



HAL
open science

Réponse des foraminifères à l'anoxie dans les milieux côtiers : études in situ de l'écologie des foraminifères benthiques, expériences en laboratoire et analyse du métabolisme anaérobie

Dewi Langlet

► **To cite this version:**

Dewi Langlet. Réponse des foraminifères à l'anoxie dans les milieux côtiers : études in situ de l'écologie des foraminifères benthiques, expériences en laboratoire et analyse du métabolisme anaérobie. Sciences de la Terre. Université d'Angers; Université Nantes Angers Le Mans (UNAM), 2014. Français. NNT : . tel-01144631

HAL Id: tel-01144631

<https://theses.hal.science/tel-01144631v1>

Submitted on 22 Apr 2015

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

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



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - ShareAlike 4.0 International License

Thèse de Doctorat

Dewi LANGLET

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : VENAM

Discipline : Sciences de la Terre
Spécialité : Environnement
Unité de recherche : UMR CNRS 6112 – LPG-BIAF

Soutenue le 24 Avril 2104
Thèse N° : 1342

Réponse des foraminifères benthiques à l'anoxie dans les milieux côtiers : études in situ de l'écologie des foraminifères benthiques, expériences en laboratoire et analyse du métabolisme anaérobie

JURY

Rapporteurs : **Annachiara BARTOLINI**, Professeur, Muséum national d'Histoire naturelle
Gerhard SCHMIEDL, Professeur, Universität Hamburg

Examineurs : **Thierry LEBEAU**, Professeur, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Frans JORISSEN**, Professeur, Université d'Angers

Co-directeurs de Thèse : **Emmanuelle GESLIN**, Maître de conférences, Université d'Angers
Edouard METZGER, Maître de conférences, Université d'Angers

Sommaire

SOMMAIRE	1
AVANT PROPOS	3
INTRODUCTION.....	7
CHAPITRE 1. EXPERIENCE IN SITU D'INCUBATION EN ANOXIE A LONG-TERME EN MER ADRIATIQUE : GEOCHIMIE BENTHIQUE ET REPONSE DES FAUNES DE FORAMINIFERES	35
PARTIE I. ARTIFICIALLY INDUCED MIGRATION OF REDOX LAYERS IN A COASTAL SEDIMENT FROM THE NORTHERN ADRIATIC 37	
PARTIE II. FORAMINIFERAL SURVIVAL AFTER LONG-TERM IN SITU EXPERIMENTALLY INDUCED ANOXIA	57
PARTIE III. FORAMINIFERAL SPECIES RESPONSES TO IN SITU EXPERIMENTALLY INDUCED ANOXIA IN THE ADRIATIC SEA 83	
PARTIE IV. BILAN DU CHAPITRE 1.....	111
CHAPITRE 2. VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE DES COMMUNAUTES DE FORAMINIFERES BENTHIQUES DANS L'ESTUAIRE FERME DE GREVELINGENMEER.....	121
PARTIE I. SPATIAL AND TEMPORAL VARIABILITY OF BENTHIC FORAMINIFERA IN THE GREVELINGENMEER, MAY, AUGUST AND NOVEMBER 2011	123
PARTIE II. RESUME ET NOUVEAUX RESULTATS DU PROJET	141
CHAPITRE 3. SURVIE, CROISSANCE ET METABOLISME DES FORAMINIFERES BENTHIQUES EN HYPOXIE ET EN ANOXIE.....	145
PARTIE I. SURVIVAL, REPRODUCTION AND CALCIFICATION OF THREE BENTHIC FORAMINIFERAL SPECIES IN RESPONSE TO EXPERIMENTALLY INDUCED HYPOXIA.....	147
PARTIE II. ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFET DE L'HYPOXIE ET DE L'ANOXIE SUR LA SURVIE ET LA CROISSANCE DE MELONIS BARLEEANUS. 171	
CHAPITRE 4. NOUVELLES DONNEES EXPERIMENTALES POUR LA COMPREHENSION DES METABOLISMES AEROBIE ET ANAEROBIE DES FORAMINIFERES BENTHIQUES.....	209
PARTIE I. ANALYSE DU METABOLISME AEROBIE.....	211
PARTIE II. ANALYSE DU METABOLISME ANAEROBIE.....	231
PARTIE III. CONCLUSIONS	259
SYNTHESE	261
PERSPECTIVES	277
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	279
TABLE DES MATIERES.....	307
TABLE DES FIGURES.....	313
LISTE DES TABLEAUX	319

Avant propos

Dans cet avant-propos, je résume l'ensemble des activités auxquelles j'ai participé au cours de ces trois ans (et demie) de thèse.

1. Missions d'échantillonnage

Le premier travail de cette thèse a constitué au prélèvement des échantillons sur lesquels j'ai travaillé. J'ai ainsi participé aux deux missions de collecte des échantillons en Mer Adriatique. Lors de ces missions qui ont duré un mois chacune, je suis ainsi allé à la station de biologie marine de Piran (Slovénie) et au département de limnologie et de Bio-océanographie de Vienne (Autriche) en Août 2010 et 2011. Ces échantillons sont analysés dans le Chapitre 1 de cette thèse.

J'ai également participé à deux missions d'échantillonnage (de 2 et 5 jours) dans le Grevelingenmeer (Pays-Bas) pour récolter les échantillons traités dans le Chapitre 2 de ce manuscrit.

Enfin, en Novembre et Décembre 2012, j'ai effectué un séjour de deux mois à l'Université d'Aarhus (Danemark) pour faire l'analyse des nitrates intracellulaires des foraminifères de cette thèse.

2. Travail d'analyse des échantillons et rédaction

Dans le Chapitre 1, je présente trois articles pour lesquels je suis premier et second auteur. Dans le premier article, qui présente les résul-

tats de géochimie du sédiment, j'ai participé au traitement et à l'analyse de l'ensemble des échantillons avec Edouard Metzger. J'ai également participé activement à la rédaction de l'article. Les deux articles pour lesquels je suis premier auteur présentent les résultats de l'analyse des faunes de foraminifères benthiques. Pour ces articles j'ai participé à une partie du lavage des sédiments, ce traitement ayant été fait en majorité par deux techniciens du BIAF (Karim Issa et Erica Bicchi). J'ai effectué le piquage des foraminifères de la fraction de taille $> 125\mu\text{m}$ (l'une des carottes a été piquée par le stagiaire que j'ai encadré : Grégoire Lognoné) et Christian Baal (Université de Vienne, Autriche) a piqué les échantillons de la fraction 63-125 μm . L'analyse d'ARNr a été réalisée par Franck Lejzerowicz et Jan Pawlowski (Université de Genève) J'ai ensuite fait l'analyse des données ainsi que rédigé les premières versions des deux articles corrigées par la suite par l'ensemble des co-auteurs.

L'étude présentée dans le Chapitre 2 étant financée par l'agence de l'eau néerlandaise, le lavage de l'ensemble des sédiments a été effectué par deux techniciens du BIAF (Karim Issa et Erica Bicchi). J'ai piqué avec l'aide de Christine Barras les foraminifères benthiques présents dans les échantillons. La rédaction du

rapport présenté dans le chapitre a essentiellement été faite avec Frans Jorissen.

Le Chapitre 3 comporte un chapitre de livre pour lequel je suis co-auteur. Pour ce chapitre de livre, nous sommes intéressés à la réponse à l'hypoxie de trois espèces de foraminifères dans des conditions expérimentales. J'ai participé à la mise en place du plan expérimental ainsi qu'à la mise en œuvre de cette expérience. Etant trois auteurs principaux (Emmanuelle Geslin, Christine Barras et moi-même) nous nous sommes chacun occupé de sélectionner et traiter les individus d'une espèce. Je me suis focalisé sur *Melonis barleeanus*. Les échantillons d'où est issue cette espèce ont été prélevés par Jérôme Bonnin et Kim Jung-Hyun (EPOC, Université de Bordeaux et NIOZ, Pays-Bas). Pauline Duros m'a aidé à la sélection des individus vivants lors de la première expérience. J'ai réalisé l'analyse des données présentée dans le chapitre de livre. J'ai participé à la rédaction de ce chapitre qui a été écrit avec Emmanuelle Geslin et Christine Barras. La seconde partie de ce chapitre a été rédigée par moi-même. J'ai collecté l'ensemble des données (en parallèle Emmanuelle Geslin et Christine Barras faisaient de même pour les espèces dont elles s'occupaient) que j'ai ensuite analysées puis présentées dans le chapitre corrigé par mes encadrants de thèse. Les données de nitrates intracellulaires présentées dans ce chapitre proviennent d'analyses réalisées par moi-même à l'Université d'Aarhus en collaboration avec Nils Risgaard-Petersen.

Enfin, dans le Chapitre 4 je présente les nouvelles données de métabolisme des fora-

minifères benthiques. La première partie s'intéresse au métabolisme anaérobie. Nous utilisons dans cette partie des données que j'ai nouvellement collectées (avec l'aide d'Edouard Metzger et de Florian Cesbron) ainsi que des données publiées par Geslin et al. (2011), article pour lequel je suis co-auteur (j'ai participé à la collecte des données lors de mon Master 1). Les données de la seconde partie sont toutes inédites (bien que présentées dans les chapitres précédents). J'ai réalisé les analyses des nitrates intracellulaires à Aarhus et les mesures de dénitrification à Angers (avec Edouard Metzger, Florian Cesbron et lors du stage volontaire de Pierre Cadeau). J'ai réalisé l'ensemble de l'analyse des données de ces deux parties et rédigé ce chapitre qui a été corrigé par la suite par mes encadrants.

3. Obtention de financements

En premier lieu, ce travail de doctorat n'a été possible que grâce au soutien de la région Pays de la Loire qui a financé ma thèse.

En complément, pour pouvoir financer les déplacements que j'ai eu la chance de faire au cours de cette thèse, j'ai avec l'aide de mes encadrants effectué plusieurs demandes de financement.

J'ai ainsi obtenu auprès de la Cushman Foundation for Foraminiferal Research, le prix William V. Sliter (à hauteur de 2000\$US / 1500€) ainsi qu'une bourse de déplacement auprès de l'UNAM (Université Nantes Angers LeMans ; à hauteur de 1600€). Ces bourses

m'ont permis de faire un séjour de 2 mois à l'Université d'Aarhus.

Les déplacements effectués lors des missions d'échantillonnage en Mer Adriatique ont été possibles grâce au support du programme Franco-Autrichien Amadeus.

4. Participation à des congrès et séminaires

Au cours de cette thèse j'ai également participé à un congrès à Toulouse sur le thème de la désoxygénation océanique (en Octobre 2011). J'y ai présenté un poster contenant les résultats des expériences menées en Mer Adriatique. Ces données ont également été présentées à l'EGU (Vienne, en 2012) sans que je sois présent.

En Décembre 2012 j'ai donné un séminaire présentant mes travaux aux membres du Center for Geomicrobiology de l'Université d'Aarhus. J'ai également donné un séminaire pour l'équipe de Géobiologie du JAMSTEC (Japon) en Janvier 2013.

Enfin, j'ai proposé une formation sur la création de graphiques sur le logiciel R qu'une partie des membres du laboratoire BIAF a suivie.

Mon travail de thèse a été présenté lors des journées des doctorants de l'école doctorale VENAM 2012 et 2013 ainsi que lors des journées des doctorants du laboratoire UMR-CNRS 6112 LPG-BIAF en 2012 et 2013.

J'ai également présenté mes travaux de thèse lors des forums des doctorants 2011 et 2013 organisés par l'Université d'Angers. Lors de ces deux éditions les posters de vulga-

risation que j'ai présentés ont été récompensés par le 2^{ème} prix du jury.

5. Encadrement de stagiaires

Entre Mai et Juin 2011 j'ai encadré un stage de deux mois de deux étudiants de Licence 3 Biologie-Environnement de l'Université de Bretagne Sud. Marine Rodriguez a ainsi travaillé sur l'étude morphologique d'*Ammonia batava* : variabilité de la taille des pores. Ce travail, qui n'est pas présenté dans le présent manuscrit, a consisté à réaliser une étude préliminaire de la variabilité de la taille des pores des foraminifères du Grevelingenmeer. Cette étude a permis au laboratoire de développer des techniques d'analyse de la porosité des foraminifères. Grégoire Lognoné a travaillé sur une étude comparative de deux carottes traitées au rose bengale et au CTG. Ce travail n'est pas présenté directement dans ce manuscrit mais les résultats obtenus par Grégoire sur la carotte CTG sont inclus dans le Chapitre 1 de ce manuscrit. En Septembre 2011, Pierre Cadeau a effectué un stage volontaire de 2 semaines que j'ai co-encadré avec Edouard Metzger. Pierre a aidé à la réalisation de mesures de dénitrification valorisées dans le Chapitre 4 de ce manuscrit.

Au cours de ma thèse j'ai également conseillé différents stagiaires du laboratoire que je n'encadrais pas notamment concernant l'analyse de leurs données (Sarah Goubet, Melanie Rocroy, Simon Ramondenc, Charlotte LeKieffre et Anaïs Guihéneuf).

6. Activités d'enseignement

Au cours de mes trois années de thèse j'ai donné 3*64h de cours (équivalent TD) en qualité de doctorant à activité contractuelle d'enseignement (anciennement nommé moniteur). J'ai ainsi enseigné en L1 (TP de Métho-

dologie du Travail Universitaire et de Paléontologie), en L3 (CM, TD et TP de Géologie approfondie), en M1 (TP de Bio-Indicateurs) et en M2 (CM dans le module Impacts Anthropiques).

Introduction

De nos jours, de nombreux environnements marins aussi bien côtiers qu'océaniques sont impactés par des phénomènes de diminution de la concentration en oxygène dissous. Si les causes d'une diminution drastique de l'oxygénation des eaux sont variables, les conséquences de tels événements ont de forts intérêts environnementaux, sociétaux, industriels et économiques. En effet, l'oxygène étant nécessaire à la respiration de l'essentiel des organismes marins, ces événements de désoxygénation peuvent mener à des mortalités massives des ressources halieutiques et benthiques.

A l'échelle des temps géologiques, de nombreux épisodes ont pu être enregistrés et seraient à l'origine de la formation de roches contenant du pétrole et autres énergies fossiles.

Cette thèse cherche à comprendre l'impact de tels événements actuels de diminution de la concentration d'oxygène sur les faunes benthiques. Nous nous intéressons en particulier aux foraminifères benthiques qui semblent présenter une forte variabilité dans leur réponse au manque d'oxygène. Ces organismes présentent la particularité de présenter un test (une coquille) calcaire, qui nous permet de les étudier aussi bien dans les environnements actuels que dans le passé.

L'approche méthodologique employée dans cette thèse est triple : 1) étude sur le terrain de l'écologie des foraminifères benthiques par un

échantillonnage saisonnier de sédiments contrastés du point de vue de l'oxygénation des eaux de fond, 2) approche expérimentale in situ et au laboratoire par la simulation de l'hypoxie et de l'anoxie et 3) des analyses du métabolisme à l'échelle individuelle en conditions anoxiques.

Ces approches sont complémentaires puisqu'elles vont permettre d'identifier dans un premier temps la réponse des faunes benthiques (changements de densité, de diversité, de distribution verticale et de composition spécifiques) à l'absence d'oxygène en faisant des observations dans le milieu naturel. Ces études sur le terrain sont réalisées à deux sites d'étude : en Mer Adriatique et dans l'ancien estuaire du Grevelingenmeer. Dans un second temps, des espèces clefs seront isolées et des expériences en laboratoire seront menées pour identifier avec précision leur réponse (survie et croissance) à différentes conditions d'oxygénation. Enfin, l'étude du métabolisme aérobie et anaérobie permettra de comprendre par quel mécanisme certaines espèces sont capables ou non de survivre en l'absence d'oxygène.

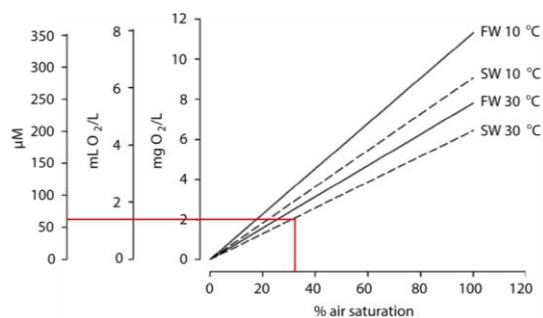


Figure 1 – Nomogramme montrant la relation entre les différentes unités utilisées pour caractériser la concentration ou la pression en oxygène dans l'eau de mer (SW, en pointillés) et dans l'eau douce (FW, en traits plein) à 10 et 30 °C. D'après Diaz et Breitburg (2009). Les lignes rouges représentent le seuil de l'hypoxie établi à 63 µM.

1. Les phénomènes d'hypoxie et d'anoxie dans les milieux marins

1.1. Définitions et unités

L'oxygène dissous dans les eaux marines de surface est à l'équilibre avec l'atmosphère qui constitue un réservoir quasi-infini. Les échanges entre les deux réservoirs sont régis dans un premier ordre par la loi de solubilité des gaz de Henry et dans un second ordre par l'activité biologique. A partir de cette loi de Henry, on peut définir un pourcentage de saturation en oxygène qui permet de normaliser l'intensité de l'oxygénation d'une masse d'eau quelques soient les conditions de pression, température et salinité. Ainsi, plus la température de l'eau est élevée, moins la concentration en oxygène dissous est importante. Dans le contexte de réchauffement climatique actuel, les eaux marines tendent alors à être de moins en moins riches en oxygène.

Dans les ouvrages scientifiques, de nombreuses terminologies sont utilisées pour dé-

crire l'intensité des événements de diminution de la saturation en oxygène et différents seuils de concentration ont été déterminés en fonction des effets observés sur les organismes marins ou sur les processus chimiques. Les termes employés ont été revus récemment (Hofmann et al., 2011; Altenbach et al., 2012). Dans ce manuscrit nous utiliserons les termes suivants (d'après Tyson et Pearson, 1991; Bernhard et Sen Gupta, 1999; Middelburg et Levin, 2009) :

- Oxique ou Oxygéné lorsque la concentration en oxygène est supérieure à 63 µM ($> 1.5 \text{ mL L}^{-1}$);
- Hypoxique lorsque la concentration en oxygène est inférieure à 63 µM ($< 1.5 \text{ mL L}^{-1}$; valeur sous laquelle le manque d'oxygène a un effet sur les faunes côtières);
- Anoxique lorsque la concentration en oxygène est nulle (ou non détectable).

Ces définitions et valeurs seuils sont utiles pour décrire les concentrations de tous types de milieux. En complément, certains environnements hypoxiques présentent la particularité d'être en permanence à de faibles concentrations d'oxygène. Ces zones océaniques dans lesquelles la colonne d'eau est en permanence $< 20 \mu\text{M}$ sont nommées les Zones à Oxygène Minimum (*Oxygen Minimum Zone*; OMZ; voir revue dans Paulmier et Ruiz-Pino (2009)).

Dans le présent manuscrit nous utiliserons essentiellement deux unités pour décrire la concentration en oxygène : les µM ($\mu\text{mol L}^{-1}$) et les mL L⁻¹. Sur la Figure 1 on peut observer

la correspondance entre ces deux unités avec la saturation, le facteur de conversion entre ces deux unités est tel que $1 \text{ mL L}^{-1} = 44.6 \text{ } \mu\text{M}$ (Gilbert et al., 2010).

1.2. Dynamique et diversité des milieux hypoxiques et anoxiques

1.2.1. Dynamique temporelle

L'occurrence de phénomènes d'anoxie au cours des temps géologiques n'est plus à mettre en évidence. De longs événements nommés « *Oceanic Anoxic Events* » (Événements Anoxiques Océaniques ; OAE) ont été estimés au nombre de 9 dont 3 événements majeurs (Jenkyns, 2010). Par exemple, au Permien (289-252 Ma), l'anoxie océanique est associée à une forte concentration de CO_2 atmosphérique et aurait mené à des extinctions massives d'organismes océaniques et terrestres (Wignall et Twitchett, 1996; Benton et Twitchett, 2003). De même, les enregistrements paléoclimatiques du Crétacé (145-65 Ma) montrent que la réduction de la concentration en oxygène océanique a mené à d'importants changements des cycles biogéochimiques et a également eu des conséquences dramatiques pour les écosystèmes (Jones et Jenkyns, 2001). Il apparaît donc clairement qu'à différents moments de l'histoire géologique de la Terre des événements anoxiques de longue durée et de grande amplitude spatiale ont eu lieu en impactant de manière importante les organismes.

Au cours du dernier siècle de nombreux indices montrent que l'amplitude, la fréquence et l'intensité des événements hypoxiques et

anoxiques ont augmenté. Une analyse portant sur les variations de concentration d'oxygène entre 1960 et 2008 montre une expansion verticale des OMZ dans les océans tropicaux (Stramma et al., 2008). Cette expansion observée à l'échelle mondiale pourrait être due au réchauffement océanique qui mène entre autres à une diminution de la solubilité de l'oxygène. Cette observation faite sur les milieux océaniques ouverts est également faite sur les milieux côtiers (Diaz et Rosenberg, 2008; Gilbert et al., 2010; Rabalais et al., 2010). Si dans ces deux types de milieux les causes et les mécanismes du développement de l'hypoxie sont différentes, l'occurrence et la fréquence de ces phénomènes y ont augmenté au cours de la fin du dernier siècle. En analysant les données publiées dans la littérature, Gilbert et al. (2010) ont mis en évidence que la fréquence d'apparition et l'intensité des événements hypoxiques ont augmenté plus rapidement dans les milieux côtiers que dans les milieux océaniques ouverts. De plus, les zones côtières reportées comme étant impactées par l'hypoxie sont essentiellement localisées sur les côtes européennes, nord-américaines et du Sud-est de l'Asie. Bien qu'il soit vraisemblable que ces observations soient partiellement influencées par l'effort d'échantillonnage, il semblerait que la majorité des zones hypoxiques recensées soient localisées au large des côtes des pays et continents fortement anthropisés et peuvent être mises en lien avec une utilisation accrue d'engrais azotés dans l'agriculture depuis les années 1940 (Diaz et Rosenberg, 2008).

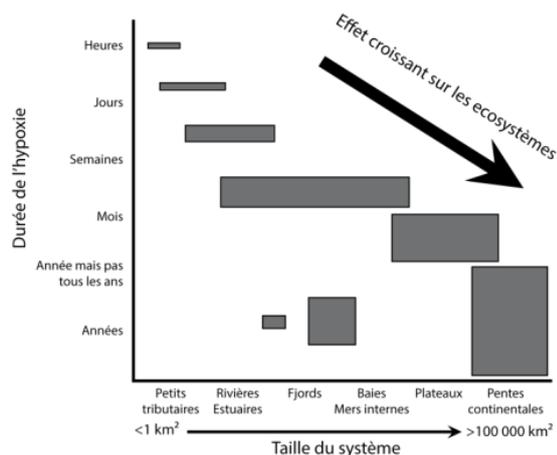


Figure 2 – Synthèse de la variabilité temporelle et spatiale des environnements hypoxiques et de leurs effets sur les écosystèmes. Figure adaptée d'après Rabalais et al. (2010).

1.2.2. Typologie des environnements actuels affectés par les phénomènes d'hypoxie et d'anoxie

La durée pendant laquelle les écosystèmes sont exposés à l'hypoxie et l'anoxie varie fortement notamment en fonction de la taille du milieu. En effet, dans des environnements de petites tailles tels que des mares intertidales, ces phénomènes durent pendant quelques heures. Ils sont d'une durée de l'ordre de plusieurs jours à semaines dans des estuaires ou des fjords, ils peuvent être saisonniers et durer plusieurs mois dans mers fermées, annuels dans les zones d'upwelling et permanents dans les OMZ des pentes continentales (Figure 2 ; Rabalais et al., 2010).

Nous pouvons ainsi considérer 4 types majeurs de masses d'eau marines appauvries en

oxygène en fonction de la fréquence d'exposition et de la concentration en oxygène minimale observée. Nous différencierons ainsi les milieux affectés par de l'hypoxie saisonnière des milieux hypoxiques permanents, anoxiques saisonniers et finalement des milieux anoxiques permanents.

Milieux anoxiques permanents

Les milieux dans lesquels l'anoxie est permanente sont assez rares à l'échelle du globe, les exemples marins les plus connus sont la Mer Noire (Murray et al., 1989), et trois bassins hypersalins profonds situés en Mer Méditerranée quelques centaines de km au large de la Crète (Bassin de l'Atalante, Urania et Discovery ; Sass et al., 2008). D'autres auteurs identifient également certaines zones de la Mer Baltique, notamment le Nord-Ouest du Golfe de Finlande (Vallius, 2006), le fjord de Framvaren dans le Skagerrak (Skei, 1983). La tranchée de Cariaco dans le Pacifique Est est aussi décrite comme un milieu anoxique (Ward et Kilpatrick, 1991). L'anoxie y est créée et maintenue par la morphologie particulière de ces bassins (des bassins très profonds et peu larges) et une forte stratification des masses d'eaux (en raison de forts gradients de température et/ou de salinité) qui limitent le renouvellement et l'oxygénation des eaux de fond.

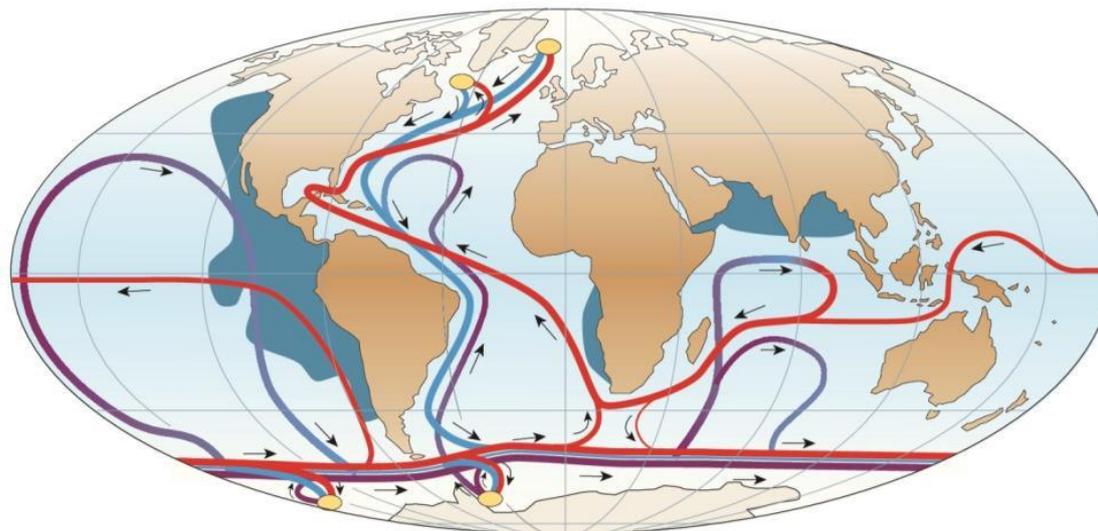


Figure 3 – Cartographie des OMZ permanentes en zones grises (redessinées d’après Kamykowski et Zentara, 1990; Paulmier et Ruiz-Pino, 2009; Hofmann et al., 2011) et de la circulation thermohaline (les flèches rouges étant les courants de surface et les flèches bleues localisent les courants profonds. Le fond de carte est d’après Rahmstorf (2002).

Milieus hypoxiques permanents

Dans certaines zones océaniques, une partie de la colonne d’eau est appauvrie en oxygène. Lorsque la concentration en oxygène est inférieure à $20 \mu\text{M}$ on parle d’OMZ (Zone à oxygène minimum). Ces OMZ sont souvent associées à des phénomènes d’upwelling lors desquels des eaux profondes riches en nutriments remontent stimulant la production primaire en surface. A la mort du phytoplancton, la matière organique qu’ils constituent tombe vers les eaux profondes. Pendant sa chute, cette matière organique fraîche est dégradée par respiration aérobie par des organismes hétérotrophes entraînant la diminution de la concentration en oxygène de la colonne d’eau en fonction de l’intensité de ces processus de dégradation (Treude, 2012). Les OMZ couvrent actuellement environ 8% de la surface océanique (Figure 3 ; Paulmier et Ruiz-Pino, 2009). L’étendue de ces zones varie aussi bien

verticalement que latéralement de façon saisonnière (Stramma et al., 2008, 2010; Paulmier et Ruiz-Pino, 2009) mais montre également une large expansion au cours des 50 dernières années (Stramma et al., 2008, 2010). Les changements de l’étendue des OMZ ont de nombreux impacts sur les faunes benthiques et pélagiques (Levin, 2002, 2003) tels qu’une réduction de la disponibilité des habitats des poissons pélagiques (Stramma et al., 2012).

Milieus hypoxiques et anoxiques saisonniers

Enfin, les hypoxies et les anoxies des eaux marines peuvent être saisonnières. De tels événements sont souvent observés dans les milieux côtiers (Figure 2 ; Rabalais et al., 2010) du fait des apports importants en sels nutritifs provenant des bassins versants littoraux.



Figure 4 – Cartographie des sites pour lesquelles des phénomènes d’hypoxie ont été observés. Données d’après Diaz et Rosenberg (2008) et mises à jour sur <http://www.wri.org/media/maps/eutrophication/fullscreen.html>.

Au fil des années de nombreux milieux côtiers ont été reportés comme présentant des phénomènes d’hypoxie ou d’anoxie ponctuels, fréquents ou permanents. Plus de 400 sites ont été référencés par Diaz et Rosenberg (2008) et 479 sites dans la version mise à jour (<http://www.wri.org/media/maps/eutrophication/fullscreen.html> ; Figure 4). Des observations de sites d’hypoxie ont été faites sur les côtes de tous les océans et la densité d’observation de ces phénomènes est nettement plus importante sur les côtes des pays dits développés. Cela suggère que l’occurrence de l’hypoxie côtière est forte-

ment liée à un impact anthropique. L’utilisation massive d’intrants azotés et phosphorés en agriculture mène à une injection massive de nutriments dans les eaux de surface côtières. Cet enrichissement stimule la production primaire et cet apport de matière organique est oxydée par les organismes benthiques et pélagiques (Diaz et Rosenberg, 2008; Levin et al., 2009). C’est lorsque la demande biologique en oxygène est supérieure aux apports d’oxygène dissous dans l’eau que les phénomènes d’hypoxie et d’anoxie se présentent.

Ces phénomènes sont exacerbés dans les milieux côtiers par la stratification des eaux qui se développe soit en raison de la morphologie particulière des bassins (ex : dans les bassins profonds de la Mer Baltique) avec les fortes températures en été et/ou avec les gradients de densité entre les eaux douces et salines. C'est la combinaison de la forte productivité associée à la stratification qui entraîne un faible renouvellement des eaux de fond et une consommation progressive de l'oxygène dissous dans les eaux de fond (Figure 5). Dans certains cas extrêmes l'export de la matière organique vers le fond marin va mener à un épuisement de l'oxygène dissous et donc à l'anoxie dans les couches d'eaux les plus profondes (Neretin, 2005). Dans certains cas, lors de l'anoxie, des quantités importantes de méthane, ammonium et sulfures peuvent être produites dans le sédiment et s'accumuler dans la colonne d'eau et sont ensuite réoxy-

dées dans les couches superficielles oxygénées (Kuypers, 2003; Treude, 2012).

Dans notre projet nous nous intéressons plus particulièrement à l'effet des phénomènes d'anoxie sur les faunes benthiques de Mer Adriatique et du bras d'estuaire fermé du Grevelingenmeer – deux sites sujets à des épisodes d'hypoxie et d'anoxie saisonniers qui se distinguent notamment par le temps depuis lequel ces milieux sont exposés à l'anoxie.

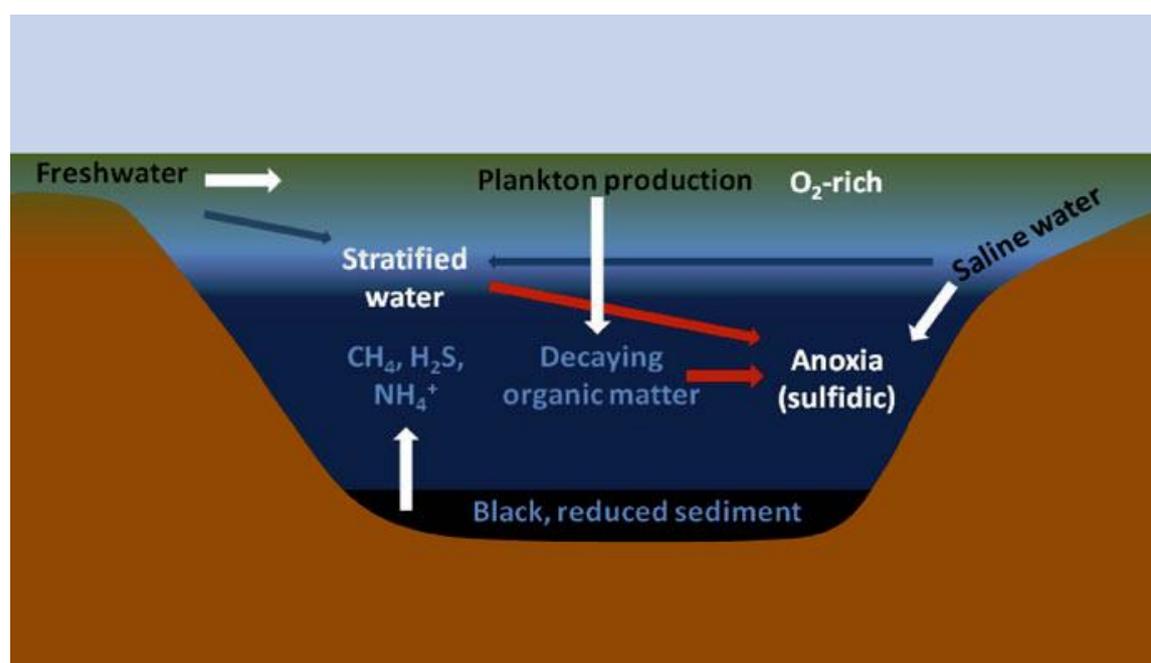


Figure 5 – Représentation du développement de l'anoxie dans les milieux côtiers semi-fermés extrait de Treude (2012).



Figure 6 – Localisation du site d'étude en Mer Adriatique Nord, dans le Golfe de Trieste.

1.2.3. Cas de la Mer Adriatique

La Mer Adriatique Nord est une mer semi-fermée, peu profonde (< 50 m ; Figure 6), avec des forts apports continentaux, présentant une forte productivité et un fort temps de résilience des eaux en été et en automne (Ott, 1992). La forte productivité se traduit depuis des siècles par des blooms de producteurs primaire formant des événements de « neige marine » (*marine snow* ; Crema et al., 1991) et se caractérisent par le développement pélagique de grandes structures phytoplanctoniques muqueuses qui finissent par tomber sur les fonds marins. Cette quantité importante de matière organique est dégradée par les orga-

nismes benthiques, menant ainsi à des phénomènes d'hypoxie et d'anoxie dans les eaux de fond.

Les données historiques montrent une augmentation de la concentration en oxygène dissous en surface et une diminution dans les eaux de fond du début des années 1910 aux années 1990 (Barmawidjaja et al., 1995; Rabalais et al., 2010). Après les années 1990 cette tendance tend à s'inverser et l'occurrence des hypoxies diminue (Giani et al., 2012). La diminution de la fréquence et de l'intensité des épisodes d'hypoxie serait due à de moindres apports en nutriments continentaux.

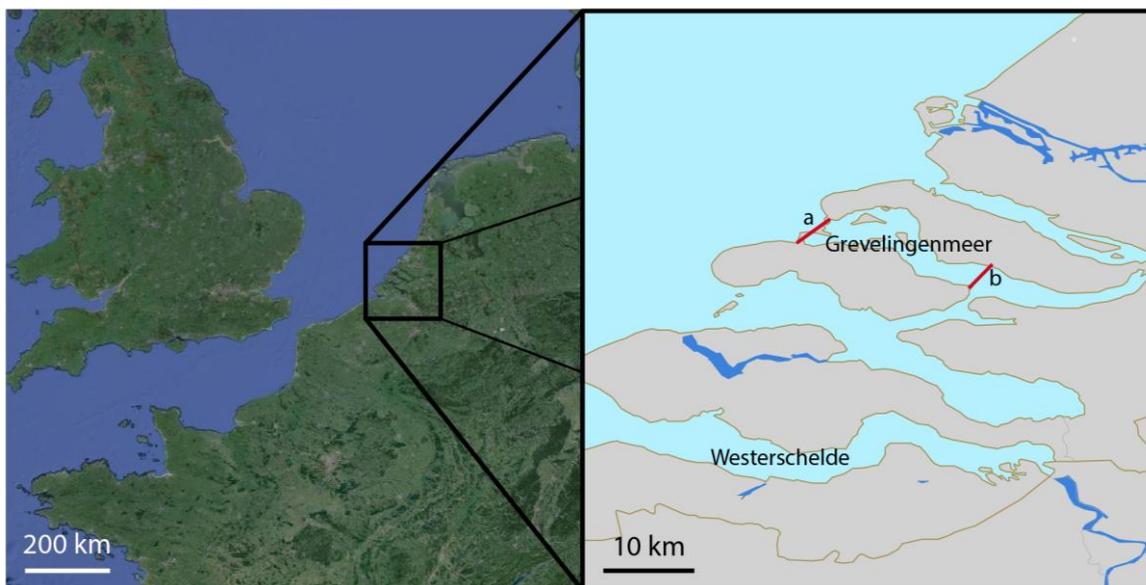


Figure 7 – Localisation du lac de Grevelingen et de l'estuaire Westerschelde. Les repères a et b marquent respectivement la position barrage du barrage du Brouwersdam et le barrage du Grevelingendam.

1.2.4. Cas du Grevelingenmeer

Le Grevelingenmeer est un ancien bras de mer de la mer du Nord localisé au Sud des Pays-Bas (Figure 7). Dans le cadre du plan Delta établi pour limiter l'occurrence et l'impact des inondations, le barrage du Grevelingendam a été construit en amont de l'estuaire en 1965 et le barrage du Brouwersdam en aval en 1971. Ces deux barrages font qu'il n'y a désormais plus d'effet de la marée dans le lac marin. Ce lac – qui est le plus grand lac salé d'Europe occidentale – a un fort rôle récréatif (sports nautiques, plongée, etc.) et économique (présence de nombreuses entreprises conchylicoles). Depuis l'établissement des barrages, la limitation des effets des marées affecte la circulation des

eaux dans le lac et une forte stratification des eaux marines et douces est observée. Avec l'augmentation des températures en été, cette stratification est accentuée menant à un faible renouvellement des eaux de fonds qui, combinée à une forte productivité, entraîne des phénomènes d'anoxie et de mortalité benthique massive (Lengkeek et al., 2007; Nolte et al., 2008) (Figure 8).

Les phénomènes d'hypoxie et d'anoxie sont relativement courants dans les estuaires se déversant dans la Mer du Nord. En effet, par exemple, la partie amont du Westerschelde (l'estuaire au Sud du Grevelingenmeer ; Figure 7) montrant une faible salinité (~2-8 PSU) la saturation en oxygène peut – au printemps - descendre à 5 % (soit environ 14 μM ; Irigoien et al., 1999).

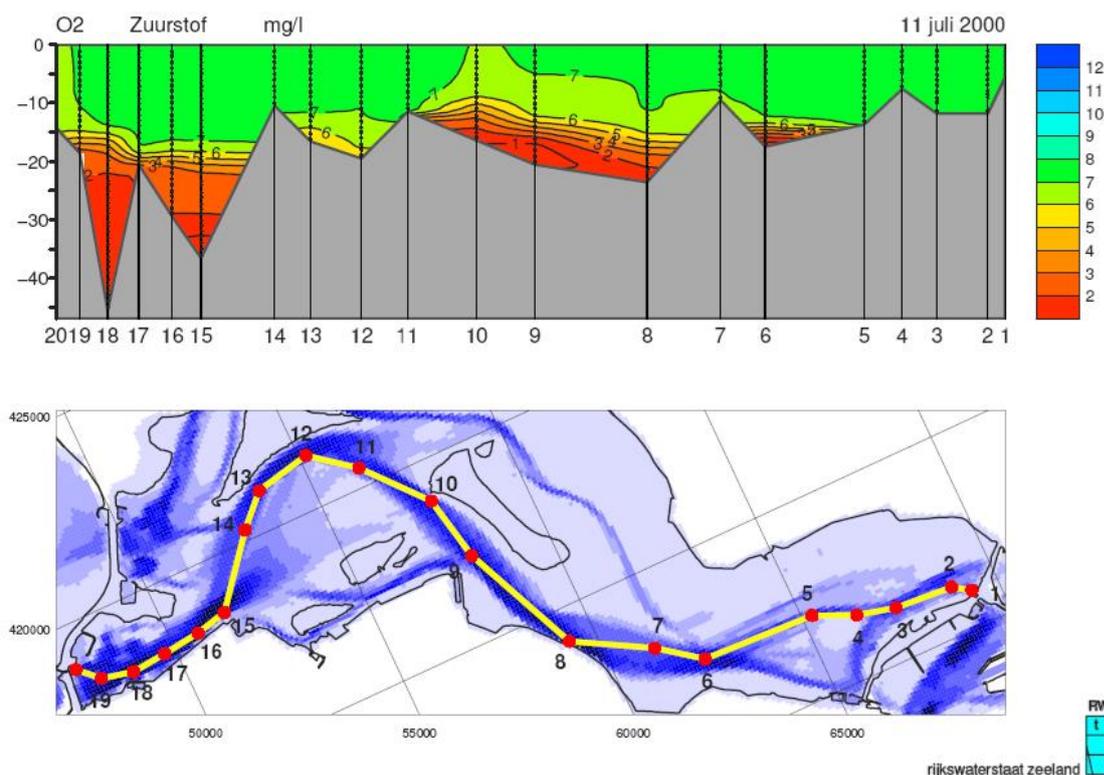


Figure 8 – Distribution de la concentration en oxygène (mg/L) en fonction de la profondeur (m) le long du chenal du Grevelingenmeer d’après des données de Rijkswaterstaat dans (Zijl et Nolte, 2006). La station 20 est localisée au barrage du Brouwersdam (en aval) et la station 1 au barrage du Grevelingendam (en amont).

Le Grevelingenmeer a donc la particularité de présenter des anoxies saisonnières systématiques et qui sont apparues relativement récemment (la première anoxie des eaux de fond estivale a été observée en 1982). Les épisodes d’anoxie se présentent du début à la fin de l’été et sont localisés dans les chenaux profonds de l’ancien estuaire (Figure 8). Le bras fermé d’estuaire du Grevelingenmeer fait désormais l’objet d’un plan d’amélioration de la qualité des eaux qui vise, en proposant l’ouverture partielle du barrage en aval, à augmenter les entrées d’eau marine afin d’augmenter la ventilation des eaux de fond. L’étude des faunes de foraminifères actuelles permet ainsi d’établir l’état actuel de la communauté benthique en vue d’éventuels futurs travaux d’aménagement.

2. Géochimie des sédiments marins

Les interactions entre la colonne d’eau et le sédiment ne se font pas seulement par le transfert de particules qui sédimentent dans les fonds marins. Les processus biogéochimiques qui se développent dans le compartiment sédimentaire génèrent aussi des flux de composés chimiques pour l’essentiel sous forme dissoute qui peuvent jouer un rôle très important sur le fonctionnement de la colonne d’eau (ex : flux de sels nutritifs, de contaminants, d’espèces réduites). Le fonctionnement de ce compartiment sédimentaire et son interaction avec la colonne d’eau seront développés ici avec l’objectif de définir le contexte géochi-

mique dans lequel les faunes benthiques vont évoluer dans les milieux côtiers semi-fermés sujets à des épisodes d'hypoxie ou d'anoxie.

2.1. Principes de géochimie benthique

Dans les milieux marins la matière organique produite dans la colonne d'eau se dépose sur le sédiment. Cette matière organique fournit aux organismes benthiques une source de nourriture et d'énergie. Les organismes benthiques vont consommer et minéraliser cette matière organique via un ensemble de réactions biogéochimiques qui ont lieu dans les centimètres superficiels du sédiment. Cet ensemble de réaction a lieu de façon séquentielle, les réactions produisant le plus d'énergie dégradant la matière organique dans

les couches superficielles du sédiment et les réactions « moins intéressantes » thermodynamiquement plus profondément (Burdige, 2006). Le premier mécanisme permettant la minéralisation de la matière organique est sa dégradation via la respiration oxygène (Figure 9 ; Tableau 1). Cette réaction est consommatrice de l'oxygène dissous dans l'eau et résulte en une diminution de la concentration d'oxygène avec la profondeur dans le sédiment jusqu'à atteindre l'anoxie (lorsque tout l'oxygène est consommé). La profondeur à laquelle l'anoxie est atteinte est appelée profondeur de pénétration d'oxygène (*Oxygen penetration depth* ; OPD). Tous les organismes présents sous l'OPD vivent donc dans un habitat anoxique. Cette OPD varie selon les milieux, notamment en fonction de la dis-

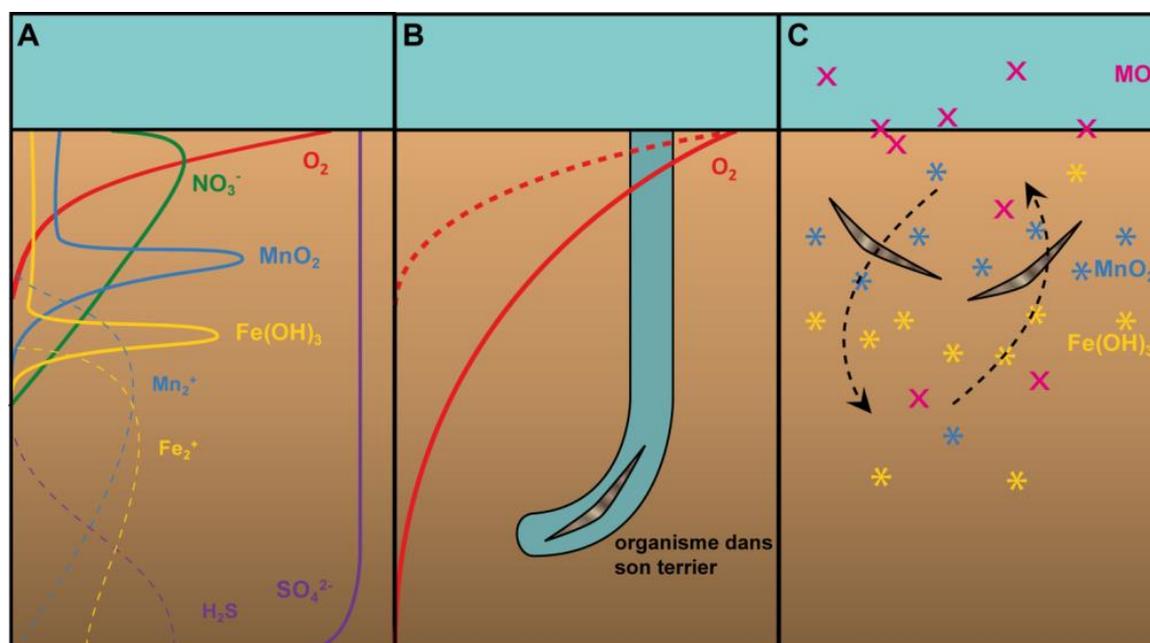


Figure 9 – A : représentation schématique des profils de concentration des éléments chimiques (u.a.) en fonction de la profondeur (u.a.) lors des réactions diagenétiques dans le sédiment marin. Les réactifs sont présentés en traits pleins et les produits en traits pointillés, d'après Froelich et al. (1979b). B et C : représentations schématiques de l'effet de la bioturbation via bio-irrigation (B) et via le remaniement sédimentaire (C) sur les profils de concentration d'oxygène (les traits plein et pointillés représentent respectivement des profils théoriques en conditions bioturbées et non-bioturbées) et les particules (Matière organique : MO représentée par les croix magenta, oxydes de manganèse et de fer : MnO_2 et $Fe(OH)_3$ respectivement les astérisques bleus et jaunes).

ponibilité et de la nature de la matière organique, de la vitesse à laquelle les organismes la dégradent et la nature du sédiment (de la porosité et son caractère bioturbé). En règle générale, les milieux profonds sont moins perméables et plus poreux que les milieux côtiers plus riches en sédiment sableux. La bioturbation est également plus importante dans les milieux côtiers que dans les environ-

nements profonds.

Les réactions biogéochimiques anaérobies sont basées séquentiellement sur les nitrates, les oxydes de manganèse, de fer et les sulfates (Figure 9 ; Tableau 1) produisant respectivement diazote, manganèse, fer et sulfures (Froelich et al., 1979). Lorsque tous les oxydants sont consommés d'autres réactions anaérobies telles que la fermentation produi-

Tableau 1 – Ensemble des réactions diagénétiques primaires et liste non-exhaustive de réactions secondaires qui produisent (+) ou consomment (-) de la matière organique (MO, telle que $MO = C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$), de l'oxygène (O_2), des nitrates (NO_3^-) et des sulfures (H_2S ; Froelich et al., 1979b).

Réactions primaires	MO	O_2	NO_3^-	H_2S
Consommation d'oxygène par respiration aérobie $138O_2 + MO + 18HCO_3^- \rightarrow 124CO_2 + 16NO_3^- + HPO_4^{2-} + 140H_2O$	-	-	+	
Consommation de nitrates par dénitrification $94.4NO_3^- + MO \rightarrow 13.6CO_2 + 92.4HCO_3^- + 55.2N_2 + 84.8H_2O + HPO_4^{2-}$	-	-		
Réduction des oxydes de Mn $236MnO_2 + MO + 364CO_2 + 104H_2O \rightarrow 470HCO_3^- + 8N_2 + 236Mn^{2+} + HPO_4^{2-}$	-			
Réduction des oxydes de Fe $424Fe(OH)_3 + MO + 740CO_2 \rightarrow 846HCO_3^- + 424Fe^{2+} + 16NH_3 + 320H_2O + HPO_4^{2-}$	-			
Production de sulfures et d'ammonium $53SO_4^{2-} + MO \rightarrow 39CO_2 + 67HCO_3^- + 16NH_4^+ + 53HS^- + 39H_2O + HPO_4^{2-}$	-			+
Réactions secondaires	MO	O_2	NO_3^-	H_2S
Production de nitrates par nitrification $NH_4^+ + 2O_2 \rightarrow NO_3^- + 2H^+ + H_2O$			-	+
Oxydation du Mn dissous par les nitrates $5Mn^{2+} + 2NO_3^- + 4H_2O \rightarrow 5MnO_2 + N_2 + 8H^+$				-
Oxydation du Fe dissous par les nitrates $5Fe^{2+} + NO_3^- + 12H_2O \rightarrow 5Fe(OH)_3 + 1/2N_2 + 9H^+$				-
Réduction des oxydes de Mn par l'ammonium $8MnOOH + NH_4^+ + 14H^+ \rightarrow 8Mn^{2+} + NO_3^- + 13H_2O$				+
Réoxydation du Mn dissous $2Mn^{2+} + O_2 + 2H_2O \rightarrow 2MnO_2(s) + 4H^+$			-	
Réoxydation du Fe dissous $4Fe^{2+} + O_2 + 6H_2O \rightarrow 4FeOOH + 8H^+$			-	
Oxydation des sulfures $HS^- + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + H^+$			-	-
Production de pyrite $Fe^{2+} + H_2S \rightarrow FeS + 2H^+$				-

sant du méthane peuvent être observées. L'ensemble de ces réactions font partie des réactions primaires de la diagénèse précoce et interviennent toutes dans la minéralisation de la matière organique (Tableau 1).

Nous n'entrerons pas dans le détail ici mais un ensemble de réactions secondaires existe également dans lesquelles les différents produits interagissent de façon relativement complexe. Parmi ces réactions secondaires, celles qui nous intéressent dans notre cas d'étude sont les interactions impliquant l'oxygène, les nitrates et les sulfures. Une liste non-exhaustive des réactions impliquant ces éléments est présentée dans le Tableau 1.

Si, comme nous le verrons dans les paragraphes suivants, la géochimie benthique influe sur la distribution de la faune, la faune affecte également les réactions diagénétiques. Par exemple, lorsque le milieu est oxygéné, les organismes suspensivores capturent et consomment les particules organiques avant leur chute sur le sédiment et la transforment en fèces qui se déposent sur le sédiment sous une forme plus réfractaire (Middelburg et Levin, 2009). Ces organismes vont donc induire une microvariabilité spatiale dans la disponibilité et la qualité de la matière organique. De même, les organismes de la macrofaune endopélique (qui vivent dans le sédiment) vont agir sur la nature et la chimie via la bioturbation. La bioturbation est caractérisée par deux phénomènes : la bio-irrigation et le remaniement sédimentaire. La bio-irrigation favorise les échanges entre les eaux porales et l'eau de fond par la création active ou passive de terriers (Figure 9B). Ces tubes

et terriers permettent aux organismes enfouis d'avoir accès à l'oxygène (Aller, 2001). La bio-irrigation va ainsi faciliter le transport de l'oxygène dans le sédiment et augmenter les taux de respiration aérobie. Les organismes fouisseurs participent également à la bioturbation par le remaniement sédimentaire qui tend à disperser les particules sédimentaires (Figure 9C ; Meysman et al., 2005). Le remaniement sédimentaire peut mener à l'enfouissement de la matière organique labile présente en surface vers des couches sédimentaires réduites (Burdige, 2006) ou au contraire au transport vers la surface de composés réduits formés en profondeur tels que la pyrite (disulfure de fer) qui seront re-oxydés à la surface (Middelburg et Levin, 2009). En résumé, la macrofaune benthique, dans les milieux oxygénés va tendre à optimiser la dégradation de la matière organique. Bien que le remaniement sédimentaire puisse enfouir de la matière organique, la bio-irrigation qui facilite la respiration aérobie en profondeur et les organismes suspensivores dégradent cette matière organique avant son dépôt sur le sédiment.

2.2. Caractéristiques géochimiques des sédiments des milieux anoxiques

Les sédiments anoxiques présentent de nombreuses particularités biogéochimiques. En effet, l'absence d'oxygène va faire que les processus de ré-oxydation des éléments réduits (manganèse, fer ou sulfures ; Tableau 1) qui migrent en dehors du sédiment sont ralentis voire stoppés. En anoxie, le sédiment joue

le rôle de puits à nitrates alors que lorsque le sédiment est bien oxygéné il joue le rôle de source de nitrates (Middelburg et al., 1996). Lorsque les eaux de fonds des milieux semi-fermés sont anoxiques le sédiment agit également comme source de sulfures qui diffusent vers les eaux de fonds (Middelburg et Levin, 2009). Le phosphore étant intimement lié aux oxydes métalliques va également tendre à être libéré vers la colonne d'eau en hypoxie et en anoxie. Une part de ce phosphore sera reoxydée dans la colonne d'eau et l'autre partie sera utilisée par le phytoplancton (Kemp et al., 2005). Ce processus qui stimule la production de matière organique et ainsi entretient l'anoxie dans le système est parfois qualifié de phénomène d'eutrophisation secondaire (Cloern, 2001; Kemp et al., 2005).

La question de l'effet de l'oxygénation des eaux de fonds sur la préservation de la matière organique a longtemps été débattue notamment en raison du fort intérêt porté à la compréhension des processus de formation des roches sources d'énergie fossile. Nombreux éléments semblent mettre en évidence que les phénomènes d'hypoxie et d'anoxie favorisent la séquestration de la matière organique dans les sédiments marins (Moodley et al., 2005; Middelburg et Levin, 2009). Il semblerait en effet, que dans l'OMZ de la marge pakistanaise le flux de carbone organique vers le sédiment soit plus importante dans le cœur de l'OMZ qu'au dessus et en dessous de cette zone (Vandewiele et al., 2009). De plus la matière organique ainsi stockée semble être de meilleure qualité en anoxie suggérant une plus faible dégradation de cette source de carbone

(Middelburg et Levin, 2009). Ces observations semblent être valables pour les milieux présentant une anoxie permanente mais pas pour les milieux présentant de fréquentes réoxygénations. Ces milieux auraient tendance à optimiser la minéralisation de la matière organique (Aller, 1994a).

La macrofaune benthique étant fortement sensible à l'anoxie, les organismes exposés à de telles conditions ne peuvent que migrer hors des zones affectées ou mourir sur place (Levin et al., 2009). En anoxie la communauté de la faune benthique est essentiellement dominée par des bactéries filamenteuses formant des tapis bactériens (Jørgensen et Gallardo, 1999), des foraminifères, nématodes ou des annélides (Levin, 2003). Bien que la grande majorité des organismes formant des terriers soient ainsi inhibée en hypoxie (Pearson et Rosenberg, 1978), dans l'OMZ de la marge du Pérou certains polychètes formant des terriers persistent (Levin, 2003). En anoxie, il a été mis en évidence un arrêt complet de la bioturbation résultant en la formation de sédiments laminés (Gooday et al., 2009; Middelburg et Levin, 2009). Cette absence d'organisme fouisseur va limiter les échanges particuliers verticaux ainsi que le transport diffusif des éléments dissous.

3. Réponse des foraminifères benthiques à l'anoxie

Parmi les organismes de la méiofaune benthique, les foraminifères benthiques apparaissent comme faisant partie des plus résistants à l'anoxie (Josefson et Widbom, 1988; Moodley

et al., 1997; Levin et al., 2009). Avant de chercher à expliquer leur réponse à l'anoxie, nous allons décrire quelques généralités concernant leur biologie et leur écologie.

3.1. Généralités sur les foraminifères benthiques

3.1.1. Définitions utilisées

Afin de faciliter la discussion et éviter toute ambiguïté concernant le sens de certains termes nous présentons ici la définition des termes que nous utiliserons au cours de ce manuscrit. Ces définitions sont présentées dans un ordre d'échelle décroissante les plus grandes unités « écologiques » d'abord puis les plus petites unités.

- **Ecosystème** : ensemble formé par un biotope et une biocénose. Le concept d'écosystème implique une structure fractale (qui fonctionne de la même manière à plusieurs échelles d'organisation et/ou spatiales) et des interactions entre les différents ensembles qui composent cet écosystème.
- **Communauté** : ensemble d'individus d'espèces différentes vivant dans un même milieu au même moment.
- **Population** : ensemble d'individus de même espèce vivant au même endroit au même moment.
- **Individu** : dans le cas des foraminifères un individu est une cellule, un test.

3.1.2. Biologie des foraminifères benthiques

Mode de vie, nutrition et cycles de reproduction

Les foraminifères sont des organismes unicellulaires eucaryotes. Ils produisent un test (coquille) formant une ou plusieurs chambres ou loges interconnectées qui renferment une cellule unique. Le test est synthétisé par le cytoplasme et peut soit être organique (sous-ordre des Allogromida), agglutiné lorsqu'il est formé des grains prélevés dans le sédiment, carbonaté lorsqu'il est formé à partir de calcite et quelques espèces présentent un test siliceux. Les tests carbonatés ou siliceux présentent un fort potentiel de fossilisation. Les foraminifères fossiles sont ainsi un outil micropaléontologique important pour les reconstructions paléo-environnementales et l'établissement des unités biostratigraphiques.

Les foraminifères sont apparus au Cambrien inférieur (540Ma) et sont actuellement présents dans une grande variété d'environnements, colonisant essentiellement les milieux marins depuis les eaux saumâtres estuariennes ou des marais maritimes jusqu'aux milieux abyssaux (Murray, 1991, 2006; Sen Gupta, 1999). Ils sont également présents dans certains milieux extrêmes tels que les sources hydrothermales (Molina-Cruz et Ayala-López, 1988; Panieri et Gamberi, 2005; Panieri, 2006), certains milieux hypersalins (Debenay et al., 1989, 2001; Almogi-Labin et al., 1992) certaines espèces identifiées par des analyses moléculaires ont également été mise en évidence dans des milieux d'eau douce (Pawlowski, 2000).

Certaines formes de foraminifères vivent dans la colonne d'eau quand d'autres colonisent uniquement le sédiment, on différencie ainsi les foraminifères planctoniques des foraminifères benthiques. Dans le présent manuscrit nous nous intéresserons uniquement aux foraminifères benthiques.

Les foraminifères vivants peuvent produire des extensions cytoplasmiques : les pseudopodes, leur permettant de se déplacer, se nourrir, se protéger et dans certains cas de respirer et de se reproduire (Goldstein, 1999). Ces pseudopodes peuvent s'étendre par l'ouverture du test sur 1 cm de long (Murray, 2002). Les foraminifères benthiques sont des organismes hétérotrophes et utilisent ainsi la matière organique qu'ils consomment comme source de carbone. Plusieurs modes de nutrition existent, certaines espèces sont herbivores, détritivores (se nourrissant de débris déposés dans le sédiment), suspensivores (consommant les particules en suspension dans l'eau) ou encore bactériophages (se nourrissant des bactéries présentes dans le sédiment) (Debenay et al., 1996). Certaines espèces contiennent également des symbiotes au sein de leur cellule qui peuvent assurer une partie de l'apport de carbone organique. Ces symbiotes peuvent être d'origine végétale ou bactérienne (Bernhard et Bowser, 1999; Hallock, 1999; Bernhard, 2003).

La reproduction des foraminifères benthiques présente alternativement un mode sexué (gamogonie) et un mode asexué (schizogonie) (Murray, 2006). Le mode sexué se fait par fusion de deux gamètes haploïdes et produit des individus diploïdes qui forment un

proloculus (la loge initiale) de petite taille (individus microsphériques). Dans le cas du mode asexué qui est léthal pour l'individu parent, les juvéniles héritent du noyau et d'une partie du cytoplasme parental et présentent un proloculus de grande taille (individus mégasphériques).

