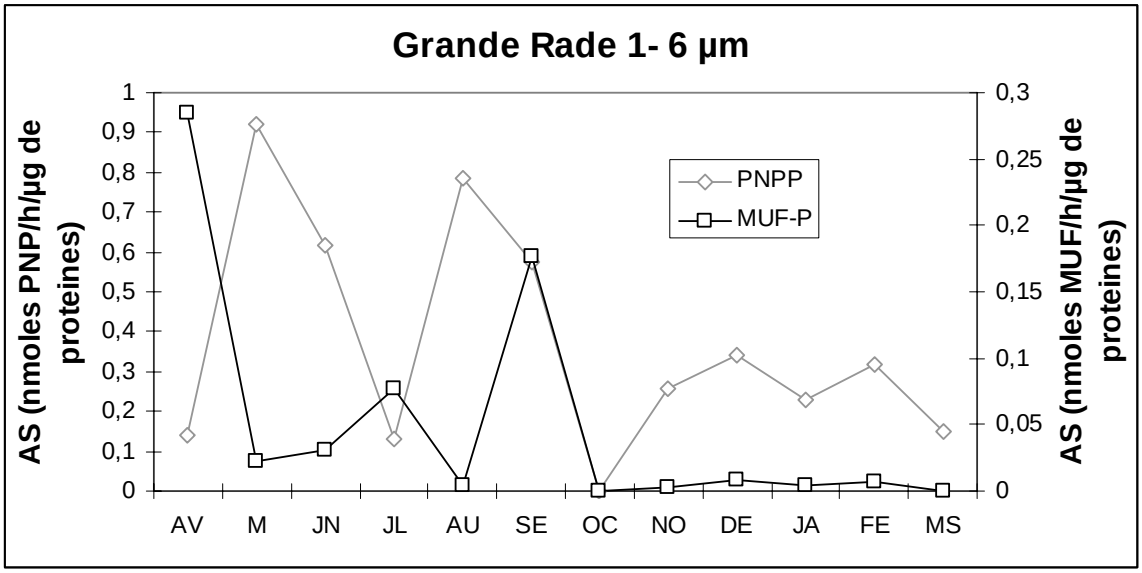

Figure 17 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction 1-6 µm mesurée avec les deux substrats (MUF-P et pNPP) dans la Grande Rade

Les activités spécifiques varient de 0,28 à 0 nmoles de MUF/h/µg protéines et de 0 à 0,92 nmoles pNP/h/µg protéines pour les deux substrats (figure 17).

Avec le MUF-P, les activités spécifiques sont comparables dans la Petite Rade et dans la Grande Rade. En moyenne sur l'ensemble de l'année elles sont respectivement de 0,052 nmoles de MUF/h/µg et 0,051 nmoles de MUF/h/µg.

Avec le pNPP, les activités spécifiques sont également comparables dans la Petite Rade (0,41 nmoles pNP/h/µg) et dans la Grande Rade (0,37 nmoles pNP/h/µg) et leur profil d'évolution est assez semblable.

1.4.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Comme dans la Petite Rade, des activités à forte et faible affinité ont été mises en évidence dans la Grande Rade pour cette classe de taille (Tableau 4).

Les Km moyen de l'activité de cette classe de taille sont de 3,5 µM pour l'activité à faible affinité et de 0,48 µM pour l'activité à forte affinité.

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	9,5	0,5	6,5	0,5	ND	0,5	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Km2	0,6	0,1	1,6	0,08	ND	0,05	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tableau 4 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 1-6 µm

Activité par litre

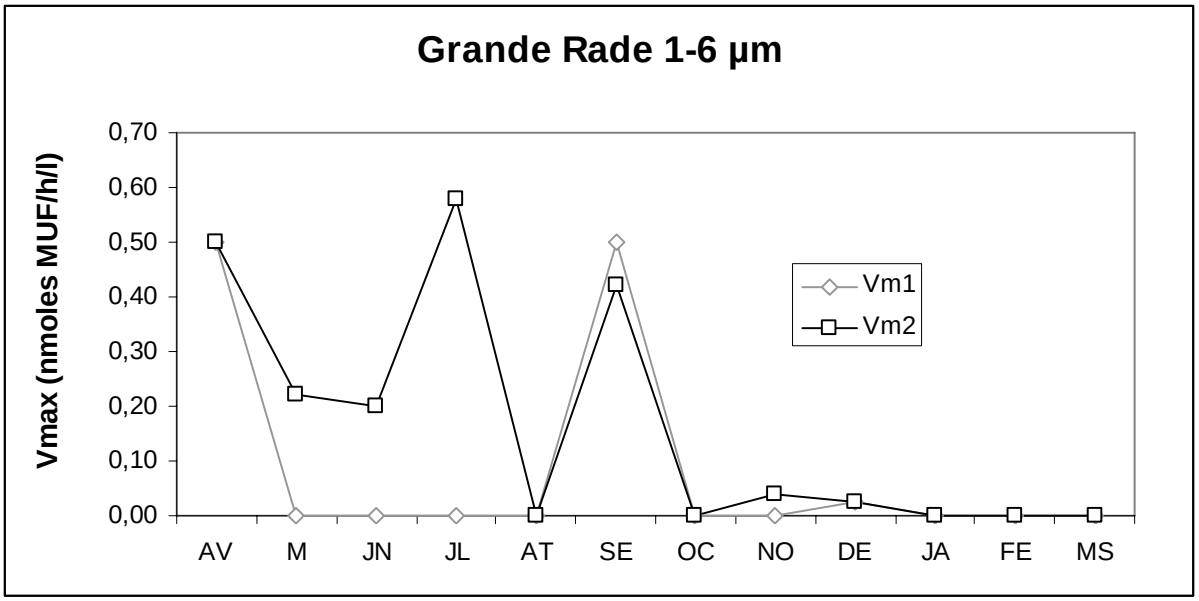

Figure 18 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 1-6 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

L'activité à forte affinité est généralement assez élevée d'avril à juillet. En revanche l'activité à faible affinité est souvent très basse. Les deux types d'activités augmentent fortement en septembre pour baisser durablement ensuite jusqu'à la fin du cycle.

Les niveaux moyens de l'activité à faible affinité sont comparables dans les deux sites (0,13 nmoles de MUF/h/l dans la Petite Rade pour à 0,11 nmoles de MUF/h/ dans la grande). En revanche l'activité à forte affinité est moins élevée que dans la Petite Rade (0,45 nmoles de MUF/h/l dans la Petite Rade pour à 0,22 nmoles de MUF/h/ dans la grande) mais la différence intersite n'est pas statistiquement significative (Figure 18).

Contribution respective des deux types d'activité

L'histogramme de la figure 19 montre qu'en période de forte activité, l'activité à forte affinité (Vm2) prédomine, tout comme dans la Petite Rade. C'est le cas en mai, juin, juillet et novembre.

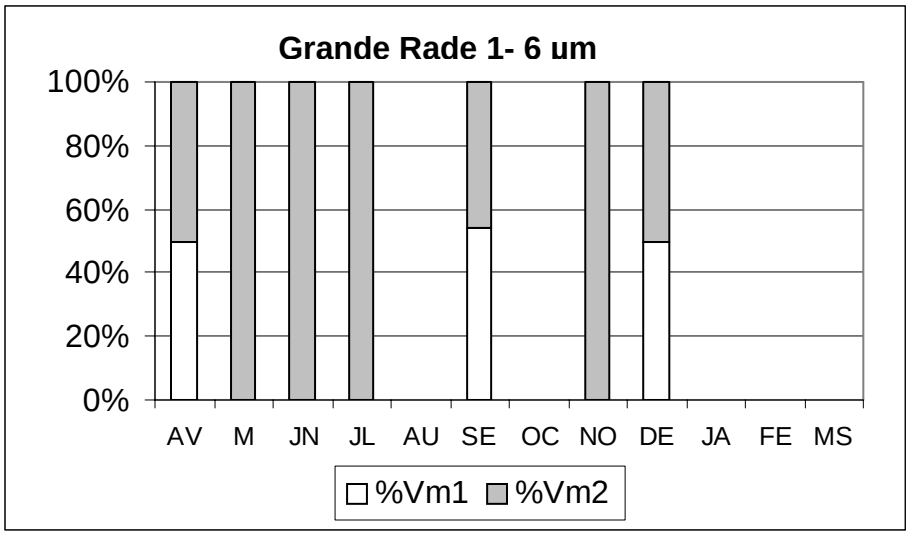

Figure 19 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 1-6 µm dans la Grande Rade

Activités spécifiques

L'évolution des activités spécifiques est identique à celle des activités exprimées par litre d'eau de mer. L'activité à forte affinité et, dans une moindre mesure, l'activité à faible affinité, présentent des niveaux nettement plus élevés entre avril et septembre qu'entre octobre et mars (figure 20), les activités les plus fortes étant enregistrées en avril, juillet et septembre.

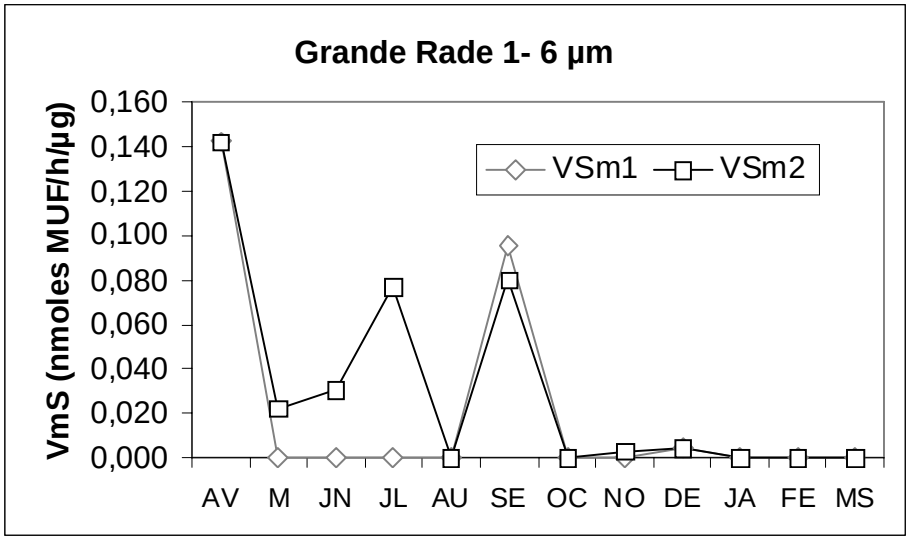

Figure 20: évolution temporelle de l'activité spécifique à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 1-6 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

1.5 Activité de la fraction 0,45-1 µm

1.5.1 Evolution des Vmax totales

Activité par litre d'eau de mer

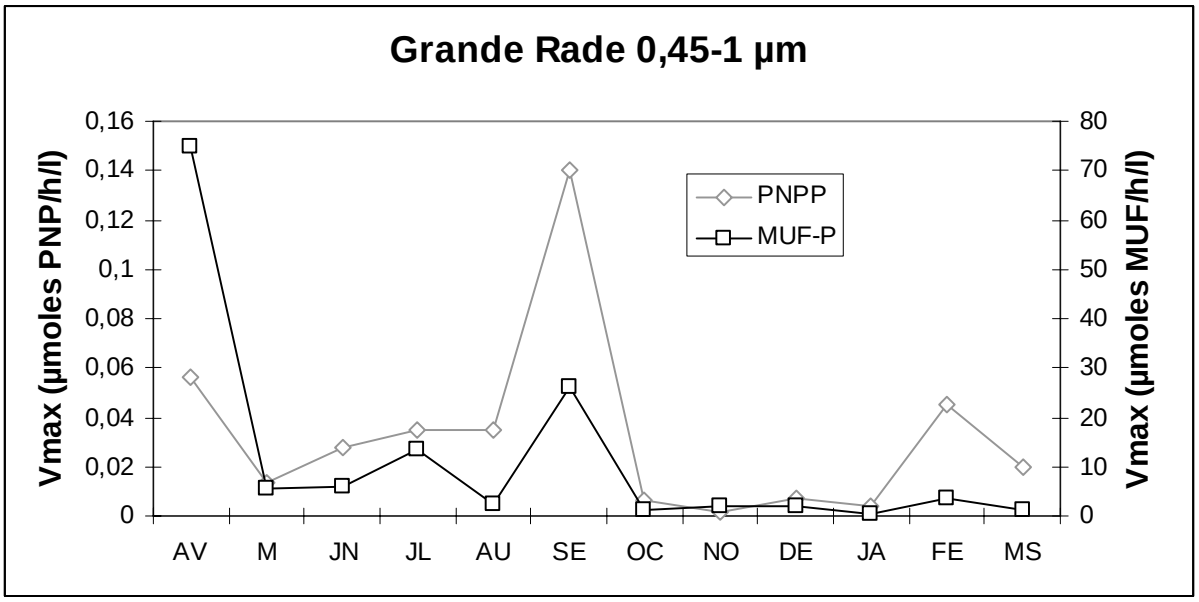

Figure 21 : évolution temporelle des Vmax totales par litre d'eau de mer pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les niveaux de ces activités varient de 0,4 à 75 nmoles de MUF/h/l avec le MUF-P et de 0,0016 à 0,14 µmoles pNP/h/l avec le pNPP (figure 21).

Les activités annuelles mesurées avec le MUF-P sont assez fluctuante en 1ère partie de cycle, avec une très forte valeur en avril 2005 (75 nmoles MUF/h/l) et des activités élevées en juillet (13,5 nmoles MUF/h/l) et en septembre 2005 (26 nmoles MUF/h/l). Par la suite, l'activité reste particulièrement basse, notamment d'octobre à janvier.

Les activités mesurées avec le pNPP sont également élevées en avril (0,056 µmoles pNP/h/l) en septembre 2005 (0,14 µmoles pNP/h/l) ainsi qu'en février 2006 (0,044 µmoles pNP/h/l).

Avec le MUF-P, la moyenne des activités annuelles est de 11,5 nmoles MUF/h/l dans la Grande Rade contre 9,2 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade. Avec le pNPP, la moyenne annuelle dans la Grande Rade est de 0,032 µmoles pNP/h/l contre 0,037 µmoles pNP/h/l dans la Petite Rade. Ces différences ne sont pas significatives d'un point de vue statistique.

Activité spécifique

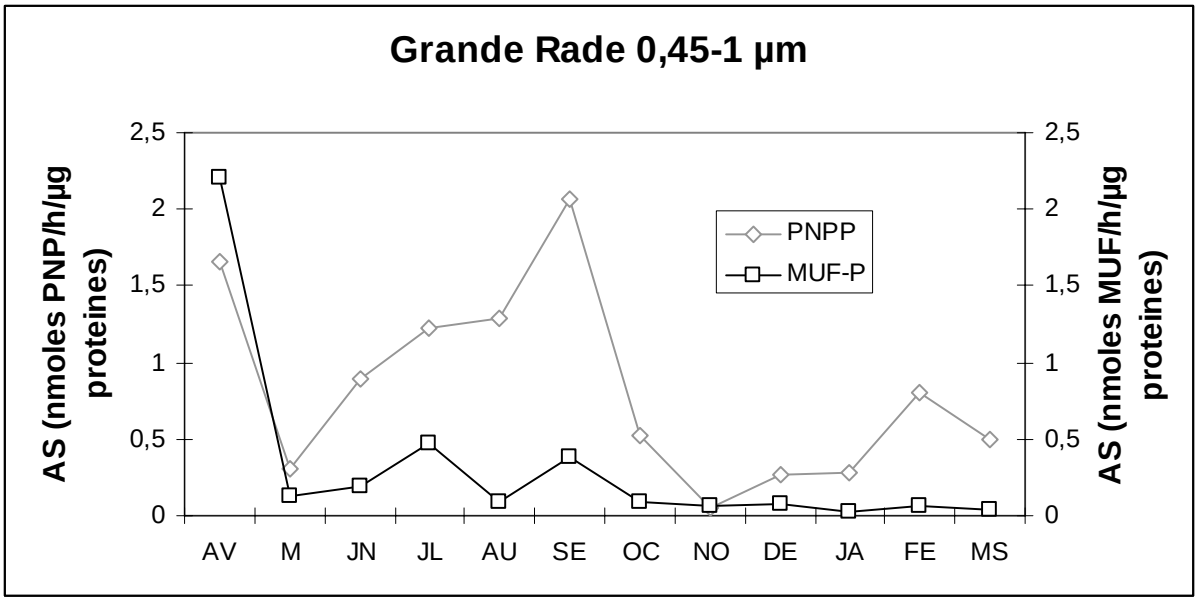

Figure 22 : évolution temporelle de l'activité spécifique (AS) pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P et le pNPP dans la Grande Rade

Les niveaux des activités spécifiques varient de 2,20 à 0,03 nmoles de MUF/h/µg protéines avec le MUF-P et de 2,06 à 0,05 nmoles pNP/h/µg protéines avec le pNPP (figure 22).

De fortes activités ont été relevées en avril et en septembre avec les deux substrats, et février exclusivement avec le pNPP.

Les activités spécifiques moyennes de l'ensemble de l'année sont sensiblement plus élevées dans la Grande Rade que dans la Petite Rade. Cette différence tient surtout à la très forte activité spécifique observée dans la Grande Rade en avril. Mais sur l'ensemble du cycle, les différences intersites ne sont pas significatives d'un point de vue statistique.

1.5.2 Evolution des activités à fortes et faibles affinités

Comme pour toutes les autres fractions, des activités à forte et faible affinités ont été mises en évidence au niveau de cette fraction (Tableau 5).

Le Km moyen de l'activité à faible affinité est de 10,1 µM, celui de la composante à forte affinité est de 0,33 µM (tableau 10).

	AV	MA	JN	JL	AU	SE	OC	NO	DE	JA	FE	MS
Km1	30	3	1	ND	2	3	2	15,5	29,5	6,7	15,5	3
Km2	0,37	0,83	0,06	0,01	0,06	0,1	0,19	0,66	0,3	0,5	0,86	0,07

Tableau 5 : évolution du Km (en µM) au cours du cycle annuel pour la fraction 0,45-1 µm

Activité par litre

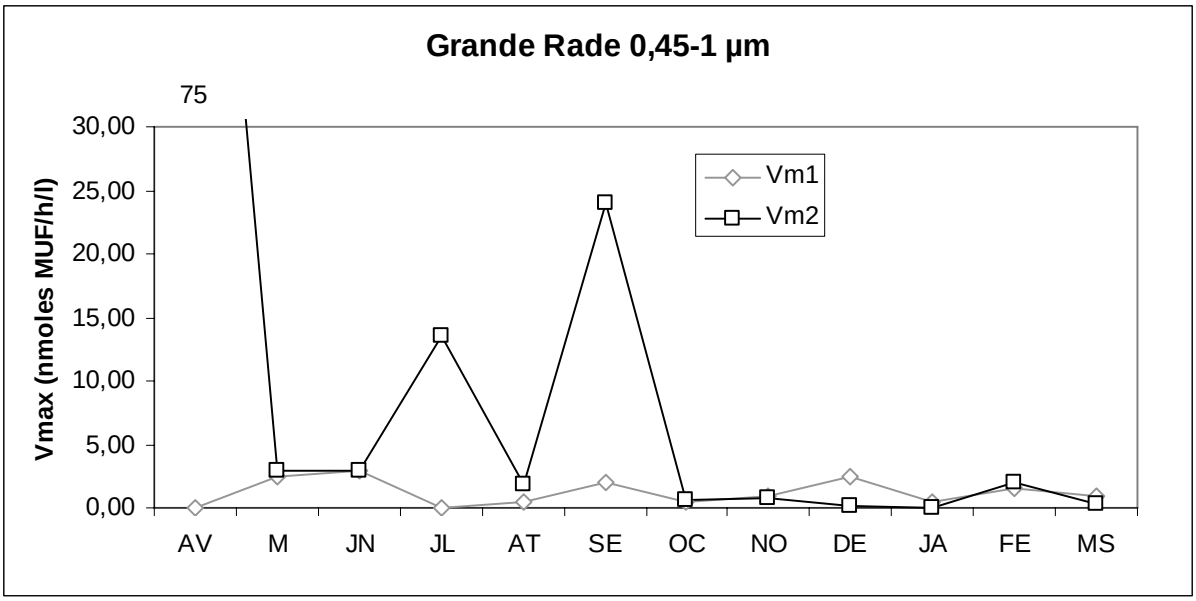

Figure 23 : évolution temporelle de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

Comme dans la Petite Rade, l'activité à forte affinité (Vm2) est supérieure à l'activité à faible affinité. Elle est particulièrement élevée en avril, juillet et septembre 2005.

L'activité à faible affinité (Vm1) varie peu en cours d'année. Elle augmente faiblement en mai et juin (Figure 23).

Contribution respective des deux types d'activité

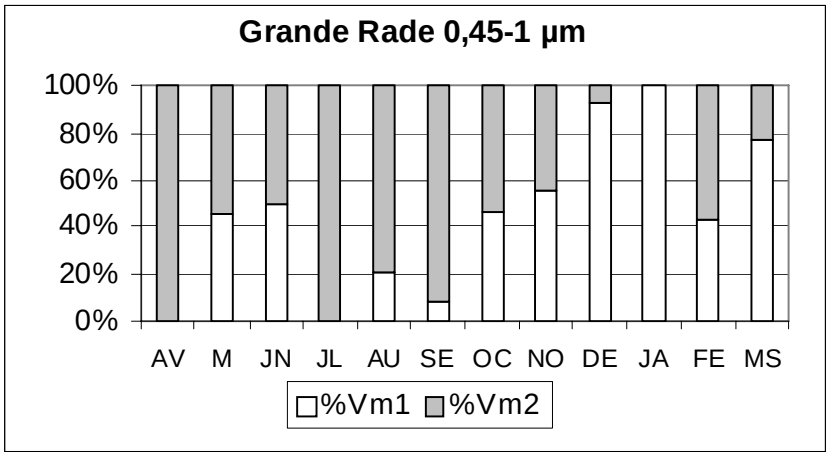

Figure 24 : évolution temporelle de la part (en %) de l'activité à faible (Vm1) et à forte affinité (Vm2) pour la fraction 0,45-1 µm dans la Grande Rade

En moyenne, l'activité à faible affinité représente 45 % de l'ensemble de l'activité phosphatasique et l'activité à forte affinité, 55 %. La composante à forte affinité prédomine en période de fortes activités, en particulier en juillet et en septembre où elle représente près de 90 % de l'activité totale. Lorsque l'activité est basse, sa contribution est comparable à celle de l'activité à faible activité.

Activités spécifiques

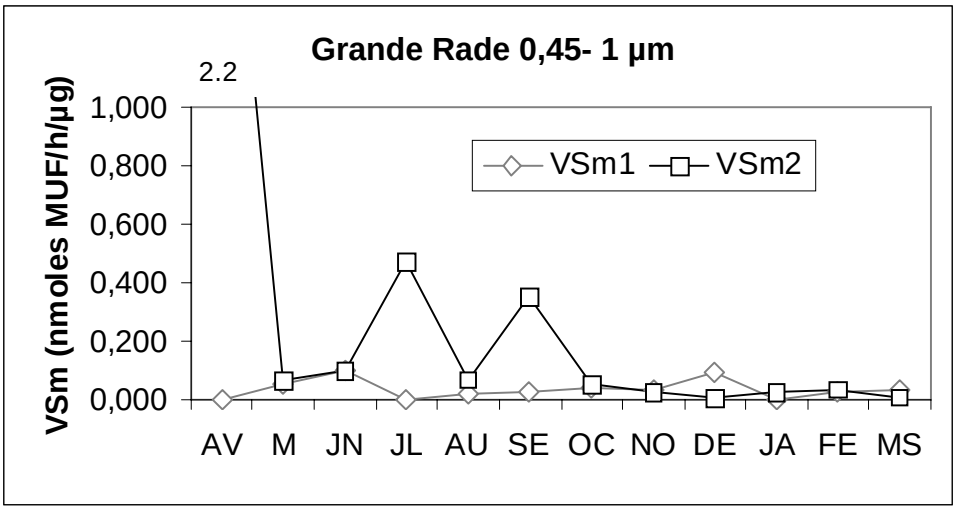

Figure 25 : évolution temporelle de l'activité spécifique à faible (VSm1) et à forte affinité (VSm2) pour la fraction 0,45-1 µm mesurée avec le MUF-P dans la Grande Rade

Comme dans la Petite Rade, les activités spécifiques à forte affinité sont plus élevées que les activités à faible affinité (figure 25). Elles sont particulièrement élevées en juillet et en septembre, et surtout en avril (2,2 nmoles MUF/h/µg). D'octobre à mars, ces activités spécifiques sont très basses de même que celles de l'activité à faible affinité (sauf en décembre pour cette dernière).

1.6 Résumé pour le matériel particulaire broyé

1.6.1 Contribution des classes de taille à la Vmax totale

Comme dans la Petite Rade, deux classes de taille contribuent à plus de 60 % de l'activité particulaire : la classe de taille >90 µm et 0,45-1 µm. Avec le MUF-P, la plus petite classe de taille contribue à 61 % de l'activité totale et la plus grande à 23 %. Avec le pNPP, la plus

petite contribue à 45 % et la plus grande à 34 %. Pour les trois autres classes, la fraction 6-50 µm est la plus importante avec 11,14 % dans le cas du MUF-P et 9 % avec le pNPP.

Cette contribution varie toutefois beaucoup au cours de l'année comme le montrent les histogrammes suivants (Figure 26).

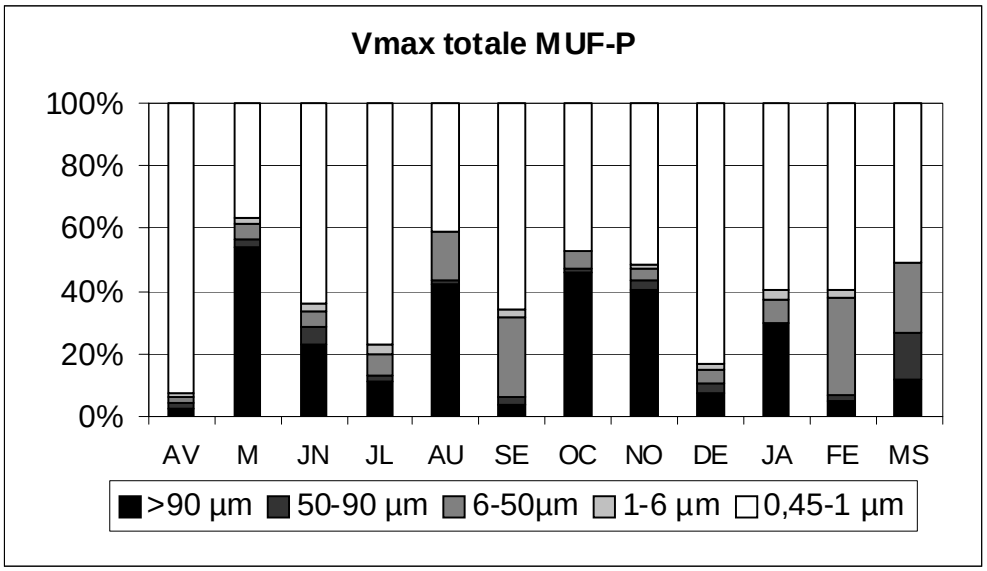

Figure 26 : contribution (en %) de chaque classe de taille à l'activité particulaire totale mesurée avec le MUF-P, dans la Grande Rade

L'activité de la classe de taille >90 %µm prédomine au mois de mai quand l'activité est mesurée avec le MUF-P (54 %). Par contre avec le pNPP, elle prédomine en mai (59 %), juin (63 %), octobre (81 %) et novembre (56 %).

Pendant le reste de l'année et pour les deux substrats, la contribution majeure à l'ensemble de l'activité particulaire provient de la plus petite classe de taille. Sa contribution est particulièrement importante en avril, juillet, septembre, périodes de fortes activités.

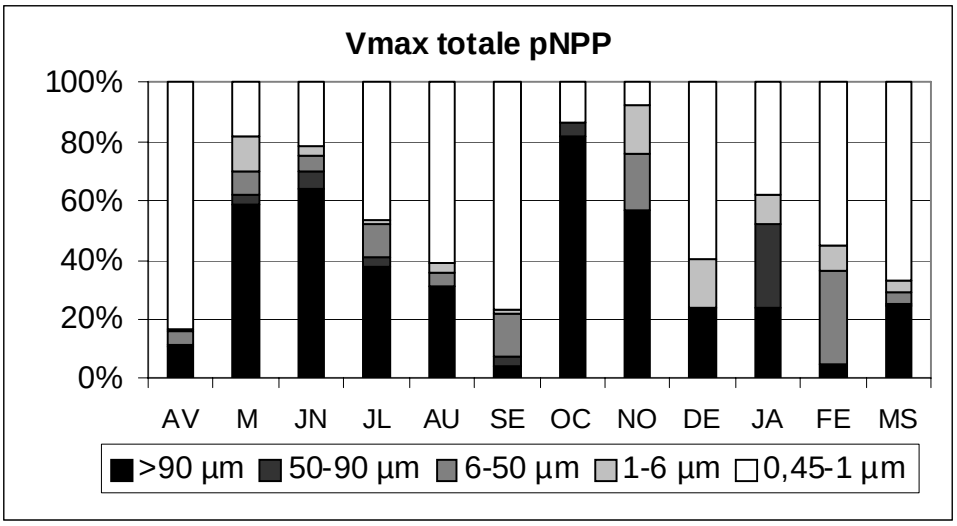

Figure 27 : contribution (en %) de chaque classe de taille à l'activité particulaire totale mesurée avec le pNPP, dans la Grande Rade

1.6.2 Contribution des différentes classes de taille à l'activité à faible affinité (Vm1)

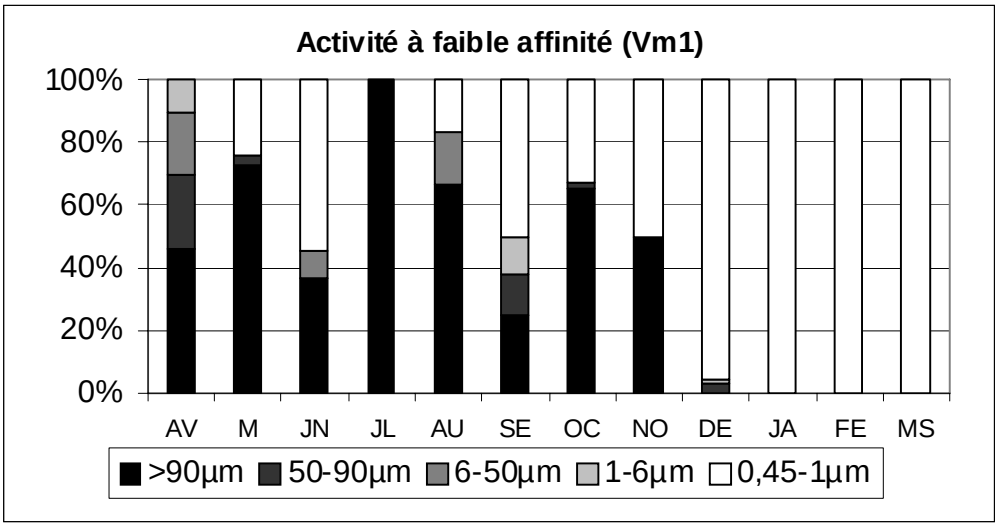

Figure 28 : contribution (en %) de chaque classe de taille à l'activité particulaire à faible affinité (Vm1) mesurée avec le MUF-P, dans la Grande Rade

Les fortes activités de la composantes à faible affinité sont surtout dues aux classes de taille >90 µm et 50-90 µm (Figure 28). C'est plus particulièrement le cas en avril et en septembre. En hiver, les très faibles activités sont dues à la plus petite classe de taille.

Ces données montrent que l'activité intracellulaire serait surtout présente au niveau de la plus grande classe de taille, essentiellement entre avril et novembre. Aux autres périodes de l'année, cette activité intracellulaire semble davantage présente dans le matériel particulaire de la plus petite fraction.