Métabolisme aérobie

Lorsque de l'oxygène est présent dans le milieu, les foraminifères benthiques le consomment par respiration. La respiration permet de fournir l'énergie nécessaire au fonctionnement de la cellule.

La quantité d'oxygène consommé par individu est dépendante de la taille des individus. En effet, il a été mis en évidence que plus les foraminifères sont grands, plus ils consomment d'oxygène (Bradshaw, 1961; Lee et Muller, 1973; Hannah et al., 1994; Nomaki et al., 2007; Geslin et al., 2011). Lorsque les taux de respiration des foraminifères sont comparés à ceux d'autres taxons de la méiofaune, il apparaît clairement que les foraminifères benthiques ont à taille comparable des taux de respiration plus faibles que ceux observés chez d'autres groupes de la méiofaune benthique comme les Ciliés, les Flagellés, les Copépodes et les Nématodes (Geslin et al., 2011). Cette activité métabolique relativement basse pourrait traduire de faibles besoins en oxygène.

Dans cette thèse nous chercherons à identifier si d'autres paramètres que la taille des organismes peuvent influencer les taux de respiration des foraminifères benthiques.

3.1.3. Ecologie des foraminifères benthiques

Plusieurs facteurs influencent la distribution à petite comme à grande échelle des espèces de foraminifères benthiques. A l'échelle mondiale, la majorité des espèces des milieux profonds ont de larges zones de distribution quand, au contraire, dans les milieux côtiers, les espèces présentent plutôt des distributions endémiques (Gooday et Jorissen, 2012). Dans les environnements côtiers, la distribution des différentes espèces est contrôlée par la température et la salinité proche des côtes et également par la nature du sédiment, la couverture végétale et la pénétration de la lumière (Gooday et Jorissen, 2012). Plus profondément, sur le talus continental, la distribution des foraminifères benthiques est influencée par la quantité et la qualité de la matière organique, la nature du sédiment, les caractéristiques topographiques (ex : présence de canyons sous-marins) et parfois la concentration en oxygène et la courantologie (Gooday et Jorissen, 2012).

A plus petite échelle spatiale, la composition spécifique des faunes de foraminifères benthique varie verticalement dans la colonne sédimentaire. En effet, dans les milieux ou-

verts profonds, les études de la distribution verticale des foraminifères ont montré que les espèces changent avec la profondeur dans le sédiment suggérant que la majorité des espèces pouvait coloniser un microhabitat particulier (Jorissen, 1999a). Les espèces épipé-
liques sont les espèces présentes à l'interface eau-sédiment. Elles sont fréquemment trouvées fixées sur un substrat végétal (espèces épiphytes) ou minéral (épilithe). Les espèces vivant dans le sédiment sont qualifiées d'endopéliques. Trois microhabitats endopéliques peuvent être identifiés : superficiels, intermédiaires ou profonds en fonction de la profondeur à laquelle l'espèce vit (Figure 10C).

Dans ces environnements profonds, la distribution verticale des espèces et leurs microhabitats semblent être régis par les changements verticaux de quantité et de qualité de matière organique (Figure 10A), la diminution en profondeur de la concentration d'oxygène et la zonation verticale de certains éléments de la séquence diagénétique (ex : les nitrates ou les sulfures ; Figure 10B) et peut-être par la compétition inter- et intra-spécifique (les densités de foraminifères tendant à diminuer avec la profondeur).

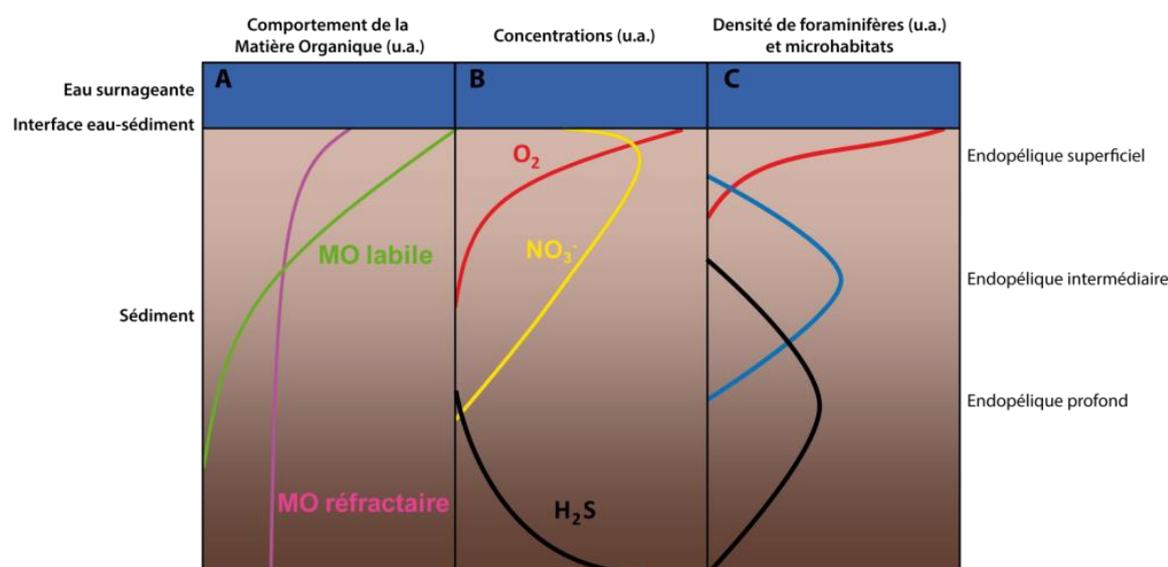


Figure 10- Comportement de la matière organique (MO ; A), de la concentration en oxygène, nitrates et sulfures (B) et de la densité de foraminifères (C) en fonction de la profondeur (unité arbitraire dépendant de la quantité de matière organique) dans les sédiments marins. La distribution des différents types de microhabitats endopéliques est présentée.

Cette distribution et cette organisation claire en microhabitats a été observée dans de nombreux environnements profonds, mais il semblerait que dans les milieux côtiers – auxquels nous nous intéressons en particulier dans cette thèse – il est plus difficile d'identifier une distribution verticale aussi clairement discriminée (Buzas et al., 1993).

De nombreux paramètres influencent la distribution des foraminifères benthiques, dans ce manuscrit nous nous intéresserons spécifiquement à leur réponse en anoxie.

3.2. Réponse des foraminifères benthiques à l'hypoxie et à l'anoxie

Comme décrit précédemment, les phénomènes de diminution de concentration d'oxygène dissous se produisent dans différents types d'environnements sur des périodes de temps variables (cf. paragraphe 1.2.2 ; Rabalais et al., 2010). Dans ce travail nous nous intéressons en particulier aux évène-

ments d'anoxie dans les milieux côtiers. Avant de décrire la réponse des foraminifères à de tels phénomènes saisonniers, nous décrivons dans un premier temps l'effet de l'hypoxie et de l'anoxie permanente sur les foraminifères benthiques.

3.2.1. Les foraminifères dans les milieux hypoxiques et anoxiques permanents

Effet de l'hypoxie permanente sur les faunes de foraminifères

Nous avons montré précédemment que dans les OMZ (Zones à oxygène minimum) les eaux sont hypoxiques en permanence. La réponse des foraminifères vivant ainsi en permanence en hypoxie a été récemment revue par Koho et Piña-Ochoa (2012). Dans l'OMZ du Pacifique Est, les foraminifères constituent la majorité de la communauté benthique (Levin, 2002; Tapia, 2008). Les analyses faunistiques menées dans les OMZ du Pacifique Est et en Mer d'Arabie montrent

de clairs changements de composition spécifique avec l'oxygénation. Les communautés vivant dans le cœur de l'OMZ sont dominées par des espèces des genres *Bulimina*, *Bolivina*, *Ammodiscus*, *Nonionella* ou *Stainforthia* par exemple .

Au large de la Namibie, dans une zone d'upwelling, *Virgulinema fragilis* ne semble vivre que dans des sédiments hypoxiques et anoxiques (sa distribution est limitée aux stations où la concentration d'oxygène varie entre 0 et 15 μM ; Leiter et Altenbach, 2010).

Dans les bassins profonds et hypoxiques en permanence tels que le bassin de Santa Barbara (où la concentration en oxygène oscille entre 0 et 12 μM toute l'année), seul un petit nombre de taxons tolérants à l'hypoxie sont présents et les faunes sont dominées par *Nonionella stella* (Bernhard et al., 1997) et les dosages de la concentration d'Adenosine Tri-Phosphate dans ce même bassin suggèrent que les faunes ne survivent pas à 10 mois d'anoxie (Bernhard et Reimers, 1991).

Effet de l'anoxie des eaux de fond permanente sur les faunes benthiques

Dans le plus grand des bassins anoxiques permanents, en Mer Noire, seul un très faible nombre de foraminifères à tests organiques (*Allogromida*) serait capable de vivre à des profondeurs où l'anoxie est permanente (Sergeeva et al., 2010).

Dans le bassin méditerranéen profond hypersalin de l'Atalante, seules trois espèces appartenant au groupe des Locifères colonisent cet environnement anoxique permanent (Danovaro et al., 2010). Ces Locifères se-

raient ainsi les seuls eucaryotes pluricellulaires à pouvoir compléter un cycle de vie complet (un cycle de reproduction) en étant en permanence dans un milieu anoxique. Le métabolisme de ces organismes est encore inconnu mais les observations ultra-structurales montrent qu'ils ne possèdent pas de mitochondries mais des organelles semblables à des hydrogénosomes - des organelles qui permettraient de générer de l'ATP par fermentation (Bernhard et Sen Gupta, 1999; Fenchel, 2012).

A plus grande échelle temporelle, plusieurs événements d'anoxie à long-terme ont eu lieu au cours du Quaternaire menant à la formation de sapropèles. Les analyses micropaléontologiques montrent une absence de foraminifères à coquille fossilisable dans ces formations sédimentaires (Jorissen, 1999b). Cette observation suggère que les foraminifères benthiques ne peuvent pas vivre dans des milieux dans lesquels les eaux de fond sont en permanence anoxiques.

Vie sous la limite de pénétration d'oxygène

Dans les milieux présentant une bonne oxygénation des eaux de fonds la respiration des organismes vivant dans le sédiment mène à une diminution de la concentration d'oxygène avec la profondeur (voir section 2.1 ; Figure 9A). Dans le sédiment il y'a donc des micro-environnements hypoxiques et anoxiques. Comme identifié précédemment, les foraminifères présentent également une zonation verticale propre à chaque espèce (Section 3.1.3 ; Figure 10C). Les espèces à microhabitat en-

dopélique intermédiaire et profond vivent donc dans des milieux respectivement hypoxiques et anoxiques.

Dans les milieux profonds, *Melonis barleeanus* apparaît comme étant l'exemple typique d'une espèce à microhabitat intermédiaire (Jorissen, 1999a). En effet, les densités maximales de cette espèce sont observées dans les couches hypoxiques et riche en nitrates du sédiment (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002; Koho et al., 2008). Cette espèce semble ainsi fortement liée à la vie dans des conditions hypoxiques. Cependant, *M. barleeanus* est également reportée en quantité variable dans des conditions oxygénées à l'interface eau-sédiment (Jorissen et al., 1998; Schmiedl et al., 2000; Fontanier et al., 2002; Ernst et van der Zwaan, 2004; Duros et al., 2011) ou dans les couches anoxiques du sédiment (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002; Mojtahid et al., 2010a). Cette espèce étant ainsi observée aussi bien en milieu oxygéné, hypoxique qu'anoxique.

Les espèces présentant un microhabitat endopélique profond les plus documentées appartiennent aux genres *Globobulimina* et *Chilostomella* (Koho et Piña-Ochoa, 2012). Si des individus des espèces du genre *Globobulimina* sont trouvés vivants aussi bien dans des microenvironnements oxygénés qu'hypoxiques et anoxiques (Jorissen et al., 1998; Kitazato et al., 2000; Mojtahid et al., 2010a) leur distribution verticale montre fréquemment un pic sous l'OPD (Schönfeld, 2001; Fontanier et al., 2003; Licari et al., 2003; Koho et al., 2008).

Ce mode de vie dans les zones hypoxiques et anoxiques du sédiment pourrait permettre aux foraminifères d'éviter la prédation et la compétition pour l'accès à la nourriture importants à l'interface eau sédiment (Fontanier et al., 2002) mais nécessite de développer des stratégies pour pouvoir survivre en l'absence d'oxygène. Nous discuterons dans un prochain paragraphe des stratégies qui permettent aux foraminifères de vivre en milieu anoxique (3.3).

Contrairement aux foraminifères vivant dans les environnements profonds, il est plus difficile de discriminer clairement les microhabitats des espèces vivant dans les milieux côtiers.

3.2.2. Réponse des foraminifères benthiques à l'anoxie et hypoxie saisonnière dans les milieux côtiers

Les phénomènes d'hypoxie saisonnière sont relativement fréquents dans les fjords scandinaves. Dans le Havstens Fjord, l'anoxie benthique dure pendant environ 5 mois dans l'année et dans de telles conditions seules *Elphidium magellanicum* et *Stainforthia fusiformis* réussissent à survivre (Gustafsson et Nordberg, 2000). Bien que l'on retrouve fréquemment *S. fusiformis* dans des milieux oxygénés (Alve, 1994, 2003) sa présence répétée dans de nombreux fjords hypoxiques tels que le Gullmar Fjord ou le Drammersfjord montre sa résistance lorsque les conditions sont faiblement oxygénées (Bernhard et Alve, 1996; Filipsson et Nordberg, 2004; Nordberg et al., 2009). Cette espèce présente également une forte réactivité à

tous types de stress environnementaux (oxygénation, perturbations physiques, salinité) montrant le caractère opportuniste de cette espèce (Alve, 2003).

Dans le Golfe du Mexique, les zones impactées par l'hypoxie présentent des faunes de foraminifères peu diverses dominées par *Buliminella morgani*, *Pseudononion atlanticum* et *Epistominella vitrea* dans la zone influencée par le Mississippi (Blackwelder et al., 1996; Osterman, 2003). Dans cette zone, différents indices biotiques ont été mis en place pour pouvoir estimer les changements d'oxygénation à partir de la composition des faunes de foraminifères. Partant du constat que le rapport entre la densité relative d'*Ammonia parkisonia* et *Elphidium excavatum* augmentait avec la diminution de la concentration le controversé « indice A-E » (le ratio entre les densités relative des espèces du genre *Ammonia* et du genre *Elphidium*) a été mis en place (Gupta et al., 1996; Platon et Gupta, 2001). Cet indice est controversé en raison du fait que les changements faunistiques seraient directement liés à des changements de conditions trophiques qui sont corrélés à l'oxygénation (Brunner et al., 2006).

En Mer Adriatique Nord, les densités de foraminifères vivants sont négativement impactées par les phénomènes d'hypoxie (Jorissen et al., 1992; Duijnsteet et al., 2004). L'influence de l'eutrophisation dans le développement de l'hypoxie via l'apport supplémentaire de matière organique qui favorise le développement des faunes rend parfois le signal difficilement lisible. *Nouria polymorphoides*, *Leptohalysis scottii* et *Textularia* spp.

semblent être des espèces sensibles à l'hypoxie et à l'anoxie quand *Nonionella turrida*, *Bolivina* spp., *Eggerella* spp., *Bulimina* spp., *Hopkinsina pacifica* et *Stainforthia fusiformis* sont plus tolérantes à de tels événements (Jorissen et al., 1992; Moodley et al., 1998b; Duijnsteet et al., 2004; Ernst et al., 2005; Pucci et al., 2009). L'ensemble de ces études montre que certaines espèces de foraminifères de la Mer Adriatique peuvent survivre à 2 à 3 mois d'hypoxie ou d'anoxie. Dans cette thèse, nous chercherons à identifier par une expérience menée in situ dans le Golfe de Trieste l'impact de 10 mois d'anoxie sur les communautés de foraminifères benthiques.

Au cours de cette thèse nous nous intéressons également à un second site d'étude côtier : le bras d'estuaire fermé du Grevelingenmeer dans lequel des phénomènes d'anoxie des eaux de fonds sont observés tous les étés. A notre connaissance, il n'y a à ce jour aucune étude de la communauté des foraminifères benthiques qui a été reportée. Cette étude serait ainsi la première à présenter les résultats de la réponse des foraminifères à l'anoxie saisonnière dans le Grevelingenmeer.

3.2.3. Survie des foraminifères en anoxie : expériences en laboratoire

Pour compléter les observations de la réponse des foraminifères à l'anoxie faites sur le terrain nous avons pris le parti de mener des expériences en laboratoire pour quantifier les taux de survie et de croissance de différentes espèces dans des conditions d'hypoxie et d'anoxie contrôlées.

En effet, sur le terrain lorsque l'on échantillonne deux stations ou deux saisons à des concentrations d'oxygène différentes, l'oxygénation n'est pas le seul paramètre à varier, la salinité, la température, la profondeur, la quantité de matière organique, etc. peuvent également changer rendant l'analyse de l'effet seul de l'hypoxie ou de l'anoxie difficile. Au laboratoire, nous pouvons choisir de faire varier ce paramètre d'oxygénation en fixant les autres variables permettant ainsi de minimiser l'interaction avec d'autres paramètres.

Ainsi, de nombreuses expériences ont été menées, à différentes concentrations d'oxygène, de l'hypoxie à l'anoxie et durant différents temps d'exposition allant de quelques jours (Moodley et Hess, 1992), à environ un mois (Bernhard, 1993; Alve et Bernhard, 1995; Bernhard et Alve, 1996; Ernst et van der Zwaan, 2004) et plus (Moodley et al., 1997, 1998b; Pucci et al., 2009; Piña-Ochoa et al., 2010b). Ces expériences basées sur des échantillons prélevés dans une grande variété de milieux montrent certes une diminution des effectifs avec le temps d'exposition mais les taux de survie des foraminifères benthiques en conditions hypoxiques et anoxiques restent élevés.

Il semblerait également que la réponse à l'anoxie soit espèce-dépendante. Par exemple, sur les faunes de la Mer Adriatique, (Moodley et al., 1998b) montrent que les espèces des genres *Textularia*, *Quinqueloculina*, *Bolivina*, *Bulimina* et *Reophax* sont sensibles (diminution de la densité et mortalité de la quasi-totalité des individus) à 66 jours d'anoxie

avec présence de sulfures. A l'opposé, *Stainforthia* spp., *Buliminella* spp. et *Hopkinsina* spp. sont résistantes à de telles conditions. Si quantitativement l'anoxie n'a sur certaines espèces pas d'effet, elle peut en avoir qualitativement. En effet, après plus de trois semaines d'incubation en anoxie, les niveaux d'ATP de *Psammosphaera bouwmanni* ne sont pas affectés quand *Adercotryma glomeratum* et *Stainforthia fusiformis* montre une diminution de leur niveaux d'ATP (Bernhard et Alve, 1996). La diminution de cet indicateur de niveau d'énergie cellulaire suggérerait une réduction de leur activité métabolique qui leur permettrait de survivre dans de telles conditions anoxiques. Les voies métaboliques permettant aux foraminifères de répondre à l'anoxie sont discutées dans la section suivante (3.3).

Il semblerait que l'ensemble des études citées précédemment présentent des réponses à l'anoxie des foraminifères assez claires. Malheureusement, les conclusions portées dans ces études pourraient souffrir d'un biais méthodologique majeur : le mode de détermination de la vitalité des foraminifères. En effet, dans la quasi-totalité des études citées précédemment, le nombre d'individus vivants est estimé selon la méthode du rose bengale. Or, comme discuté dans le paragraphe suivant, cette méthode de détermination de la vitalité des foraminifères peut mener à de larges surestimations du nombre de foraminifères vivants lorsque le milieu d'étude est anoxique. Dans cette thèse, nous chercherons à minimiser les biais méthodologiques en utilisant des méthodes de détermination de la vitalité aussi

appropriées que possible à l'étude de l'écologie des foraminifères vivant dans les milieux anoxiques.

3.2.4. Problématique méthodologique : détermination de la vitalité d'un foraminifère benthique en anoxie

Afin de comprendre comment les foraminifères répondent à l'anoxie, il est nécessaire de pouvoir déterminer si un individu est vivant ou mort. Cette problématique, en apparence triviale, est loin d'être aisée à résoudre. L'identification et la quantification du nombre d'individus vivants est d'autant plus difficile quand il s'agit d'organismes provenant de milieux anoxiques.

Plusieurs alternatives basées notamment sur la présence d'éléments cellulaires, l'activité

de mobilité, enzymatique ou métabolique des organismes permettent de déterminer avec plus de précision si un individu est vivant ou non. Chaque méthode présente des avantages et des inconvénients et ont chacune leur champ d'application particulier (Tableau 2).

La méthode la plus couramment utilisée lors d'études faunistiques ainsi que lors d'expériences en laboratoire est celle de la coloration au rose bengale. La grande majorité des études citées précédemment sont réalisées à partir de la coloration d'individus au rose bengale. Le rose bengale est un colorant qui marque les protéines présentes dans le protoplasme (Walton, 1952; Bernhard, 2000). Or, le protoplasme peut être conservé dans le test du foraminifère plusieurs jours à plusieurs semaines après la mort de l'individu lorsque

Tableau 2 – Ensemble des méthodes les plus couramment utilisées pour identifier la vitalité des foraminifères benthiques (liste non exhaustive), mode d'action, type d'utilisation et leurs points positifs et négatifs. Voir Walton, 1952; Alve et Bernhard, 1995; Bernhard et al., 1995, 2006; Bernhard et Alve, 1996; Bernhard, 2000; Borrelli et al., 2011; Lejzerowicz et al., 2013a, 2013b pour plus de détails sur chaque méthode.

Type	Méthode	Mode d'action	Utilisation dans des études		Points positifs	Points négatifs
			écologiques	en laboratoire		
Marqueur de présence d'éléments cellulaires	Rose Bengal	Coloration des protéines du protoplasme	oui	oui	peu couteux, tri facile	Marque présence de protéines, pas si individu est vivant
	ADN	Extraction de l'ADN présent dans le sédiment	oui	oui	Ensemble de la faune (toutes taille), taxonomie moléculaire	Non quantitatif, peut être conservé plusieurs années ou Ma
Marqueur de mobilité	Observation des pseudopodes	Observation microscopique des pseudopodes	non	oui	sur à 100% que l'individu est vivant	peut omettre les individus vivants non actifs, très couteux en temps
	Observation du déplacement	Observation du déplacement sur couche de sédiment fin	non	oui	sur à 100% que l'individu est vivant	peut omettre les individus vivants non actifs, très couteux en temps
Marqueur d'activité métabolique	ATP	Mesure de la quantité d'ATP	difficilement	oui	Mesure quantitative et qualitative du niveau d'activité	Non fixable --> à analyser immédiatement après échantillonnage
	ARNr	Extraction de l'ARN présent dans le sédiment	oui	oui	Ensemble de la faune (toutes taille), taxonomie moléculaire	Non quantitatif, difficile à mettre en œuvre
	FISH	Marquage fluorescent de l'ARNm actif	non	oui	Mesure localisée, quantitative et qualitative. Sondes spécifiques aux foraminifères	Isolation des individus rapidement après échantillonnage, protocole complexe
Marqueur d'activité enzymatique	FDA	Molécule non fluorescente incorporée et hydrolysée dans la cellule et formation de molécule fluorescente	non	oui	peu couteux, utilisable qualitativement et quantitativement	non fixable --> à analyser immédiatement après incubation
	CTG	Molécule fluorescente	oui	oui	Utilisation quantitative ou qualitative, fixable	Relativement couteux financièrement et en temps

le milieu est oxygéné (Boltovskoy et Lena, 1970; Bernhard, 1988; Murray et Bowser, 2000) et jusqu'à trois mois lorsque le milieu est anoxique (Hannah et Rogerson, 1997). En anoxie, la vitesse de dégradation de la matière organique est plus faible qu'en présence d'oxygène (Burdige, 2006; Glud, 2008). Ainsi, le protoplasme organique du foraminifère va être dégradé plus lentement en anoxie que lorsque le milieu est oxygéné et risque d'être coloré par le rose bengale plusieurs mois après la mort de l'individu. On peut donc s'attendre à une forte surestimation des densités de foraminifères si l'on se base sur une coloration au rose bengale. Si cette méthode permet une identification relativement rapide et peu onéreuse des foraminifères potentiellement vivants elle n'est pas recommandée pour l'analyse d'échantillons provenant de milieux anoxiques ou lorsqu'il faut déterminer si un individu est mort il y a peu de temps.

Cette méthode a été très largement utilisée aussi bien dans les études expérimentales que dans les études faunistiques bien que cette méthode apparaisse clairement comme produisant un nombre important de faux-positifs en conditions anoxiques. Ainsi, la grande majorité des conclusions de la littérature précédemment citée sont établies à partir de cette méthode qui est inadéquate pour décrire la réponse des foraminifères benthiques en anoxie. Les références utilisant des indicateurs autres que le Rose Bengale – et que l'on peut considérer comme plus fiables – sont très peu nombreuses.

L'un des objectifs de ce travail de doctorat est la réponse des faunes de foraminifères à

l'anoxie de déterminer en utilisant des indicateurs aussi fiables que possible. Ainsi plutôt que d'utiliser des marqueurs de présence d'éléments cellulaires tels que le rose bengale, nous utiliserons le FDA et le CTG qui sont des indicateurs d'activité enzymatique. En théorie, l'activité enzymatique du foraminifère est stoppée à la mort de l'individu, l'utilisation de ces méthodes devrait ainsi permettre de quantifier avec plus de précisions le nombre d'individus qui sont vivants en conditions anoxiques. En complément, nous utiliserons également la présence d'ARNr dans des sédiments anoxique comme marqueur de l'activité métabolique des foraminifères.

3.3. Métabolisme anaérobie

Comme décrit dans les paragraphes précédents, de nombreuses espèces sont capables de survivre en anoxie (Bernhard et Reimers, 1991; Bernhard, 1993; Bernhard et Alve, 1996; Duijnsteet et al., 2003). Cette survie en anoxie suggère que les foraminifères benthiques sont potentiellement des organismes anaérobies facultatifs (des organismes qui respirent de l'oxygène lorsqu'il est présent et qui en anoxie sont capables d'utiliser un métabolisme anaérobie).

Pour expliquer la survie en anoxie des foraminifères benthiques, différentes hypothèses ont été émises : ces organismes présenteraient de nombreuses adaptations physiologiques leur permettant de résister à l'anoxie (Bernhard, 1996; Bernhard et Sen Gupta, 1999). La séquestration de chloroplastes, l'assimilation de l'enzyme nitrate réductase

depuis des chloroplastes de diatomées, la formation de kystes, la dormance (réduction du métabolisme), l'agrégation de réticulum endoplasmique et de peroxyosomes procureraient un avantage métabolique – qui, à ce jour n'est pas clairement défini - permettant aux foraminifères benthiques de résister à l'anoxie (Leutenegger, 1984; Cedhagen, 1991; Bernhard et Alve, 1996; Moodley et al., 1998b; Grzymiski et al., 2002; Bernhard et Bowser, 2008). La présence de bactéries méthanogènes et réductrices de sulfates endo- et ecto-byontes chez de nombreuses espèces de foraminifères benthiques (Bernhard et Reimers, 1991; Bernhard, 1996; Bernhard et al., 2000) pourrait également faciliter la vie en anoxie. Les bactéries symbiotiques pourraient permettre en oxydant les sulfures de détoxifier les eaux porales (Bernhard et Sen Gupta, 1999). Chez les Allogromiidae les bactéries endobyontes permettraient également d'assurer la dénitrification (Bernhard et al., 2011).

La dénitrification est un processus impliquant plusieurs enzymes qui permettent de catalyser la réduction des nitrates en diazote. Il y'a quelques années, ce processus était supposé n'être présent que chez les procaryotes (Fenchel et Finlay, 1995). Mais en 2006 il a été mis en évidence que deux espèces de foraminifères benthiques : *Globobulimina turgida* et *Nonionella stella* sont capables de dénitrifier (Risgaard-Petersen et al., 2006). Ces deux espèces sont ainsi capables d'accumuler les nitrates (un ion non toxique) en grande quantité dans leur cellule et de les réduire via dénitrification lorsqu'ils sont placés en anoxie. Cette observation est ainsi la

première preuve que certaines espèces de foraminifères benthiques sont anaérobies facultatifs.

Par la suite d'autres espèces ont été analysées et il apparait que la capacité à accumuler des nitrates présente une forte variabilité inter- et intra-spécifique (Høgslund et al., 2008; Piña-Ochoa et al., 2010a). La capacité à dénitrifier semble uniquement présente chez les espèces capables d'accumuler les nitrates en grande quantité (Piña-Ochoa et al., 2010a). Le fait que seules des espèces ayant des microhabitats endopéliques profonds ou vivant dans les OMZ soient capables de dénitrifier suggère que la capacité de survie des foraminifères en anoxie serait liée à leur capacité à présenter un métabolisme anaérobie.

Pendant un temps, pour certains auteurs, des doutes ont subsisté concernant la capacité à dénitrifier des foraminifères, la présence de bactéries symbiontes étant supposée être la source de cette capacité. Finalement, il a été récemment mis en évidence chez *Buliminella tenuata* la présence d'une enzyme impliquée dans la dénitrification n'étant pas affiliée à un potentiel symbionte procaryote (Bernhard et al., 2012). Cette observation suggère que la capacité à dénitrifier est bien due au foraminifère lui-même et non pas à ses symbiontes.

Toutes les espèces pour lesquelles la capacité à dénitrifier a été mise en évidence sont également capables de respirer de l'oxygène confirmant ainsi le caractère anaérobie facultatif des foraminifères. Les foraminifères pourraient contribuer entre 4 et 70% de la dénitrification benthique (Glud et al., 2009; Piña-Ochoa et al., 2010a) quand leur contribution à

la consommation d'oxygène benthique varie entre 0.5 et 2.5 % (Geslin et al., 2011). Les foraminifères benthiques contribuent ainsi plus fortement à la minéralisation de la matière organique anaérobie qu'à la minéralisation aérobie.

Lors de cette thèse nous chercherons à voir si comme dans les milieux océaniques profonds les foraminifères benthiques des milieux côtiers sont capables de dénitrifier et nous tenterons d'identifier si l'occurrence d'un tel métabolisme anaérobie permet d'expliquer la survie des foraminifères en anoxie.

4. Problématique(s)

Cette thèse intitulée « Réponse des foraminifères à l'anoxie dans les milieux côtiers : études in situ de l'écologie des foraminifères benthiques, expériences en laboratoire et analyse du métabolisme anaérobie » a pour objectif de chercher à identifier la réponse des foraminifères de Mer Adriatique et de l'ancien estuaire du Grevelingenmeer à l'anoxie ainsi que de comprendre les mécanismes qui permettent d'expliquer la survie des foraminifères en anoxie.

Ce travail a pour but de répondre aux questions scientifiques suivantes :

- Est-ce que les foraminifères benthiques sont capables de survivre à l'anoxie ? Combien de temps peuvent-ils vivre en anoxie ? Quels sont les effets de l'anoxie à l'échelle de la communauté, de la population et de l'individu ?

- Quelles sont les espèces qui sont sensibles et quelles espèces survivent en anoxie ?
- Comment expliquer la survie de certaines espèces ? Est-ce que seules les espèces capables de dénitrifier peuvent vivre en anoxie ?
- Est-ce que les foraminifères répondent de la même manière à l'anoxie dans les différents milieux côtiers étudiés ? Comment expliquer les similarités et les différences ? Est-ce que la réponse des foraminifères à l'anoxie est différente dans les milieux côtiers et dans les milieux profonds ?
- Est-ce que l'anoxie et l'hypoxie ont des effets différents sur les foraminifères benthiques ?

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé différentes approches : 1) des observations sur le terrain, 2) des expériences menées sur le terrain et 3) des expériences en laboratoire. L'utilisation de ces différentes approches ont toutes pour objectif d'identifier la réponse des faunes de foraminifères à l'anoxie mais permettent d'identifier 1) la réponse en Mer Adriatique à une anoxie contrôlée expérimentalement, 2) la réponse dans l'estuaire du Grevelingenmeer à une anoxie présente « naturellement » tous les étés et 3) la réponse en laboratoire d'espèces sélectionnées à une anoxie contrôlée. Nous chercherons dans un quatrième temps à identifier les mécanismes qui permettent d'expliquer la réponse des foraminifères à l'anoxie.

Dans le premier chapitre « Expérience in situ d'incubation en anoxie à long-terme en Mer Adriatique : géochimie benthique et réponse des faunes de foraminifères » présente les résultats d'une expérience menée en Mer Adriatique. Dans cette expérience, des chambres benthiques permettant d'initier et contrôler l'anoxie ont été installées pendant 10 mois sur le sédiment marin. Ce chapitre comporte 3 articles scientifiques publiés dans les journaux *Biogeosciences* et *Biogeosciences Discussion* ainsi qu'une synthèse des résultats présentés dans ces trois articles :

- « Artificially induced migration of redox layers in a coastal sediment from the Northern Adriatic » par Metzger, Langlet et al. qui présente en annexes les résultats d'analyse des changements de la géochimie du sédiment avec l'anoxie.
- « Foraminiferal survival after long term in situ experimentally induced anoxia » par Langlet et al. qui présente les changements de densité de foraminifères au cours du développement de l'anoxie.
- « Foraminiferal species responses to in situ experimentally induced anoxia in the Adriatic Sea » par Langlet et al. dans lequel l'effet de l'anoxie sur la diversité et la composition des faunes de foraminifères est quantifié.

Le second chapitre de cette thèse « Variabilité spatio-temporelle des communautés de foraminifères benthiques dans le lac salée de

Grevelingenmeer » nous observons sur le terrain la réponse des foraminifères benthiques à l'anoxie qui se développe saisonnièrement dans les eaux de fond du Grevelingenmeer. Trois missions d'échantillonnage ont lieu avant, pendant et après la période annuelle d'anoxie et à chaque mission des stations impactées et non-impactées par l'anoxie sont analysées. Ce chapitre, issu à l'origine d'un rapport d'étude effectuée pour l'agence de l'eau néerlandaise (qui a financé une part de cette étude) présente les changements spatio-temporels de la composition, la diversité ainsi que la densité des faunes de foraminifères benthiques.

Le troisième chapitre « Survie, croissance et métabolisme des foraminifères benthiques en hypoxie et en anoxie » présente les résultats de deux expériences d'incubation de différentes espèces en anoxie et en hypoxie. Dans ce chapitre, un chapitre de livre « Biological response of three benthic foraminiferal species to experimentally induced hypoxia » par Geslin, Langlet et al. est présenté et les résultats d'une étude comparative de deux expériences (l'une en hypoxie, l'autre en anoxie) menées sur *Melonis barleeanus* sont présentés.

Le quatrième chapitre « Nouvelles données expérimentales pour la compréhension des métabolismes aérobie et anaérobie des foraminifères benthiques » présente et compile l'ensemble des données concernant la quantification des métabolismes aérobie et anaérobie disponibles à ce jour avec les données

obtenues lors de cette thèse. L'établissement de cette base de données nouvellement compilée permet d'approfondir et d'aller plus loin dans la compréhension du métabolisme des foraminifères benthiques.

A la fin du manuscrit, les conclusions, la synthèse et les perspectives de ce travail de recherche seront présentées.

Chapitre 1. Expérience in situ d'incubation en anoxie à long-terme en Mer Adriatique : géochimie benthique et réponse des faunes de foraminifères

Dans ce chapitre, nous allons présenter les résultats d'une expérience menée dans un milieu côtier fréquemment affecté par des phénomènes d'hypoxie et d'anoxie : la Mer Adriatique. Dans l'expérience que nous avons menée (dans le cadre des projets FWF P21542-B17 et P17655-B03 financés par l'Austrian Science Fund) en Mer Adriatique, l'anoxie est déclenchée en plaçant des cloches benthiques sur le sédiment. L'ensemble des publications tirées des résultats de ce projet sont publiées dans un tirage spécial du journal *Biogeosciences* : « *Coastal hypoxia and anoxia: a multi-tiered, holistic approach* ».

Afin de contraindre au mieux le changement des conditions géochimiques au cours de l'expérience, nous présentons dans un premier temps dans ce chapitre de thèse l'article de Metzger, Langlet et al. « *Artificially induced migration of redox layers in a coastal sediment from the Northern Adriatic* » publié dans *Biogeosciences* actuellement en phase de révision finale. Les changements des conditions géochimiques ainsi contraints, nous discutons dans l'article de Langlet et al. « *Foraminiferal survival after long-term in situ experimentally induced anoxia* » de l'effet de 10 mois d'anoxie sur les densités de foraminifères benthiques. La réponse des différentes espèces de foraminifères est discutée dans un troisième article de Langlet et al. « *Foraminiferal species responses to in situ experimentally induced anoxia in the Adriatic Sea* » actuellement accepté pour une publication sous presse en *Biogeosciences*. Pour clôturer ce chapitre, nous proposons un bilan de l'ensemble de ces trois articles dans lequel les résultats principaux sont présentés.

Partie I. Artificially induced migration of redox layers in a coastal sediment from the Northern Adriatic

E. Metzger¹, D. Langlet¹, E. Viollier², N. Koron³, B. Riedel⁴, M. Stachowitsch⁴, J. Faganeli³, M. Tharaud², E. Geslin¹, F. Jorissen¹

[1]{ UMR CNRS 6112 LPG-BIAF – Laboratoire des Bio-Indicateurs Actuels et Fossiles, Université d'Angers, 2 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex, France }

[2]{ UMR 7154 CNRS, Laboratoire de Géochimie des Eaux, Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Institut de Physique du Globe de Paris, 75013 Paris, France }

[3]{ Marine Biology Station, National Institute of Biology, Fornace 41, 6330 Piran, Slovenia }

[4]{ Department of Limnology and Oceanography, University of Vienna, Althanstrasse 14, Vienna 1090, Austria }

Correspondence to: E. Metzger (edouard.metzger@univ-angers.fr)

1. Abstract

Long-term experimental studies suggest that, under transient anoxic conditions, redox fronts within the sediment shift upwards causing sequential rise and fall of benthic fluxes of reduced species (Mn(II), Fe(II) than S(-II)). Infaunal benthic organisms are associated with different redox fronts as micro-habitats and must be affected by such changes during natural hypoxia events. In order to document the geochemical evolution of the sediment during prolonged anoxia in the framework of an in situ experiment designed to mimic natural conditions, benthic chambers were deployed on the seafloor of the Northern Adriatic and sampled after 9, 30 and 315 days of incubation. Oxygen and sulfide were measured continuously in the early stages (9 days)

of the experiment. High-resolution porewater profiles were sampled by DET probes and redox-sensitive species were analysed (alkalinity, S(VI), Mn(II) and Fe(II)).

Starting oxygen saturation was about 80% within the chamber. After 7 days, anoxia was established in the bottom waters within the chambers. Mn(II) and Fe(II) started diffusing towards the anoxic water column until they reached the surficial sediment. Being reoxidized there, Mn and Fe reprecipitated, giving a rusty coloration to the seafloor. Infaunal species appeared at the sediment surface. After 20 days, all macro-organisms were dead. Decomposition of macro-organisms at the sediment-water interface generated S(-II) within the entire height of the chamber, leading to a downward flux of sulfide into the sediment, where they were quickly oxidized

by metallic oxides or precipitated as FeS. S(-II) was below detection in the water column and porewaters at the end of the experiment. Our results suggest that S(-II) enrichment in the water column of coastal systems which are episodically anoxic is strongly controlled by the biomass of benthic macrofauna and its decay during anoxia, whereas its residence time in the water column is controlled by iron availability (as solid oxides or as dissolved reduced cations) within the sediment, even without water circulation.

2. Introduction

The increased occurrence of seasonal anoxia and hypoxia in coastal areas reflects a combination of several factors, the most important being nutrient input due to river runoff and stratification of the water column. Since the 1960s a clear increase in the occurrence of anoxic events has been observed, often associated with mass mortality of benthic faunas (Diaz et Rosenberg, 2008). In most cases, anoxia occurs in environments that are semi-enclosed, shallow and have soft sediment bottoms. This combination restricts water circulation, increases the residence time of water and its solutes, favors stratification and, in areas affected by anthropogenic eutrophication, promotes nutrient accumulation. Oxygen is then depleted without sufficient resupply. This phenomenon, however, is not exclusive to semi-enclosed settings. Many estuaries where the residence time of water is supposedly relatively short also show severe hypoxia (Garnier et al., 2001; Rabalais et al., 2002;

Hagy et al., 2004; Lanoux et al., 2013), sometimes leading to fish mortality; this includes estuaries only moderately impacted by anthropogenic eutrophication, such as the Loire River mouth (Abril et al., 2003). Furthermore, continental seas such as the Baltic Sea, Black Sea, and the Gulf of Mexico (Rabalais et al., 2002), show an increase in the occurrence and geographic extent of anoxic events. Meire et al. modeled the evolution of hypoxic events in the Oyster Grounds (central North Sea) and concluded that riverine runoff was a key factor influencing the occurrence of hypoxia (Meire et al., 2013). In some coastal environments such as Thau lagoon (French Mediterranean), a decrease of the occurrence of anoxic events has been reported since the 1990s, which has been interpreted to reflect efficient environmental policies leading to a reduced phosphorus load to the lagoon (Souchu et al., 1998). More recent studies in the same system, however, showed that this trend did not extend into the 2000s. Despite the lower phosphorus loads, a large stock is still available within the sediment of the Thau Lagoon, mainly as shellfish faeces; its recycling under summer conditions (i.e., higher temperature and little wind) triggers high benthic fluxes of phosphorus towards the water column, enhancing primary production and ultimately leading to seasonal hypoxia/anoxia as observed in 2003 and 2006 (Mesnage et al., 2007; Minghelli-Roman et al., 2011). Therefore, coastal systems that experienced decades of eutrophic conditions take time to recover. Furthermore, global warming affects oxygen solubility and water stratification worldwide,

promoting hypoxia/anoxia. Several authors therefore predict a further increase of the areas affected by anoxia and mass mortality events if no major efforts to decrease nutrient supplies to coastal areas are undertaken (Diaz et Rosenberg, 2008; Middelburg et Levin, 2009; Meire et al., 2013).

We conducted a series of in situ experiments in the Northern Adriatic (Mediterranean Sea), one of the areas repeatedly affected by seasonal hypoxia (Barmawidjaja et al., 1995; Rabalais, 2010; Giani et al., 2012). They were designed to better understand how anoxia affects benthic macrofauna and meiofauna survival and how fast the impacted zone attains a new ecological equilibrium. The main objective was to simulate short- to long-term bottom-water anoxia and to study the survival, resilience and recolonization of different groups of benthic organisms (macrofauna (Riedel et al., 2012, 2013; Blas-nig et al., 2013), meiofauna such as foraminifera (Langlet et al., 2013a, 2013b), nematodes and copepods (De Troch et al., 2013; Grego et al., 2013, 2014)), which are expected to respond differently to anoxia. Seasonal changes in bottom-water oxygenation are known to induce vertical migrations of the major redox fronts in the sediment, promoting vertical separation between redox-sensitive elements. The separation between iron and manganese (oxyhydr)oxides in the sedimentary column, for example, is related to different kinetics of reduction/oxidation and therefore of dissolution/precipitation of these metals (Burdige, 2006). Redox oscillations will enhance the accumulation of manganese on

top of the sediment. Associated trace metals, including non-redox elements such as cadmium, can also be affected by redox oscillations (Gobeil et al., 1997; Sundby et al., 2004). Experimental studies have shown that cores incubated under hypoxic conditions successively released dissolved manganese (Mn(II)), iron (Fe(II)) and sulfide S(-II) to the overlying water column. This demonstrates that bottom-water oxygenation impacts the vertical extent of redox zones (Kristiansen et al., 2002; Sell et Morse, 2006).

In the Northern Adriatic, hypoxic conditions occur seasonally in late summer, affecting the recycling of metal oxides and bioturbation activity (Faganeli et al., 1985; Hines et al., 1997). Several macrofauna mortality events have been documented (Stachowitsch, 1984, 1991). Moreover, the region is impacted by intense trawl-fishing activities, enhancing the vulnerability to benthic perturbation. The present contribution is part of a multidisciplinary study conducted on a silty-sand bottom at 24-m water depth in the Gulf of Trieste, Northern Adriatic. It presents the evolution of a series of major chemical species in the bottom waters and surficial sediments during a series of in situ anoxia experiments lasting up to 10 months. Benthic meiofauna and foraminifera preferentially inhabit the top layer of the sediment. Nonetheless, some of these organisms live in microhabitats that correspond to the major redox zones. Those species with a deep infaunal microhabitat can cope better under anoxia (Jorissen, 1999a; Schönfeld, 2001). Sulfide, however, seems to be a barrier for vertical migration of foraminifera

(Moodley et al., 1998a) making the sulfate/sulfide redox front dynamics a key parameter of infaunal survival. Our hypothesis was that, during our experiment, both the pore water chemical composition and the vertical distribution of meiofauna would change. Accordingly, the goals of the present study were 1) to describe with high vertical resolution the geochemical evolution of the pore and bottom waters slightly above and below the sediment-water interface during short- and long-term incubation, 2) to better understand the behavior of the main redox species (i.e. oxygen, manganese, iron and sulfur) during the onset of anoxia, and 3) to provide the geochemical constraints that would potentially explain the response of the benthic fauna to anoxia.

3. Material and Methods

3.1. Study Area

The study site is located 2.3 km off Piran (Slovenia) in the southern part of the Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea, at the Marine Biology Station's hydrographic buoy Vida (45°32'55.68" N, 13°33'1.89" E). This site was selected because of a minimal risk of damage to equipment by commercial fisheries. The Gulf of Trieste covers an area of 600 km², has a maximal depth of 25 m and is isolated from the rest of the Northern Adriatic by a 100-m-deep shoal. This leads to water residence times (about 250 days, Poulain et Hariri, 2013) which is twice as long as in the southern Adriatic Sea. The salinity of bottom waters ranges from 36 to 38.5 and bottom-water temperatures range from 8 °C in winter

to 20 °C in summer. In late summer, a vertical density gradient can result in bottom-water hypoxia or anoxia (Faganeli et al., 1985). The sediment in the southern part of the Gulf of Trieste is mainly composed of silty sand that is rich in biogenic carbonate (porosity about 0.6, unpublished data). The benthic macrofauna community is dominated by brittle stars, sponges and tunicates (Fedra et al., 1976; Ogorelec et al., 1991) and is actively bioturbated by polychaetes, bivalves and irregular sea urchins. The sedimentation rate, determined by ²¹⁰Pb, is approximately 1.2 mm yr⁻¹ (Ogorelec et al., 1991). The sediment surface is covered by microalgae, mostly diatoms (Bertuzzi et al., 1996), which greatly contribute to the sedimentary organic-carbon (OC) input (Ogrinc et al., 2005). The OC content in superficial sediment is about 0.65 wt% (Ogrinc et al., 2005; Koron et al., 2013).

Tableau 3 - Time schedule of deployment for each chamber

chamber name	deployment dates	
	initial	final
9 days	02/08/2010	11/08/2010
1 month	27/07/2010	25/08/2010
10 months	24/09/2010	25/08/2011

3.2. Experimental setup

A series of benthic chambers was deployed in situ to mimic anoxic events and to isolate the sediment and its overlying waters for different periods of time. We assumed that no ventilation occurs during anoxia events and therefore decided against stirring. An abundant literature shows the influence of hydrodynamics on benthic fluxes and suggests that

stirring is suitable to homogenize the chemical composition of the overlying water and to keep a realistic benthic boundary layer in order to determine benthic fluxes (Sundby et al., 1986; Hall et al., 1989; Boudreau, 2001; Viollier et al., 2003). However, since the project intended to investigate whether benthic organisms respond to biogeochemical changes in the surface sediment, the aim of the present study was not to measure benthic fluxes but to describe changes in pore water chemistry during the development of anoxia. The cubic benthic chambers were made of Plexiglas, with sides of 50 cm (surface area 0.25 m², volume 0.125 m³). A sealable aperture on one side enabled inserting and removing probes during/after deployment. The three chambers used for our analyses were deployed for 9 days, 1 month and 10 months (Tableau 3). The “9 days” chamber was equipped with a camera and a set of chemical sensors and has previously been described as EAGU (Experimental Anoxia Generating Unit) (Riedel et al., 2008, 2012; Stachowitsch et al., 2007). In order to optimize the isolation of the benthic chambers (i.e. prevent bioturbation by macroinfauna), the sidewalls were pushed a few cm into the sediment; additionally, 20-cm-high inox steel plates were pushed into the sediment parallel to the walls. Finally, the area around the chambers was covered with ceramic tiles to minimize the risk that burrowing could re-ventilate the chambers. In every chamber, a series of 8 DET (Diffusive Equilibrium in Thin films) gel probes (Davison et al., 1991; Fones et al., 1998; Metzger et al., 2007) was inserted 24 h to 48 h before termi-

nation of the experiment, allowing in situ sampling of pore water at a 2-mm resolution (see below, Figure 16D). DET gel probes were also deployed in an adjacent control area, hereinafter referred to as “Normoxic” (Figure 16A). The distance between the chambers did not exceed 10 m and all deployment areas were chosen for their visually homogeneous sediment without macrofauna multi-species clumps.

3.3. Oxygen and sulfide sensors

Two oxygen and two sulfide Clark-type sensors from Unisense® (Revsbech, 1989) were placed within the first chamber, which was opened after 9 days. The four probes were placed at each corner of the chamber. One of each pair was positioned 5 cm above the sediment-water interface, the second one about 4 mm. Sensors were connected to a specially designed data logger from Unisense®, yielding a measurement every 10 min for each of the four sensors.

3.4. DET gel preparation and deployment

For this study, we used a modified version of DGTresearch© perspex probes (Metzger et al., 2007), which minimize probe thickness (3 mm) and vertical channeling. Each probe corresponds to 75 cells of 22 µL and a vertical resolution of 2 mm. Probes were rinsed in HCl acid and deionized water before assemblage. A mixture of 1.5 % w/w of ultra-pure agarose (USB Corporation, USA) in deionized water (milli-Q®) was placed in a microwave

oven until complete dissolution of the agarose powder. The hot gel was poured into the probe and a glass plate was pressed over it to remove excess hydrogel. After cooling, the remaining excess gel was removed with a Teflon-coated razor blade. Next, the gel was covered with a PVDF hydrophilic membrane (0.2- μm size pore, Millipore, USA). The membrane was fixed onto the probe with commercially available PVC plastic tape (Leroy Merlin®), which is sensitive to dissolved H_2S (Jézéquel et al., 2007). Gels were stored for at least 24 h in deionized water, which was replaced twice.

Before deployment, DET probes were degassed with N_2 overnight and kept under nitrous atmosphere until immersion to minimize oxygen contamination from the gel to the anoxic sediment during insertion. The DETs were inserted into the sediment of the chamber by Scuba divers through the sealable aperture in the chamber wall (\varnothing 20 cm) and then photographed to document their relative position in the chambers as well as the precise location of the sediment-water interface. Based on the aperture size and construction, the water exchange during DET insertion was minimal (an estimated 2 L, versus the 125 L content of each chamber). Although the time needed for equilibration of the DET probes is generally only about 4 h (Harper et al., 1997), the gels in the present study were deployed from 24 to 48 h because of operational limitations and to enable the sediment to recover from potential perturbation. The entire retrieval operation (until preservation in nitrous atmosphere) took 3 min at most. DETs were

sampled and the samples chemically stabilized in the laboratory within 4 h after retrieval.

3.5. DET preservation and analyses

In total, 8 DET probes were inserted within each incubation chamber. Two probes were dedicated for each type of analysis (e.g. 6 in total) in order to have two replicates for each chemical profile. The two remaining probes were used as spares.

Gel samples serving for metal determinations were eluted in 5 mL of a 0.01 mol L^{-1} suprapur® nitric-acid solution corresponding to a dilution factor of about 200 of the pore water (DET gel piece about 25 μL). Dissolved iron and manganese were analyzed with a High-Resolution ICP-MS Element II from ThermoScientific. This ICP-MS enables working in different resolution modes (LR = 400, MR = 4000 and HR=10000) to better discriminate between elements of interest and possible interferences (Krachler, 2007). ^{55}Mn and ^{56}Fe isotopes were measured at high resolution (HR). At the beginning of each measurement session, the instrument was first tuned to produce maximum sensitivity and stability while also maintaining low oxide formation ($\text{UO}/\text{U} \leq 5\%$). In order to minimize analytical time and sample volume, we worked with the SC-FAST automation system coupled to a cyclonic spray chamber (Mahar et al., 2008). A 6-port valve rapidly delivers the sample with a high flow vacuum pump and rinses the probe sample lines while the sample is analyzed. This allowed us to de-

crease the analytical time and volume for each sample to 2.5 min and 2 mL. Multiple standard solutions were prepared using 1000-ppm SPEX standard solutions and laboratory-distilled suprapur® nitric acid, and the accuracy and precision of measurements were checked using SLRS-4 and 5 certified standards (NRC-CNRC). The overall uncertainty was estimated to be below 6 %.

Gel samples dedicated to sulfate determination were stored in 1 mL of a 0.01 mol L⁻¹ zinc acetate solution in order to fix all sulfide present in the solution as ZnS, avoiding oxidation into sulfate. Before ionic chromatography analysis, samples were diluted to a final dilution of 800. Standard solutions were prepared with filtered subsurface seawater from the Bay of Biscay with a salinity of 34. Sulfate and chloride were measured using a Metrohm 792 Basic IC with a 100 mm Metrosep A supp 5 column. Precision was about 2%. In order to point out ongoing biogeochemical processes, SO₄²⁻ values are normalized to Cl⁻ and shown as the result of the calculation: $(SO_4^{2-}/Cl^-)_{\text{sample}} \times Cl^-_{\text{overlying water}}$. Because Cl⁻ is considered to be a conservative chemical species, variations of normalized sulfate with depth cannot be interpreted to reflect mixing processes.

Gel samples used to determine alkalinity were stabilized directly in 1 mL of the colorimetric reagent that was used for spectrophotometric measurement. A bromophenol blue formic acid reagent was prepared according to Metzger et al. (2013b) following the technique proposed by Sarazin et al. (1999). Standard solutions were made with sodium

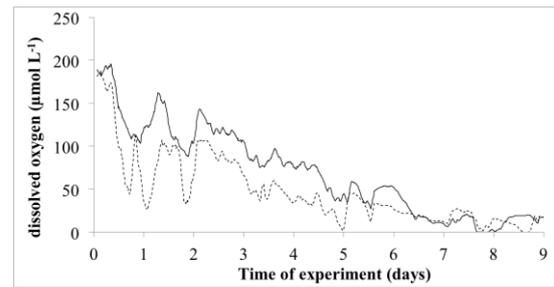


Figure 11 - In situ dissolved oxygen concentration inside EAGU chamber (9 days incubation time). Dashed line: oxygen probe 5 cm above SWI. Full line: oxygen probe 4 mm above SWI. Sulfide was always below detection limit for both probes.

hydrogen carbonate salt. Measurements were done after 1 h of equilibration at a wavelength of 590 nm. Precision was about 0.3 mmol L⁻¹.

4. Results

4.1. Dissolved oxygen and sulfide in the chamber

In situ dissolved oxygen and sulfide concentrations obtained from microsensors are shown in Figure 11. The data logger was started directly after chamber closure and stopped about 9 days later prior to opening the chamber. The data presented in Figure 11 are averaged values for 1-h periods (i.e. average of 6 values taken every 10 min). Oxygen probes, which were located at two different edges of the chamber and positioned at different distances from the SWI (Ox1 at 5 cm and Ox2 at 4 mm), both showed the same trend, with initial values of about 190 µmol L⁻¹ (about 80% oxygen saturation) and with minimal values close to zero reached about 7 days later. Data show a second-order variation with oscillations of variable amplitude, without a clear periodicity. Note that during the first

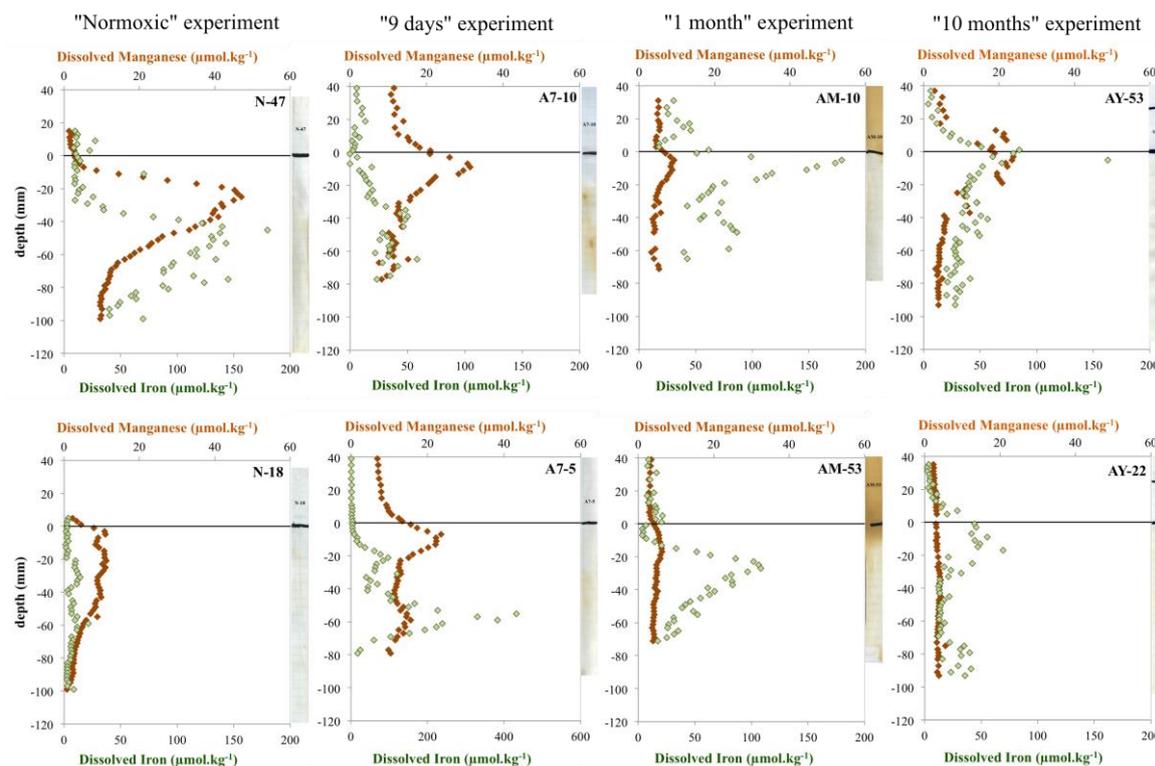


Figure 12 - Pore-water dissolved manganese (orange diamonds) and iron (green diamonds) distribution from DET probes. From left to right: “Normoxic” situation, “9 days” incubation, “1 month” incubation”, “10 months” incubation. White tape sulfide sensor corresponding to the DET probe is shown for each profile.

five days of the experiment, probe 2, situated 4 mm above the SWI (full line on Figure 11), shows a higher oxygen content than the probe located at 5 cm above SWI (dashed line). A linear regression yields an estimated oxygen consumption rate about $10 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. Sulfide concentration for both probes was below detection limit during the whole experiment ($< 0.3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$).