1.6.3 Contribution des différentes classes de taille à l'activité à forte affinité (Vm2)

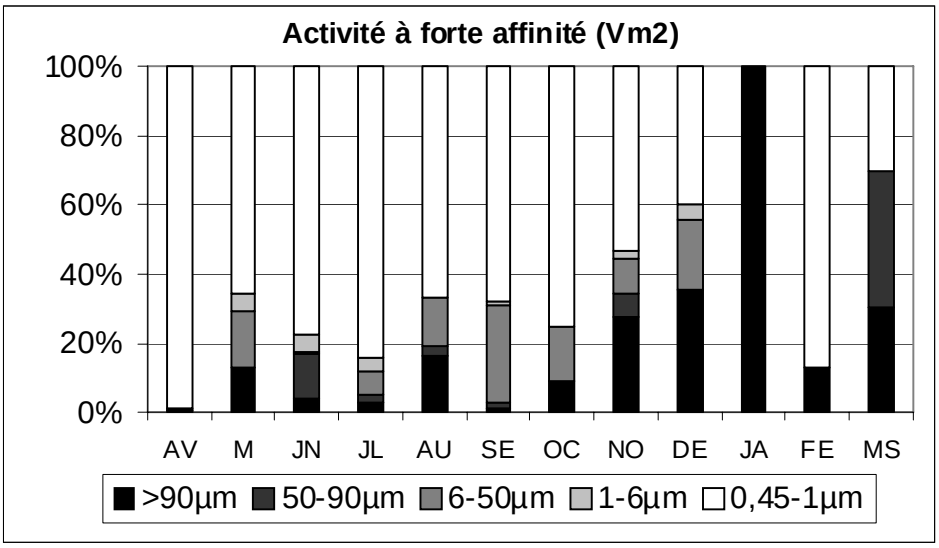

Figure 29 : contribution (en %) de chaque classe de taille à l'activité particulaire à forte affinité (Vm2) mesurée avec le MUF-P, dans la Grande Rade

Sauf en hiver, toutes les classes de taille contribuent à l'activité à forte affinité (figure 64) mais la contribution majeure provient de la plus petite classe (0,45-1 µm) (Figure 29), ce qui corrobore les observations faites dans la Petite Rade. Sa contribution est particulièrement élevée aux périodes de forte activité, notamment en avril juillet et septembre.

Ces données indiquent que l'activité phosphatasique exoenzymatique serait essentiellement due à la plus petite classe de taille. C'est plus particulièrement le cas lorsque les activités phosphatasiques sont élevées (avril, juillet et septembre notamment).

1.6.4 Contribution des classes de taille à la Vmax spécifique

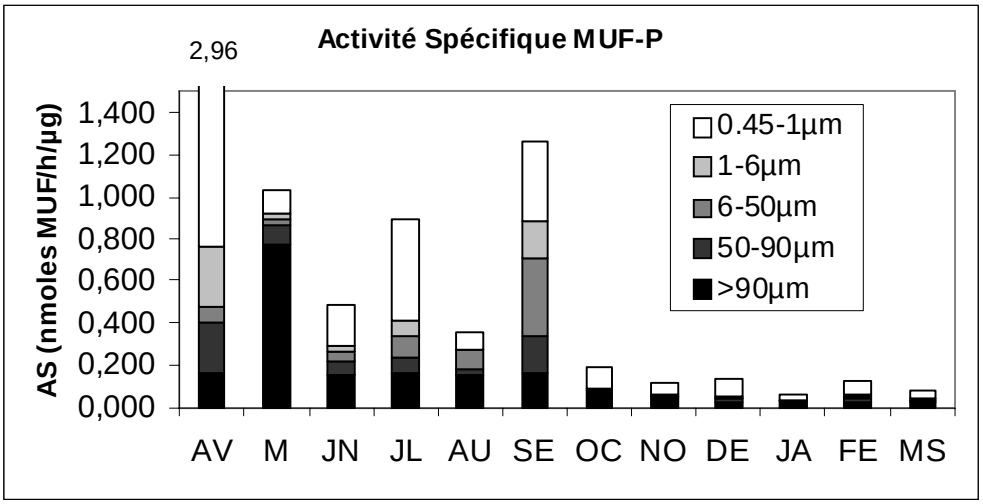

Figure 30 : valeurs empilées de l'activité spécifique mesurée avec le MUF-P pour chaque classe de taille, dans la Grande Rade

Les activités spécifiques mesurées avec le MUF-P (figure 30), sont plus élevées pour les plus grandes et les plus petites classes de taille (0,15 nmoles MUF/h/µg et 0,32 nmoles MUF/h/µg pour les classes >90 µm et 0,45-1 µm). Pour les autres, ces activités sont assez voisines (0,06 nmoles MUF/h/µg pour 50-90 µm, 0,07 nmoles MUF/h/µg pour 6-50 µm et 0,05 nmoles MUF/h/µg pour 1-6 µm).

Sur l'ensemble du cycle les activités spécifiques de la Grande Rade sont comparables à celles de la Petite Rade. Ponctuellement, des activités plus élevées ont été relevées en septembre et en avril pour la plus petite classe de taille.

Avec le pNPP (figure 31), et sur l'ensemble de l'année, l'activité spécifique la plus forte est celle de la plus grande classe de taille (2,3 nmoles pNP/h/µg). Les activité des autres classes sont assez voisines et varient entre 0,36 nmoles pNP/h/µg pour la classe 6-50 µm et 1,44 nmoles pNP/h/µg pour la classe 0,45-1 µm). Comme avec le MUFP, les activités spécifiques moyennes sont comparables à celles enregistrées dans la Petite Rade.

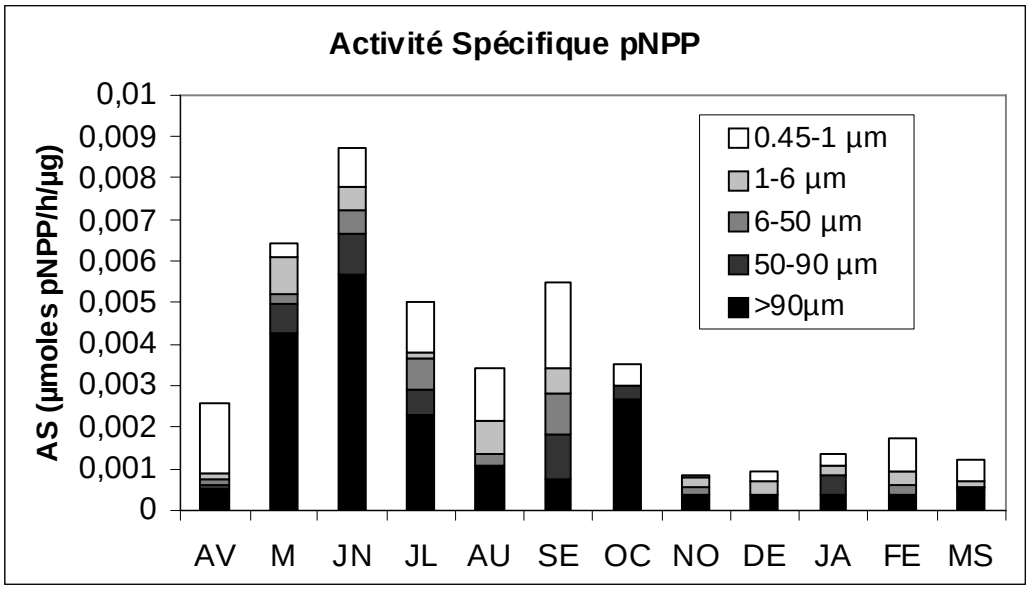

Figure 31 : valeurs empilées de l'activité spécifique (AS)mesurée avec le pNPP pour chaque classe de taille, dans la Grande Rade

1.6.5 Contribution des classes de taille à l'activité spécifique à faible affinité

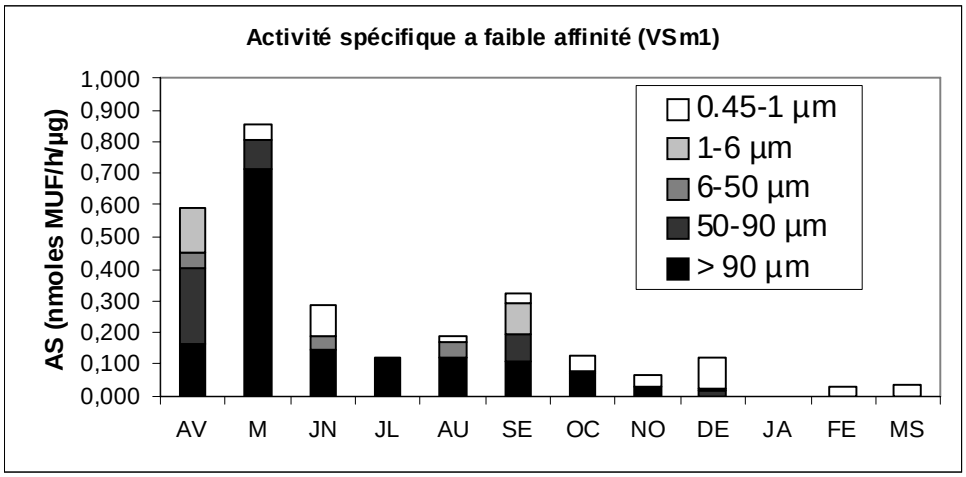

Figure 32 : valeurs empilées de l'activité spécifique(AS) à faible affinité (Vm1) pour chaque classe de taille, dans la Grande Rade

L'activité a faible affinité de la Grande Rade est essentiellement supportée par la classe >90 µm (Figure 32). Cependant en avril et en septembre, les classes de taille intermédiaires y contribuent également. A partir de novembre, cette activité est très basse voire indécelable, en particulier en janvier.

1.6.6 Contribution des classes de taille à l'activité spécifique à forte affinité

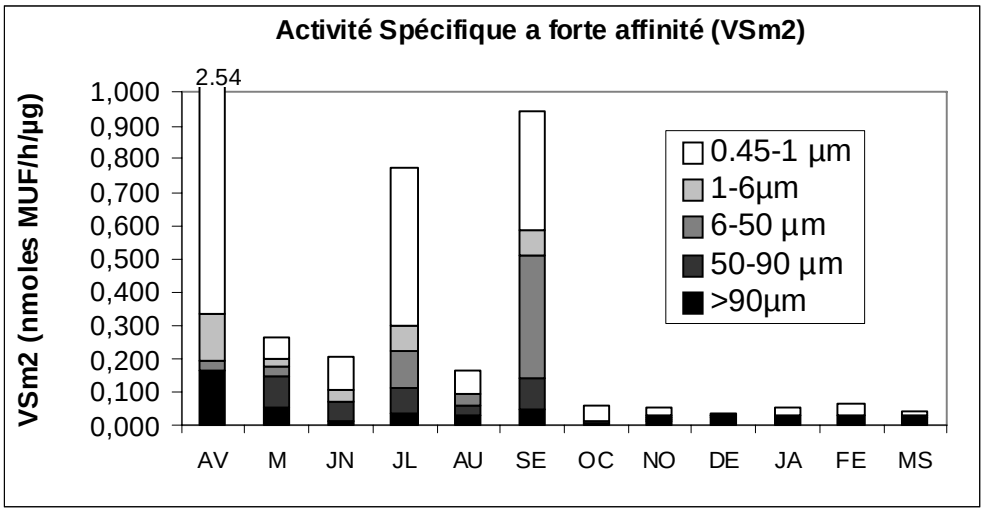

Figure 33 : valeurs empilées de l'activité spécifique à forte affinité (Vm2) pour chaque classe de taille, dans la Grande Rade

Tout comme dans la Petite Rade, la fraction 0,45-1 µm est majoritairement responsable de la composante à forte affinité (Figure 33). Les classes intermédiaires apportent également une contribution notable à certaines périodes. C'est le cas septembre pour la fraction 6-50 µm.

2 Activités du matériel particulaire intact

2.1 Contribution des différentes classes de taille

La technique utilisée pour mesurer l'activité exoenzymatique de diverses classe des taille est identique à celle présentée lors da présentation des résultats de la Petite Rade. Cette activité a été mesurée en utilisant le pNPP comme seul substrat.

En ce qui concerne la Grande Rade (figure 34), la majeure partie de l'activité exoenzymatique est supportée par la classe de taille <1 µm sauf en juillet où la contribution de la fraction 1-50 µm est encore plus importante.

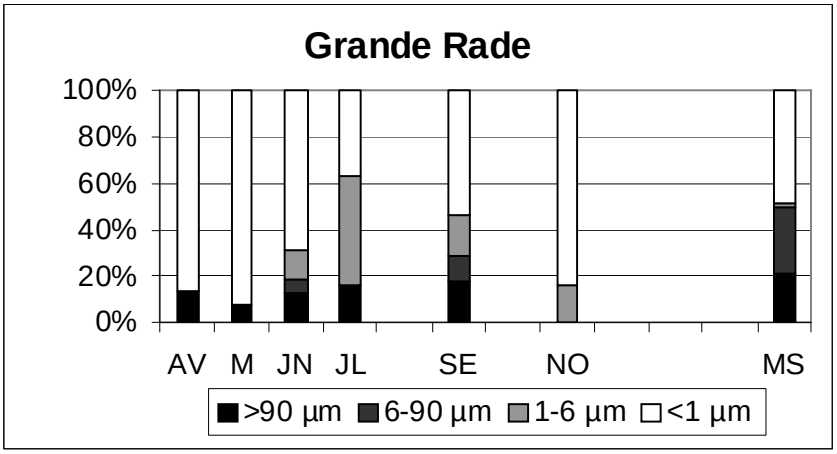

Figure 34: contribution (en %) au cours d'un cycle annuel des différentes fractions particulaires à l'activité exoenzymatique dans la Grande Rade

2.2 Activité de la classe de taille >90 µm

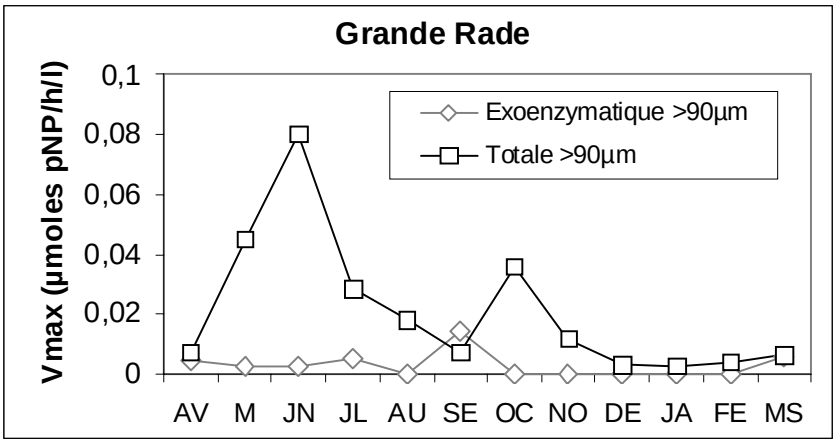

Figure 35: comparaison au cours d'un cycle annuel de l'activité exoenzymatique (non broyée) et de l'activité totale pour la fraction >90 µm (broyée) dans la Grande Rade

Dans la Grande Rade (figure 35), les activités exoenzymatiques de cette classe de taille sont basses et comparables à celles de la Petite Rade. Elles présentent des valeurs sensiblement plus élevées en septembre et en mars.

L'activité du matériel particulaire broyé est la plupart du temps beaucoup plus élevée que celle de l'activité exoenzymatique, ce qui témoigne de la présence d'une activité phosphatasique intracellulaire forte.

Ces observations confirment que la fraction de taille >90 est le siège d'une activité intracellulaire importante entre mai et juillet, et d'une activité exoenzymatique qui est souvent moins élevée.

2.3 Activité de la classe de taille 6-90 µm

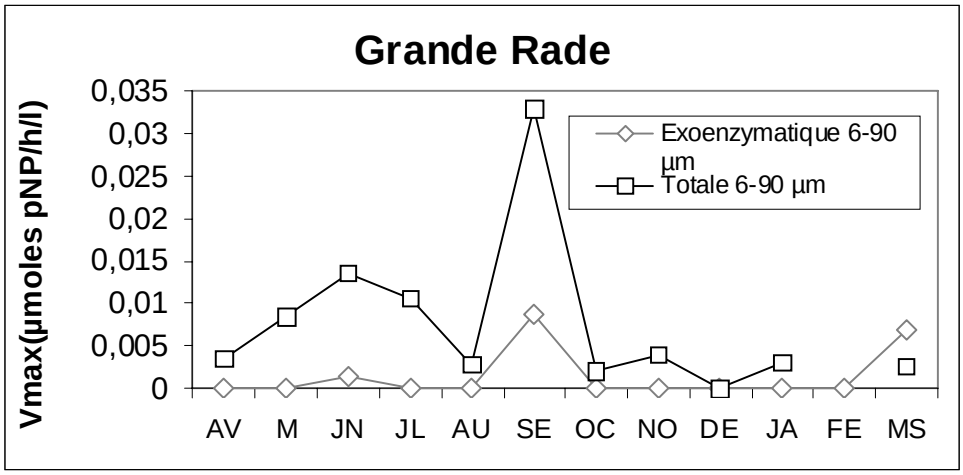

Figure 36: comparaison de l'activité exoenzymatique et de l'activité totale pour la fraction 6-90 µm dans la Grande Rade

Comme l'activité de la classe précédente, l'activité de la classe de taille 6-90 du matériel particulaire intact s'élève notablement en septembre et en mars (Figure 36). L'activité du matériel broyé est beaucoup plus élevée, en particulier en septembre mais aussi de mai à juillet, ce qui témoigne de la présence d'une forte activité intracellulaire à ces périodes.

2.4 Activité de la classe de taille 1-6 µm

L'activité de cette classe n'a pas été présentée en raison de son très faible niveau et des imprécisions dans son calcul qui en résultent.

2.5 Activité de la classe de taille <1 µm

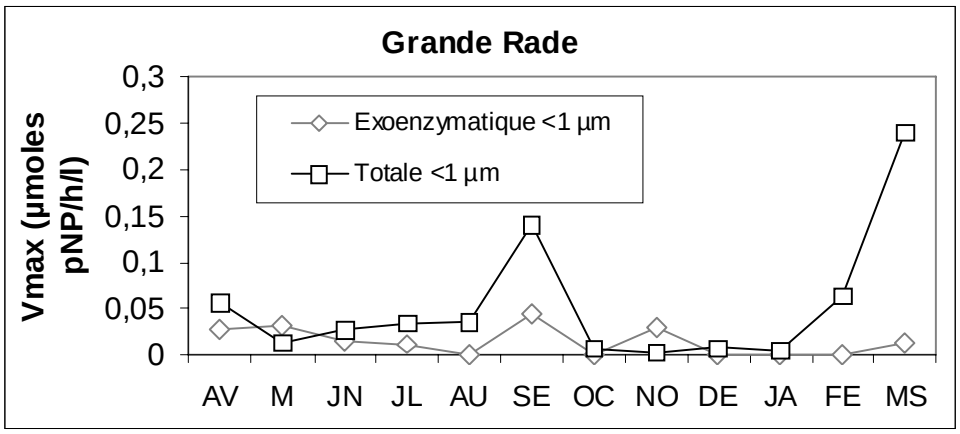

Figure 37: comparaison de l'activité exoenzymatique et de l'activité totale pour la fraction <1 µm dans la Grande Rade

Les activités exoenzymatiques de cette plus petite fraction sont notablement plus élevées en avril, mai et en septembre. Elles augmentent fortement en septembre et en mars quand elles sont mesurées sur du matériel broyé, ce qui indique qu'une activité intracellulaire relativement élevée existe à ces périodes (Figure 37).

2.6 Résumé pour le matériel particulaire intact

Cette étude menée sur le matériel particulaire intact a permis de préciser la contribution de différentes classes de taille dans l'activité exoenzymatique.

La contribution la plus importante provient de la classe de taille <1 µm dont l'activité représente en moyenne plus de 60 % de l'activité particulaire totale. La comparaison des activités mesurées sur le matériel broyé et intact a permis de confirmer que :

- la classe de taille >90 µm est le siège d'une activité intracellulaire plus élevée que l'activité exoenzymatique. Cette activité intracellulaire culmine entre mai et juillet.
- les classes de taille 6-90 µm et 1-6 µm présentent des activités exoenzymatiques élevées en période de fortes efflorescences (septembre et mars).
- la classe <1 µm présente forte activité exoenzymatique mais également une activité intracellulaire très importante ; cette dernière est d'ailleurs prépondérante. Les activés intracellulaires et exoenzymatiques culminent en septembre.

Résultats, Chapitre V : mise en évidence des relations entre les activités phosphatasiques et les principaux groupes planctoniques

Présentation :

Ce chapitre est destiné à préciser le rôle du zooplancton, du phytoplancton et des bactéries dans la production des activités phosphatasiques particulaires et dissoutes. Pour cela nous analyserons l'évolution des activités enzymatiques au cours du cycle annuel en relation avec les principaux groupes planctoniques.

Nous considèrerons le cas des activités particulaires à fortes affinités que les travaux présentés dans les précédents chapitres ont permis de mettre en relation avec l'hydrolyse des composés phosphorés présents dans l'eau de mer.

Nous considèrerons également les activités à faible affinité qui sont principalement localisées à l'intérieur des cellules planctoniques et qui portent sur des substrats intracellulaires.

Nous analyserons les activités totales qui représentent la somme des activités à forte et faibles affinité.

L'activité dissoute sera enfin considérée. Comme l'activité particulaire, cette dernière comporte des composantes à forte et à faible affinités.

L'exploitation statistique de ces résultats sera effectuée au moyen du test non paramétrique de Spearman que nous appliquerons aux activités phosphatasiques rapportées au volume d'eau de mer à la biomasse protéinique ainsi qu'à l'abondance des principaux groupes planctoniques.

Au préalable nous présenterons l'évolution des abondances de ces groupes et de leur biomasse. Nous présenterons l'évolution de la biomasse planctonique mesurée par dosage des protéines ou de la chlorophylle. Nous présenterons ensuite l'évolution des abondances des principales communautés planctoniques, le zooplancton, le phytoplancton et les bactéries.

1. Paramètres biotiques 191
1.1 Biomasse protéique 191
1.1.1 Dans la Petite Rade 191
1.1.2 Dans la Grande Rade 192
1.2 Concentration en chlorophylle 194
1.2.1Dans la Petite Rade 194
1.2.2 Dans la Grande Rade 194
1.3 Communautés et biomasse planctoniques 195
1.3.1 Le Bactérioplancton 195
Dans la Petite Rade 195
Dans la Grande Rade 195
1.3.2 Le Phytoplancton 196
Dans la Petite Rade 197
Dans la Grande Rade 197
1.3.3 Le Zooplancton 198
Dans la Petite Rade 198
Dans la Grande Rade 200
2. Relations avec les activités phosphatasiques particulaires 201
2.1 Cas de l'activité exoenzymatique 201
2.2 Activité particulaire des classes de taille 202
2.2.1 Classe de taille >90 µm 202
Cas des activités par litre 202
Activités spécifiques 204
2.2.2 Classe de taille 1-90 µm 206
Activités par litre 206
Activités spécifiques 209
2.2.3 Classe de taille 0,45-1 µm 211
3. Relations avec les activités phosphatasiques dissoutes 212
4. Résumé 214

1. Paramètres biotiques

1.1 Biomasse protéique

La biomasse a été mesurée par la concentration en protéines du matériel particulaire des échantillons d'eau prélevés. Les résultats sont présentés par classes de taille séparés par filtrations successives.

1.1.1 Dans la Petite Rade

Contribution moyenne annuelle des différentes classes de taille

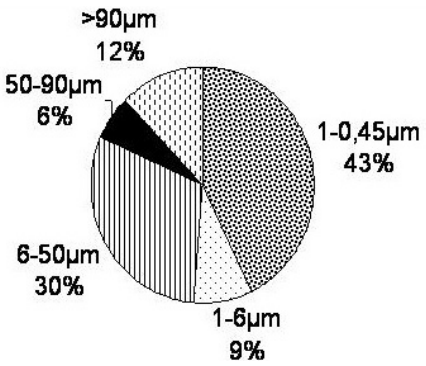

Figure 1: contribution des différentes classes de taille à la biomasse protéique dans la Petite Rade

Sur l'ensemble du cycle, deux classes de taille contribuent à plus de 70 % de la biomasse protéique : les classes 60-50 µm et 0,45-1 µm. (Figure 1).

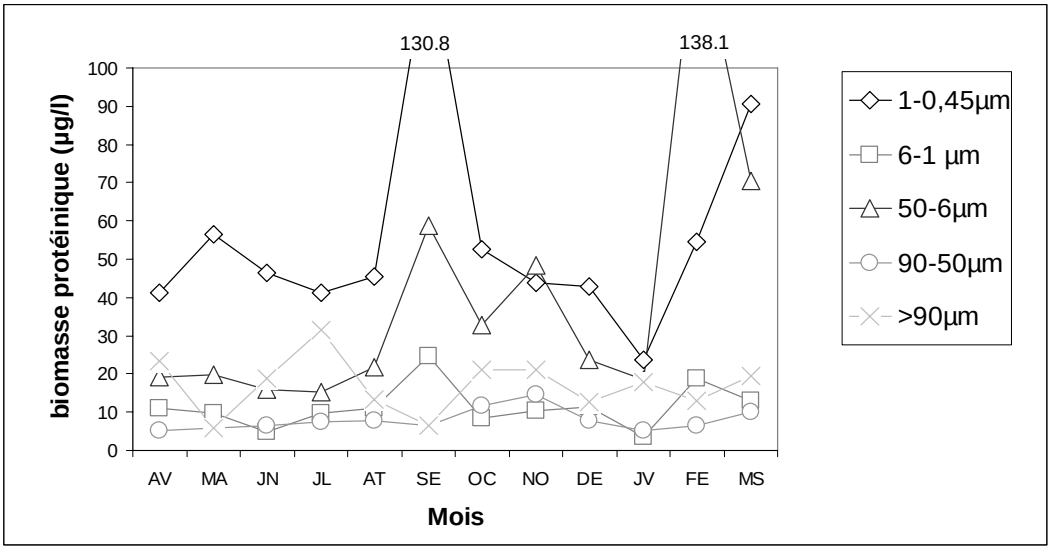

Figure 2: biomasse protéique en µg/l dans la Petite Rade de Toulon pour chaque classe de taille

La classe de taille 0,45-1 µm présente des biomasses très élevées en septembre et en mars. La biomasse protéique de la classe 6-50 µm culmine en février. Elle présente également de fortes valeurs en septembre et en novembre.

Les biomasses des autres classes sont nettement moins élevées en particulier celles des classes 1-6 µm et 50-90 µm. La biomasse de la classe >90 représente en moyenne 12 % de l'ensemble des fractions de taille. Ses valeurs culminent en juillet ainsi qu'en octobre et novembre.

L'évolution des autres classes est beaucoup plus fluctuante, et leur niveau est très bas (Figure 2).

1.1.2 Dans la Grande Rade

Contribution moyenne annuelle des différentes classes de taille

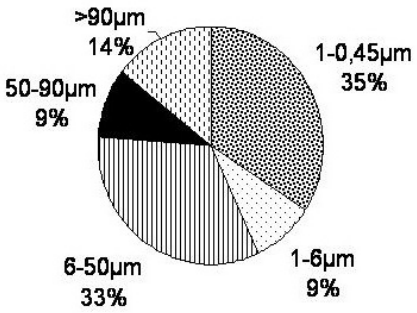

Figure 3: contribution des différentes classes de taille à la biomasse protéique dans la Grande Rade

Le profil des contributions des différentes classes de taille à la biomasse protéique de la Grande Rade est comparable à celui de la Petite Rade. Comme dans la Petite Rade la contribution majeure à la biomasse protéique provient des classes de taille 0,45-1 µm et 6-50 µm qui comptent pour 68 %. La part exercée par la plus grande clase de taille (>90 µm : 14 %) est sensiblement plus élevée que dans la Petite Rade (Figure 3).

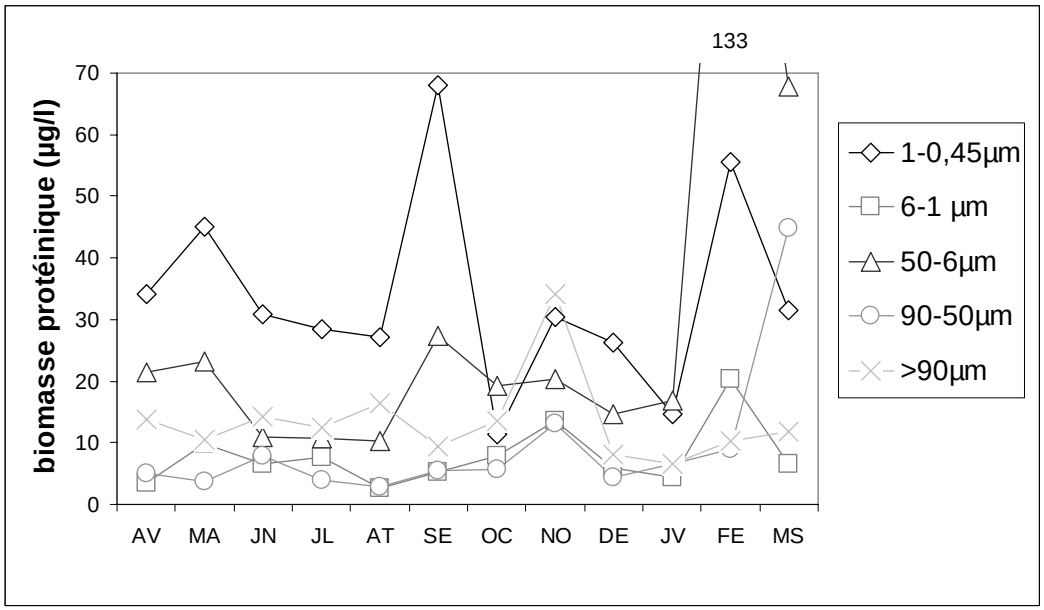

Figure 4 : biomasse protéique en µg/l dans la Grande Rade de Toulon pour chaque classe de taille.

Les biomasses protéiques des classes de taille 0,45-1 µm et 6-50 µm présentent une évolution tout à fait analogue avec des pics en septembre et en février, la biomasse de la première classe culminant en septembre et celle de la deuxième, en février. Ces biomasses sont également relativement élevées en avril et mai. Les biomasses de la classe de taille >90 µm sont plus faibles que les précédentes, sauf en août mais surtout en novembre2005. Les biomasses de la classe 50-90 µm sont elles aussi très faibles sauf en février où elles augmentent fortement.

Les biomasses protéiques de la Grande Rade sont le plus souvent inférieures à celles de la Petite Rade. Les différences sont surtout significatives pour la fraction 1-6 µm (p=0,01) (Figure 4).

1.2 Concentration en chlorophylle

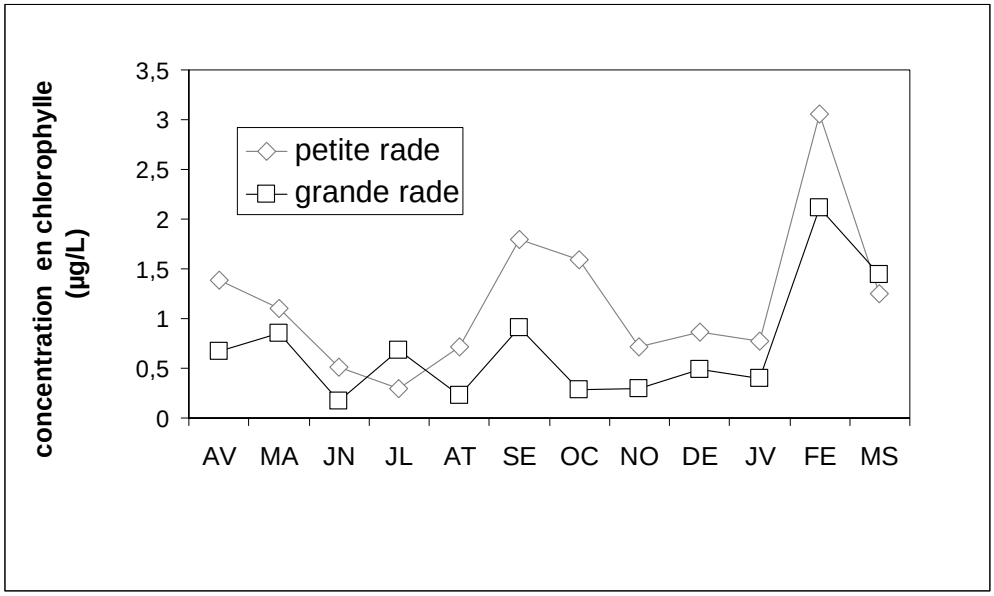

Figure 5: concentration en chlorophylle en µg.l^{-1} dans les deux rades

1.2.1Dans la Petite Rade

L'évolution des concentrations en chlorophylle dans la Petite Rade de Toulon est marquée par des valeurs élevées en avril (1,38 µg.l^{-1}), septembre (1,8 µg.l^{-1}) et février (3,05 µg.l^{-1}) (Figure 5).

Il est à noter que l'évolution des concentrations en chlorophylle est corrélée de manière statistiquement significative à celle des concentrations en protéines pour les classe de taille 6-50 µm et 1-6 µm (test de Spearman $p< 0,05$).

1.2.2 Dans la Grande Rade

L'évolution annuelle des concentrations en chlorophylle de la Grande Rade suit celle de la Petite Rade (figure 5) Néanmoins, les concentrations moyennes y sont moins élevées (1,17 µg.l^{-1} pour la Petite Rade et 0,71 µg.l^{-1} pour la Grande Rade). Ces différences sont statistiquement significatives (test de Wilcoxon $p< 0,05$).

Comme dans la Petite Rade, l'évolution des concentrations en chlorophylle est bien corrélée avec celles des concentrations protéiques des classes 6-50 µl et 1-6 µm.

1.3 Communautés et biomasse planctoniques

1.3.1 Le Bactérioplancton

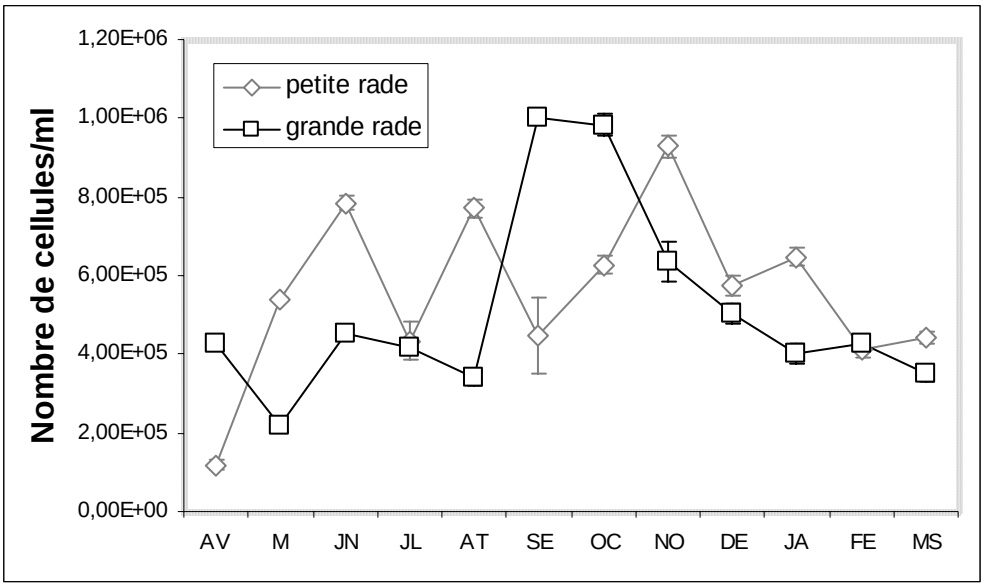

Figure 6 : abondance des cellules du Bactérioplancton (en nombre de cellules.ml^{-1} dans les deux rades. Les barres représentent l'erreur standard du nombre de bactéries par champ de comptage.

Dans la Petite Rade

La densité moyenne annuelle du bactérioplancton dans la Petite Rade est de 5,3.10^5 cellules par ml. Elle fluctue beaucoup entre juillet et décembre 2005. Les valeurs les plus élevées ont été relevées en novembre avec 9,3.10^5 cellules par ml, période où l'hydrodynamisme et le matériel en suspension étaient élevés (Figure 6).

Dans la Grande Rade

Sur l'ensemble de l'année, la densité bactérienne moyenne de la Grande Rade est de 4,90.10^5 cellules par ml. Cette densité est inférieure à celle de la Petite Rade mais les différences ne sont pas statistiquement significatives, sur l'ensemble de l'année.

L'évolution des densités phytoplanctoniques de la Grande Rade est marquée par une période d'efflorescence en septembre-octobre 2005 avec des valeurs qui atteignent 1 million de cellules par ml. Pendant le reste de l'année, les abondances sont plus stables et varient entre 2.10^5 et 5.10^5 cellules par ml). Cette évolution est bien corrélée à celle de la Petite Rade ($p<0,05$) (Figure 6).

1.3.2 Le Phytoplancton

Nous avons représenté l'évolution des abondances totales des cellules phytoplanctoniques des deux sites, puis distingué celles des deux principaux groupes qui constituent cette communauté : les Dinophycées et les Bacillariophycées. A partir des mesures de biovolumes, une estimation de la biomasse de ces cellules a été faite.

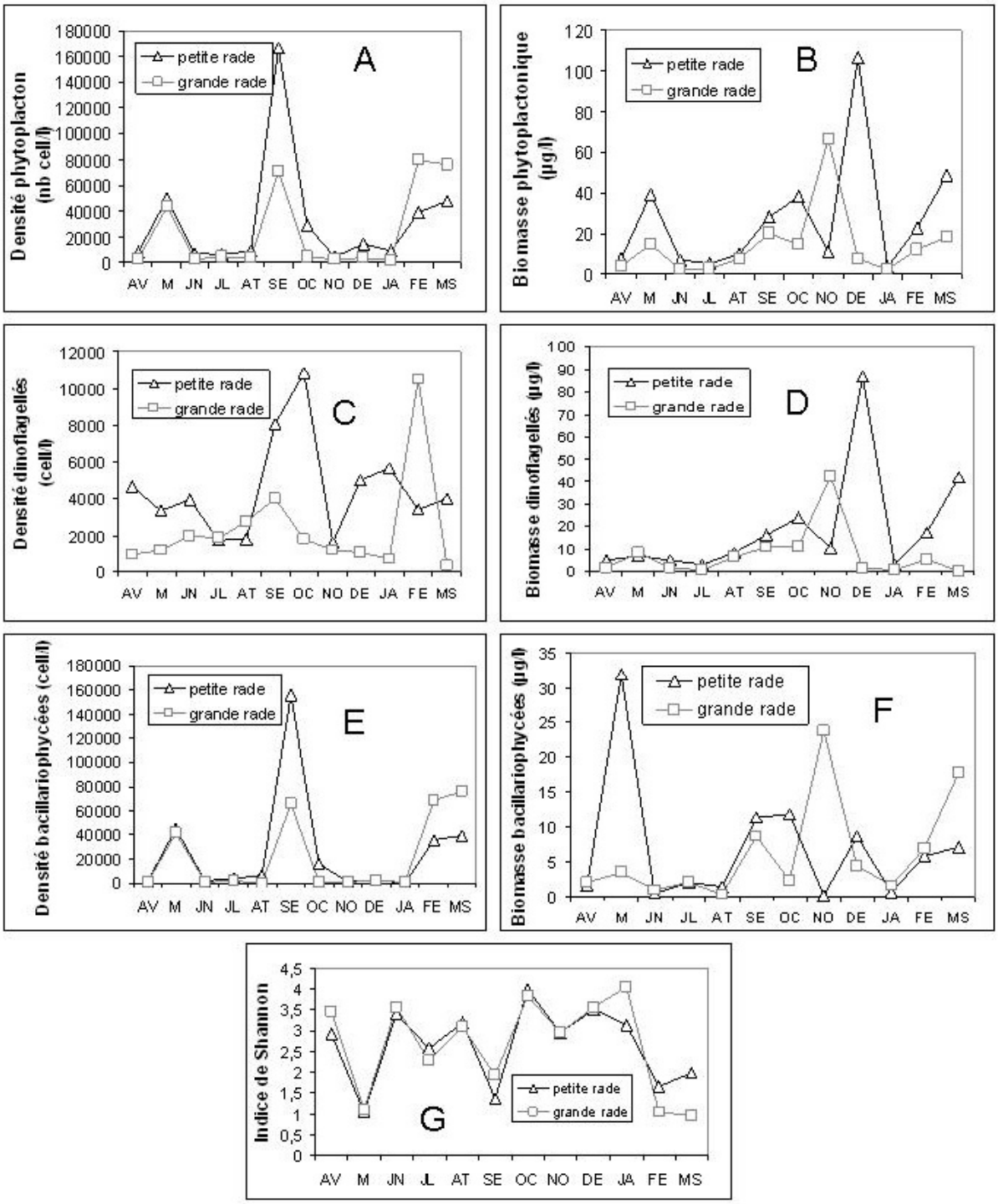

Figure 7: densité (en nombre de cellules par litre) et biomasse (en µg par litre) pour le plancton total (A et B), pour les Dinoflagellés (C et D), pour les Bacillariophycées (E et F) et indice de Shannon (G).

Dans la Petite Rade

La densité moyenne de l'ensemble des cellules phytoplanctonique de la Petite Rade est de $3,2.10^4$ cellules par litre. Trois périodes de plus fortes densités ont été relevées (figure 7) : en mai 2005 ($4,9.10^4$ cellules par litre), en septembre 2005 ($1,7.10^5$ cellules par litre) et en février-mars 2006 ($4,8.10^4$ cellules par litre). Ces périodes d'efflorescence sont très courtes dans le temps : un mois le plus souvent, ou deux mois entre février et mars 2006.
L'abondance des Diatomées est beaucoup plus importante que celle des Dinoflagellés. Elles culminent en mai, en septembre et en mars. Leurs biovolumes sont plus élevés en mai qu'aux autres périodes.
Les abondances des Dinoflagellés culminent en octobre et décembre/janvier et leur biovolume est particulièrement élevé en décembre (Figure 7).

Dans la Grande Rade

Les abondances des cellules phytoplanctoniques sont en moyenne de $2,5.10^4$ cellules par litre d'eau de mer. Elles sont plus faibles que dans la Grande Rade et ces différences sont statistiquement significatives ($p<0,05$). Les biomasses phytoplanctoniques sont également plus faibles dans la Grande Rade avec des valeurs de 14,4 µg/l contre 27,3 µg/l dans la Petite Rade (Figure 7).
Comme dans la Petite Rade, la communauté phytoplanctonique est constituée d'une majorité de Bacillariophycées. Elles se développent en même temps que dans la Petite Rade et leur évolution est statistiquement corrélée ($p<0,05$). Mais leurs densités ne sont pas différentes d'un point de vue statistique. Il en est de même de leurs biomasses qui culminent en novembre et en mars (Figure 7).
En ce qui concerne les Dinophycées, leur abondance est significativement plus faible que dans la Petite Rade ($p=0,06$). L'évolution de leur densité se caractérise un développement printanier et automnal avec une efflorescence maximale en février 2006 (1.10^4 cellules par litre). En revanche leurs biomasses culminent en novembre et ses valeurs sont significativement plus faibles que dans la Petite Rade ($p<0,05$).

1.3.3 Le Zooplancton

Les comptages ont permis de préciser l'évolution annuelle des abondances des principaux groupes composant le zooplancton ainsi que celles des adultes et des larves.

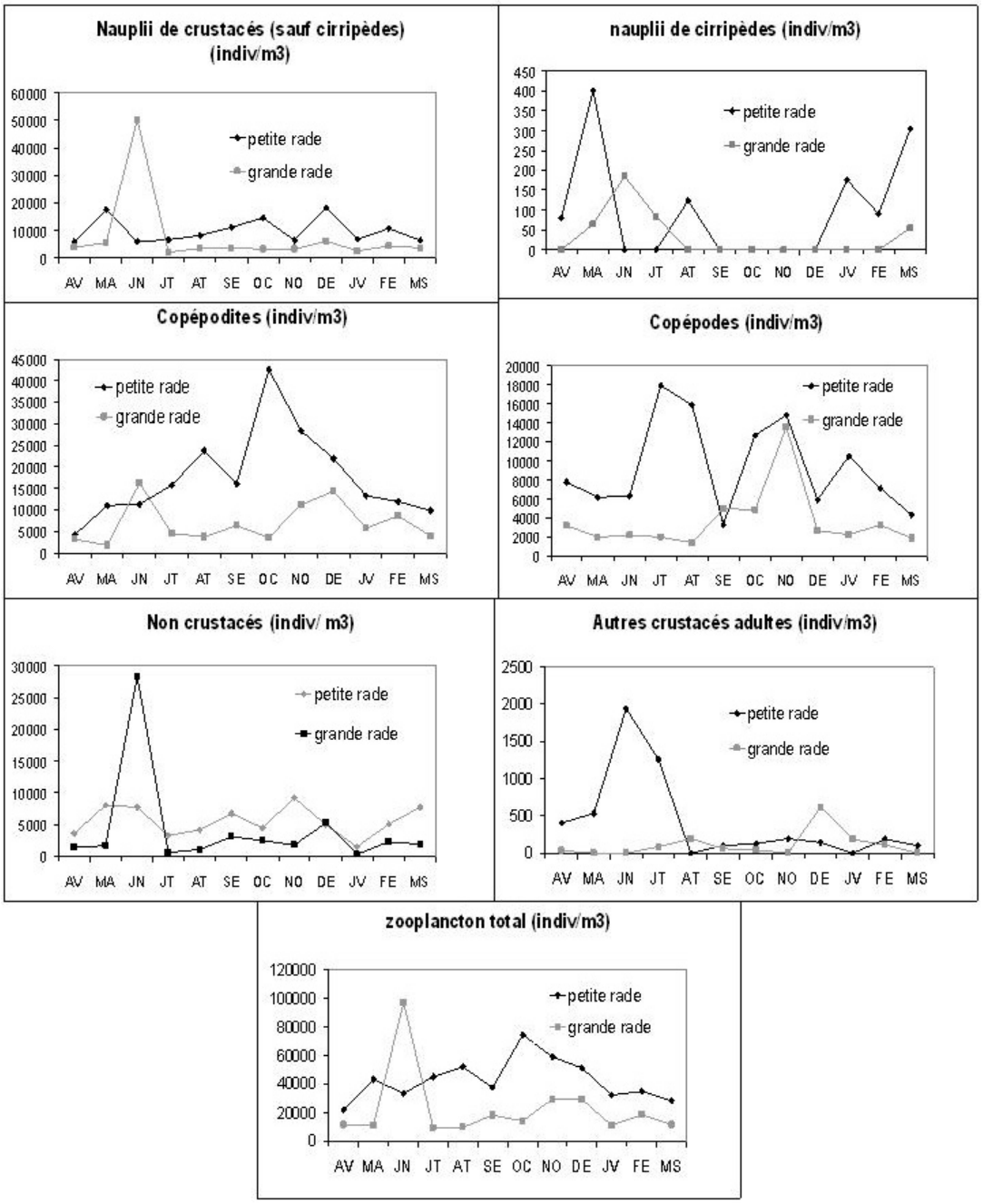

Figure 8: les différents groupes zooplanctoniques en nombre d'individus par m^3 dans les deux rades.

<u>Dans la Petite Rade</u>

L'abondance de l'ensemble du zooplancton au cours de l'année (figure 8) est maximale en octobre 2005 (74444 individus par m^3). Elle augmente régulièrement à partir d'avril (21964 individus par m^3) et diminue à partir d'octobre.

Le zooplancton est majoritairement composé de Crustacés. Ils représentent au minimum 75 % du zooplancton total (en juillet). Les Copépodes et de leurs Copépodites en sont les principaux représentants. La contribution de ces Copépodites à l'ensemble du zooplancton présente une évolution nette au cours du cycle : elle augmente régulièrement d'avril à octobre puis elle diminue jusqu'en mars (Figure 8).

L'évolution de l'abondance des Copépodes adultes est caractérisée par de fortes abondances en juillet et en novembre. L'abondance de leurs Copépodites culmine en octobre et leur abondance est bien plus élevée que celle des adultes.

Les abondances des autres Crustacés sont beaucoup moins élevées. Leur maximum est atteint en juin. Les Cirripèdes ont été détectés en mars, août, février et mars (Figure 8 et 9).

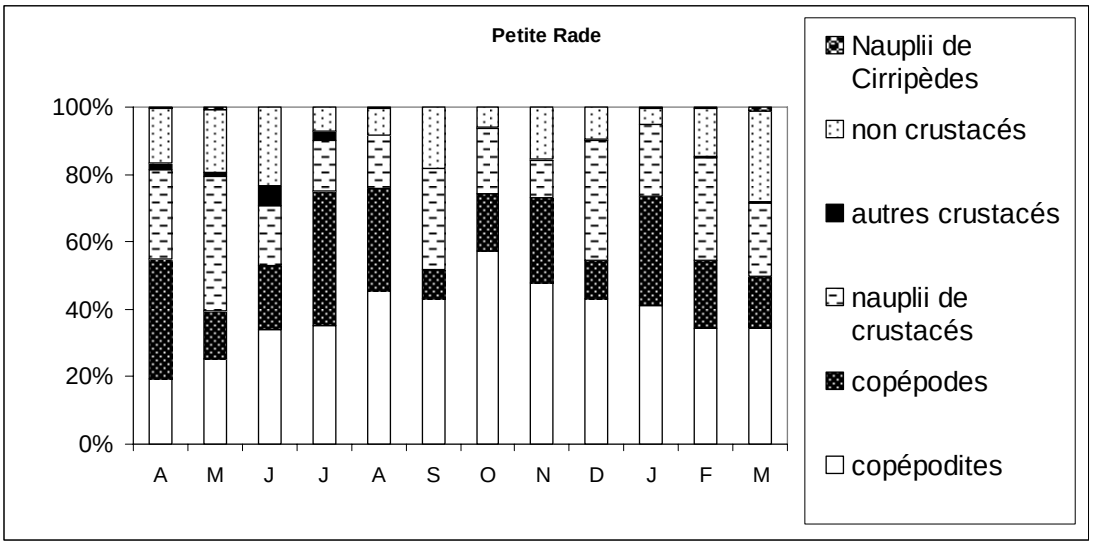

Figure 9: répartition du zooplancton en diverses classes dans la Petite Rade de Toulon. La catégorie Nauplii de Crustacés contient les Nauplii de Copépodes, les Nauplii de Cirripèdes étant une catégorie à part.

Dans la Grande Rade

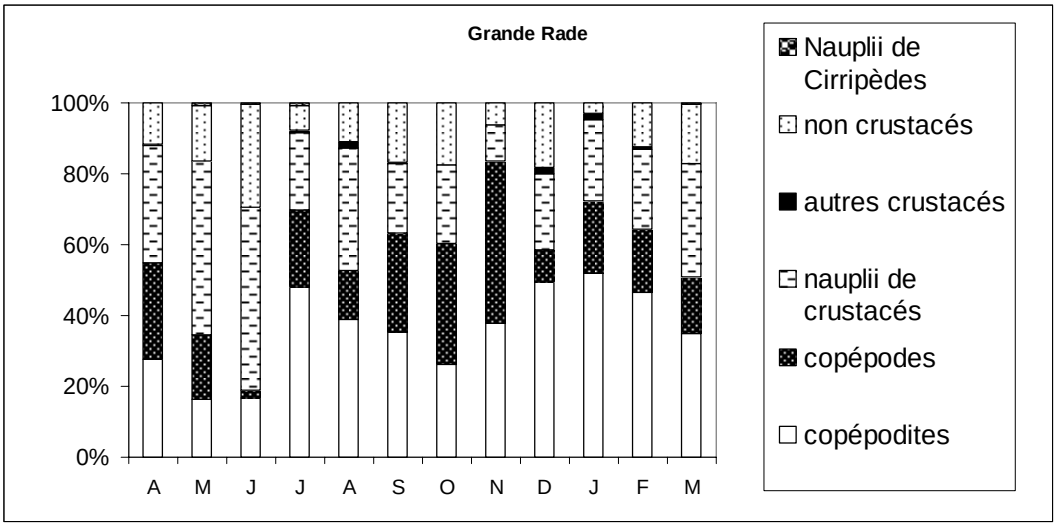

Figure 10: pourcentages des différentes classes zooplanctoniques dans la Grande Rade de Toulon. La catégorie Nauplii de Crustacés contient les Nauplii de Copépodes, les Nauplii de Cirripèdes étant une catégorie à part.

Comme dans la Petite Rade, la classe des Crustacés représente au minium 70 % du zooplancton. Au mois de juillet elle représente même près de 90 %. Comme dans la Petite Rade, les Copépodes et leurs Copépodites sont toujours les plus abondants, ainsi que les Nauplii qui peuvent représenter jusqu'à 50 % du zooplancton total (Figure 10).

L'évolution de l'abondance du zooplancton de la Grande Rade est marquée par un épisode de forte densité en juin 2005 (97107 individus par m^3, figure 8).

L'abondance des Copépodes adulte augmente fortement en novembre, celle des Copépodites culmine en juin et en octobre-novembre. Quant aux Nauplii de Cirripèdes, ils sont présents de mai à juillet 2005 ainsi qu'en mars.

Sur l'ensemble de l'année, les densités zooplanctoniques totales comme celles de leurs larves ou des adultes, sont beaucoup plus élevées dans la Petite Rade et ces différences intersites sont statistiquement significatives (test de Wilcoxon $p = <0,05$). Par ailleurs, leur évolution au cours de l'année est bien corrélée (test de Spearman $p < 0,05$).

2. Relations avec les activités phosphatasiques particulaires

2.1 Cas de l'activité exoenzymatique

Il s'agit de la Vmax de l'activité mesurée par différence entre l'activité brute de l'eau de mer et l'activité dissoute. C'est l'activité de l'ensemble du matériel particulaire intact.

Dans la Petite Rade, l'évolution de cette activité peut être mise en relation avec celle des densités de l'ensemble des organismes phytoplanctoniques.

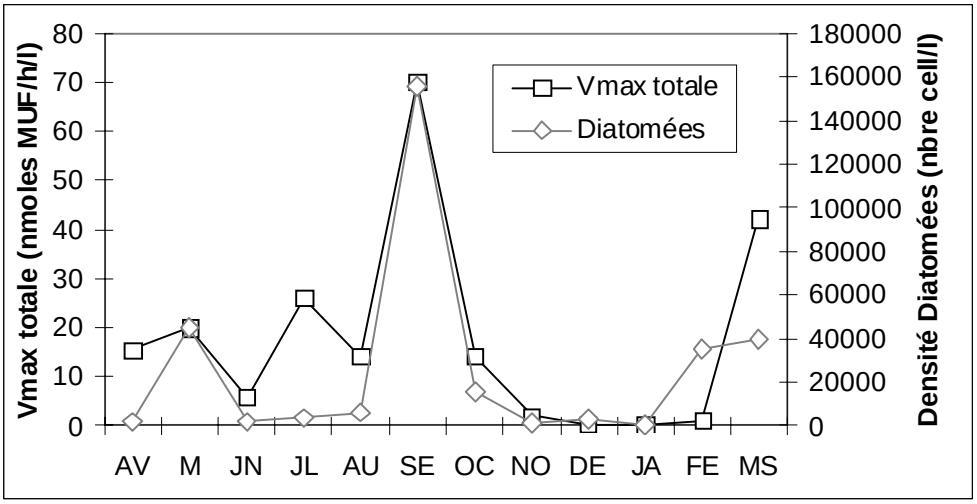

Figure 11: relation entre la Vmax totale totale du matériel particulaire intact et la densité cellulaire des Diatomées dans la Petite Rade

Les deux paramètres présentent le même optimum en mai, en septembre et en mars et de très faibles niveaux de novembre à janvier. Mais cette corrélation n'est pas statistiquement significative. Elle devient très significative (p=0,03) avec les Diatomées (figure 11) alors qu'elle ne l'est pas avec les Dinoflagellés (p=0,94).

Les relations avec les bactéries ou avec le zooplancton sont moins significatives. Néanmoins dans la Grande Rade on peut observer que l'activité phosphatasique présente une évolution qui peut être rapprochée de celle des bactéries (figure 12).

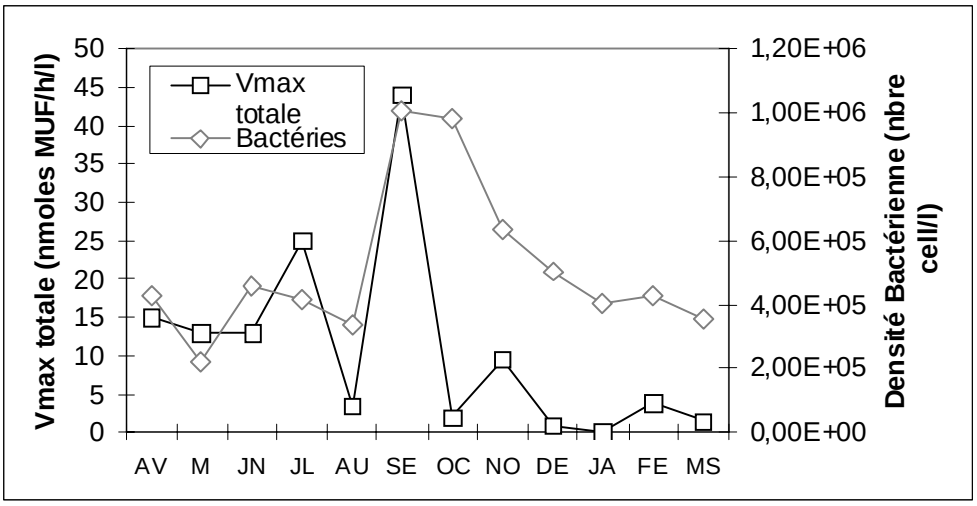

Figure 12: relation entre la Vmax totale du matériel particulaire intact et la densité cellulaire des Bactéries dans la Grande Rade

Ces donnés suggèrent que le phytoplancton et les bactéries contribuent majoritairement à l'activité exoenzymatique du matériel particulaire.

2.2 Activité particulaire des classes de taille

Une étude similaire à la précédente a été effectuée à partir des activités phosphatasiques à fortes et faibles affinités des différentes classes de taille. Elle permettra de mieux préciser le rôle des grands groupes planctoniques. Elle a été mesurée sur du matériel particulaire congelé et broyé.

2.2.1 Classe de taille >90 µm

Cette classe de taille correspond globalement au zooplancton.

<u>Cas des activités par litre</u>

Le rôle du zooplancton dans la production de l'activité phosphatasique peut être illustré dans la Petite Rade où l'évolution des activités à faible affinité (Vm1) de la fraction >90 µm semble directement en relation avec l'évolution des abondances des adultes (figure 13).

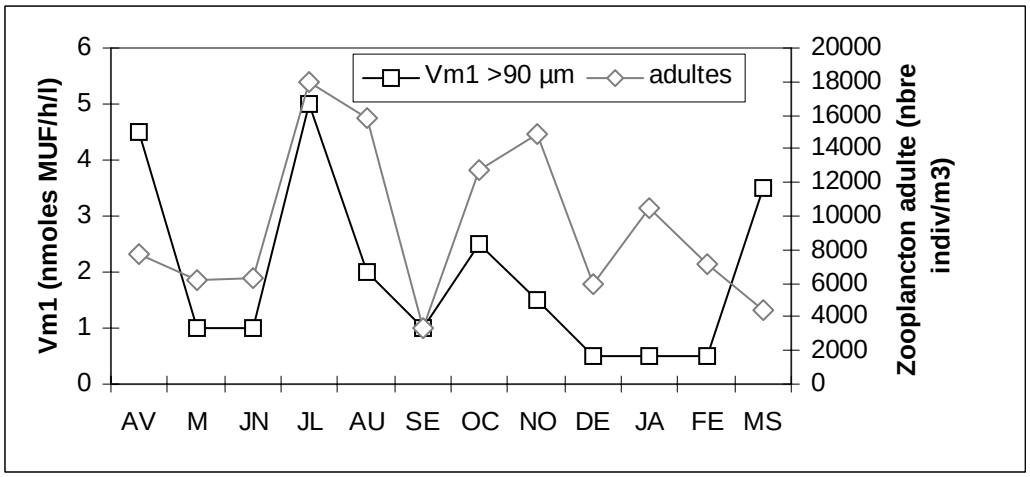

Figure 13: relation entre l'activité phosphatasique à faible affinité (Vm1) de la fraction >90 µm et l'abondance des adultes dans la Petite Rade

Toutefois l'analyse statistique ne donne qu'une valeur de p = 0,17 sur l'ensemble de l'année. Si l'on ne considère que les valeurs comprises entre mai et septembre qui correspondent à la période de plus forte activité phosphatasique, la corrélation entre l'activité à faible affinité et l'abondance des adultes est de 0,07.

Dans la Grande Rade, le rôle du zooplancton a été mis en évidence de manière statistiquement significative dans le cas des activités à faibles affinités (figure 14) pour lesquelles la corrélation avec l'abondance des adultes est significative (p=0,034).

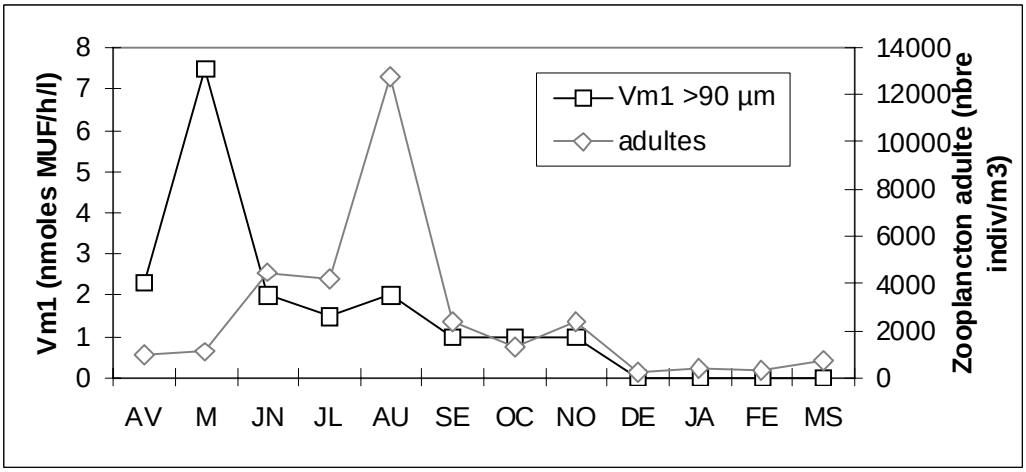

Figure 14: relation entre l'activité phosphatasique à faible affinité (Vm1) de la fraction zooplanctonique et l'abondance des adultes dans la Grande Rade

On remarquera toutefois que les pics des activités enzymatiques et des abondances planctoniques ne coïncident pas, ce qui rend les conclusions de l'analyse statistique discutable.

Une attention particulière a été portée aux Nauplii de Cirripèdes en raison des très fortes activités phosphatasiques qu'ils renferment (voir chapitre 3).