4.2. Dissolved manganese and iron

Figure 12 shows the vertical distribution of Mn(II) and Fe(II) between 4 cm above the SWI and 10 cm depth in the sediment, for four different treatments. From left to right: the profiles from a reference sediment (“Normoxic”) and for the “9 days”, “1 month”

and “10 months” experiments. Results from different probes are shown separately, yielding 8 profiles (2 replicates for each treatment, upper and lower panel). In the “Normoxic” profiles, Mn(II) and Fe(II) show contrasted results between the two replicates. Profiles from DET N47 (upper panel) show large peaks of Mn(II) and Fe(II), while profiles from DET N-18 (lower panel) show smaller variations. Manganese peaks develop from 0 to 6 cm depth with maxima of 47 and $11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, at about 2 cm depth. Iron peaks develop from 2 to 10 cm depth with maxima of 180 and $22 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ at about 4.5 and 6 cm depth, respectively. After 9 days of incubation, the vertical distribution of Mn and Fe is different. Mn profiles show similar

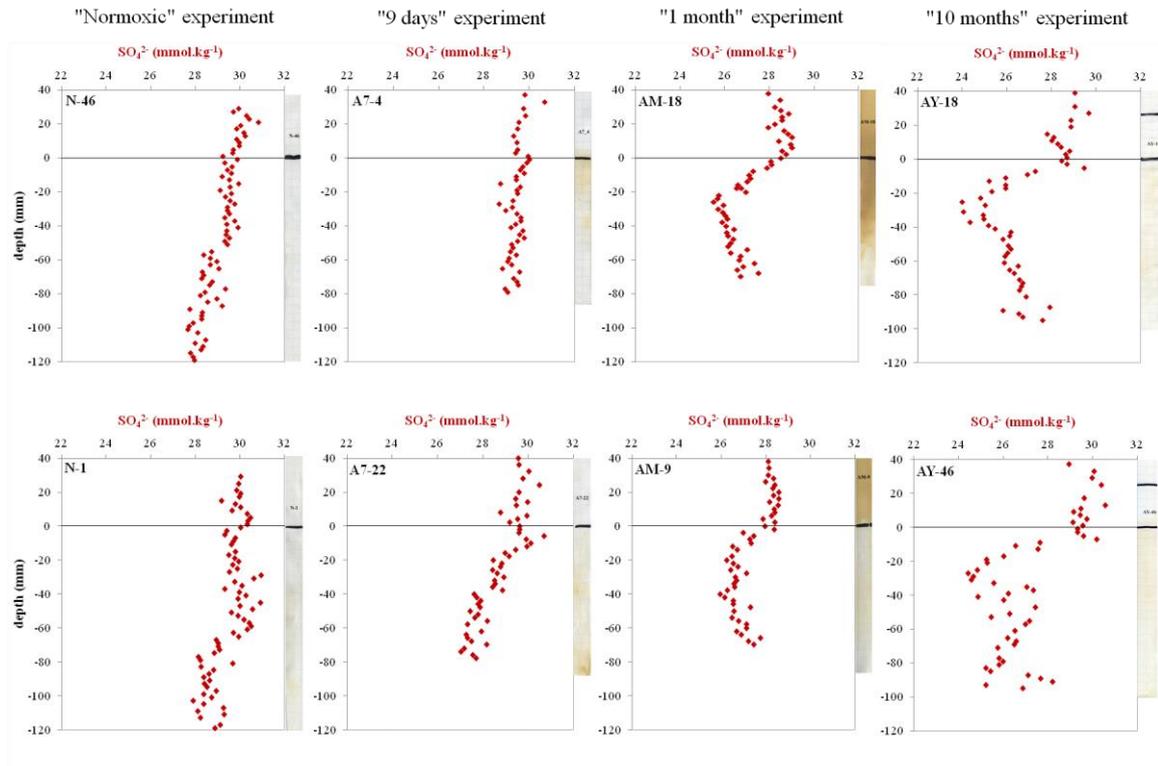


Figure 13 - Normalized dissolved sulfate distribution in pore water from DET probes.

trends for both replicates (A7-10 and A7-5), with elevated values from 2 cm above the SWI to 3 cm below. Maxima occur about 1 cm below the SWI, with values of 31 and 24 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. Iron profiles show peaks developing between 1 and 8 cm below the SWI, with maxima of 58 and 423 $\mu\text{mol L}^{-1}$ at 5.5 and 6.5 cm depth, respectively. At the end of the “9 days” experiment, relatively elevated Mn concentrations are present in the overlying water compared to the “Normoxic” profile (7 to 12 $\mu\text{mol L}^{-1}$ instead of 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$). In the “1 month experiment”, Mn in the overlying waters decreases to about 4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The pore water distribution shows relatively weak maxima compared to the “9 days” experiment (9 and 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ around 1 cm below the SWI for DET AM-10 and AM-53, respectively). Iron peaks have their maxima at 0.5 and 2.5 cm below the SWI, with concen-

trations of about 179 and 108 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. A secondary Fe peak is visible directly above the SWI in both profiles. DET AY-53 from the “10 months experiment” (upper panel) shows concomitant peaks of Mn and Fe, with maximum values at the SWI (23 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Mn and 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for Fe). The second profile, AY-22 (lower panel), shows a fairly constant Mn concentration with low values (around 3 μM), whereas Fe peaks around 1 cm depth with a maximum concentration of 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3. Sulfate

The vertical distribution of sulfate concentrations in the pore waters is presented in Figure 13. “Normoxic” profiles show rather constant values of about 30 mmol L^{-1} down to 5 cm below the SWI. Deeper down, sulfate slightly decreases by about 2 mmol L^{-1} until

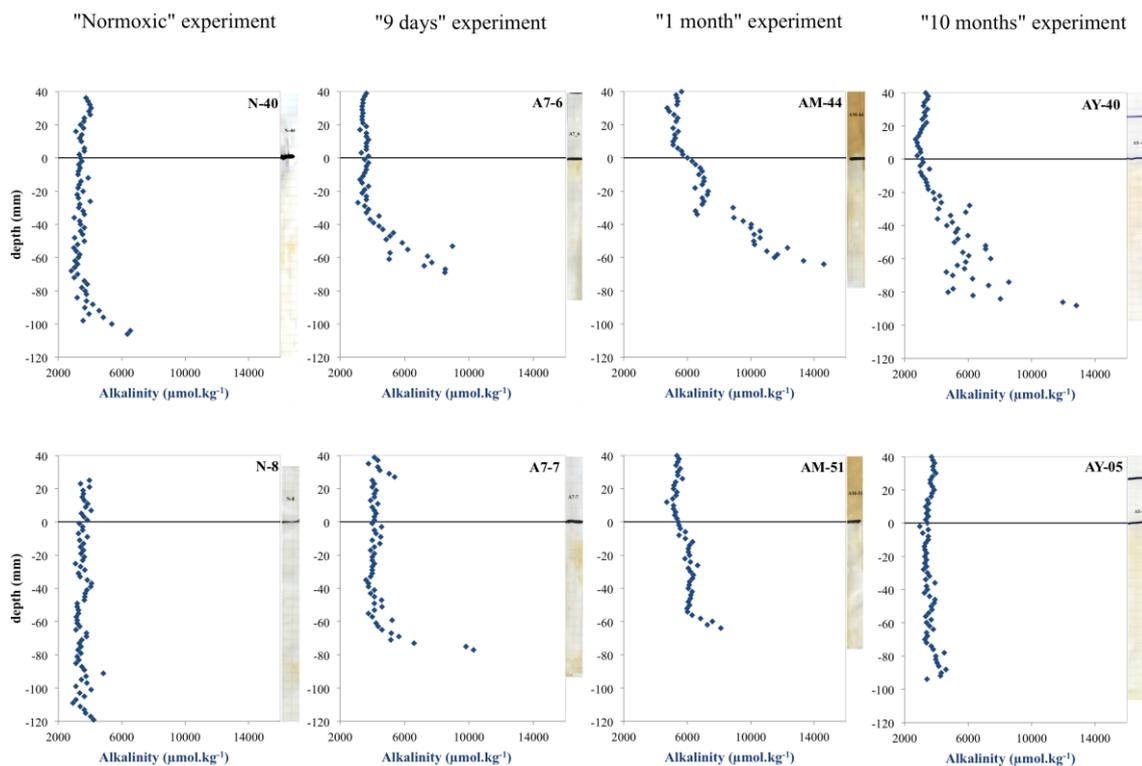


Figure 14 - Pore water alkalinity distribution from DET probes.

the bottom of the profiles (12 cm depth). Spatial variability is apparently higher for the “9 days” DETs. DET A7-22 (lower panel) shows a decrease of sulfate from 1 cm below the interface, whereas no decreasing trend is present in DET A7-4 (upper panel). Minimal $\text{SO}_4(\text{II})$ concentrations are about 29 and 27 mmol L^{-1} for DET AW-4 and AW-22. The “1 month” DETs show lower sulfate concentrations (28-29 mmol L^{-1}) in the overlying water than those described above. Below the SWI, the sulfate concentration decrease is more important than before (about 3 mmol L^{-1}) reaching 26 mmol L^{-1} at 2-cm depth and apparently increases slightly deeper down, to reach 27 mmol L^{-1} at the bottom of the profile (i.e. 6.5-cm depth). The sulfate profiles of the “10 months” experiment are very similar to those of the “1 month” DETs. However, the decrease below the SWI is sharper and

stronger (about 4 mmol L^{-1}). The sulfate gradients below the SWI seem to be sharper and shallower depending on incubation duration.

4.4. Alkalinity

The alkalinity measurements of pore waters from the four experiments are shown in Figure 14. The “Normoxic” profiles suggest little variation of alkalinity in the overlying waters and downwards through the SWI (3.5 mmol L^{-1}). Nonetheless, a downward alkalinity increase is evident in both replicates, starting at 7 cm depth for DET N-40 and 11 cm depth for DET N-8. The two “9 days” DETs show similar profiles with constant values in overlying waters and in the upper part of the sediment (3.5 and 4 mmol L^{-1} for DETs A7-06 and A7-07), and increasing concentrations in the deeper part of the sediment (starting at 4 and 6

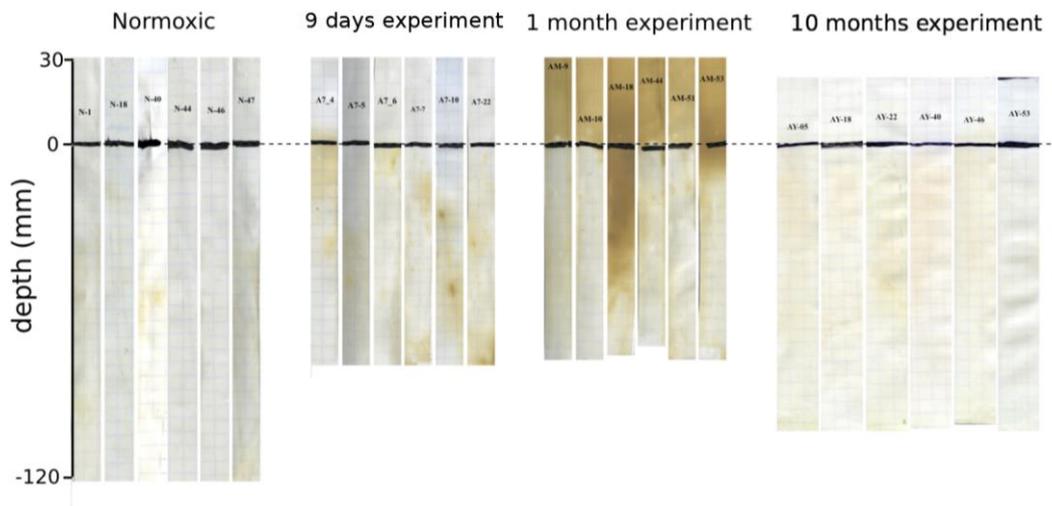


Figure 15 - Dissolved H₂S occurrence during DET deployment as indicated by PVC white tapes (brown coloration).

cm below SWI, respectively). Values reach 8.5 and 11 mmol L⁻¹ in the two replicates. The “1 month” DETs show a relatively large variability between the two replicates. The overlying waters have a higher alkalinity than before (about 5 mmol L⁻¹ instead of 3.5-4 mmol L⁻¹ in “Normoxic” and “9 days” chambers). From 1 cm above the SWI to the first cm below, alkalinity increases slightly to 7 and 6 mmol L⁻¹ for DETs AM-44 and AM-51. Values remain more or less constant downward until a rapid increase starting at 3.5 and 5.5-cm depth, respectively. Alkalinity reaches respectively 14 and 8 mmol L⁻¹ at 7-cm depth. The “10 months” profiles show contrasting patterns between the two replicates. DET AY-40 (upper panel) shows an alkalinity increase with depth starting 2 cm below the SWI, peaking at 13 mmol L⁻¹. Conversely, DET AY-05 shows little variation with depth and values fluctuate only within a range of 1 mmol L⁻¹. The overlying waters of both replicates show alkalinity concentrations of about

3.5 mmol L⁻¹, comparable to the “Normoxic” values.

4.5. H₂S-sensitive white tape coloration

Figure 15 shows the collection of the originally white PVC tapes used for each different DET probe at each experiment (6 DET x 4 experiments). The tapes are shown together with the respective pore water profiles to facilitate discussion. After retrieval, the tapes were glued in a notebook with squares of half-centimeter height (visible in the Figure). The “Normoxic” tapes are predominantly white below the SWI. The “9 days” tapes show dispersed brownish areas within the sediment, indicating the release of H₂S into the pore waters. The “1 month” tapes show much more continuous dark-brown zones below the SWI, but the pore water variability seems to be very high. Contrary to the previous experiments, the “1 month” tapes show also a very dark coloration above the SWI. Finally, the “10

months” tapes are mostly whitish, comparable to the “Normoxic” tapes.

Tableau 4 - Oxygen uptake estimated from previous studies in the Northern Adriatic and corresponding organic carbon percentage when available

reference	mmol/m ² /d	OC (%)
This study	-9.93	0.7
Riedel et al.,2008	-77.17	--
Stachowitch et al., 2007	-40 to -80	--
Epping et al., 1997	-3 to -30	0.3 to 1.7
Bertuzzi et al., 1996	-5 to -30	0.5 to 1.8

5. Discussion

5.1. Sedimentary geochemistry under summer “Normoxic” conditions

According to oxygen electrode profiles measured in the “9 days” chamber (Figure 11), the oxygen consumption rate in our study site is about 10 mmol.m⁻².d⁻¹ (Tableau 4). This rate corresponds in the Adriatic to an oxygen penetration depth of about 5 mm (Epping et Helder, 1997). Manganese profiles from the “Normoxic” DETs show a gradient across the SWI, indicating that Mn(II) diffuses upward towards the SWI and the overlying waters and is oxidized there. Reduced iron, however, remains confined within the sediment as suggested by the deep location of iron peaks in Figure 12 (from 2 to 10 cm depth). These results suggest that there is little chance for Fe(II) to react directly with free oxygen because its penetration would not exceed a few millimeters. Therefore, iron oxidation, which under “Normoxic” conditions takes place in deeper sediment layers, is probably due to other oxidants such as manganese oxides or nitrate (measured in the pore waters by Koron

et al., 2013). An earlier study investigated the seasonal evolution of metabolic pathways of mineralization processes in the same area (Hines et al., 1997). In September 1993, when bottom waters were hypoxic and the water column was stratified, Hines and coworkers demonstrated that anaerobic mineralization processes were as important as aerobic processes. They suggested that considerable benthic oxygen consumption was due to the upward diffusion of reduced components such as Mn(II) and Fe(II) towards the water column. They were, however, unable to observe the efflux of reduced metals at the centimeter resolution they used. The present study improved the vertical resolution of profiles. Despite considerable lateral heterogeneity, it provides evidence of Mn(II) diffusion towards the bottom water even while the water column was well oxygenated. In the next section we discuss the further evolution of manganese and iron mobility during anoxia in order to verify the hypothesis of Hines and co-workers (1997) that manganese and iron are important consumers of oxygen during strong hypoxia and/or anoxia. Sulfate concentrations (Figure 13) decrease below 5-cm depth, showing very slight gradients (at most ≤10% of sulfate consumed 12 cm below the SWI). The white tapes were very slightly discolored only in scattered zones within the sediment. In other shallow-water environments these qualitative probes turned dark grey/brown when sulfide concentrations reached millimolar amounts, a few centimeters below SWI (e.g. Thau lagoon, Jézéquel et al., 2007; Metzger et al.,

2013b; Arcachon Basin, Metzger, unpublished data).

The “Normoxic” samples were taken in early August 2010, when temperature was lower than the monthly average. In this area, marine snow events are common, occurring almost every summer (Malej, 1995). In 2010, marine snow first developed in late August, suggesting that the sediment at the sampling station was not yet under “late summer conditions”, characterized by considerable input of fresh organic material. During our experiment we estimated an oxygen uptake of about $10 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{d}^{-1}$. This value is very low compared to those obtained at other sites for the same season. A previous study in the Gulf of Trieste showed a summer oxygen uptake approaching $30 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (Bertuzzi et al., 1996). This large difference can be explained by the fact that the sediment at their station had much higher organic carbon content (1.7% at the surface) than our sites (0.65 %, Koron et al., 2013; Hines et al., 1997). After a marine snow deposit, oxygen consumption rates should be higher, although no measurements are available for our study area. The time needed to completely consume all oxygen in the benthic chamber (7 days, Figure 11) in our “9 days” experiment is very long compared to previous observations with the same device in the same period of the year (Stachowitsch et al., 2007; Riedel et al., 2008). In those experiments, respiration of the enclosed macrofauna led to a rapid oxygen decrease in the chamber (i.e. anoxia after maximum 4 days), with calculated oxygen uptake varying from 40 to $80 \text{ mmol m}^{-2} \text{ d}^{-1}$

(Tableau 4). Those studies also showed sulfide production less than one day after oxygen depletion. This indicates a rapid total consumption of all oxidants other than sulfate (e.g., nitrate, Mn and Fe oxides) in the surface sediment and the water column, which did not occur in our experiment.

The main difference between the present experiment and all previous ones is that the latter were conducted over macro-/megafaunal multi-species slumps, whereas for the present experiment, areas without visible macrofauna were selected. In our opinion, the large differences in oxygen consumption and the time needed to reach total anoxia mainly reflect the highly contrasting respiration by and decay of macrofauna.

In summary, in our “Normoxia” sediments, diagenetic processes are not very intense for summer conditions in a coastal area of the supposedly eutrophic Northern Adriatic. Sulfate reduction rates reported by Hines et al. (1997) were lower at our study station than at their station in the Bay of Piran located a few kilometers southeast of the buoy (our station) and closer to shore (Hines et al., 1997). This may reflect a larger sediment grain size and a lower organic carbon content at our station. Note, however, that those authors showed that, in late summer (September 1993), when the water column was stratified and oxygen saturation at the bottom was 45%, sulfate reduction rates near the buoy increased from about zero to $300 \text{ nmol cm}^{-3} \text{ d}^{-1}$ in the top sediment layer. In our “9 days” experiment, the oxygen concentration at the sea floor was

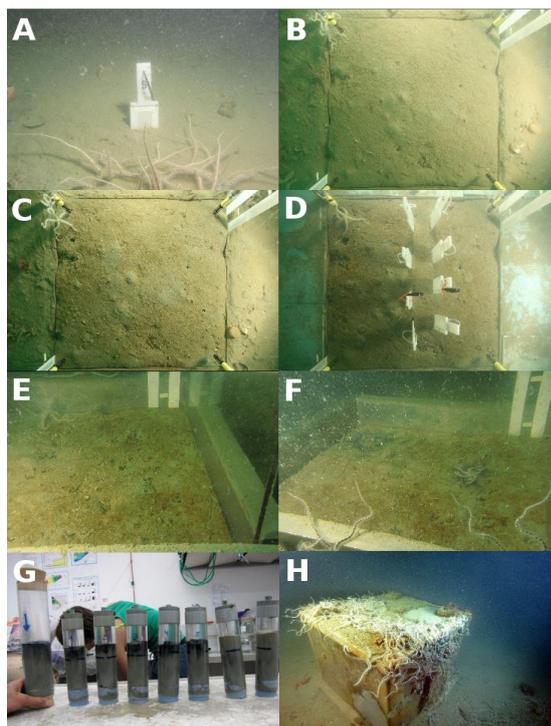


Figure 16 - A: “Normoxic” DET probe on seabed. **B:** “9 days” chamber (EAGU) directly after chamber closure. **C:** “9 days” chamber after 8 days. **D:** “9 days” chamber directly before opening of chamber. **E:** “1 month” chamber on 10 August. **F:** “1 month” chamber on 17 August. **G:** 6 cores on the left sampled inside the “1 month” chamber. 2 cores on the right sampled outside the “1 month” chamber. **H:** photo of “10 months” chamber 1 month before opening (photo: T. Makovec).

about $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, corresponding to a saturation rate of about 80 %; this suggests very low sulfate reduction rates, especially near the SWI.

5.2. Vertical redox fluctuations versus lateral heterogeneity

Previous EAGU deployments in the near-shore area off Piran by Stachowitch and co-workers showed a typical pattern of oxygen and sulfide concentrations within the chamber. After closure, oxygen was quickly depleted and sulfide began to accumulate (see above). Also, laboratory experiments using

cores sampled in other environments showed a clear relationship between oxygen concentration in the bottom waters and sediment to water-column fluxes of Mn(II), Fe(II) and S(-II) (Kristiansen et al., 2002; Sell et Morse, 2006). The kinetics experiment performed by Kristiansen and co-workers clearly showed that reduced compounds accumulated more in the overlying water during more severe hypoxia. They showed that long-term reductive dissolution of manganese and iron (oxyhydr)oxides under hypoxic conditions ultimately leads to their exhaustion, allowing the upward diffusion of sulfides and their flux into the overlying waters. Therefore, a temporal succession in the release of Mn(II), Fe(II) and S(-II) is generally interpreted as an upward migration of redox layers after exhaustion of all free oxygen and other possible oxidants (Balzer, 1982; Sundby et al., 1986; Aller, 1994b; Skoog et Arias-Esquivel, 2009). Following this conceptual model, we expected that, after total oxygen consumption in the EAGU chambers, a flux of Mn(II) and Fe(II) into the chamber would occur due to the upward migration of redox fronts. After approximately three days, metallic oxides should have been consumed and S(-II) should start diffusing into the chamber as it has occurred in previous EAGU experiments. Considering the Mn(II), Fe(II), $\text{SO}_4(-\text{II})$ and alkalinity profiles (Figure 13 to Figure 15), our data set supports this model. Manganese maxima occur 2 cm below SWI in the “Normoxic” profiles and shift upwards to 1 cm below SWI after 9 days (“1 week” profiles). After “1 month”, the position of the Mn(II) maxima

does not change, but their intensity decreases from about $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ to less than $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, strongly suggesting that sediment Mn-oxides become exhausted due to bacterial reduction. After “10 months”, the two profiles contrasted: one is nearly straight, suggesting that all solid manganese oxides have been consumed, whereas the second profile still shows a maximum of about $60 \mu\text{mol L}^{-1}$ near the SWI. This important difference points to considerable lateral heterogeneity within the sediment of our chambers, complicating the interpretation of the temporal trends. Nonetheless, despite this spatial heterogeneity, the overall upward shift of manganese redox front during the experiment is evident.

Reduced iron profiles show a more complex picture, with some profiles showing a double peak indicating a more complex sedimentological history. For instance, double Fe(II) peaks may occur after rapid sediment deposits burying a surficial sediment enriched in metal oxides (Deflandre et al., 2002). In our data, Fe(II) maxima are located 6 cm below SWI after 9 days and have migrated to the SWI in one of the “1 month” profiles. Evidence of iron diffusion into the chamber is given by the progressive orange coloration of the seabed (Figure 16, photos A to F), which indicates reoxidation of upwardly diffusing Fe(II) by oxidants such as oxygen or nitrate.

Sulfate profiles point to sulfate reduction below 6-cm depth in the “Normoxic” profiles. After “9 days”, $\text{SO}_4(-\text{II})$ reduction appears to occur only a few millimeters below the SWI. In the following weeks, the sulfate gradient

becomes steeper, with a decrease of about 3 and 5 mmol L^{-1} in the first 2 cm in the “1 month” and “10 months” profiles respectively. The sulfide probes (white tapes; Figure 15) show a very large spatial variability of the free sulfide distribution in the benthic chambers, confirming the considerable heterogeneity of the sediment. In fact, the DET probes point to minimal concentrations of free sulfide within the sediment: only a few DETs show brown-grey patches.

Summarizing, our data set strongly suggests that the successive redox layers, which can be interpreted as microhabitats for infaunal meiofauna communities (Jorissen, 1999a), shifted upwards during the experiment. Nonetheless, this upward shift was slower than expected because no S(-II) release was observed during the 9 first days of the experiment, unlike previous studies in the area using the same analytical approach (Stachowitsch et al., 2007; Riedel et al., 2008, 2012). These results support the model of successive release of reduced compounds towards the water column under anoxic conditions (Balzer, 1982; Sundby et al., 1986; Aller, 1994a; Skoog et al., 2009), and underline the importance of manganese recycling under anoxic conditions in different coastal settings.

The upward shift of redox layer documented here seems to have constrained the temporal evolution of the macro- and meiofauna. Copepods drastically decreased with anoxia duration: no living individuals were found after one month (Grego et al., 2014). The foraminifera, however, retained high densities throughout the experiment (Langlet et al.,

2013b), underlining that copepods were more sensitive to redox conditions than foraminifera. The foraminiferal abundance of the first half centimeter was affected by anoxia while the deeper microhabitats did not change over-time suggesting that shifts of redox zonation did not affect infaunal organisms. The next section gives an explanation of what controlled foraminifera dynamics as discussed in detail in Langlet et al. 2013a and b.

5.3. Unexpected sulfide feature

Surprisingly, the overlying waters show a different pattern for free sulfide (S(-II)) from what we expected (i.e. an increasing efflux of sulfide from the sediment during anoxia). Although most chambers show no S(-II) in the overlying waters, the tapes on all the DETs deployed in the “1 month” chamber were intensely discolored above the SWI; this strongly contrasts with the absence of S(-II) in the sediment of four of the DET probes. Only two of the DETs demonstrate sulfide penetration into the sediment, about 2 cm in DET AM-53, and about 5 cm in DET AM18. This contrast between sulfide-rich overlying waters and sulfide-poor sediment strongly suggests that FeS precipitation limits S(-II) accumulation and therefore that deep sediment is not a source of sulfides(-II), as indicated by the Kristiansen model and other studies on seasonally anoxic basins (Brüchert et al., 2003; Metzger et al., 2013b). Rather, S(-II) is produced at the SWI or slightly above. Figure 16F shows the black coloration produced by the decomposition of several brittle stars after 3 weeks of incubation. These were introduced

in the chambers at the beginning of the experiment as “visible anoxia probes” because most chambers were not equipped with sensors. We consider the presence of this introduced epifauna to have had a negligible influence on the sedimentary processes because its biomass is small (particularly compared with the infauna). These individuals represent a minimum contribution of the otherwise dominant macroepifauna (which we rigorously avoided when positioning our chambers in order to focus on developments within the sediment. Importantly, the presence (and decomposition) of a full macroepifauna in “natural” anoxia events supports and strengthens our interpretations about the influence of decaying organic material on the sediment surface. Figure 16G shows that all cores sampled in the “1 month” chamber had a very dark layer at the SWI, versus the homogeneous grey coloration in cores taken outside the chamber. These macroscopic observations strongly suggest that the decomposition of infaunal macroorganisms has generated a thin layer of dark sediment at the SWI probably rich of iron sulfide precipitates. The visual analysis of time-lapse photographs taken with the EAGU indicates that, during the first week of the experiment, brittle stars were still alive; they tiptoed (“arm-tipping”) in order to raise their respiratory organs higher in the progressively oxygen-depleted overlying waters, as shown in previous studies (Riedel et al., 2012, 2013). After a few days of incubation (while oxygen decreased), infaunal organisms migrated to the sediment surface and died in the absence of O(-II) at the SWI. The organic-carbon (OC)

content in the “1 Month” cores showed no clear vertical trend and no significantly higher contents that would suggest any organic-matter supply due to macrofaunal mortality (Koron et al., 2013). Since the OC content of the sediment is controlled by the balance between input and mineralization processes, the absence of a clear Corg signal does not mean there is no Corg input; it can suggest a rapid remineralization of dead organisms. The presence of S(-II) in the overlying waters, accompanied by the presence of a very dark layer at the SWI around the remains of dead organisms, is probably due to the decomposition of these organisms mainly by sulfate-reducing bacteria. In fact, during hypoxic events, Hines et al. (1997) observed maximum sulfate reduction rates in the top of their sediment cores, corroborating our hypothesis. Because macrofaunal remains are mainly decomposed on top of the sediment, produced S(-II) can diffuse into the overlying waters without being oxidized by sedimentary metal oxides. This would explain the intense brown coloration of the white tapes above the SWI (Figure 15). Accordingly, the sediment column acts as a sink rather than a source for S(-II) formed at the SWI, as indicated by the brownish color of the upper part of the PVC tapes of two of the DETs. The deep penetration of sulfide in two of the profiles could be explained by the presence of relict burrows. For DET AM-53, such a burrow could explain why no dissolved iron was measured in pore waters shallower than that depth, whereas the maximum concentration occurred at the SWI for the other replicate (AM-10).

Importantly, after prolonged anoxia this source of S(-II) at the SWI disappears: no S(-II) was observed in the “10 months” probes. Note here that DET probes were inserted immediately before opening the chambers and are representative of chemical conditions within the chamber at the end of the incubation. Between 1 month and 10 months of incubation, all produced S(-II) apparently diffuses into the sediment and disappears by precipitation together with reduced iron and manganese, or is oxidized by the iron and manganese (oxyhydr)oxides from the sedimentary lattice. Within the sediment, sulfate reduction continues, but the produced S(-II) is never detected (i.e. no discolored PVC tapes). Accordingly, sandy sediment apparently behaves as an auto depurative system where metallic (oxyhydr)oxides limit the residence time of S(-II) within the sediment and in overlying waters. Indeed, the iron concentration within the sediment is about $350 \mu\text{mol g}^{-1}$ at the surface and a few decimeters below (Hines et al., 1997). This stock of iron is mainly coated onto the surface of silicates as Fe_2O (Arçon et al., 1999) and constitutes a large reservoir of reducible iron. Langlet et al. (2013b) reported that foraminifera survived 10 months of anoxia. An abundant literature has reported foraminiferal survival under anoxic conditions, but this is the first time that in situ long-term experiments were conducted. Langlet et al. (2013b) suggest that the additional input of Corg at one month led to an increase of top layer foraminiferal density. S(-II) is a toxin that, even at micromolar concentrations, impairs biological processes neces-

sary for organisms' metabolism meaning that the sulfate/sulfide redox layer act as a bottom barrier for infaunal foraminifera microhabitats (Bagarinao, 1992; Moodley et al., 1998a; Giere, 2008). Nonetheless, it seems that the control of pore water S(-II) content by the (oxyhydr)oxides of the sedimentary lattice prevented foraminifera to be poisoned and was, in consequence, a key parameter enabling long-term survival of benthic foraminifera under anoxia.

5.4. Representativeness of the in situ experiments

Do our long-term (up to 10 months) in situ closed benthic chambers realistically show how anoxia impacts the physic-chemical conditions of the bottom waters and the superficial sediment layers, as well as the response of the living organisms? The lack of bottom water renewal (ventilation) is a key factor leading to hypoxia in bottom waters (Middelburg et Levin, 2009). In “natural” anoxia, considerable organic-matter input to the sediment – due to strong primary production and high phytoplankton mortality – increases the sedimentary oxygen demand. This, in turn, triggers anoxic events, leading to mass-mortality events, causing an even higher oxygen demand (Stachowitsch, 1984, 1991; Deslous-Paoli et al., 1998; Souchu et al., 1998). Our experimental design does mimic the stratification-related blockage of bottom-water ventilation and organic and mineral input into the sediment. It does not, however, mimic mixing in the sub-pycnocline layer, although

bi-directional (tidal) and circular bottom water currents during “natural” anoxia would be expected to have a homogenizing effect rather than in themselves governing benthic processes. Another potential bias is the entrapment of organisms, since some might be able to migrate to less hostile environments. We can exclude this as a substantial issue because we deployed our chambers on sediment without visible macroepifauna. Moreover, successful longer-distance migration or escape of such epifauna and infauna is unlikely in anoxia events extending across hundreds to thousands of square kilometers. Despite the inherent problems in extrapolating from the small to the large scale, our system successively: (1) stopped water exchange (2) led to a total benthic oxygen consumption and a concomitant upward migration of redox zones (3) induced mortality of the macroinfauna, and (4) produced significant amounts of S(-II) at the sediment-water interface due to the anaerobic decomposition of the freshly emerged organisms. Summarizing, our experimental setup, despite certain constraints, satisfactorily mimicked the course of events in the natural ecosystem. The setup also provided new results that indicate the prominent role of benthic biomass and the sedimentary content of metallic (oxyhydr)oxides in controlling S(-II) residence time in 1) the pore waters which probably allowed meiofauna long-term survival and, more important regarding epifauna survival, in 2) the anoxic water column of sandy coastal settings. Our results showed that if a setting is cut off from organic carbon sources, which is the case if a basin becomes totally

anoxic, sulfidic conditions cannot last for long. This information is relevant for future anoxia modeling approaches and helps deepen our understanding of anoxic (paleo-) events.

6. Conclusions

The long-term incubation experiment conducted on the silty sand sediment in the Northern Adriatic Sea near Piran enabled us to document, under realistic in situ conditions, how prolonged anoxia changes the geochemistry of the pore waters of the superficial sediment and the overlying bottom waters. Despite the apparent upward migration of several redox species (Fe(II), Mn(II), SO₄(-II)), there is no obvious release of sulfide from the sediment into the overlying waters. On the contrary, sulfides are apparently produced at the sediment-water interface, after the death and subsequent anaerobic degradation of macrofaunal organisms. Our experiment shows that, despite an important sulfide release to the water column (i.e. saturation of H₂S sensors above the SWI), its residence time within the chamber is limited due to iron present either as oxide minerals that oxidize sulfide or as dissolved reduced components that react as precipitates. This suggests that sandy sediments can act as efficient sinks for sulfide during anoxia events.

7. Acknowledgements

We would like to thank the director and staff of the Marine Biology Station in Piran for their support during this project. Alexan-

dra Haselmair and Ivo Gallmetzer provided considerable support (diving and otherwise) during the fieldwork and took several sets of photographs for the longer-term aspect. Nadège Blon provided access to the ionic chromatograph from the Department of Chemistry of the University of Angers and provided technical assistance in analyses. In addition, we would like to thank Peter Kraal and the anonymous referees for their help in improving this manuscript. The present study was financed by the Austrian Science Fund (FWF; project P21542-B17) and supported by the OEAD Bilateral French Austrian Scientific Technical Cooperation project FR 13/2011.

Partie II. Foraminiferal survival after long-term in situ experimentally induced anoxia

D. Langlet¹, E. Geslin¹, C. Baal², E. Metzger¹, F. Lejzerowicz³, B. Riedel⁴, M. Zuschin², J. Pawlowski³, M. Stachowitsch⁴ and F.J. Jorissen¹

[1]{LUNAM Université, Université d'Angers, UMR CNRS 6112 LPGN-BIAF - Laboratoire des Bio-Indicateurs Actuels et Fossiles, 2 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex, France}

[2]{University of Vienna, Department of Paleontology, Althanstrasse 14, 1090, Vienna, Austria}

[3]{University of Geneva, Department of Genetics and Evolution, CH 1211 Genève 4, Switzerland}

[4]{University of Vienna, Department of Limnology and Oceanography, Althanstrasse 14, 1090, Vienna, Austria}

Correspondence to: D. Langlet (dewi.langlet@univ-angers.fr)

1. Abstract

Anoxia was successfully induced in four benthic chambers installed at 24-m depth on the Northern Adriatic seafloor from 9 days to 10 months. To accurately determine whether benthic foraminifera can survive experimentally induced prolonged anoxia, the CellTracker™ Green method was applied and calcareous and agglutinated foraminifera were analyzed. Numerous individuals were found living at all sampling times and at all sampling depths (to 5 cm), supported by a Ribosomal RNA analysis that revealed that certain benthic foraminifera were active after 10 months of anoxia. The results show that benthic foraminifera can survive up to 10 months of anoxia with co-occurring hydrogen sulphides. However, foraminiferal standing stocks decrease with sampling time in an ir-

regular manner. A large difference in standing stock between two cores sampled under initial conditions indicates the presence of a large spatial heterogeneity of the foraminiferal faunas. An unexpected increase in standing stocks after 1 month is tentatively interpreted as a reaction to increased food availability due to the massive mortality of infaunal macrofaunal organisms. After this, standing stocks decrease again in cores sampled after 2 months anoxia, to then attain a minimum in the cores sampled after 10 months. We speculate that the trend of overall decrease of standing stocks is not due to the adverse effects of anoxia and hydrogen sulphides, but rather due to a continuous diminution of labile organic matter.

(keywords: Northern Adriatic Sea; anoxia; in situ experiment; benthic foraminifera; survival)

2. Introduction

Over the last decade numerous marine environments have been affected by hypoxia (Diaz et Rosenberg, 2008). The increase in the frequency of occurrence of hypoxia and the spatial distribution of such oxygen-depleted areas are assumed to be linked to eutrophication and climate change (Stramma et al., 2008; Rabalais et al., 2010). Hypoxia can dramatically affect pelagic and benthic biodiversity (Levin, 2003; Gooday et al., 2009; Stramma et al., 2010). The mechanisms leading to low-oxygen conditions differ between the open ocean and coastal enclosed basins. In many oceanic upwelling areas, hypoxia is permanent and the dissolved oxygen concentration remains below 0.5 mL/L (20 μ M, Helly and Levin, 2004; Middelburg and Levin, 2009). Hypoxia is caused by a combination of high pelagic productivity and slow renewal of oxygen in the water column. In most semi-enclosed coastal areas, hypoxia is related to continental inputs (of nutrients and organic matter) and seasonal water-column stratification. Pelagic production is a response to natural and/or anthropogenic nutrient input, and hypoxia is mainly caused by benthic oxygen consumption. In such coastal environments hypoxia appears seasonally.

Generally, bottom-water oxygen concentrations are strongly linked to several other environmental parameters. Increased organic matter supplies stimulate benthic production, leading to an increased sediment oxygen demand and, finally, to lowered bottom water oxygenation. In extreme cases, when the sea-

floor becomes anoxic, organic-matter degradation continues via anaerobic metabolic pathways, eventually leading to sulphate reduction near the sediment-water interface (Middelburg et Levin, 2009). In such conditions toxic hydrogen sulphide may diffuse into the bottom water.

Various terminologies have been proposed to describe the intensity of hypoxia, mainly based on the effect of oxygen concentration on marine biota (reviewed in Hofmann et al., 2011; Altenbach et al., 2012). For the purpose of the present study we will use only three terms defined as follows (Tyson and Pearson, 1991; Bernhard and Sen Gupta, 1999; Middelburg and Levin, 2009): 1) oxic – the measured oxygen concentration above 1.5 mL/L ($>63 \mu$ M); 2) hypoxic – concentration below 1.5mL/L ($<63 \mu$ M), which is the threshold at which an impact has been recorded on coastal metazoan biota, and 3) anoxic – no detectable dissolved oxygen present.

In the past, several field and laboratory studies have been conducted to better understand the response of benthic faunas to hypoxia (i.e., to low oxygen concentration and its co-occurring processes such as high organic matter availability and increased hydrogen sulphide concentration) in coastal environments. These studies demonstrate that for macrofauna (invertebrates larger than 1mm) the first responses to low oxygenation are usually behavioral or physiological changes (e.g., body extension, shallowing of burial depth, emergence from the sediment; see Levin et al., 2009) for a review), and the organisms exhibit a high mortality after only 2 to 7 days of an-

oxia (Riedel et al., 2008; Stachowitsch et al., 2012). Within the meiofauna (invertebrates measuring 45 μm to 1 mm), copepods are among the taxa most sensitive to anoxia (Moodley et al., 1997; Diaz et Rosenberg, 2008), whereas several nematode species can survive up to 60 days of anoxia (Wieser et Kanwisher, 1961). Benthic foraminifera appear to be more tolerant to anoxia than most meiofaunal metazoans (Josefson et Widbom, 1988; Moodley et al., 1997; Levin et al., 2009).

In field studies, the foraminiferal density tend to decrease during anoxic and/or hypoxic events (Jorissen et al., 1992; Duijnsteet et al., 2004) and infaunal taxa migrate upward in hypoxic conditions (Alve et Bernhard, 1995; Duijnsteet et al., 2003). In the diatomaceous mud belt off Namibia, *Virgulinitella fragilis* appear to be the only foraminiferal species that can survive anoxic and sulphidic conditions (Leiter et Altenbach, 2010). Laboratory studies show that foraminiferal assemblages can survive up to 78 days of anoxia (Moodley et al., 1997). Conversely, benthic foraminiferal densities respond positively to increased input of fresh organic matter if it is not accompanied by oxygen depletion (Heinz et al., 2001; Ernst and van der Zwaan, 2004; Ernst et al., 2005; Nomaki et al., 2005). Some evidence suggests that an exposure to hydrogen sulphide for up to 21 days does not significantly affect foraminiferal density, and that after 66 days of exposure some individuals were still found alive (Moodley et al., 1998b).

Most previous studies were based on the analysis of foraminiferal assemblages stained

by Rose Bengal. Rose Bengal is a bulk-stain which adheres to the proteins present in the protoplasm (Walton, 1952; Bernhard, 2000). However, protoplasm may be preserved in the foraminiferal shell several days to weeks after the death of the organism in well-oxygenated conditions (Boltovskoy et Lena, 1970; Bernhard, 1988; Murray et Bowser, 2000) and up to three months in anoxia (Hannah et Rogerson, 1997), leading to the staining of dead organisms. The expectation is that protoplasm degradation is especially slow in anoxic conditions (Burdige, 2006; Glud, 2008). Consequently, using Rose Bengal can lead to substantial overestimation of the living foraminiferal standing stocks, and probably does not reliably reflect the living faunas in low-oxygen settings. Although Rose Bengal staining may yield a rapid overview of living faunas in distributional studies, it is unsatisfactory for studies with a high temporal resolution, where the time between successive samplings may be shorter than the time needed for degradation of the foraminiferal protoplasm. Several techniques have recently been developed to more accurately identify the vitality of benthic foraminifera (reviewed in Bernhard, 2000). As noted above, proteins can still be present after the organism has died and all energetic and enzymatic activities have stopped. These activities are the basis for more accurate foraminiferal vitality discrimination techniques. For instance, based on an Adenosine TriPhosphate (ATP) concentration, an absence of living individuals was determined in the Santa Barbara Basin after a 10-month anoxic period (Bernhard et Reimers,

1991). A laboratory experiment using the ATP concentration method determined, in four species from a shallow site (45 m) in Drammensfjord (Norway), that all these species survived up to three weeks of anoxia. Three species, however, showed a lower ATP concentration in anoxic conditions (Bernhard et Alve, 1996). A recent laboratory experiment (Piña-Ochoa et al., 2010b) using the enzymatic activity sensor Fluorescein DiAcetate (FDA; Bernhard et al., 1995) showed that the deep infaunal species *Globobulimina turgida* can survive anoxia (with presence of nitrate) for up to 84 days (with a survival rate of 46%). A subsequent study, using the same method, demonstrated that the individuals do not migrate vertically during anoxia (Koho et al., 2011). CellTracker Green™ (CTG; Bernhard et al., 2006), another enzymatic activity probe, has been used to determine that Adriatic Sea foraminiferal assemblages can survive up to 69 days of hypoxia and that their vertical migrational behavior is largely linked to the labile organic matter availability (Pucci et al., 2009). Finally, it has been shown recently that the active status of foraminifera can be confirmed by sequencing a taxonomic marker extracted from the sediment metatranscriptome (Lejzerowicz et al., 2013).

Summarizing, previous laboratory and field studies suggest that foraminifera can survive strong hypoxia and anoxia for prolonged periods, in most cases without a clear decrease in population density. Many of these studies, however, are based on the problematic Rose Bengal staining method, which may substantially overestimate the number of living indi-

viduals or even indicate “living” faunas where none are present, especially in anoxic conditions. This calls for testing the resistance of shallow-water foraminifera to anoxia with a more reliable vitality determination technique. Additionally, until now the foraminiferal response to strong hypoxia and/or anoxia has mainly been assessed by laboratory experiments and by ecological field studies lasting up to 3 months, but never (to our knowledge) by an in situ experiment during 10 months. The current paper applies such a long-term in situ experimental approach to document the foraminiferal response to anoxia, using the CTG technique. Our experimental setup was designed to address several complementary aspects of the benthic ecosystem:

In order to ensure long-term anoxia (up to ~10 months), several benthic chambers were positioned on the sea floor for different periods of time. After closure of the chambers, the respiration of the benthic organisms rapidly consumed all available oxygen, leading to anoxia. In order to quantify these processes, the chemical characteristics of the sediment and the overlying waters were monitored (Koron et al., 2013; Metzger et al., 2013a).

An in situ experimental approach has the advantage of considerably reducing “laboratory effects” due to differences between experimental and natural conditions, and of reducing the natural temporal variability (in temperature, salinity, water transparency, food availability...) that can affect faunas in field studies.

Our experimental set-up allows us to apply the same method on different faunal elements.

It has been successfully used to study the effect of anoxia on macrofauna (Riedel et al., 2008, 2012, 2013; Stachowitsch et al., 2012; Blasnig et al., 2013), on different meiofaunal groups such as copepods, nematodes (De Troch et al., 2013; Grego et al., 2013) and foraminifera (this study and Langlet et al., 2013a).

Our study was conducted in the Northern Adriatic Sea, which is a typical coastal area impacted by seasonal hypoxia/anoxia. It combines many aspects commonly associated with low oxygenation events: a semi-enclosed, shallow (<50 m) basin with a fine-grained substrate, a high riverine input, high productivity (leading to “marine snow” events), and long water residence times in summer/autumn (Ott, 1992). Several studies have reported the occurrence of bottom-water hypoxia and anoxia here (Giani et al., 2012), with an increasing frequency from the 1970s to the mid-1990s. It appears that the frequency of marked hypoxia has decreased since the mid-1990s (Giani et al., 2012), likely due to a reduction of anthropogenic nutrient supplies and a reduced riverine nutrient input into the Northern Adriatic Sea.

In this context, we investigate the responses of the foraminiferal faunas to experimentally induced anoxia in benthic chambers. The present paper focuses on the foraminiferal survival and density response to long-term anox-

ia. Our main question was whether benthic foraminifera can survive 10 months of anoxia. In case of a positive answer, our goal was to determine how the density varies as a function of the duration of anoxia. Finally, we studied the variation of density in the upper 5 cm of the sediment in order to identify potential vertical migration of the foraminiferal faunas in response to experimental conditions. The response of individual species to anoxia is treated in a second paper (Langlet et al., 2013a).

3. Material and methods

3.1. Experimental set-up and sampling

The experiment was conducted in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea) near the oceanographic buoy of the Marine Biology Station Piran (45° 32.90’N, 13°33.00’E) at 24-m depth, on a poorly sorted silty sandy bottom. The experimental set-up has been adapted from an earlier experiment conducted by Stachowitsch et al., 2007 and Riedel et al., 2008. Both experiments used the Experimental Anoxia Generating Unit (EAGU), which is a 0.125 m³ fully equipped benthic chamber (a cube with all sides 0.5 m long) which enables experimentally inducing and documenting local-scale anoxia (see Stachowitsch et al., 2007).

Tableau 5 – Deployment and sampling dates as well as duration of the experimental period for the cores representing in situ conditions (“Normoxia”) and the various periods of anoxia in the four different benthic chambers

Sample ID	Chamber deployment day	Core sampling day	Incubation duration
Normoxia	-	03/08/2010	0 days
9 Days	02/08/2010	11/08/2010	9 days
1 Month	27/07/2010	25/08/2010	29 days
2 Months	27/07/2010	23/09/2010	58 days
10 Months	24/09/2010	05/08/2011	315 days

In the current study, we used four different chambers to produce anoxia for four different durations (Tableau 5). The four chambers were installed on the sea floor, several meters apart, on substrates which were visually poor in macrofauna. At the beginning of each experiment, 2 to 3 brittle stars (*Ophiothrix quinque maculata*) were introduced into each chamber (that otherwise did not contain any visible macrofauna) to provide rapid, visible indication of the onset of anoxia in each chamber. For comparison, two cores (termed “Normoxia”) were sampled at the start of the experiment. In order to standardize the terminology for all articles of the present Biogeosciences Special Issue, the different sampling times (also named in the present paper “Sample ID” for “Sample Identification”) have been termed “9 Days”, “1 Month”, “2 Months” and “10 Months”. The exact duration (in days) of each of the experiments is given in Tableau 5. The first chamber, fully equipped with the EAGU analytical devices, documented the onset of anoxia during a 9-day period. The other three chambers were used to study the development of the meiofauna after ~1 month, ~2 months and about 10 months of anoxia, respectively. Foraminifera,

copepods and nematodes were analyzed for the same cores. Sediment cores were taken by scuba divers using a Plexiglas™ corer with a 4.6-cm inner diameter (16.6 cm² surface area). Two replicate cores were taken in each of the benthic chambers at each sampling time.

3.2. Meiofaunal analysis

To identify whether the collected meiofaunal organisms were alive, we used CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate ; Molecular Probes, Life Technologies; heretofore called “CTG”). When living cells are incubated in CTG, this non fluorescent probe passes through the cellular membrane and reaches the cytoplasm, where hydrolysis with nonspecific esterase produces a fluorogenic compound. This fluorogenic compound does not leak out of the cell after fixation and can thus enable identifying the individuals exhibiting enzymatic activity when sampled (Bernhard et al., 2006).

For meiofaunal analyses, entire sediment cores were sliced every half centimeter from 0 to 2 cm and every centimeter between 2 and 5 cm. Within one hour after retrieval, sediments were stored in 100 cm³ bottles, which

were filled with sea water and CTG-DMSO (Dimethyl sulfoxide) at a final CTG concentration of 1 μM (Bernhard et al., 2006; Pucci et al., 2009). Samples were gently shaken and immediately placed in a cold room at *in situ* temperature, where they remained for at least 10 h, in order to obtain the hydrolysis of the CTG probe. After this reaction period, samples were fixed in 4% formaldehyde buffered with sodium tetraborate. The samples were further stored at room temperature.

Samples were then centrifuged to separate the soft meiofauna (i.e., copepods, nematodes; results presented in De Troch et al., 2013; Grego et al., 2013) from the sediment and the “hard-shelled” meiofauna (i.e., foraminifera; the present article and Langlet et al., 2013a). Centrifugation has two main advantages: first it permits working on the same sample for both copepods/nematodes and foraminifera. These two groups are easily separated because of their different densities; foraminifera are heavier because of their agglutinated or calcareous test. Secondly, it simplifies the foraminiferal analysis because all the soft organisms, which show a stronger fluorescence than foraminifera (the test tends to diminish the observed intensity of the fluorescence), have been removed.

Prior to centrifugation, samples were first sieved over a 38- μm mesh to remove small sediment particles and formaldehyde. We then added a Levasil density medium and distilled water to achieve a density of about 1.17 g/cm^3 , and finally added about 10 g of kaolin powder to promote the sedimentation of the heavier particles (McIntyre et Warwick,

1984; Burgess, 2001). Next, we centrifuged for 10 min at 3000 rpm at ambient room temperature. After this, the supernatant (composed of soft meiofauna) and the deposit (composed of the hard-shelled meiofauna and sediment) were separately sieved over a 38- μm mesh to remove the kaolin and the Levasil medium. The two separated samples were stored in a Borax-buffered formaldehyde solution until further analysis.

The present study analyzes only the samples containing the hard-shelled meiofauna (soft-walled foraminiferal taxa are excluded). Therefore, this contribution only considers calcareous and agglutinated foraminifera. These samples were subsequently sieved over 315, 150, 125 and 63 μm meshes.

A major asset of the present study is that we also analyzed all of the >63 μm size fractions of the benthic foraminifera, and we systematically studied the complete sample, without splitting. Many studies fail to analyze the smaller size fractions (63-125 or 63-150 μm) because it is extremely time-consuming. The smaller size fraction, however, may contain abundant living individuals and can provide important information about small opportunistic species and about potential reproduction during the experiment.

For the 63-125 μm fractions it was necessary to use a concentration method for the foraminifera to prevent splitting the sediment (leading to statistical problems) and/or unrealistic working times. Thus, all foraminiferal samples of the fractions 63-125 μm were washed to remove the borax-buffered formaldehyde solution and dried in a compartment

dryer (Memmert GmbH + Co.KG) at 30-40°C. The foraminiferal tests were then separated by treating the sediment with tetrachloro-carbon under a laboratory fume (Hohenegger et al., 1989; Murray, 2006). The tetrachloro-carbon was carefully decanted and the floating foraminifera were collected on paper filters, quickly dried, and stored in small glass vials.

Foraminiferal counts were performed in all fractions >63 µm using an epifluorescence stereomicroscope (Olympus SZX12 with a light fluorescent source Olympus URFL-T or Nikon SMZ 1500 with a PRIOR Lumen 200). Samples were observed at the accurate excitation (492 nm) and emission (517 nm) wavelengths. The samples from the 63-125 fractions were dried and picked dry, while the samples from the >125µm fractions were not dried and picked wet. Dried specimens still show clearly the fluorescence produced by incubation with CTG. Only specimens showing clear green fluorescence were picked and counted as living.

3.3. Ribosomal RNA analysis

Total RNA was extracted from ca. 0.5 g of sediment from the top centimeter of one single core collected in the “10 Months” anoxia chamber using the Power-Soil Total RNA Isolation Kit according to the manufacturer instructions (MoBio). For each sample, a 30 µL aliquot of RNA extract was purified from co-extracted DNA by incubating 2 Units of TURBO DNase enzyme (Ambion) in the presence of 3 µL of its 10X Buffer for 25 min at 37°C. An additional incubation with another 2 Units of DNase was conducted in order to

guarantee the total digestion of small DNA fragments. Then, the digestion was stopped by adding 5 µL of DNase Inactivation Reagent (Ambion) and incubating 2 min at ambient temperature. After centrifugation for 90 sec at 10,000 g, the supernatant was collected and the absence of double-stranded DNA was confirmed by PCR amplification. This control PCR reaction was conducted on 1 µL of DNase-treated RNA in a total volume of 15 µL containing 1 U of Taq Polymerase (Roche), 1X of Buffer solution (Roche), 0.2 µmol L⁻¹ of each primer s14F3 (5' - AC-GCAMGTGTGAAACTTG - 3') and s17 (5' - CGGTCACGTTTCGTTGC - 3'), and 0.2 mM of each dNTP. The reaction consisted of a pre-incubation at 94°C for 90 sec, followed by 25 cycles of 94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 45 sec, 10 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 30 sec and 72°C for 45 sec, and a final incubation at 72°C for 120 sec. The amplification results are presented in the Supplementary Fig. 1. The complementary strands of ca. 150 ng of RNA (i.e., cDNA) were synthesized for each sample using the SuperScriptIII® Reverse Transcriptase (Invitrogen). In a volume of 11 µL of RNA were pre-mixed 1 µL of 10 mmol L⁻¹ dNTPs and 1 µL containing 250 ng of random primers (Promega). After an incubation for 5 min at 65°C and then for 2 min on ice, 4 µL of 5X RT Buffer (Invitrogen), 1 µL of 100 mmol L⁻¹ dithiothreitol (DTT) and 200 U of SuperScriptIII® Reverse Transcriptase (Invitrogen) were added to the pre-mix. The reverse-transcription was conducted for 5 min at 25°C, followed by 50 min at 55°C and 15 min

at 15°C. A control with no RNA was included and amplified as described in the next section in order to monitor the occurrence of contamination during the cDNA synthesis. The resulting cDNA were used as template to amplify, clone and sequence the foraminifera-specific hypervariable region 37f of the small subunit of the ribosomal RNA gene (SSU rDNA) as in Pawlowski et al. (2011) but using the above primers and no re-amplification. The resulting sequences were filtered for chimeras using UChime and each sequence assigned to a foraminiferal species or genus based on the taxonomically informative 37f hypervariable region (Pawlowski et Lecroq, 2010). Briefly, each of the 61 sequences was aligned to 1003 curated reference sequences of the corresponding 37f hypervariable foraminiferal region using the Needleman-Wunsch algorithm and the best match(s) under a threshold of 20% dissimilarity was retained for assignment. In those cases where more than one reference sequence matched the environmental sequence at the lowest distance, the environmental sequence was assigned to the deepest consensus of taxonomy without conflict of these reference sequences, as in (Lecroq et al., 2011). Pairwise global alignments between all assigned sequences were also used to form clusters or Operational Taxonomic Units (OTUs) using the software mothur v1.28.0 (Schloss et al., 2009). A threshold of 4% sequence dissimilarity was chosen as no further sequence clustered until a distance of 16%. The resulting OTUs were assigned according to the consensus of the assignments for individual sequences. The

analyzed sequences were submitted to GenBank under the accession numbers KF647255 to KF647315.

3.4. Data analysis

After the discrimination of the living individuals, they were counted and expressed as standing stock (number of living individuals per core in the 0-0.5 or in the 0-5 cm depth interval normalized for a 10 cm² surface area) and as density (number of living individuals per depth interval normalized for a 10 cm³ sediment volume).

Three statistical procedures were used to identify the effect of several parameters on the foraminiferal standing stocks or density. All the procedures are Linear Models (Chambers et Hastie, 1992) in which the dependent variable (the response variable) is the log-transformed foraminiferal density or standing stock. The log-transformation ensures that the dependent variable shows a Gaussian distribution.

To be able to determine significant differences in the foraminiferal standing stocks between sampling times, two models test the effect of the Sample ID (i.e., a qualitative expression of the sampling time) on standing stocks over two depths intervals. The first model tests the Sample ID effect in the whole core (0-5 cm; Tableau 6; Model 1), the second only for the shallowest depth interval (0-0.5 cm; Tableau 6; Model 2).

To quantify the effect of anoxia on standing stocks in these two depth intervals (0-0.5 cm and 0-5 cm) we designed an analysis of covariance linear model. This model (Tableau 6;

Tableau 6 - Summary of the variables used in each of the three linear models, describing the name of the variable, its type (dependent or independent), its unit, nature (quantitative or qualitative) and the used transformation. For the quantitative variables the minimum and maximum values of the non-

Model 1: Analysis of variance				
Name	Variable Type	Unit	Variable nature (values)	Transformation
Standing Stock (0-5cm)	Dependent	Ind. / 10 cm ²	Quantitative (min = 533; max = 1979)	log (1 + Standing Stock)
Sample ID	Independent	-	Qualitative ("Normoxia", "9 Days", "1 Month", "2 Months" and "10 Months")	-
Model 2: Analysis of variance				
Name	Variable Type	Unit	Variable nature (values)	Transformation
Standing Stock (0-0.5cm)	Dependent	Ind. / 10 cm ²	Quantitative (min = 115; max = 529)	log (1 + Standing Stock)
Sample ID	Independent	-	Qualitative ("Normoxia", "9 Days", "1 Month", "2 Months" and "10 Months")	-
Model 3: Analysis of covariance				
Name	Variable Type	Unit	Variable nature (values)	Transformation
Standing Stock	Dependent	Ind. / 10 cm ²	Quantitative (min = 115; max = 1979)	log (1 + Standing Stock)
Depth Interval	Independent	-	Qualitative ("0-5 cm" and "0-0.5cm")	-
Time	Independent	days	Quantitative (min = 0; max = 315)	log (5 + Time)
Depth Interval * Time	Independent	-	interaction	-
Model 4: Analysis of covariance				
Name	Variable Type	Unit	Variable nature (values)	Transformation
Density	Dependent	Ind. / 10 cm ³	Quantitative (min = 46; max = 1059)	log (1 + Density)
Depth	Independent	cm	Quantitative (min = 0.25; max = 4.5)	log (1 + Depth)
Depth ²	Independent	cm	Quantitative (min = 0.25; max = 4.5)	(log (1 + Depth)) ²
Sample ID	Independent	-	Qualitative ("Normoxia", "7 Days", "1 Month", "2 Months" and "10 Months")	-
Depth*Depth ²	Independent	-	interaction	-
Depth*Sample ID	Independent	-	interaction	-
Depth ² *Sample ID	Independent	-	interaction	-

Model 3) tests the effect of Sampling Time (a quantitative expression of the duration of the experiment), Depth Interval (a qualitative expression of the selected depth intervals: “0-0.5 cm” and “0-5 cm”) and their Interaction. This model was designed to identify whether the variation of the standing stock in function of sampling time is similar for the two depth intervals or not. Note that the sampling Time has been log-transformed in order to avoid giving too much weight to the “10 Months” chamber.

Finally, to quantify the effect of the anoxia and of sediment depth on the foraminiferal density, we designed an analysis of covariance linear model. The first computed model (Tableau 6; Model 4) tests the effect of the Sample ID, the sediment depth (i.e., here a quantitative expression of the depth interval; the value used being the midpoint of the depth intervals) and their first-order interaction with

foraminiferal density. Note that to increase the quality of the fit, sediment depth has been log-transformed and has been introduced with a polynomial component (the log transformed depth has been squared). The Depth times squared Depth interaction and the squared Depth times Sample ID interaction have also been added to the model.

Tableau 8 shows only the tested variables that have a significant effect. Supplementary Table 2 shows how each of the variables affects the dependent variable.

4. Results

4.1. Foraminiferal survival under various experimental conditions

Living benthic foraminifera (i.e., positively labeled with CTG) were present from the beginning of the experiment to the end, after about 10 months of anoxia. Relatively large

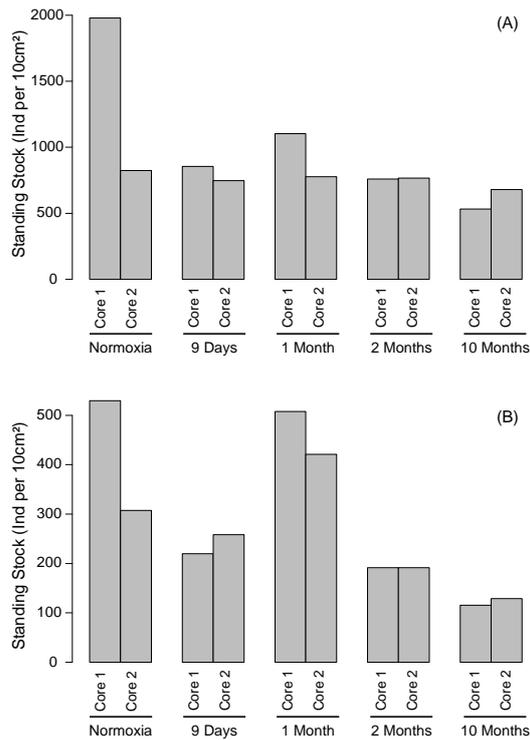


Figure 17 - Foraminiferal standing stocks in all sampled cores for the whole cores (0-5 cm; panel A) and for the 0-0.5 cm depth intervals (panel B)

standing stocks were recorded from the surface down to 5 cm depth Figure 17; Tableau 7). In the 10 studied cores, the total number of individuals in the top 5 cm varied from ~1980 individuals per 10 cm² in “Normoxia” core 1, to ~530 individuals per 10 cm² in the “10 Months” core 1. Over all sampling times, the living assemblages were dominated by *Reophax nanus*, *Eggerella scabra* and *Bulim-*

ina aculeata, whereby *Textularia agglutinans*, *Quinqueloculina seminula*, *Lagenammina atlantica*, *Hopkinsinella glabra*, *Bolivina pseudoplicata* and *Quinqueloculina stelligera* were other conspicuous faunal elements. Census data are presented in Suppl. Mat. Table 1; a more complete description and analysis of the faunal composition is presented in Langlet et al. (2013a).

4.2. Density variation with time

Figure 17 shows that living benthic foraminifera (i.e., CTG-stained) were present at every sampling time. The standing stocks in the whole cores (0-5 cm depth interval, Figure 17; Panel A) varied only slightly with incubation time. Although a clear maximum was found in “Normoxia” core 1, no significant differences existed between the pairs of replicate cores of the 5 sampling times (Tableau 8; Model 1). When only the 0-0.5 cm depth interval is considered, the highest standing stocks occurred in “Normoxic” core 1, very similar values were found in both “1 Month” cores, whereas the values were lowest (~ 30 individuals per 10 cm³) in the two “10 Months” cores.

Tableau 7 - Total counts and standing stocks of living (CTG labeled) foraminifera at every sampling time for every replicate core

Sample ID	Time (Days)	Replicate core	Total count (individuals)	Standing stock (indiv/10cm ²)
Normoxia	0	core1	3289	1979
Normoxia	0	core2	1368	823
9 Days	9	core1	1422	856
9 Days	9	core2	1241	747
1 Month	29	core1	1834	1104
1 Month	29	core2	1291	777
2 Months	58	core1	1263	760
2 Months	58	core2	1274	767
10 Months	315	core1	886	533
10 Months	315	core2	1131	681

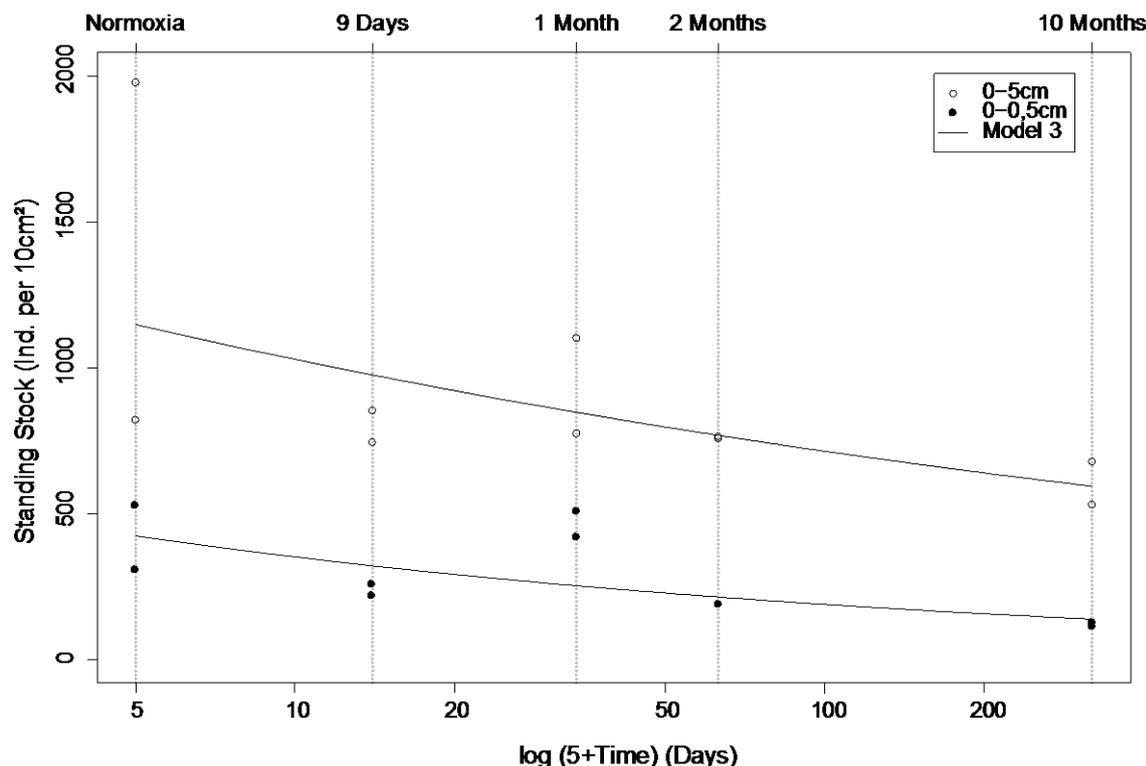


Figure 18 - Foraminiferal standing stocks plotted against deployment time. Open circles represent standing stock in the 0-5cm depth interval, full black circles correspond to the standing stock in 0-0.5cm depth. Full black lines represent the modeled standing stocks plotted against time, for the two depth intervals, after Model 3. Note that incubation time is represented on a transformed log scale (5 + time).

Model 2 (Tableau 8) was used to test whether the foraminiferal densities in the 0-0.5 cm depth interval (Figure 18), are significantly different at different sampling times. The test shows that the standing stocks of the “Normoxia” and the “1 Month” cores are not significantly different, but both are significantly higher than the 0-0.5 cm densities of the “9 Days” and “2 Months” cores. The latter cores are not significantly different from each other (Tableau 8; Model 2 and Suppl. Mat. 2). Finally, the standing stocks of the 0-0.5 cm layer of the “10 Months” cores are significantly lower than those observed in all other cores (Tableau 8).

The analysis of covariance reveals that the total standing stocks showed a significant exponential decrease both for the total cores

(0-5 cm) and for the 0-0.5 cm level, in function of log-transformed experimental Time (Figure 18, Tableau 8, Model 3). The density was significantly lower in the 0-0.5cm depth interval than in the whole core (Tableau 8; Model 3), indicating that a significant part of the living fauna was present in deeper sediment levels.

The slopes of the regression curves between the 0-5 cm and 0-0.5 cm intervals were not significantly different (Tableau 8, Model 3). This means that the density decrease over Time was not significantly different between the whole core (0-5 cm) and the topmost sediment (0-0.5 cm).

4.3. Density variation with sediment depth

Figure 19 shows that foraminiferal density decreased strongly with sediment depth in the five pairs of replicate cores. In fact, all cores exhibited a significant exponential decrease of density in function of log-transformed sediment depth (Tableau 8, Model 4). Also the Sample ID (i.e., a qualitative expression of Time) effect is significant (Tableau 8, Model 4). When the various depth levels are considered individually, the densities in the “10 Months” cores were significantly lower than

those of the other 4 pairs of replicate cores (Tableau 8, Model 4 and Suppl. Mat. 2). Additionally, the slopes of the density decrease with depth were not significantly different except for the one observed for the “1 Month” cores, which is significantly steeper, mainly due to the very high density in the topmost level and the very strong decrease in the 0.5-1 cm level.

Tableau 8 - Results of the Models 1, 2, 3 and 4. For each Model, the degrees of freedom (Df), the sum and mean of squares (SumSq. And MeanSq.), the F-value (F) and its p-value (p) are given for each variable. The p-values indicate whether the variable has a significant effect ($p < 0.05$) or not ($p > 0.05$).

Model 1

	Df	SumSq.	MeanSq.	F	p
Sample ID	4	0,6	0,2	1,6	0,31
Residuals	5	0,5	0,1		

Model 2

	Df	SumSq.	MeanSq.	F	p
Sample ID	4	2,4	0,6	16,2	0,005
Residuals	5	0,2	0,0		

Model 3

	Df	SumSq.	MeanSq.	F	p
log(5+Time)	1	1,8	1,8	16,3	0,001
Depth Interval	1	7,3	7,3	66,4	4,37E-07
log(5+Time) * Depth Interval	1	0,1	0,1	1,1	0,32
Residuals	16	1,7	0,1		

Model 4

	Df	SumSq.	MeanSq.	F	p
Sample ID	4	3,5	0,9	7,1	1,12E-04
log(1+Depth)	1	16,7	16,7	134,6	2,77E-16
log(1+Depth) ²	1	2,7	2,7	22,0	1,89E-05
Sample ID * log(1+Depth)	4	3,1	0,8	6,3	3,25E-04
log(1+Depth) * log(1+Depth) ²	1	0,5	0,5	4,1	0,048
Sample ID * log(1+Depth) ²	4	1,0	0,3	2,0	0,10
Residuals	54	6,7	0,1		

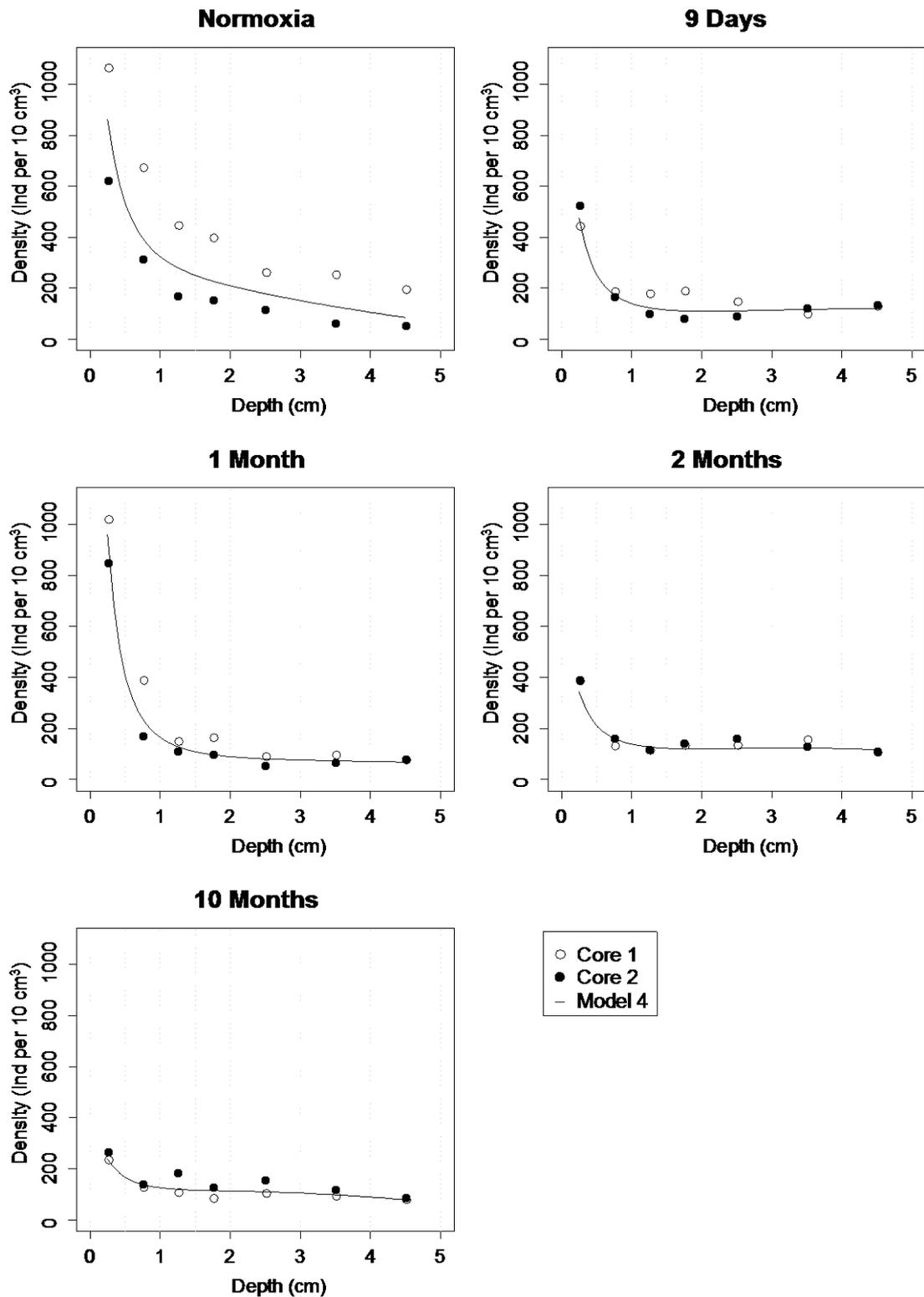


Figure 19 - Foraminiferal density plotted against sediment depth for all sampled cores. Open circles represent the density in replicate core 1, full black circles that in core 2. Full black line represents the modeled density according to Model 4.

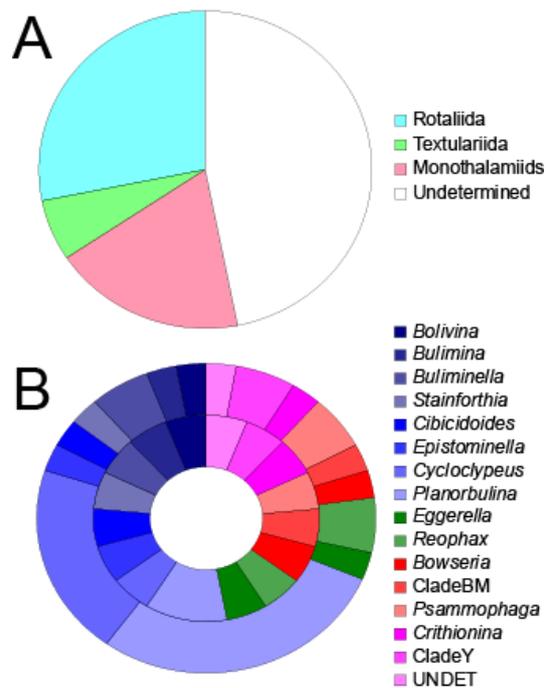


Figure 20 - Taxonomic composition of the foraminiferal ribosomal RNA OTUs (Operational Taxonomy Unit) clustered at 96% sequence identity from the top centimeter of the sediment in the “10 Months” chamber. (A) Relative proportions of the 32 OTUs identified the order level or left unassigned after taxonomic assignment based on Needleman-Wunsch, global alignments of the 37f hyper-variable region as in Lejzerowicz et al., (2013). (B) Relative proportion of OTUs (inner circle) and sequences (outer circle) assigned to the genus level.

4.4. Ribosomal RNA analysis

A total of 61 filtered foraminiferal SSU rDNA sequences were obtained from the metatranscriptomic sediment extract of the 10 months anoxic chamber. After clustering, 32 OTUs (Operational Taxonomy Units) were obtained which included 15 unassigned OTUs (Figure 20A). The remaining OTUs were assigned to the calcareous order Rotaliida (9 OTUs), the agglutinated Textulariida (2 OTUs) and to the soft-walled monothalamiids (6 OTUs). One OTU represented by one sequence perfectly matched the reference se-

quence of a specimen that was morphologically determined as *Eggerella scabra* and collected in the same area (Figure 20B).

5. Discussion

5.1. Pore water geochemistry and macrofaunal behavior during the experiment

Parallel to the meiofaunal and macrofaunal analyses, sediment geochemical analyses were conducted to control whether the experimental conditions indeed led to anoxia in both the overlying water and in the pore water (Koron et al., 2013; Metzger et al., 2013a). This paragraph summarizes the findings relevant to our study, for more details about the data and methodology refer to these papers. Metzger et al. (2013a) show that the oxygen concentration in the waters overlying the sediment (measured by two oxygen microsensors placed a few millimeters above the sediment-water interface in the “9 Days” chamber) started to decrease as soon as the chamber was closed. The consumption rate was 950 nL/cm²/h (i.e., 0.0115 nmol/cm²/s or 9.93 mmol/m²/day). Microsensor data show that hypoxia was reached after 2 to 6 days and anoxia after 7 days. The overlying water remained anoxic until the end of the deployment (9 days). To estimate the contribution of the foraminiferal assemblages to the oxic respiration in our benthic chambers, we compared the oxygen consumption rate with the total foraminiferal respiration estimated using the power relation between foraminiferal biovol-

ume and respiration rate (Geslin et al., 2011). The application of this relation, taking into account the foraminiferal densities in the oxygenated sediment layer (the 0-0.5 cm interval of the Normoxia cores) in 4 distinct size classes (63-125, 125-150, 150-315 and >315 μm), yields a total foraminiferal respiration rate of 4.57 nL/cm²/h. In comparison, the value is 950 nL/cm²/h for total benthic respiration (Metzger et al., 2013a). Accordingly, foraminifera are responsible for about 0.5% of the total benthic respiration in the chamber. These values are similar to those estimated for assemblages inhabiting the Rhone prodelta (0.6 and 1.2% at 37 and 60 m depth, respectively; Geslin et al., 2011; Goineau et al., 2011). Nevertheless, as these estimations are based on the standing stock of foraminifera larger than 63 μm and, thus, neglect all the smaller individuals, these values probably underestimate the respiration rates of the whole foraminiferal community.

At the beginning of each experiment, 2 to 3 brittle stars (*Ophiothrix quinquemaculata*) were placed into each chamber, which otherwise contained no visible macro-epifauna. *Ophiothrix* shows typical behavioral reactions to decreasing oxygen concentrations, such as arm-tipping at the transition from normoxia to hypoxia, probably to raise the position of the respiratory organs in the water column (see Riedel et al., 2008, 2012, 2013). This macrofaunal behavior (including emerging infaunal species) was used as an additional in situ indicator for the onset of hypoxia in each chamber. The brittle stars and the other macrofaunal organisms died after 7 to 15 days

of deployment. Shortly after the brittle stars died, the normally greyish-brown sediment turned black a few centimeters around the dead organisms. About 2 days later (i.e., after 9 to 17 days of deployment), the whole surface of the sediment in the chambers was completely black.

After this 9-day period, direct oxygen measurements were no longer technically possible (due to the limited battery capacity of the data logging system), but other chemical indicators indicate that reductive conditions occurred and remained present until the opening of the “10 Months” chamber. Upward shifts of the manganese, iron and sulfate reduction zones were observed during the experiment, confirming a shift from oxic to anoxic conditions at the sediment-water interface as well as in the overlying water and in the sediment column (Metzger et al., 2013a). Whereas this change seems to be progressive in the sediment column, the chemical composition of the overlying waters shows a more complex pattern. The “1 Month” probes showed a considerable increase of free sulphide hydrogen above the sediment water interface. No such intensive sulphide production was observed in the “2 Months” and “10 Months” samples. This particular pattern caused an inversed sulphide gradient, and consequently, a downward sulphide flux into the sediment. In the “1 Month” sample, sulphide was still detected 2 cm below the interface. These observations have been interpreted to reflect the degradation of the dead macrofaunal remains concentrated at the sediment surface. Previous studies at the same

site, using the same experimental protocol, have shown that the macrofaunal organisms suffer massive mortality during the first week of anoxia (Riedel et al., 2008, 2012). The geochemical results (Metzger et al., 2013a) and especially the decrease in biogeochemical activity suggest that the abundant labile organic matter resulting from macrofaunal mortality (the already present infaunal organisms and the introduced brittle stars) is consumed in the first month(s) of the experiment. Finally, the geochemical analyses also indicate that nitrates were present both in the overlying water and in the pore waters at all times, without any major changes in vertical distribution (Koron et al., 2013).

To summarize, the pore water chemistry indicates that the oxygen concentration decreased during the first days of the experiment. Anoxia was reached after 7 days, and was maintained until the end of the experiment after 315 days. Sediment geochemistry also suggests that a non-negligible amount of fresh organic matter was added to the system due to the mortality of the macrofauna. This newly available labile organic matter was consumed in the first month(s) of the experiment.

5.2. Methodological strategy of the study

The present study is original for combining an in situ experiment with the use of the very accurate CTG labeling method (instead of the traditional Rose Bengal staining method) and for the very long duration of the anoxia.

We think that our experimental approach has three advantages compared to laboratory experiments. A first one is that it circumvents undesirable laboratory effects, such as stress from transport and/or culture maintenance, reproduction after incubation (e.g., Geslin et al., 2014; Ernst et al., 2006; Murray, 2006), and slightly differing environmental conditions (temperature, light, salinity, etc.). In comparison to non-experimental field studies, our experimental set-up allowed us also to prolong the anoxic period and to avoid the effect of seasonal variation of food supplies. Conversely, our closed set-up blocked food supply from the outside, and toxic components such as sulphides are not dispersed in the water column. Moreover, deployment by scuba divers in 24 m depth limits the available manpower and manipulation time, precluding sampling every month and obtaining a higher temporal resolution. Finally, our cores were taken a few decimeters from each other, potentially resulting in important variation related to spatial patchiness, especially in the distribution of macrofaunal organisms and burrows, and the related biogeochemical processes. Laboratory studies can avoid the effects of patchiness by sieving and homogenizing the sediment, which could in turn affect the results pertaining to more sensitive species (Langezaal et al., 2004). Nonetheless, we think that the advantages of our in situ approach outweigh the disadvantages.

A second advantage of our approach is avoiding the use of Rose Bengal, a bulk-stain that adheres to the proteins in the foraminiferal protoplasm. Since the protoplasm can be

preserved weeks to months after death (Boltovskoy et Lena, 1970; Bernhard, 1988; Corliss et Emerson, 1990), faunal inventories based on Rose Bengal can substantially overestimate foraminiferal densities, especially in anoxic conditions, where organic matter degradation will be slow (Hannah et Rogerson, 1997; Glud, 2008). It can also yield false positives in experiments in anoxic conditions, calling for caution in interpreting the results of many earlier studies (e.g., Moodley et al., 1997; Heinz et al., 2001; Duijnsteet et al., 2003). Our goal of following the faunal variation on a weekly to monthly scale required using a more accurate vitality discrimination technique. CTG is a fluorescent probe that is hydrolyzed within any cytoplasm by foraminiferal or bacterial (or any) metabolism. Since such enzymatic activity should stop after the death of the organism, the CTG method should very accurately determine living specimens (Bernhard et al., 2006). This assumption has been confirmed during a comparative study on copepods and nematodes (Grego et al., 2013) using the same experimental design as our study, these authors found that the two methods yielded similar estimations of copepod density but that Rose Bengal yielded higher densities of nematodes in well-oxygenated conditions. After 7 days of anoxia, the Rose Bengal method overestimated (compared to CTG) the density of living nematodes and copepods by about 30% and 50%, respectively (Grego et al., 2013). Accordingly, especially in anoxic conditions and in case of a high temporal resolution, the CTG method produces considerably more reliable re-

sults. Nevertheless, recognizing pink tests using Rose Bengal and fluorescent tests using CTG both have a subjective component and call for observer expertise. Several parameters can affect the observer's judgment: the various test types (hyaline, porcelaneous, agglutinated) influence the way the fluorescence of the cytoplasm is seen through the test, the presence of other fluorescent organic material close to the object (e.g., nematodes and copepods are more fluorescent than foraminifera) can "hide" the foraminiferal fluorescence (we removed these organisms from our samples by centrifugation to avoid such a negative effect), the natural fluorescence of the sediment, and the interspecific and inter-individual variability in the fluorescence intensity. Finally, prior to the use of CTG, several tests were performed to calibrate the identification of living individuals. To do so, active (moving), non-active (non-moving) and clearly dead individuals were incubated in CTG. This calibration tests shows clear differences in the fluorescence intensity and patterns. It has been previously evidenced that foraminiferal cytoplasm can be (partially) overtaken by bacteria and still positively stain with Rose Bengal (Bernhard et al., 2010b). Such a possibility cannot be entirely excluded either with the CTG method, since living bacteria also react positively to CTG. In our material, for some specimens the fluorescence intensity was rather low, and appeared patchy and "milky". We assume that such a patchy/milky fluorescence could be due to the presence of bacteria, and did not count such individuals as living. Fortunately, this type of fluorescence can be

easily distinguished from actual foraminiferal fluorescence. Because of our very strict selection of fluorescent individuals (with a clear and bright fluorescence), we are confident that the large majority of the inventoried fluorescent individuals were alive at the time of sampling.

It is possible that centrifugation in the Levaryl solution at 300 rpm may have destroyed some fragile foraminiferal specimens. However, in spite of this treatment fragile species such as *Leptohalysis scottii* or *Reophax nanus* were found in relatively large numbers in the centrifuged samples, indicating that these species can resist such a treatment. The most problematic part of the centrifugation protocol is probably the potentially low extraction efficiency for foraminifera estimated at 88 % (Burgess, 2001). The application of our protocol could therefore lead to an under estimation of the foraminiferal standing stock in the 63-125 μm fraction.

The third advantage of the experimental setup is the long-term duration of the chamber deployment. While previous anoxia incubation experiments on foraminifera lasted up to three months, we extended this period to more than 10 months. Although it cannot be excluded that deeper-burrowing macrofauna may eventually find their way into the chambers, our geochemical analyses indicate that the conditions were strongly reductive and anoxic at the end of the evaluated deployment.

5.3. Foraminiferal survival under the experimental conditions

5.3.1. Foraminiferal survival under anoxia in the presence of hydrogen sulphides

Abundant CTG-labeled specimens were found in all cores. Thus, either many foraminifera survived from 9 days to more than 10 months of anoxia, in all sediment layers down to 5 cm depth or offspring were produced during that time period. To confirm that foraminifera were indeed alive after almost one year of anoxia, a complementary foraminiferal ribosomal RNA analysis was carried out. Ribosomal RNA marker sequences were successfully recovered from total sediment RNA extractions and assigned to diverse foraminifera. As in a recent study of deep-sea foraminiferans realized at a comparably low sequencing effort, sequences originating from the RNA material corresponded to the species that were also found stained with Rose Bengal (Lejzerowicz et al., 2013). Sequences recovered in anoxic conditions in the present study were assigned to several groups of foraminifera (Rotaliida, Textulariida and monothalamiids), including to the textulariid *Eggerella scabra*, which was shown to survive prolonged anoxia (Langlet et al., 2013a). This foraminiferal diversity was reported based on the RNA material found from the first centimeter of sediments collected after 10-months anoxia, i.e., from sediment exposed to prolonged anoxia. RNA molecules are short-lived, although one study reported the existence of extracellular RNA molecules particu-

larly well preserved after 2.7 million year in subsurface sediments (Orsi et al., 2013). Nevertheless, the use of RNA as a proxy for describing active species has already proved successful in numerous studies of modern micro-eukaryotic communities (Sørensen et Teske, 2006; Stoeck et al., 2007; Alexander et al., 2009; Frias-Lopez et al., 2009; Takishita et al., 2010; Logares et al., 2012; Stock et al., 2012), although the differences in the activity levels of identified species cannot be inferred from sequence data (Logares et al., 2012). Ribosomal RNA marker sequences were assigned to species also revealed by CTG (Langlet et al., 2013a), leaving few doubts that these species were alive and metabolically active after 308 days of anoxia (315 days of experiment – 7 days of oxic and hypoxic conditions). Our molecular results further support the accuracy of the CTG method for detecting living foraminiferans.

Notwithstanding the caveats of the Rose Bengal approach, available data strongly suggest that foraminifera are tolerant to anoxia (Bernhard et Alve, 1996; Moodley et al., 1997; Leiter et Altenbach, 2010; Piña-Ochoa et al., 2010b). It is nonetheless surprising that benthic foraminifera are still alive in considerable numbers after 308 days of anoxia (~530 and ~680 individuals per 10 cm² down to 5 cm in the two replicate cores). We assert that we have presented the first conclusive evidence that such a long-term foraminiferal survival in anoxic conditions could occur.

With the development of anoxia, hydrogen sulphides were produced. The concentration has been roughly estimated at >100 µM in the

overlying water of the “1 Month” chamber (Metzger et al., 2013a). Despite the potential toxicity (Fenchel et Finlay, 1995; Giere, 2008), the foraminiferal faunas survived this strong exposure.

5.3.2. Implications of the experiment for our understanding of foraminiferal metabolism

We show that foraminifera remain alive in anoxic conditions, despite the occurrence of sulphides, for at least 308 days. Prior to this study, foraminifera were known to survive relatively short periods in hypoxic and anoxic conditions (Alve et Bernhard, 1995; Piña-Ochoa et al., 2010b) and Rose-Bengal stained organisms were found under constant anoxic conditions (Leiter et Altenbach, 2010). Several experimental and ultrastructural observations reviewed by Bernhard (1996) and Bernhard et Sen Gupta (1999) identified the sequestration of chloroplasts, encystment, dormancy, aggregation of endoplasmic reticulum and peroxisomes or the presence of symbiotic bacteria as potential mechanisms to survive anoxia. Several authors showed that certain taxa can respire nitrates in anoxic conditions (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008; Piña-Ochoa et al., 2010a). A gene for nitrate reduction has recently been found in *Bolivina argentea* (Bernhard et al., 2012), suggesting that, in this species, denitrification could at least partially be performed by the foraminifera themselves, and not by symbiotic bacteria, such has been shown for allogromiid foraminifera (Bernhard et al., 2011). Based on denitrification budget calculations, (Risgaard-

Petersen et al., 2006) estimated that the most efficient species could survive anoxia for 2 to 3 months by using their intracellular nitrate stock. In our experiment, however, all species, including some that do not store nitrate in large quantities (*Bulimina aculeata*, see Piña-Ochoa et al. (2010a) or *Eggerella scabra*, see Langlet et al. (2013b)), survived almost one year of anoxia. Two explanations can be proposed to explain this discrepancy: some species may indeed denitrify and continuously renew their nitrate stocks (nitrates are always available in pore and bottom waters; Koron et al., 2013). Others may shift to other survival strategies, such as drastically decreasing their metabolic rates, or use as yet undescribed metabolic pathways.

5.4. Variations in foraminiferal densities

Overall densities significantly decreased with time (Tableau 8, Model 2), but the values after one month are somewhat higher than after 9 days. This difference is much clearer in the values from the topmost 0.5 cm than from the whole core. In fact, the temporal density variation does not follow a gradual decrease. In the 0-0.5 cm depth interval the standing stocks in the “Normoxia” and the “1 Month” chambers are both significantly higher than those in the “9 Days” and “2 Months” chambers. The cores of the latter two (which are not significantly different) both have significantly higher standing stocks in the 0-0.5 cm interval than the “10 Months” cores (Tableau 8, Model 3). We hypothesize that these densi-

ty variations are explained either by spatial variability, the effect of the anoxia, or by labile organic matter availability. These three hypotheses are discussed below.

5.4.1. Spatial heterogeneity versus temporal variability

Since the living fauna has been analyzed in two replicate cores, we can to some extent assess the spatial variability of the meiofauna at a decimetric spatial scale. The two replicate cores that differ most are the “Normoxia” cores sampled before the beginning of the experiment, with total (0-5 cm) standing stocks of ~1980 and ~820 individuals per 10 cm², respectively. This difference is not due to a different vertical distribution, which is fairly similar (Figure 19): the density differs at all depths. Considerable patchiness at this site is the logical explanation. The substrate here is a poorly sorted silty sand, which is colonized by very patchy macro-epibenthic assemblages, defined as multi-species clumps or bioherms (Fedra et al., 1976; Stachowitsch, 1984, 1991). Also the sediment geochemistry shows a non-negligible variability in the intensity and depth of the major diagenetic reactions (Metzger et al., 2013a). We expect that the areas devoid of visible macro-epifauna (such as those selected for this experiment) also show important spatial patchiness. Burrowing activities of infaunal macrofauna, for example, may have affected the homogeneity of the sediment column. The presence of burrows generally leads to a deeper oxygen penetration depth (Aller, 1988), which can explain the

higher infaunal foraminiferal standing stocks (e.g., Jorissen, 1999; Loubere et al., 2011; Phipps et al., 2012).

For comparison, at a 14.5m-deep site located at the northern Gulf of Trieste, Hohenegger et al. (1993) compared the faunal composition (Rose Bengal method) of 16 sediment cores (4.8 cm inner diameter, as in our study), sampled in a single 1 m² surface. Foraminiferal standing stocks varied from ~2450 to ~6300 individuals per 100 cm², with an average of ~3500 individuals per 100 cm² (Hohenegger et al., 1993). The authors explained this by the influence of burrows and specific food requirements. The ratio of about 2.6 between their richest and poorest cores is very similar to the maximum ratio of 2.4 found for our replicate cores at the beginning of the experiment. Such a difference may be typical for shallow Gulf of Trieste sites. A number of long-term (weeks to months) in situ observations clearly show strong changes in foraminiferal standing stocks in coastal environments (Murray, 1983; Horton et Murray, 2007). In the Northern Adriatic Sea, between 30- to 60-m depth, Barmawidjaja et al. (1992) and Duijnsteet et al. (2004), describe substantial seasonal variability, probably in response to seasonal primary production changes, organic carbon fluxes to the seafloor, temperature and/or salinity. It is very unlikely that such changes (except perhaps temperature) have impacted the foraminiferal faunas in our closed benthic chambers. The observed temporal changes are therefore rather due to the effect of the experimental conditions than to

natural environmental changes concerning the whole Northern Adriatic.

The spatial heterogeneity at our study site precludes definitively interpreting the differences in foraminiferal densities between the different chambers (and different sampling times) as being entirely the consequence of the experimental conditions. Nevertheless, all statistical tests indicate that the intra-chamber effect is less important than the other tested variables (Time, Sample ID or Depth). Accordingly, experimental conditions appear to have a stronger impact on density differences between pairs of replicate cores than spatial patchiness.

5.4.2. Effect of anoxia and hydrogen sulphides on the foraminiferal faunas

The foraminiferal standing stocks exhibit a significant exponential decrease with the log transformed experiment time (Figure 18). In detail, the densities do not decrease gradually with time, the highest densities occur in the initial conditions and after 1 month of anoxia, and the values are lower in the “9 Days” and “2 Months” cores, with the lowest densities in the “10 Months” anoxia samples. If the observed density changes in the 0-0.5 cm interval are not entirely due to spatial patchiness, standing stocks could be negatively affected by the development of anoxia in the first week (Figure 17). However, in an earlier experiment using the same protocol (in situ incubation, CTG probe), performed in 2009 at the same site, no significant difference in foraminiferal density was observed between a reference core (normoxic conditions) and a core

sampled after 7 days of anoxia (Geslin, unpublished data). Also a previous experiment based on Rose Bengal-stained organisms using Adriatic Sea faunas did not show a significant impact of up to two months of anoxia on the hard-shelled foraminiferal density (Moodley et al., 1997). Conversely, in a study on the temporal variability of densities in the Northern Adriatic Sea (close to the Po delta), total foraminiferal standing stocks tended to decrease by roughly 20% during periods of bottom water hypoxia in late summer (Duijnsteet et al., 2004). A previous laboratory study conducted in the Northern Adriatic Sea (also using RB staining) found lower standing stocks (roughly 30% fewer individuals) in cores incubated for 1.5 months in anoxic conditions (Ernst et al., 2005). Furthermore, considering that many foraminifera (of all common species) survived more than 10 months of anoxia, the decrease in density in the first week can hardly reflect decreasing oxygen concentration, especially since the sediment surface was oxic most of the time. This observation and the literature suggest that short-term anoxia (0 to 1 month) cannot explain the density drop; the observed differences reflect spatial patchiness. Nevertheless, the overall density decrease suggests that long-term anoxia (> 2 months) negatively impact density.

In the present study, the vertical density profiles (Figure 19) are very similar for all experimental cores, and are not significantly different from the “Normoxia” cores. In some other studies (Alve et Bernhard, 1995; Duijnsteet et al., 2003; Ernst et al., 2005; Pucci et al., 2009), densities between 2 and 4 cm de-

creased rapidly after the onset of hypoxia/anoxia. This was ascribed to upward migration. In our study, apparently no major vertical migration took place. The standing stocks in the whole cores (0-5 cm) do not differ significantly over time, unlike the standing stock in the first depth interval (0-0.5 cm). This difference may reflect biogeochemical changes (Metzger et al., 2013a): they were much more important in the uppermost sediment interval (which became anoxic, where macrofaunal mortality and degradation resulted in hydrogen sulphides release) than in deeper sediment intervals, which were already anoxic at the start of the experiment (oxygen penetration about 0.5 cm).

Benthic foraminifera were still alive in large numbers in the “1 Month” cores, for which the estimated hydrogen sulphides concentration in the water overlying the sediment exceeded 100 μM (Metzger et al., 2013a). The toxic nature of hydrogen sulphides for most metazoans could help explain the density decrease between the “1 Month” and “2 Months” cores (average values of ~ 930 and ~ 380 individuals per 10 cm^3 in the topmost 0-0.5 cm depth interval, respectively). In an earlier laboratory experiment using Northern Adriatic Sea sediments, (Moodley et al., 1998b) found that a 6 to 12 μM concentration of dissolved sulphides led to a significant decrease of the Rose Bengal-stained foraminiferal densities, from about 700 to 200 individuals per 10 cm^3 after 30 days of incubation, corresponding to about 4% per day. In our study the observed average decrease between 29 and 58 days from ~ 940 to

~760 individuals per 10 cm³ in the 0-5 cm interval, or from 460 to 200 individuals per 10 cm³ in the 0-0.5 cm layer, corresponds to a loss of 0.75% and 1.3% per day, respectively. These values are in the same order of magnitude as those obtained by (Moodley et al., 1998b). Thus, despite of the presence of high, toxic hydrogen sulphides concentrations (Fenchel et Finlay, 1995; Giere, 2008), a substantial part of the foraminifera survived up to 308 days of anoxic and sulphidic experimental conditions. The higher mortalities in other studies (Moodley et al., 1998b) may be due to the presence of additional stress factors in their experimental set-ups.

5.4.3. Potential response to labile organic matter availability

In the present experimental set-up, the availability of labile organic matter is another factor that could limit survival: the sealed benthic chamber blocks the sediment organic matter input by the pelagic system. This should considerably reduce labile organic matter availability and potentially starve the benthic faunas. Unfortunately no complete (and conclusive) organic carbon dataset is available to confirm such a trend. Nevertheless, the geochemical analyses indirectly show that organic matter availability varied during the experiment. A large input of hydrogen sulphides in the overlying water took place after one month of anoxia. Usually, sulphides are produced deep in the sediment and diffuse upwards. Conversely, after 1 month of anoxia, the source of the sulphide pool was positioned

at the sediment water interface (Metzger et al., 2013a). This shallow production of sulphides has been interpreted as due to the death of macrofaunal organisms (the already present macro-infaunal organisms as well as the two introduced brittle stars) in the early stages of the experiment, and their subsequent anaerobic degradation.

Unexpectedly, the geochemical data suggest that the organic matter content at the sediment-water interface did not decrease with time (due to the sealing of the chamber), but rather increased, peaking after 1 month, due to macrofaunal decay. The coincidence between the periods with maximum foraminiferal standing stocks and maximum estimated organic matter availability (at “Normoxia” and “1 Month”) suggests a causal relationship between the two parameters. Numerous previous studies show a clear foraminiferal response to organic matter input (e.g. Heinz et al., 2001; Ernst and van der Zwaan, 2004; Duijnsteet et al., 2005; Ernst et al., 2005; Nomaki et al., 2005; Pucci et al., 2009). Accordingly, increased labile organic matter (macrofaunal remains) could promote foraminiferal densities in the topmost sediment layer, despite the anoxic conditions. Equally, the considerable standing stock of benthic foraminifera in the “1 Month” samples could be the result of a reproduction event. This possibility is discussed in more detail for individual species in Langlet et al. (2013). Consequently, organic matter availability would have a stronger effect on foraminiferal density than both anoxia and hydrogen sulphides.

6. Conclusions

We performed an in situ experiment at a 24-m-deep site in the Gulf of Trieste. Benthic chambers enclosing abundant benthic foraminiferal faunas were installed on the sediment surface, which rapidly turned anoxic. Assuming the two independent methods employed here (CTG labeling and ribosomal RNA analysis) are accurate, cores sampled in chambers opened after 1 week, 1 month, 2 months and 308 days all contained abundant foraminiferal assemblages down to 5 cm depth in the sediment. Benthic foraminifera in the Gulf of Trieste are therefore capable of surviving anoxia with co-occurring sulphides for at least 10 months. Large differences between some of the replicate cores point to considerable spatial patchiness, which may be related to the irregular distribution of macro-infaunal burrowing activity, somewhat hampering the interpretation of the temporal trends in density. Nonetheless, our data show an exponential decrease in densities over time. Closer examination suggests slightly increased densities in the topmost 0.5 cm after one month, which we tentatively interpret as a response to increased labile organic matter availability due to macrofaunal mortality at the beginning of the experiment.

Acknowledgements. Authors would like to thank Dr. Joan Bernhard, who edited this paper and the special issue, and two anonymous reviewers for their constructive comments, which helped us to improve the manuscript. The corresponding author's research is funded by the Council of the Region Pays de la Loire.

This study is funded by the Austrian Science Fund (FWF project P21542-B17 and P17655-B03), supported by the OEAD "Scientific-Technical Cooperation" between Austria-France (project FR 13/2010) and Austria-Slovenia (project SI 22/2009), as well as the Swiss National Science Foundation (grant no. 31003A_140766). We would like to thank the director and staff of the Marine Biology Station in Piran for their support during this project, all the scuba divers for their involvement during the fieldwork and Grégoire Lognoné for his helpful contribution to the data acquisition.

Partie III. Foraminiferal species responses to in situ experimentally induced anoxia in the Adriatic Sea

D. Langlet¹, C. Baal², E. Geslin¹, E. Metzger¹, M. Zuschin², B. Riedel³, N. Risgaard-Petersen⁴, M. Stachowitsch³ and F.J. Jorissen¹

[1]{Université d'Angers, UMR CNRS 6112 LPG-BIAF - Bio-Indicateurs Actuels et Fossiles, 2 Boulevard Lavoisier, 49045 Angers Cedex, France}

[2]{University of Vienna, Department of Paleontology, Althanstrasse 14, 1090, Vienna, Austria}

[3]{University of Vienna, Department of Limnology and Oceanography, Althanstrasse 14, 1090, Vienna, Austria}

[4]{Aarhus University, Center for Geomicrobiology, Department of Bioscience, 8000 Aarhus C, Denmark}

Correspondence to: D. Langlet (dewi.langlet@univ-angers.fr)

1. Abstract

Anoxia was successfully induced in four benthic chambers installed at 24 m depth in the Northern Adriatic Sea for periods varying from 9 days to 10 months. During the 10 months period, species richness significantly decreased. Although no significant change in Shannon diversity and evenness was observed, the composition of the foraminiferal assemblages changed with time. This change is due to interspecific differences in tolerance to anoxia. *Reophax nanus*, *Textularia agglutinans* and *Quinqueloculina stelligera* all showed a significant decrease with time, strongly suggesting they are sensitive to anoxia. Conversely, *Eggerella scabra*, *Bulimina*

marginata, *Lagenammia atlantica*, *Hopkinsina pacifica* and *Bolivina pseudoplicata* appeared to be resistant to the experimental conditions. *Quinqueloculina seminula* was apparently sensitive to anoxia but showed a clear standing stock increase during the first month of the experiment, which we interpret as an opportunistic response to increasing organic matter availability due to the degradation of the dead macrofaunal organisms. None of the anoxia-sensitive species is able to accumulate intracellular nitrates. Nitrate accumulation could be shown for some tested specimens of the dominant anoxia-tolerant species *E. scabra* and *B. marginata*. However, tests on the denitrification capacity of these taxa yielded negative results, suggesting that their

resistance to long-term anoxia is not due to their ability to denitrify.

2. Introduction

Over the last decades, bottom-water hypoxia has occurred in an increasing number of coastal areas as a result of human-induced eutrophication as well as increased stratification, circulation changes and bottom-water temperature increase. In semi-enclosed basins, hypoxia may appear seasonally as a response to combined pelagic productivity and water column stratification. In the benthic environment, increased organic matter consumption leads to decreased dissolved oxygen concentration when seasonal water column stratification inhibits oxygen renewal. Seasonal oxygen depletion has been observed in the Adriatic Sea (Stachowitsch, 1984; Jorissen et al., 1992) with different intensity, varying from hypoxia (defined as $<63 \mu\text{mol L}^{-1}$; Helly and Levin, 2004) to anoxia (defined as $0 \mu\text{mol L}^{-1}$; Bernhard and Sen Gupta, 1999; Middelburg and Levin, 2009). The frequency of these low-oxygen events increased from the 1970s to the 1990s, to decrease again after the 1990s as a result of reduced continental nutrient inputs (Giani et al., 2012).

Oxygen depletion events can drastically affect benthic faunas. Macrofaunal organisms ($> 1 \text{ mm}$) are apparently more sensitive than meiofaunal organisms ($> 45 \mu\text{m}$ and $< 1 \text{ mm}$) to hypoxic and anoxic conditions (Moodley et al., 1997; Diaz et Rosenberg, 2008). Among meiofauna, copepods are most sensitive, whereas several nematode genera can survive

up to 60 days of anoxia (Wieser et Kanwisher, 1961). Benthic foraminifera appear to be most tolerant (Moodley et al., 1997) and can survive up to 10 months of anoxia (Bernhard et Reimers, 1991; Langlet et al., 2013b). This surprisingly long period may be due to a shift to anaerobic metabolism: some species of the eukaryotic benthic foraminifera can accumulate large quantities of nitrates in their cells and can denitrify during anoxia (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008; Piña-Ochoa et al., 2010a; Bernhard et al., 2012). Nonetheless, despite their high tolerance to anoxia, foraminiferal density and diversity tend to decrease in low-oxygen environments (Blackwelder et al., 1996; Schumacher et al., 2007; Bouchet et al., 2012). Furthermore, not all foraminiferal taxa respond similarly. For instance, in the Adriatic Sea some taxa (*Nouria polymorphoides*, *Reophax nanus* and *Textularia* spp.) appear to be sensitive to hypoxia/anoxia, whereas others (*Nonionella turgida*, *Bolivina* spp., *Eggerella* spp., *Bulimina* spp., *Hopkinsina pacifica* and *Stainforthia fusiformis*) are more tolerant (Jorissen et al., 1992; Moodley et al., 1998b; Duijnsteet et al., 2004; Ernst et al., 2005; Pucci et al., 2009). Note, however, that these valuable earlier results should be interpreted with caution because they are based on inventories of rose bengal stained faunas. Rose bengal is a bulk stain which adheres to proteins in the protoplasm (Walton, 1952; Bernhard, 2000). Since foraminiferal protoplasm may remain present after death of the organism, rose bengal can stain a non-negligible number of dead organisms (Boltovskoy et Lena, 1970;

Bernhard, 1988; Hannah et Rogerson, 1997; Murray et Bowser, 2000). The amount of false positives could even be more important in anoxic and hypoxic conditions due to the slow degradation of organic matter there (Burdige, 2006; Glud, 2008). To avoid such artefacts we used CellTracker™ Green (CTG) to recognize living individuals. CTG is a non-fluorescent probe that passes through the cellular membrane into the cytoplasm, where hydrolysis with nonspecific esterase produces a fluorescent compound (Bernhard et al., 2006). Consequently, fluorescent specimens were enzymatically active when sampled. This approach enabled us to accurately determine live individuals in our experimentally induced anoxia, and to distinguish between species more tolerant or more sensitive to anoxia.

The present study focuses on the northeastern Adriatic Sea, specifically the Gulf of Trieste, which is a recognized area for seasonal hypoxic/anoxic events and is also listed among the “spreading dead zones around the world” (Diaz et Rosenberg, 2008). To control the environmental conditions as best as possible, we adopted an in situ approach and experimentally generated anoxia by placing benthic chambers on the sea floor. The foraminiferal analyses reported in this study and in Langlet et al. (2013b) are complemented by geochemical analyses, demonstrating the changes of redox conditions during the experiment (Koron et al., 2013; Metzger et al., 2013a). Studies of macrofaunal behaviour (Riedel et al., 2008, 2012, 2013; Blasnig et al., 2013) and of copepod and nematode assemblages (De Troch et al., 2013; Grego et al., 2014)

show the impact of the experimentally induced anoxia on other biota. In a first paper Langlet et al. (2013b) determined the effect of anoxia on the total foraminiferal standing stocks. Benthic foraminifera were alive at all sampling times, proving that foraminifera can survive up to 10 months of anoxia with co-occurring hydrogen sulphides. In the present study, we focus on the effects of long-term anoxia on individual species, and on biodiversity. We determine how the density of the major species changes in response to anoxia, and distinguish between more or less resistant taxa. This approach will allow us to better understand the ecology of key species in foraminiferal communities. It will also provide information that may help us to select species for future laboratory experiments in hypoxic/anoxic conditions, for instance to develop proxies of paleo-oxygenation. Finally, we investigate whether survival of tolerant species can be explained by a shift to anaerobic metabolism (denitrification).

3. Material and methods

3.1. Study area

Two sites were sampled for the present study: a site in the Gulf of Trieste where the incubation experiment was conducted and a second site in the NW Adriatic Sea, where we collected living foraminifera for laboratory analyses. The field experiment was conducted in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea) near the oceanographic buoy of the Piran Marine Biology Station (45° 32.90'N, 13°33.00'E) at 24 m depth, on a poorly sorted

Tableau 9 – Deployment and sampling dates as well as duration of the experimental period for the cores representing in situ conditions (“normoxia”) and the various periods of anoxia in the four different benthic chambers

Sample ID	Chamber deployment day	Core sampling day	Incubation duration
Normoxia	-	03/08/2010	0 days
9 days	02/08/2010	11/08/2010	9 days
1 month	27/07/2010	25/08/2010	29 days
2 months	27/07/2010	23/09/2010	58 days
10 months	24/09/2010	05/08/2011	315 days

sandy silty bottom. This study site was chosen because of the presence of the oceanographic buoy, which permits mooring the boat from which the scuba divers operated. The buoy also helps protect the scientific equipment left on the sea floor for the long term experiment (up to 10 months) because commercial fishing activity (such as bottom-trawling and dredging) is forbidden around the buoy. In late summer, at this site, both the vertical density gradient and marine snow production can result in bottom-water hypoxia or anoxia (Faganelli et al., 1985; Malej et Malacic, 1995).

The experimental set-up has been adapted from an earlier experiment (Stachowitsch et al., 2007; Riedel et al., 2008) and has been described in Langlet et al. (2013b). In the field, we used four different chambers to produce anoxia for different periods of time (Tableau 9): the Experimental Anoxia Generating Unit (EAGU), which is a 0.125 m³ fully equipped (datalogger and sensor equipment, time-lapse camera) benthic chamber which enables experimentally inducing and documenting small-scale anoxia (Stachowitsch et al., 2007) as well as 3 simple plexiglass™ chambers, equally dimensioned.

The four chambers were installed on the sea floor, several meters apart, on substrates that

were visually poor in macrofauna. At the beginning of each experiment, two to three brittle stars (*Ophiothrix quinquemaculata*) which are very sensitive to oxygen were introduced into each chamber to provide rapid, visible indication of the onset of anoxia in each chamber. Two reference cores (termed “normoxia”) were sampled at the start of the experiment. In order to standardize the terminology for all articles of the present Biogeosciences Special Issue, the successive sampling times have been termed “9 days”, “1 month”, “2 months” and “10 months”. The exact duration (in days) of each of the experiments is given in Tableau 9. The first chamber was fully equipped with analytical devices, documenting the onset of anoxia. The other three chambers, without oxygen sensors, were used to study the development of meiofauna after ~1 month, ~2 months and about 10 months of anoxia, respectively. Foraminifera, copepods and nematodes were analyzed for the same cores. Sediment cores were taken by scuba divers using a Plexiglas corer with a 4.6 cm inner diameter (16.6 cm² surface area). Two replicate cores were taken in each of the benthic chambers at each sampling time.

Reliably measuring intracellular nitrate and denitrification requires a large number of

fresh and living individuals. The sediment from the Piran station is sandy and rich in dead foraminifera. It was extremely time consuming to find even a few living individuals. Therefore, in September 2012, sediment samples were collected with a Van Veen grab at 12 m depth at Portonovo Bay station D10 (43°35.5'N; 13°34.9'E), close to the site studied by Sabbatini et al. (2012) which is slightly finer grained and richer in living foraminifers. Samples were kept in plastic bottles in well oxygenated sea water (the lid of the bottles partly open) at in situ salinity and temperature (S=35 and T=22°C) until further analysis.

3.2. Faunal analysis

The methodology of the faunal analyses is described in detail in Langlet et al. (2013). Sediment cores of 4.6 cm inner diameter were sliced in 7 depth intervals, every 0.5 cm between 0 and 2 cm and every cm from 2 down to 5 cm. Each sediment slice was mixed with sea water, to which a CTG-DMSO (CellTracker™ Green CMFDA (5-chloromethylfluorescein diacetate); Molecular Probes®, Life Technologies™ and dimethyl sulfoxide) solution was added, with a final CTG concentration of 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (Bernhard et al., 2006; Pucci et al., 2009). Next, the samples were kept in the dark at in situ temperature for at least 10 h, during which the originally non-fluorescent CTG molecule is hydrolysed by the living individuals and transformed into a molecule which fluoresces when excited at a specific wave-length. In order to perform the faunal analysis at a later

stage, the samples were fixed in 4% formaldehyde buffered with sodium tetraborate.

A specific aspect of this project is that soft-shelled (nematodes, copepods) and hard-shelled meiofaunal organisms (foraminifera) have been studied in the same samples (De Troch et al., 2013; Langlet et al., 2013b; Grego et al., 2014). In order to separate these two groups of organisms, a density separation was performed by adding a Levasil solution to the sample and centrifuging it at 3000 rpm for 10 min (McIntyre et Warwick, 1984; Burgess, 2001). Next, the residue containing the sediment and the denser organisms (i.e. the hard-shelled foraminifera) was washed and sieved at different mesh sizes (63, 125, 150, 315 and 500 μm). Thus, soft-shelled foraminifera which are likely to be found in the supernatant after centrifugation are not considered in the present study. Samples were kept in a sodium tetraborate-buffered formalin solution until further analysis.

Foraminifera from the 63-125 μm size fraction were separated from the sediment by the tetrachloride density separation method (e.g., Hohenegger et al., 1989; Murray, 2006) as described by Langlet et al. (2013b). No density separation was performed for the size fractions larger than 125 μm . Samples from all fractions were analyzed under an epifluorescence stereomicroscope (Olympus SZX12 with a light fluorescent source Olympus URFL-T or Nikon SMZ 1500 with a PRIOR Lumen 200), and only clearly fluorescent individuals were considered as living.

3.3. Statistical analysis

After identifying all living individuals, they were sorted into different taxa, counted (Supplementary material 6 and Supplementary material 7) and expressed as standing stock (number of living individuals in the 0-5 cm depth interval normalized for a 10 cm² surface area), density (number of living individuals per depth interval normalized for a 10 cm³ sediment volume) and relative frequency (percentage of a species with respect to the total fauna). Next, species richness, the Shannon index and evenness were calculated (e.g. Hayek and Buzas, 1997).

Three different procedures were used to estimate the effect of the different parameters on the foraminiferal standing stocks and diversity indices. We systematically used linear models (Chambers et Hastie, 1992) in which the dependent (response) variable must follow a normal distribution. The statistical analyses were performed with R version 2.14 (R Development Core Team, 2011). In order to obtain a normal distribution, data transformation was sometimes necessary. In these

cases, we applied a log transformation for standing stocks and density, and an arcsin transformation for relative frequencies. Each of our three groups of models, which consider one to four dependent variables, is applied on different data sets (see column “data selection” in Tableau 10). In all models the number of independent variables is reduced by backward selection (i.e. variables having a significant effect on the dependent variable are progressively removed) to retain only the variables with a significant effect on the dependent variable. We could expect that the different tested variables did not necessarily show a gradual variation with the sampling time. Therefore the time variable was log-transformed. We also tested the effect of the square of the time in order to examine possible polynomial changes with time.

The first group of models tests the effect of time and time² on standing stock, species richness, Shannon index and evenness in two different samples categories (the > 125 µm or > 63µm size fractions in the whole core).

The second group of models is designed to identify whether time, time², depth and their

Tableau 10 - Name and number of the linear models. For each model type the different dependent and independent variables are listed and the used transformation is presented in brackets. As the models are executed on different data, the categories of the selection are presented.

Models names	Dependent variable (Transformation)	Independent variable (Transformation)	Data selection
Models 1 (x8)	Standing stock (log) Species richness Shannon index Evenness	Time (log) Time ² (log)	Size (>125µm and >63µm)
Models 2 (x18)	Standing stock (log) Frequency (arcsin)	Time (log) Time ² (log) Depth (0-0.5cm and 0-5cm) Time*Depth Time ² *Depth	Species (<i>R. nanus</i> , <i>E. scabra</i> , <i>B. marginata</i> , <i>T. agglutinans</i> , <i>Q. seminula</i> , <i>L. atlantica</i> , <i>H. pacifica</i> and <i>B. pseudoplicata</i> and <i>Q. stelligera</i>)
Models 3 (x6)	Standing stock (log) Frequency (arcsin)	Time (log) Time ² (log)	Response types (A, B, C)

interactions significantly affect the standing stocks and relative frequencies of the major species (> 4% in at least one core).

Finally, the third group of models tests the effect of time and depth and their interaction on the total standing stocks and the cumulative relative frequencies of three types of species, which have been selected in function of the results of the second group of models. Tableau 11, Tableau 12, and Tableau 17 show only those dependent variables with a significant effect, whereas Tableau 13 and Supplementary material 4 Supplementary material 5 show how each variable affects the dependent variables.

3.4. Nitrate content and denitrification measurements

The samples for living foraminifera, used in the denitrification experiments, were selected from well-oxygenated substrates (not from anoxic benthic chambers) from both study areas (Piran and station D10; see section 2.1). These samples were kept under oxygenated conditions at all times. Foraminifera were put on a thin layer of sediment (< 38 μm), and living individuals, which moved on the sediment film, were picked and washed at least 3 times with a brush in nitrate-free artificial sea water, before being put in a 1 mL centrifugation tube. Samples were kept at -20°C until further analysis. The intracellular nitrate content of single specimens was measured using the VCl_3 reduction method and detected by chemiluminescence as described previously (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008). For the present study a total num-

ber of 33 individuals were measured for 7 different species.

For denitrification measurements a maximum number of 7 living specimens were placed in an anoxic tube of 0.5 mm inner diameter containing nitrate-free sea water. Nitrate respiration rates were then determined from N_2O profiles measured with a N_2O micro sensors (Andersen et al., 2001) after acetylene inhibition of N_2O reduction (Smith et al., 1978; Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008). In all, five experiments were performed. Note that two of these experiments are pseudoreplicates because three to four individuals from the first set of measurements were re-used in the second experiment, after adding some more individuals in the measurement chamber.

4. Results

4.1. Effect of anoxia on standing stocks and diversity

In a first paper (Langlet et al., 2013b), we showed that foraminifera are alive at all sampling times in fairly large numbers (Figure 21). In the $>63 \mu\text{m}$ fraction, total standing stocks in the whole cores (0-5 cm) varied between ~ 1980 individuals per 10 cm^2 at the beginning of the experiment and ~ 530 ind. per 10 cm^2 at the end. In the whole cores we observed a significant decrease with time in the $> 63 \mu\text{m}$ fraction but not in the $> 125 \mu\text{m}$ size fraction (Figure 21, Tableau 11 and Supplementary material 5). According to the data presented in the present paper, also species richness tended to decrease with time (Figure 21).

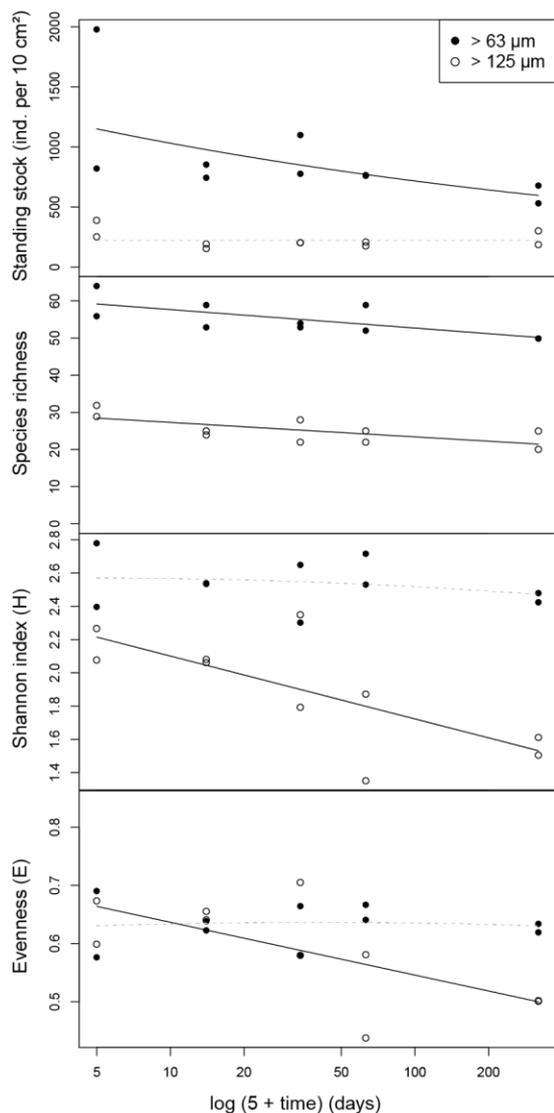


Figure 21: Standing stock, species richness, Shannon index and evenness variations with time in two size fractions (full circles: >63 µm and open circles: >125 µm). The lines are estimated after the “models 1” group, full black line indicates that for the considered size the relationship between the dependent variable and the independent variable is significant, while grey dashed lines indicate no significant relationship.

While 74 species were found in total, not all of them were present in all cores. A maximum of 64 species was observed in the > 63 µm

fraction of one of the “normoxia” cores (0-5 cm). Minimal values (50 species) were found in the “10 months” cores (Figure 21). Species richness significantly decreased with time in both the > 63 µm and > 125 µm size fractions (Tableau 11 and Supplementary material 5).