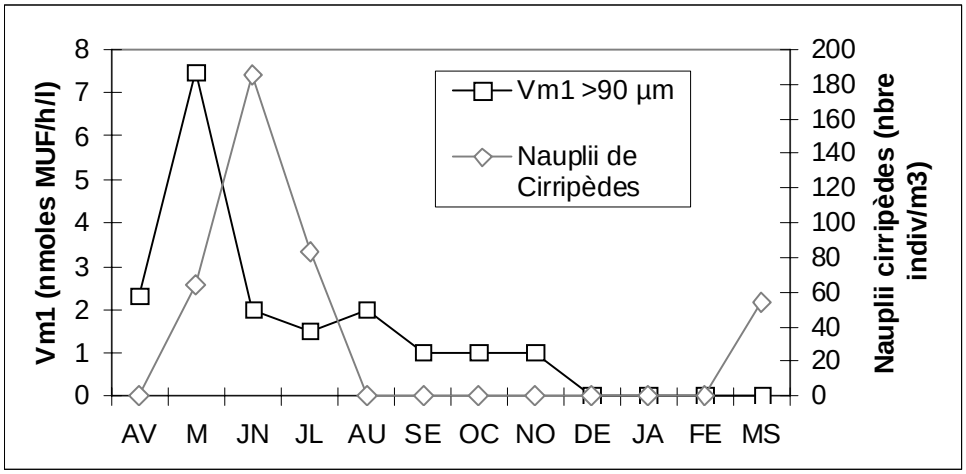

Figure 15: relation entre l'activité phosphatasique à faible affinité (Vm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction zooplanctonique et l'abondance des Nauplii de Cirripèdes dans la Grande Rade)

Dans la Grande Rade, leur présence pourrait expliquer les fortes activités observées en juin avec le MUF-P (figure 15) ou en mars dans la Petite Rade avec le pNPP (figure 16).

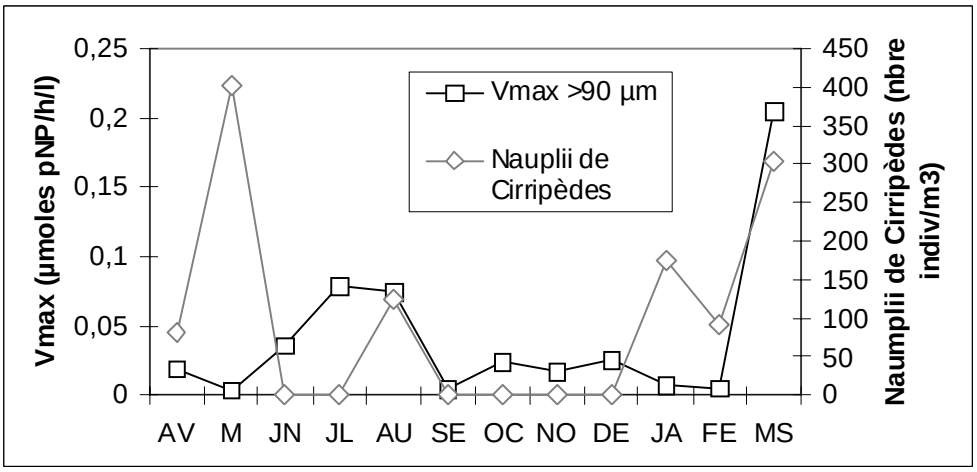

Figure 16: relation entre la Vmax mesurée avec le pNPP de la fraction zooplanctonique et de l'abondance des Nauplii de Cirripèdes dans la Petite Rade

<u>Activités spécifiques</u>

Le rôle du zooplancton dans la production d'une activité phosphatasique a été confirmé par la mise en évidence d'une corrélation significative dans la Grande Rade entre l'activité spécifique à faible affinité et l'abondance des adultes (p=0,04) (figure 17).

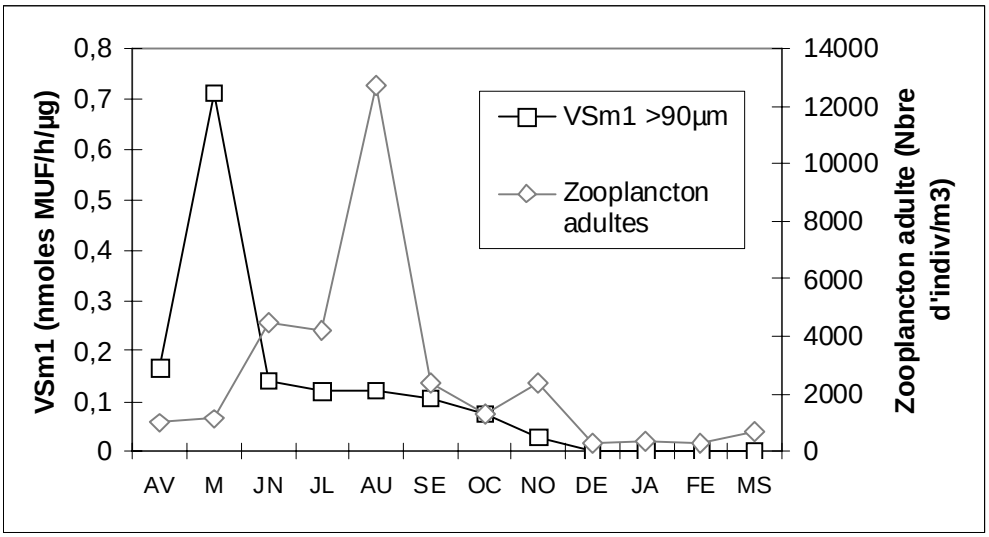

Figure 17: relation entre l'activité spécifique à faible affinité (VSm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction zooplanctonique et de l'abondance des adultes dans la Grande Rade

Cette activité peut être également mise en relation avec les abondances des larves de Cirripèdes (figure 18). Toutefois l'analyse statistique ne montre pas de corrélation significative (figure 18).

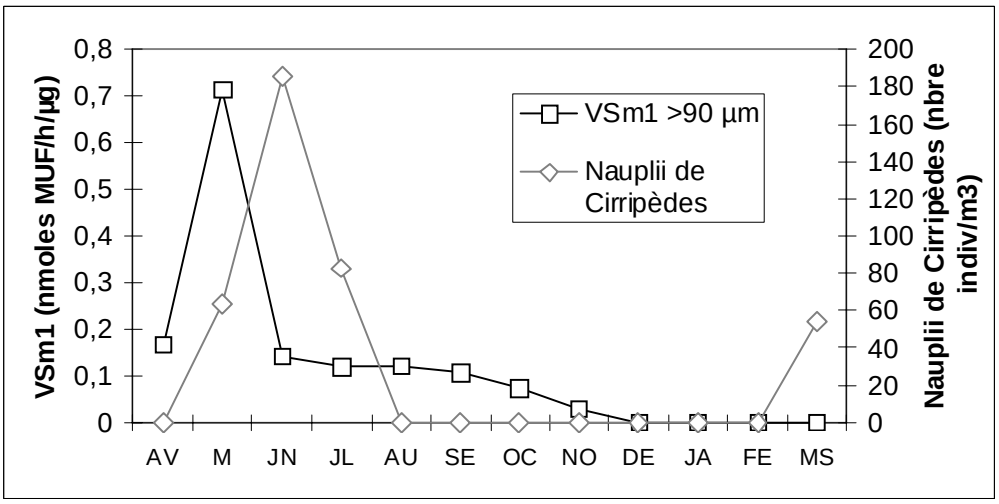

Figure 18: relation entre l'activité spécifique à faible affinité mesurée avec le MUF-P de la fraction zooplanctonique(VSm1) et l'abondance des Nauplii de Cirripèdes dans la Grande Rade

Aucune corrélation significative n'a été mise en évidence avec la densité du phytoplancton ou avec la chlorophylle ce qui confirme que l'activité phosphatasique de la classe de taille >90 µm revient essentiellement au zooplancton.

2.2.2 Classe de taille 1-90 µm

Cette classe de taille correspond globalement au phytoplancton. Les activités enzymatiques de cette classe ont été calculées à partir de celles des fractions 1-6 µm, 6-50 µm et 50-90 µm présentées précédemment.

Activités par litre

Le rôle du phytoplancton dans la production de l'activité phosphatasique peut être caractérisé dans la Petite Rade. En effet, l'activité à faible affinité des classes de taille 1-90 µm y est corrélée sur l'ensemble de l'année avec l'évolution des abondances des Diatomées (p = 0,08) (figure 19).

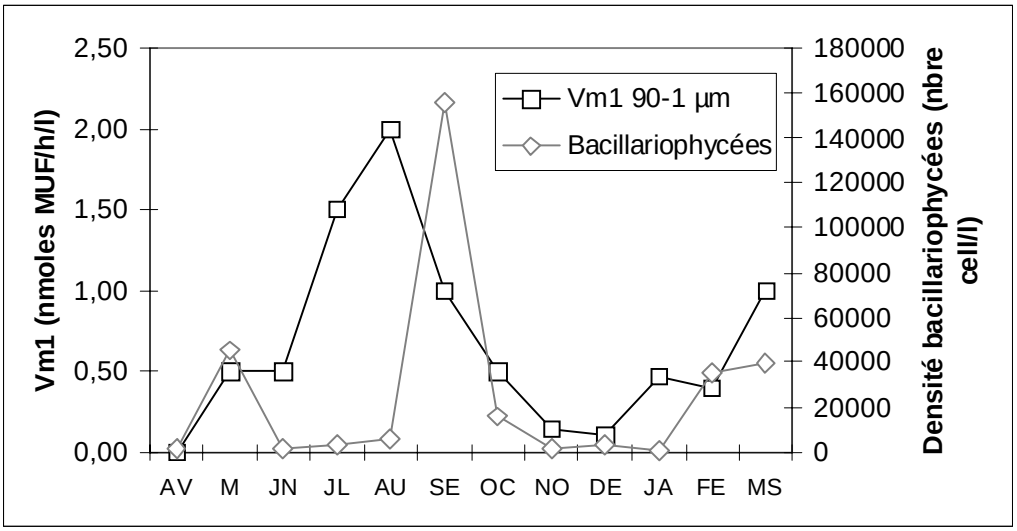

Figure 19: relation entre l'activité phosphatasique à faible affinité (Vm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction 1-90 µm et la densité des Bacillariophycées dans la Petite Rade

L'importance de ces organismes est bien illustrée par les résultats de septembre qui montrent une forte augmentation de l'activité à faible affinité en même temps qu'une forte augmentation de l'abondance des Diatomées. Les Diatomées peuvent être mise en relation plus précisément avec la Vmax totale de la classe de taille 1-50 µm (p=0,037) (figure 20B) ainsi qu'avec l'activité à faible affinité de la classe de taille 1-6 µm (p=0,041) (figure 20A).

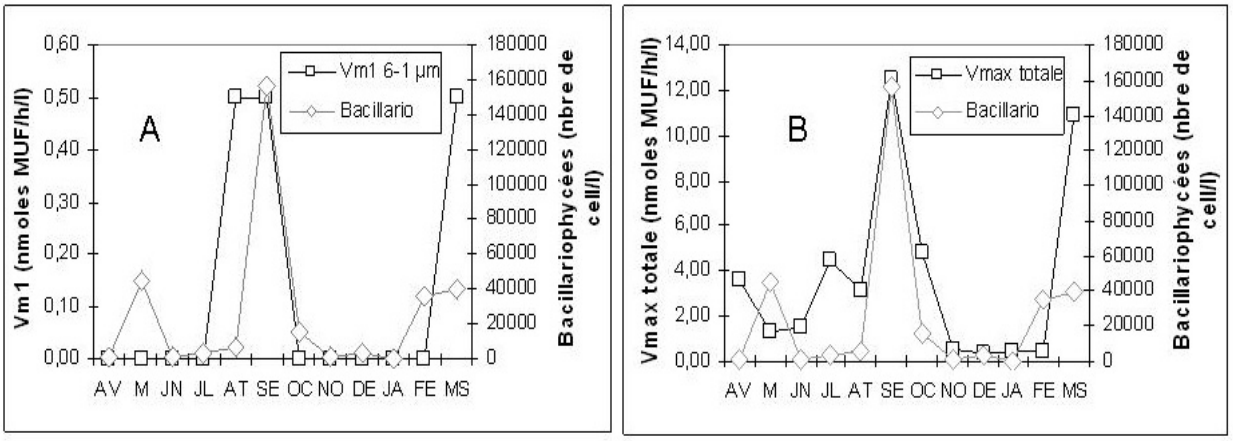

Figure 20: relation entre la densité des Bacillariophycées et la Vmax à faible affinité (Vm1) de la fraction 1-6 µm (A) et la Vmax totale de la fraction 1-50 µm (B) dans la Petite Rade

Les Dinoflagellés contribuent également à la production de l'activité phosphatasique. Leur rôle est démontré par la corrélation significative entre l'évolution de leur abondance et celle de l'activité à faible affinité de la classe de taille 6-50 µm (p=0,022) (figure 21). Il s'agit toutefois d'une corrélation inverse.

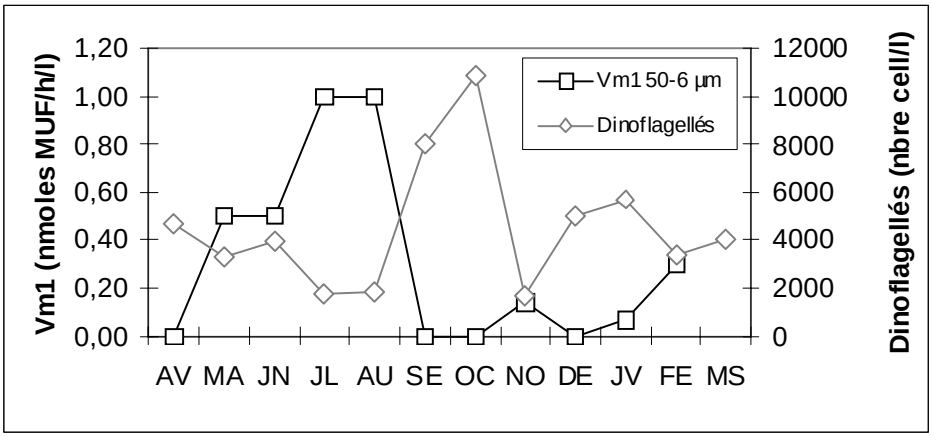

Figure 21: relation entre l'activité phosphatasique à faible affinité (Vm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction 6-50 µm et la densité des Dinoflagellés dans la Petite Rade

Dans la Grande Rade, le rôle des Dinoflagellés est souligné par les corrélations statistiquement significatives entre l'évolution de leur abondance et celle de l'activité totale de la classe de taille 6-50 µm (p=0,06) (figure 22).

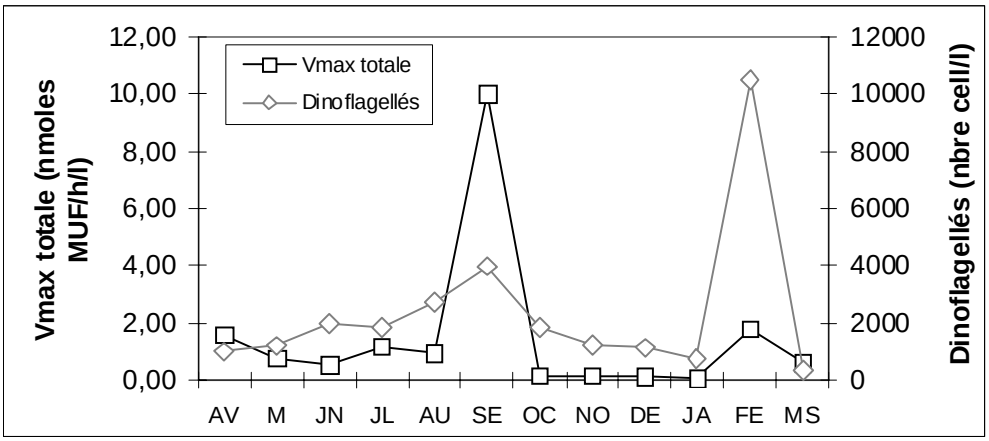

Figure 22: relation entre la Vmax totale mesurée avec le MUF-P de la fraction 6-50 µm et la densité des Dinoflagellés dans la Grande Rade

Le rôle des Diatomées est par ailleurs démontré car leur abondance est assez bien corrélée avec l'activité à forte affinité de cette classe (p=0,08) (figure 23).

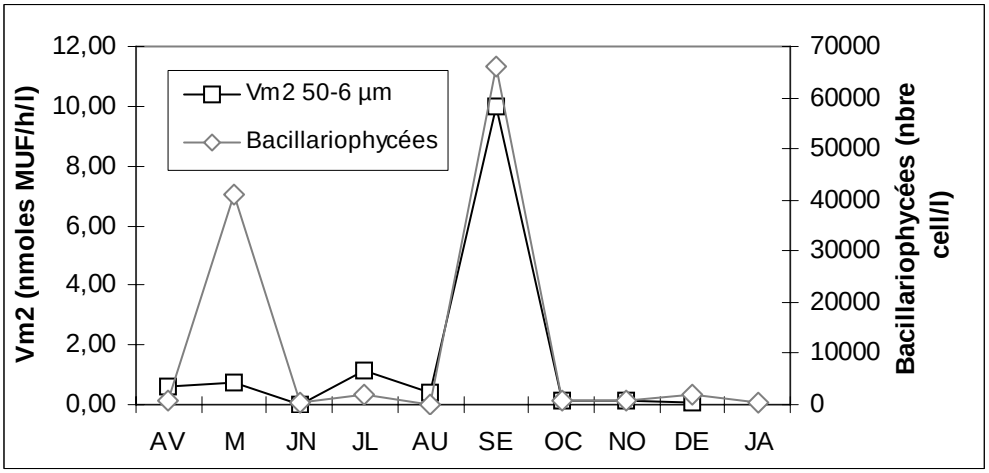

Figure 23: relation entre la Vmax à forte affinité (Vm2) mesurée avec le MUF-P de la fraction 6-50 µm et la densité des Bacillariophycées dans la Grande Rade

L'activité à forte affinité de la classe 6-50 µm est également corrélées dans la Grande Rade avec l'évolution des concentrations de chlorophylle : (p = 0,08) (figure 24).

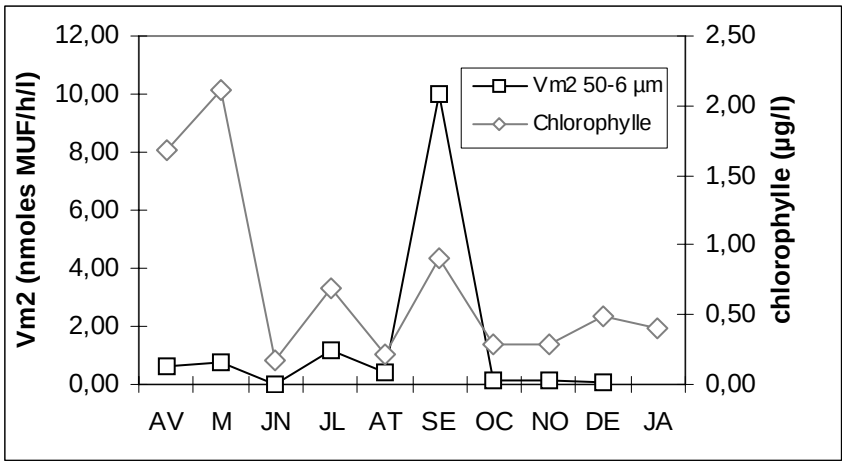

Figure 24: mise en relation entre la Vmax à forte affinité (Vm2) mesurée avec le MUF-P de la fraction 6-50 µm et la concentration en chlorophylle dans la Grande Rade

Toutefois les activités des deux derniers mois n'ont pas été considérées en raison de leur très faible niveau et de l'imprécision du calcul des Vmax.

Dans le cas du pNPP, on notera la très bonne corrélation avec l'évolution de l'abondance des Dinoflagellés dans la Grande Rade et l'activité phosphatasique totale de la fraction 6-50 µm (p=0,022) (figure 25).

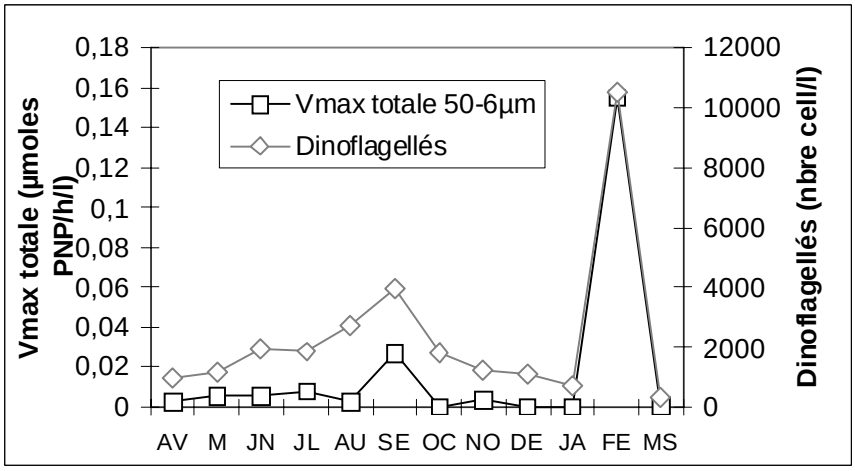

Figure 25: relation entre la Vmax totale mesurée avec le pNPP de la fraction 6-50 µm et la densité des Dinoflagellés dans la Grande Rade

<u>Activités spécifiques</u>

Le rôle du phytoplancton dans la production de l'activité phosphatasique est démontré dans la Petite Rade par les corrélations inverses significatives entre l'activité spécifique à faible affinité de la classe de taille 6-50 µm et l'abondance des Dinoflagellés (p=0,03) (figure 26).

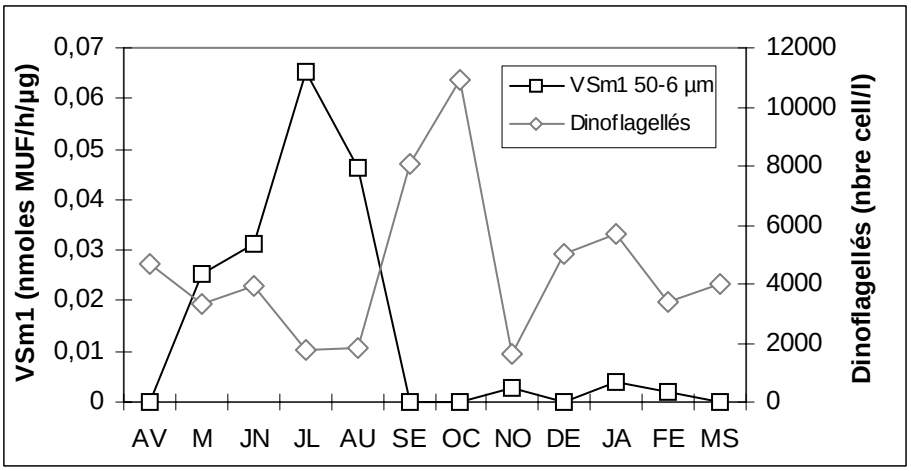

Figure 26: relation entre l'activité spécifique à faible affinité (VSm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction 6-50 µm et la densité des Dinoflagellés dans la Petite Rade

Cette activité phosphatasique est également corrélée de façon inverse avec la chlorophylle (p=0,02) (figure 27).

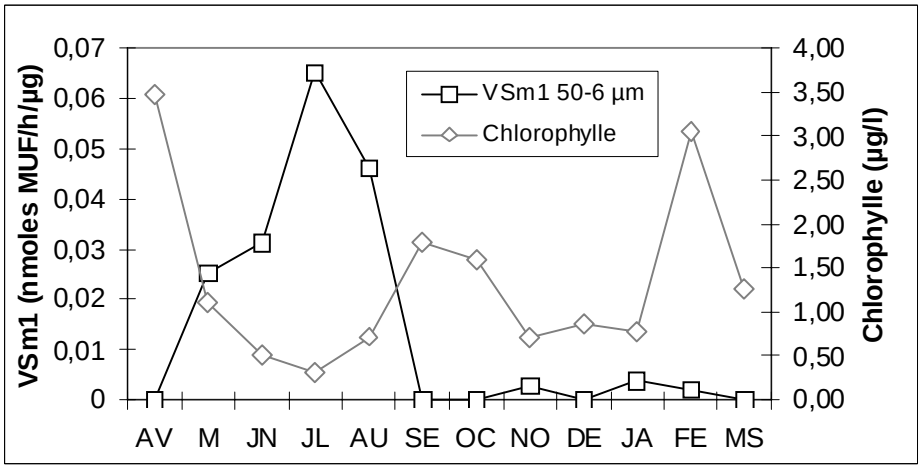

Figure 27: relation entre l'activité spécifique à faible affinité (VSm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction 6-50 µm et la concentration en chlorophylle dans la Petite Rade

Une corrélation significative a été également caractérisée entre l'activité phosphatasique à faible affinité de la fraction 1-6 µm et l'abondance des Diatomées (p=0,04) (figure 28).

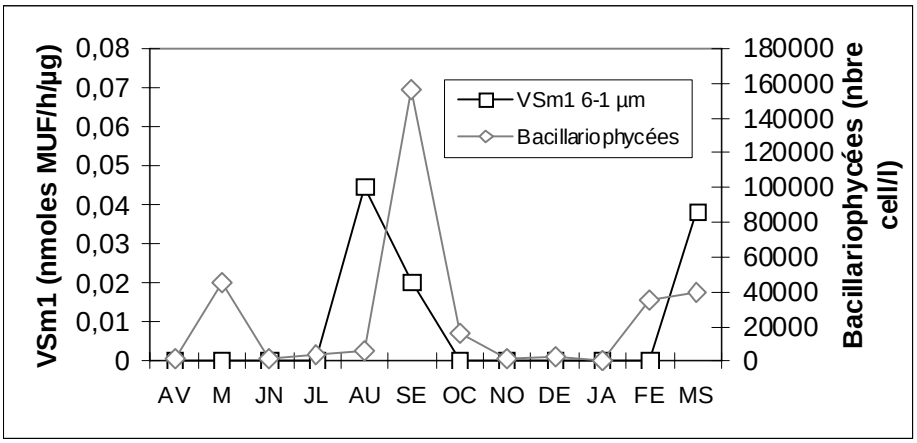

Figure 28: relation entre l'activité spécifique à faible affinité (VSm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction 1-6 µm et la densité des Bacillariophycées dans la Petite Rade

2.2.3 Classe de taille 0,45-1 µm

Cette fraction correspond majoritairement aux bactéries. Dans la Petite Rade comme dans la Grande Rade, aucune corrélation significative n'a été trouvée entre les activités phosphatasiques rapportées au volume d'eau ou aux quantités de protéines, et l'évolution de l'abondance bactérienne.

La figure 29 illustre cependant des relations concordantes entre ces deux paramètres. En ce qui concerne l'activité totale mesurée avec le MUF-P dans la Petite Rade, on peut même observer une corrélation inverse (Figure 29A).

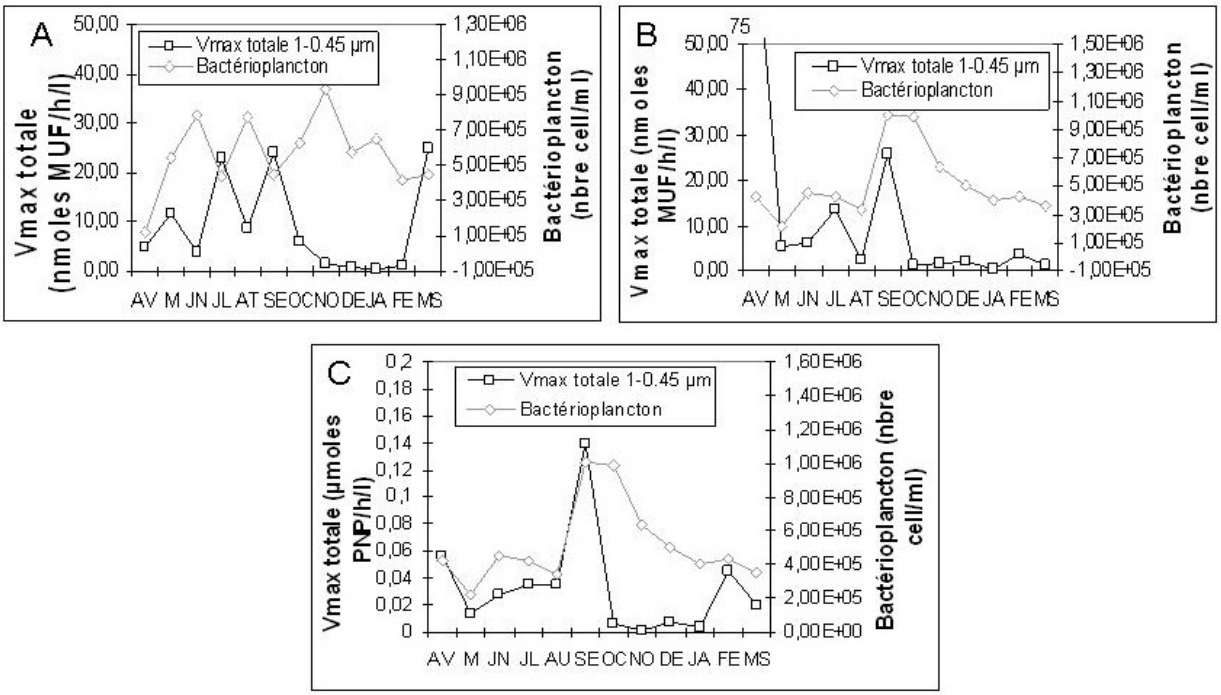

Figure 29: relation entre la densité du Bactérioplancton et l'activité phosphatasique totale (VmT) mesurée avec le MUF-P de la fraction 0,45-1 µm dans la Petite Rade (A), dans la Grande Rade (B) et mesurée avec le pNPP dans la Grande Rade (C)

3. Relations avec les activités phosphatasiques dissoutes

Comme l'activité particulaire, l'activité dissoute est constituée d'activités à forte et à faible affinités. La contribution de l'activité à faible affinité est beaucoup plus importante que celle des activités à forte affinité (chapitre 4).

Cette activité dissoute peut être mise en relation avec le phytoplancton. En effet les activités phosphatasiques évoluent au cours du cycle annuel comme l'abondance des Dinoflagellés et des Diatomées. Dans la Petite Rade, l'activité à faible affinité est particulièrement élevée en mai, en septembre-octobre et en janvier. Les pics de septembre-octobre et de janvier se produisent au moment où les abondances des Dinoflagellés augmentent (figure 30).

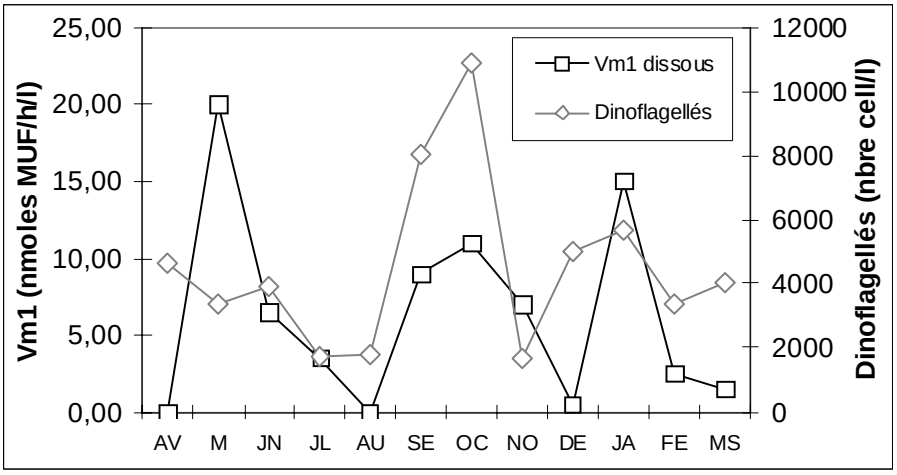

Figure 30: relation entre la Vmax à faible affinité(Vm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction dissoute, et la densité des Dinoflagellés dans la Petite Rade

En mai, l'activité à faible affinité augmente en parallèle avec la densité des Diatomées (figure 31). De fortes densités de Diatomées pourraient ainsi contribuer au pic d'activité observé en septembre-octobre.

Une analyse statistique effectuée entre avril et octobre montre que l'activité à faible affinité est corrélée avec l'abondance des Diatomées (p=0,08 entre avril et octobre) (figure 31). En revanche la corrélation avec les Dinoflagellés est moins bonne (p=0,4) (figure 30).