Both other diversity indicators (Shannon index and evenness) showed important differences between the > 63 µm and > 125 µm size fractions (Figure 21). In the > 63 µm fraction of the whole cores (0-5 cm), the Shannon index attained a maximum of 2.8 in one of the “normoxia” cores. Evenness varied (from 0.44 to 0.71) in the two size fractions. Both the Shannon index and the evenness significantly decreased with time in the >125 µm fraction, but not in the > 63 µm fraction (Figure 21, Tableau 11 and Supplementary material 5).

4.2. Species response to the experimental conditions

Here, we considered the nine major species ($\geq 4\%$ in one of the cores). The effect of time, time² and depth on their standing stocks and relative frequencies was tested by backward variable selection in order to retain only the independent variables that significantly affect the dependent variable. The analysis of variance is presented in Tableau 12, the estimation of the coefficients associated to the independent variables in Tableau 13.

Tableau 11 - Statistical parameters (Df: degrees of freedom, Sum Sq: Sum of Squares, Mean Sq: Mean of Squares, F value: value of the F-test, Pr(>F): probability of the F-test) for the models 1 at all sampled Size fractions and Depth intervals for the 4 tested dependent variables. For the cases where no significant effect of either the time or time² was observed, only the “residuals” parameters are estimated.

Dependent variable	Size	Independent variable	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Standing stock	>63µm	log(5 + time)	1	0,5	0,5	6,6	0,03
		residuals	8	0,6	0,1	NA	NA
	>125µm	residuals	9	0,7	0,1	NA	NA
Species richness	>63µm	log(5 + time)	1	92,6	92,6	8,3	0,02
		residuals	8	89,4	11,2	NA	NA
	>125µm	log(5 + time)	1	56,1	56,1	7,3	0,03
		residuals	8	61,5	7,7	NA	NA
Shannon index	>63µm	residuals	9	0,2	0,0	NA	NA
	>125µm	log(5 + time)	1	0,5	0,5	9,5	0,02
	>125µm	residuals	8	0,4	0,1	NA	NA
Evenness	>63µm	residuals	9	0,0	0,0	NA	NA
	>125µm	log(5 + time)	1	0,0	0,0	6,9	0,03
		residuals	8	0,0	0,0	NA	NA

Figure 22 and Supplementary material 1 showed the absolute densities and relative frequencies of the nine species in the whole cores (0-5 cm). *Reophax nanus*, *Quinqueloculina seminula*, *Hopkinsina pacifica*, *Bolivina pseudoplicata* and *Quinqueloculina stelligera* were

largely restricted to the 63-125 µm fraction, whereas *Bulimina marginata* was mainly found in size fractions below 150 µm (Figure 22). *Eggerella scabra* and *Textularia agglutinans* occurred in all size fractions below 315 µm, whereas *Lagenammina atlantica* was

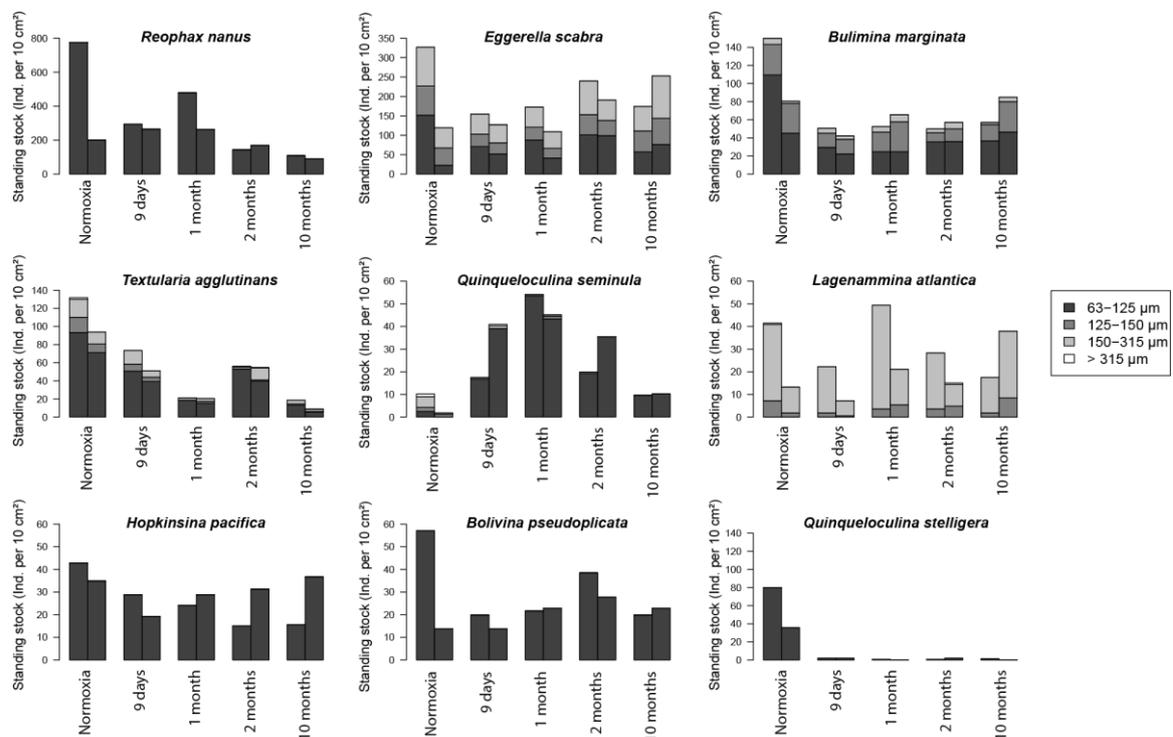


Figure 22: Standing stock of the 9 major species in all the sampled cores (two replicate cores each time) in all studied size fractions in the whole core (0-5 cm). Note the different vertical scales for the various species.

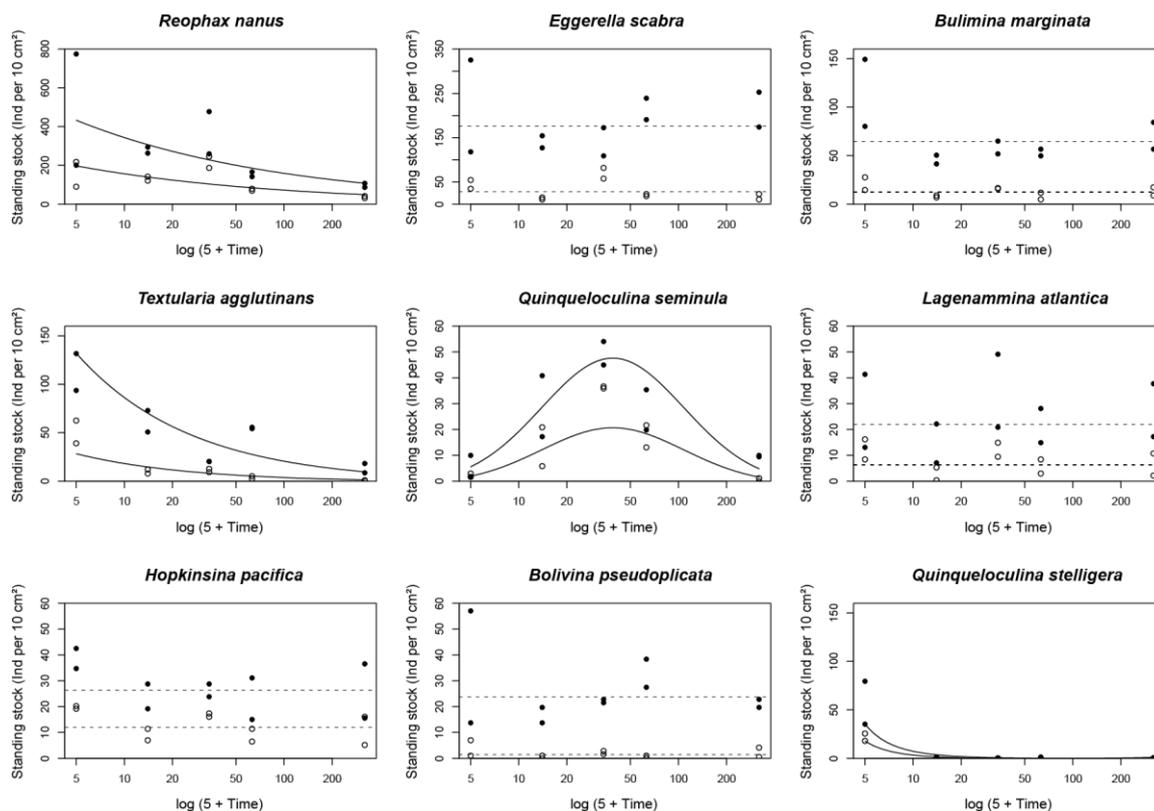


Figure 23: Standing stock variation with time and sampling depth (full circles: 0-5 cm, open circles 0-0.5 cm) for the 9 major species. The lines are estimated after the “models 2” group, full lines indicating a significant effect of time and dashed lines indicating a non-significant effect of time. Two lines are drawn for the significantly different depth intervals.

present almost exclusively in the $> 125 \mu\text{m}$ fraction (Figure 22).

The standing stock of *R. nanus* varied from ~ 780 ind. per 10 cm^2 in one of the two “normoxic” cores to ~ 90 ind. per 10 cm^2 in the “10 months” cores (Figure 22). The standing stocks significantly decreased with time (Figure 23 and Tableau 12), although a slight increase was observed in one of the “1 month” cores. Also for *E. scabra* the highest standing stocks were recorded in one of the “normoxic” cores (~ 330 ind. per 10 cm^2), whereas the lowest standing stocks occurred in the “9 days” and “1 month” samples (110 to 170 ind. per 10 cm^2). The standing stock increased slightly after 1 month (Figure 22), but

this trend was not significant (no significant effect of the time^2 parameter; Tableau 12).

Very similarly, also for *B. marginata* the highest standing stock was observed in one of the “normoxic” cores (~ 150 ind. per 10 cm^2), the lowest values in the “9 days” samples (~ 50 ind. per 10 cm^2 ; Figure 22). Also for this species, the standing stock apparently decreased in the first week, to remain stable thereafter until the end of the experiment. There was, however, no significant change with time (Figure 23). *Textularia agglutinans* showed a significant decrease of standing stock with time, from 130 to 90 ind. per 10 cm^2 in the “normoxia” cores to ~ 15 ind. per 10 cm^2 in the “10 months” samples (Figure 22 and Figure 23). *Quinqueloculina seminula*

Tableau 12 - Statistical parameters (Df: degrees of freedom, Sum Sq: Sum of Squares, Mean Sq: Mean of Squares, F value: value of the F-test, Pr(>F): probability of the F-test) for the models 2 for all the 9 major species and for the standing stock.

Species	Independent variable	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
<i>Reophax nanus</i>	log(5 + time)	1	4,4	4,4	21,2	< 10 ⁻³
	depth	1	3,1	3,1	14,8	0,001
	residuals	17	3,5	0,2	NA	NA
<i>Eggerella scabra</i>	depth	1	16,8	16,8	60,1	< 10 ⁻³
	residuals	18	5,0	0,3	NA	NA
<i>Bulimina marginata</i>	depth	1	12,5	12,5	75,1	< 10 ⁻³
	residuals	18	3,0	0,2	NA	NA
<i>Textularia agglutinans</i>	log(5 + time)	1	14,5	14,5	60,1	< 10 ⁻³
	depth	1	11,4	11,4	47,4	< 10 ⁻³
	residuals	17	4,1	0,2	NA	NA
<i>Quinqueloculina seminula</i>	log(5 + time)	1	0,1	0,1	0,3	0,58
	depth	1	3,3	3,3	10,1	0,01
	log(5 + time) ²	1	17,0	17,0	52,6	< 10 ⁻³
	residuals	16	5,2	0,3	NA	NA
<i>Lagenammia atlantica</i>	depth	1	6,6	6,6	15,1	0,001
	residuals	18	7,9	0,4	NA	NA
<i>Hopkinsinella glabra</i>	depth	1	2,7	2,7	17,4	0,001
	residuals	18	2,8	0,2	NA	NA
<i>Bolivina pseudoplicata</i>	depth	1	26,5	26,5	83,9	< 10 ⁻³
	residuals	18	5,7	0,3	NA	NA
<i>Quinqueloculina stelligera</i>	log(5 + time)	1	18,0	18,0	55,9	< 10 ⁻³
	depth	1	2,1	2,1	6,6	0,02
	log(5 + time) ²	1	12,7	12,7	39,2	< 10 ⁻³
	residuals	16	5,2	0,3	NA	NA

showed a very different pattern. Standing stocks were low at the beginning and end of the experiment (~10 ind. per 10 cm²). There was a statistically significant increase (Tableau 12) towards maximum values of ~50 ind. per 10 cm² in the “1 month” samples (Figure 23) followed by a decrease down to ~10 ind. per 10 cm² in the “10 months” samples.

Lagenammia atlantica, *H. pacifica* and *B. pseudoplicata* all varied between 15 and 60 ind. per 10 cm² (Figure 22). *Lagenammia atlantica* showed no clear changes with time, and the variability between replicate cores was high. The other two species showed a maximum in one of the “normoxia” cores. For none of these species was the change with time statistically significant (Tableau 12).

Finally, the standing stock of *Quinqueloculina stelligera* was 80 and 30 ind. per 10 cm² in the 2 “normoxic” cores, but was less than 5 ind. per 10 cm² in all anoxic cores, from “9 days” to “10 months” (Figure 22). Its standing stock decreased significantly with time and time² (Figure 23 and Tableau 12).

4.3. Three different response types to long-term anoxia

Based on the statistical tests presented in Tableau 12, we determined whether time and/or time² had a significant relationship with the standing stocks of the dominant species. These tests yielded three types of response (Tableau 13). The taxa of type A, which consist of *R. nanus*, *T. agglutinans* and *Q. stelligera*, all exhibited a significant de-

Tableau 13 - Estimation of the coefficient associated to independent variables after models 2 for the 9 major species. Only the independent variables having a significant effect on the standing stock are retained by the backward model selection. Depending on the presence or absence of a significant effect of time on the density and the coefficient sign, three types of responses have been determined.

Species	Response type	Time	Time ²	Depth
<i>Textularia agglutinans</i>	A	-0,61		-1,51
<i>Reophax nanus</i>	A	-0,33		-0,78
<i>Quinqueloculina stelligera</i>	A	-3,73	0,41	-0,65
<i>Eggerella scabra</i>	B			-1,83
<i>Bulimina marginata</i>	B			-1,58
<i>Lagenammina atlantica</i>	B			-1,15
<i>Hopkinsina pacifica</i>	B			-0,74
<i>Bolivina pseudoplicata</i>	B			-2,30
<i>Quinqueloculina seminula</i>	C	3,49	-0,48	-0,81

crease in standing stocks with time. Type B is composed of *E. scabra*, *B. marginata*, *L. atlantica*, *H. pacifica* and *B. pseudoplicata*, which did not exhibit a significant effect of time. Finally, the response type C contained only *Q. seminula*, which showed a significant effect of both time (positive) and time² (negative); its standing stock significantly increased

in the first month of the experiment, and decreased thereafter until the end of the experiment.

4.4. Species microhabitats

For most of the species, density decreased gradually with sediment depth (Figure 24). Nevertheless, some species had fairly high densities at the sediment-water interface as well as deeper in the sediment (between 1.5 and 4 cm). This was especially the case for response-type B species. *E. scabra* and *B. marginata*, and to a minor degree *H. pacifica*, all showed maximum values both at the sediment-water interface and in a deeper sediment layer. *Bolivina pseudoplicata* showed a peak in the 0.5-2 depth interval, whereas *L. atlantica* and *Q. stelligera* showed fairly high densities from the sediment-water interface down

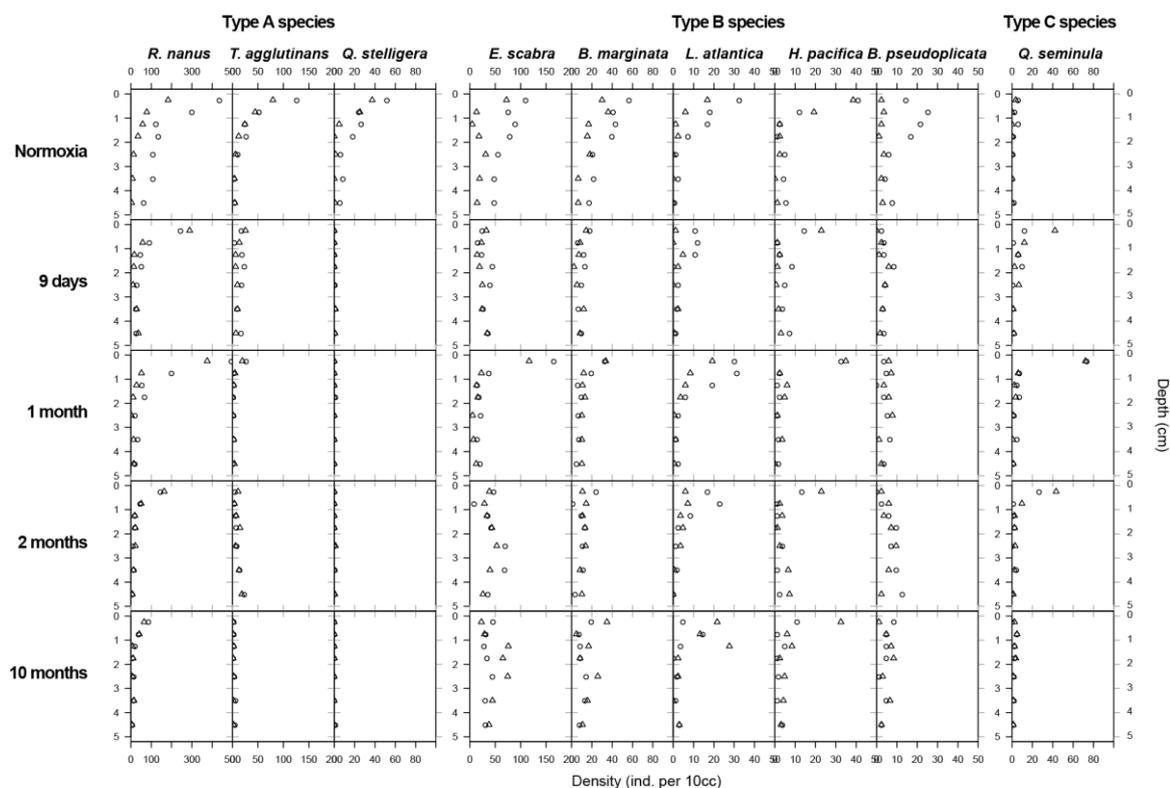


Figure 24: Relationship between sediment depth and foraminiferal density for the 9 major species at all sampling times. Open circles and triangles represent replicate cores 1 and 2, respectively.

Tableau 15 - Nitrate contents (in pmol) for 7 different species of the two response types A and B from two sampling sites (the Gulf of Trieste station Piran and the station D10 on the west coast of the Adriatic Sea). The number of tested individuals (n), the number of individuals with a nitrate content different from 0, the mean nitrate content, the minimum measured nitrate content, the minimum nitrate content different from 0 and the maximum measured nitrate content.

Species	Type	Site	Nitrate content (pm)					
			n	n (N ≠ 0)	mean	min	min (N ≠ 0)	max
<i>Leptohalysis scotii</i>	A	Piran	2	0	0	0	-	0
<i>Textularia agglutinans</i>	A	Piran	3	0	0	0	-	0
<i>Fissurina</i> sp.	A	Piran	1	0	0	0	-	0
<i>Nonion</i> spp.	A	Piran	2	0	0	0	-	0
<i>Ammonia beccarii</i>	A	D10	4	0	0	0	-	0
<i>Eggerella scabra</i>	B	Piran	2	0	0	0	-	0
<i>Eggerella scabra</i>	B	D10	9	3	22	0	37	119
<i>Bulimina marginata</i>	B	Piran	9	1	1	0	8	8
<i>Bulimina marginata</i>	B	D10	1	1	433	433	433	433

to 2 cm depth (Figure 24).

For all these species, no major change of the vertical distribution was recorded between the different sampling times (Figure 24). A complementary statistical model indicated that only *E. scabra*, *T. agglutinans*, *Q. seminula* and *Q. stelligera* had significantly different vertical distributions at the different sampling times. These differences, however, were largely due to density changes in the 0-0.5 cm layer and did not appear to reflect a potential vertical migration of the foraminiferal faunas.

4.5. Nitrate content and denitrification

Only five of the 33 tested individuals from seven different species contained nitrate in

their cells (Tableau 15). Among the tested major species, the two *R. nanus* individuals did not have measurable nitrate in their cells. Also the two tested *E. scabra* individuals from “normoxic” conditions in Piran gave a negative result. Conversely, three of the nine tested *E. scabra* individuals from station D10 from the western Adriatic Sea showed a nitrate content varying between 37 and 119 pmol. One of the nine tested *B. marginata* specimens from Piran contained 8 pmol of nitrate, whereas the only tested individual from station D10 yielded 433 pmol (Tableau 15). None of the three tested *T. agglutinans* and the seven tested individuals of three non-major species (*Fissurina* sp., *Nonion* spp., *Ammonia beccarii*) contained any nitrate.

Several individuals of *E. scabra* and *B.*

Tableau 14 - Denitrification rates of the two tested species from two different sites. The number of individuals added to the measurement chamber is indicated. In two cases some individuals were re-used in a second set of measurements, generating pseudoreplication; the number of individuals used in the second set of measurements is indicated.

Species	Site	Nb. Indiv.	Pseudoreplication	Rate (pmol indiv ⁻¹ d ⁻¹)
<i>Eggerella scabra</i>	Piran	4	4 indiv. (set 1)	0
<i>Eggerella scabra</i>	Piran	7	4 indiv. (set 2)	0
<i>Eggerella scabra</i>	D10	7		0
<i>Bulimina marginata</i>	Piran	3	3 indiv. (set 1)	0
<i>Bulimina marginata</i>	Piran	6	3 indiv. (set 2)	0

marginata were tested for their capacity to denitrify. None of the tests revealed denitrification (no detectible N₂O production; Tableau 14).

5. Discussion

5.1. Sediment geochemistry and faunal response to experimentally induced anoxia

In this experiment, not only benthic forami-

nifera, but also sediment geochemistry (Koron et al., 2013; Metzger et al., 2013a), macrofaunal behaviour (Blasnig et al., 2013; Riedel et al., 2013) and soft-shelled meiofauna (copepods and nematodes; De Troch et al., 2013; Grego et al., 2014) have been analyzed. Sediment geochemistry analyses enabled following the development of the anoxia at the beginning of the experiment. The oxygen concentration started to decrease as soon as the chamber was closed, and anoxia was reached

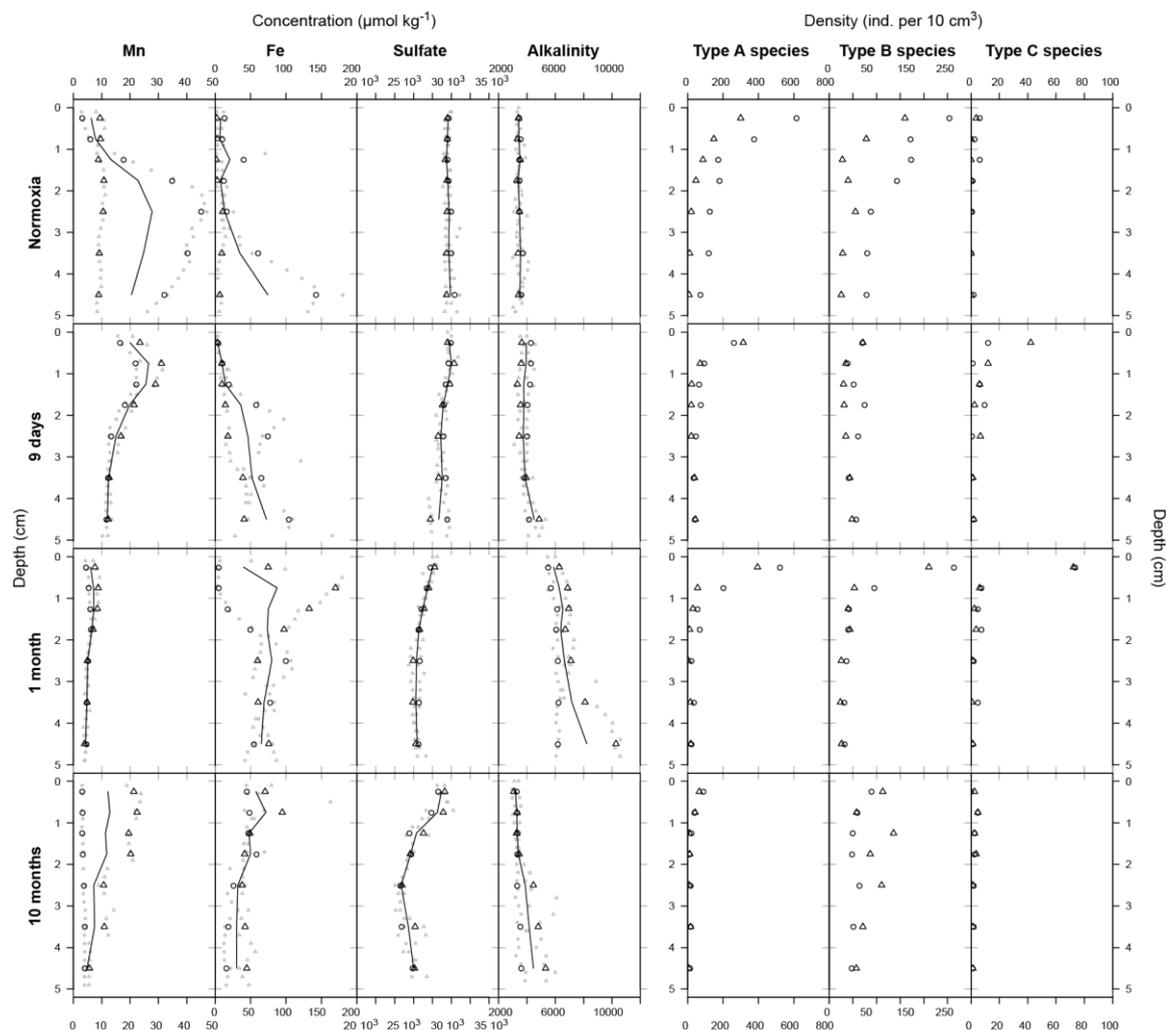


Figure 25: Vertical profiles of dissolved manganese, iron, sulfates and alkalinity with sediment depth at all sampling points after data presented in Metzger et al. (2013a) and vertical profiles of the total densities of the types A, B and C species. The raw geochemistry data are presented as small grey open circles and triangles for the two replicate probes. Large black open circle: concentration values averaged for each depth interval (0-0.5cm, ... 4-5 cm), black line: average for both replicates. The foraminiferal densities are presented as open circles and triangles for cores 1 and 2, respectively.

after 7 days, two days before the “9 days” benthic chamber was sampled. The available geochemical information (Metzger et al., 2013a) shows an upward migration of the redox fronts indicating that the overlying water remained anoxic with reducing conditions until the end of the experiment (Figure 25). The data also showed that nitrates were available in the pore water at all times (Koron et al., 2013).

At the beginning of the experiment, 2 to 3 brittle stars were placed in each chamber. The brittle stars died after 7 to 15 days of deployment, and shortly after their death the sediment surface turned black. After ~5 to 10 days, several infaunal organisms such as polychaetes and bivalves emerged from the sediment, to finally die on the sediment surface some days later. We hypothesize that the death of these macrofaunal organisms provided a considerable amount of fresh organic matter that was degraded by anaerobic pathways. The anaerobic degradation of this newly available organic matter released considerable amounts of hydrogen sulphides at the sediment-water interface and in the overlying water, which has been clearly observed in the “1 month” samples (Metzger et al., 2013a).

In the present contribution we did not model the effect of geochemical changes on the foraminiferal response for three reasons: 1) different dataset structures (the “2 months” samples were not analyzed in Metzger et al. (2013a) and the vertical resolution of the geochemical measurements differs from that of the faunal analyses), 2) the impossibility to estimate benthic fluxes (due to the lack of

stirring in the benthic chamber) and 3) statistical limitations (due to the strong inter-correlation of all the measured geochemical descriptors, making linear modeling impossible). Instead, we chose to first describe the temporal changes in the geochemical conditions to later quantify the effect of time on the foraminiferal faunas. This approach permits to discuss indirectly (via the temporal changes) the effect of the pore-water chemistry on the foraminiferal faunas.

5.2. Variation of foraminiferal standing stocks and diversity

The temporal variability of the total foraminiferal standing stock has been described in detail by Langlet et al. (2013b). These authors concluded that - as shown by the statistical analyses -the variability appears to be explained by the changes in the experimental conditions rather than by spatial patchiness. Their data conclusively show that benthic foraminifera were alive at all the sampling times. Consequently, foraminifera can survive “10 months” of anoxia. Nevertheless, the total foraminiferal standing stock significantly decreased with time, interrupted by slightly higher values in the “1 month” cores. Langlet et al. (2013b) tentatively interpreted this increase as a response to organic matter release due to macrofaunal mortality.

A total of 74 taxa was observed. Since eight from the nine major species were found alive in all samples, even after “10 months” of anoxia (Figure 21), the changes in species richness are exclusively caused by minor species

and by *Quinqueloculina stelligera* (which did not show any living individuals in one of the replicates cores of the “1 month” and “10 months” chambers). Species richness of the whole cores significantly decreased with time, but for the 0-0.5 cm interval, this trend was not significant in the > 63 μm fraction. This decrease is apparently explained by the disappearance of some of the less common species, which may be less resistant to the experimental conditions than the dominant species.

The two other diversity indexes (Shannon index and evenness) show a significant decreasing trend only in the >125 μm fraction (Tableau 11). The lack of significant trends in the >63 μm fraction can be explained by the fact that the faunas of the small size fraction (63-125 μm) were dominated (up to > 40%) by *Reophax nanus* (Figure 22). The absolute as well as relative frequency of this species decreased with time (Supplementary material 1, Supplementary material 2 and Supplementary material 3), leading to a higher evenness and Shannon index for the fine fraction; this may compensate the significant decreasing tendency of these indices in the > 125 μm fraction.

In general, the diversity of foraminiferal assemblages is low in permanently hypoxic areas, such as Oxygen Minimum Zones (reviewed in Koho and Piña-Ochoa, 2012) as well as in seasonally hypoxic areas, such as the Gulf of Mexico (Blackwelder et al., 1996) or the shallow Skagerrak coast (Nordberg et

al., 2000; Filipsson et Nordberg, 2004; Bouchet et al., 2012). In this context, it is surprising that the decrease of foraminiferal diversity with time is not clearer in our data.

5.3. Species responses to experimentally induced anoxia

Based on the temporal variability of the standing stocks of individual taxa, three types of responses to anoxia have been recognized: the taxa of type A show a significant decrease with time, for the species of type B there is no significant trend, whereas *Q. seminula* is the only species of type C, which shows a significant maximum in the “1 month” cores. The next chapter considers all species of these three response types in more detail, in the hope that our observations may contribute to a better understanding of their ecology. For 65 taxa the relative frequency is always lower than 4%. These taxa have been arbitrarily separated into 7 taxonomic groups. Four groups show a significant decrease of their cumulative standing stocks with time: 1) *Ammonia/Aubignina* spp., 2) *Elphidium/Nonion/Haynesina* spp., 3) non fossilizing agglutinated taxa and 4) miliolids. Conversely, 1) bolivinids, 2) buliminids and 3) the group of epiphytic taxa do not show a significant decrease in cumulative standing stocks with time.

Tableau 16 - Type of environment, microhabitat, and response to anoxia in the literature and in the present study for all the major species (their synonymous names are also given). Abbreviations: O₂ = oxygen or oxygenated, OM = organic matter, N = density or standing stock, relativ. = relatively, M = months.

Species	Other names	Distribution	Literature		Present study	
			Microhabitat	Response to anoxia	Microhabitat	Response to anoxia
<i>Reophax nanus</i>	<i>R. nana</i>	Coastal environnements	Deep infaunal (8, 9, 10)	Tolerant to low O ₂ (11)	Shallow infaunal	Type A
	<i>Cuneata arctica</i>	Vigo estuary (1)	Shallow infaunal (1, 6)	Indicator of OM rich (12, 13)		Decrease of N
	<i>Acostata mariae</i>	Skagerrak (2)		No change of N in low-O ₂ (9, 10)		N relativ. high after 10M
		Mediterranean shelf (3) Adriatic sea (4,5) Gulf of Trieste (6,7)		Decrease of N in anoxia (14,15)		
<i>Textularia agglutinans</i>		Coastal environnements Mediterranean Sea	Unclear Deep infaunal (9)	In O ₂ sediments (5, 17) No change of N in low-O ₂ (9)	Shallow infaunal	Type A Decrease of N
		Rhone prodelta (16, 17) Adriatic sea (18, 19, 20, 7)				
<i>Quinqueloculina stelligera</i>		Coastal environnements Gulf of Cadiz (21)		Undescribed Considered as indicator of high-O ₂ (24)	Shallow infaunal	Type A Strong decrease of N
		Mediterranean Sea (22) Tyrrhenian Sea (23)				
<i>Eggerello scabra</i>	<i>Eggerelloides scabra</i>	Subtidal, coastal and shelf environments (1, 25) Adriatic Sea (4, 6, 7, 26, 27)	Infaunal (4, 8, 9, 18)	Tolerant to hypoxia and anoxia (1, 8) Increase of N in hypoxia (28)	Deep infaunal	Type B No change of N
<i>Bulimina marginata</i>	<i>B. aculeata</i>	Cosmopolitan	Unclear (34)	Can survive episodes of severe hypoxia/anoxia (4, 5, 28, 35)	Deep infaunal	Type B
	<i>B. denudata</i>	Atlantic Ocean (29) Mediterranean Sea (5, 10, 16, 30, 31, 32, 33) Adriatic Sea (18) Gulf of Trieste (6)	Shallow infaunal Intermediate infaunal Deep infaunal			No change of N
<i>Lagenamina atlantica</i>	<i>Saccamina atlantica</i>	Continental shelves (25) Brackish waters (25)			Shallow/intermediate infaunal	Type B No change of N
	<i>Hopkinsina pacifica</i>	<i>Hopkinsinella glabra</i>	River-influenced inner shelf (1, 4, 16, 18) 10, 18)	Can survive in anoxia (10)	Shallow infaunal	Type B
	<i>Hopkinsina atlantica</i>	Northern Adriatic Sea (6, 8, 9, 10, 14, 20)				No change of N
<i>Bolivina pseudoplicata</i>		Transitional environments (1, 36, 37) Adriatic Sea (6, 19)			Deep infaunal	Type B No change of N
<i>Quinqueloculina seminula</i>		Continental shelves (25) Mediterranean lagoons (25) Adriatic Sea (38) Gulf of Trieste (6)		Sensitive to anoxia (15)	Shallow infaunal	Type C Opportunistic response to OM

References
1: Di z and Francés (2008), 2: Alve and Goldstein (2010), 3: Hyams-Kaphzan et al. (2009), 4: Barmawidjaja et al. (1992), 5: Donnici and Serandrei Barbero (2002), 6: Hohenegger et al. (1993), 7: Sabbatini et al. (2010), 8: Ernst et al. (2002), 9: Duijnste et al. (2003), 10: Ernst et al. (2005), 11: Semensatto-Jr. et al. (2009), 12: Scott et al. (2001), 13: Mojtabid et al. (2008), 14: Moodley et al. (1997), 15: Moodley et al. (1998), 16: Mojtabid et al. (2009), 17: Goineau et al. (2011), 18: Jorissen et al. (1992), 19: Barmawidjaja et al. (1995), 20: Duijnste et al. (2004), 21: Mendes et al. (2012), 22: Matsu-Vicens et al. (2010), 23: Celia Magno et al. (2012), 24: Di Bella et al. (2011), 25: Murray (2006), 26: Stigter et al. (1998), 27: Sabbatini et al. (2012), 28: Pucci et al. (2009), 29: Jorissen et al. (1998), 30: Jorissen (1987), 31: De Rijk et al. (2000), 32: Di Leonardo et al. (2007), 33: Schmiel et al. (2000), 34: Jorissen (1999), 35: Geslin et al. (2014), 36: Cearreta et al. (2000), 37: Debenay et al. (2006), 38: Frontalini and Cocconi (2011)

In the following subsections we discuss the changes of standing stock and the vertical migration for each of the major species of each response type. The discussion on each species is summarized in Tableau 16.

5.3.1. Response-type A

Response-type A is composed of *R. nanus*, *T. agglutinans* and *Q. stelligera*. The first two species, which are the most dominant in the assemblages, are both agglutinants, whereas *Quinqueloculina stelligera* has a porcelaneous shell. All three species show a significant decrease in standing stock with time (Figure 23 and Tableau 12). They appear therefore to be sensitive to the experimental conditions of long-lasting anoxia with a presence of hydrogen sulphides.

Sediment geochemistry data presented in Metzger et al. (2013a) show a clear upward migration of the production fronts of dissolved manganese, iron and alkalinity and of the sulfate consumption front (see Figure 25). That upward migration of the redox fronts appears gradually with the experiment duration. In parallel, the foraminiferal vertical distribution shows that at all sampling time, species from type A are present essentially at the sediment-water interface. These type-A species do not show any major sign of vertical migration with time (Figure 25). Therefore, they do not seem to track the sediment geochemistry changes. The anoxia-sensitive character of these species might explain their incapacity to move and migrate in anoxic conditions.

Reophax nanus

Reophax nanus is present mainly in the 63-125 µm size fraction. This species appears to be sensitive to the experimental conditions (Figure 23 and Tableau 12). In spite of the centrifugation treatment applied to separate the soft-shelled meiofauna from both the hard-shelled meiofauna and the sediment lattice, *Reophax nanus* was present in large numbers at all sampling times. It could have been expected that the centrifugation treatment would destroy very fragile foraminiferal species such as *R. nanus*. In spite of the large numbers, our density and standing stock estimates of this species might be slightly underestimated. It has been previously described under different names (*Reophax nana*, *Cuneata arctica* or often *Acostata mariae*) and is common in coastal environments such as the Skagerrak (Alve et Goldstein, 2010), the North-Eastern Mediterranean shelf (Hyams-Kaphzan et al., 2009) or in low densities in the Vigo estuary (Diz et Francés, 2008). This species is found frequently in the Adriatic Sea (Barmawidjaja et al., 1992; Donnici et Serandrei Barbero, 2002) and, more specifically, in the Gulf of Trieste (Hohenegger et al., 1993; Sabbatini et al., 2010).

Reophax nanus has been described mostly in eutrophic places such as muds flats in a Brazilian mangrove (Semensatto-Jr. et al., 2009), where the authors suggested that it could be tolerant to exposure to low-oxygenation. This species has also been considered as a good bio-indicator of organic-rich conditions (Scott et al., 2001; Mojtahid et al.,

2008). Several experiments were conducted to identify the effect of low oxygen concentration on the Adriatic Sea faunas. Some studies reported that the density of *R. nanus* was not influenced by low-oxygen conditions (Duijnsteet et al., 2003; Ernst et al., 2005). Conversely, in other assays of rose bengal stained assemblages, lower densities were observed in anoxia with and without co-occurring hydrogen sulphides (Moodley et al., 1997, 1998b). Summarising, although in the literature the response of this species to low-oxygen settings is not clear, in the present study it shows a clear decrease in standing stock with time.

Reophax nanus was described earlier as a deep infaunal species and can potentially reproduce deep in the sediment (Ernst et al., 2002, 2005; Duijnsteet et al., 2003), while in both the present study, in Diz and Francés (2008) and in Hohenegger et al. (1993) *R. nanus* is found mostly in the shallowest first centimeter of the sediment. This species migrated upward in response to an organic matter pulse in well-oxygenated conditions (Ernst et al., 2005).

Despite its apparent sensitivity to anoxia, *R. nanus* is still alive in substantial numbers after “10 months” of anoxia. We can therefore confirm that although it prefers well-oxygenated settings, *R. nanus* is able to survive anoxia with co-occurring hydrogen sulphides. Nonetheless, the significant decrease of its relative frequencies (Supplementary material 2 and Supplementary material 3) suggests that it is less resistant than most other dominant species.

Textularia agglutinans

Textularia agglutinans was found alive in all size fractions, with larger numbers in the 63-125 µm fraction (Figure 22). Its standing stock significantly diminishes with time, and in the sediment column it quickly disappears in deeper levels (Figure 23, Figure 24 and Tableau 12). Both observations suggest a limited tolerance of anoxia. *Textularia agglutinans* has been widely described in the Mediterranean, for instance in the Rhone prodelta (Mojtahid et al., 2009; Goineau et al., 2011), the Marmara Sea (Armynot du Châtelet et al., 2013) and also in the Adriatic Sea (Jorissen et al., 1992; Barmawidjaja et al., 1995; Duijnsteet et al., 2004; Sabbatini et al., 2010). Its ecological preferences are not well established. Duijnsteet et al. (2003) described it as a deep-dwelling species showing no vertical migration or standing stock changes in experimentally induced anoxia. Conversely, *T. agglutinans* is common in the distal zone of the Rhone prodelta, where the surface sediment is well oxygenated and where the oxygen penetration depth is relatively high (Goineau et al., 2011). It is also abundant in less eutrophic and better oxygenated areas off the Po delta (Donnici et Serandrei Barbero, 2002). Most of these observations corroborate our conclusion that *T. agglutinans* is sensitive to bottom-water anoxia and co-occurring hydrogen sulphides.

Quinqueloculina stelligera

Quinqueloculina stelligera is found alive only in the finest size fraction (63-125 µm; Figure 22). Its standing stocks show a strong

and significant decrease with time, as it is almost exclusively found alive in the “normoxic” conditions (Figure 23 and Tableau 12). In these well-oxygenated conditions it lives in the two upper centimeters of the sediment (Figure 24). *Quinqueloculina stelligera* has been described from infralittoral areas in the Gulf of Cadiz (Mendes et al., 2012) and in low quantities in sediment colonized by *Posidonia oceanica* in the Mediterranean Sea (Mateu-Vicens et al., 2010). In the Tyrrhenian Sea, its distribution seems to be controlled by sediment type, since it is almost exclusively found on fine sands (Celia Magno et al., 2012). However, *Q. stelligera* is also described in stations polluted with Fe, Pb, Zn and PAHs and was consequently considered as pollution-tolerant (Romano et al., 2009). Although it appears to be resistant to heavy-metal pollution it has not been described before in low-oxygen environments. Consequently, in a paleontological record of the ancient harbor of Claudius, the presence of *Q. stelligera* was interpreted as indicative of a well-oxygenated environment (Di Bella et al., 2011). In the present study, the instantaneous (and significant) collapse of its standing stocks early in the experiment suggests that it is highly sensitive to anoxia.

5.3.2. Response type B

Response-type B is composed of two agglutinated species (*E. scabra* and *L. atlantica*) and three calcareous species (*B. marginata*, *H. pacifica* and *B. pseudoplicata*). The standing stocks of these taxa do not decrease significantly with time (Figure 23 and Tableau 12),

suggesting strong resistance to the experimental conditions.

The vertical distribution of the type-B species shows that they are found living at all sampling depths at all times. In the “9 days”, “2 months” and “10 months” samples their densities are comparable at all depths, while in “normoxia” and in the “1 month” samples their vertical distributions show both considerable densities in deeper sediment layers and a peak at the sediment-water interface (Figure 24). This peculiar distribution could reflect organic matter availability. As explained above, we suspect that organic matter availability is larger in “normoxic” conditions and after 1 month of the experiment, due to aerobic and anaerobic degradation and the decay of the dead macrofauna. The anoxia-resistant species would therefore show a peak density at the sediment-water interface when the organic matter availability was maximal there. Consequently, these species seem to track changes in the organic-matter availability rather than changes in the pore-water chemistry. In our first paper we suggested that organic-matter availability is the main parameter explaining changes of the foraminiferal standing stocks (Langlet et al., 2013b). Many previous studies show a clear response of foraminiferal faunas to organic matter input (Heinz et al., 2001; Ernst et van der Zwaan, 2004; Duijnste et al., 2005; Ernst et al., 2005; Nomaki et al., 2005a; Pucci et al., 2009). We now suspect that also the foraminiferal vertical distribution is more likely explained by changes in the organic matter availability than

by the development of anoxia and by changes in pore-water chemistry.

Eggerella scabra

In the present study, *Eggerella scabra* (= *Eggerelloides scabra*; Hohenegger et al., 1993; Diz and Francés, 2008) is present in all size fractions from 63 to 315 μm (Figure 22). Its standing stock does not change significantly with time (Figure 23 and Tableau 12). It penetrates relatively deep into the sediment, showing substantial numbers down to 5 cm depth (Figure 24). *Eggerella scabra* is a very common species in subtidal, coastal and shelf environments (Murray, 2006; Diz et Francés, 2008), and is a common species in the Adriatic Sea (Jorissen et al., 1992; Hohenegger et al., 1993; Stigter et al., 1998; Sabbatini et al., 2010, 2012). It has been reported in sediments enriched in organic matter (Stigter et al., 1998; Donnici et Serandrei Barbero, 2002), more specifically in sediments with low-quality organic matter (Diz et Francés, 2008; Duchemin et al., 2008; Goineau et al., 2011). *Eggerella scabra* has also been considered as tolerant to hypoxic and/or anoxic conditions (Ernst et al., 2002; Diz et Francés, 2008). In a laboratory experiment, Pucci et al. (2009) observed an increased standing stock of *E. scabra* after a 15-day incubation in strongly hypoxic conditions. *Eggerella scabra* is generally described as an infaunal species (Barmawidjaja et al., 1992; Jorissen et al., 1992; Ernst et al., 2002; Duijnste et al., 2003). As in our cores, it is often found throughout the first 5 cm of the sediment column without a clear maximum at a specific depth (Ernst et

al., 2006; Pucci et al., 2009). Our data clearly confirm the capacity of *Eggerella scabra* to survive anoxia with co-occurring hydrogen sulphides. This species can be considered as highly resistant to such anoxic conditions.

Bulimina marginata

Bulimina marginata was alive in all size fractions from 63 to 315 µm and showed no significant change in its standing stock with time (Figure 22, Figure 23 and Tableau 12). This cosmopolitan taxon is well known in the Atlantic Ocean (e.g. Jorissen et al., 1998) and Mediterranean Sea (Jorissen, 1987; De Rijk et al., 2000; Schmiedl et al., 2000; Donnici et Serandrei Barbero, 2002; Ernst et al., 2005; Di Leonardo et al., 2007; Mojtahid et al., 2009). It occurs in continental shelf and slope environments, and abundant faunas have been described from the Adriatic Sea (Jorissen et al., 1992) and especially from the Gulf of Trieste (Hohenegger et al., 1993). Jorissen (1988) noted that three main morphotypes occur in the Adriatic Sea. Typical morphotypes, with well-developed undercuts, occur in outer shelf and upper slope settings. *Bulimina aculeata* morphotypes with a fusiform, slightly twisted initial part are found mainly on the continental shelf, whereas *B. denudata* morphotypes with weakly developed undercuts, are dominant at eutrophic inner shelf sites (Jorissen, 1988). Based on molecular phylogenetic analyses, Tsuchiya et al. (2008) concluded that these morphotypes are genetically different and should be considered as biological species. In our material, *denudata* and *aculeata* types dominated.

Bulimina marginata is generally considered to be an eutrophic taxon typical for areas with high organic carbon loads, where it may show an opportunistic behavior (Zwaan et Jorissen, 1991; Schmiedl et al., 2000; Donnici et Serandrei Barbero, 2002; Langezaal et al., 2006; Mojtahid et al., 2006). Because this taxon can survive episodes of severe hypoxia/anoxia (Barmawidjaja et al., 1992; Donnici et Serandrei Barbero, 2002; Pucci et al., 2009; Geslin et al., 2014), it is generally considered stress-tolerant, although some authors suggested that it may prefer well-oxygenated conditions (Alve et Bernhard, 1995; Donnici et Serandrei Barbero, 2002; Ernst et al., 2005; Mojtahid et al., 2006). Our observations, with no significant changes in standing stocks after “10 months” of anoxia, fully confirm its resistance to anoxia with a presence of hydrogen sulphides.

The microhabitat of *Bulimina marginata* is not well defined. In the literature, it has been described as a shallow, intermediate or even deep infaunal taxon (see review in Jorissen, 1999). *Bulimina marginata* may find suitable environmental conditions at the sediment surface as well as deeper in the sediment. In our study, abundant occurrences in deeper sediment intervals confirm its potentially infaunal character (Figure 24).

Several authors have suggested that *Bulimina marginata* can migrate rapidly through the sediment, which could explain their often chaotic vertical distribution (Barmawidjaja et al., 1992; Mackensen et al., 2000; Schmiedl et al., 2000; Ernst et al., 2005). In a laboratory experiment with strongly hypoxic conditions,

however, it did not migrate vertically (Pucci et al., 2009). Alve and Bernhard (1995) considered *Bulimina marginata* as one of the few taxa potentially able to reproduce in strongly hypoxic conditions. In the present study, it is clearly strongly resistant to anoxia and co-occurring hydrogen sulphides, but its rather invariable standing stocks provide no indications that reproduction occurred during the 10 months of our experiment.

Lagenammia atlantica

Lagenammia atlantica (also known as *Saccammia atlantica*) was mainly found alive in the 150-315 μm fraction. Its standing stocks differ considerably between the pairs of replicate cores, and there is no significant overall change with time (Figure 22, Figure 23 and Tableau 12). Most individuals were found in the first 1.5 cm (Figure 24). Little information is available about the ecology of this taxon. (Murray, 2006) considers it to be a shelf species that also inhabits brackish waters. Our data strongly suggest that this species is very resistant to the combination of anoxia and hydrogen sulphide.

Hopkinsina pacifica

Hopkinsina pacifica - also named *Hopkinsinella glabra* (Haig, 1993) or *Hopkinsina atlantica* (Diz et Francés, 2008) - was found alive mainly in the 63-125 μm fraction. Its standing stocks show no significant trend with time. Unlike the other species of response-type B, *H. pacifica* is mainly found at the sediment-water interface, and is apparently a surface dweller.

Hopkinsinella pacifica is a typical species of river-influenced inner shelf ecosystems (Bar-mawidjaja et al., 1992; Jorissen et al., 1992; Diz et Francés, 2008; Mojtahid et al., 2009) such as in the Northern Adriatic Sea (Hohe-negger et al., 1993; Moodley et al., 1997; Ernst et al., 2002, 2005; Duijnsteet al., 2003, 2004).

On the basis of a laboratory experiment, Ernst et al. (2005) concluded that this species is favored by fresh food supplies. Other observations corroborate such an opportunistic behavior (Jorissen et al., 1992; Ernst et al., 2002; Duijnsteet al., 2004; Goineau et al., 2012), which is a common trait of several small-sized taxa (e.g., *Epistominella exigua*, *Leptohalysis scottii*). *Hopkinsina pacifica* typically occupies the superficial sediment layer (Jorissen et al., 1992; Ernst et al., 2002; Duijnsteet al., 2003). Our observations confirm that this species is a surface dweller. In an experimental study involving an organic matter pulse under anoxic conditions, Ernst et al. (2005) observed an upward migration of this taxon. In our experiment, living individuals were always restricted to the upper 1 cm, and no upward migration was observed (Figure 24).

Ernst et al. (2005) reported that only part of their *H. pacifica* population survived experimental anoxia. In our data, this species showed no significant decrease with time, and it belongs to the most anoxia-resistant taxonomic group.

Bolivina pseudoplicata

Bolivina pseudoplicata is mainly found in the 63-125 µm fraction and, like the other representatives of response-type B, its standing stocks do not show a significant change with time. *Bolivina pseudoplicata* occurs in fair numbers down to 5 cm depth, without a clear trend.

Bolivina pseudoplicata has been reported from transitional environments such as estuaries and prodeltas (Cearreta et al., 2000; Debenay et al., 2006; Diz et Francés, 2008). This species has also been observed in the Adriatic Sea (Hohenegger et al., 1993; Barmawidjaja et al., 1995). Its ecology is not well known and little information is available about its microhabitat. Our data, which show abundant living individuals after “10 months” of anoxia, demonstrate its high anoxia tolerance.

5.3.3. Response type C***Quinqueloculina seminula***

Quinqueloculina seminula represents response-type C. It is found mostly in the 63-125 µm size fraction and occurs only in the topmost centimeter of the sediment, indicating a very shallow microhabitat. *Quinqueloculina seminula* is only present in small quantities in the “normoxia” core samples at the beginning of the experiment, but shows a tenfold increase in standing stock after “9 days”, reaching a density maximum after “1 month”. Thereafter, standing stocks decrease, and after “10 months” of anoxia, standing stocks are comparable to those in the “normoxia” cores.

Quinqueloculina seminula has been described from a wide range of environments, such as Mediterranean lagoons, marshes and continental shelves (Murray, 2006). Species of the genus *Quinqueloculina* are also common in the Adriatic Sea (Frontalini et Coccioni, 2011) and in the Gulf of Trieste (Hohenegger et al., 1993). Concerning its tolerance to low oxygen conditions, contradictory evidence has been reported. For example, Moodley and Hess (1992) observed that it was resistant to 24 h of anoxia, whereas a later study described it as sensitive to anoxia with co-occurring hydrogen sulphides (Moodley et al., 1998b). Rather surprisingly in view of the general perception of miliolids as sensitive taxa, typical of oligotrophic conditions (Baras et al., 2014), *Q. seminula* has been observed as an early colonizer after volcanic ash deposits (Hess et Kuhnt, 1996) and as a pioneer species after sediment disturbance in submarine canyons (Duros et al., 2011).

Our observations suggest an opportunistic response to labile organic matter supplies combined with a resistance to short-term anoxia. As explained above, we hypothesize that the increase in standing stocks of several taxa in the “1 month” cores, which is particularly spectacular for *Q. seminula*, is a response to increased labile organic matter availability after macrofaunal mortality in the first two weeks of the experiment. In the subsequent weeks (i.e. after the sampling of the “9 days” cores), the anaerobic degradation of this organic matter released a large quantity of hydrogen sulphides that can be observed at the sediment-water interface in the “1 month”

chamber. We hypothesize that the increase in the standing stocks during the first month of the experiment is due to growth of juvenile specimens (individuals < 63 μm) or is the result of a reproduction event triggered by the accumulation of labile organic matter at the sediment-water interface. The decrease in density between 1 and 10 months of experiment could reflect a combined effect of less organic matter availability (that is mainly consumed anaerobically after the onset of anoxia), the effect of prolonged anoxia and the sensitivity to hydrogen sulphides, which appeared massively in the water column.

Quinqueloculina seminula can therefore tentatively be considered as a species with an opportunistic behavior, capable of surviving the early stages of anoxia, but sensitive to prolonged anoxia in combination with sulphides.

5.4. Foraminiferal community response to the experimental conditions

Considering the response of the whole foraminiferal community, the impact of 10 months of anoxia, with co-occurring hydrogen sulphides, is apparently very limited. This is not really surprising because most of the dominant taxa are known for their resistance to low oxygen conditions, which is largely confirmed by our results. Such a dominance of low-oxygen-tolerant taxa is logical in ecosystems that are periodically impacted by seasonal hypoxia. Seasonal hypoxia has increased in frequency over the last fifty years, reflecting strongly increased anthropogenic

nutrient inputs, but are basically a natural phenomenon (Barmawidjaja et al., 1995; Diaz et Rosenberg, 2008). In spite of the overall tolerance of low oxygen conditions, which is evident for all major species (which all survived 10 months of anoxia), three differential types of response have been distinguished. The species of response-type A (*Reophax nanus*, *Textularia agglutinans* and *Quinqueloculina stelligera*), which is mainly composed of rather superficially living species, show a significant decrease in standing stock, although many living specimens remain until the end of the experiment. The species of response-type B (*Eggerella scabra*, *Bulimina marginata*, *Lagenammina atlantica*, *Hopkinsina pacifica* and *Bolivina pseudoplicata*), which is mainly composed of taxa with a stronger infaunal tendency, show an even higher tolerance for the combination of prolonged anoxia and hydrogen sulphide, and show no significant decline in standing stocks with time. This higher tolerance may be partly explained by their deeper microhabitats, which forces these taxa to live in anoxic conditions even when the sediment-water interface is oxic. Conversely, their higher tolerance to anoxia also enables them to live in deeper sediment intervals; this is important in ecosystems where oxygen penetration is normally limited to the upper few millimeters (Metzger et al., 2013a).

Finally, the shallow infaunal taxon *Q. seminula* combines the slightly lower tolerance to anoxic conditions of the response-type A taxa with a very strong opportunistic tendency. The result is a spectacular increase in standing

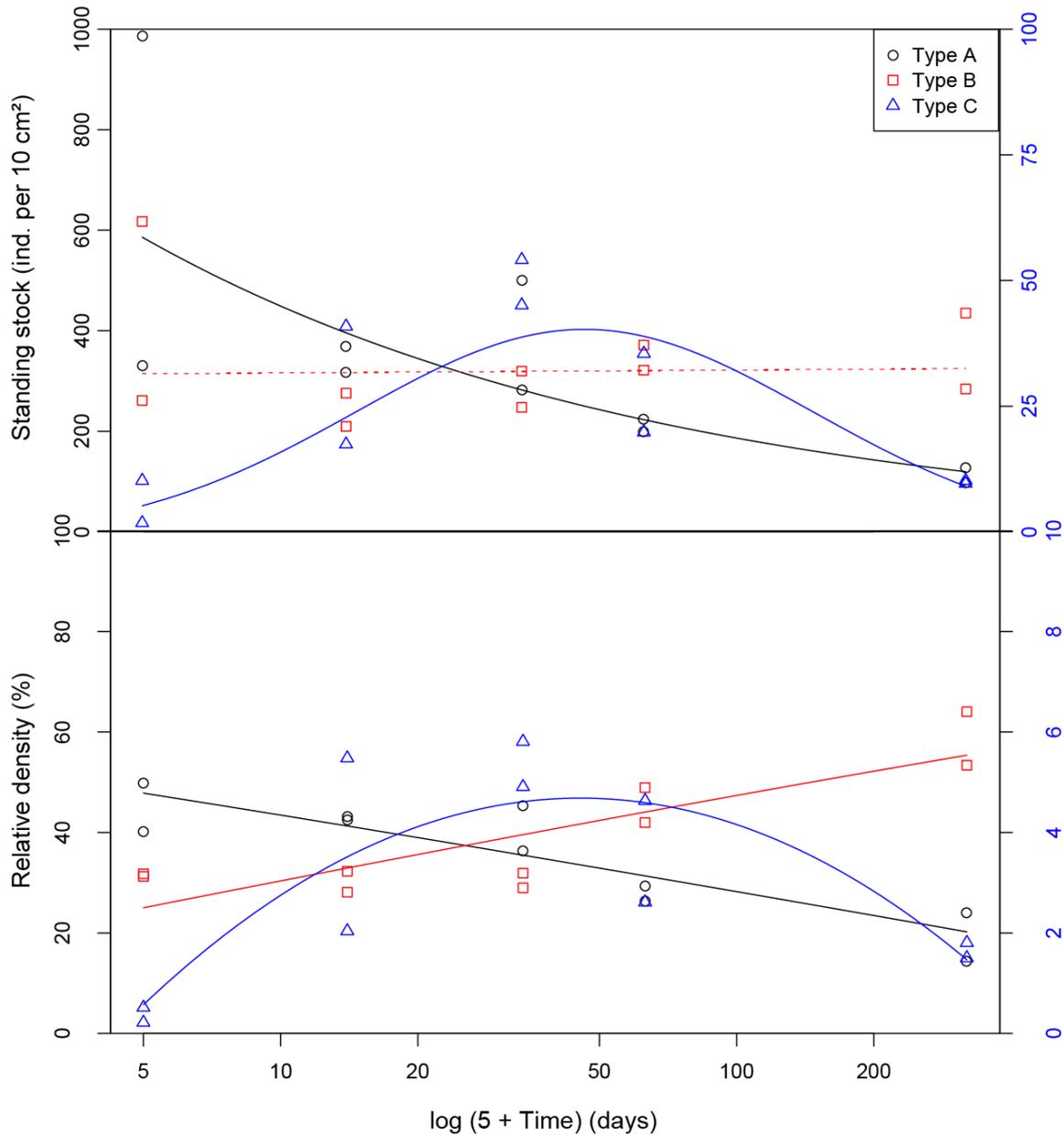


Figure 26: Standing stock (upper panel) and relative density (lower panel) variation with time for the the 3 types of response (black circles: type A, red squares: type B and blue triangles: type C) in the whole core (0-5 cm). Note that for representation purposes the standing stocks and relative density of type C were multiplied by 10 (refer to axis on the right). The lines are estimated after the “models 3” group, full lines indicating a significant effect of time, dashed lines a non-significant effect.

stock after 1 month. Surprisingly, the presence of anoxia did not inhibit a reproductive response of this species to inputs of labile organic matter.

Examining the behaviour of these three types of responses enables three successive stages to be distinguished. Figure 26 shows that during a first stage, until 2 to 3 weeks, the

faunas tend to be dominated by response-type A species (Tableau 17). During a second stage, which lasts until about 2 months, *Q. seminula*, and perhaps also *Reophax nanus* and *Lagenammia atlantica*, show an opportunistic response (reproduction and growth) to putative labile organic carbon input resulting from the death of enclosed macrofauna. The

third and final stage shows an increasing dominance of the highly anoxia-resistant response-type B species (Figure 26, Tableau 17). This three-stage temporal succession is very similar to the spatial patterns along strong eutrophication gradients, such as those described around point sources of organic pollution. Along such gradients, sensitive taxa progressively disappear, and slightly stress-tolerant taxa are gradually replaced by taxa with maximum tolerance for stressed conditions. When stress is not lethal, some species may show a strong opportunistic response, yielding very high standing stocks. Such patterns have been described repeatedly for macrofauna (e.g. Pearson and Rosenberg, 1976), but have recently also been shown for foraminifera (Mojtahid et al., 2006, 2008). Summarising, the foraminiferal response to anoxia and co-occurring enrichment in organic matter appears to be very similar to the macrofaunal response, with the essential difference that many foraminiferal taxa are much more resistant to anoxic conditions than macrofauna

(Langlet et al., 2013b).

5.5. Understanding foraminiferal survival during exposure to anoxia

The intracellular nitrate content and denitrification measurements could not be performed for all the major species of our study area, mainly because of the difficulty in selecting living foraminifera in the silty and sandy sediments of our two sampling stations. Nevertheless, intracellular nitrate measurements are available for species of each of the three identified response-types. We performed measurements on species from response-types A and B, whereas the genus *Quinqueloculina* has been tested by Piña-Ochoa et al. (2010a). Our results show that none of the 12 tested individuals of 5 species belonging to response-type A were able to accumulate nitrate in their cells. Conversely, 5 of the tested 21 individuals of *E. scabra* and *B. marginata*, both belonging to response-type B, contained non-negligible amounts of intracellular nitrates, with values ranging from 8 to 433 pmol

Tableau 17 - Statistical parameters (Df: degrees of freedom, Sum Sq: Sum of Squares, Mean Sq: Mean of Squares, F value: value of the F-test, Pr(>F): probability of the F-test) for the models 3 for all 3 response types and for the two tested dependant variables (standing stock and frequency).

Dependent variable	Response	Independent variable	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
Standing stock	Type A	log(5 + time)	1	2,8	2,8	22,1	0,002	
		residuals	8	1,0	0,1	NA	NA	
	Type B	log(5 + time)	1	0,0	0,0	0,0	0,92	
		residuals	8	0,9	0,1	NA	NA	
	Type C	log(5 + time)	1	0,2	0,2	0,7	0,43	
		log(5 + time) ²	1	5,4	5,4	19,5	0,003	
		residuals	7	1,9	0,3	NA	NA	
	Relative frequency	Type A	log(5 + time)	1	0,1	0,1	27,9	0,001
			residuals	8	0,0	0,0	NA	NA
Type B		log(5 + time)	1	0,1	0,1	21,7	0,002	
		residuals	8	0,0	0,0	NA	NA	
Type C		log(5 + time)	1	0,0	0,0	0,4	0,56	
		log(5 + time) ²	1	0,0	0,0	15,9	0,01	
		residuals	7	0,0	0,0	NA	NA	

per cell. Unfortunately, no data are available for the three other species of response-type B (*L. atlantica*, *H. pacifica* and *B. pseudoplicata*). Piña-Ochoa et al. (2010a) measured 16 specimens (from the Peru OMZ, Skagerrak, Bay of Biscay and Rhône Delta) of *Quinqueloculina* spp., without any positive results. Although the available information is still inconclusive, a picture emerges that response-type B species can accumulate nitrate in their cytoplasm, whereas response-type A species and *Q. seminula* cannot. Although this picture remains to be confirmed or informed by additional measurements, the present data suggest that the higher tolerance to anoxia by the response-type B species could reflect their ability to accumulate nitrate and thus to shift to an anaerobic metabolism (denitrification) under anoxic conditions. Nonetheless, the 5 measurements of denitrification we performed for *E. scabra* and *B. marginata* gave only negative results. We see two possible explanations for the absence of denitrification in these experiments: 1) the measured individuals did not accumulate nitrate before being measured, perhaps because the well-oxygenated pre-measurement laboratory conditions did not incite them to do so, or 2) they are incapable of denitrifying. This calls for additional analyses to establish whether the foraminiferal taxa that survive 10 months of anoxia are capable of denitrifying or not. If not, another explanation must be sought for their highly surprising long-term survival.

6. Conclusions

We performed an in situ experiment at a 24 m-deep site in the Gulf of Trieste. Benthic chambers were installed on the sediment surface and rapidly turned anoxic. Cores sampled in chambers opened after 9 days, 1 month, 2 months and 10 months all contained abundant foraminiferal assemblages down to 5 cm depth in the sediment. During the experiment the foraminiferal species richness significantly decreased while the diversity indexes showed no changes, probably due to the anoxia sensitivity of *Reophax nanus*, which was strongly dominant in the original conditions. Despite the minor changes in diversity, the species composition changed because some species are less resistant than others to anoxia. The present study identified *Reophax nanus*, *Textularia agglutinans* and especially *Quinqueloculina stelligera* as more sensitive to the experimental conditions. Conversely, *Eggerella scabra*, *Bulimina marginata*, *Lagenammina atlantica*, *Hopkinsina pacifica* and *Bolivina pseudoplicata* appear to be highly resistant to long-term anoxia and co-occurring hydrogen sulphide. The foraminiferal faunas not only responded by a change in species composition, but some taxa also apparently show an opportunistic behavior to the organic matter release due to the degradation of the dead macrofauna after 1 month of experimentation. *Quinqueloculina seminula*, (and perhaps also *Reophax nanus* and *Lagenammina atlantica*) exhibit such a potentially opportunistic behaviour. Finally, the intracellular nitrate and denitrification measurements we

performed provided no positive evidence that foraminiferal survival to anoxia is related to their denitrification capacity. This differential reaction to anoxia, and the survival of set of species to long-term disturbance, has important implications for the status and recovery potential of coastal areas increasingly affected by large-scale oxygen depletion events.

7. Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Joan Bernhard, who edited this paper and the special issue, and two anonymous reviewers for their constructive comments, which helped us to improve the manuscript. The first author's research is funded by the General Council of the Region Pays de la Loire. This study is funded by the Austrian Science Fund (FWF project P21542-B17 and P17655-B03), and supported by the OEAD "Scientific-Technical Cooperation" between Austria-France (project FR 13/2010) and Austria-Slovenia (project SI 22/2009). The first author greatly profited from the support of the Cushman Foundation for Foraminiferal Research, the European project Erasmus and the Danish National Research Foundation, which made it possible to perform intracellular nitrate analyses at Aarhus University. We would like to thank the director and staff of the Marine Biology Station in Piran for their support during this project; all the scuba divers for their involvement during the fieldwork, Karim Issa and Erica

Bicchi for the precious technical assistance and Grégoire Lognoné for his helpful contribution to the data acquisition.

Supplementary material caption (available online at <http://www.biogeosciences-discuss.net/10/12065/2013/bgd-10-12065-2013.html>)

Supplementary material 1: Relative densities of the 9 major species in all the sampled cores (two replicate cores each time) in all studied size fractions. Note the different vertical scales for the various species.

Supplementary material 2: Relative frequency variation with time and sampling depth (open circles: 0-5 cm and full circles 0-0.5 cm) for the 9 major species. The lines are estimated after the "models 2" group, full lines indicating a significant effect of time, dashed lines indicating a non-significant effect. Two lines indicate significant sampling depth effect, one line no significant effect. Note that the frequency is presented on a log transformed axis.

Supplementary material 3: Statistical parameters (Df: degrees of freedom, Sum Sq: Sum of Squares, Mean Sq: Mean of Squares, F value: value of the F-test, Pr(>F): probability of the F-test) for the "models 2" group for all 9 major species and for relative frequency.

Supplementary material 4: Estimated coefficient associated to independent variables after the "models 2" group for the 9 major species. Only the independent variables having a significant effect on the relative frequency are retained by the backward model selection.

Supplementary material 5: Estimated coefficients and statistical parameters associated (Std. Error: Standard Error, t value: value of the T-test, Pr(>|t|): probability of the T-test) for the "models 1, 2 and 3" groups for all the selected data.

Supplementary material 6: Census data presenting the living foraminiferal counts at all times, replicate core, size fraction and depth interval for all the studied species.

Supplementary material 7: Taxonomic reference list for all the major species.

Partie IV. Bilan du Chapitre 1

Ce premier chapitre compile les résultats obtenus au cours d'une expérience lors de laquelle plusieurs chambres benthiques sont installées pour différentes périodes de temps sur les fonds marins de la Mer Adriatique à 24 mètres de profondeur. Ces chambres benthiques permettent de créer un environnement anoxique après quelques jours d'incubation. Nous mettons en évidence dans le premier article l'effet de l'expérience sur la géochimie benthique et dans les deux articles suivants l'effet de l'anoxie sur les faunes de foraminifères.

.Les analyses de la géochimie du sédiment réalisées dans le cadre de cette expérience ont deux objectifs : 1) contrôler le développement de l'anoxie dans les chambres benthiques et 2) étudier l'évolution verticale en cours d'expérience des fronts redox qui, d'après la littérature, conditionnent l'étendue verticale des microhabitats des foraminifères benthiques.

Après avoir décrit les changements des conditions environnementales au cours de l'expérience, nous analysons l'effet de l'expérience sur les communautés de foraminifères benthiques et nous cherchons à expliquer comment les différentes espèces font pour vivre dans des conditions anoxiques.

1. Contrôle du développement de l'anoxie dans les chambres benthiques

1.1. Suivi de l'oxygène

Dans l'article de Metzger, Langlet et al., nous suivons les changements de la concentration de l'oxygène et du sulfure d'hydrogène dans l'eau surnageante durant les 9 premiers jours d'expérience à l'aide de micro-électrodes ampérométriques. Les résultats montrent que la concentration en oxygène dans l'eau diminue pour atteindre l'hypoxie ($< 63\mu\text{M}$) après environ 3 jours d'incubation et l'anoxie ($0\ \mu\text{M}\ \text{O}_2$) après 7 à 8 jours d'expérience (Figure 11 ; Figure 28). Au-delà de ces 9 jours d'expérience, des limitations

techniques rendent difficile le suivi de la concentration d'oxygène en autonomie. Au cours de ces 9 jours, la concentration en sulfure est restée sous la limite de détection. Ainsi, nous avons suivi l'évolution temporelle d'autres marqueurs géochimiques pour confirmer le maintien de l'anoxie après 9 jours d'expérience.

1.2. Migration des éléments chimiques dissous

La concentration en nitrates dans les eaux porales au cours de l'expérience n'a pas été analysée dans le cadre de cette thèse mais elle a été mesurée par Koron et al. (2013). Les résultats montrent que des nitrates sont présents dans les eaux porales à tous les temps d'échantillonnage (T0, 9 jours, 1 mois, 2 mois

et 10 mois) à des concentrations moyennes d'environ $15 \mu\text{M}$ et peu de changements sont observés au cours de l'expérience (Koron et al., 2013, Koron pers. comm.).

Les gradients géochimiques à travers l'interface eau-sédiment (5 cm au-dessus et 10 cm en dessous ; à la résolution de 2mm) ont été obtenus grâce au couplage des techniques de gel DET (Diffusive Equilibrium in Thin films, Davison et al., 1991) pour l'échantillonnage et de la colorimétrie (alcalinité), la chromatographie anionique (sulfate) et la spectrométrie de masse (fer et manganèse) pour l'analyse chimique (voir Figure 16 A et D pour une illustration). 2 réplicats ont été réalisés pour chaque chimie et chaque temps (T0, T9j, T1mo, T10mo) En comparant les deux réplicats de profils pour fer et manganèse à chaque temps d'échantillonnage, nous pouvons observer une différence importante de la concentration maximale et de la position de ces pics (Figure 12, Figure 27). Cette différence importante entre réplicats suggère une variabilité latérale importante, cela est probablement dû à l'hétérogénéité de la matrice sédimentaire qui contient les oxydes métalliques qui seront réduits en cours de diagenèse pour libérer sous forme réduite dans l'eau interstitielle le manganèse et le fer. Malgré cette variabilité latérale, nous pouvons mettre en évidence que les zones de production du Fer et du Manganèse dissous tendent à se déplacer vers l'interface eau-sédiment au cours de l'expérience (Figure 27).

Les profils de sulfates et d'alcalinité montrent une variabilité inter-réplicats moindre que celle observée sur les profils de manga-

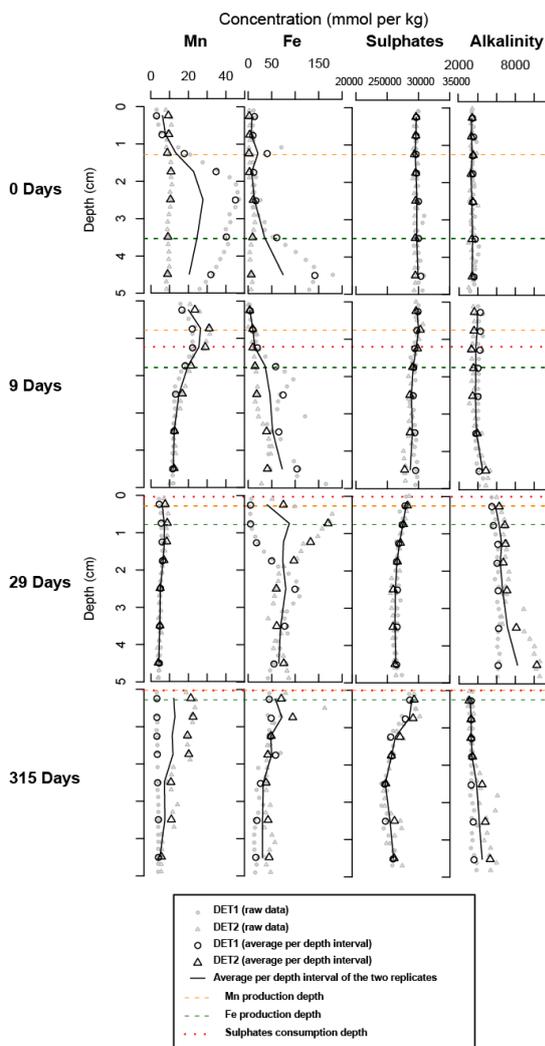


Figure 27 - Concentration de manganèse, fer, sulfates et d'alcalinité entre 0 et 5 cm de profondeur dans les eaux porales aux différents temps d'échantillonnage d'après des données de Metzger et al. (2013a). Pour chaque réplicat (DET1 et DET2) les données brutes sont présentées en points et triangles gris, les valeurs moyennées par intervalles de profondeur (les intervalles utilisés pour les analyses faunistiques : 0-0,5 cm, ..., 4-5 cm) sont présentées en points et triangles noirs et la moyenne des deux réplicats par intervalle de profondeur est présentée en trait plein noir. Les profondeurs de production ou de consommation de manganèse, fer et sulfates sont présentées en trait pointillés orange, vert et rouge respectivement.

nèse et de fer dissous (Figure 27). On peut également observer que la réduction des sulfates tend à augmenter avec la durée de l'expérience et que cette zone de consommation migre vers l'interface eau-sédiment. Les

profils d'alcalinité (produite par la majorité des réactions diagénétiques anaérobies) présentent également une augmentation de production et une migration verticale de ce front de production au cours du temps (Figure 27).

L'ensemble des données géochimiques ainsi récoltées présente une migration verticale des fronts d'oxydoréduction montrant que les conditions à partir de 9 jours d'expérience au moins sont fortement réductrices. Ces observations confirment ainsi le fait que l'eau piégée dans les chambres benthiques est anoxique après 7 jours et jusqu'à la fin des 10 mois d'expérience.

L'oxygénation du sédiment n'est pas le seul paramètre qui peut affecter les faunes de foraminifères benthiques, nous pouvons nous attendre à ce que la quantité de sulfures (potentiellement toxique) et de matière organique disponibles influencent également la réponse des foraminifères aux conditions expérimentales. D'après les données précédentes, nous pourrions supposer que la quantité de matière organique diminue au cours du temps et devient de plus en plus réfractaire favorisant la sulfato-réduction et la diffusion des sulfures depuis le sédiment vers l'interface et l'eau surnageant. Nous verrons dans le paragraphe suivant dans le cycle du soufre est plus complexe que cela et que cela aura des répercussions importantes sur l'évolution de la méiofaune benthique.

2. Production de sulfures et changements dans la quantité de matière organique

La production de sulfures dans le sédiment est mise en évidence à partir de microélectrodes placées dans la chambre benthique lors de l'expérience qui dure 9 jours et par des bandes adhésives PVC sensibles aux sulfures (qui se colorent en gris/marron) placés sur les sondes DETs aux autres temps d'échantillonnage.

Avant l'expérience, en conditions « normoxiques », quelques traces de sulfures sont détectables sur les scotchs placés sur les sondes distribués de manière aléatoire (Figure 15). A cette même profondeur, les analyses des gels DETs révèlent une diminution de la concentration de sulfates (Figure 13). Cela suggère qu'en conditions non-perturbées, la sulfato-réduction a lieu à plus de 6 cm de profondeur et est de relativement faible intensité.

Au cours de l'expérience, les analyses montrent une migration vers la surface du front de consommation des sulfates et une augmentation de la sulfato-réduction. En parallèle, la coloration des scotchs sensibles aux sulfures tend à augmenter au cours du temps sous l'interface eau-sédiment (Figure 15).

Ce sulfure présent dans le sédiment ne semble pas être la source de sulfure la plus importante. En effet, après 1 mois d'expérience, nous pouvons observer sur les scotchs sensibles une forte coloration au-dessus de l'interface eau-sédiment. Cette ob-

servation particulière a été interprétée comme liée à la mort des organismes de la macrofaune à la surface du sédiment (Metzger et al., 2013a). En effet, les observations du comportement de la macrofaune dans le cadre de l'expérience montrent que ces organismes meurent après environ 7 à 15 jours d'anoxie (Riedel et al., 2012, 2013). Ces individus meurent à la surface du sédiment et se décomposent dans le milieu anoxique. La dégradation anaérobie de cette matière organique nouvellement disponible serait ainsi la source de cette production importante de sulfures dans l'eau surnageante. Le système créé par la mise en place des chambres benthiques aurait donc la particularité de faire que le sédiment n'agit pas comme une source de sulfures (comme classiquement observé dans les environnements anoxiques) mais le sédiment agit comme un puits à sulfures. Les sulfures produits à l'interface eau-sédiment auraient ainsi tendance à diffuser librement dans l'eau surnageante et avec plus de difficulté vers le sédiment où ils peuvent être réoxydés ou précipités sous forme de sulfures de fer (Metzger et al., 2013a).

Les résultats discutés dans le paragraphe précédent ainsi que les observations du comportement de la faune benthique au cours de l'anoxie suggèrent un changement de quantité de matière organique métabolisable présente dans le sédiment au cours de l'expérience. Nous suggérons qu'avec le développement de l'anoxie, la consommation de la matière organique par l'ensemble des réactions diagénétiques aérobies comme anaérobies tendent à diminuer la quantité de matière organique

dans le sédiment au cours des 10 premiers jours d'expérience (Figure 28). Dans un second temps, la décomposition des organismes de la macrofaune morts d'asphyxie entre 7 et 15 jours d'expérience pourrait avoir renouvelé le stock de matière organique disponible et expliquerait l'importante sulfato-réduction observée après 1 mois d'expérience. Au-delà de cette période, ce stock de matière organique serait lentement consommé via les réactions anaérobies et tendrait ainsi à diminuer entre 1 mois et 10 mois d'expérience (Figure 28). Cette diminution de la quantité de matière organique disponible pourrait expliquer la diminution de l'intensité des réactions diagénétiques observées entre 1 et 10 mois d'expérience.

3. Effet des conditions expérimentales sur les foraminifères benthiques

3.1. Survie des foraminifères benthiques

Le résultat majeur de l'analyse faunistique que nous avons réalisé est que des foraminifères vivants sont trouvés à tous les temps d'échantillonnage (en conditions « normoxiques », après 9 jours, 1 mois, 2 mois et 10 mois d'anoxie). Nous avons mis en évidence par deux méthodes différentes (incorporation de la sonde fluorescente CTG et extraction de l'ARN ribosomal) que les foraminifères ont une activité enzymatique et qu'ils produisent de l'ARN nous permettant d'affirmer que les foraminifères benthiques

sont capables de survivre à au moins 10 mois en anoxie.

Après un mois d'anoxie, nos analyses de la géochimie du sédiment montrent la présence de sulfures en grande quantité dans l'eau sur-nageante et dans les tous premiers millimètres de sédiment (à l'exception d'une sonde où H₂S pénètre plus profondément à cause d'un terrier). Au même moment, dans ce compartiment sédimentaire, les foraminifères vivants sont présents à de fortes densités suggérant qu'ils ne sont ni très sensibles à l'anoxie ni à la présence de ce composé toxique.

Malgré la variabilité spatiale importante, nous montrons qu'il existe également une légère diminution des densités avec la durée d'exposition à l'anoxie suggérant que tous les individus et/ou toutes les espèces ne sont pas capables de survivre en anoxie. La diminution des densités avec le temps ne se fait pas de manière linéaire. En effet, les densités diminuent entre 0 et 9 jours d'expérience. Les densités à 1 mois d'expérience sont du même ordre de grandeur que celles des conditions initiales puis tendent à diminuer après 2 et 10 mois d'expérience. Cette tendance est assez proche de la variation de la matière organique suggérée par les analyses de la géochimie du sédiment. Les temps pour lesquelles les densités sont les plus fortes sont les temps où nous supposons que la quantité de la matière organique est la plus importante (à T0 et à 1 mois d'anoxie ; Figure 28). Cette observation suggère que les foraminifères ne répondraient pas directement à l'absence d'oxygène mais préférentiellement aux variations de disponibilité de la matière organique.

3.2. Réponse spécifique

La communauté de foraminifères benthiques de notre site d'étude est dominée par essentiellement 9 espèces (espèces présentant des densités relatives supérieures à 5% dans au moins une carotte) : *Reophax nanus*, *Eggerella scabra*, *Bulimina aculeata*, *Textularia agglutinans*, *Quinqueloculina seminula*, *Lagenammina atlantica*, *Hopkinsinella glabra*, *Bolivina pseudoplicata* et *Quinqueloculina stelligera*. Au cours de l'expérience, le nombre d'espèces présentant des individus vivants diminue légèrement (d'environ 60 espèces identifiées en « normoxie » à environ 50 espèces après 10 mois d'anoxie). La diversité de foraminifères benthiques ne diminue de manière significative que dans les fractions de taille > 125 µm. Si l'on considère l'ensemble des individus de taille > 63 µm les indices de diversité ne montrent pas de changement avec le temps. Nous expliquons cette observation par le fait que la fraction 63-125µm est fortement dominée par *Reophax nanus*. Cette espèce est, comme nous allons le voir dans le paragraphe prochain, sensible à l'anoxie et montre une diminution de sa densité avec le temps. Ainsi, sa dominance diminue avec le temps, tendant à augmenter la diversité dans la fraction 63-125 µm. L'absence de changement significatif de la diversité dans la fraction > 63 µm peut donc s'expliquer par un effet de compensation entre la diminution de la diversité de la fraction > 125 µm et l'augmentation de la diversité dans la fraction 63-125 µm.

Comme abordé brièvement dans le paragraphe précédent, toutes les espèces de foraminifères benthiques ne répondent pas de la même manière aux conditions expérimentales. En observant les changements de densité de chaque espèce nous pouvons différencier trois types d'espèces qui présentent des comportements sensiblement différents :

1. Les espèces de type A sont des espèces dites sensibles à l'anoxie soit qui présentent une diminution de leur densité avec la durée de l'expérience. Cet ensemble est composé de *Reophax nanus*, *Textularia agglutinans* et *Quinqueloculina stelligera*. Ces trois espèces ont pour particularité d'être présentes essentiellement à l'interface eau-sédiment (plus d'1/3 de leur stock vit dans l'intervalle de profondeur 0-0.5cm).
2. Les espèces de type B sont des espèces que nous considérons comme résistantes à l'anoxie ces espèces ne montrent pas de changement significatif de leur densité avec le temps. Cet ensemble d'espèces est composé d'*Eggerella scabra*, *Bulimina aculeata*, *Lagenammia atlantica*, *Hopkinsina pacifica* et *Bolivina pseudoplicata*. La distribution verticale de ces 5 espèces montre qu'elles sont présentes à toutes les profondeurs échantillonnées (entre 0 et 5 cm).
3. Le type C contient les espèces qui montrent une augmentation de leurs densités au cours de la première phase de l'expérience (entre le début et 1 mois d'expérience) puis une diminution dans la seconde phase (entre 1 et 10 mois

d'anoxie). Parmi les espèces majeures analysées seule *Quinqueloculina seminula* présente une réponse de ce type. Cette espèce est essentiellement distribuée sur le demi-centimètre le moins profond de la carotte.

Si la majorité des espèces semblent répondre positivement à l'augmentation de la matière organique à 1 mois d'expérience (en présentant une augmentation de leur densité dans l'intervalle de profondeur 0-0.5 cm) elles ne répondent pas toutes de la même manière à l'anoxie. Si les espèces de type A qui montrent une diminution de leur densité sont sensibles à l'anoxie, leurs densités sont pour certaines toujours importantes après 10 mois d'anoxie. Ainsi, nous pouvons considérer que *Reophax nanus* est sensible à l'anoxie bien qu'elle soit capable de survivre dans de telles conditions puisque sa densité après 10 mois d'anoxie est d'en moyenne 150 individus / 10 cm² (contre environ 450 individus / 10 cm² en moyenne normoxie). Nous pouvons également considérer que *Quinqueloculina seminula* – seule espèce de type C – est une espèce sensible à l'anoxie. Si sa densité augmente entre 0 et 1 mois en réponse à l'augmentation de la quantité de la matière organique, les conditions anoxiques et riches en sulfures après 1 mois d'expérience font que la densité de cette espèce tend à diminuer. Seules les espèces de type B ne semblent pas être affectées par l'anoxie.

Comme abordé précédemment, les trois types d'espèces ne présentent pas tout à fait les mêmes distributions verticales. Les es-

pèces de type B sont présentes de manière quasi-homogène à toutes les profondeurs analysées et les espèces de type A et C sont présentes majoritairement proche de l'interface eau-sédiment. Or, c'est à l'interface eau-sédiment que les conditions changent le plus fortement au cours de l'expérience. En effet, à notre site d'étude, la profondeur de pénétration de l'oxygène est estimée à environ 0.5 cm (Epping et Helder, 1997; Metzger et al., 2013a). Ainsi, seuls les organismes vivant au-dessus de cette limite sont affectés par la diminution de la concentration dans la colonne d'eau. C'est également dans ce microenvironnement que les changements de concentration de sulfures sont les plus importants. La profondeur de vie préférentielle de chaque espèce semble ainsi être l'un des facteurs expliquant la survie différentielle en anoxie.

Les différents types de réponse à l'expérience font que la composition des communautés change au cours de l'expérience. La communauté des foraminifères benthiques est initialement dominée par les espèces de type A. La densité relative des espèces de type A tend à diminuer au cours du

temps quand la densité relative des espèces du type B augmente. Après 1 mois d'expérience, les densités relatives des deux types sont similaires (environ 50%). Au-delà d'un mois d'anoxie, les espèces de type B dominent la communauté de foraminifères benthiques (Figure 28).

Nous avons ainsi mis en évidence que l'anoxie créée lors de l'expérience tendait à affecter la densité des foraminifères benthiques. Cet effet négatif est contrebalancé par les apports de matière organique dus à la décomposition de la macrofaune qui tend à stimuler la densité de foraminifères benthiques après 1 mois d'anoxie. Enfin, nous avons montré que l'anoxie tend à changer la composition spécifique de la communauté de foraminifères benthiques passant d'une communauté dominée par des espèces sensibles à l'anoxie à une communauté dominée par les espèces qui résistent à l'anoxie. Nous discutons dans le paragraphe suivant du ou des mécanismes qui pourraient permettre de vivre dans des conditions anoxiques.

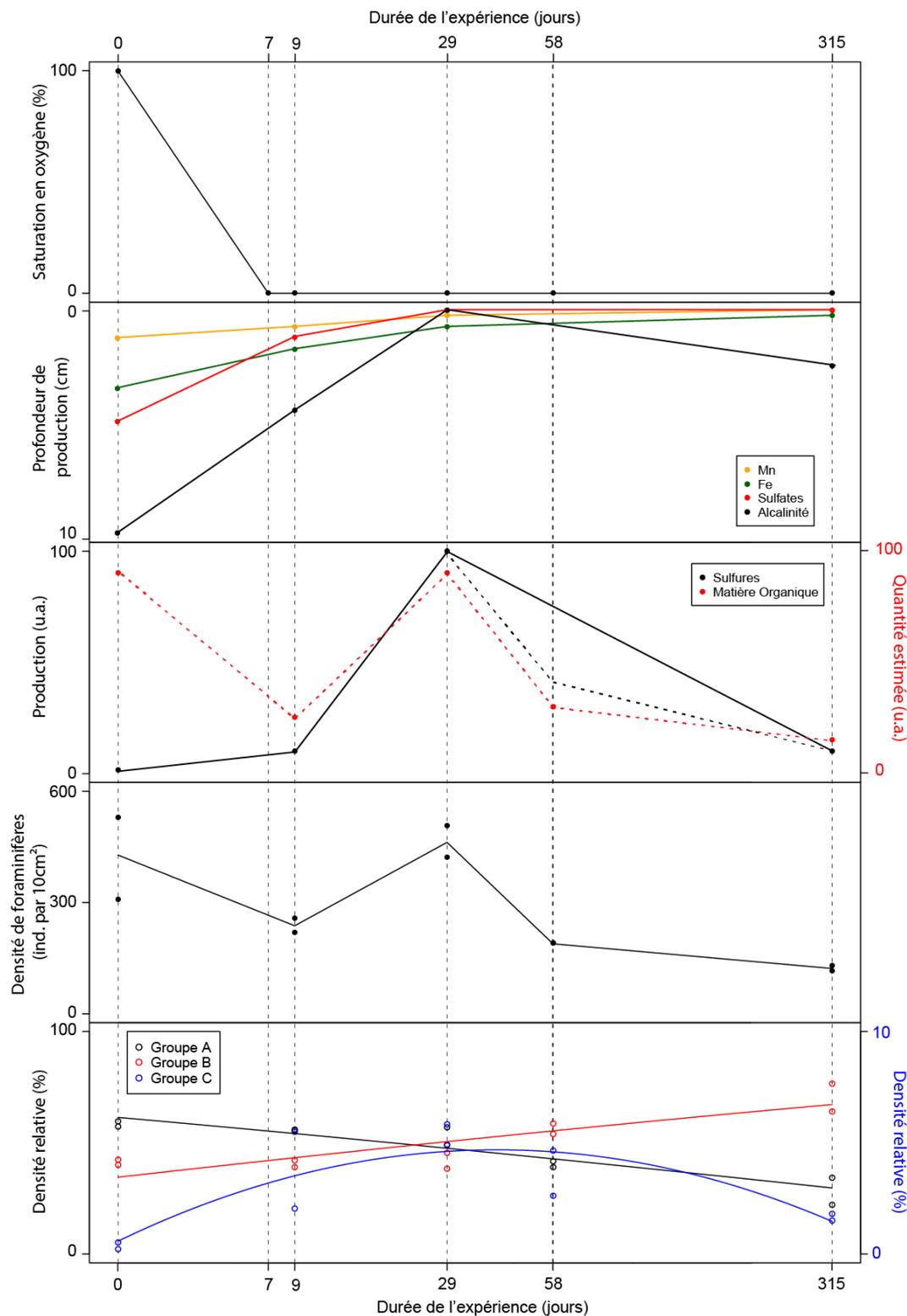


Figure 28 - Variations de la saturation en oxygène, de la profondeur de production ou consommation de manganèse, fer, sulfates, alcalinité, de la production de sulfures, de la disponibilité de la matière organique, de la densité et de la densité relative des foraminifères benthiques en fonction de la durée de l'expérience. La saturation en oxygène est schématisée d'après les données de Metzger et al. (2013). La profondeur de production ou consommation des différents composés chimiques et la disponibilité de la matière organique sont estimées d'après les données de Metzger et al. (2013). La densité de foraminifères dans l'intervalle de profondeur 0-0,5 cm est présentée dans (Langlet et al., 2013b). Les densités relatives sont présentées dans (Langlet et al., 2013a).

4. Comment les foraminifères benthiques font-ils pour survivre à 10 mois d'anoxie ?

A ce jour, le seul mécanisme permettant aux foraminifères de vivre en anoxie clairement identifié est leur capacité à présenter une voie métabolique anaérobie : la dénitrification (Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010a). En effet, certaines espèces de foraminifères benthiques sont capables d'accumuler dans leur cellule les nitrates présents dans le milieu puis de les réduire en anoxie via dénitrification. En considérant la quantité de nitrates accumulés dans la cellule des individus et la vitesse à laquelle les foraminifères les consomment (les taux de dénitrification), Risgaard-Petersen et al. (2006) et Piña-Ochoa et al. (2010a) estiment que certaines espèces peuvent survivre environ 3 mois en anoxie en consommant leur stock de nitrates. Nous avons donc cherché à savoir si les foraminifères benthiques de la Mer Adriatique étaient capables d'accumuler et de consommer des nitrates par dénitrification.

Nos analyses montrent que seules les espèces de type B présentent des nitrates dans leur cellule. Les espèces de type B étant les espèces qui résistent à l'anoxie, ce résultat suggère que la présence de nitrates dans la cellule joue un rôle dans la survie des foraminifères en anoxie. Nous avons donc cherché à tester si ces espèces étaient capables de consommer ces nitrates par dénitrification. Ces mesures de dénitrification effectuée sur *Eggerella scabra* et *Bulimina aculeata* sont négatives montrant que ces deux espèces capables de survivre en anoxie et d'accumuler des nitrates dans leur cellule ne sont pas capables de dénitrifier. Le fait que ces espèces ne soient pas capables d'utiliser les nitrates par dénitrification suggère que soit les nitrates n'interviennent pas dans le métabolisme anaérobie de ces espèces soit qu'ils sont utilisés par une autre voie métabolique que la dénitrification. Nous discuterons de ces hypothèses en détail dans le chapitre traitant du métabolisme anaérobie des foraminifères benthiques (Chapitre 4).

Chapitre 2. Variabilité spatio-temporelle des communautés de foraminifères benthiques dans l'estuaire fermé de Grevelingenmeer

Comme mentionné dans l'introduction qui précède ce chapitre, le Grevelingenmeer est un ancien estuaire localisé au Sud des Pays-Bas. Entre 1965 et 1971 deux barrages ont été construits en amont et en aval du bras de mer limitant ainsi l'influence tidale dans le lac marin. Les différences de salinité entre les eaux marines et les eaux douces ainsi que les fortes températures estivales créent une forte stratification de la colonne d'eau. Ainsi, en été, les eaux de fonds sont très peu renouvelées entraînant des épisodes d'anoxie des eaux de fond et une mortalité benthique massive. Un projet récent a pour objectif d'augmenter le flux entrant d'eaux marines afin de rétablir la circulation dans le bassin pour diminuer et si possible d'éliminer les phénomènes d'anoxie dans les eaux de fond.

Dans ce contexte, nous avons réalisé une étude préliminaire de la variabilité spatio-temporelle des communautés de foraminifères benthiques vivant avant, pendant et après un épisode d'anoxie. L'objectif du rapport réalisé pour l'agence de l'eau néerlandaise est de faire un état des lieux des communautés de foraminifères benthiques en vue de suivre l'impact de nouveaux aménagements. Cette étude a pour but secondaire d'identifier quelles espèces de foraminifères benthiques vivent dans l'estuaire et si ces espèces sont capables de survivre dans des conditions anoxiques.

Nous présentons ici le rapport tel qu'il a été envoyé à l'agence de l'eau néerlandaise en Juin 2012.

Partie I. Spatial and temporal variability of benthic foraminifera in the Grevelingenmeer, May, August and November 2011

Dewi LANGLET, Christine BARRAS and Frans JORISSEN

1. Abstract

This report presents the results of a study on the spatial and temporal variability of living benthic foraminiferal faunas in the Grevelingenmeer. Our faunal analyses, based on the very adequate CTG method for the recognition of live individuals, indicate that abundant live foraminiferal faunas occur at stations 22, 12 and 26-1/2 (water depth 24, 16 and 13 m, respectively) in May 2011 and at stations 2 and 4 (water depth 23 and 17 m, respectively) in August and November 2011. At station 1 (30-34 m), which is subject to seasonal anoxia, very poor foraminiferal faunas were observed in May, August and November 2011. We suspect that these scarce living foraminifera have been transported into the deepest part of the channel, and do not represent an autochthonous viable fauna.

At stations 2 and 4, the faunas are almost exclusively composed of three taxa: *Ammonia* cf. *A. batava*, *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Trochammina* cf. *T. inflata*, whereas at stations 12 and 22, *Haynesina germanica* and *Elphidium* spp. are subsidiary taxa. Both in August and November 2011, the faunas of station 4 are about two times richer than those

of station 2. Although the three dominant taxa are the same, the relative proportion of *Ammonia* cf. *A. batava* is higher at station 4 than at station 2, whereas the opposite can be seen for *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*. This suggests that *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* has a higher tolerance for low oxygen conditions than *Ammonia* cf. *A. batava*. A denser sampling program is necessary to find out whether the ratio between these two taxa can be used as an index for the environmental quality of the benthic environments of the Grevelingenmeer.

A statistical analysis permitted us to quantify the effect of the oxygen saturation on the foraminiferal density for the three stations sampled in August and November. The results show an exponential relationship between the density of the two most frequent species and oxygen saturation, the strength of the relation depending on the season.

Most of the species living in the Grevelingenmeer are characterised by a morphology which differs from that of the typical species. Especially in *Ammonia* cf. *A. batava*, the pore density and pore size appears to be much higher than in typical *A. batava*. This observation has to be confirmed in a future morphometric study.

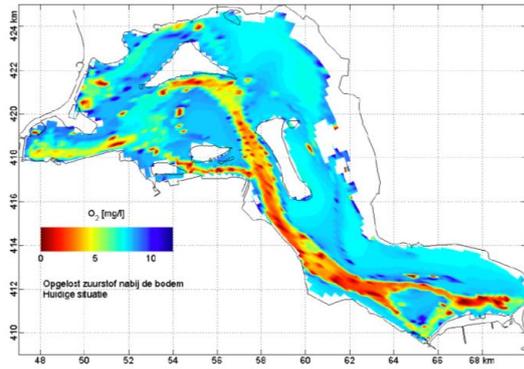


Figure 29 - Map of bottom water oxygen concentration, July 2010

2. Introduction

The Grevelingenmeer is a saline lake in the Southwest of the Netherlands. Due to the closure of this former branch of the estuary, a strong stratification of the water column is taking place seasonally, resulting in recurrent bottom-water hypoxia in the deeper areas. Bottom-water anoxia are developing in summer in some of the deepest channels (Figure 29).

In late summer, a strong bathymetrical biogeochemical zonation can be observed (Figure 30). Below 25 meters depth, bottom waters are anoxic and the sediment appears to be azoic (no macro-epifaunal specimens). Between 25 and 20 meters depth bottom waters are strongly hypoxic and bacterial mats (of *Beggiatoa* sp.) cover the sediment surface. Between 20 and 15 meters depth the sediment surface shows large amounts of the polychaete annelid worm *Ophiodromus flexuosus*. At shallower depth, above 15 m, the sediment is bioturbated (Figure 30). Consequently, it

appears that the oxygen concentration (perhaps together with other redox species) largely determines the macrofaunal distribution.

The main goals of our study were to investigate:

- 1) whether live foraminiferal faunas are present in the Grevelingenmeer, and, if so,
- 2) whether the faunal assemblages show any spatial and/or seasonal variability, in response to varying oxygen concentrations.

A preliminary study of the foraminiferal assemblages, performed by the consulting firm TNO, which has used the Rose Bengal staining method (a method based on the staining of proteins in the foraminiferal protoplasm), suggested the absence of live foraminiferal faunas in the Grevelingenmeer.

For this study, we decided to use the CellTracker™ Green method (CTG: a method based on esterase activity), which is considered much more reliable in strongly hypoxic environments than the Rose Bengal staining method (Bernhard et al., 2006). In fact, the Rose Bengal method is not adequate for the study of live foraminiferal faunas in low oxygen environments, because proteins may be degraded very slowly in such conditions, and dead foraminifera may still stain for several months to years after the death of the living organism (Boltovskoy et Lena, 1970; Corliss et Emerson, 1990; Hannah et Rogerson, 1997; Murray et Bowser, 2000).

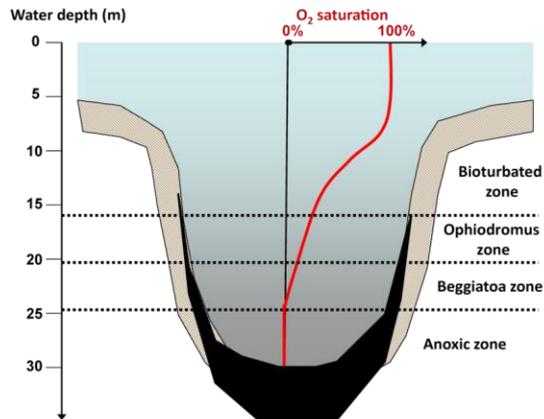


Figure 30 - Schematic representation of bathymetrical biogeochemical zonation along the southern channel transect (after Meysman et al., pers. com.)

Consequently, we use the much more critical CTG method (CTG becomes only fluorescent in a living organism, with esterase activity, see Bernhard et al., 2006) to study the spatial and seasonal variations of the foraminiferal assemblages, and to identify whether there is an effect of the spatial and temporal changes in oxygen concentration on the density, diversity and species composition of the foraminiferal faunas. In view of the large tolerance of benthic foraminifera with respect to various stress parameters (e.g. Murray, 2006), we expected to find living foraminiferal faunas at all sites, eventually with important changes in density, diversity and species composition along the oxygen gradient.

3. Material and Methods

3.1. Sampling strategy

Sediment samples have been collected during 3 sampling campaigns at 6 different sites. During the May cruise on the R/V Argus, 4 sites were sampled to cover a large spatial area, with 2 sites (station 26.5 is oxic, station 22 is hypoxic) in the northern channel and 2 sites (station 12 is oxic, station 6 is hypoxic) in the southern channel (Tableau 18 and Figure 31). During the August and November cruises on the R/V Luctor, we focused on a 3-stations bathymetric transect in the Southern channel, with a strong gradient in bottom-water oxygenation in August (Figure 31).

At all sampling stations, two cores have been taken for foraminiferal analysis. Our cores have been obtained by subsampling in a boxcorer during the May cruise and with a MiniMUC multicorer or a UWITEC corer (both are interface corers) for the August and November cruises. During all 3 cruises we obtained cores with an inner diameter of 6 cm. The oxygen saturation (only available for August and November sampling times) is measured by CTD (Meysman pers. com.) at station 1, the values given for stations 2 and 4

Tableau 18 - Sampling sites, depth, coordinates, sampling dates and number of cores. O₂ saturation measured by CTD at station 1, the values given for stations 2 and 4 are based on the CTD profile obtained at station 1. NA: no data available

Station	Depth (m)	Latitude	Longitude	Sampling date	Month	Number of cores taken	O ₂ saturation (%)
ST6	30	51°44'46.5341"N	3°53'22.1415"E	18/05/2011	May	2	NA
ST12	16	51°42'53.6326"N	3°59'57.5929"E	18/05/2011	May	2	NA
ST26.5	13,3	51°46'05.8762"N	3°59'11.9570"E	18/05/2011	May	2	NA
ST22	24	51°45'47.4010"N	3°52'08.5633"E	18/05/2011	May	2	NA
ST1	34	51°44.834 N	3°53.401 E	23/08/2011	August	2	4
ST2	23,1	51°44,956 N	03°53.826 E	24/08/2011	August	2	45
ST4	17,2	51°44.856 N	03°53.942 E	24/08/2011	August	2	60
ST1	34	51°44.834 N	3°53.401 E	01/11/2011	November	2	82
ST2	23,1	51°44,956 N	03°53.826 E	01/11/2011	November	2	91
ST4	17,2	51°44.856 N	03°53.942 E	01/11/2011	November	2	94

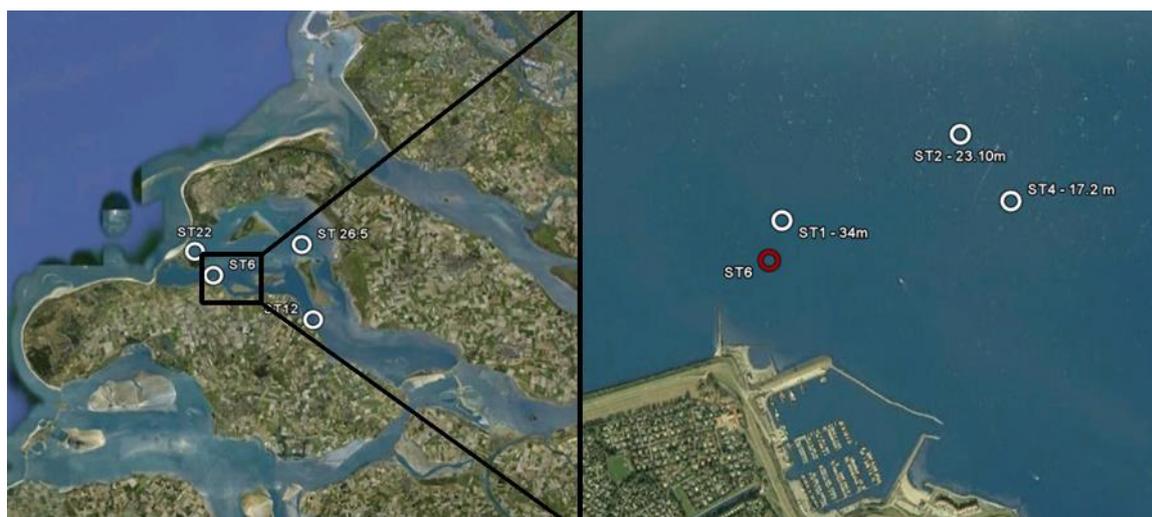


Figure 31 - Location of the sampling sites (Left panel: May 2011 sampling stations; right panel: August and November 2011 sampling stations).

are based on the CTD profile with water depth obtained at station 1.

3.2. Foraminiferal faunal analysis

All cores were treated using the CTG method. CellTracker™ Green CMFDA is a non fluorescent molecule, which is hydrolyzed in the living organism by nonspecific esterase, producing a fluorescent compound (if observed with the accurate excitation and emission wavelength, 492 nm and 517 nm respectively). When living cells are incubated in CellTracker™ Green CMFDA, the probe passes through the cellular membrane, and reaches the cytoplasm where hydrolysis with nonspecific esterase causes a fluorogenic reaction.

For faunal analyses, entire sediment cores (28.3 cm² surface area) were sliced, every half cm between 0 and 2 cm and every cm between 2 and 5 cm. Within one hour after retrieval, sediments were stored in 200 cc bottles, which were filled with sea water and CTG-DMSO at a final CTG concentration of

1 μM as described by Bernhard et al. (2006). Samples were shaken and immediately placed in a cool box at *in situ* temperature where they remained for at least 6 h in order to obtain a CTG reaction. After this reaction period, samples were taken from the incubator and fixed in 4% formalin buffered with Sodium Borax. The samples were further stored at room temperature.

Tableau 19 - Depth intervals analysed for all the sampled cores.

Station	Month	Core	Depth intervals analysed
ST6	May	A	2 (0-1cm)
ST6	May	B	2 (0-1cm)
ST12	May	A	2 (0-1cm)
ST12	May	B	2 (0-1cm)
ST26-1/2	May	A	2 (0-1cm)
ST26-1/2	May	B	2 (0-1cm)
ST22	May	A	2 (0-1cm)
ST22	May	B	2 (0-1cm)
ST1	August	A	7 (0-5cm)
ST1	August	B	2 (0-1cm)
ST2	August	A	7 (0-5cm)
ST2	August	B	2 (0-1cm)
ST4	August	A	7 (0-5cm)
ST4	August	B	2 (0-1cm)
ST1	November	A	2 (0-1cm)
ST1	November	B	2 (0-1cm)
ST2	November	A	2 (0-1cm)
ST2	November	B	2 (0-1cm)
ST4	November	A	2 (0-1cm)
ST4	November	B	2 (0-1cm)

In the laboratory, the samples were subsequently sieved over 315, 150, 125, 100 and 63 µm meshes. Foraminiferal counts were performed in all fractions >125 µm using an epifluorescence stereomicroscope (Olympus SZX12 with a light fluorescent source Olympus URFL-T). Samples were excited at a wavelength of 492 nm, whereas emission took place at 517 nm. Only specimens showing clear green fluorescence were picked and counted as living. For the August cruise, we sampled one core from every station down to 5 cm depth. For the three replicate cores, the topmost 2 levels (0-0.5 cm and 0.5-1 cm) were studied. For the May and November cruises, we studied for all stations the 0-1 cm

depth interval in a pair of replicate cores (Tableau 19).

4. Results and interpretation

4.1. Analysis of Foraminiferal Faunas

The analysis of the foraminiferal faunas revealed that living foraminifera are present in large numbers in the Grevelingenmeer (Tableau 20).

The average number of living individuals in the 0-1 cm interval differs considerably between the stations and sampling periods. At the deepest stations 6 and 1 (30 and 34 m

Tableau 20 - Total number of living foraminifera (per 28.3 cm³) and relative density of the main species found in the 0-1cm depth interval of the 20 studied cores.

Month	Station	Core	Water depth	Oxygen saturation	Number of living individuals	<i>Ammonia</i> cf. <i>A. batava</i> (%)	<i>Elphidium</i> ex. gr. <i>E. excavatum</i> (%)	<i>Elphidium</i> spp. (%)	<i>Haynesina germanica</i> (%)	Porcelaneous species (%)	<i>Stainforthia fusiformis</i> (%)	<i>Trochammina</i> cf. <i>T. inflata</i> (%)	Other species (%)	A/A+E ratio
May	ST6	A	30	ND	21	9,5	85,7	0,0	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	10,0
May	ST6	B	30	ND	9	0,0	80,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0
May	ST12	A	16	ND	410	71,4	8,1	0,5	15,6	0,2	2,2	1,5	0,5	89,8
May	ST12	B	16	ND	1496	90,0	3,7	0,1	3,7	0,1	1,1	1,1	0,2	96,1
May	ST26-1/2	A	13,3	ND	156	81,5	4,2	5,4	3,0	0,0	0,0	1,8	4,2	95,1
May	ST26-1/2	B	13,3	ND	122	80,8	6,2	2,3	2,3	0,6	0,0	5,1	2,8	92,9
May	ST22	A	24	ND	168	46,8	0,6	37,2	8,3	3,2	0,0	0,0	3,8	98,6
May	ST22	B	24	ND	177	45,0	0,8	36,7	10,0	0,0	0,0	0,0	7,5	98,2
August	ST1	A	34	4%	10	33,3	8,3	50,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	80,0
August	ST1	B	34	4%	5	42,9	14,3	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	75,0
August	ST2	A	23,1	45%	396	51,8	38,4	0,5	0,3	0,3	0,0	7,6	1,3	57,4
August	ST2	B	23,1	45%	588	43,9	45,9	0,0	0,3	0,5	0,0	9,0	0,3	48,9
August	ST4	A	17,2	60%	1249	59,2	32,7	0,4	0,2	0,2	0,0	7,2	0,1	64,5
August	ST4	B	17,2	60%	1080	60,1	28,7	0,5	0,1	0,4	0,1	9,7	0,5	67,7
November	ST1	A	34	82%	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
November	ST1	B	34	82%	6	33,3	50,0	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0	40,0
November	ST2	A	23,1	91%	314	55,7	29,9	1,6	0,0	1,0	0,0	11,8	0,0	65,1
November	ST2	B	23,1	91%	414	41,1	49,1	1,5	0,7	0,0	0,0	7,3	0,2	45,6
November	ST4	A	17,2	94%	2235	66,8	21,3	0,2	0,0	0,3	0,1	10,9	0,4	75,9
November	ST4	B	17,2	94%	2413	63,8	25,1	0,4	0,1	0,3	0,1	9,8	0,4	71,8

depth respectively, very close to each other), we only found a few individuals in each of the three sampling periods. A maximum of 21 specimens was found in May, whereas no living specimens were observed in core A sampled in November 2011.

In May 2011, three other, widely spaced samples were sampled. Unfortunately no oxygen saturation data are available for these samples. Stations 22 and 26-1/2 (water depth 24 and 13 m, respectively, show both densities of about 150 specimens per core, whereas station 12 (water depth 16 m) shows a highly variable density with ~400 and ~1500 specimens observed in the 2 replicate cores.

For the stations sampled in August and November, 300 to 600 individuals per core were found at station 2, at 23 m depth. At station 4, at 17 m depth, more than thousand specimens were found in each of the four studied cores. A maximum of ~2400 living foraminifera was observed at station 4 in November 2011.

At station 1 (and 6, considered to represent the same conditions), the values are low for all three sampling periods. At station 2, the foraminiferal density has the same order of magnitude in August and November. Conversely, at station 4, the foraminiferal density was almost 2 times higher in November than in August.

When we compare the pairs of replicates cores, it appears that the foraminiferal density is generally fairly similar (Tableau 20) suggesting the absence of a strong small scale spatial patchiness in the Grevelingenmeer. Nevertheless, a strong difference in foraminiferal density between the two replicates cores

is observed at Station 12. Since these two cores have been subsampled from a box corer, this difference could be partly due to a badly preserved sediment-water interface.

The faunal analyses of the 20 studied cores show that the foraminiferal faunas are strongly dominated by 3 species: *Ammonia* cf. *A. batava*, *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Trochammina* cf. *T. inflata* (See Figure 32, Figure 33 and Figure 34). Since the representatives of these three taxa systematically have a slightly different morphology than typical *A. batava*, *E. excavatum* and *T. inflata*, we prefer to put them in the open nomenclature, awaiting further (genetic and morphological) analyses. At stations 12 and 22, *Haynesina germanica* and *Elphidium* spp. are subsidiary taxa.

When we consider the large spatial range covered by the May 2011 samples (Figure 31), it appears that the foraminiferal densities and species composition are highly variable between the four stations. The lowest densities are observed at the deep station 6, intermediate values at stations 22 and 26-1/2 and high and variable densities at station 12. The very scarce fauna found at station 6 is mainly composed of *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*. At stations 12 and 26, the foraminiferal faunas are strongly dominated by *Ammonia* cf. *A. batava* (70-90%) and show only low numbers of *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* (~5%). At station 12 (16 m depth), positioned in the eastern part of the channel *Haynesina germanica*, tolerant for brackish waters, is an important subsidiary species (4 and 16% in the two replicate cores). At station 22 (24 m

water depth), in the western part of the basin, close to the Grevelingendam, *Ammonia* cf. *A. batava* is much less dominant (~45%), *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* is almost absent, whereas other *Elphidium* species account for ~35% of the faunas, and *Haynesina germanica* for ~10%.

It appears that at the large spatial scale of the May sampling campaign, the foraminiferal faunas do not only strongly vary in density, but also in species composition.

During the august and November campaigns, we concentrated on a three stations bathymetrical transect in the main channel, over a very short distance. Consequently, the spatial range we considered is much smaller than during the May campaign. At stations 6 and 1 (which are very close to each other), bottom waters were anoxic from early summer until October 2011. Consequently, when we consider samples from May, August and November 2011, we are looking at the foraminiferal communities before, during and a few weeks after anoxic conditions.

In May the poor faunas at station 6 (21 and 9 individuals in the topmost cm of the two replicate cores) were strongly dominated by *Elphidium* ex gr. *E. excavatum* (Figure 32). In August, at station 1 (5 and 10 individuals in the topmost cm) this species was accompanied by small amounts of *Ammonia* cf. *A. batava* (Figure 33), whereas in November one core did not contain any living foraminifera, whereas the second one contained only 6 specimens (Figure 34). These very scarce faunas suggest that before the onset of anoxic conditions, the faunas were strongly dominat-

ed by *Elphidium* ex gr. *E. excavatum*, but that also this apparently rather low oxygen tolerant species progressively disappeared after the onset of anoxia.

The poverty of the foraminiferal faunas at this site (stations 1 and 6) in the centre of the main channel is striking. We suspect that the population found in May are the last remnants of a viable fauna present in winter, when the basin floor is re-oxygenated. Conversely, the very poor, but slightly more diverse, assemblages found in August and November may have been transported to this site by bottom currents. Once swept in, these individuals may have survived for a certain period of time in strongly hypoxic or even anoxic conditions. The continuing poverty of the foraminiferal faunas in November 2011, a couple of weeks after the re-oxygenation of the bottom waters, shows that an extensive re-colonisation has not yet taken place. Additional data are necessary to decide whether such a re-colonisation does not take place at all, or whether this re-population takes place later in the year.

At stations 2 and 4 we observe a rather similar species composition in August and September 2011, and very similar patterns in the replicate cores. The foraminiferal faunas are strongly dominated by three taxa: *Ammonia* cf. *A. batava*, *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Trochammina* cf. *T. inflata*. Foraminiferal densities are systematically much higher at station 4 than at station 2. At station 2, the faunas tend to be slightly richer in August than in November. Conversely, at station 4, in the cores sampled in November the faunal density in the first centimeter is

about two times higher than in the cores sampled in August (Figure 34).

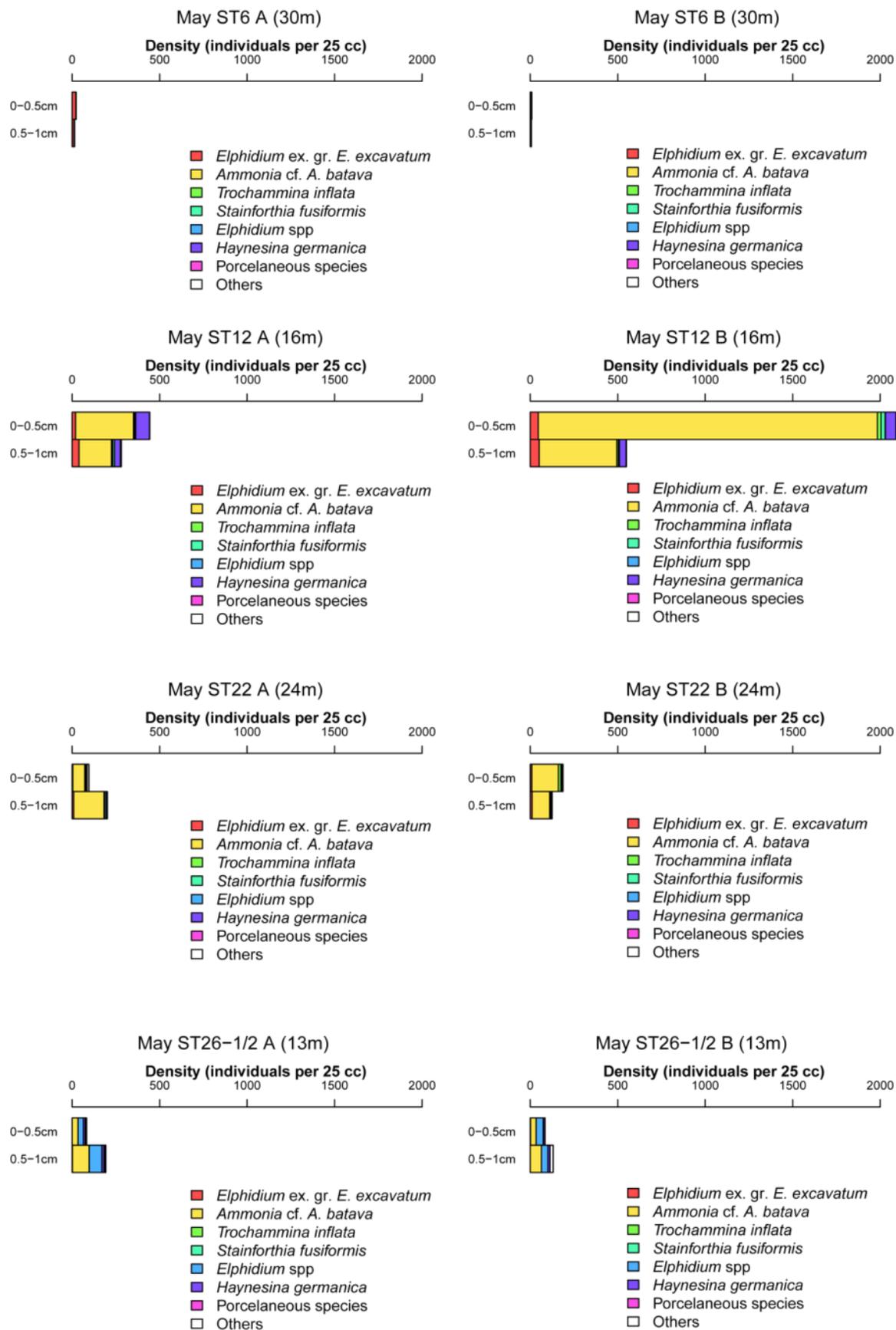


Figure 32 - Foraminiferal densities (standardized as the number of individuals per 25cc) in May 2011 2011 at stations 6, 12, 22 and 26.5. Left panel is replicate A and right panel is replicate B.