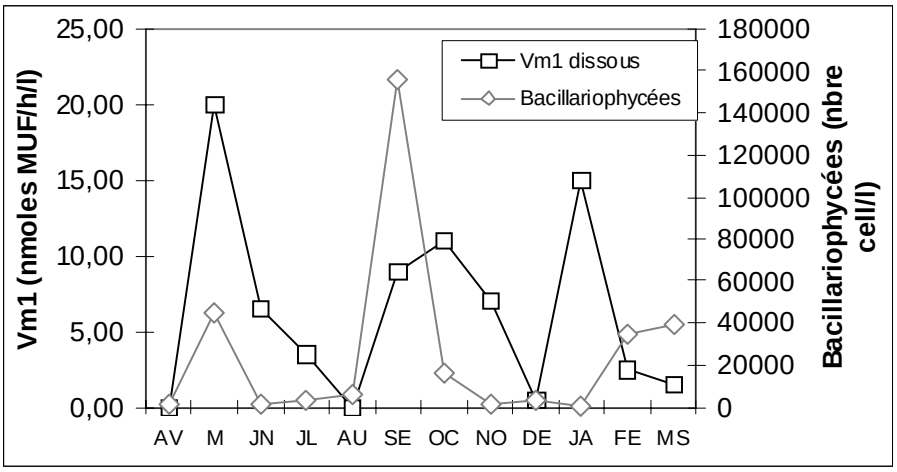

Figure 31: relation entre la Vmax à faible affinité (Vm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction dissoute, et la densité des Bacillariophycées dans la Petite Rade

Dans la Grande Rade, l'analyse des relations entre l'évolution des activités à faible affinité et des abondances planctoniques confirme le rôle du phytoplancton dans production de l'activité dissoute. L'activité à faible affinité présente trois pics : en mai, septembre et janvier. Les deux premiers se produisent à des périodes où les abondances des Diatomées sont très élevées (figure 32). L'analyse statistique effectuée à partir des données obtenues entre avril et novembre montre que la corrélation est statistiquement significative (p=0,04). Le troisième pic d'activité qui se produit en janvier ne semble pas dû aux Diatomées dont les abondances n'augmentent qu'en février.

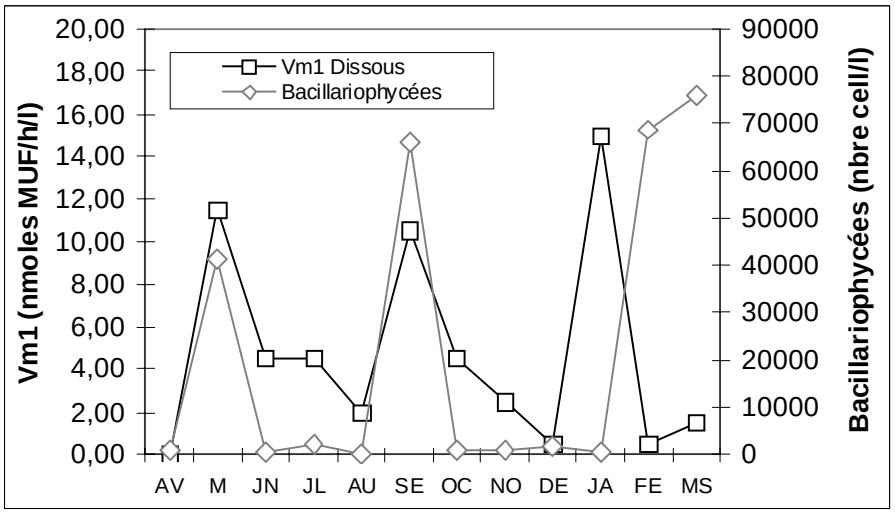

Figure 32: relation entre la Vmax à faible affinité (Vm1) mesurée avec le MUF-P de la fraction dissoute, et la densité des Bacillariophycées dans la Grande Rade

Ces résultats indiquent que l'activité à faible affinité dissoute dans l'eau de mer pourrait provenir de cellules planctoniques. Comme une activité à faible affinité à été caractérisée à

l'intérieur de ces cellules (chapitre 5), l'activité dissoute à faible affinité pourrait provenir de contenus intracellulaires relargués dans l'eau de mer après la mort des cellules algales.

4. Résumé

L'activité à faible affinité (rapportée au volume d'eau de mer ou à la biomasse protéique) de la classe de taille >90 µm est significativement corrélée avec l'abondance du zooplancton adulte dans la Petite Rade comme dans la Grande Rade.

L'activité des fractions comprises entre 90 et 1 µm à été mise en relation avec les densités phytoplanctoniques. L'activité à faible affinité (Vm1) de la classe de taille 1-6 µm est significativement corrélée avec l'abondance des Bacillariophycées dans la Petite Rade. L'activité à forte affinité (Vm2) est corrélée significativement dans la Grande Rade avec l'abondance des Bacillariophycées et avec l'évolution des concentrations en chlorophylle.

Une corrélation entre la Vmax totale (Vm1 + Vm2) et l'abondance des Dinophycées à été mise en évidence lorsque le pNPP est utilisé comme substrat. Les activités spécifiques à faible et à forte affinité sont également corrélées avec les abondances des Dinophycées, à l'exception de la VSm1 qui est corrélée inversement avec la chlorophylle dans la Petite Rade.

L'activité de la fraction 0,45-1 µm (le bactérioplancton), ne présente aucune corrélation significative avec l'évolution de l'abondance bactérienne.

Concernant l'activité dissoute, sa composante à faible affinité (Vm1) est corrélée significativement avec les densités phytoplanctoniques des Bacillariophycées et des Dinophycées.

Résultats, Chapitre VI : mise en évidence des relations entre les activités phosphatasiques et les composés phosphorés

Présentation :

Les activités phosphatasiques sont contrôlées par les ions orthophosphates. Elles sont régulées au niveau moléculaire par ces ions qui répriment la synthèse de la phosphatase chez les organismes planctoniques, et au niveau écologique par le rapport N/P. Il en résulte que les activités phosphatasiques varient souvent à l'inverse des concentrations en orthophosphate ou dans le même sens que le rapport N/P. Ces régulations ont été bien démontrées dans des conditions stables sur les cultures de cellules planctoniques, mais leur rôle dans les milieux naturels est encore problématique, en particulier en eau de mer (voir l'introduction).
L'objet de ce chapitre est d'analyser ces relations dans la Petite Rade et de la Grande Rade de Toulon afin de mieux comprendre les mécanismes de contrôle de l'activité phosphatasique.

1. Relations avec les concentrations en orthophosphates 215
1.1 Activité à forte affinité de l'ensemble du matériel particulaire 215
1.2 Analyse des activités des différentes fractions de taille 217
2. Relations avec les rapports NO_3^-/ PO_4^{3-} 221
3. Résumé 222

1. Relations avec les concentrations en orthophosphates

1.1 Activité à forte affinité de l'ensemble du matériel particulaire

Des relations inverses ont été mises en évidence entre l'évolution des concentrations en orthophosphate et celle des activités phosphatasiques à forte affinité exoenzymatique, calculées par différence entre l'activité brute et l'activité dissoute (cf chapitre III) (figure 1).
A partir de juin dans la Petite Rade (figure 1A) comme dans la Grande Rade (figure 1B), cette activité tend à varier à l'inverse de la concentration en orthophosphate. Cependant, l'analyse statistique de Spearman révèle que cette relation n'est pas significative d'un point de vue statistique.

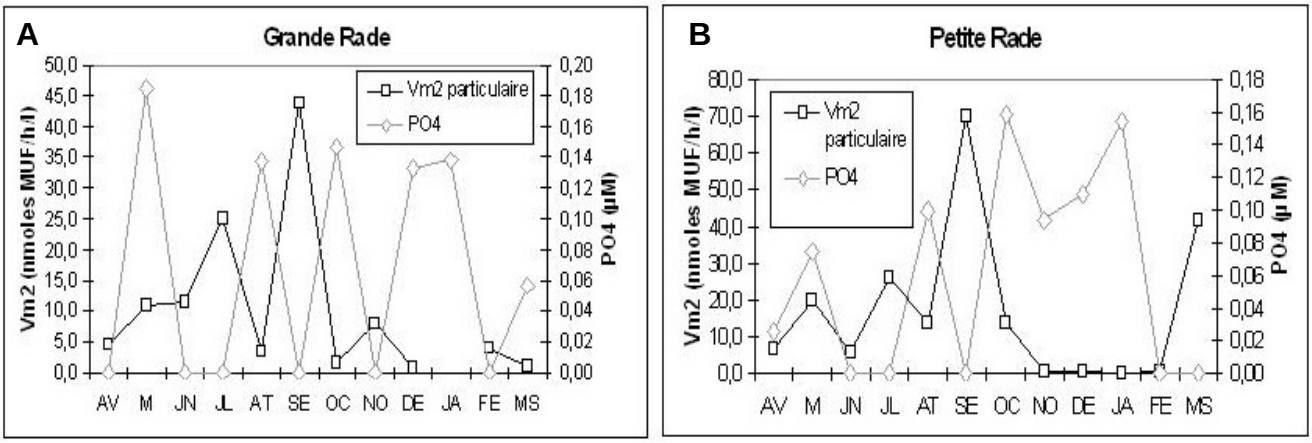

Figure 1: relations entre la Vmax à forte affinité (Vm2) du matériel particulaire intact et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Petite Rade (A) et de la Grande Rade (B)

Cette relation à été retrouvée avec l'activité à forte affinité du matériel congelé et broyé (issue du regroupement des différentes fractions du matériel particulaire) (figure 2).

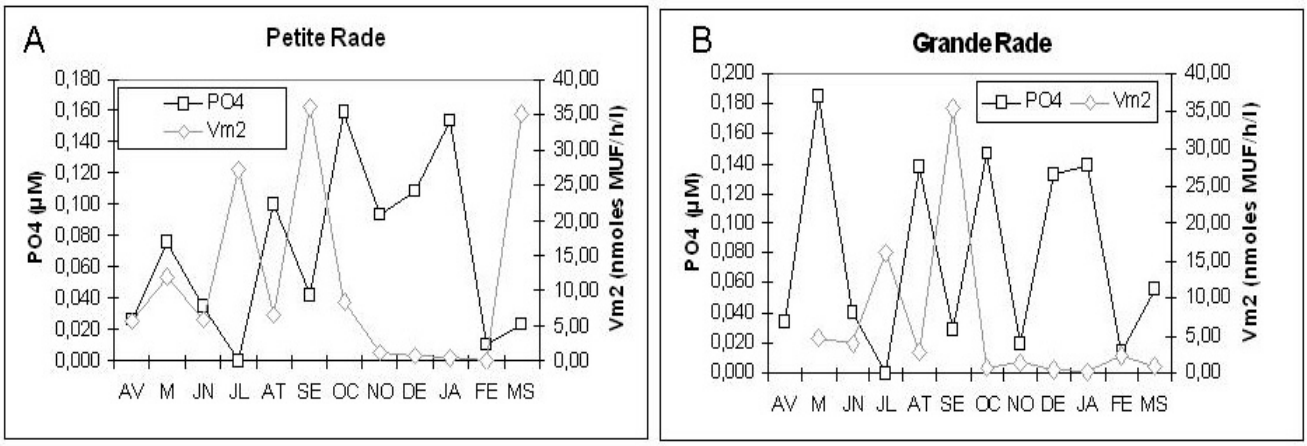

Figure 2: relations entre la Vmax à forte affinité (Vm2) de l'ensemble du matériel particulaire broyé et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Petite Rade (A) et de la Grande Rade (B)

Une analyse de ces données montre que ce manque de signification statistique provient en grande partie des données de février dans les deux sites et de celles de novembre dans la Grande Rade. A ces périodes, les activités phosphatasiques comme les concentrations en orthophosphate sont basses. En excluant ces données du calcul statistique, on obtient pour la Petite Rade une corrélation proche du seuil à 0,05 (p=0,071).En regroupant les activités à forte affinité mesurées sur le matériel particulaire intact et broyé, on obtient une corrélation inverse très significative dans la Grande Rade entre ces activités phosphatasiques et les concentrations en orthophosphate (p=0,03).

Une relation analogue est obtenue avec le pNPP, mais elle est peu significative d'un point de vue statistique (p=0,26 dans la Petite Rade et p=0,19 dans la Grande Rade). Une analyse des

données montre que cette absence de significativité tient également pour une grande part aux données de février et de novembre. En ne les prenant pas en compte, une corrélation inverse significative peut être trouvée dans la Petite Rade (p=0,054). Pour la Grande Rade la relation est proche de la significativité (p=0,13). Il est à noter que pour le pNPP, l'ensemble de l'activité phosphatasique est pris en compte et non pas uniquement l'activité à forte affinité.

1.2 Analyse des activités des différentes fractions de taille

La relation inverse entre les concentrations en phosphore et les activités phosphatasique se retrouve à des degrés divers pour toutes ces classes de taille. Nous présenterons d'abord la relation avec les activités spécifiques car elles permettent de comparer les activités des différentes fractions les unes avec les autres.

Dans la Petite Rade

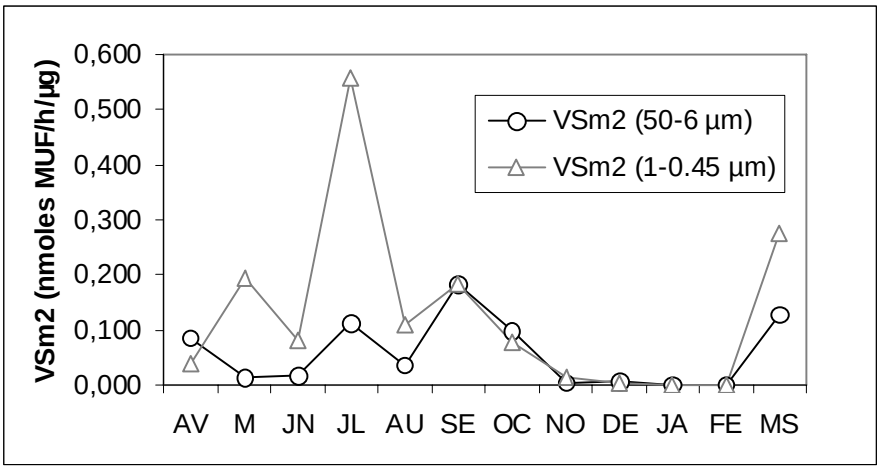

Figure 3 : comparaison des activités spécifiques a forte affinité (VSm2) des fractions 6-50 µm et 0,45-1 µm dans la Petite Rade au cours d'un cycle annuel

Dans la Petite Rade, les activités spécifiques des classes 6-50 µm et 0,45-1 µm présentent des évolutions similaires au cours du cycle annuel, en particulier à partir de juin (figure 3). Leurs niveaux sont généralement plus élevés que ceux des autres fractions, en particulier ceux de la plus petite fraction. Ces activités sont très élevées en juillet et en septembre alors que les concentrations en phosphore sont particulièrement basses (figure 4 et 5). En revanche, elles diminuent beaucoup d'octobre à janvier lorsque les concentrations de phosphore sont plus élevées.

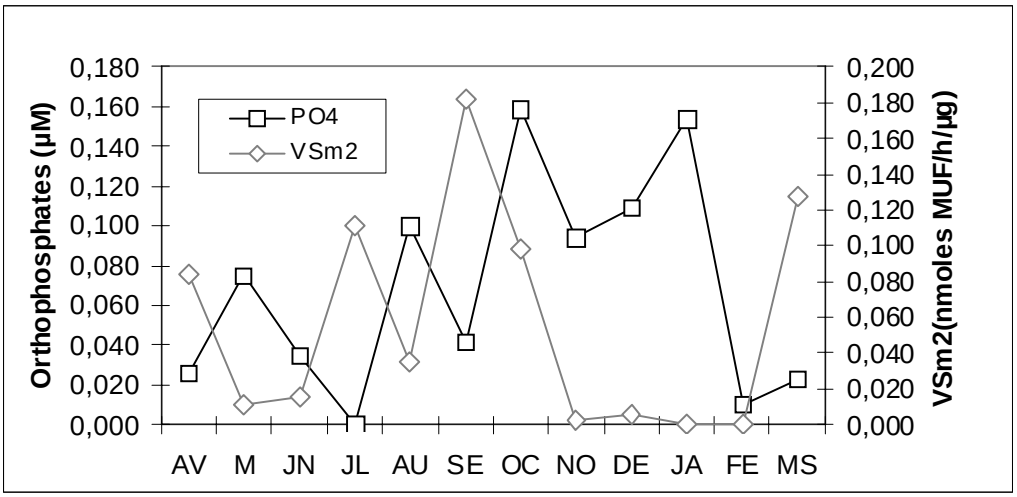

Figure 4 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité (VSm2) de la fraction 6-50 µm et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Petite Rade.

Les relations inverses entre les concentrations de phosphore et les activités phosphatasiques sont confirmées lorsque les activités sont exprimées par litre d'eau de mer (figure 5). Ainsi dans l'ensemble, les activités phosphatasiques fluctuent dans la Petite Rade jusqu'en novembre en relation inverse avec les concentrations de phosphore. Puis elles se maintiennent à des niveaux très bas jusqu'en février alors que les concentrations en phosphore augmentent de façon plus durable.

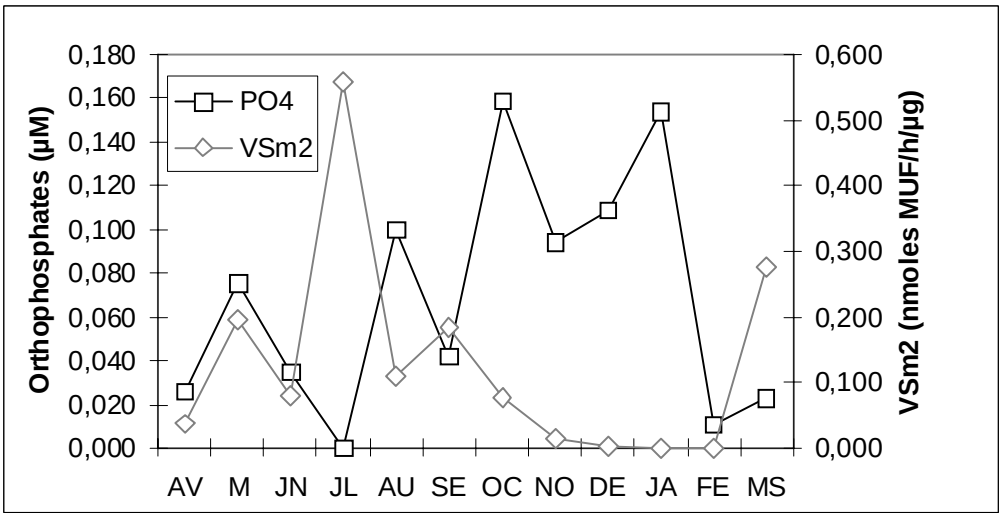

Figure 5 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité (VSm2) de la fraction 0,45-1 µm, et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Petite Rade.

Pour la fraction >90 µm, une relation analogue a été caractérisée dans la Petite Rade avec l'activité spécifique, mais sa réponse est beaucoup plus faible que celle des autres fractions (figure 6).

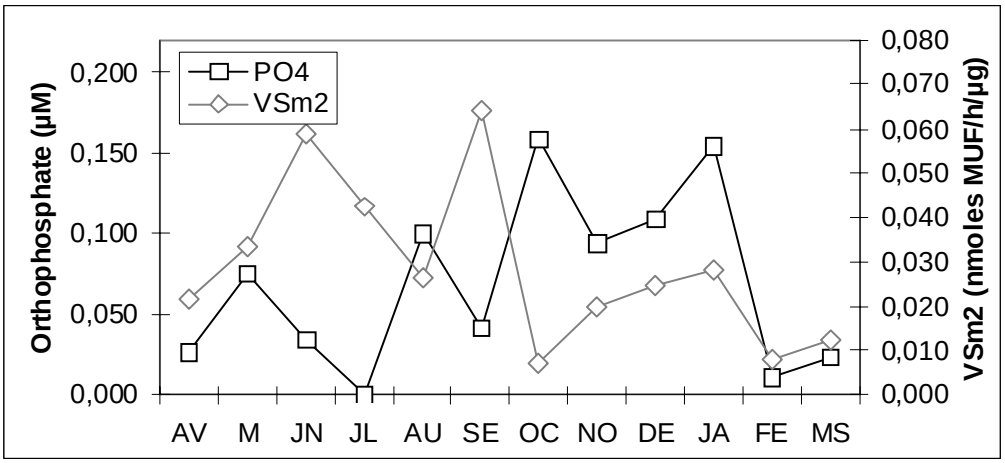

Figure 6 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité (VSm2) de la fraction >90 µm, et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Petite Rade.

Dans la Grande Rade

Dans la Grande Rade, l'évolution des activités phosphatasiques spécifiques et leurs relations avec les concentrations en phosphore sont dans leur ensemble assez semblable à celles de la Petite Rade. Les activités spécifiques des trois plus petites classes de taille: (6-50 µm, 1-6 µm et 0,45-1 µm) présentent une évolution comparable au cours du cycle (figure 7).

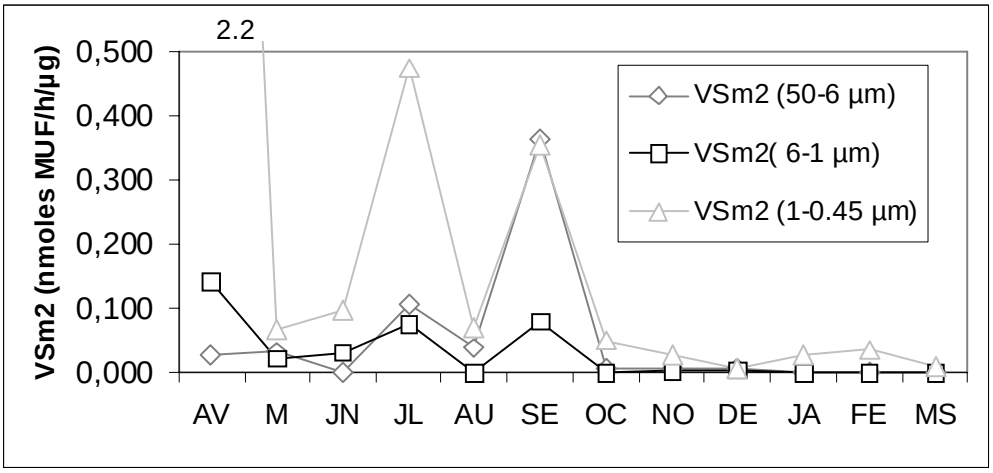

Figure 7 : comparaison des Vmax à forte affinité des fractions 6-50 µm, 1-6 µm et 0,45-1 µm dans la Grande Rade au cours d'un cycle annuel

Ces activités fluctuent beaucoup d'avril à octobre, puis elles se maintiennent à des niveaux très bas jusqu'à la fin du cycle. Dans l'ensemble ces fluctuations varient à l'inverse des concentrations en phosphore. Par ailleurs, comme dans la Petite Rade les réponses de la plus petite classe de taille sont nettement plus marquées que celles des autres fractions (figure 8 à 10). Des observations analogues peuvent être faites en considérant les activités rapportées au volume d'eau de mer.

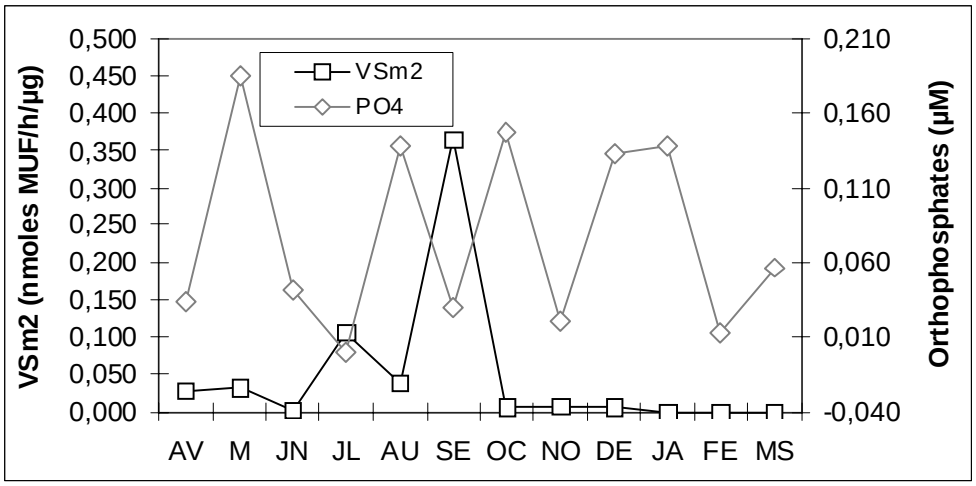

Figure 8 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité(VSm2) de la fraction 6-50 µm, et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Grande Rade.

L'analyse statistique des résultats par classe de taille ne permet cependant pas de mettre en évidence de corrélations statistiquement significatives entre l'évolution des concentrations de phosphore et celle des activités enzymatiques. Toutefois, une analyse plus fine de ces données montre que, comme pour les activités rapportées au volume d'eau, les données de février et de novembre dans la Grande Rade sont pour une très grande part responsable du mauvais coefficient de corrélation. Si cette période n'est pas prise en compte dans les calculs statistiques, les corrélations inverse entre les activités phosphatasiques et les concentrations en phosphate deviennent alors plus significatives notamment si l'on rassemble les activés spécifiques des deux sites (classe 6-50 µm : p=0,016, classe 1-6 µm: 0,0448, classe 0,45-1 µm :0,0125).

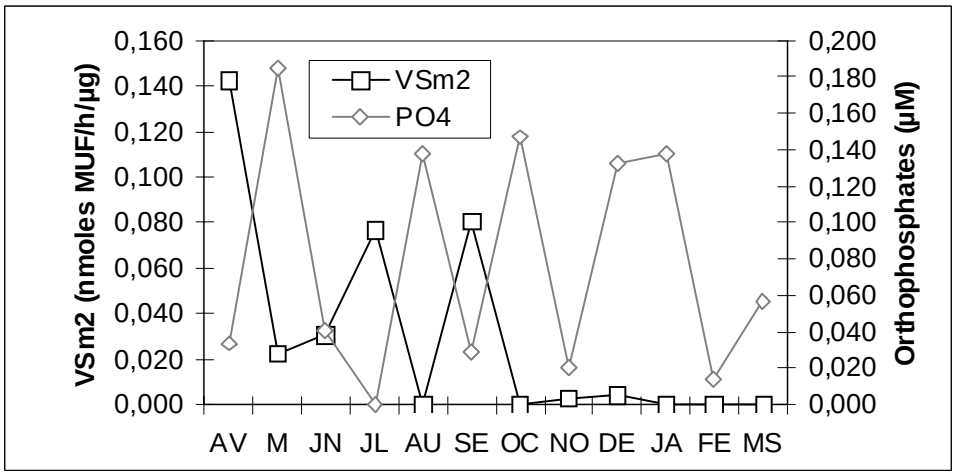

Figure 9 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité (VSm2) de la fraction 1-6 µm, et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Grande Rade

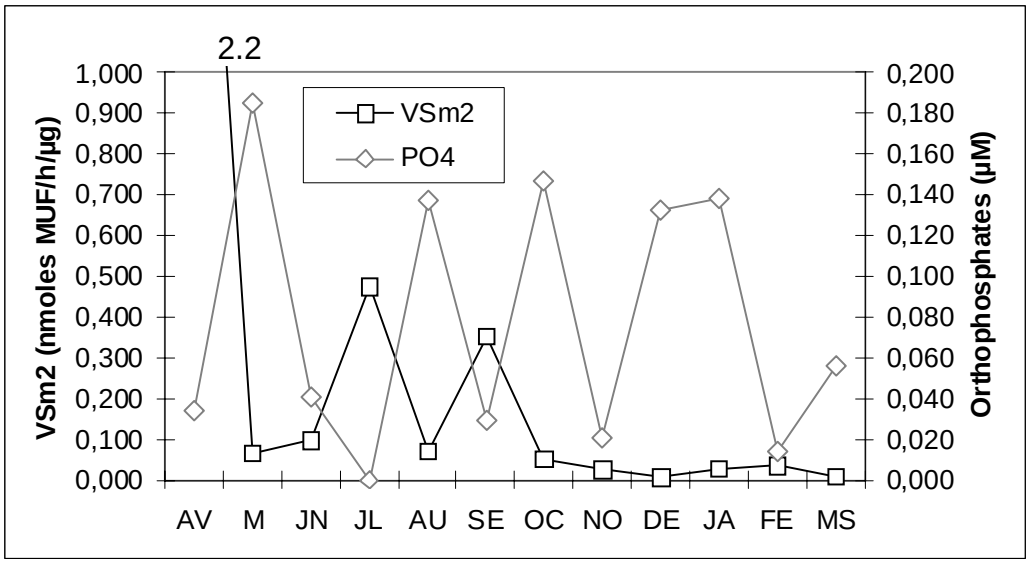

Figure 10 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité (VSm2) de la fraction 0,45-1 µm, et les concentrations en Orthophosphates au cours d'un cycle annuel dans la Grande Rade

Aucune relation analogue n'a pu être mise en évidence avec l'activité particulaire à faible affinité (Vm1). Dans un précédent chapitre nous avons montré que cette activité provient surtout du zooplancton. Il en est de même pour l'activité dissoute, à faible comme à forte affinité.

Aucune corrélation n'a été obtenue par ailleurs avec le pNPP. Dans ce cas le nombre limité de concentrations n'a pas permis de faire la part des composantes à forte et faible affinité. La Vmax mesurée correspondant à la somme des Vmax totale des l'activité mesurée avec le MUF-P ce qui rend l'analyse moins fine.

2. Relations avec les rapports NO_3^-/ PO_4^{3-}

Les relations entre l'évolution du rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} et les activités phosphatasiques particulaires sont beaucoup moins probantes que celles établies précédemment avec les ions orthophosphates. L'évolution de ces deux paramètres est mal corrélée aussi bien dans la Petite Rade que dans la Grande Rade (figure 11 et 12), la fraction la plus élevée en termes d'activité (0,45-1 µm) étant représentée graphiquement. Dans la Petite Rade, le test de Spearman donne un p de 0,28 dans la Petite Rade et de 0,14 dans la Grande Rade.

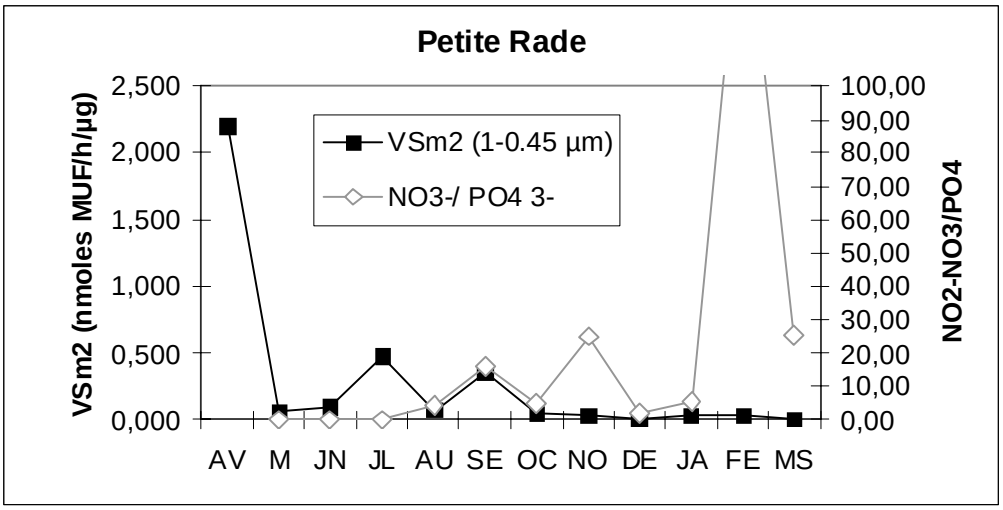

Figure 11 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité (VSm2) de la fraction 0,45-1 µm, et le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} au cours d'un cycle annuel dans la Petite Rade

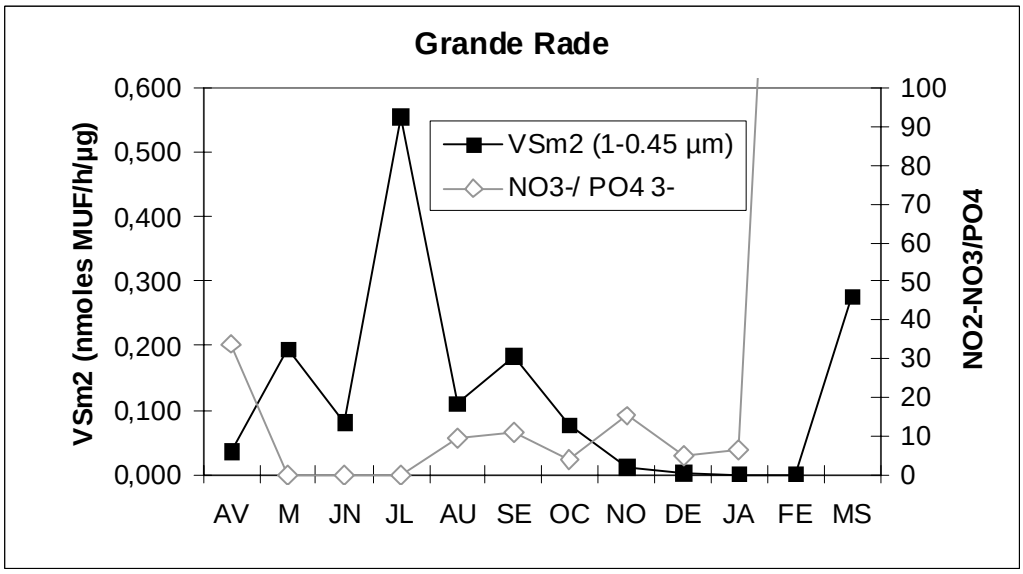

Figure 12 : relations entre la Vmax spécifique à forte affinité (VSm2) de la fraction 0,45-1 µm, et le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} au cours d'un cycle annuel dans la Grande Rade

3. Résumé

Une corrélation inverse a été mise en évidence entre l'évolution de la concentration en orthophosphates et la Vmax totale (Vm1 + Vm2) de l'ensemble du matériel particulaire congelé ou intact. Cette corrélation est significative si l'on exclut les données de mois de février et de novembre (Grande Rade) avec les deux substrats testés.