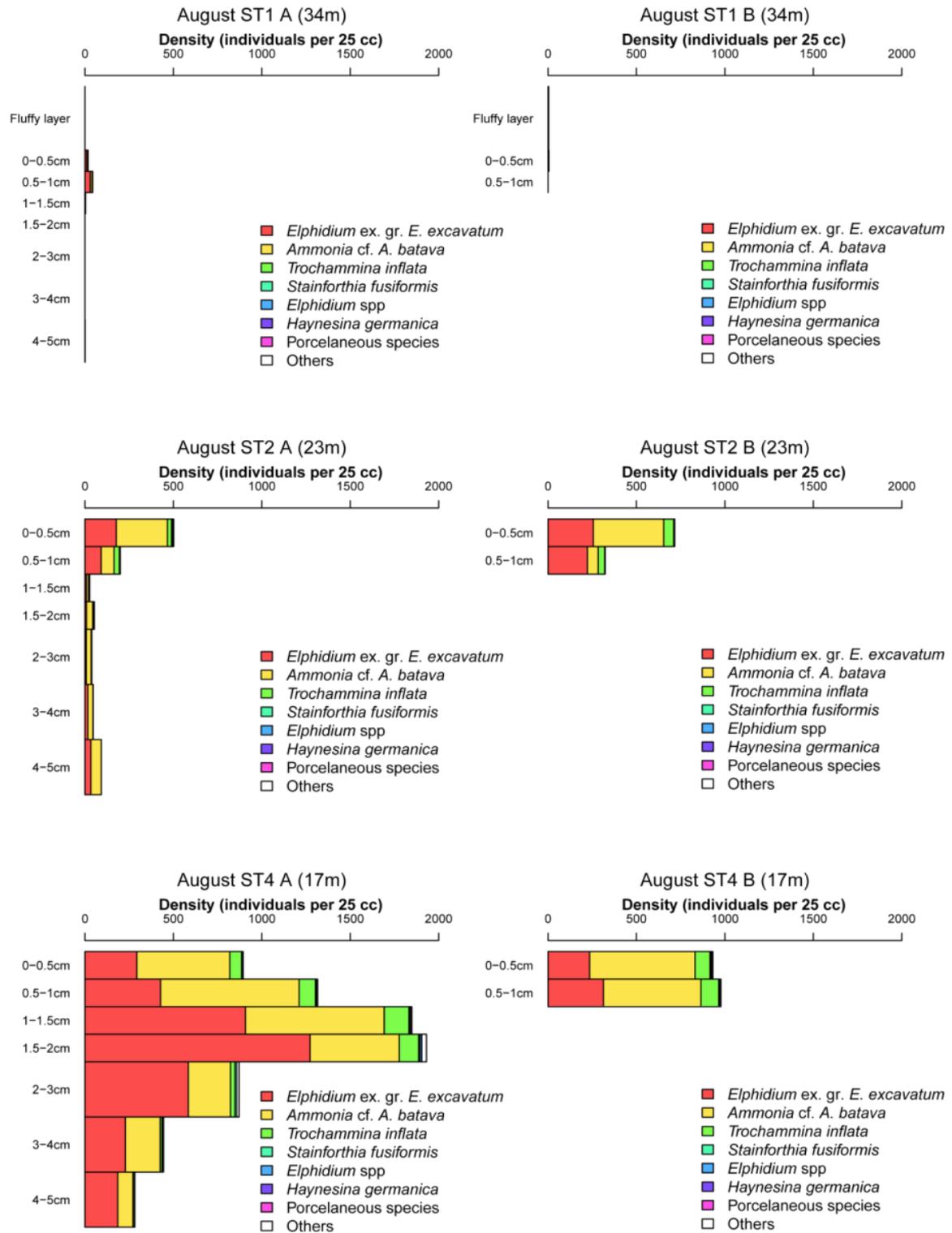


Figure 33 - Foraminiferal densities (standardised as the number of individuals per 25cc) in August 2011 at stations 1, 2 and 4. Left panel is replicate A and right panel is replicate B.

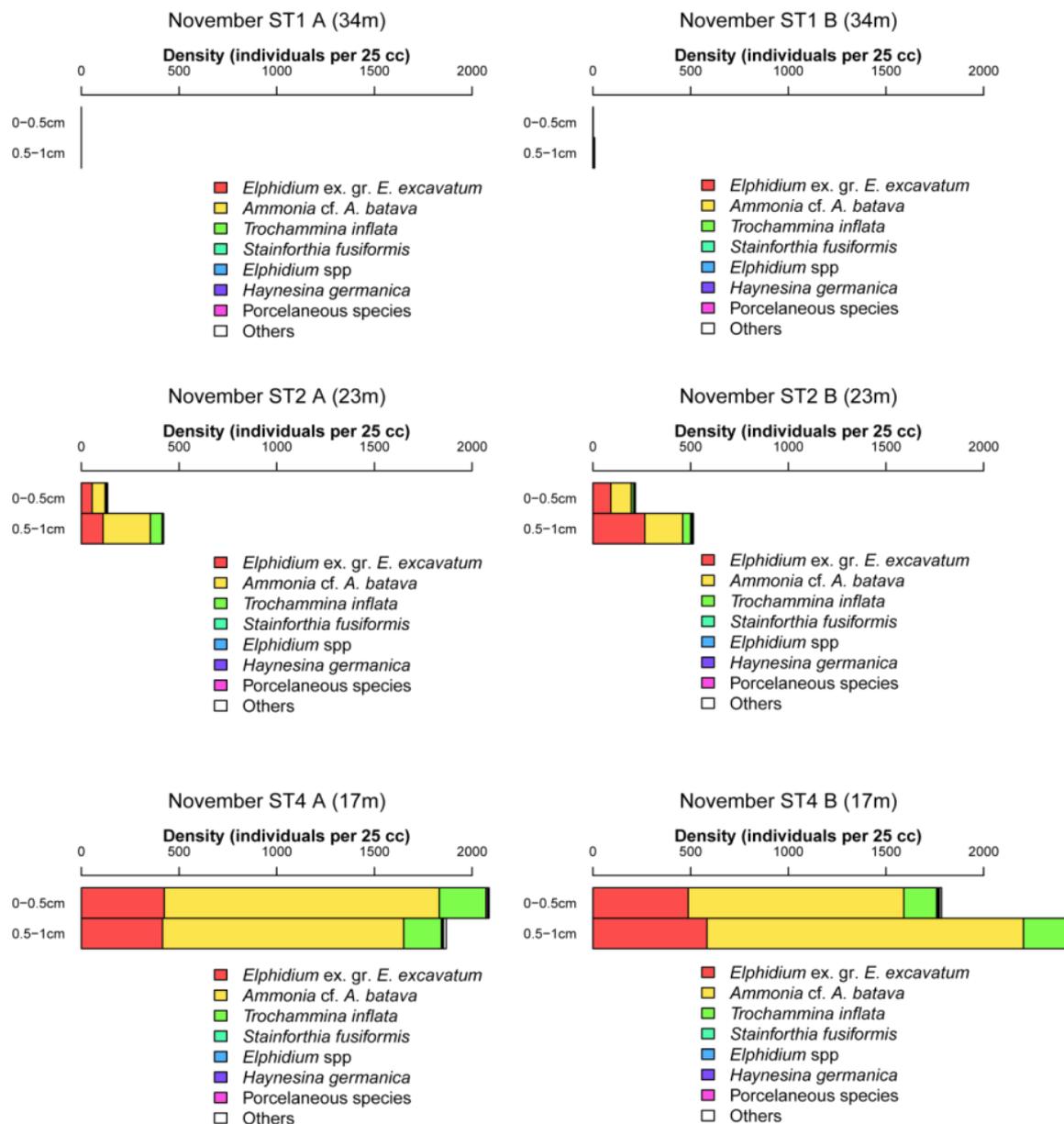


Figure 34 - Foraminiferal densities (standardised as the number of individuals per 25cc) in November 2011 at stations 1, 2 and 4. Left panel is replicate A and right panel is replicate B.

When looking in somewhat more detail at the relative frequencies of the two dominant species, *Ammonia* cf. *A. batava*, and *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*, it appears that at station 2 (water depth 23 m), their proportions are more or less comparable (Table 3: 41-56% for the first, 30-49% for the latter taxon), in August as well as November. At the systematically slightly better oxygenated station 4 (water depth 17 m), *Ammonia* cf. *A.*

batava clearly dominates the faunas of the topmost centimeter, in both sampling periods (59-67%), whereas *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* is always much less frequent (21-33%). The fact that the relative frequency of *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* increases at station 4, where the oxygen saturation is lower, suggest a higher tolerance for hypoxia of this species. Such an interpretation is corroborated by the strong dominance of *Elphidium*

ex. gr. *E. excavatum* in the faunas collected at station 6 in May 2011, and by its dominance in the deeper sediment layers at station 4 (Figure 32 ; Tableau 20).

The higher standing stocks observed in November 2011 at station 4 could be due to an earlier re-oxygenation of this site in comparison to the deeper stations 2 and 1. This hypothesis needs to be verified with a more dense periodical sampling scheme, accompanied by accurate oxygen measurements at the sediment-water interface.

4.2. Vertical distribution of the foraminiferal assemblages

When considering the vertical distribution of foraminifera in the three cores which we studied down to 5 cm, we can notice that at station 2, foraminiferal densities rapidly decrease with depth in the sediment (Figure 33). At station 4, where oxygen concentration is highest, a subsurface maximum (*i.e.* in the 1-2cm depth interval) was observed in August 2011 (Figure 33). At station 1, living foraminifera have only been found in the 0-1 cm interval, no living specimens were found between 1 and 5 cm depth. These results suggest that although the foraminiferal faunal composition does only show limited differences between the investigated stations, the microhabitat of the dominant species may vary considerably.

In August 2011, *Ammonia* cf. *A. batava* had a clear maximum at the sediment surface at station 2, but was present with about equal

numbers in the topmost 2 cm at station 4. *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*, lived in the top 1 cm at station 2, but showed a very clear infaunal maximum at station 4, between 1 and 3 cm depth in the sediment. The difference in vertical distribution between these two stations probably reflects a more extended succession of redox zones at station 4, where the oxygen saturation in the overlaying bottom water was higher (60% versus 45%, values obtained at site 1, at 23 and 17 m water depth, respectively). This would have allowed the foraminifera to colonize a deeper part of the sediment column.

The difference in vertical distribution between *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Ammonia* cf. *A. batava*, with the former species occupying a deeper microhabitat, corroborates our conclusion based on the percentage data of both species, that *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* has a higher tolerance of low oxygen conditions than *Ammonia* cf. *A. batava*.

4.3. Influence of bottom water oxygen saturation on the foraminiferal density in August and November 2011

Unfortunately data on oxygen saturation are only available for the August and November 2011 cruises. Consequently we will in the following analysis only consider the faunal data from these two cruises. We will first describe the variation of density of all the major species and then focus our analysis on the two most occurring species: *Ammonia* cf. *A. batava* and *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*.

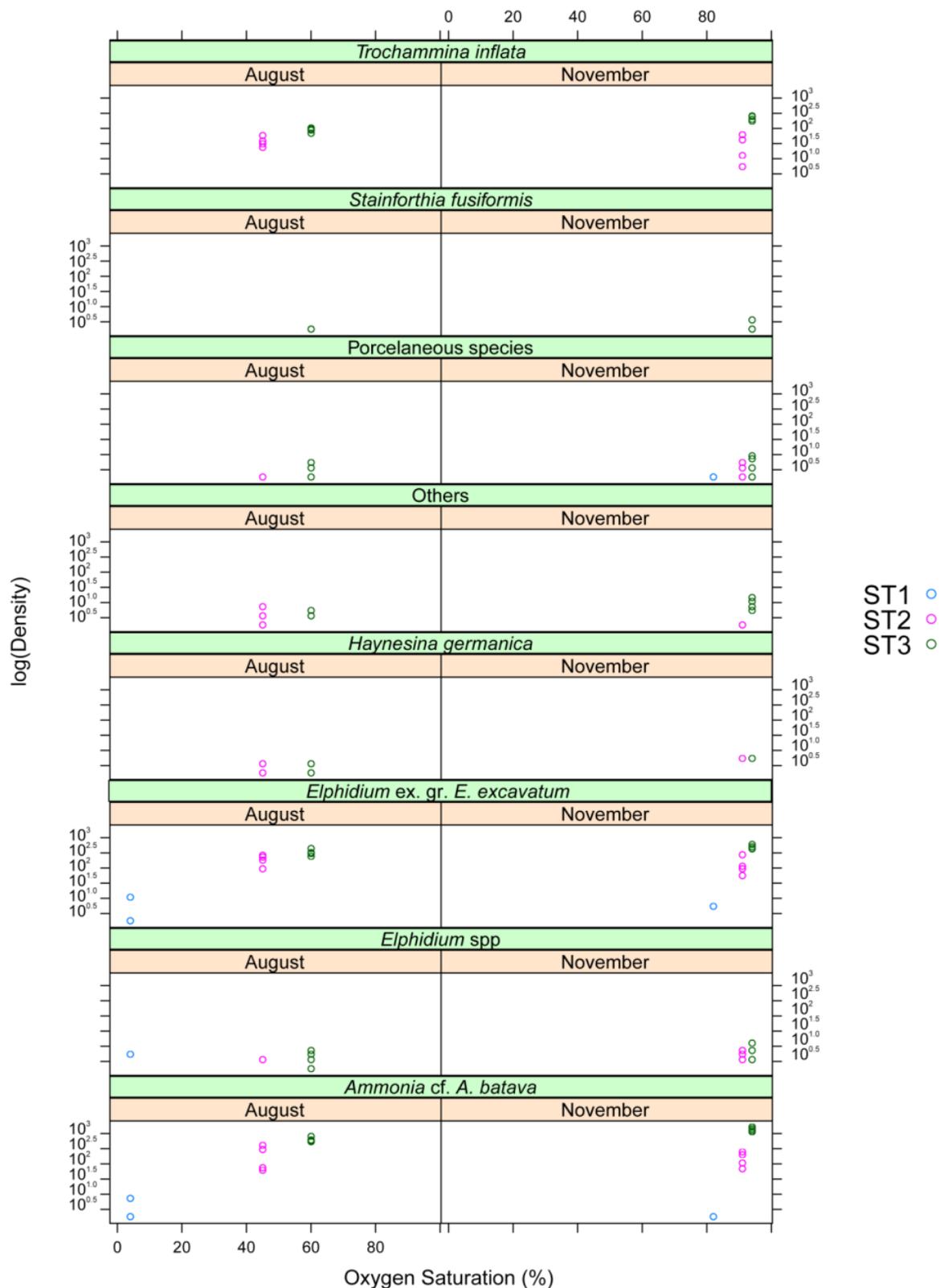


Figure 35 - Plot of the variation of the foraminiferal density versus estimated oxygen saturation in the bottom water in August and November for the three sampled stations. Note that the density is expressed on a log scale. The plotted values are the densities (individuals per 25cc) for the two pairs of replicates cores and the two studied depth intervals (0-0.5 and 0.5-1cm).

When we look at the relation between oxygen saturation on foraminiferal density we can observe that for all of the major species the density increases with increasing oxygen saturation (Figure 35). Nevertheless even if the oxygen saturation at station 1 is important in November (~80%) the foraminiferal density is very low. This is probably due to the ecosystem resilience, the slow recovery after an anoxic period. Even if the oxygen saturation has increased in the bottom water in the main channel, it may take some time before the sediment-water interface becomes re-oxygenated at the same water depth (the oxygen values for stations 2 and 4 has been taken from the CTD profile of station 1). Next, the foraminiferal faunas may need weeks or even months to re-colonise the clayey substrate after its re-oxygenation. Further analyses (at least with monthly samples) are needed to identify to what degree, and how fast the foraminiferal communities can fully recover after an anoxic period.

To further quantify the relationship between oxygen saturation and foraminiferal density we focus on the two dominant species: *Ammonia* cf. *A. batava* and *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*. We use linear statistical models to test the statistical effect of the species, the month, the oxygen saturation and the interaction between the month and the saturation on

Tableau 21 - Summary of the results of the analysis of variance. Df = degrees of freedom; F value = value of the statistical estimate F; p value = probability associated to the test.

Variable	Df	F value	p value
Species	1	2.0566	0.1588
Saturation	1	112.89	9.963e-14
Month	1	268.55	<2.2e-16
Month:Saturation	1	210.15	<2.2e-16

the foraminiferal density (which has been log-transformed).

Our statistical analysis reveals that there is a significant (statistical) effect of the oxygen saturation and the sampling month on the log of the faunal density of the two species (no significant effect of the species; see Tableau 21). The fact that there is a significant relationship between these parameters does of course not necessarily mean that they are linked by a causal relationship.

The realized statistical model permits us to quantify the relationship between bottom water saturation, the sampling date and their interaction on the foraminiferal densities (Tableau 22 ; Figure 36):

$$Density_{(August)} = (e^{0.096 * Saturation + 0.509}) - 1$$

$$Density_{(November)}$$

$$= (e^{(0.096 + 0.412) * Saturation + 0.509 - 41.7}) - 1$$

In our very limited set of observations, foraminiferal density increases exponentially with increasing oxygen concentration. The slope of the fit is steeper in November than in August, which means that the increase in density per unit of oxygen saturation is more important in November than in August. This observation also reveals that in spite of the fact that the bottom waters have been almost entirely re-oxygenated, the recolonisation by the foraminiferal faunas is probably still in an initial stage.

In order to gain a better insight in the systematics of the recolonisation process, and its timing with respect to the re-oxygenation history, it is absolutely necessary to have a closer sample spacing in time. Before having such results available, we can speculate that

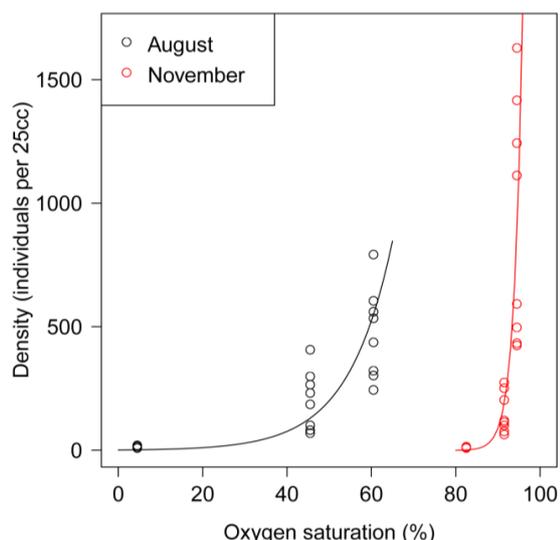


Figure 36 - Plot of the foraminiferal density in August (black open circles) and November (red open circles) for two species (*Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Ammonia* cf. *A. batava*) at the three sampled stations for the two analysed depth intervals with estimated oxygen saturation. The lines represent the statistical model in August and November in black and red respectively ($F=197.2$; $df=3, 44$; $p.value<0.05$; $R^2=0.92$).

after one or two months the foraminiferal densities in the deepest station will strongly increase, whereas the densities at the shallowest station will stabilize. One of the major remaining questions is whether the populations which were subjected to prolonged periods of anoxia will recover as fast and as completely as the populations which were only subjected to short periods of anoxia, or to longer periods of severe hypoxia.

4.4. A tentative bio-indication method for the Grevelingenmeer

One of the questions which led to this first preliminary study of the living benthic foraminifera was whether it was possible to develop a reliable and simple to use bio-indicator method, which could describe the state of the benthic ecosystem in a quantitative way.

The present data suggest that such a bio-indicator method can indeed be envisaged. In this first study, based on the living foraminifera from the > 125 µm fraction, it appears that the foraminiferal faunas respond in several ways to changing oxygen saturation values:

1) the faunal densities increase with increasing oxygen saturation of the bottom waters;

2) the depth of the foraminiferal faunas in the sediment increases with increasing oxygen saturation;

3) the percentage of *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* decreases, whereas the percentage of *Ammonia* cf. *A. batava* increases, with increasing oxygen saturation;

4) although this has to be confirmed by a biometrical study, it appears that the pore density and the pore size increase with decreasing oxygen saturation.

Concerning the first 3 observations, it appears that all these three types of faunal response to oxygen saturation have a more or less strongly delayed response to oxygen concentration. However, it should be kept in mind that in the present study, all oxygen saturation measurements were performed in the water column at station 1, and not at the sediment-water interface of the various stations. It seems very probable that the water column

Tableau 22 – Estimation of the coefficients of the statistical model.

	Estimate	t value	p value
(Intercept)	0.509056	1.962	0.0562
Saturation	0.095992	16.040	<2e-16
Month November	-41.723849	-16.756	<2e-16
Saturation:MonthNovember	0.411948	14.496	<2e-16

was re-oxygenated more quickly than the sediment-water interface at the same water depth, which may explain part of the delay in the response of the foraminiferal faunas. It is evident that a much closer sample survey is necessary to understand the time relations between water column re-oxygenation, sediment-water interface re-oxygenation and foraminiferal recolonisation.

From a practical point of view, the first and third of the faunal responses listed above offers the best perspectives to develop an easily applicable bio-indicator method. Especially the ratio between *Ammonia* cf. *A. batava* and *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*, expressed as

$$\frac{N_{Ammonia}}{N_{Ammonia} + N_{Elphidium}} \times 100$$

With $N_{Ammonia}$ = Raw count or density or relative density of *Ammonia* cf. *A. batava*

And $N_{Elphidium}$ = Raw count or density or relative density of *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum*

could provide an easy measure of the ecosystem state. For the present study, the values of this index are listed in Tableau 20. It is evident this ratio can only be reliable if it is based on a sufficiently rich sample. The values for stations 1 and 6, based on very few living foraminifera, should therefore not be considered. The comparison between stations 2 (AE = 49-57%) and 4 (AE index = 64-76%) shows as expected, the Ammonia-Elphidium index increases towards the most oxygenated stations.

It is surprising that in the Grevelingenmeer an *Elphidium* species is more tolerant, whereas an *Ammonia* species is less tolerant to oxy-

gen depletion. These observations are strongly contrasting with the observation of Sen Gupta et Platon (2006) in the Gulf of Mexico, where an Ammonia/Elphidium index increases with increasing ecological stress. The large difference between the two areas is probably due to the fact that the concerned species are not the same. In the Grevelingenmeer the *Elphidium* species is more tolerant, whereas in the Gulf of Mexico, the *Ammonia* species is more tolerant to hypoxia. These strongly contrasting results underline the danger to use generic categories, and the necessity to base bio-indicator methods on determinations at a species level.

Further studies are needed to test this potential bio-indicator method, and especially to investigate how the time delays between re-oxygenation and faunal recovery influence this index.

4.5. Morphology of benthic foraminifera in the Grevelingenmeer: an adaptive response to low-oxygen conditions?

The living foraminiferal faunas of the Grevelingenmeer are strongly dominated by the taxa *Ammonia* cf. *A. batava*, *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Trochammina* cf. *T. inflata*. For all three taxa, their morphology is rather different from typical representatives of the species, and for this reason we placed them in the open nomenclature. This anomalous morphology is most striking in *Ammonia* cf. *A. batava*. At all three stations this taxon shows a high density of very large pores (Figure 38

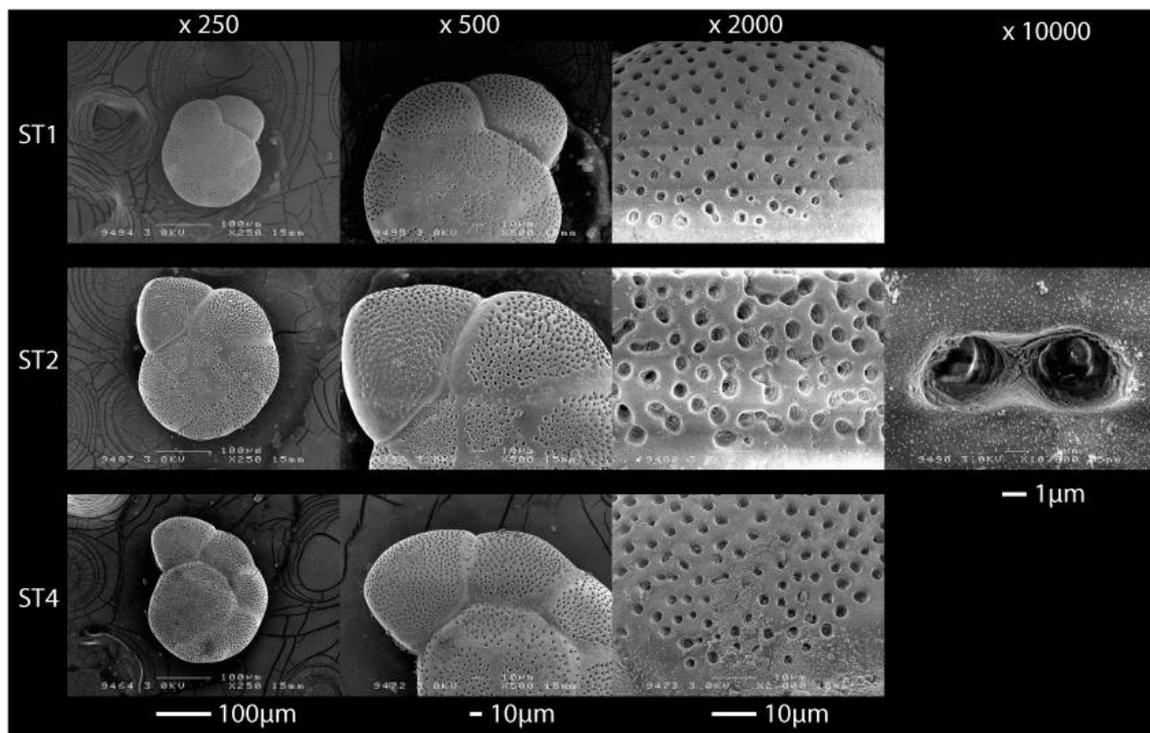


Figure 37 - SEM micrographs of 3 living *Ammonia* cf. *A. batava* from 3 different stations (ST1, ST2 and ST4) in August 2011 with close-ups of the pore distribution in the penultimate chamber, at a magnification of 250, 500, 2000 and 10000 times.

and Figure 37), whereas the parts of the chambers close to the sutures are very often imperforate (Figure 37, 500 x magnification). These aspects are different from typical *A. batava*, in which the pores are at least two times smaller, the number of pores per surface area is lower, and no imperforate zones are observed.

Several studies have tried to link foraminiferal pore size and pore density to bottom water oxygen concentration (Leutenegger et Hansen, 1979; Moodley et Hess, 1992; Bernhard et al., 2010a; Glock et al., 2011). Consequently, we paid special attention to these parameters. Figure 38 shows a typical representative of *Ammonia* cf. *A. batava*. At Figure 37, representative specimens of sites 1, 2 and 4 are shown.

On these pictures, it can be seen that the pore density is very high at all three stations. The pore diameter varies between 2 and 3 µm, which is also very high for this taxon. At first view, there are no major differences between

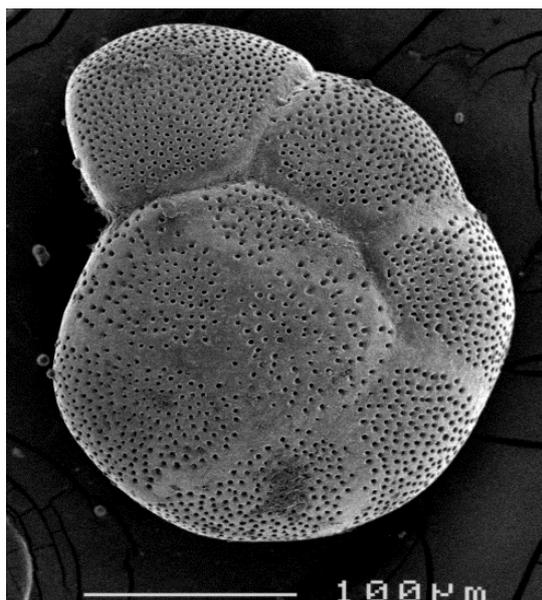


Figure 38 - SEM micrographs of a living *Ammonia* cf. *A. batava* (ST3 - August 2011).

the three sites. However, the specimen of station 2 shows numerous cases of two or three connected pores. Additional studies will be carried out to find out whether this particular aspect is due to partial dissolution of the tests, or a specific treat at this station, which could be interpreted as an adaptive response to low oxygen conditions.

5. Conclusions

- Our faunal analyses using the very critical CTG method indicate that abundant live foraminiferal faunas occur at stations 2 and 4 (water depth respectively 23 and 17 m) in August and November 2011.
- At stations 1 and 6 (30-34 m), which are subject to seasonal anoxia, poor foraminiferal faunas were observed in May, August and November 2011. We suspect that the poor faunas of May represent the last survivors of a declining population, whereas the very scarce foraminifera observed in August and November may have been transported by currents into the deepest part of the channel, and do not represent autochthonous viable faunas. Additional samplings are necessary to find out whether this station is repopulated in winter or early spring, when oxygen contents are maximal.
- The three dominant taxa are characterised by a morphology which differs from that of the typical species; for this reason we placed them in the open nomenclature. Especially in *Ammonia* cf. *A. batava*, the pore density and pore size appears

to be much higher than in typical *A. batava*. A biometrical study will be performed to investigate whether pore size and density vary in function of oxygen concentration.

- Whereas the faunas of station 1 were very poor for the three sampling periods, abundant living faunas were found at the better oxygenated stations 2 and 4. The faunas of station 4, where oxygen saturation is higher, were on average about two times richer than those of station 2.
- Both at stations 2 and 4, the faunas are almost exclusively composed of three species: *Ammonia* cf. *A. batava*, *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Trochammina* cf. *T. inflata*. The relative frequency of *Ammonia* cf. *A. batava* is systematically higher at the better oxygenated station 4 than at station 2, with less well oxygenated conditions. *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* shows the opposite tendency.

6. Perspectives

The present study is mainly based on a three station transect along a bathymetrical and oxygen gradient, which was sampled in August and November 2011. In view of this very limited data set, the present study can only be considered as preliminary. Nevertheless, some important observations have been made:

There are abundant foraminiferal faunas in the Grevelingenmeer, with the exception of station 1, where only very poor faunas were

observed in May, August and November 2011.

The foraminiferal recovery appears to be delayed compared to the re-oxygenation of the water column and the sediment-water interface.

The 2 dominant species show a difference in tolerance with respect to anoxia/hypoxia which offers the opportunity to construct an index of environmental quality on the basis of their relative frequencies.

The pore density and pore size of the dominant taxa seems to be higher than in better ventilated (open marine) environments, and may be related to oxygen concentration.

It is evident that additional, more deepgoing studies are needed to confirm these first observations, based on a very limited number of samples. In order to develop a reliable bio-indicator method, the following information is needed:

1. A more closely spaced study in time (monthly sampling over a period of at least one year) of the foraminiferal faunas, with measurements of the oxygen concentration at the sediment-water interface. Such a study is absolutely needed for two main reasons:
 - To investigate whether the deepest sites, most impacted by anoxia, are recolonised during winter. A larger num-

ber of samples are needed to calibrate the relationship between oxygen concentration and the relative frequency of the two dominant taxa.

- To better quantify the time lag between re-oxygenation and faunal recovery; this knowledge is crucial for the calibration of the bio-indication index based on the two dominant species, and should somehow be integrated in this method.
2. A genetic study of the dominant species in the Grevelingenmeer, and a comparison with similar species of open marine areas. This study has been started in collaboration with Dr. Magali Schweizer of the University of Edinburgh (now at the Université d'Angers).
 3. A biometrical study of the pore density and pore size of the dominant taxa. A study of the relationship between oxygen concentration and pore characteristics are in progress.
 4. As study of a long sediment core from the Grevelingenmeer, in which the bio-indicator methods based on the relative frequency of the 2 dominant taxa can be tested.

Partie II. Résumé et nouveaux résultats du projet

Ce rapport écrit en Juin 2012 présente les résultats d'une étude préliminaire de la variabilité spatio-temporelle des faunes de foraminifères benthiques dans le Grevelingenmeer. Cette étude a été commandée par l'agence de l'eau néerlandaise (Rijkswaterstaat) qui souhaite augmenter les efforts de monitoring de l'effet du développement saisonnier de l'anoxie dans les eaux de fond. A long-terme, le caractère marin du bras d'estuaire fermé pourrait être renforcé afin d'augmenter la circulation dans le but de rétablir une oxygénation correcte dans les bassins profonds. Notre étude a ainsi pour but d'établir un point de référence des communautés de foraminifères benthiques avant un potentiel arrêt des phénomènes d'anoxie.

Dans cet ancien estuaire, la station la plus profonde (nommée station 1 ou station 6) est anoxique entre Juillet et Octobre 2011. Notre analyse basée sur le comptage d'individus répondant positivement à la coloration au CTG (un réactif fluorescent marquant les individus actifs enzymatiquement, et ainsi considérés comme vivants) montre des faunes abondantes aux stations oxygénées 22, 12 et 26.5 (respectivement 24, 16 et 13 m) en Mai 2011. En Aout et Novembre 2011, les densités de foraminifères aux stations 2 et 4 (23 et 17 m de profondeur) sont également importantes. Aux stations 1 et 6 (à 34 et 30 m de profon-

deur) anoxiques entre Juillet et Septembre, les densités de foraminifères vivants sont très faibles en Mai, Aout et Novembre 2011. Ce nombre très faible pourrait correspondre à des individus transportés depuis les stations riches vers la station profonde anoxique, restés vivants dans des conditions hostiles.

Aux stations les plus riches, les faunes ne sont composées quasi-exclusivement que de trois taxons : *Ammonia* cf. *A. batava*, *Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* et *Trochammina* cf. *T. inflata*. Quelques individus d'*Haynesina germanica* et *Elphidium* spp. sont également trouvés aux stations 12 et 22.

En Aout et en Novembre, les densités à la station 4 sont deux fois plus importantes que les densités observées à la station 2 (Tableau 23). Bien que les espèces dominantes soient les mêmes aux deux sites, la densité relative du genre *Ammonia* est supérieure à la station 4 qu'à la station 2 quand l'inverse est observé pour le genre *Elphidium*. Cette différence suggère qu'*Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* pourrait avoir une plus forte tolérance à la diminution de la saturation en oxygène qu'*Ammonia* cf. *A. batava*. Si cette différence peut être confirmée dans un plus grand nombre d'analyse des faunes du Grevelingenmeer, le ratio des densités relatives des deux espèces pourrait être utilisé comme in-

dice de bio-indication des conditions d'oxygénation des eaux de fond.

Nous avons également mis en évidence un effet de la saturation en oxygène aux 3 stations échantillonnées en Aout et Novembre sur les densités des deux espèces dominantes. Cette relation est telle que la densité augmente exponentiellement avec la saturation en oxygène avec une pente différente aux deux périodes d'échantillonnage.

Le faible nombre d'individus présents dans la station profonde anoxique suggère qu'ils sont transportés accidentellement dans ce milieu hostile où ils peuvent survivre mais ne pourraient pas se reproduire.

La majorité des espèces de foraminifères benthiques vivant dans le Grevelingenmeer

sont caractérisées par une morphologie qui diffère de la morphologie typique de ces espèces. Cette différence est particulièrement marquée pour *Ammonia* cf. *A. batava*. Pour cette espèce, le nombre de pores serait relativement faible mais la taille de ces pores des individus vivant dans le Grevelingenmeer est plus importante que chez les *A. batava* échantillonnées à d'autres sites.

Depuis la rédaction de ce rapport en Juin 2012, j'ai eu l'occasion d'encadrer le stage de Marine Rodriguez (L3 Environnement Université de Bretagne Sud) qui a participé à la mise au point du protocole d'analyse de la taille et de la densité des pores de la coquille.

Anais Guihéneuf (M2, ENS Lyon), encadrée par Frans Jorissen, a travaillé sur la den-

Tableau 23 - Total number of living foraminifera (per 28.3 cm³) and relative density of the main species found in the 0-1cm depth interval of the 20 studied cores.

Month	Station	Core	Water depth	Oxygen saturation	Number of living individuals	<i>Ammonia</i> cf. <i>A. batava</i> (%)	<i>Elphidium</i> ex. gr. <i>E. excavatum</i> (%)	<i>Elphidium</i> spp. (%)	<i>Haynesina germanica</i> (%)	Porcelaneous species (%)	<i>Stainforthia fusiformis</i> (%)	<i>Trochammina</i> cf. <i>T. inflata</i> (%)	Other species (%)	A/A+E ratio
May	ST6	A	30	ND	21	9,5	85,7	0,0	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	10,0
May	ST6	B	30	ND	9	0,0	80,0	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	10,0	0,0
May	ST12	A	16	ND	410	71,4	8,1	0,5	15,6	0,2	2,2	1,5	0,5	89,8
May	ST12	B	16	ND	1496	90,0	3,7	0,1	3,7	0,1	1,1	1,1	0,2	96,1
May	ST26-1/2	A	13,3	ND	156	81,5	4,2	5,4	3,0	0,0	0,0	1,8	4,2	95,1
May	ST26-1/2	B	13,3	ND	122	80,8	6,2	2,3	2,3	0,6	0,0	5,1	2,8	92,9
May	ST22	A	24	ND	168	46,8	0,6	37,2	8,3	3,2	0,0	0,0	3,8	98,6
May	ST22	B	24	ND	177	45,0	0,8	36,7	10,0	0,0	0,0	0,0	7,5	98,2
August	ST1	A	34	4%	10	33,3	8,3	50,0	0,0	8,3	0,0	0,0	0,0	80,0
August	ST1	B	34	4%	5	42,9	14,3	42,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	75,0
August	ST2	A	23,1	45%	396	51,8	38,4	0,5	0,3	0,3	0,0	7,6	1,3	57,4
August	ST2	B	23,1	45%	588	43,9	45,9	0,0	0,3	0,5	0,0	9,0	0,3	48,9
August	ST4	A	17,2	60%	1249	59,2	32,7	0,4	0,2	0,2	0,0	7,2	0,1	64,5
August	ST4	B	17,2	60%	1080	60,1	28,7	0,5	0,1	0,4	0,1	9,7	0,5	67,7
November	ST1	A	34	82%	0	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx	xx
November	ST1	B	34	82%	6	33,3	50,0	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0	0,0	40,0
November	ST2	A	23,1	91%	314	55,7	29,9	1,6	0,0	1,0	0,0	11,8	0,0	65,1
November	ST2	B	23,1	91%	414	41,1	49,1	1,5	0,7	0,0	0,0	7,3	0,2	45,6
November	ST4	A	17,2	94%	2235	66,8	21,3	0,2	0,0	0,3	0,1	10,9	0,4	75,9
November	ST4	B	17,2	94%	2413	63,8	25,1	0,4	0,1	0,3	0,1	9,8	0,4	71,8

sité des pores et la géochimie de la coquille de spécimens vivants isolés lors de mon travail de thèse ainsi que sur des spécimens fossiles qu'elle a elle-même isolé. Les organismes fossiles sont extraits d'une carotte longue de 90 cm représentant un enregistrement d'environ 40 ans. Cette carotte permet de faire une étude haute résolution de l'effet de la fermeture de l'estuaire sur les foraminifères benthiques. Les résultats de ce stage montrent qu'au cours des 40 ans d'enregistrement, la surface relative des pores (le pourcentage de couverture des pores sur la coquille) a augmenté. Cette augmentation est en partie due à l'apparition brutale d'individus présentant des pores de grande taille. L'analyse des individus vivants (qui ont été piqués et identifiés dans le présent travail de thèse) montre que les surfaces relatives les plus faibles sont observées à la station anoxique 1 et à la station la plus oxygénée 4. Ces résultats suggèrent une augmentation de la surface des pores avec la diminution de l'oxygénation entre la station 4 (station la plus oxygénée) et 2 (station intermédiaire) et une diminution de la surface des pores entre la station 2 et 1 (station profonde anoxique) dont la cause n'est pas encore clairement identifiée.

Ces questions de changements de géochimie et de densité des pores de la coquille des foraminifères font partie de la problématique majeure de la thèse de Jassin Petersen au LPG-BIAF qui a commencé en Novembre 2013.

Depuis la rédaction de ce rapport, une analyse phylogénétique de quelques individus du genre *Ammonia* et du genre *Elphidium* a été

effectuée par Magali Schweizer (PostDoc University of Edimburgh et maintenant Maître de Conférences contractuel au LPG-BIAF). Cette analyse révèle que les *Ammonia* appartiennent au phylotype T6 nommé *Ammonia aomoriensis* (Schweizer et al., 2011). Les *Ammonia tepida* prélevées dans la Baie de l'Aiguillon (utilisées dans les expériences du 0) appartenant également à ce phylotype, nous utiliserons pour la suite de ce manuscrit (notamment dans la synthèse) la terminologie *Ammonia tepida* pour les individus provenant des deux sites. Les *Elphidium* font partie du phylotype T5 et sont inclus dans le morphogroupe *Elphidium excavatum* (Schweizer pers. comm.). Ces analyses phylogénétiques sont basées sur une analyse du cluster de l'ADN ribosomique de la petite sous unité (SSU) 18S. L'une des perspectives de ce travail serait de faire une analyse d'une partie de l'ADN ribosomique plus variable telle que l'ITS (Internal Transcribed Spacer). L'analyse de cette partie de l'ADNr fortement variable pourrait permettre d'identifier si les changements récents des conditions physico-chimiques dans le Grevelingenmeer ont mené à une diversification ou à une spécialisation génétique des foraminifères. Nous pouvons nous attendre à ce que l'isolement créé par la fermeture de l'estuaire par des barrages tende à diminuer les échanges génétiques avec les populations de la Mer du Nord et que les conditions d'oxygénation particulières tendent à favoriser ou non des populations particulièrement résistantes à l'anoxie.

Chapitre 3. Survie, croissance et métabolisme des foraminifères benthiques en hypoxie et en anoxie

Dans les chapitres précédents nous avons décrit la réponse des communautés et des espèces de foraminifères en anoxie. Dans ce chapitre, nous cherchons à identifier la réponse de différentes espèces lors de deux expériences en laboratoire en hypoxie et en anoxie. La première partie de ce chapitre est une étude parue dans le livre « Approches to Study Living Foraminifera » début 2014. Dans cette première partie, nous présentons les résultats de la première expérience qui permet de comparer la réponse de trois espèces (*Ammonia tepida*, *Bulimina marginata* et *Melonis barleeanus*) à l'hypoxie. La seconde partie de ce chapitre de thèse compare les résultats des deux expériences en hypoxie et en anoxie sur *Melonis barleeanus*. Nous cherchons ainsi à identifier si l'hypoxie et l'anoxie ont des impacts différents sur les foraminifères benthiques.

Partie I. Survival, reproduction and calcification of three benthic foraminiferal species in response to experimentally induced hypoxia

Emmanuelle Geslin ¹, Christine Barras ¹, Dewi Langlet ¹, Maria Pia Nardelli ¹, Jung-Hyun Kim ², Jérôme Bonnin ³, Edouard Metzger ¹ and Frans J. Jorissen ¹

¹ UNAM University, Université d'Angers, UMR CNRS 6112 LNPG-BIAF, 2 Bd Lavoisier, F – 49045 Angers Cedex, France

Tel: +33 241735407, Fax: +33 241735352, E-mail: emmanuelle.geslin@univ-angers.fr

² Royal Netherlands Institute for Sea Research (NIOZ), Department of Marine Organic Biogeochemistry, PO Box 59, 1790 AB Den Burg, Texel, The Netherlands

³ Université de Bordeaux 1, UMR 5805 EPOC, Avenue des Facultés, F-33405 Talence Cedex, France

1. Abstract

An experiment was conducted to test the survival rates, growth (calcification), and reproduction capacities of three benthic foraminiferal species (*Ammonia tepida*, *Melonis barleeanus* and *Bulimina marginata*) under strongly oxygen-depleted conditions alternating with short periods of anoxia. Protocols were determined to use accurate methods 1) to follow oxygen concentrations in the aquaria (continuously recorded using microsensors), 2) to distinguish live foraminifera (fluorogenic probe), 3) to determine foraminiferal growth (calcein-marked shells and automatic measurement of the shell size). Our results show a very high survival rate, and growth of *A. tepida* and *M. barleeanus* in all experimental conditions, suggesting that sur-

vival and growth are not negatively impacted by hypoxia. Unfortunately, no reproduction was observed for these species, so that we cannot draw firm conclusions on their ability to reproduce under hypoxic/anoxic conditions. The survival rates of *Bulimina marginata* are much lower than for the other two species. In the oxic treatments, the presence of juveniles is indicative of reproductive events, which can explain an important part of the mortality. The absence of juveniles in the hypoxic/anoxic treatments could indicate that these conditions inhibit reproduction. Alternatively, the perceived absence of juveniles could also be due to the fact that the juveniles resulting from reproduction (causing similar mortality rates as in the oxic treatments) were not able to calcify, and remained at a propagule stage. Additional experiments are needed to distinguish these two options.

Keywords: Benthic foraminifera, survival rate, growth, reproduction, hypoxia, anoxia

2. Introduction

Oxygen deficiency is one of the most widespread harmful effects for aerobic organisms in the marine environment. Over the past 10 to 15 years the number of coastal areas affected by seasonal hypoxia in the bottom waters has spread rapidly, mainly due to anthropogenically induced eutrophication (Diaz et Rosenberg, 1995, 2008). While hypoxic and anoxic events (hypoxic $< 63 \mu\text{M O}_2$, anoxic = below the detection limit of microsensors, following Middelburg et Levin, 2009) existed throughout geological time, their occurrence in shallow marine and estuarine areas is clearly increasing. Global warming will probably enhance these effects and will enlarge the affected areas (Justić et al., 2003).

In most marine environments, only the top centimeter or millimeter of the sediment contain oxygen (Jørgensen et Revsbech, 1989), because it is quickly consumed by biological and chemical processes (Wenzhöfer et Glud, 2004). The oxygen content, which usually shows an exponential downward decrease, is the result of the equilibrium between downward oxygen diffusion from the bottom water into the sediment and the consumption of the oxygen used for the degradation of organic matter by aerobic organisms (Glud, 2008). Oxygen deficiency may be caused by increased organic matter supplies and/or a decrease of the bottom water ventilation. At greater water depths, less organic matter

reaches the seafloor, and less carbon is degraded in the sediment. Consequently, in general, in fined-grained organic-rich sediments in marine coastal areas, oxygen penetration is only a few millimeters (e.g. Jørgensen et al., 2005) compared to several centimeters in the deep sea (Wenzhöfer et Glud, 2004). In addition, other important factors controlling oxygen availability in sediments are photosynthetic benthic microorganisms (Revsbech et al., 1986), such as diatoms which form biofilms in the intertidal zone and burrowing macrofauna which increase oxygen penetration into the sediment (bio-irrigation) in deeper ecosystems (e.g. Aller, 1994).

In environments with hypoxic bottom waters, oxic organic matter degradation is decreased but remineralization will continue using nitrates, sulfates and metal oxides. In permanently anoxic or sulfidic settings, most oxidants have been exhausted and early diagenetic processes in the sediments are dominated by sulfate reduction, methanogenesis and anaerobic oxidation of methane (Treude, 2012).

Marine faunas are strongly affected by hypoxic and anoxic events, particularly the benthic fauna living at the sediment-water interface and within the superficial sediment. In general meiofauna is less sensitive to hypoxia and anoxia than macrofauna and megafauna (Josefson et Widbom, 1988; Moodley et al., 1998b). Obligate or facultative anaerobes occur in some meiofaunal protists groups including flagellates, ciliates and foraminifera (Fenchel, 2012). The diversity of anaerobic metabolic pathways applied by eukaryotes is

much more restricted than the wide range of processes that enable prokaryotes to live and grow in the absence of free oxygen. Still, new findings show from time to time that eukaryotic organisms have developed some unexpected strategies to exert all basic life functions (survival, growth, reproduction) under anaerobic conditions (Oren, 2012). However, anaerobic respiration using oxidized compounds of nitrogen, sulfur and other elements remain very rare among eukaryotes. Following observations that foraminifera may proliferate in anoxic environments (reviews in Bernhard et Sen Gupta, 1999; Geslin et al., 2004), Risgaard-Petersen et al. (2006) discovered that a foraminiferal species (*Globobulimina turgida*) that usually lives in the oxygen-free zone of the sediment can use nitrate as electron acceptor and perform full denitrification forming N_2 as end product. This species is able to accumulate a large quantity of nitrate in its cell, allowing it to employ anaerobic metabolism for at least 3 months (Piña-Ochoa et al., 2010b). Piña-Ochoa et al. (2010a) recently showed that many other benthic foraminiferal species store nitrate in their cell, suggesting that nitrate reduction can potentially be applied by a wide range of species. A gene for nitrate reduction has recently been found in *Bolivina argentea* (Bernhard et al., 2012), suggesting that in this species denitrification could at least partially be performed by the foraminifera themselves, and not entirely by symbiotic bacteria, such has been shown for allogromiid foraminifera (Bernhard et al., 2011). However, some foraminiferal species known to be tolerant to

hypoxic and anoxic conditions do not store nitrate in their cell, strongly suggesting that they are not able to denitrify (Piña-Ochoa et al., 2010a). For example, this is the case of *Ammonia tepida*, a dominant shallow water species, often observed in deeper layers in hypoxic or anoxic sediments (e.g. Kitazato, 1994; Bouchet et al., 2009). Also *Bulimina marginata* and *Melonis barleeanus*, which have often been observed in deeper sediment layers, and are therefore suspected to be facultative anaerobes, do not show elevated concentrations of nitrate in their cell (Piña-Ochoa et al., 2010a).

In the present paper, we want to focus on the response of these somewhat enigmatic species to alternating hypoxic and anoxic conditions. We were especially interested to determine their survival rate and growth capacity under hypoxic conditions and their ability to shift to nitrate reduction during short periods of anoxia.

To answer these questions, we studied in the laboratory the behavior of these three species (*Ammonia tepida*, *Bulimina marginata* and *Melonis barleeanus*) under different oxygen regimes, using adequate methods to distinguish live specimens, to observe the growth of living individuals, and to identify reproduction events. Three different treatments were applied: 1) oxic conditions with available nitrate, 2) strongly hypoxic to anoxic (nitrogen-flushed) conditions with nitrate and 3) strongly hypoxic to anoxic (nitrogen-flushed) conditions without nitrate. We expected that the third treatment would allow us to observe the ability of the three species to survive short

periods of anoxia without having the possibility to store nitrate and/or to denitrify.

3. Ecological characteristics of the three tested species

3.1. *Ammonia tepida*

Ammonia tepida is a cosmopolitan species occurring in intertidal mudflats, brackish lagoons, estuaries and shallow marine areas that are extremely variable environments both temporally and spatially (Debenay et al., 2000; Murray, 2006). It is a common species, which is able to survive a wide range of temperature, salinity and other environmental parameters varying on seasonal or daily scales (Bradshaw, 1961; Schnitker, 1974; Walton et Sloan, 1990). It is a free living superficial to infaunal species in muddy to silty or fine sandy sediments (e.g. Debenay et al., 1998).

Ammonia tepida has been extensively studied for various attributes, such as geographic distribution, ecology, biology, life-cycles, morphology, structure, and dependence of environmental parameters such as temperature and salinity (Bradshaw, 1957, 1961; Schnitker, 1974; Poag, 1978; Stouff et al., 1999a, 1999b; Pascal et al., 2008). *Ammonia tepida* is considered as a deposit feeder and has been found feeding on algae (e.g. Moodley et al., 2000), bacteria (Goldstein et Corliss, 1994; Langezaal et al., 2005; Pascal et al., 2008) and other meiofaunal groups (Dupuy et al., 2010). The congener *Ammonia* sp. shows a rapid uptake of freshly deposited algal carbon (Moodley et al., 2000).

The large morphological variability of the genus *Ammonia* has led to considerable difficulties in species identification and more than 40 species and subspecies (or varieties) of recent *Ammonia* have been described worldwide under the generic names *Ammonia*, *Streblus*, and *Rotalia* (Ellis et Messina, 1940). Recent studies have shown that the total number of genetically distinct and morphologically separable living species of *Ammonia* worldwide is likely to exceed 25 to 30 (Hayward et al., 2004). Comparing the morphology of *Ammonia tepida* collected in the Aiguillon Bay with the pictures presented by Hayward et al. (2004), our morphological range contains morphotypes close to molecular type T1.

Ammonia tepida is reported to be able to live in oxic and hypoxic conditions (Moodley et Hess, 1992; Koho et Piña-Ochoa, 2012). It has been found both in epifaunal and infaunal microhabitats (Kitazato, 1994; Debenay et al., 1998). Bouchet et al. (2009) found Rose Bengal stained specimens below 20 cm in the sediment. However, it is still not 100% clear whether this species is able to live in anoxic sediments, and, if this is the case, whether it uses an anaerobic metabolism or if it is able to survive in oxic microniches created by bioturbation. We expected our experiment to confirm or discount the ability of *A. tepida* to survive and to calcify under strongly hypoxic conditions lasting for two months and to clarify its capacity to denitrify during short periods of anoxia.

3.2. *Bulimina marginata*

Bulimina marginata is a cosmopolitan species found in various oceans around the world (Jorissen, 1988; Corliss, 1991; Jannink et al., 1998; Jorissen et al., 1998; De Rijk et al., 1999, 2000; Schmiedl et al., 2000; Mojtahid et al., 2006, 2008; Mojtahid, 2007; Pucci et al., 2009). *Bulimina marginata* lives at a wide range of water depths, from the continental shelf between 10 and 150 m water depth (Barmawidjaja et al., 1992; Fontanier et al., 2002; Langezaal et al., 2006) to continental slope and bathyal environments, down to 2200 m water depth (e.g. Jorissen et al. 1998, De Rijk et al. 1999, 2000). Abundant faunas of this species have also been described in submarine canyon environments (Schmiedl et al., 2000; Hess et al., 2005; Koho et al., 2007; Hess et Jorissen, 2009).

Several studies indicate that *B. marginata* is a eutrophic taxon typical of fine grained muddy sediments with high food availability (e.g., Jorissen 1988, De Rijk et al. 2000). *Bulimina marginata* is generally considered as a detritivore. It occurs alive in shallow infaunal microhabitats in the topmost centimeters of the sediment, but abundant Rose Bengal stained assemblages have also been described in much deeper sediment layers (Kitazato, 1989; Jorissen et al., 1998; Jorissen, 1999a). The presence of such deep assemblages may be related to macrofaunal burrows.

In several older studies, *B. marginata* has been considered as a good marker of low oxygen conditions (Phleger et Soutar, 1973; Zwaan et Jorissen, 1991; Sen Gupta et Ma-

chain-Castillo, 1993; Bernhard et Sen Gupta, 1999). It is supposed to support periodic episodes of anoxia or hypoxia (Pucci et al. 2009).

3.3. *Melonis barleeanus*

Melonis barleeanus is a typical species of open marine settings from the lower continental shelf to bathyal environments (Schmiedl et al., 2000; Fontanier et al., 2002, 2008). Rich assemblages have also been described in submarine canyons (Koho et al., 2008; Nardelli et al., 2010; Phipps et al., 2012).

Melonis barleeanus is commonly described as an intermediate infaunal species (Jorissen et al., 1998). This species is most often found in hypoxic sediments where pore-water nitrate concentrations are maximal (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2005; Koho et al., 2008; Mojtahid et al., 2010a), and is assumed to feed on degraded organic detritus (e.g. Caralp, 1989; Fontanier et al., 2002). Although only very low nitrate concentrations have been measured in *Melonis barleeanus*, (intracellular NO_3^- content: 0.6 ± 0.2 mM; Piña-Ochoa et al. 2010a), it has been considered as a potential denitrifier because of its systematic appearance in nitrate-rich sediment layers (Koho et Piña-Ochoa et al. 2012).

4. Methodology

4.1. Experimental design

4.1.1. Foraminiferal collection and storage in the laboratory

Ammonia tepida

Superficial sediment was sampled at low tide on the 9th of February 2011 in the intertidal area of the Bay of Aiguillon (French Atlantic coast). This area is known for its very rich live faunas of *Ammonia tepida* (Pascal et al. 2008). In the field, the sediment was immediately sieved, using a 150- μm mesh and local seawater. The fraction $> 150 \mu\text{m}$, containing large amounts of foraminifera, was transported to the culture laboratory at the University of Angers and maintained at 14°C until the beginning of the experiment. On the 15th of April 2011 (one month before the beginning of the experiment), *Ammonia tepida* was incubated in a calcein solution (Bernhard et al., 2004).

Bulimina marginata

Sediment cores were sampled in the Bay of Biscay at station K (Lat. 43°38'N, Long. 1°43'W, water depth 650 m depth) on the 4th of February 2011 with a classical Barnett multi-tube corer (Barnett et al., 1984). The two first centimeters were sliced from the subsurface, placed in containers with seawater and transported to the laboratory where they were stored at 10°C until the beginning of the experiment.

Melonis barleeanus

Sediment cores were sampled with a MUC8+4 multi-tube corer in Nazaré Canyon at station 161 (Lat. 39°35'N, Long. 9°24'W, water depth 918 m) on the 20th of March 2011. The two first centimeters were sliced from the subsurface, placed in containers with seawater and transported to the laboratory

where they were stored at 12°C until the beginning of the experiment.

4.1.2. Identification and collection of living organisms

One week before the start of the experiment, sediments from the 3 different locations were sieved with filtered (0.45 μm) seawater over a 150- μm mesh and living foraminifera were picked. To ascertain the vitality of the selected specimens, each foraminifer was placed in a thin layer of fine-grained ($< 38 \mu\text{m}$) sediment for approximately 12 hours. Only the specimens that had moved, and had produced a burrow or trace on the sediment were considered alive and selected for the experiment.

4.1.3. Experimental set-up

Three different conditions were tested in three different aquaria with the same temperature ($12.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$) and salinity (35.4 ± 0.2).

Aquarium “OxN” (Oxic + Nitrate) contained well oxygenated artificial seawater (ASW) with 50 μM NO_3 . High oxygen concentrations were maintained by continuously bubbling seawater with air. Aquarium “HypN” (low $[\text{O}_2]$ + Nitrate) and aquarium “Hyp” (low $[\text{O}_2]$ without nitrate) were both maintained under low oxygen conditions and contained ASW with 50 μM NO_3 for HypN or nitrate-free water for Hyp. Hypoxic conditions were obtained by a continuous introduction of N_2 gas mixed with 0.04% CO_2 (to keep the pH stable ; Piña-Ochoa et al. 2010b) into the overlying water. Oxygen concentrations were measured at least ones a day with a Clark-type microelectrode with a 100 μm thick tip

(Revsbech, 1989). The sensors were regularly 2-point calibrated in air-saturated ASW (temperature 12°C, salinity 35) and in anoxic alkaline ascorbate.

Specimens were introduced into the aquaria in glass vials (20 ml each) with a thin layer of fine-grained sieved sediment (<38 µm) filled up with ASW, in order to create more 'natural' conditions for the foraminifera. Each vial was closed with a net (100µm mesh) to keep the foraminifera within the vials.

4.1.4. Survival experiment

Living adult specimens of the three selected species *Ammonia tepida*, *Melonis barleeanus* and *Bulimina marginata* were introduced in 45 species-specific glass vials (one vial per sampling time per species per aquarium): 20 specimens per vial for *A. tepida*, 20 for *M. barleeanus* and 11 for *B. marginata*. Each aquarium contained 5 vials with *A. tepida*, 5 vials with *M. barleeanus* and 5 vials with *B. marginata*. The vial position in the aquaria was randomly defined to avoid any spatial effect on the foraminiferal survival rates.

The experiment started on the 16th of May 2011 and ran for 56 days. Three vials (one per species) were sampled in each aquarium after 7 days (T = 1), 14 days (T = 2), 29 days (T = 3), 45 days (T = 4) and 56 days (T = 5). The contents (sediment + foraminifera) of the vials were transferred to Petri dishes and foraminifera were picked out. Nets and vials were checked under a stereomicroscope to pick also the specimens that had migrated upward (along the walls of the vials).

The majority of introduced foraminifera were recovered at the end of the experiment (80 to 100% with one exception of 61% at $t = 3$ in the HypN condition for *B. marginata*). In some cases, juveniles were born during the experiment; they have been counted as well. Living specimens were recognized using a fluorescence technique. The fluorescence technique is a powerful, reliable and quick method to identify living individuals in experimental setups (Bernhard et al., 1995; Morigi et Geslin, 2009; Pucci et al., 2009; Piña-Ochoa et al., 2010b; Koho et al., 2011; Heinz et Geslin, 2012), particularly under anoxic conditions. Incubation in fluorogenic probes causes live specimens to become fluorescent. The fluorogenic probe used in this experiment was fluorescein diacetate (FDA; Bernhard et al., 1995), which was diluted in a dimethyl sulfoxide solution and ASW in order to obtain a final solution of 100 µM FDA. Specimens were picked out at the end of experiment directly in the vials when it was possible or after sieving (> 63 µm). They were incubated in ASW-FDA solution for 10 to 20 hours. Foraminifera were then picked out and placed in ASW with no FDA. Specimens were inspected individually for fluorescence using an Olympus SZX12 with a light fluorescent source Olympus URFL-T. Survival rates were calculated for each species and for each experimental condition.

4.1.5. Growth experiment

To study their growth ability under the various experimental conditions, one vial per species was added to each aquarium (Ox,

HypN, Hyp). For *A. tepida* and *B. marginata*, calcein-marked living specimens were added; 50 semi-adults of *A. tepida* at T = 0 and 20 juveniles (3 chambers) of *B. marginata* at T = 1. Thanks to the calcein stain of the introduced tests, the newly formed chambers, calcified under controlled conditions, could be easily identified (Bernhard et al., 2004; Barras et al., 2009) and counted. Additionally, at the end of the experiment, all specimens were measured using an automatic particle analyzer (see description below). Specimens that did not calcify new chambers were used to estimate the initial size whereas specimens that calcified new chambers allowed us to determine the average size increase of *A. tepida* and *B. marginata* in each condition.