Des corrélations inverses ont également été mises en évidence pour certaines classes de taille. En regroupant les deux sites, ces corrélations concernent les fractions 6-50 µm, 1-6 µm, mais surtout la classe de taille 0,45-1 µm.

Aucune relation n'a été trouvée pour l'activité de la fraction dissoute à faible et comme à forte affinités.

Discussion

Ce travail a eu pour objectifs de réaliser un suivi annuel des différents réservoirs organiques et inorganiques du phosphore dans la rade de Toulon et de faire une étude aussi complète que possible de l'activité phosphatasique responsable de la conversion du phosphore organique en phosphore inorganique. L'étude de l'activité phopsphatasique repose sur l'analyse des cinétiques des fractions dissoutes et particulaires. La contribution de différentes classes de taille à l'activité particulaire a été également analysée afin de préciser la part des principales catégories planctoniques. Le rôle des ions orthophosphate dans le contrôle de cette activité a été également abordé.

Ces travaux apportent des éléments utiles à la compréhension des mécanismes de contrôle des apports en phosphore aux organismes vivants en milieu marin, et plus particulièrement en méditerranée.

1. Méthodologie

1.1 Dosage du phosphore inorganique (PID)

Un des problèmes majeurs soulevé par le dosage des orthophosphates selon Murphy et Riley (1962) est celui de sa spécificité. En effet le phosphore qui réagit au molybdate n'est pas uniquement composé de phosphore inorganique, mais peut inclure toutes formes de phosphore, y compris certaines formes de phosphore organique. La composition de cette fraction réactive varie en fonction de la nature de l'eau (Nürnberg et Peters, 1984). Par ailleurs le dosage ne détecte pas toutes les formes de phosphore inorganique.

Un autre problème lié à cette technique est que le molybdate réagit avec d'autres ions, en particulier avec la silice. Pour éviter cette interférence, il est recommandé de maintenir un pH inférieur à 2. Mais une hydrolyse de composés phosphorés organiques comme certains sucres simples ou esters monophosphates, peut se produire à de tels pH entraînant une surestimation des concentrations de PO_4^{3-} (Benitez-Nelson, 2000). Pour toutes ces raisons la terminologie PID (Phosphore Inorganique Dissous) est souvent remplacée par celle de SRP pour phosphore soluble réactif (Strickland et Parsons 1972).

Mais le principal problème du dosage des SRP par la méthode de Murphy et Riley concerne son manque de sensibilité quand il est pratiqué sur des milieux oligotrophes comme la Méditerranée. Sa limite de détection est en effet de 20 nM, une valeur fréquemment

rencontrée dans la Rade de Toulon. Pour pallier ce problème il est possible de pré-concentrer le phosphore en le précipitant en milieu alcalin. C'est la méthode MAGIC développée par Karl et Tien (1992) et modifiée par Thomson-Bulldis et Karl (1998). Elle permet d'abaisser la limite de détection à 5nM avec une précision de ± 1 nM.

1.2 Dosage du phosphore organique

Le phosphore organique des échantillons est dosé après minéralisation en phosphore inorganique. Cette minéralisation est généralement effectuée à des pressions et des températures élevées, en présence d'un réactif oxydant (McKelvie *et al.* 1995), comme le recommande la norme AFNOR (1997). Ridal et Moore, (1990) ont montré sur des extraits d'eau de mer, que l'association de cette technique avec un traitement par les UV permettait d'obtenir une meilleure minéralisation.

La différence entre les concentrations en PTD et en SRP correspond au POD (phosphore organique dissous). Cependant cette fraction contient un certain nombre de composés inorganiques non réactifs (au molybdate) comme les polyphosphates (Strickland et Parsons, 1972). De ce fait, le terme « phosphore soluble non-réactif » (SNP) est souvent préconisé à la place de POD (Benitez-Nelson, 2000).

La méthode de dosage du phosphore enzymatiquement hydrolysable (PHPase) que nous avons utilisée a été l'objet de mises au point préalables. Son principe consiste à ajouter de la phosphatase purifiée dans l'eau et à doser le phosphore inorganique libéré. Ces mises au point étaient nécessaires car la phosphatase alcaline commerciale ajoutée dans l'eau de mer interagit avec les réactifs du dosage. C'est pourquoi une gamme étalon réalisée dans de l'eau de mer contenant la même concentration de phosphatase a été réalisée en parallèle. Une approche analogue à la nôtre a été développée en milieu marin côtier par Suzumura *et al.* (1998). Ces auteurs ont montré que si la durée de l'incubation était trop longue, des bactéries pouvaient se développer et utiliser le SRP libéré par l'enzyme, sous estimant ainsi sa concentration. Ce développement bactérien n'a pu se produire au cours de nos expériences, le temps d'incubation étant suffisamment court (2h).

1.3 Mesures des activités phosphatasiques

Deux phosphomonoesters ont été utilisés comme substrat pour la mesure de l'activité phosphatasique, le MUF-P et le pNPP. Comme nous l'avons évoqué en introduction, en milieu marin trois enzymes sont responsables de l'hydrolyse des composés organiques

phosphorés : la phosphatase alcaline et la 5' nucléotidase qui hydrolysent les phosphomonoesters et la PhosphoDiesterase qui hydrolyse les phosphodiesters.

Les phosphomonoestérases les plus communément rencontrées en eau de mer sont la phosphatase acide et alcaline et la 5'Nucléotidase (Hoppe, 2003). Martinez *et al.,* (1996) ont mis en évidence lors d'études préliminaires que le MUF-P pouvaient être aussi hydrolysé par l'une que par l'autre enzyme. Il en est de même pour le pNPP qui présente par ailleurs, une spécificité vis à vis de la phosphatase bien moindre que le MUF-P. Le pNPP est notamment hydrolysé par les ATPases et les nucléotidases acides, qui sont surtout présentes dans la fraction zooplanctonique (Perona et Vallejo, 1985).

En plus de ce manque de spécificité, la mesure des activités phosphatasiques à l'aide du pNPP souffre d'un manque de sensibilité en particulier lors de mesure de l'activité dissoute (Hoppe, 2003), la détection des activités dissoutes nécessitant des temps d'incubation plus longs avec le pNPP qu'avec le MUF-P. Lorsque ces durées dépassent 24 heures, nous avons constaté qu'un développement de bactéries pouvait se produire avec le pNPP lorsque ses concentrations dépassent 5 mM. Une augmentation de l'activité phosphatasique de l'eau peut en résulter. En revanche, le p-NPP convient pour mesurer l'activité du matériel particulaire préconcentré, une ou deux heures d'incubation étant suffisantes. Par ailleurs, comme ces deux substrats sont artificiels, ils ne sont pas représentatifs des substrats naturels. De ce fait, leur intérêt réside surtout dans la mise en évidence des relations avec les variables environnementales (Suida 1984). La comparaison des activités phosphatasiques mesurées avec le MUFP et le pNPP a montré qu'elles présentent souvent une évolution assez semblable au cours du cycle annuel, avec d'assez bons coefficients de corrélation. Toutefois le MUF-P doit être préféré, surtout lorsque les mesures sont pratiquées sur de courts intervalles de temps.

Choix de la température

Une température d'incubation constante de 20°C à été retenue pour les mesures des activités enzymatiques. Elle correspond à la température moyenne de l'eau de mer, et de ce fait semble préférable à celle de 37 °C souvent utilisée même en milieu aquatique.

1.3 Choix du milieu et du pH

L'utilisation d'un tampon pour stabiliser le pH des milieux d'incubation est souvent préconisée (Hoppe 2003). Mais l'eau de mer étant naturellement tamponnée, nous n'y avons pas ajouté de tampon supplémentaire, sauf au cours de l'étude spécifique des effets du pH. Nous avons choisi de réaliser les mesures du cycle annuel en dissolvant les substrats dans de

l'eau de mer afin de se rapprocher des conditions naturelles, plutôt que de recourir à un milieu spécifique ajusté au pH optimum de l'enzyme. Certains auteurs (Ammerman et Azam, 1991 ; Van Wambeke *et al.* 2002) ont évoqué l'influence alors possible de substrats naturels (phosphore organique dissous et particulaire) sur l'activité phosphatasique lorsque l'eau de mer est utilisée pour dissoudre le pNPP ou le MUF-P. Ces substrats peuvent être des compétiteurs, d'autant que leurs concentrations sont souvent du même ordre de grandeur que les Km du MUF-P. Toutefois ce type d'interaction n'a d'influence que sur le Km, laissant les Vmax inchangées.

L'utilisation d'aliquotes d'eau de mer de 10 à 50 ml est mal adaptée pour la mesure des activités phosphatasiques ou des concentrations du phosphore des organismes planctoniques dont la densité est faible. C'est le cas des fractions de taille >90 µm constituées surtout de zooplancton. Pour pallier ce problème, les dosages du phosphore ont été réalisés en triplicatas. Quant à la mesure de l'activité phosphatasique, l'utilisation d'une large gamme de concentrations en substrats et l'analyse des cinétiques d'Eadie Hofstee permettent de limiter l'incidence de ces problèmes d'échantillonnage.
Pour les mesures des activités particulaires des différentes classes de taille, les échantillons ont été préalablement congelés à -80°C. Une perte d'activité enzymatique peut en résulter. Toutefois, des études préalables sur le zooplancton ont montré que l'activité exprimée par la Vmax n'était pas significativement plus basse après congélation (Lespilette *et al.,* 2007). De plus, les activités à forte affinité des activités congelées et intactes sont tout à fait comparables (voir figure 17 chapitre II). L'effet de la congélation sur des échantillons destinés au dosage du phosphore et de l'azote a été étudié par de Krom *et al.* (2005). Ces auteurs ont montré que la congélation est acceptable pour des échantillons dont la concentration est supérieure à 20 nM pour le PID et à 400 nM pour le DIN. Ces niveaux sont atteints exceptionnellement pour le phosphore dans la rade.

2. Caractéristiques, évolution spatiotemporelle, origine et régulation de la phosphatase alcaline en relation avec le métabolisme des composés phosphorés

2.1 Nutriments

Phosphore Inorganique (PID)

Les concentrations en phosphore inorganique dissous (PID) ont varié de 7 nM à 160 nM avec une moyenne annuelle de 70 nM pour la Petite Rade, et de 0 à 185 nM avec une moyenne annuelle de 75 nM pour la Grande Rade. Ces valeurs sont sensiblement plus fortes que celles mesurées par Durrieu de Madron *et al.* (2003) dans le golfe du Lion (20 et 30 nM). Elles sont en revanches plus faibles que celles mesurées dans la rade de Toulon en 1999/2000 par Jean (2002) (de 84 à 462 nM). Une baisse des concentrations en phosphore semble s'être produite dans la rade de Toulon au cours de ces 6 dernières années. Les mesures en vue de restaurer la qualité des eaux prises par le Contrat de Baie depuis 2002, pourraient en être à l'origine. Mais d'autres facteurs doivent être également pris en compte comme la pluviométrie, beaucoup plus importante en 1999-2000.

D'une manière générale, les concentrations en orthophosphate de la rade de Toulon fluctuent beaucoup entre mars et septembre et se maintiennent ensuite à des niveaux plus élevés et plus stables, en particulier dans la Grande Rade, jusqu'en janvier. Puis en février et en mars elles diminuent fortement. Les précipitations ont certainement beaucoup contribué à l'augmentation des concentrations en orthophosphate entre septembre et janvier. En revanche, entre avril et août, période où les précipitations sont très faibles, les fortes concentrations en phosphore observées occasionnellement sont à rattacher aux fortes activités phosphatasiques que nous analyserons plus loin.

Phosphore Organique Dissous (POD)

Trois classes de composés organiques phosphorés dissous ont été identifiés en milieu marin : les monoesters phosphates, les diesters phosphates et les phosphonates (Clark *et al.,* 1998). Ces derniers sont extrêmement stables et résistants à l'hydrolyse chimique. En utilisant la technique d'ultrafiltration et de NMR ^{31}P, Clark *et al.,* (1998) ont estimé que les phosphonates constituent environ 25 %du POD dans les eaux de surface de l'Océan pacifique. Nos résultats sont proches des leurs (22 % pour la fraction non hydrolysable NH) bien que l'origine des masses d'eaux soit différente.

Concernant l'hydrolyse des autres composés phosphorés organiques dissous, Suzumura *et al.* (1998) ont montré que la phosphatase alcaline est très spécifique des monoesters (par exemple, le Glucose-6 phosphate et l'ATP), les diesters (comme l'ADN et l'ARN) étant hydrolysés par la Phosphodiesterase. La fraction enzymatiquement hydrolysable (PHPase) que nous avons étudiée contient donc essentiellement des monoesters. Cette fraction à été mesurée en milieu côtier par Kobori et Taga (1978) et les valeurs trouvées par ces auteurs sont comparables aux nôtres (30 à 450 nM). Ce compartiment biodisponible hydrolysable par la phosphatase ne représente cependant qu'une petite fraction du POD total (environ 10 % du POD) (Suzumura *et al.,* 1998 ;Benitez-Nelson et Buesseler, 1999). Dans la rade de Toulon, ses concentrations étaient très fluctuantes et parfois, indétectables.

Le POD est généralement considéré comme le plus grand réservoir de phosphore dans les eaux de surfaces (Durrieu de Madron *et al.* (2003). Nos résultats le confirment puisqu' en moyenne le POD représente 44 % du phosphore total dans la rade de Toulon. Ses concentrations oscillent entre 0 et 200 nM avec un pic accidentel en novembre (329 nM). Des valeurs similaires de POD ont été relevées par plusieurs auteurs : 50 nM pour Krom *et al.,* (2005) en Méditerranée orientale, 130 nM pour Raimbault *et al.*, (1999) en Méditerranée occidentale et entre 70 et 80 nM pour Durrieu de Madron *et al.* (2003) dans le Golfe du Lion. Ces concentrations sont particulièrement basses en été. Une baisse des nutriments phosphorés en période estivale en Méditerranée à été également mise en évidence par Thingstad *et al.,* (1998) dans la baie de Villefranche sur mer.

Dans la rade de Toulon, les concentrations du POD présentent une évolution saisonnière plus marquée que celles du phosphore inorganique. Les concentrations baissent progressivement au cours du printemps et se reconstituent en automne et en hiver. Les faibles niveaux de ces concentrations en été indiquent que la rade de Toulon présente alors une grave limitation en phosphore, aussi bien en ce qui concerne le phosphore organique que le phosphore organique utilisé par la phosphatase. Ces observations expliquent qu'à ce cette période les abondances phytoplanctoniques ou les concentrations en chlorophylle sont très basses. Seules augmentent les abondances zooplanctoniques, en particulier celles *d'Oithona nana* dont le régime alimentaire est essentiellement omnivore.

Phosphore particulaire (PP)

Les zones de fortes concentrations en PP correspondent en général aux zones de forte production. Nos résultats le confirment puisque l'on peut mettre en évidence une corrélation significative entre les évolutions des concentrations en PP et celle des teneurs en chlorophylle

dans la Petite Rade ($p<0,008$ en excluant les valeurs de PP de novembre, probablement affectées par les fortes pluies survenues lors du prélèvement). Une relation existe également dans la Petite Rade entre l'évolution des concentrations de POD et celles du phosphore particulaire ($p<0,05$). Ces observations indiquent que l'essentiel du PP proviendrait du phytoplancton et que ce phosphore particulaire pourrait ensuite contribuer aux apports en POD.

Alors que les concentrations en PID et en POD sont comparables dans les deux sites, les concentrations moyennes du PP sont bien plus élevées dans la Petite Rade (134 nM) que dans la Grande Rade (54 nM). Ces valeurs sont plus élevées que celles relevées par Krom *et al,* 2005 en Méditerranée orientale (de 9,1 à 7,6 nM), et par Durrieu de Madron *et al.* (2003) lors de la campagne Moogli dans le Golfe du Lion (26 et 40 nM). Elles s'expliquent probablement par la plus forte anthropisation de cette zone côtière et par les plus fortes abondances des diverses classes planctoniques dans la Petite Rade, notamment celles du zooplancton.

Nitrates

Les concentrations en nitrates mesurées au cours varient entre 0 et 4,06 µM pour la Petite Rade avec une moyenne de 1,08 µM et entre 0 et 2,18 µM pour la Grande Rade avec une moyenne de 0,61 µM. Dans le golfe du Lion, les concentrations en DIN sont généralement comprises entre 2,03 et 0,92 µM (Durrieu de Madron, 2003). Les valeurs de nitrates mesurées par Jean (2002) en 1999-2000 dans la Petite Rade s'échelonnent de 1,4 µM à 30,3 µM avec une moyenne annuelle de 8,8 µM. Comme pour le phosphore, on peut donc observer une tendance à la baisse des concentrations de ces nutriments lors de ces 6 dernières années.

L'évolution saisonnière des concentrations en nitrates est marquée dans les deux sites par une très forte augmentation en février et en mars. Elle peut s'expliquer par les fortes pluies qui se sont produites en janvier, quelques jours avant le prélèvement de février. A la différence des concentrations en phosphore dissous, les concentrations en nitrates sont statistiquement plus élevées dans la Petite Rade ($p=0,02$). Toutefois cette différence provient pour une large part des plus fortes valeurs trouvées dans la Petite Rade en février et en mars. Si ces valeurs sont exclues de l'analyse statistique, les différences intersites sont alors beaucoup moins significatives ($p=0,09$). Il est à noter enfin que la méthode de dosage des nitrates ne permet pas de distinguer les nitrates des nitrites qui sont transformés en nitrate par les réactifs et les conditions du dosage.

Rapports NO_3^-/ PO_4^{3-}

Le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-}est très utile dans la recherche des éléments qui limitent le développement du plancton. Selon Redfield *et al.*, (1963), ce rapport normalisé est de 16 :1 pour l'océan mondial. Pour la Méditerranée, il est proche de 20 pour la partie occidentale et de 22 (ou plus) pour la partie orientale (Mc Gill, 1969 ; Raimbault et Coste, 1990). Ces plus fortes valeurs indiquent que le phosphore serait plus limitant que l'azote en Méditerranée. Dans la rade de Toulon, ce rapport ne dépasse 16 qu'en février et en mars dans les deux rades, ainsi qu'en avril dans la Petite Rade et en novembre dans la Grande Rade. A ces périodes le phosphore serait l'élément limitant mais pendant le reste du cycle, ce serait l'azote. Il est à noter qu'en juillet, dans les deux sites, les concentrations en phosphore et azote sont indétectables. Cette période serait donc caractérisée par une co-limitation par l'azote et le phosphore.

D'autres critères sont souvent retenus pour la recherche des éléments limitants. Selon Justic *et al.* (1995), la limitation par l'azote survient lorsque les concentrations en azote inorganique dissous (DIN) sont inférieures à 1 µm et lorsque le rapport DIN/PID est inférieur à 10. La limitation par le phosphore survient lorsque les concentrations en PID sont inférieures à 0,1 µm et lorsque le rapport DIN/PID est supérieur à 22. Selon ces critères, la Petite Rade et la Grande Rade de Toulon seraient limitées en azote en mai, juin, juillet, août, octobre, décembre et janvier. Le phosphore serait limitant dans la Petite Rade et dans la Grande Rade en avril, février, mars et en juillet dans la Petite Rade. Une co-limitation par le phosphore et l'azote surviendrait dans les deux sites en juillet tandis qu'aucune limitation n'existerait en septembre (dans les deux rades) et en novembre (dans la Petite Rade).

2.2 Activités phosphatasiques

Activités à faible et forte affinités

La mise en évidence de composantes à faible et forte affinités a révélé que les cinétiques de l'activité phosphatasique de l'eau de mer sont complexes. Des travaux antérieurs effectués dans la rade Toulon en utilisant le pNPP l'avaient déjà indiqué (Boge *et al*., 2006). La caractérisation de ce type d'activité est souvent délicate. De plus, les transformations de Lineweaver et Burk, classiquement utilisées pour le calcul des Km et des Vmax, sont souvent inappropriées pour les caractériser. C'est probablement la raison pour laquelle les auteurs qui les ont étudiées utilisaient, tout comme nous l'avons fait, les transformations d'Eadie Hofstee

(d'Azam et Hodson, 1981 ; Rivkin et Swift 1980 ; Garcia-Ruiz *et al*., 1997). Ainsi Garcia-Ruiz *et al* (1997) ont caractérisé une activité biphasique sur la diatomée marine *Phaeodactylum cornutum*. Rivkin et Swift (1980), ont ainsi mis en évidence une cinétique triphasique sur le dinoflagellé *Pyrocystis noctiluca,* Pour ces auteurs, il n'existerait qu'une seule enzyme mais elle possèderait plusieurs sites actifs lui permettant ainsi d'être opérationnelle malgré les fluctuations des concentrations en POD du milieu. C'est le concept d'activité multiphasique d'Azam et Hodson, (1981).

Nedoma *et al.,* (2006) en revanche ont montré que les activités phosphatasiques multiphasiques des communautés planctoniques d'un réservoir d' eau douce provenaient d'activités distinctes supportées par différentes classes planctoniques : une fraction phytoplanctonique (100-2 µM) avec une activité à faible affinité, et une fraction bactérienne (<2 µM) avec une activité à forte affinité. Les cinétiques multiphasiques du matériel particulaire provenant de la rade de Toulon sont également dues à l'hétérogénéité du matériel planctonique, la fraction bactérienne (0,45-1 µm) présentant un Km moyen plus bas et des Vmax plus élevées (Km2 = 0,05, Vm2 = 8,1 nmoles/h/l) que la fraction phytoplanctonique (Km2 = 0,15 µM, Vm2 = 2,8 nmoles/h/l). Nos travaux ont également montré que les composantes multiphasiques de l'activité phosphatasique du matériel broyé pouvaient résulter d'activités intracellulaires et exoenzymatiques ayant des Km et des Vmax très différents.

La qualité de la représentation des cinétiques enzymatiques selon Eadie Hofstee repose sur le nombre de concentrations et sur l'étendue de la gamme qu'elles couvrent. Elle repose également sur l'hypothèse de départ relative au nombre de composantes du modèle. L'aspect des courbes des activités des sites de Toulon plaide en faveur d'un modèle à deux composantes. Nous l'avons validé en comparant les courbes théoriques données par ce modèle et les valeurs expérimentales. Nous avons ainsi constaté que les différences entre les activités calculées à partir des courbes théoriques et les activités mesurées expérimentalement différaient de moins de 5 %. (figure 4 Chap. III résultats).

Le rapport Vm/Km a été utilisé pour comparer et apprécier les activités enzymatiques dans des conditions non saturantes en substrat. Dans toutes les fractions, il semble que pour l'activité à forte affinité, ce paramètre est toujours plus élevé pour l'activité à faible affinité. Lors d'une étude sur la limitation en phosphore en Méditerranée, Van Wambeke *et al.* (2002) ont calculé le Turnover time qui correspond à l'inverse du rapport Vm/Km. Ces auteurs ont montré qu'une limitation en phosphore peut mise en évidence par ce rapport Km/Vm. La valeur de 100 jours est la valeur référence en dessous de laquelle ont peut parler de limitation. En calculant l'inverse du rapport Vm/Km au cours du cycle annuel, nous avons trouvé que ses

niveaux et son évolution sont comparables dans les deux sites, ses valeurs variant entre 8 et 280 jours. Le phosphore serait surtout limitant entre mars et octobre où les valeurs de Turover time sont généralement inférieures à 100 jours.

Activité Dissoute

L'activité dissoute est celle du filtrat obtenu après passage d'eau de mer sur des membranes de 0,45 µm. Sur l'ensemble de l'année, la contribution de cette activité dissoute à l'ensemble de l'activité phosphatasique est de 48 %avec le MUF-P et de 28 % avec le pNPP sur la base des Vmax totales. Ces valeurs sont plus faibles que celle obtenues précédemment dans la rade de Toulon avec le pNPP par Bogé *et al*, (2006). Des durées d'incubation plus importantes (24 heures) pourraient avoir alors surestimé les mesures de ces activités dissoutes, cette durée pouvant favoriser le développement de bactéries, surtout aux plus fortes concentrations.

Dans la rade de Toulon, cette activité dissoute présente des composantes à faible et forte affinités. La composante à faible affinité possède les mêmes caractéristiques que celle de l'activité planctonique intracellulaire. Les deux activités présentent en particulier le même optimum de pH, nettement alcalin. Par ailleurs des corrélations ont été mises en évidence entre l'évolution de cette composante et la densité phytoplanctonique. De ce fait, l'activité dissoute à faible affinité pourrait provenir de contenus cytoplasmiques libérés dans le milieu après la mort des cellules planctoniques (Jansson *et al.,* 1988 ; Hoppe, 2003 ; Nausch et Nausch, 2004). Ces activités pourraient se maintenir dans le milieu plus d'un mois après la mort des cellules (Li *et al.*, 1998). La possibilité que ces activités proviennent de l'éclatement de cellules lors des filtrations ne peut être tout à fait exclue, même si les pressions de filtration ont été maintenues aussi basses que possible.

Cette activité dissoute à faible affinité pourrait ainsi constituer un bon marqueur de lyse cellulaire permettant d'étudier les conséquences d'épisodes anciens ou récents de carences en phosphore du milieu (Chrost, 1991 ; Liu *et al.*, 1995 ; Cotner *et al.,* 1997 ; Li *et al.,* 1998. Comme cette activité possède un optimum de fonctionnement nettement alcalin, il conviendrait d'effectuer les mesures d'activité à ce pH afin de limiter les interactions avec l'activité à forte affinité dont l'optimum est proche du pH de l'eau de mer.

Au cours de notre cycle annuel, la contribution de la fraction dissoute varie au cours de l'année. Ainsi au mois de janvier, la Vmax de l'activité de la fraction dissoute à faible affinité est particulièrement élevée. Par ailleurs nous avons montré que cette contribution dépend

également des concentrations en substrat, elle s'élève lorsque cette concentration augmente (Résultats : chapitre III, figure 10).

L'origine de l'activité dissoute à forte affinité est plus incertaine. Elle pourrait provenir de bactéries non retenues sur les filtres de 0,45 µm ou de sécrétions. Toutefois aucune corrélation avec les densités bactériennes ou avec les activités de la classe de taille 0,45-1 µm n'a été mise en évidence.

Activité particulaire

Sur la base des Vmax totales (somme des Vmax à forte et faible affinités), l'activité particulaire mesurée avec le MUF-P représente en moyenne 52 % de l'activité totale (dissoute et particulaire). Cette contribution augmente lorsque la concentration en substrat diminue. En utilisant les concentrations moyennes en phosphore organique dissous (0,12 µM), et les équations des cinétiques correspondant aux activités moyennes annuelles, on peut estimer que près de 90 % de l'hydrolyse des composés organiques phosphorés proviennent de cette activité particulaire.

Deux types d'activité, à faible et forte affinités, ont été caractérisés au niveau du matériel particulaire.

Activité à faible affinité

L'activité à faible affinité est toujours plus élevée quand elle est mesurée sur du matériel broyé. Ce type d'activité serait par conséquent intracellulaire.

Cette activité intracellulaire est particulièrement élevée pour la plus grande classe de taille. Elle est par ailleurs bien corrélée avec le zooplancton. Le pH optimum de cette activité est voisin de celui de l'eau de mer. Elle pourrait être impliquée dans le métabolisme cellulaire et l'hydrolyse des substrats intracellulaires. Nos travaux (Lespilette *et al.,* 2007) ont montré qu'elle est particulièrement élevée chez les Nauplii de Cirripèdes. Ces activités pourraient alors contribuer à l'utilisation de réserves car pendant une partie de leur développement ces larves ne se nourrissent pas.

Une activité à faible affinité a été également mise en évidence sur les classes taille correspondant au phytoplancton. Son pH optimum est très alcalin. Peu de travaux ont permis de caractériser une telle activité phosphatasique à l'intérieur de cellules algales, peut être en raison de son faible niveau. Toutefois, grâce à l'ELF-97, Dyhrman et Palenik (1999) l'ont nettement mis en évidence chez *Prorocentrum minutum*.

Une activité à faible affinité détectable après sonication a été également observée sur le matériel particulaire de la plus petite classe de taille (0,45-1 µm). Son niveau est souvent faible. Son pH optimum est, comme celui de l'activité de la classe précédente, très alcalin. Cette activité pourrait provenir de bactéries. Mais les bactéries ne possèdent pas d'activité phosphatasique intracellulaire. Martinez et Azam (1993) l'ont confirmé après avoir fait éclater les cellules par traitement au TRIS. En revanche cette activité est concentrée dans l'espace périplamisque des bactéries gram négatives (Martinez et Azam 1993).

L'origine de l'activité phosphatasique à faible affinité de la plus petite classe de taille reste par conséquent problématique. Mais cette fraction est hétérogène. En plus de bactéries elle contient des microalgues de taille inférieure à 1 µm. Il pourrait s'agir de Cyanophycées, des procaryotes probablement dépourvues de phosphatase intracellulaire, ou de picoeucaryotes comme les Prasinophycées (*Ostreococcus, Bathycoccus et Micromonas*) qui, comme le phytoplancton eucaryote, pourraient contenir de la phosphatase intracellulaire. Les Prasinophycées constituent un groupe abondant dans la zone euphotique de l'océan mondial (Sym et Pienaar, 1993) mais leurs caractéristiques génétiques et physiologiques sont encore mal connues.

Activité à forte affinité

Une activité à forte affinité a été mise en évidence dans le matériel particulaire. Ses caractéristiques sont les mêmes lorsqu'elle est mesurée sur du matériel intact ou broyé, ce qui nous a conduit à émettre l'hypothèse que cette activité est exoenzymatique et qu'elle correspond à une ectoenzyme.

Une activité a forte affinité à été relevée sur la fraction de taille correspondant au zooplancton. Elle est beaucoup plus faible que l'activité à faible affinité discutée plus haut. Son origine est incertaine. Il est admis que le zooplancton contribue pour une faible part à l'hydrolyse des composés phosphorés de l'eau de mer. Nous avons d'ailleurs confirmé la présence d'activité de ce type sur des individus isolés et intacts (Lespilette et al. 2006). Mais elle pourrait provenir aussi de bactéries attachées. Les travaux de Jean *et al.* (2003) indiquent qu'une activité bactérienne est associée à cette fraction zooplanctonique mais il n'a pas été possible de préciser s'il s'agissait de bactéries attachées sur la carapace ou présentes dans le tube digestif.

Une activité à forte affinité a été également caractérisée sur le matériel particulaire de taille comprise entre 1 et 50 µm. Elle est beaucoup plus élevée que celle de la composante à faible

affinité. Elle provient du phytoplancton car il existe une bonne corrélation entre les teneurs en chlorophylle et cette activité dans la Grande Rade. Le rôle du phytoplancton dans la production d'activités phosphatasiques a été bien démontré, notamment grâce à l'utilisation du substrat ELF qui permet d'identifier les cellules productrices de telles activités. Les cellules ainsi marquées sont la plupart du temps des Dinoflagellés, les Diatomées semblant beaucoup moins actives (Nicholson *et al.,* 2006) mais régulant mieux la phosphatase en absence de PID (Dyhrman et Ruttenberg, 2006). L'activité phosphatasique à forte affinité observée à Toulon en septembre au moment du bloom de Diatomées semble indiquer que l'activité de ces algues serait élevée mais il resterait à le confirmer sur des cellules isolées.

Mais l'essentiel de l'activité à forte affinité provient de la plus petite classe de taille (0,45-1 µm). Sur l'ensemble de l'année sa contribution à l'activité à forte affinité de l'ensemble du matériel particulaire représente en moyenne sur les deux rades 55,2 %. Ses activités spécifiques sont souvent plus élevées que celles des autres fractions. Les bactéries pourraient en être à l'origine. Comme nous l'avons précisé plus haut, leur activité phosphatasique est souvent localisée dans leur périplasme; une zone qui recouvre leur membrane cellulaire et dans laquelle se déroule la réaction enzymatique après le passage du substrat provenant du milieu ambiant (Hollibaugh et Azam , 1983 ; Chrost 1990).

Toutes ces activités à forte affinité présentent un optimum de pH voisin de celui de l'eau mer, en particulier aux plus faibles concentrations en substrat. En revanche quand ces concentrations s'élèvent une activité présentant un optimum de pH nettement plus alcalin a été observée. Il est encore difficile de savoir si ce type d'activité à pH alcalin provient bien d'ectoenzymes ou s'il s'agit de contamination par du matériel intracellulaire ou dissous.

2.3 Evolution spatiotemporelle et Relation avec les concentrations en PO4

Entre avril et août, les activités phosphatasiques particulaires se caractérisent par de fortes amplitudes de variation et des niveaux souvent élevés, principalement lorsque les concentrations en orthophosphate sont basses. A cette période, l'activité phosphatasique serait d'une grande importance pour la fourniture en orthophosphate nécessaire à la croissance du plancton. Toutefois, les faibles concentrations en substrats organiques phosphorés observées parfois en été, indiquent que cette production enzymatique en orthophosphate pourrait être momentanément limitée par un manque de substrat. C'est notamment le cas en juillet. Cette période est donc particulièrement critique pour le milieu. La forte hausse des activités phosphatasiques à forte affinité observée alors témoigne de l'importance du stress

nutritionnel, amplifié par les très faibles concentrations en nitrate. Toutefois les réserves en phosphore organiques semblent se reconstituer dès le mois d'août, probablement à partir de la matière organique des organismes planctoniques en décomposition.

De septembre à février, les activités sont plus faibles et plus stables alors que les concentrations en orthophosphate sont plus élevées, en particulier dans la Petite Rade. Le rôle de la phosphatase dans la production du phosphore minéral, serait alors beaucoup plus limité qu'au cours de la période précédente. Le phosphore pourrait alors provenir des précipitations, du ruissellement ou des crues de rivières comme l'Eygouttier. Lors d'un précédent cycle, une relation entre le niveau de concentrations en phosphore de la colonne d'eau et celui des précipitations avait déjà été trouvée (Jean 2002 ; Jamet *et al.,* 2005).

Sur l'ensemble du cycle il apparaît que l'activité phosphatasique à forte affinité varie souvent à l'inverse des concentrations en orthophosphate du milieu ambiant. Ce contrôle de l'activité phophatasique par les concentrations en orthophosphate a été retrouvé pour la plupart des classes de taille, mais il est particulièrement significatif pour la plus petite d'entre elles. De nombreuses études en eau douce, comme en eau de mer, effectuées dans le milieu naturel ou sur des cultures d'algues l'ont montré (Chrost *et al.,* 1984, Smith et Kalff, 1981, Gonzales-Gil *et al.,* 1998, Tanaka *et al.,* 2006). Ce type de relation pourrait provenir du contrôle exercé par le phosphore sur la synthèse de la phosphatase. Cette régulation se fait par répression lorsque les ions orthophosphate se fixent sur un récepteur spécifique ou par dérépression lorsque les concentrations en orthophosphate sont insuffisantes. Mais il pourrait également provenir de la sélection d'espèces présentant des activités phosphatasiques constitutives adaptées aux concentrations en orthophosphate du milieu. Dans ce cas, le rôle du rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} serait déterminant alors que dans le premier cas ce seraient les concentrations en phosphore.

Dans la rade de Toulon, la corrélation entre l'activité phosphatasique et les concentrations en phosphore est bien meilleure que celle impliquant le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-}. Cette observation signifie que les fluctuations d'activité de la phosphatase proviendraient surtout du contrôle de la synthèse de l'enzyme par le phosphore. La répression de la synthèse de l'enzyme par les ions orthophosphate serait particulièrement opérante entre octobre et janvier, période au cours de laquelle les concentrations en orthophosphate sont les plus élevées. Aux autres périodes, les épisodes de répression et de dérepression se succéderaient rapidement afin de permettre un approvisionnement en orthophosphate suffisant et rapide.

Cette réponse de l'activité de la phosphatase aux fluctuations des concentrations en phosphore inorganique est à l'origine de l'utilisation de la mesure de cette activité comme indicateur de carence en phosphore du milieu (Gage et Gorham, 1985 ; Rose et Axler, 1998).

Tout comme Hoppe (2003) dans sa revue de synthèse, Bowman *et al*., (2005) concluent que cette activité reflète le mieux la biodisponibilité du phosphore et constitue de ce fait le meilleur indicateur de la limitation en phosphore des algues. La mesure de cette activité a été également proposée comme un indicateur du niveau trophique des milieux aquatiques. Les mesures directes *in situ* menées dans les océans et les lacs (Petterson et Jansson, 1978 ; Hoppe 1983 ; Somville et Billen 1983) ont montré que l'expression des activités ectoenzymatiques fluctuait en réponse aux changements de statuts trophiques saisonniers de l'écosystème (Chrost *et al.,* 1986, Rath *et al.,* 1993)

Cependant, l'intérêt de cette activité en tant qu'indicateur des milieux carencés en phosphore à été souvent remise en question (Cembella *et al.,* 1984 a et b; Jansson *et al.,* 1988). Pour Garcia -Ruiz *et al*., (2000) l'activité phosphatasique serait indépendante des fractions phosphorées et Hino (1988) a conclu que les activités enzymatiques étaient probablement plus affectées par la composition spécifique du plancton que par les concentrations en orthophosphate. Gage et Gorham (1985) et Pettersson (1985) expliquent ce manque de corrélation avec les concentrations en orthophosphate du milieu par le fait que l'activité de la phosphatase pourrait dépendre des concentrations en phosphore intracellulaire. De plus, Suida (1984), Boavida et Heath (1984) ont suggéré qu'elles pourraient provenir d'activités phosphatasiques exoenzymatiques de type constitutif qui sont indépendantes des concentrations en phosphore. Les expériences effectuées en mésocosme par Tanaka *et al.,* (2006) ont montré que la corrélation imparfaite entre les deux paramètres provient essentiellement de sous estimations dans la mesure des concentrations en phosphore en raison du manque de spécificité du dosage des ions orthophosphate. D'autres auteurs suggèrent que ce manque de corrélation proviendrait du contrôle de l'activité phosphatasique par l'azote ou le carbone, en particulier en milieux eutrophes (Chrost et Overbeck, 1987 ; Hernàndez *et al.,* 1996 ; Caron *et al.,* 2000 ; Sebastiàn *et al.,* 2004 a et b) ou de la 5' nucléotidase qui, comme la phosphatase alcaline, hydrolyse le pNPP ou le MUF-P.

Les résultats obtenus dans la rade de Toulon montrent que les plus fortes concentrations en orthophosphate inhibent toujours l'activté de l'enzyme. C'est le cas entre octobre et janvier. En revanche, lorsque ces concentrations sont à leurs plus bas niveaux, l'activité phosphatasique n'est pas toujours stimulée. Trois cas ont été relevés pour lesquels de faibles activités ont été observées alors que les concentrations en orthophosphate étaient basses : en février dans les deux sites et en novembre dans la Grande Rade. A ces périodes les rapports NO_3^-/ PO_4^{3-} étaient particulièrement élevés ce qui suggère que ces faibles activités

phosphatasiques ne peuvent résulter d'un contrôle de l'activité par l'azote ou de la sélection d'espèces ayant un bas niveau d'activité constitutive. Le contrôle par le carbone semble lui aussi exclu dans la mesure où la rade de Toulon est un milieu particulièrement oligotrophe.

L'analyse de nos résultats nous a amené à envisager une autre possibilité. Dans les trois cas qui viennent d'être rapportés, les basses concentrations en orthophosphate étaient associées à des concentrations en POD et en particulier en POD hydrolysables par la phosphatase, élevées. Or des concentrations en POD élevées, associées à des activités phosphatasiques basses pourraient assurer une fourniture en PID suffisante aux cellules. La régulation moléculaire de l'activité phosphatasique apporte des éléments permettant de préciser ces réactions. Le gène qui régule la synthèse de la phosphatase et dont l'activité est contrôlée par un récepteur membranaire, contrôle également l'entrée du PID dans les cellules. Chez les bactéries, l'espace périplasmique constituerait un microenvironnement dans lequel les substrats diffusent à partir du milieu extérieur avant d'être hydrolysés. Il est probable que le PID issu de l'activité de la phosphatase se concentre dans cet espace avant d'être absorbé par les cellules ou de diffuser dans le milieu ambiant. La régulation de l'activité de la phosphatase et du transporteur du PID se ferait par le PID de l'espace périplasmique, si le récepteur est externe, ou par le PID intracellulaire, si le récepteur est interne. Cette interprétation est conforme au modèle de régénération du phosphore inorganique d'Ammerman et Azam (1991). Selon ce modèle, le POD des excrétats du zooplancton ou par la lyse des cellules algales ou bactériennes est hydrolysé par les enzymes de la surface cellulaire (phosphatase alcaline et nucléotidase). Le phosphate ainsi régénéré est soit immédiatement utilisé par les cellules soit réincorporé dans le pool ambiant de phosphore inorganique. Dans la rade de Toulon, cette utilisation immédiate des ions orthophosphate par les cellules serait beaucoup plus rapide en février, probablement en raison de besoins en nutriments élevés provenant des organismes autotrophes, dont la croissance est alors directement stimulée par l'augmentation de la photopériode.

Ces observations permettent d'avancer que la simple mesure des concentrations en PID du milieu ambiant n'est probablement pas suffisante pour expliquer le niveau de l'activité de la phosphatase, en particulier lorsque ces concentrations sont basses. Une meilleure compréhension des relations entre l'activité de cette enzyme et le phosphore nécessiterait par conséquent de prendre également en compte les concentrations du POD, en particulier de la fraction hydrolysable par la phosphatase alcaline. Dans ces conditions, l'activité phosphatasique pourrait être considérée comme le meilleur indicateur des besoins de

l'écosystème en phosphore, car elle intègre non seulement le niveau des concentrations en PID mais également celui des concentrations en POD.

Contrairement à l'activité à forte affinité, l'activité particulaire à faible affinité ne semble pas reliée aux concentrations du phosphore. Son Km élevé et le fait qu'elle ait été surtout mise en évidence après broyage des cellules planctoniques indiquent qu'elle pourrait participer au métabolisme phosphoré intracellulaire. Nos conclusions se rapprochent de celles de Cembella *et al*., (1984a) ainsi que Price et Morel (1990) pour qui la phosphatase alcaline intracellulaire serait constitutive et non controlée par le régulon. Pourtant Dyhrman et Palenik (1999) ont observé que des algues maintenues en milieu carencé en phosphore manifestaient une activité phosphatasique intracellulaire plus élevée.

2.4 Différences intersites et statut du phosphore

Aucune différence marquée n'a été trouvée entre la Petite Rade et la Grande Rade, aussi bien en ce qui concerne les concentrations des composés phosphorés que les diverses activités phosphatasiques spécifiques. Les seules différences significatives relevées portent sur les activités exprimées par litre d'eau de mer ou les concentrations du phosphore particulaire lesquelles sont souvent plus élevées dans la Petite Rade. Ces différences s'expliquent aisément par les abondances planctoniques qui sont souvent plus élevées dans la Petite Rade, en particulier celles du zooplancton. Des différences significatives ont été également relevées dans le cas de l'azote. Mais nous avons montré qu'elles proviennent surtout de très fortes valeurs relevées en fin de cycle en rapport avec un épisode de pluie important, dont les répercussions ont été plus marquées dans la Petite Rade, milieu semi fermé, que dans la Grande Rade.

Ces observations indiquent que le statut du phosphore serait identique dans les deux sites. Entre mars 2005 et avril 2006 deux périodes on été caractérisées. La première va du mois d'avril, début du cycle au mois d'août. Au cours de cette période, l'activé phosphatasique joue un rôle déterminant sur le renouvellement des ions orthophosphate biodisponibles. Cette activité fluctue alors rapidement et son niveau est contrôlé principalement par celui des concentrations en orthophosphate. Les réserves en phosphore organique s'épuisent alors progressivement, conduisant à un état critique en été où les carences en phosphore organique et inorganique sont à l'origine d'un stress particulièrement sévère pour le plancton à l'origine d'une très forte augmentation de l'activité spécifique phosphatasique. La seconde période va

de septembre à mars. Elle est caractérisée par des concentrations en phosphore organique mais surtout inorganique plus élevées et par de faibles niveaux des activités phosphatasiques. Les pluies, plus fréquentes, pourraient être alors déterminantes sur le renouvellement du phosphore et conditionner le développement du plancton, en particulier en automne.

La mesure de l'activité phosphatasique, à condition qu'elle soit pratiquée sur le matériel particulaire intact ou qu'elle concerne exclusivement la composante à forte affinité est alors à même de servir d'indicateur de stress pour le plancton et de révélateur de ses besoins en phosphore biodisponible. Cette activité serait davantage contrôlée par les concentrations de phosphore inorganique et par celles du phosphore organique hydrolysable que par le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-}.

Synthèse

Le phosphore constitue l'un des éléments minéraux indispensables au développement du plancton. En Méditerranée, ses concentrations sont particulièrement basses et elles peuvent limiter le développement du plancton. Notre travail a consisté en un suivi de l'évolution des concentrations des formes dissoutes de cet élément (inorganique, organique hydrolysable, oxydable) et de ses formes particulaires dans la Petite Rade et la Grande Rade de Toulon. L'activité des phosphatases qui sont responsables des conversions du phosphore organique en phosphore inorganique ont été analysées dans l'eau de mer mais surtout dans les fractions dissoutes et particulaires. Les mesures de activités phosphatasiques ont été effectuées en utilisant le pNPP ainsi qu'un substrat fluorescent le MUF-P. L'ensemble de ces données permettra de préciser le statut du phosphore dans un écosystème littoral méditerranéen perturbé.

Une partie du phosphore organique dissous est hydrolysable en particulier sous l'action de la phosphatase alcaline. Nous l'avons confirmé en ajoutant à l'eau de mer de l'enzyme purifiée, ce qui nous a permis de calculer les concentrations de ces substrats hydrolysables par la phosphatase. Les concentrations du phosphore organique dissous hydrolysable fluctuent beaucoup au cours du cycle annuel. Dans la Petite Rade comme dans la Grande Rade elles présentent des valeurs plus élevées en mai-juin (0,100-0,140 µM), de septembre à novembre (0,100-0,160 µM) et en février (0,07-0,09 µM). En contrepartie des concentrations proches de zéro ont été enregistrées en mars-avril, en décembre mais surtout en juillet-août. L'évolution et les niveaux des concentrations en orthophosphate sont assez comparables dans la petite et dans la Grande Rade. Entre avril et octobre, ces concentrations fluctuent avec des maxima en mai (0,080-0,180 µM), août (0,100-0,140 µM) et octobre (0,150-0,160 µM). En revanche en avril, en septembre mais surtout en juillet ces concentrations sont voisines de zéro. Entre octobre et janvier, ces concentrations se maintiennent à des niveaux plus forts qu'aux autres périodes de l'année (minimum 0,090 µM) à l'exception du mois de novembre dans la Grande Rade où la concentration est très basse (0,02 µM).

De plus, le rapport NO_3^-/ PO_4^{3-} ne dépasse 16 qu'aux mois de février et mars dans les deux rades, ainsi qu'en avril dans la Petite Rade et en novembre dans la Grande Rade. A ces périodes le phosphore serait l'élément limitant mais pendant le reste du cycle, ce serait l'azote. Il est à noter qu'en juillet, dans les deux sites, les concentrations en phosphore et

azote sont indétectables. Cette période serait donc caractérisée par une co-limitation par l'azote et le phosphore.

Une activité phosphatasique a été caractérisée dans le filtrat obtenu par passage d'eau de mer sur des filtres de 0,45 µm. C'est l'activité dissoute. Elle inclut des activités à forte et à faible affinités, l'activité à faible affinité étant toujours plus élevée que l'activité à forte affinité. L'évolution de cette activité au cours du cycle annuel est comparable dans la Petite Rade et la Grande Rade et son niveau est assez voisin (9,5 nmoles MUF/h/l). Dans les deux sites, trois pics de plus forte activité ont été relevés, l'un en mai 2005 (11,5-20 nmoles MUF/h/l), l'autre entre septembre et novembre 2005 (en moyenne 9 nmoles MUF/h/l) et enfin le dernier en janvier (15 nmoles MUF/h/l). L'activité à forte affinité se caractérise par un optimum de pH voisin du pH de l'eau de mer alors que l'activité à faible affinité a un pH optimum plus alcalin (pH=9).

L'activité particulaire exoenzymatique ou intacte a été calculée par différence entre l'activité totale de l'eau de mer et l'activité dissoute. Elle est surtout associée à une activité à forte affinité. Entre mars et octobre cette activité particulaire fluctue beaucoup dans la Petite Rade comme dans la Grande Rade avec des niveaux qui peuvent être particulièrement élevés en particulier en juillet (26 nmoles MUF/h/l),en septembre (70 nmoles MUF/h/l) et en mars 2006 (42 nmoles MUF/h/l). En revanche, entre octobre et février les niveaux d'activité sont stables et très bas. Ces niveaux sont assez comparables dans la Petite Rade et dans la Grande Rade.

Quand cette activité particulaire est mesurée sur du matériel particulaire broyé, des activités à faible et à forte affinités ont été mises en évidence. L'activité à forte affinité mesurée sur le broyat est tout à fait comparable (même Vmax et même Km) à l'activité mesurée sur le matériel particulaire intact. L'étude de l'activité de différentes classes de taille a permis de montrer que cette activité particulaire à forte affinité est particulièrement élevée pour la plus petite classe de taille (0,45-1 µm : 8,2 nmoles MUF/h/l dans la Petite Rade) alors que l'activité à faible affinité est plus élevée pour la plus grande classe (>90 µm : 2 nmoles MUF/h/l).

Ces données nous ont permis de conclure que l'activité à forte affinité est une activité exoenzymatique qui agit sur des substrats présents dans l'eau de mer, alors que l'activité à faible affinité est surtout intracellulaire. L'activité exoenzymatique concerne surtout les bactéries ou le picoplancton, alors que l'activité intracellulaire est surtout élevée sur le zooplancton.

Une étude spécifique de l'activité du zooplancton a été entreprise sur des organismes isolés. Elle a permis de montrer que ses niveaux pouvaient être plusieurs centaines de fois plus

élevés chez les larves de Cirripèdes que chez les autres espèces. Par ailleurs, l'activité intracellulaire associée au zooplancton présente un optimum à un pH voisin de l'eau de mer (pH=8,3) (particulièrement sur les larves de Cirripèdes), ainsi qu'un optimum plus alcalin (pH=9). L'activité intracellulaire des autres classes de taille a un optimum de pH toujours très alcalin (pH=9-9,5).

L'activité particulaire exoenzymatique à forte affinité présente des niveaux comparables dans les deux sites quand elle est rapportée à la biomasse protéique (activité spécifique). Pour la plus petite classe taille, qui représente l'essentiel de cette activité, elle fluctue au cours du cycle avec des niveaux plus élevés mais plus variables entre mai et septembre (0,2 nmoles MUF/h/µg), et plus bas et plus stables entre octobre et février (0,018 nmoles MUF/h/µg). L'activité intracellulaire à faible affinité, mesurée au pH de l'eau de mer est généralement beaucoup plus faible que l'activité à forte affinité.

Des analyses de corrélation ont permis de mettre en relation les activités particulaires des différentes classes de taille avec le zooplancton pour l'activité de la plus grande classe de taille, et avec le phytoplancton pour les classes de taille intermédiaires. En revanche aucune corrélation avec les abondances des bactéries n'a pu être faite. Des analyses de corrélation effectuées à partir des activités dissoutes ont permis de montrer que l'activité à faible affinité pourrait provenir d'activités intracellulaires de cellules phytoplanctoniques mortes.

Des analyses de corrélation ont également montré que l'activité phosphatasique à forte affinité est mieux corrélée avec les concentrations en orthophosphates qu'avec le rapport NO_3^-/PO_4^{3-}, en particulier pour les plus petites classes de taille. L'activité phosphatasique est toujours basse quand les concentrations en orthophosphate sont élevées. En revanche, elle augmente souvent quand ces concentrations diminuent. Toutefois en novembre et en février son niveau reste bas en dépit de concentrations en orthophosphates faibles. A ces périodes, les concentrations en phosphore organique hydrolysable sont élevées et il a été avancé que le phosphore inorganique produit dans le microenvironnement des cellules, par le biais de la phosphatase, pourrait être suffisant pour couvrir leurs besoins.

Ces données confirment que l'activité phosphatasique particulaire contribuerait majoritairement à la fourniture d'orthophosphate biodisponible entre avril et septembre. A partir de septembre, le phosphore inorganique pourrait provenir des précipitations ou de remontées à partir des sédiments en relation avec les coups de vents plus fréquents enregistrés à cette période. Ces résultats soulignent l'intérêt de la mesure des concentrations des principales formes de phosphore ainsi que de l'activité phosphatasique dans la rade de Toulon pour comprendre la dynamique de la croissance du plancton, le phosphore pouvant être

considéré comme un élément temporairement limitant. La mesure de l'activité phosphatasique à forte affinité peut ainsi être considérée comme un bon marqueur du stress phosphoré dans la rade de Toulon.

Bibliographie

AFNOR, Recueil des normes françaises, 1997. Qualité de l'eau. Tome 3. Méthodes d'analyse 2. Eléments majeurs, autres éléments et composés minéraux. 2ème édition. *AFNOR (Eds),* p265.

Agusti S., Satta M.P., Mura M.P., Benavent E., 1998. Dissolved esterase activity as a tracer of phytoplankton lysis rates in the Northwestern Mediterranean. *Limnol. Oceanogr*., 43, 1836-1849.

Aiba H., Mizuno T., 1994. A novel gene whose expression is regulated by the response-regulator, SphR, in response to phosphate limitation in *Synechococcus* species PCC7942. *Mol. Microbiol.,* 13, 25-34.

Amblard C., 1987. Les successions phytoplanctoniques en milieu lacustre. *Ann. Biol.,* 26 (1) : 1-33.

Ammerman J.W., Azam F., 1985. Bacterial 5'-nucleotidase in aquatic ecosystems: a novel mechanism of phosphorus regeneration. *Science* 227, 1338-1340.

Ammerman J.W., Azam F., 1991. Bacterial 5' nucléotidase activity in estuarine and coastal marine waters: characterisation of enzyme activity. *Limnol. Oceanogr.* 36, 1427-1436.

Arar, E.J., 1994. Evaluation of a new fluorometric technique that uses highly selective interference filters for measuring chlorophyll *a* in the presence of chlorophyll *b* and pheopigments,Environmental Monitoring Systems Laboratory, *Office of Research and Development,USEPA, Cincinnati*.

Azam F., Hodson R.E., 1981. Multiphasic kinetics for D-glucose uptake by assemblages of natural marine-bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser*., 6, 213-222.

Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A., Thingstad F. 1983. The ecological role of watercolumn microbes in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10, 257-263.

Bartoli G., Migon C., Losno R., 2005. Atmospheric input of dissolved inorganic phosphorus and silicon to the coastal northwestern Mediterranean Sea: Fluxes, variability and possible impact on phytoplankton dynamics. Deep-sea Res. 52, 2005-2016.

Belin C., Beliaeff B., Raffin B., Rabia M., Ibanez, F. 1995. Phytoplankton time-series data of the French phytoplankton monitoring network: toxic and dominant species. In Lassus P., Arzul G., Erard E., Gentien P., Marcaillou C. (eds), Harmful Marine Algal Blooms. Technique et Documentation-Lavoisier, Intercept Ltd.

Benitez-Nelson C., Buesseler K.O., 1999. Temporal variability of inorganic and organic phosphorus turnover rates in the coastal ocean. *Nature,* 389, 502-505.

Benitez-Nelson C., 2000. The biogeochemical cycling of phosphorus in marine systems. *Earth-Science Reviews,* 51, 109-135.

Berland B., Bonin D.J., Maestrini Y., 1980. Azote ou phosphore? Considérations sur le « paradoxe nutritionnel » de la Mediterranée. *Oceanol. Acta.* 3 : 135-142.

Bethoux J.P., Copin-Montegut G., 1986. Biological fixation of atmospheric nitrogen in the Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 31, 1353-1358.

Bethoux J.P., Morin P., Chaumery C., Connan O., Gentili B., Ruiz-Pino D. 1998. Nutrients in the Mediterranean sea, mass balance and statistical analysis of concentrations with respect to environmental change. *Marine Chemistry.* 63, 155-169.

Bethoux J.P., Morin P., Ruiz-Pino D.P., 2002. Temporal trends in nutrients ratios: chemical evidence of Mediterranean ecosystem changes driven by human activity. Deep-sea Res. 49, 2007-2016.

Björkman K., Karl D.M., 1994. Bioavailability of inorganic and organic P compounds to natural assemblages of microorganisms in Hawaïan coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 111, 265-273.

Blum J.J., 1965. Observation on the acid phosphatase of Euglena gracilis. *J. Cell. Biol.* 24, 223-234.

Boavida M.J., Heath R.T., 1984. Phosphatase activity of *Chlamydomonas acidophila* Negoro (Volvocales, Chlorophyceae). *Phycologia,* 25, 400-404

Boavida M.J., Heath R.T., 1988. Is alkaline phosphatise always important in phosphate regeneration? *Arch. Hydrobiol.,* 111: 507-518.

Boavida M., 2005. ASLO Summer Meeting. Santiago da Compostela, Spain.

Bogé G., Jamet J-L., Richard S., Jamet D., Jean N., 2002. Contribution of copepods, cladocerans and cirripeds to phosphatase activity in Mediterranean zooplankton. *Hydrobiologia,* 468, 147-154.

Bogé G., Jean N., Jamet J-L., Jamet D., Richard S., 2006. Seasonal changes in phosphatase activities in Toulon Bay (France). *Mar. Env. Res.*, 61, 1-18.

Bonin D.J., Bonin M.C., Berman T., 1989. Mise en évidence expérimentale des facteurs nutritifs limitants de la production du micro-nanoplancton et de l'ultraplancton dans une eau côtière de la Méditerranée orientale (Haïfa, Israël). *Aquat. Sci.* 51 (2), 132-148.

Bonin D.J., Travers M., 1992. Examen critique des méthodes d'estimation de la biomasse et de l'activité des microorganismes dans les systèmes aquatiques. *Mar. Life,* 2 : 1-29.

Boon P.I., 1993. Organic matter degradation and nutrient regeneration in Australian freshwaters. III. Size fractionation of phosphatise activity. *Arch. Hydrobiol.,* 126: 339-360.

Bougis P., 1974. Ecologie du plancton marin. I. Le phytoplancton. *Coll. Ecol. n°2, Masson Eds,* 197 pp.

Bourrelly P., 1966. Les algues d'eau douce. Tome I : les algues vertes. *Boubée & Cie,* 511 pp.

Bowman M.F., Chambers P.A., Schindler D.W., 2005. Epilithic algal abundance in relation to anthropogenic changes in phosphorus bioavailability and limitation in mountain rivers. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62: 174-184.

Broche P., Devenon J.L., Forget P., Maistre J.C., Naudin J.J., Cauwet G. 1998. Experimental study of the Rhône plume. Part I: physics and dynamics. Oceanologica Acta 21: 725-738.

Burns R.G., 1978. Enzymes activity in soil: some theoretical and practical considerations. In: Burns RG (Ed) Soil enzymes. *Academic Press, London,* p 295-340.

Buscemi C., 1999. Technique analytique de la qualité de l'eau en zone côtière. *BTS de Chimie du Lycée Jean Perrin,* 32 pp.

Caron D.A., Lin Lim E., Sanders R.W., Dennett M.R., Berninger U.G., 2000. Responses of bacterioplankton and phytoplankton to organic carbon and inorganic nutrient additions in contrasting oceanic ecosystems. *Aquat. Microb. Ecol.* 22: 175-184.

Carr O.J., Goulder R., 1990. Fish-farm effluents in rivers – I. Effects on bacterial populations and alkaline phosphatise activity. *Wat. Res.,* 24 (5): 631-638.

Cembella A.D., Antia N.J., Harrison P.J., 1984a. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part 1. *Crit. Rev. Microbiol.* 11, 13-81.

Cembella A.D., Antia N.J., Harrison P.J., 1984b. The utilization of inorganic and organic phosphorus compounds as nutrients by eukaryotic microalgae: a multidisciplinary perspective: Part 2. *Crit. Rev. Microbiol.* 11, 13-81.

Christian J.R., Karl D.M., 1995. Bacterial ectoenzymes in marine waters: Activity ratios and temperature responses in three oceanographic provinces. *Limnol. Oceanogr.* 40(6): 1042-1049.

Chrost R.J., Siuda W., Halemejko G.Z., 1984. Long term studies on alkaline phosphatise activity (APA) in a lake with fish aquaculture in relation to lake eutrophication and phosphorus cycle. *Arch. Hydrobiol., Suppl.* 70(1):1-32.

Chrost R.J., Siuda W., Albrecht D., Overbeck J., 1986. A method for determining enzymatically hydrolysable phosphate (EHP) in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 31: 662-667.

Chrost R.J., Overbeck J., 1987. Kinetics of alkaline phosphatase activity and phosphorus availability for phytoplankton and bacterioplancton in lake Pluβsee (North German Eutrophic Lake). *Microb. Ecol.,* 13: 229-248.

Chrost R.J., Münster U., Rai H., Albrecht D., Witzel P.K., Overbeck J., 1989. Photosynthetic production and exoenzymatic degradation of organic matter in the eutrophic zone of a eutrophic lake. *J. Plankton Res.,* 11: 223-242.

Chrost R.J., 1990. Microbial ectoenzymes in aquatic environnements. *In Overbeck J., Chrost R.J. Eds. Aquatic microbial ecology biochemical and molecular approaches. Springer Verlag. New York,* p. 47-78.

Chrost R.J., 1991. Microbial enzymes in aquatic environments. *Springer-Verlag, New-York.*

Chu S.P. 1946. The utilization of organic phosphorus by phytoplancton. *J. Mar. Biol.* 6, 285-295.

Chung C-C., Hwang S-P. L., Chang J., 2003. Identification of a high-affinity phosphate transporter gene in a Prasinophyte alga, *Tetraselmis chui*, and its expression under nutrient limitation. *Appl. Envir. Microbiol.*, 69, 754-759.

Clark L.L., Ingall E.D., Benner R., 1998. Marine phosphorus is selectively remineralized. *Nature* 393: 426.

Collos, Y., Bec,B., Jauzein, C., Abadie, E., Laugier, T., Lautier, J., Pastoureaud, A., Souchu, P., Vaquer, A. 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea Research* 61: 68-75

Cook A. M., Daughton C.G., Alexander M., 1978. Phosphonate utilization by Bacteria. *J. Bacteriol.,* 133, 85-90.

Coste B., Jacques G., Minas H.J. 1977. Sels nutritifs et production primaire dans le golfe du Lion et ses abords. Ann. Inst. Océangr. 53 : 189-202.

Cotner J.B., Wetzel R.G., 1992. Uptake of dissolved inorganic and organic phosphorus compounds by phytoplankton and bacterioplankton. *Limnol. Oceanogr.,* 37(2): 232-243.

Cotner JB., Ammerman J.W., Peele E.R., Bentzen E., 1997. Phosphorus-limited bacterioplankton growth in the Sargasso Sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 13, 141-149.

Currie D.J., Kalff J., 1984. The relative importance of bacterioplankton and phytoplankton in phosphorus uptake in freshwater. *Limnol. Oceanogr.* 29, 311-321.

Currie D.J., Bentzen E., Kalff J., 1986. Does algal-bacterial phosphorus partitioning vary among lakes? A comparative study of orthophosphate uptake and alkaline phosphatase activity in freshwater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.,* 43:311-317.

Despiau S., Gourdeau J., Jamet D., Geneys C., Jamet J.L. 2002. seawater DMS in a perturbed coastal ecosystem. Hydrobiologia 489: 107-115.

Diaz F., Raimbault P., Boudjellal B., Garcia N., Moutin, T. 2001. Early spring phosphorus limitation of primary productivity in a NW Mediterranean coastal zone (Gulf of Lions). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 211, 51-62.

Direction du CONTRAT DE BAIE / TPM – COPRAMEX / MV Aqua expertise –2007 Etude sur la Capacité Aquacole de la baie du Lazaret (Rade de Toulon). Rapport final.*TPM (Eds)* 160 pp.

Durrieu de Madron X., Denis L., Diaz F., Garcia N., Guieu C., Grenz C., Loÿe-Pilot M-D., Ludwig W., Moutin T., Raimbault P., Ridame C., 2003. Nutrients and carbon budgets for the Gulf of L ion during the Moogli cruises. *Oceanologica Acta*, 26, 421-433.

Dyhrman S.T, Palenik B., 1999. Phosphate stress in cultures and field populations of the Dinoflagellate Prorocentrum minimum detected by a single-cell alkaline phosphatase assay. *Appl. Env. Microbiol.,* 65, 3205-3212.

Dyhrman S.T, Chappell P.D., Haley S.T., Moffett J.W., Orchard E.D., Waterbury J.B., Webb E.A., 2006. Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature,* 439, 68-71.

Dyhrman S.T., Ruttenberg K.C., 2006. Presence and regulation of alkaline phosphatase activity in eukaryotic phytoplankton from the coastal ocean: Implications for dissolved organic phosphorus remineralization. *Limnol. Oceanogr.,* 51, 1381-1390.

FernÁndez M., Bianchi M. & Van Wambeke F. 1994. Bacterial biomass, heterotrophic production and utilization of dissolved organic matter photosynthetically produced in the Almeria-Oran front. *J. Mar. Systems* , 5 (3-5) 313-325.

Francko D.A., 1983. Size-fractionation of alkaline phosphatase activity in lake water by membrane filtration. *J. Fresh. Ecol.,* 2(3): 305-309.

Froehlich P.N. 1988. Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: a primer on the phosphate buffer mechanism. *Limnol. Oceanogr*. 33, 649-668.

Frontier S., Pichod-Viale D. 1993. Ecosystèmes : Structure, Fonctionnement, Evolution. *Coll. Ecol. n°21, Masson Eds,* 447 pp.

Gage M.A., Gorham E., 1985. Alkaline phosphatase activity and cellular phosphorus as an index of the phosphorus status of phytoplankton in Minnesota lakes. *Freswater Biology,* 15, 227-233.

Gambin F., Bogé G., Jamet D., 1999. Alkaline phosphatase in a littoral Mediterranean marine ecosystem: role of the main plankton size classes. *Mar. Env. Res.,* 47, 441-456.

Garcia-Ruiz R., Hernàndez I., Lucena J., Niell F.X., 1997. Preliminary studies on the significance of alkaline phosphatase in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin. *Sci. Mar.*, 61, 517-525.

Garcia-Ruiz R., Hernàndez I., Lucena J., Niell F.X., 2000. Significance of phosphomonoesterase activity in the regeneration of phosphorus in a meso-eutrophic, P-limited reservoir. *Soil Biology and Biochemistry*, 32, 1953-1964.

Gillor O., Hadas O., Post A.F., Belkin S., 2002. Phosphorus bioavailability monitoring by a bioluminescent cyanobacterial sensor strain. *J. Phycol.* 38, 107-115.

Gomez E., Durillon C., Rofes G., Picot B., 1999. Phosphate adsorption and release from sediments of brackish lagoons: pH, O_2, and loading influence. *Wat. Res.* 33, 2437-2447.

González-Gil S., Keafer B.A., Jovine R.V.M., Aguilera A., Lu S.H., Anderson D.M., 1998. Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton. Mer. Ecol. Prog. Ser., 164, 21-35.

Guerzoni S., Chester R., Dulac F., Herut B. Loÿe-Pilot M.D., Measures C., Migon C., Molinaroli E., Moulin C; Rossini P., Saydam C., Soudine A., Ziveri P. 1999. The role of atmospheric deposition in the biogeochemistry of the Mediterranean sea. *Progr. Oceanogr.*, 44, 147-190.

Guillaud J-F., Romaña L-A., 1991. La mer et les rejets urbains. *Bendor 13-15 Juin 1990. Actes des Colloques n°11. IFREMER (Eds)*, 244 pp.

Halemejko G.Z., Chrost R.J., 1984. The role of phosphatases in phosphorus mineralization during decomposition of lake phytoplankton blooms. *Arch. Hydrobiol.,* 101(4): 489-502.

Hargrave B.T., Geen G.H., 1968. Phosphorus excretion by zooplankton. *Limnology and oceanography,* 13, 332-342.

Heath R.T., Cooke D., 1975. The significance of alkaline phosphatase in a eutrophic lake. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 959-965.

Hernàndez I., Hwang S.J., Heath R.T., 1996. Measurements of phosphomonoesterase activity with a radiolabelled glucose-6-phosphate. Role in the phosphorus requirement of phytoplankton and bacterioplankton in a temperate mesotrophic lake. *Arch. Hydrobiol*. 137: 265-280.

Hill D., Summer G.K., Waters M.D., 1968. An automated fluorometric assay for alkaline phosphatase using 3-*O*-methyl-fluorescein phosphate. *Analyt. Biochem.,* 24: 9-17.

Hino S., 1988. Fluctuation of algal alkaline phosphatase activity and the possible mechanisms of hydrolysis of dissolved organic phosphorus in Lake Barato. *Hydrobiologia,* 157, 77-84.

Holboe N., Jensen H.S., Andersen F.O., 1999. Nutrient addition bioassays as indicators of nutrient limitation of phytoplankton in an eutrophic estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* 186, 95-104.

Hollibaugh J.T., Azam F., 1983. Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 28, 1104-1116.

Holm-Hansen O., Lorenzen C.J., Holmes R.W., Stricklands J.D.H., 1965. Fluorometric determination of chlorophyll, *J. Cons. perm. int. Explor. Mer.,* 30(1): 3-15.

Hoppe H.G., 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* 11: 299-308.

Hoppe H.G., 2003. Phosphatase activity in the sea. *Hydrobiologia,* 493, 187-200.

Huang B., Ou L., Wang X., Huo W., Li R., Hong H., Zhu M., Qi Y., 2007. Alkaline phosphatase activity of phytoplankton in East China Sea coastal waters with frequent harmful algal bloom occurrences. *Aquat. Micro. Ecol.,* 49, 195-206.

IFREMER, 1993. Qualité du milieu marin littoral. Ministère Enseignement Supérieur et Recherche et Ministères Environnement, IFREMER Eds, 241 pp.

IFREMER, 2001. L'eutrophisation des eaux marines et saumâtres en Europe, en particulier en France, IFREMER Eds, 59 pp.

Istvanovics V., Petterson K., Pierson D., Bell R., 1992. Evaluation of phosphorus deficiency indicators for summer phytoplankton in Lake Erken. *Limnol. Oceanogr.,* 37, 890-900.

Jamet D., Aleya L., Devaux J., 1994. Diel changes in the alkaline phosphatase activity of bacteria and phytoplancton in the hypereutrophic Villerest Reservoir (Roanne, France). *Hydrobiologia,* 300/301 : 49-56.

Jamet D., Amblard C., Devaux J., 1997. Seasonal changes in alkaline phosphatase activity of bacteria and microalgae in Lake Pavin (Massif Central, France). *Hydrobiologia,* 347, 185-195.

Jamet, J.L., Bogé, G., Richard, S., Geneys, C., Jamet, D., 2001. The zooplankton community in bay of Toulon area (northwest Mediterranean Sea, France). *Hydrobiologia* 457: 155-165.

Jamet, J.L., Jean, N., Bogé, G., Richard, S., Jamet, D., 2005. Plankton succession and assemblage structure in two neighbouring littoral ecosystems in the north-west Mediterranean Sea. *Mar. Fresh. Res.* 56, 69-83.

Jansson M., 1976. Phosphatases in lake water: characterization of enzymes from phytoplankton and zooplankton by gel filtration. *Science,* 194: 320-321.

Jansson M., 1977. Enzymatic release of phosphate in water from subarctic lakes in northern Sweden. *Hydrobiologia,* 56: 175-180.

Jansson M., Olsson H., Pettersson K., 1988. Phosphatases; origin, characteristics and function in lakes. *Hydrobiologia* 170, 157-175.

Jean N., 2002. Etude du DMSP et du DMS dans deux écosystèmes littoraux marins de niveaux trophiques différents (Méditerranée Occidentale, France) : relation avec les facteurs abiotiques et biotiques. *Thèse de Doctorat de l'Université de Toulon et du Var,* 283 pp.

Jean N., Bogé G., Jamet J-L., Richard S., Jamet D., 2003. Seasonal changes in zooplanctonic alkaline phosphatase activity in Toulon Bay (France): the role of *Cypris* larvae. *Mar. Poll. Bull.*, 46, 346-352.

Justic D., Rabalais N.N., Turner R.E., Dortch Q., 1995. Changes in nutrient structure of river-dominated coastal waters –Stoichiometric nutrient balance and its consequences. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 40, 339-356.

Karl D.M., Tien G., 1992. MAGIC: a sensitive and precise method for measuring dissolved phosphorus in aquatic environments. *Limnol. Oceanogr.* 37, 105-116.

Kerhervé P., Minagawa M., Heussner S. Monaco A. 2001. Stable isotopes ($^{13}C/^{12}C$ and $^{15}N/^{14}N$) in settling organic matter of the northwestern Mediterranean Sea: biogeochemical implications. *Oceanol. Acta,* 24, 77-85.

Kobori H., Taga N., 1978. Phosphatase activity and its role in the mineralization of organic phosphorus in coastal waters. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 36, 23-39.

Koike I., Nagata T., 1997. High potential activity of extracellular alkaline phosphatase in deep waters of the central Pacific. Deep-sea Res. II, 44, 2283-2294.

Krom M.D., Kress N., Brenner S. 1991. Phosphorus limitation of primary productivity in the eastern Mediterranean Sea. *Limnol. Oceanogr.* 36(3), 424-432.

Krom M.D., Woodward E.M.S., Herut B., Kress N., Carbo P., Mantoura R.F.C., Spyres G., Thingstad T.F., Wassmann P., Wexels-Riser C., Kitidis V., Law C.S., Zodiatis G., 2005. Nutrients cycling in the south east Levantine basin of the eastern Mediterranean: Results from a phosphorus starved system. *Deep-Sea Res.* 52, 2879-2896.

Lacombe H. 1988. Considérations générales sur l'océanographie physique Méditerranéenne, no. Spécial : océanographie pélagique Méditerranéenne. In : Minas, H.J., Nival, P. (Eds.), *Océanol. Acta*, pp 7-12.

Le Poupon C., 1994. Automatisation d'un procédé d'analyse de l'azote organique dissous après minéralisation en conditions réductrices. *Thèse de Doctorat de l'Université de Toulon et du Var,* 182 pp.

Legendre L., Watt W.D., 1971-1972. On a rapid technique for plankton enumeration. *Ann. Inst. Oceanogr., Paris,* 58: 173-177.

Lenburg M.E., O'Shea E.K., 1996. Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci*., 21, 383-387.

Lespilette M., Bogé G., Richard S., Jamet J-L., 2007. Origin and characteristics of the zooplankton phosphatase activity in a coastal ecosystem of the Mediterranean Sea (Toulon Bay). *Mar. Env. Res.,* 63, 445-456.

Li H., Veldhuis M.J.W., Post A.F., 1998. Alkaline phosphatase activities among planktonic communities in the northern Red Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 173, 107-115.

Liu H., Campbell L., Landry M.R., 1995. Growth and mortality of Prochlorococcus and Synechococcus measured with a selective inhibitor technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116, 277-287.

Lohman H., 1908. Untersushungen zur Feststellung des vollstandigen Gehaltes des Meeres an Plankton. *Wiss. Meeresunters., Abt. Kiel N.F.,* 10: 132-170.

Lovdal T., Tanaka T., Thingstad T.F., 2007. Algal-Bacterial competition for phosphorus from dissolved DNA, ATP, and orthophosphate in a mesocosm experiment. *Limnol. Oceanogr.,* 52, 1407-1419.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.,* 193: 265-275.

Martinez J., Azam F., 1993. Periplasmic aminopeptidase and alkaline phosphatase activities in a marine bacterium: implications for substrate processing in the sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* 92: 89-97.

Martinez J., Smith D.C., Steward G.F., Azam F., 1996. Variability in ectohydrolytic enzyme activities of pelagic marine bacteria and its significance for substrate processing in the sea. *Aquat. Microb. Ecol.* 10, 223-230.

Marty J.C., Chiaverini J., Pizay M.D., Avril B. 2002. Seasonal and interanual dynamics of phytoplankton pigments in the Mediterranean Sea at the France-JGOFS DYFAMED time-series station (1991-1999). *Deep-Sea Res.* 49, 2017-2030.

Mc Comb R.B., Bowers G.N., Posen S., 1979. Alkaline phosphatases. *Plenium press, N.Y.,* 986 pp.

Mc Gill D.A. 1969. A preliminary study of the oxygen and phosphate distribution in the Mediterranean Sea. *Deep-sea Res.* 8, 259-275.

Mc Kelvie I.D., Peat D.M., Worsford P.J., 1995. Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters. *Anal. Proc. Including Anal. Comm.* 32, 437-445.

Middelboe M., Jorgensen N.O.G., Kroer, N. 1996. Effects of viruses on nutrient turnover and growth efficiency of noninfected marine bacterioplankton. Appl. Environ. Microbiol. 62, 1991-1997.

Migon, C., Sandroni, V. 1999. Phosphorus in rainwater: partitioning, inputs and impact on the surface coastal ocean. *Limnol. Oceanogr.,* 44, 1160-1165.

Migon, C., Sandroni, V. Bethoux J.P. 2001. Athmospheric input of anthropogenic phosphorus to the northwest Mediterranean during the oligotrophic season. *Mar. Environ. Res*., 52, 413-426.

Migon C., 2004. Fertilisation d'un système oligotrophe par les apports athmosphériques. *Oceanis (Paris)* 30 :22 171-188.

Moutin T., Raimbault P., Golterman H.L., Coste B. 1998. The input of nutrients by the Rhône River into the Mediterranean Sea: recent observations and comparisons with earlier data. In: J.C. Amiard, Le Rouzic B., Berthet B., Bertru G. (Eds), Oceans, Rivers and Lakes : Energy and Substance Transfers at Interfaces, *Hydrobiologia,* 373/734, 237-246.

Moutin T, Raimbault P. 2002. Primary production, carbon export and nutrients availability in western and eastern Mediterranean Sea in Early summer 1996 (MINOS cruise). *Journal of marine systems.* 33-34, 273-288.

Moutin T., Thingstad T.F., Van Wambeke F., Marie D., Slawyk G., Raimbault P., Claustre H., 2002. Does competition for nanomolar phosphate supply explain the predominance of the cyanobacterium *Synechococcus*? *Limnol. Oceanogr.*, 47 1562-1567.

Murphy J., Riley J.P., 1962. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *An. Chem. Acta.* 27: 31-36.

Nagaya M., Aiba H., Mizuno T., 1994. The sphR product, a two-component system response protein, regulates phosphate assimilation in *Synechococcus* sp. Strain PCC-7942 by binding to two sites upstream from the *phoA* promoter. *J. Bacteriol.*, 176, 2210-2215.

Nausch M., 1993. Alkaline phosphatase activities and the relationship to inorganic phosphate in the Pomeranian Bight (southern Baltic Sea). *Aquat. Microb. Ecol.* 16, 84-94.

Nausch M., 2000. Experimental evidence for interactions between bacterial peptidase and alkaline phosphatase activity in the Baltic Sea. *Aquat. Ecol*. 34, 331-343.

Nausch M., Nausch G., 2004. Bacterial utilization of phosphorus pools after nitrogen and carbon amendment and its relation to alkaline phosphatase activity. *Aquat. Microb. Ecol.,* 37: 237-245.

Neddermann K., Nausch M., 2004. The seasonality of stimulation of alkaline phosphatase activity by organic and anorganic nitrogen. *Aquat. Ecol.,* 38, 475-484.

Nedoma J., Garcia J.C., Comerma M., Simek K., Armengol J., 2006. Extracellular phosphatases in a Mediterranean reservoir: seasonal, spatial and kinetic heterogeneity. *Freshwater Biology,* 51, 1264-1276.

Newman S., Reddy K.R., 1992. Sediment resuspension effects on alkaline phosphatase activity. *Hydrobiologia,* 245: 75-86.

Newman S., Reddy K.R., 1993. Alkaline phosphatase activity in the sediment-water column of a hypertrophic lake. *J. Environm. Quality.* 22: 832-838.

Nicholson D., Dyhrman S., Chavez F., Paytan A., 2006. Alkaline phosphatase activity in the phytoplankton communities of Monterey Bay and San Francisco bay. *Limnol. Oceanogr.,* 51, 874-883.

Nürnberg G., Peters R.H., 1984. Biological availability of soluble reactive phosphorus in anoxic and oxic freshwaters. *Cand. J. Fish. Aquat. Sci.* 41:757-765.

Olsson H., 1990. Phosphatase activity in relation to phytoplankton composition and pH in Swedish lakes. *Freswater. Biol.,* 23: 353-362.

Paillard, M., Gravez, V., Clabaut, P., Walker, P., Blanc, J.J., Boudouresque, C.F., Belsher, T., Urscheler, F., Poydenot, F., Sinnassamy, J.M., Augris, C., Peyronnet, J.P., Kessler, M., Augustin, J.M., Le Drezen, E., Prudhomme, C., Raillard, J.M., Pergent, G., Hoareau, A., Charbonnele, E., 1993. Cartographie de l'herbier de Posidonie et des fonds marins environnants de Toulon à Hyères (Var-France). Reconnaissance par sonar latéral et photographie aérienne. Notice de présentation. IFREMER and GIS Posidonie, 36pp

Pant H.K., Reddy K.R., 2001. Phosphorus sorption characteristics of estuarine sediments under different redox conditions. *J. Environ. Qual.* 30: 1474-1480.

Perona R., Vallejo C.G., 1985. Acid hydrolases during Artemia development : a role in yolk degradation. *Comp. Biochem. Physiol. Part B,* 81, 993-1000.

Perry M.J., 1972. Alkaline phosphatase in subtropical Central North Pacific waters using a sensitive fluorometric method. *Mar. Biol.,* 15: 113-119.

Petterson K., Jansson M., 1978. Determination of alkaline phosphatase activity in lake water: a study of methods. *Verh. Internat. Verein. Limnol.,* 24: 231-235.

Petterson K., 1980. Alkaline phosphatase activity and algal surplus phosphorus as phosphorus deficiency indicator in lake Erken. *Arch. Hydrobiol.,* 89: 54.

Petterson K., 1985. The availability of phosphorus and the species composition of the spring phytoplankton in Lake Erken. *Internationale revue des gesamten hydrobiologie.* 70, 527-546.

Porter K.J., Feig Y.S., 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.,* 25: 943-948.

Price C., 1962. Repression of acid phosphatase synthesis in *Euglena gracilis. Science N.Y.*, 135, p 46.

Price N., Morel M., 1990. Role of extracellular enzymatic reactions in natural waters, p. 235-258. *In W. Stumm (ed.), Aquatic chemical kinetics: reactions rates of processes in natural waters. Wiley-Interscience, New York*, N.Y.

Raimbault P., Coste B. 1990. Very high values of nitrate: phosphate ratio (>30) in the subsurface layers of western Mediterranean Sea. *Rapp. Comm. Int. Mer. Mediterr.* 32 (1), C-18.

Raimbault P., Pujo-Pay M. 1993. Activation d'absorption de nitrate par l'addition de phosphate dans les eaux de l'Atlantique tropical. C.R. Acad. Sci., 316 740-744.

Raimbault P., Conan P., Coste B., 1995. Le phosphate en Méditerranée occidentale : données récentes et ré-évaluation de l'évolution temporelle au sein des eaux profondes. *Rapp. Comm. Int. Mer. Mediterr.* 34, 68.

Rao NN., Kar A., Roberts M.F., Yashphe J., Torriani-Gorini A., 1994. Phosphate, phospho-related metabolites, and the pho régulon of *Escherichia coli*. *In: Torriani-Gorini A, Yagil E., Silver S (eds) Phosphate in microorganisms: cellular and molecular biology. American society for microbiology Washington, DC,* p 22-29.

Rath J., Schiller C., Herndl G.J., 1993. Ectoenzymatic activity and bacterial dynamics along a trophic gradient in the Caribbean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 102, 89-96.

Ray J., Bhaya M.D., Block M.A., Grossman A.R., 1991. Isolation, transcription, and inactivation of the gene for an atypical alkaline phosphatase of *Synechococcus* sp. Strain PCC 7942. *J. Bacteriol.* 173, 4297-4309.

Redfield A.C., Ketchum B.H., Richards F.A. 1963. The influence of organisms on the composition of sea-water. *In: Hill M.N. (ed) The Sea, Vol 2. Wiley, New York,* p 26-77.

Rehnstam A.S., Bäckman S., Smith D.C., Azam F., Hagström A., 1993. Blooms of sequence-specific culturable bacteria in the sea. *FEMS Microb. Ecol*. 102, 161-166.

Reichardt W., Overbeck J., Steubing L., 1967. Free dissolved enzymes in lake waters. *Nature,* 216: 1345-1347.

Ridal J.J., Moore R.M., 1990. A re-examination of the measurements of dissolved organic phosphorus in seawater. *Mar. Chem*. 29, 19-31.

Ridame C., 2001. Rôle des apports athmosphériques d'origine continentale dans la biogéochimie marine: Impact des apports sahariens sur la production primaire en Mediterranée. Thèse de Doctorat, Université Paris VI, 246 pp.

Ridame C., Guieu C. 2002. Saharan input of phosphorus to the oligotrophic water of the open western Mediterranean. *Limn. Oceanogr*. 47, 856-869.

Ridame C., Moutin T., Guieu C., 2003. Does phosphate adsorption onto Saharan dust explain explain the unusual N/P ratio in the Mediterranean Sea? *Oceanologica Acta*, 26 629-634.

RINBIO. 2007. Création d'un réseau de suivi des contaminants chimiques en milieu marin au sein de la rade de Toulon par l'utilisation d'un intégrateur biologique (*Mytilus galloprovincialis*). IXSurvey, Dossier T1640. 85 pp.

Rivkin R.B., Swift E., 1980. Characterisation of alkaline phosphatase and organic phosphorous utilization in the oceanic Dinoflagellate Pyrocystis noctiluca. *Marine Biology*, 61 1-8.

RNO – Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin, 1987. Résultats de la campagne à la mer Intersite II. IFREMER et Secrétariat d'Etat chargé de l'environnement. DERO-87.20-EL. 356 pp.

Robertson B.R., Button D.K., 1989. Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry,* 10: 70-76.

Rose C., Axler R.P., 1998. Uses of alkaline phosphatase activity in evaluating phytoplankton community phosphorus deficiency. *Hydrobiologia,* 361, 145-156.

Rossi N., Jamet J.L., 2008. In situ heavy metals (copper, lead and cadmium) in different plankton compartments and suspended particulate matter in two coupled Mediterranean ecosystems (Toulon Bay, France). *Mar. Poll. Bull.,* 56, pp. 1862-1870.

Sachs J.P., Repetta D. 1999. Oligotrophy and nitrogen fixation during eastern Mediterranean sapropel events. *Science* 286 , 2485-2488.

Scanlan D.J., West N.J., 2002. Molecular ecology of the marine cyanobacteria *Prochlorococcus* and *Synechococcus. FEMS Microbiol. Ecol*., 40, 1-12.

Schmitter R.E., Jurkiewicz A.J., 1981. Acid phosphatase localization in peri iodic-acid sciff bodies of *Gonyaulax. J. Cell. Sci.*, 51, 15-24.

Sebastiàn M., Aristegui J., Montero M.F., Niell F.X., 2004 a. Kinetics of alkaline phosphatase activity, and effect of phosphate enrichment: a case study in the NW African upwelling region. *Mar. Ecol. Prog. Ser.,* 270, 1-13.

Sebastiàn M., Aristegui J., Montero M.F., Escanez J., Niell F.X, 2004 b. Alkaline phosphatase activity and its relationship to inorganic phosphorus in the transition zone of the North-western African upwelling system. *Prog. Oceanogr.,* 62, 131-150.

Shannon C.R., Weaver W., 1949. The mathematical Theory of Communication. *Urbana University, Illinois,* 117-127.

SIAT (Syndicat Intercommunal de l'Aire Toulonnaise) 2001. Contrat de baie de la rade de Toulon, étude et cartographie des biocénoses de la rade de Toulon. Dossier définitif, 151pp.

SIAT – Ifremer CONTRAT DE BAIE 2002 Etude en contribution au diagnostic de la qualité microbiologique (sanitaire) de la baie du Lazaret (rade de Toulon) des activités conchylicole 62 p.

Smith R.E.H., Kalff J., 1981. The effect of phosphorus limitation of algal growth rates: evidence from alkaline phosphatase. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 30, 1421-1427.

Somville M., Billen G., 1983. a method for determining exoproteolytic activity in natural waters. *Limnol. Oceanogr.* 28, 190-193.

Stevens R.J, Parr M.P., 1977. The significance of alkaline phosphatase activity in Lough Neagh. *Freshwat. Biol.,* 7: 351-355.

Stewart A.J., Wetzel R.G., 1982. Phytoplankton contribution to alkaline phosphatase activity. *Arch. Hydrobiol.,* 93(3): 265-271.

Strickland J.D., Parsons T.R., 1972. A practical book on seawater analysis, 2nd edn. *Bull. Fish. Res. Bd. Canada.* 167pp.

Suida W., 1984. Phosphatases and their role in organic phosphorus transformation in natural waters. A review. *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 31, 207-233.

Suzumura M., Ishikawa K., Ogawa H., 1998. Characterisation of dissolved organic phophorus in coastal seawater using ultrafilration and phosphohydrolytic enzymes. *Limnol. Oceanogr.* 43, 1553-1564.

Sym S.D., Pienaar R.N., 1993. The class Prasinophyceae. Prog. In Phycol. Res., 9, 281-376.

Taft J.L., Loftus M.E., Taylor W.R., 1977. Phosphate uptake from phosphomonoesters by phytoplankton in the Chesapeake Bay. *Limnol. Oceanogr.,* 22: 1012-1021.

Tanaka T., Henriksen P., Lignell R., Olli K., Seppala J., Tamminen T., Thingstad T.F., 2006. Specific affinity for phosphate uptake and specific alkaline phosphatase activity as diagnostic Tools for detecting phosphorus-limited phytoplankton and bacteria. *Estuaries and Coasts,* 29, 1226-1241.

Thingstad T.F., Rassoulzadegan F.,1995. Nutrient limitations, microbial food webs, and "biological C-pumps": suggested interactions in a P-limited Mediterranean. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 117, 299-306.

Thingstad T.F., Zweifel U.L., Rassoulzadegan F., 1998. P Limitation of heterotrophic bacteria and phytoplankton in the northwest Mediterranean. *Limnol. Oceanogr*. 43, 88-94.

Thingstad F., Krom M.D., Mantoura R.F.C., Flaten G.A.F., Groom S. Herut B., Kress N., Law C.S., Pasternak A., Pitta P., Psarra S., Rassoulzadegan F., Tanaka T., Tselepides A., Wassmann P., Woodward E.M.S., Wexels-Riser C., Zodiatis G., Zohary T., 2005. Nature of phosphorus limitation in the ultraoligotrophic eastern Mediterranean? *Science,* 309, 1068-1071.

Thomson-Bulldis A., Karl D.M. 1998. Application of a novel method for phosphorus determinations in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr*. 43, 1565-1577.

Trees, C.C., Kennicutt M.C., Brooks J.M., 1985. Errors associated with the standard fluorometric determination of chlorophylls and phaeopigments, *Marine Chemistry,* 17: 1-12.

Tregouboff G., Rose M., 1957. Manuel de planctonologie méditerranéenne *CNRS, Paris*. 2 vols.

Utermohl H., 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik. *Mitt. Intern. Verein. Theor. Und Angew. Limnol.,* 9 : 1-38.

Van Wambeke F., Christaki U., Giannakourou A., Moutin T., Souvemerzoglou K., 2002. Longitudinal and vertical trends of Bacterial limitation by Phosphorus and Carbon in the Mediterranean Sea. *Microb. Ecol*. 43, 119-133.

Vaulot D., Lebot N., Marie D., Fukai E., 1996. Effect of phosphorus on the Synechococcus cell cycle in surface Mediterranean waters during summer. *Appl. Environ. Microbial.* 62, 2527-2533.

Velji M.I., Albright L.J., 1993. Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria. *In: Kempf P. F., Sherr B.F., Cole J.J. Eds, Handbook of methods in aquatic microbial ecology, Lewis publishers, Boca raton,* 139-142.

Vidal M., Duarte C.M., Agusti S., Gasol J.M., Vaqué D., 2003. Alkaline phosphatase activities in the central Altantic Ocean indicate large areas with phosphorus deficiency. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 262, 43-53.

Wagner K., Masepohl U.B., Pistorius E.K., 1995. The cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 contains a second alkaline phosphatase encoded by *phoV*. *Microbiology*, 141 3049-3058.

Wanner B.L., 1986. Bacterial alkaline phosphatase clonal variation in Some *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant strains. *J. Bacteriol.,* 168, 1366-1371.

Wetzel R.G., 1981. Long term dissolved and particulate alkaline phosphatase activity in a hardwater lake in relation to lake stability and phosphorus enrichments. *Verh. Internat. Verein. Limnol.,* 21: 337.

Wood E. D., Armstrong A. A. Richards F.A. 1967. Determination of nitrate in sea water by cadmium-copper reduction to nitrite. *J. Mar. Biol., Ass. U.K.,* 47: 23-31.

Wynne D., 1977. Alternations in activity of phosphatases during the Peridinium bloom in lake Kinneret. *Physiol. Pl.,* 40, 219-224.

Yamaguchi H., Yamaguchi H., Fukami K., Adachi M., Nishijima T., 2005. Utilization of phosphate diester by the marine diatom *Chaetoceros ceratosporus*. *J. Plankton Res.,* 27, 603-606.

Yentsch, C.S., Menzel D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.,* 10: 221-231.

Zaccone R., Caruso G., Cali C., 2002. Heterotrophic bacteria in the northern Adriatic Sea: seasonal changes and ectoenzyme profile. *Mar. Envir. Res.* 54, 1-19.