For *M. barleeanus*, specimens were not calcein-marked beforehand. To evaluate their growth during the experiments, the size of all introduced specimens (10 adult individuals per condition) was measured at the start (T = 0) and the end (T = 5) of the experiment using an automatic particle analyzer (see below).

4.2. Size measurements using an automatic particle analyser

Automated particle analysis has been carried out with a fully automated incident light microscope system. Images are acquired and particles are analyzed with analySIS FIVE (SIS/Olympus[®]) software supported by a software add-in developed by MAS[®]. Samples are measured automatically under a Leica Z16APO monocular microscope (plan-

apochromatic objective). Images are captured with a CC12 colour camera (SIS[®]). Constant illumination of samples is provided by a Leica[®] CLS100X light source and a Leica[®] ring-light. This setup is the second generation of a particle analyzing system developed by Jörg Bollmann (Bollmann et al., 2004; Movellan et al., 2012).

4.3. Metabolism: oxygen respiration rates

In order to estimate the amount of oxygen needed for foraminiferal aerobic metabolism, respiration rates of *M. barleeanus* were measured using a Clark type O₂ microsensor (Revsbech, 1989) according to the methodology of Geslin et al. (2011), so that our results are totally comparable to their data. Four measurements were performed for *M. barleeanus* with 4 to 7 specimens per analysis. Aerobic respiration rates of *A. tepida* from Aiguillon Bay and *B. marginata* from Bay of Biscay were not measured because data are available in Geslin et al. (2011).

4.4. Internal nitrate contents in foraminifera

In order to follow the intracellular nitrate contents in the foraminiferal cells during the experiment, living specimens of the 3 studied species were selected in each condition at each sampling time (except for *A. tepida* at T=4 and T=5). One specimen was required for intracellular nitrate measurement. A total of 147 specimens were analyzed with 10 to 24 specimens per condition and per time. Each

specimen was rinsed in nitrate-free ASW, transferred to PCR tubes and stored at -20°C . They were analyzed for nitrate content using the VCl_3 reduction method (Braman and Hendrix 1989) on a chemiluminescence detector (Model CLD 86, Eco Physics AG) as described by Risgaard-Petersen et al. (2006) and Høgslund et al. (2008). Biovolumes were determined according to Geslin et al. (2011) in order to calculate the nitrate concentration in each individual.

4.5. Statistical analyses

Two different parametric statistical procedures were used to test the effect of the experimental conditions (OxN, HypN and Hyp) and of time on the foraminiferal survival rates and growth. Due to the binomial nature of the response variable “survival” (i.e. dead or alive; 0 or 1) we used generalized linear model (GLM, Nelder et Wedderburn, 1972) procedures of R (R Development Core Team, 2011). In these GLM procedures we tested the effect of the quantitative independent variable “Time” and the qualitative independent variables “Conditions” (OxN, HypN and Hyp) and “Species” (*M. barleeanus*, *A. tepida* and *B. marginata*). This procedure allowed us to determine for each of the variables whether it had a significant effect on survival (expressed as a Deviance and a Chi probability) and if so, to quantify the effect (giving an estimate of a coefficient for which the significance was expressed with z and p statistics).

Because of the normality of the response variable (the dependant variable), we used linear models (LM, Chambers et Hastie,

1992) to quantify the effect of both “Conditions” and “Time” and their interaction on the size of the foraminifera (the Maximum Diameter or Length in μm according the species). In order to identify the effect of the conditions on each species we ran three models, one for each species. This procedure consists of two steps. The first one allows us to determine whether one or several independent variables (depending on the species: Time, Conditions or the Time*Conditions interaction) has a significant effect on the individual size (after an analysis of variance, expressed with F and the associated probability statistics). The aim of the second step was to quantify how each variable affects the foraminiferal size (expressed with an estimated coefficient, for which a Student’s t-test is realized to see if the estimate is significantly different from zero, associated with a t and its probability statistics). As the method used to determine the growth is slightly different for the three species we have to use different independent variables for each species. Both for *A. tepida* and *B. marginata*, the initial size was not measured at the beginning of the experiment but was estimated on the basis of the final size of the individuals that did not grow during the experiment. For these two species, we tested the effect of the qualitative dependent variable coded with 4 terms: “T5.NoGrowth”, “T5.OxN”, “T5.HypN” and “T5.Hyp”. For *M. barleeanus*, we tested the effect of Time, Conditions and of the interaction Time*Conditions on the dependant variable Maximum Diameter. For all procedures we used a 0.05 significance level.

5. Results

5.1. Monitoring of the oxygen conditions

During all the experiment in aquaria Hyp and HypN, oxygen concentrations were lower than $90 \mu\text{mol.l}^{-1}$ ($\sim 2 \text{ ml.l}^{-1}$) and several short anoxic periods occurred (up to 6 days). Average O_2 concentrations are 10 ± 13 and $14 \pm 18 \mu\text{mol.l}^{-1}$ in aquaria HypN and Hyp, respectively.

5.2. Survival rates of adult specimens

5.2.1. Influence of incubation time under oxie conditions

Under oxie conditions (OxN), the survival rates of *A. tepida* (84-100%) and *M. barleeanus* (87-95%) are very high; whereas the survival rate of *B. marginata* (36-64%) is much lower (Figure 39, Figure 40 and Figure 41). GLModels show that there is a significant “Species” effect with *B. marginata* exhibiting a lower survival rate (Tableau 24). There is no significant effect of the incubation time and of the interaction Time*Species on the survival rates of the three species (Tableau 24).

5.2.2. Influence of hypoxic conditions

Specimens of the three tested species were found alive in both hypoxic conditions, until the end of the experiment. The survival rates (SR) are very high in both tested conditions for *A. tepida* (Figure 39, 90-100% for HypN, 89-100% for Hyp, respectively) as well as for *M. barleeanus* (Figure 40, 80-100% for HypN, 75-100% for Hyp) (Tableau 24). For

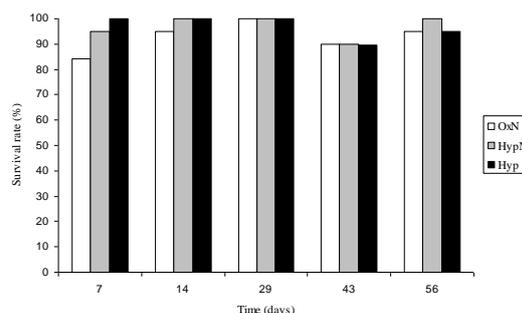


Figure 39 - Survival rates of *Ammonia tepida* after 7, 14, 29, 43 and 56 days under 3 experimental conditions.

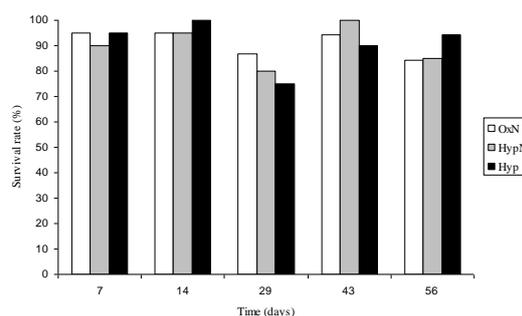


Figure 40 - Survival rates of *Melonis barleeanus* after 7, 14, 29, 43 and 56 days under 3 experimental conditions.

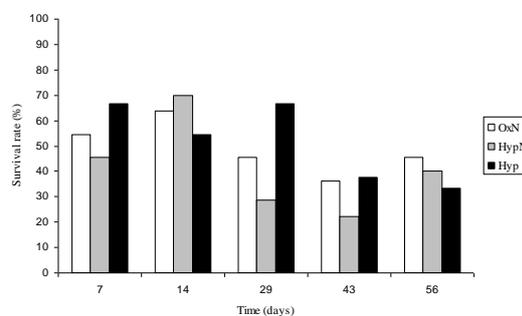


Figure 41 - Survival rates of *Bulimina marginata* after 7, 14, 29, 43 and 56 days under 3 experimental conditions.

B. marginata, the survival rates are significantly lower than for the other two species (22-70% for HypN, 33-67% for Hyp, respectively) (Tableau 24, Figure 41). None of the three studied species exhibit significant differences in their survival rates between the different sampling times in hypoxic conditions alternating with short (up to 6 days) periods of anoxia with or without nitrates. No

Tableau 24 - Effect of the experimental conditions on survival rates of the three species under oxie conditions (upper panel) and under all conditions (lower panel). The Degrees of freedom (Df), the Deviance and the probability (p(Chi)) statistic values are presented for every tested variables.

	Df	Deviance	p(Chi)
<u>Influence of incubation time under oxie conditions</u>			
Species effect	2	46.9	6.6×10^{-11}
Incubation time effect	1	0.7	0.39
Interaction Incubation time*Species	2	1.8	0.40
<u>Influence of hypoxic conditions</u>			
Species effect	2	151.9	$< 2 \times 10^{-16}$
Incubation time effect	1	2.7	0.10
Conditon effect	2	0.2	0.92

significant difference is observed between the aquaria with and without nitrate (Tableau 24).

5.3. Reproduction

No juveniles were obtained for *A. tepida* and *M. barleeanus*, whereas reproduction events occurred in the vials containing adult specimens of *B. marginata*. Juveniles were only found in the OxN aquaria: 80, 37 and 142 juveniles were counted at T=1, T=3 and T=4 respectively.

5.4. Growth

At T = 5 (56 days), 64 to 84% of the *A. tepida* semi-adult specimens introduced in the vials for the growth experiment were found. For this species, growth was assessed through the observation of additional chambers calcified during incubation (use of calcein labeling). The percentage of specimens that added at least one chamber in OxN, HypN and Hyp aquaria was 81, 60 and 82%, respectively (n=50 for each condition). They added 1 or 2 chambers with the exception of a single spec-

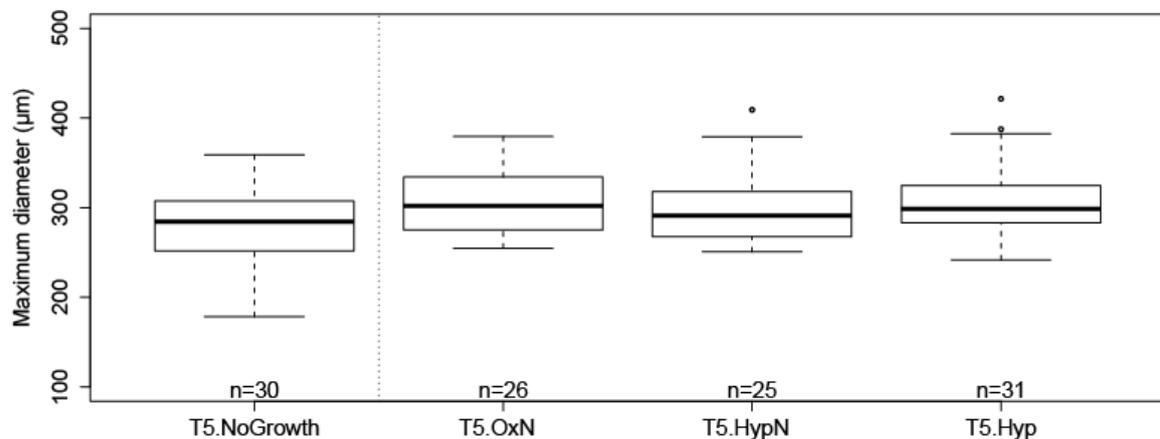


Figure 42 - Growth of *Ammonia tepida*: comparison of the size of the individuals that did not add new chambers (T5.NoGrowth) and those that calcified one or more new chambers (T5), for each tested condition (OxN, HypN, Hyp). On the box-and-whisker plot the two borders of each box are the first and third quartile while whiskers are 1.5 times the interquartile range of the lower and higher quartiles.

Tableau 25 - Effect of the experimental conditions on the maximum diameter of *A. tepida*: estimation of the coefficient, its standard error (Std. error) and the t and p statistics for the linear model. Note that the estimated Intercept corresponds to average of the reference category (here T5.NoGrowth) whereas all other estimated values are indicative of the average difference between the experimental and the reference population.

	Maximum diam. (μm)		Statistical param.	
	Estimate	Std. Error	t	p
Intercept (T5.NoGrowth)	280,0	7,5	37,6	$<2.1 \times 10^{-16}$
T5.OxN	27,4	10,9	2,5	0,01
T5.HypN	17,5	11,1	1,6	0,12
T5.Hyp	28,2	10,5	2,7	0,01

imen that added 3 new chambers. In order to study the size increase for *A. tepida*, the average size of all the individuals that did not add any new chambers was compared with the average size of individuals that calcified new chambers (Figure 42).

According to the size measurements, the individuals of *A. tepida* that added new chambers were significantly wider than the ones that did not exhibit newly formed chambers (Df=3, F=3.05, p=0.03). The average difference of maximum diameter between specimens that added new chambers and those who did not is +27.4, +17.5 and +28.2 μm in OxN, HypN and Hyp conditions, respectively

(Figure 42, Tableau 25). The size difference between individuals with and without chamber addition was significant in both the OxN and Hyp aquaria, but was not significant in the HypN aquaria (Tableau 25).

All specimens of *B. marginata* introduced in the aquaria at T = 1 (7 days) for the growth experiment (20 three-chambered juveniles for each treatment) were found at T = 5 (56 days). The percentage of specimens that added at least one chamber in OxN, HypN and Hyp aquaria was 15, 25 and 30%, respectively. Although only three specimens calcified in oxic conditions, each of these specimens added 2 or 3 new chambers. Conversely, the 11

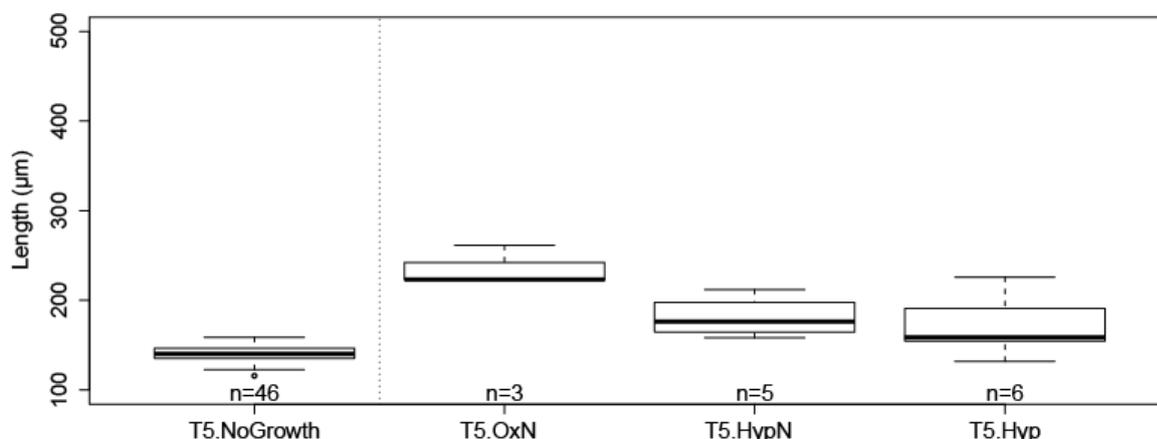


Figure 43 - Growth of *Bulimina marginata*: comparison of the size of the individuals that did not add new chambers (T5.NoGrowth) and those that calcified one or more new chambers (T5), for each tested condition (OxN, HypN, Hyp). On the box-and-whisker plot the two borders of each box are the first and third quartile while whiskers are 1.5 times the interquartile range of the lower and higher quartiles

Tableau 26 - Effect of the experimental conditions on the maximum diameter of *B. marginata*: estimation of the coefficient, its standard error (Std. error) and the t and p statistics for the linear model. Note that the estimated Intercept corresponds to average of the reference category (here T5.NoGrowth) whereas all other estimated values are indicative of the average difference between the experimental and the reference population.

	Maximum diam. (μm)		Statistical param.	
	Estimate	Std. Error	t	p
Intercept (T5.NoGrowth)	140,0	2,2	62,9	$<2.1 \times 10^{-16}$
T5.OxN	95,7	9,0	10,6	4.5×10^{-15}
T5.HypN	41,7	7,1	5,9	2.5×10^{-7}
T5.Hyp	30,0	6,6	4,6	2.6×10^{-5}

specimens from hypoxic aquaria (5 in HypN and 6 in Hyp) that added new chambers added a single chamber, with the exception of a single specimen that added 2 chambers. In all three experimental conditions, at T=5, specimens that added new chambers had a significantly larger maximum length than specimens that did not add new chambers (Figure 43, Df=3, F=49.7, p=8.35e-16 and Tableau 26). The average difference in maximum length between specimens with and without chamber addition was 95.7, 41.7 and 30.0 μm for OxN, HypN and Hyp, respectively (Tableau 26). A complementary statistical analysis shows that the size of the individuals that grew in the OxN conditions is significantly higher than

the size of the individuals that grew in both hypoxic conditions. Summarizing, it appears that hypoxic conditions do not have a negative effect on the number of specimens that add new chambers. Conversely, for specimens that added new chambers, more chambers were added in oxic conditions, and consequently, the size difference was larger. Finally, the presence/absence of nitrate in the seawater has no significant impact on chamber addition.

All 10 incubated specimens of *M. barleeanus* were found in the Hyp aquarium, whereas 9 from the 10 individuals were found in the OxN and HypN aquaria. In the case of *M. barleeanus*, the same specimens were measured at T = 0 and T = 5, so that the obtained

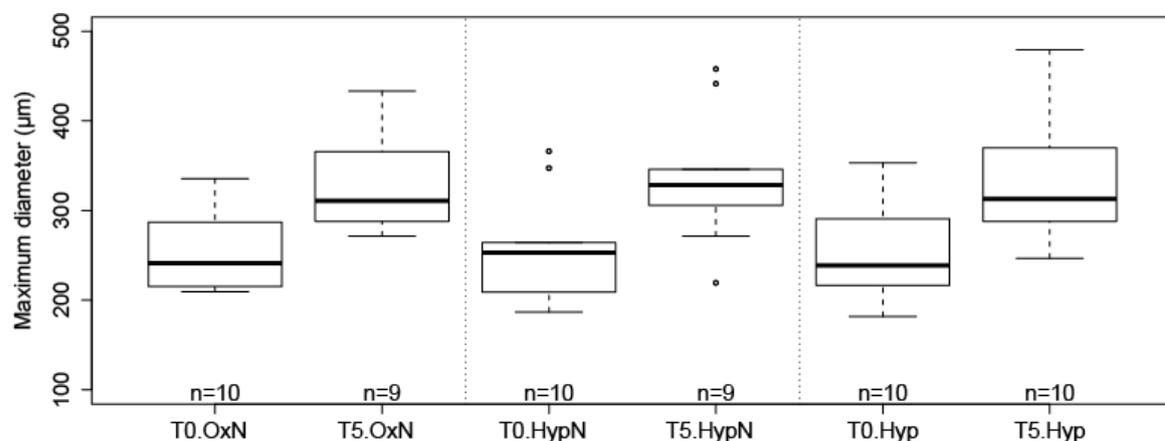


Figure 44 - Growth of *Melonis barleeanus* between T0 and T5 for each tested condition (OxN, HypN, Hyp). On the box-and-whisker plot the two borders of each box are the first and third quartile while whiskers are 1.5 times the interquartile range of the lower and higher quartiles.

Tableau 27 - Respiration rates (average value and standard error of the replicate measurements) of benthic foraminifera studied in the present paper with detailed data on their size (average size of maximal diameter or length and estimated biovolume).

Species	Location	Average size of max. Diam / Length	Biovolume (μm^3) Mean (SE)	RR ($\text{nl O}_2 \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$)			references
				mean	SE	n	
<i>Melonis barleeanus</i>	Portugal Continental Margin	347	8.6E+06 (7.2E+06)	0.32	0.26	3	our data
<i>Ammonia tepida</i>	Aiguillon Bay	541	3.1E+07 (3.2E+06)	2.01	0.07	4	Geslin et al., 2011
<i>Bulimina marginata</i>	Bay of Biscay	369	8.0E+06 (6.4E+05)	0.42	0.07	3	Geslin et al., 2011

values can be directly compared. In all three experimental conditions, the size increase between $T = 0$ and $T = 5$ (Figure 44) was statistically significant ($Df=1$, $F=25.2$, $p=6.32 \cdot 10^{-6}$), with an average increase of 81.6 μm , 85.9 μm and 80.3 μm for OxN, HypN and Hyp, respectively. No significant difference was found between the three experimental conditions (OxN, HypN, Hyp) ($Df=2$, $F=0.05$, $p=0.95$). It appears that, just as for *A. tepida*, strong hypoxic conditions alternating with short periods of anoxia do not inhibit the growth of *M. barleeanus*.

5.5. Respiration rates

Oxygen respiration measurements were performed for *M. barleeanus*. The observed values were $0.32 \text{ nl} \pm 0.26 \text{ O}_2 \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Tableau 27).

5.6. Intracellular nitrate content in foraminifera

In the following part, data of intracellular nitrate content of the 3 studied species are introduced without taking into account the different tested conditions. In a second part, data are presented as a function of time for each species.

Nitrate contents were measured in 29, 57 and 61 specimens of *A. tepida*, *M. barleeanus* and *B. marginata*, respectively. Nitrate was detected within the cell of individuals of all three species, but about 40% of the measured *B. marginata* and *A. tepida* individuals show no measurable nitrate in their cell (Tableau 28). The average values of nitrate contents are 16 ± 5 , 61 ± 10 and 40 ± 7 pmol NO_3^- per cell for *A. tepida*, *M. barleeanus* and *B. marginata* respectively. The values of intracellular nitrate contents show a large intra-specific variability. For example, the average value of all measured *A. tepida* is $16 \text{ pmol NO}_3^- \cdot \text{cell}^{-1}$ with

Tableau 28 - Intracellular nitrate contents recorded in the present study compared to the previous published data for the same species. n is the number of measured specimens. *Values are mean values. Standard Error of the Mean (SEM) is given in parentheses.

Species	reference	Location	Nitrate Content (pmol per cell)			NO_3^- (mM)*	n
			min	max	Average		
<i>Ammonia tepida</i>	our data	Aiguillon Bay	0	114	16 (5)	3 (1)	29
<i>Melonis barleeanus</i>	our data	Portugal Margin	0	462	61 (10)	8 (1)	57
<i>Bulimina marginata</i>	our data	Bay of Biscay	0	220	40 (7)	12 (2)	61
<i>Ammonia tepida</i>	Pina-Ochoa et al., 2010	Aiguillon Bay	0	58	13	0	15
<i>Melonis barleeanus</i>	Pina-Ochoa et al., 2010	North sea	1	27	9	1	7
<i>Melonis barleeanus</i>	Pina-Ochoa et al., 2010	Rhone delta	0	0	0	0	2
<i>Bulimina marginata</i>	Pina-Ochoa et al., 2010	Bay of Biscay	40	60	40	4	14

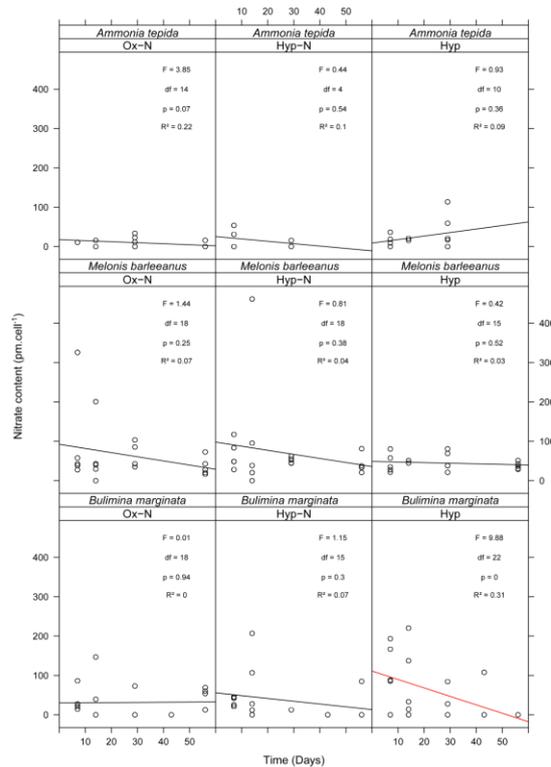


Figure 45 - Nitrate content (pmol.cell⁻¹) recorded in the cell of the three species along the incubation time. The red line is statistically significant (only the case for *B. marginata*, Hyp).

a standard error of the mean (SEM) of 5 pmol.cell⁻¹, a minimum value of 0 and a maximum value of 114 pmol.cell⁻¹ (n=31) (Tableau 28). Taking into account the biovolume of each specimen, the concentrations in the cell can be calculated. The average concentrations of intracellular nitrate are varying between 3 to 12 mM according to the species (Tableau 28). These values are much higher than in the surrounding environments (max. 50 μM NO₃⁻), underlining the ability for each of these three species to store nitrate.

Figure 45 shows the evolution of nitrate contents with time for each condition and each species. No significant trend is detectable except for *B. marginata* in the hypoxic aquarium without additional nitrate (p<0.05).

In this case, nitrate contents decreased with time.

6. Discussion

6.1. Species responses to hypoxic conditions

The high survival rates obtained under oxic conditions during long-term laboratory incubation for *Ammonia tepida* are not really surprising. In fact, this species is known to be well adapted to laboratory conditions (Bradshaw, 1957, 1961; Schnitker, 1974; Goldstein et Moodley, 1993; Stouff et al., 1999a, 1999b; Le Cadre et al., 2003; Dissard et al., 2010a, 2010b). According to the literature, this species is resistant to various types of environmental stress (Murray, 2006). *Ammonia tepida* is a common species in intertidal mud-flats where the oxygen penetration depth is very low (few millimeters). Rose Bengal stained specimens have been observed either on top of the sediment (e.g. Alve et Murray, 2001) or deeper in the sediment where conditions are mainly anoxic (Frankel, 1975; Buzas, 1977; Kitazato, 1994; Bouchet et al., 2007). Consequently, *A. tepida* is often considered as a species resistant to oxygen-depleted conditions (Moodley and Hess 1992). However, it is still not clear if *A. tepida* inhabits the anoxic part of the sediment or occupies oxic microhabitats created by burrowing macrofauna. Our experiment confirms the capacity of *A. tepida* to survive hypoxic conditions (at least 2 months) alternating with short anoxic periods (up to 6 days). Similar experimental observations were reported by

Moodley and Hess (1992) for *Ammonia beccarii*. They observed the activity of this species after 6 days of incubation under low oxygen conditions (12 μ M) and 24 hours of anoxia. After a longer anoxic incubation experiment, Moodley et al. (1997) noted that specimens of the genus *Ammonia* were found alive (Rose Bengal stained) after 78 days of putative anoxia. However, using the Rose Bengal staining method in experimental studies is problematic; the number of living individuals may be totally unrealistic, since cytoplasm may stain for prolonged periods of time after the death of the organism, especially in anoxic conditions (Bernhard, 1988).

Ammonia tepida is also known to be able to add chambers under laboratory condition (Bradshaw, 1957, 1961; Goldstein et Moodley, 1993; Stouff et al., 1999a, 1999b; Nooijer et al., 2009). In our case, growth was proven in all tested conditions by the observations of additional chambers not marked by calcein. Bradshaw (1961) reported growth rates of *Ammonia tepida* collected mainly in mud-flats (California, USA). He noted a growth of approximately 40 μ m for adult specimens after 60 days at 15°C. The values presented by Bradshaw (1961) are of the same order of magnitude as ours. Under oxic conditions, specimens of *A. tepida* that added new chambers (lack of calcein marking) were, on average, 27 μ m larger in diameter than specimens that did not add chambers after 56 days of incubation. Our slightly lower values may be due to the fact that unlike Bradshaw (1961), we did not add food before or during the experiment. However, according to the

large range of morphological and molecular types of *Ammonia tepida*, the specimens studied by Bradshaw (1961) were not necessarily conspecifics with our specimens.

Asexual reproduction has often been observed in *A. tepida* under laboratory conditions (Bradshaw, 1957, 1961; Schnitker, 1974; Goldstein et Moodley, 1993; Stouff et al., 1999a; Diz et al., 2012). However, in our case, no reproduction (production of juveniles) was observed, not even in the oxic treatment. This may be due to low food availability in our experimental setup. In fact, Bradshaw (1961) has experimentally shown that *A. tepida* reproduces when food is added. Because of this absence of reproduction under oxic conditions, the results are inconclusive.

According to the literature, this is the first time that *M. barleeanus* has been used for an experimental study. The high survival rates obtained under oxic conditions show the ability of this species to survive under laboratory conditions. This result is very promising for future laboratory experiments using *M. barleeanus*. The majority of the specimens also survive 56 days of strong hypoxia alternating with short anoxic periods, with or without added nitrates. *Melonis barleeanus* is one of the most typical intermediate infaunal foraminiferal species (Jorissen, 1999a). It normally lives in a specific microhabitat at some millimeters or centimeters in the sediment, where oxygen is strongly diminished, and where nitrate reduction is maximal (Jorissen et al., 1995, 1998; Fontanier et al., 2005; Koho et al., 2008; Mojtahid et al., 2010a).

Our comparison of tests sizes at the beginning and end of the experiment indicates that *M. barleeanus* is able to calcify under the three imposed laboratory conditions. Oxygen concentration had no significant effect on the growth rate of *M. barleeanus*, so that calcification does not seem to be affected by such conditions. The fact that no reproduction was observed may be explained, like with *A. tepida*, by the fact that no food was added during the experiment. However, since reproduction of this species has never been observed before in laboratory conditions, it is difficult to draw firm conclusions on this subject.

Surprisingly, *Bulimina marginata* was strongly affected by all our laboratory conditions, with low survival rates, both under oxic and hypoxic conditions. This result is surprising because, unlike many other deep-sea foraminiferal taxa, *B. marginata* previously showed a good adaptation to laboratory conditions (Wilson-Finelli et al., 1998; Havach et al., 2001; Hintz et al., 2004, 2006a; McCorkle et al., 2008; Barras et al., 2009, 2010; Filipsson et al., 2010).

Nevertheless, our results show no significant difference between the three different treatments. The survival rates of *B. marginata* are not significantly lower in the aquaria with long-term hypoxia alternating with short anoxic periods, with or without nitrate. This result is in agreement with the literature. *Bulimina marginata* is known to be able to live under hypoxic and anoxic conditions in the natural environment (Bernhard et Sen Gupta, 1999). In many older studies, *B. marginata* has been considered as a good marker of low

oxygen conditions (Phleger et Soutar, 1973; Zwaan et Jorissen, 1991; Sen Gupta et Machain-Castillo, 1993; Bernhard et Sen Gupta, 1999). However, some experimental studies have shown that oxygen-depleted conditions can have a negative effect on this species. In a 24-day experiment, the survival rate of *B. marginata* in nitrogen-flushed waters was significantly lower than in the oxic controls (Bernhard et Alve, 1996). According to Ernst et al. (2005), *B. marginata* was hardly influenced by hypoxia, but higher abundances were observed in oxygenated microcosms. Alve and Bernhard (1995) noticed that specimens migrated to the sediment surface and occurred on polychaete tubes when the oxygen condition became lower than 0.2 ml.l⁻¹. They interpreted this migration as behavior to avoid decreasing oxygen contents within the sediment. Conversely, Moodley et al. (1998) performed laboratory experiments to test the viability of foraminifera in anoxia; *Bulimina marginata* was still found alive (Rose Bengal stained) after a maximum of 21 days of anoxic incubation.

In our study, growth of juveniles of *B. marginata* was recorded in oxic as well as hypoxic conditions. Although the percentage of individuals that added new chambers is lower in oxic conditions (15% versus 25% and 30% in the hypoxic aquaria), the number of added chambers was higher than in hypoxic conditions. Unfortunately, our dataset is too limited to draw any firm conclusion.

Bulimina marginata is able to reproduce under oxic conditions, producing juveniles which have grown and calcified. Such repro-

ductions were observed at T1, T3 and T4 with 80, 37 and 142 counted juveniles, respectively. In experiences described by Barras et al. (2009), in which low quality food was added, adult specimens of *B. marginata* produced an average of 30 juveniles per reproduction event. If the number of juveniles per reproduction had been the same in our experiments, we can estimate the numbers of adults that reproduced (3 at T1, 1 at T3 and 4 to 5 at T4). The apparent absence of reproduction in our hypoxic aquaria contrasts with results obtained by Alve et Bernhard (1995). During a 4-week mesocosm experiment with low oxygen conditions, these authors observed Rose Bengal stained juveniles of *B. marginata*, suggesting that reproduction took place.

Two main facts stand out in the data obtained for *B. marginata*: 1) the survival rates of *B. marginata* are low in all tested conditions, and 2) juveniles were observed under oxic conditions but not under hypoxic conditions. According to the literature, *Bulimina marginata* is relatively easy to keep alive, and reproduction can be obtained under laboratory condition by feeding them with fresh or frozen diatoms or green algae (Hintz et al., 2004, 2006a, 2006b; McCorkle et al., 2008; Barras et al., 2009; Filipsson et al., 2010). However, no reproduction was observed when no additional food was added to the cultures (C. Barras, Pers. Com). To explain our surprising observations, three contrasted hypotheses can be envisaged.

Hypothesis 1: In our experiment, high mortality rates of *B. marginata* could be explained by unfavorable conditions in our aquaria due

to the lack of fresh organic matter. The only source of foraminiferal food was the organic matter existing in the fine sediment added. We chose not to add food in order to avoid complex geochemical processes in the vials. However, reproduction occurred under oxic conditions. Boltovskoy et Wright (1976) discussed how reproduction could be a stress response or a response to favorable conditions. Our results may lead to contradictory hypothesis. Either food is lacking and could explain high mortality rate and reproduction events as a response to stress condition; or food is not a limiting factor and reproduction occurred in response to favorable condition. In this case, another parameter may be responsible for the death of *B. marginata*.

Hypothesis 2: The absence of juvenile specimens in the hypoxic/anoxic treatments suggests that hypoxic conditions have a negative impact on reproduction. We could hypothesize that foraminifera did not reproduce under hypoxia, which could lead a decrease of the metabolic rate. Such a diminished metabolic rate could be sufficient for cell growth and calcification, but insufficient for reproduction.

Hypothesis 3: Asexual reproduction of foraminifera usually results in the death of the parent individual, creating the presence of empty adult tests (Lee et al., 1991; Barras et al., 2009). For *Bulimina marginata*, Barras et al. (2009) observed that all adults died after reproduction. In our study, reproduction occurred in oxic conditions explaining a large part of the empty adult tests, thereby contributing in a significant way to the low survival rates observed for *B. marginata*. Very similar

survival rates were observed under oxic and hypoxic conditions. We may therefore wonder if the low survival rates in hypoxic conditions could also be partly explained by reproduction events. The only evidence we have that no reproduction took place in the hypoxic aquaria is the absence of juveniles. However, Alve and Goldstein (2003) demonstrated by experimental approaches that reproduction of foraminifera produces propagules (uncalcified chamber smaller than 63 μm) which are able to stay in the sediment for at least 4 months without any growth and calcification. This phenomenon may also have occurred in our experiment. Specimens of *B. marginata* may have reproduced and, perhaps, the produced propagules never calcified. At the end of the experiment, sediment and water containing foraminifera were sieved over a 63 μm mesh and $> 63 \mu\text{m}$ fractions were observed. With this protocol, it is very well possible that propagules $< 63\mu\text{m}$ were present at the end of the hypoxic experiments.

A very important consequence of this hypothesis would be that hypoxia does not have an impact on reproduction but does have a large impact on propagule calcification, which did not take place. Our results, obtained for the growth rates (chamber addition and calcification) of *B. marginata*, support this idea (lower calcification rate under hypoxia than under oxic conditions). The ultimate consequence of this hypothesis would be that the successive disappearance of foraminiferal species after long term hypoxia/anoxia (as observed in Mediterranean sapropels, e.g., Jorissen 1999) would not be explained by

adult mortality, but rather because juveniles are unable to calcify. Unfortunately, our present data set does not allow us to make firm conclusions at this moment; additional experiments are needed to confirm or refute this hypothesis.

6.2. Metabolism in hypoxic conditions

Aerobic respiration rates that were measured in this study for *Melonis barleenus* (0.32 $\text{nl O}_2 \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (± 0.26)) are in the same range as those published by Geslin et al. (2011), who reported a minimum respiration rate value of 0.09 $\text{nl O}_2 \text{ cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (± 0.02) for *Rectuvigerina phlegri* and a maximum value of 5.27 $\text{nl cell}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (± 0.52) for *Ammonia beccarii*. As it has been shown previously, respiration rates of foraminifera vary in function of cell size following the equation $R=3.98 \cdot 10^{-3} \text{ BioVol}^{0.88}$ (with respiration rate (R) expressed in $\text{nl O}_2 \text{ h}^{-1}$ and biovolume (BioVol) in μm^{-3}), for the 17 species studied (Geslin et al., 2011). The same authors showed that benthic foraminifers have lower oxygen respiration rates than other groups of meiofauna, even when standardized for biovolume. This suggests that foraminifera have a relatively low oxygen demand, which may explain why their aerobic metabolism is less affected by low oxygen contents (our hypoxic treatments). The lower respiration rate may reflect a lower metabolic rate; which could in turn be explained by the low degree of activity of the foraminifera. A relatively low metabolic rate is advantageous for organisms exposed to environmental stress

(Theede et al., 1969). In this specific case of oxygen deficiency, a low metabolic rate may help the foraminifer to preserve its energy pool during short anoxic periods.

6.3. Intracellular nitrate content

6.3.1. Average data of intracellular nitrate content

The intracellular nitrate contents recorded in the present study are in the same order of magnitude as the data published by Piña-Ochoa et al. (2010a). The average of intracellular nitrate contents calculated for the numerous measurements made for the three studied species varies between 16 to 61 pmol NO_3^- per cell (Tableau 27) whereas measurements reported by Piña-Ochoa et al. (2010a) range between 3 to 40 pmol $\text{NO}_3^- \cdot \text{cell}^{-1}$. However, the nitrate concentrations of the three studied species are still very low (max. value 462 pmol NO_3^- per cell) compared to the much higher values reported by Piña Ochoa et al. (2010a) for *Cyclammina cancellata* (45,500 pmol NO_3^- per cell) or *Globobulimina turgida* (18,000 pmol NO_3^- per cell). The high concentrations of intracellular nitrates allow these two species to respire nitrates under anoxia for at least 3 months (Piña-Ochoa et al., 2010a).

Ammonia tepida was reported as non nitrate-storage species by Piña-Ochoa et al. (2010a). In our case, a higher number of specimens was measured (n=29) and, although 13 specimens showed no intracellular nitrate, the other had intracellular nitrate with a maximum value of 114 pmol NO_3^- per cell (23.3

mM of NO_3^-). Knowing that the maximum concentration of nitrate in the surrounding sea water is 50 μM , these new data show that also *A. tepida* is able to store nitrate in their cells. However, these results do not imply that this species is also actively denitrifying. In Piña-Ochoa et al. (2010a), no positive denitrification rates were obtained for *Ammonia tepida*. However, it is probable that this negative result is explained by the fact that the specimens used by Piña-Ochoa et al. (2010a) did not contain any intracellular nitrate. In order to clarify this point, denitrification rates should be measured using specimens with elevated intracellular nitrate contents.

The specimens of *M. barleeanus* measured in the present study show higher nitrate contents than those reported by Piña-Ochoa (2010a). However, the nitrate contents of *M. barleeanus* are still very low compared to other species such as *Uvigerina elongatastrata* (5,400 pmol NO_3^- per cell), which occupies the same intermediate infaunal microhabitat as *M. barleeanus* (Koho et al., 2008; Mojtahid et al., 2010a). Piña-Ochoa et al. (2010a) suggested that *M. barleeanus* would not be able to denitrify because of the insufficient amount of nitrate available in the cell. In the light of our new data, this conclusion should be reconsidered. However, in order to ascertain that *M. barleeanus* is indeed able to respire nitrate under anoxia, it is absolutely necessary to measure denitrification rates. The fact that roughly all analyzed specimens of *M. barleeanus* collected on the continental Margin off Portugal contain intracellular nitrate (n=55, our study) whereas specimens collected in the

Rhone delta (n=2, Piña-Ochoa et al. 2010a) did not (Tableau 27), suggests that environmental parameters influence the nitrate content of this species.

6.3.2. Impact of the 3 tested conditions on intracellular nitrate contents

The intra-specific variability of intracellular nitrate concentrations within a population is high. The same observation was made by Koho et al. (2011) who reported that the nitrate concentration in single individuals of living *G. turgida* ranged from 0 to 32541 pmolN per cell, corresponding to average concentrations of 3929 ± 4590 and 8999 ± 9023 pmol N per cell (SEM higher than the mean) in two replicate cores. A similarly high intra-population variability in nitrate concentrations has also been noted by Piña-Ochoa et al. (2010a,b) and Bernhard et al. (2011, 2012). Because of this high variability, it is not easy to follow the story of the intracellular nitrate in individual foraminifera. Nevertheless, our data show a single statistically significant trend.

Intracellular nitrate contents do not show significant changes with time for *Ammonia tepida* and *Melonis barleeanus* (Figure 45). If these species are able to denitrify, we could expect that they should use nitrate at least during the short periods of anoxia. This should lead to a decrease of their intracellular nitrate concentration in the hypoxic aquaria without nitrate during anoxia. Furthermore, if these 2 species would shift to nitrate respiration in case of anoxia, in the hypoxic aquaria without nitrate they should die after the ex-

haustion of their pools of intracellular nitrate. Therefore, all our data suggest that *A. tepida* and *M. barleeanus* did not denitrify but nevertheless survived hypoxia and short periods of anoxia.

The only significant trend is the decrease of nitrate contents in *B. marginata* with time in hypoxic conditions without nitrate which could be explained by the fact that this taxon has indeed used nitrate for foraminiferal denitrification during the short periods of anoxia. It is possible that such a decreasing trend in nitrate content has not been observed in the hypoxic aquaria with nitrate because the foraminifera have recharged their intracellular nitrate pool after each of the anoxic periods. Our data therefore suggest the capacity of *B. marginata* to denitrify. However, the significant trend could be discussed because of the high variability of nitrate content. The previous suggestions should be resolved by additional studies with measurements of denitrification rates.

6.4. Discussion regarding experimental methodologies

6.4.1. Survival determination

Working with foraminifera in oxygen-depleted environments can be problematic because of the determination of living foraminifera during the experiment. Observation of Rose Bengal stained cytoplasm inside the test is not sufficient to judge vitality when incubations are performed under oxygen-depleted conditions or for short periods of time, because cytoplasm can be retained in dead spec-

imens for weeks to months (Bernhard, 1988; Hannah et Rogerson, 1997). Accurate methods to distinguish living foraminifera are needed. We chose to use fluorogenic probes which are non fluorescent compounds that produce a fluorescent product after modification by intracellular esterases that are only active in living individuals. Two different fluorogenic probes may be used: CTG (CellTracker Green) and FDA (Bernhard et al., 1995, 2006). CTG is a fluorogenic probe producing fluorescence which can be fixed with formalin (Bernhard et al., 2006; Pucci et al., 2009). Fixed samples may be observed after the fixation (weeks to months) using an epifluorescence binocular. On the opposite, FDA, another fluorogenic probe, cannot be fixed with formalin (Bernhard, 2000) so that samples treated with FDA have to be observed few hours after the incubation. Consequently, CTG is more practical when the amount of samples to observe is too high to be treated within a few hours. The inconvenience of this probe is its prohibitive price. In our case, we observed the fluorescence of FDA incubated specimens a few hours after the end of the experiment to assess vitality. The same protocol was used by Piña-Ochoa et al. (2010b) and Koho et al. (2011).

6.4.2. Growth observations

In our study, two methodologies were used to determine growth of the incubated specimens: introduction of marked-shell specimens using calcein (Bernhard et al., 2004) and automatic measurements of the foraminiferal shell size before and after the experiment. The

advantage of the calcein method is to be able to detect growth of specimens even if growth is very small (e.g. one chamber) and to determine the number of additional chambers (unmarked) calcified during the incubation. Determination of growth is also possible with precise size measurements when considering each specimen separately at the beginning and at the end of the experiment. However, when considering the average size of a pool of individuals, which is the case in our study (practically impossible to have 1 specimen per vial and a statistically significant numbers of individuals per condition), a slight growth of a limited number of individuals of this pool might be hidden in the standard error of the average size of all specimens. Moreover, the calcein method should theoretically also allow

6.4.3. Reproduction

In many experiments, reproduction events are identified thanks to the production of juveniles (Le Cadre et Debenay, 2006; Barras et al., 2009). The first step of the foraminiferal life is a single uncalcified chamber called a “propagule” (Alve et Goldstein, 2003). These propagules may calcify chambers in order to become juvenile foraminifera, but they also may remain as uncalcified propagules for many weeks to months (Alve et Goldstein, 2003). Consequently, reproduction events may occur without the production of calcified juveniles. To prove accurately the occurrence of reproduction events during experiments, it is therefore necessary to observe the entire samples (no sieving) and particularly the

small fraction ($< 63 \mu\text{m}$) with a microscope in order to avoid loss of propagules.

7. Conclusion

Ammonia tepida and *Melonis barleeanus* show a similar response to hypoxic conditions alternating with short periods of anoxia. We have recorded similarly very high survival rates under oxic and hypoxic conditions as well as similar growth rates. No reproduction was observed, which may be due to the lack of added food. Therefore, additional experiments are needed to demonstrate their ability to reproduce under low oxygen conditions.

Bulimina marginata shows a very different response. The survival rates are much lower, but there was no significant difference in survival between the oxic and hypoxic/anoxic treatments.

It is possible that the high mortality is due to unfavorable experimental conditions (e.g. lack of food). Alternatively, the observation of juveniles in the oxic treatment suggests that the high mortality rate may be at least partially due to reproduction. The absence of calcified juveniles in the hypoxic/anoxic treatments can result from an absence of reproduction (in which case hypoxia would inhibit reproduction), but could also be explained by the incapacity of the juveniles to calcify, forcing them to stay at a propagule stage.

Intracellular nitrate contents suggest that *B. marginata* may be able to denitrify during short periods of anoxia.

This study allows us to propose future experimental work with interesting species such

as *M. barleeanus* which was not previously used for laboratory experiments.

Acknowledgements

We thank the crews of Côte de la Manche (PECH cruise) and of the Pelagia (PACE-MAKER cruise) for good collaboration during the cruise. We thank the essential work of H. Howa for organizing the cruise and for sampling sediment in the Bay of Biscay. We thank gratefully N. Risgaard-Petersen for his help to analyze intracellular nitrate contents in the foraminifera. This work was funded by the French national program (EC2CO from CNRS).

Partie II. Etude comparative de l'effet de l'hypoxie et de l'anoxie sur la survie et la croissance de *Melonis barleeanus*.

En collaboration avec E. Geslin, C. Barras, J.-H. Kim, J. Bonnin, E. Metzger, N. Risgaard-Petersen et F. Jorissen

1. Introduction

Dans les milieux de plateforme et dans les domaines profonds, l'oxygène dissous dans l'eau peut pénétrer jusqu'à plusieurs centimètres de profondeur dans le sédiment (Reimers et al., 1992; Cai et Sayles, 1996). Cet oxygène présent dans les eaux de fond est consommé par les organismes benthiques qui dégradent la matière organique présente dans le sédiment. Ainsi l'oxygène diminue exponentiellement avec la profondeur dans la co-

lonne sédimentaire (Glud, 2008). Dans les couches superficielles du sédiment, l'eau poreuse est oxygénée, à des profondeurs intermédiaires les concentrations en O_2 atteignent le seuil de l'hypoxie ($< 63\mu M$; Helly and Levin, 2004; Middelburg and Levin, 2009) et plus profondément dans le sédiment l'anoxie ($0\mu M$; Tyson and Pearson, 1991; Bernhard and Sen Gupta, 1999) (Figure 46). Lors de l'enfouissement, la matière organique n'est pas seulement oxydée par l'oxygène mais par une séquence d'oxydants (nitrates, oxyde de manganèse, oxyde de fer et sulfates) agissant

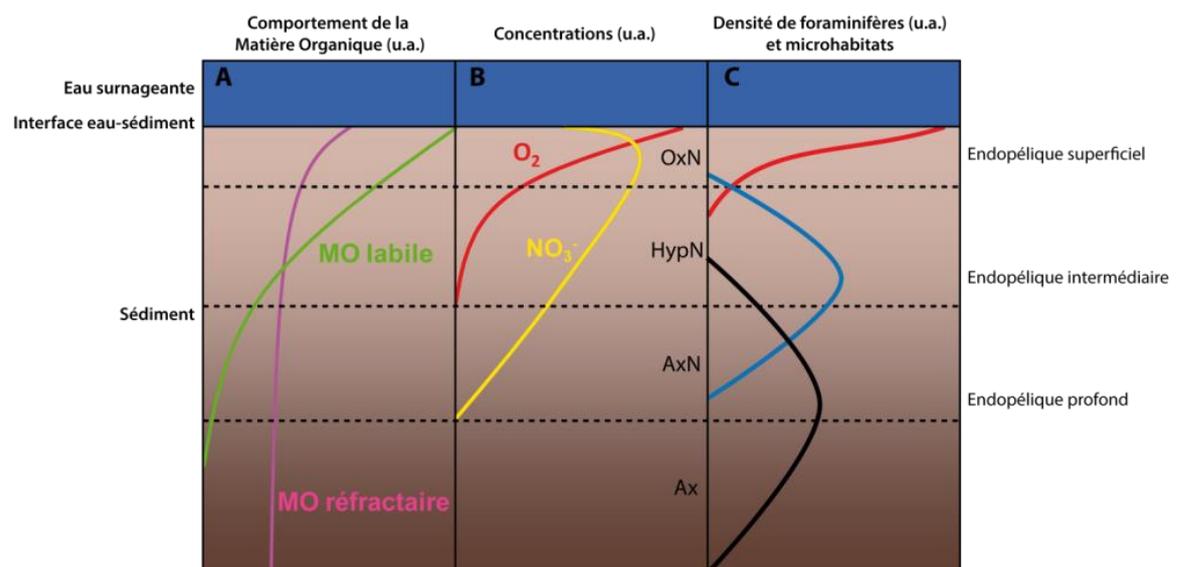


Figure 46 - Représentation schématique du comportement de la matière organique (A), des concentrations en oxygène et nitrates d'après (Froelich et al., 1979; Burdige, 2006) (B) et des différents microhabitats de foraminifères benthiques (C) dans le sédiment marin. Abréviations utilisées : MO (matière organique), OxN caractérise les zones avec oxygène et nitrates, HypN les zones hypoxiques avec nitrates, AxN les zones anoxiques avec nitrates et Ax les zones anoxiques sans nitrates.

à des profondeurs croissantes et présentant des intérêts énergétiques décroissants pour les bactéries qui effectuent ces réactions (Froelich et al., 1979; Burdige, 2006). Cet ensemble de réactions diagénétiques fait que la concentration de matière organique labile diminue avec la profondeur (Figure 46A). Par conséquent, la matière organique est essentiellement réfractaire en profondeur et donc difficilement assimilable pour les organismes benthiques. Ces réactions biogéochimiques entraînent la formation de différents microenvironnements géochimiques en fonction de la profondeur. Ainsi, d'après la Figure 46B, on peut différencier 4 microhabitats géochimiques majeurs : une zone oxygénée et avec des nitrates (OxN), une zone hypoxique avec des nitrates (HypN), une zone anoxique avec des nitrates (AxN) et en profondeur un microhabitat anoxique sans nitrates (Ax).

Dans les environnements benthiques profonds, les foraminifères benthiques représenteraient plus de 50 % de la biomasse totale (Gooday et al., 1992). La distribution verticale des faunes benthiques et notamment des foraminifères benthiques serait régit par les variations en profondeur de la concentration d'oxygène et de la disponibilité de la matière organique. Généralement, le nombre d'individus vivants et la richesse spécifique diminue avec la profondeur de la colonne sédimentaire et donc avec l'oxygène et la matière organique labile. Certaines espèces colonisent des microenvironnements particuliers : les espèces vivant dans la zone OxN sont qualifiées d'espèces endopéliques superficielles (Figure 46C). Les espèces présentant

un pic de densité dans la zone HypN sont les espèces à microhabitat endopélique intermédiaire. Les espèces présentes essentiellement dans les couches anoxiques du sédiment sont dites endopéliques profondes (Figure 46C). *Melonis barleeanus* est une espèce typique présentant un microhabitat endopélique intermédiaire (Jorissen et al., 1998; Mackensen et al., 2000; Schönfeld, 2001; Fontanier et al., 2002, 2003, 2005, 2008; Heinz et al., 2002; Szarek et al., 2007; Koho et al., 2008; Mojtahid et al., 2010a; Duros et al., 2011; Phipps et al., 2012). Elle montre généralement un pic d'abondance à 2 ou 3 cm sous l'interface eau-sédiment dans des conditions d'hypoxie et dans la zone de réduction des nitrates (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002; Koho et al., 2008). Cette espèce semble ainsi fortement liée à la vie dans des conditions hypoxiques. Cependant, *M. barleeanus* est également reportée en quantité variable dans des conditions oxygénées à l'interface eau-sédiment (Jorissen et al., 1998; Mackensen et al., 2000; Schmiedl et al., 2000; Fontanier et al., 2002, 2003; Heinz et al., 2002; Ernst et van der Zwaan, 2004; Szarek et al., 2007; Koho et al., 2008; Mojtahid et al., 2010a; Duros et al., 2011). Cette espèce est également trouvée sous la profondeur de pénétration d'oxygène (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002; Mojtahid et al., 2010a) soit dans un microenvironnement anoxique. D'après les études in situ de la littérature, *Melonis barleeanus* semble ainsi être capable de survivre dans différents milieux quelle que soit la concentration en oxygène. D'autres paramètres semblent influencer la distribution

de cette espèce comme notamment la quantité et la qualité de la matière organique. En effet, dans différentes études paléocéologiques, les variations d'abondance relative de cette espèce sont interprétés comme une préférence de *M. barleeanus* pour les milieux riches en matière organique altérée (Caralp, 1989a, 1989b). Ses variations d'abondance relatives au cours du Quaternaire dans le Sud de l'Océan Atlantique suivent des cycles à hautes fréquences (d'environ 23000 ans de période) liés à la précession de la Terre indiquant que cette espèce peut être considérée comme un indicateur de forte productivité (Schmiedl et Mackensen, 1997). Ces observations semblent être cohérentes avec les études de distribution des individus vivants qui montrent un maximum d'individus dans des microhabitats endopéliques intermédiaires, à des profondeurs auxquelles les organismes n'ont pas accès à la matière organique fraîchement déposée (Fontanier et al., 2002). De plus, il semblerait que cette espèce soit assez peu sensible aux variations temporelles (à relatif court terme) de la quantité de la matière organique labile (Mackensen et al., 2000; Heinz et al., 2001; Ernst et van der Zwaan, 2004; Fontanier et al., 2005; Koho et Piña-Ochoa, 2012), bien qu'elle ait parfois été identifiée comme présentant une migration vers la surface après un dépôt de matière organique fraîche (Linke et Lutze, 1993; Schmiedl et al., 2000; Heinz et al., 2002; Fontanier et al., 2003). Les études sur le terrain apportent donc des informations sur l'écologie de cette espèce qui sont cependant parfois contradictoires.

Peu de données expérimentales sont disponibles pour cette espèce. Les expériences publiées ont été réalisées sur l'ensemble de la communauté de foraminifères benthiques, *Melonis barleeanus* n'ayant jamais été isolée et étudiée seule. Des données expérimentales à partir de sédiment provenant du Golfe de Gascogne et incubé pendant 20 jours en anoxie indiquent que cette espèce ne présente pas de changement d'abondance ou de distribution verticale détectable avec l'effet d'ajout de nourriture fraîche et ou en anoxie (Ernst et van der Zwaan, 2004). De même, lors d'une expérience d'ajout de différentes espèces d'algues à la surface de sédiment prélevé dans le Golfe du Lion, Heinz et al. (2001) notent une augmentation de la densité de *Melonis barleeanus* sans observer de migration verticale. Cependant, dans une expérience similaire d'ajout de trois espèces d'algues, Heinz et al. (2002) observent une migration vers la surface en réponse à l'une des espèces d'algue (*Dunaliella tertiolecta*). Enfin, dans une expérience lors de laquelle des échantillons vivants provenant du Skagerrak (détroit qui lie la Mer du Nord et la Mer Baltique) ont été conservés sans apport de nourriture pendant 2 ans, l'abondance de *Melonis barleeanus* a augmenté (Alve, 2010). Ces observations indiquent que cette espèce ne semble ni être affectée par la présence de matière organique fraîche ni par le manque d'oxygène. Dans ce cadre où *M. barleeanus* est capable de vivre dans des conditions oxygénées, hypoxiques et anoxiques, nous souhaitons comprendre pourquoi cette espèce présente un microhabitat essentiellement endopélique intermédiaire.

Cette distribution préférentielle est elle due à un effet de compétition interspécifique avec des espèces endopéliques superficielles et profondes ? Est-ce que cette espèce vit mieux en hypoxie, en anoxie ou dans un milieu oxygéné ?

Il apparait clairement que certaines espèces de foraminifères peuvent vivre en hypoxie et en anoxie (Alve et Bernhard, 1995; Moodley et al., 1998b; Ernst et van der Zwaan, 2004; Ernst et al., 2005; Piña-Ochoa et al., 2010b). Au sein de la méiofaune benthique, le groupe des foraminifères benthiques est le plus tolérant aux conditions de faible oxygénation (Josefson et Widbom, 1988; Moodley et al., 1997; Levin et al., 2009). Il a été montré que certaines espèces de foraminifères benthiques présentent un métabolisme anaérobie facultatif et sont capables d'accumuler et de respirer les nitrates par dénitrification (Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010a). Cette faculté pourrait permettre à certaines espèces endopéliques profondes de se maintenir en vie pendant plus de 2 mois (Risgaard-Petersen et al., 2006). En ce qui concerne *Melonis barleeanus*, cette espèce semble accumuler des nitrates en faible quantité mais cette capacité à accumuler les nitrates semble être dépendante du site d'étude. En effet, 7 individus prélevés en Mer du Nord accumulent des nitrates dans leurs cellules contrairement à 2 individus provenant du prodelta du Rhône (Piña-Ochoa et al., 2010a). Sa capacité à dénitrifier n'a pas été testée mais certains auteurs suggèrent qu'en raison de sa distribution préférentielle dans le pic de concentration de nitrates cette espèce pourrait être

considérée comme potentiellement dénitrifiante (Koho et Piña-Ochoa, 2012). La capacité à survivre à l'anoxie ne semble pas seulement être fonction de la capacité à dénitrifier. En effet, les analyses menées dans un chapitre précédent lors d'une expérience d'incubation en anoxie en Mer Adriatique suggèrent que certaines espèces capables de survivre à 10 mois d'anoxie ne seraient pas capables de dénitrifier (Chapitre 1, Langlet et al. 2013a,b). Les mécanismes permettant à ces espèces de survivre à l'anoxie ne sont pas connus à ce jour.

Les objectifs de cette étude sont donc de chercher à comprendre la distribution verticale particulière de *Melonis barleeanus* qui est présente préférentiellement dans des microhabitats hypoxiques mais également dans des habitats anoxiques et oxiques. Pour comprendre la réponse (survie, croissance, accumulation de nitrates) de cette espèce à l'hypoxie une première expérience a été mise en place pendant 56 jours. Une seconde expérience a été menée en anoxie pendant 69 jours d'incubation. Pour ces deux expériences l'effet de l'hypoxie et de l'anoxie a été testé sur plusieurs espèces (*Ammonia tepida*, *Bulinna marginata*, *Melonis barleeanus* et *Bolivina subaenariensis*) et les résultats de la première expérience ont fait l'objet d'une publication (Geslin et al., 2014). Ce chapitre présente la synthèse des résultats des deux expériences en laboratoire menées sur *Melonis barleeanus*. Ces expériences permettront d'identifier si *Melonis barleeanus* présente des taux de survie, des taux de croissance ainsi que des concentrations de nitrates intra-

cellulaires différents en milieu oxique (condition témoin), hypoxique et anoxique. Aux vues de la distribution naturelle de cette espèce nous pouvons nous attendre à ce que sa survie et sa croissance ne diffèrent pas entre les milieux oxiques et hypoxiques. Nous pouvons également nous attendre à ce que sa survie en anoxie soit fonction de sa capacité à dénitrifier. Si *Melonis barleeanus* est capable de dénitrifier nous pouvons nous attendre à ce que la durée de survie en anoxie dépende de la quantité de nitrates disponible dans la cellule. Si nous confirmons les résultats de Piña-Ochoa et al. (2010a) qui montrent que cette espèce n'accumule pas les nitrates en grande quantité nous pouvons nous attendre à ce que la dénitrification ne permette pas de survivre à plus de 1 ou 2 mois d'anoxie. Les données et les résultats de l'expérience en hypoxie ont été présentés et décrits dans Geslin et al. (2014) (article pour lequel je suis co-auteur disponible Chapitre 3.Partie I). Dans cette seconde partie, ces données seront de nouveau présentées et analysées et sont comparées ici avec les résultats de l'expérience en anoxie. C'est analyse comparative de l'effet de l'hypoxie et de l'anoxie qui forme le sujet de cette seconde partie.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Collecte, conservation et traitement des échantillons

2.1.1. Prélèvement et conservation des échantillons

Des carottes de sédiment ont été prélevées dans le Canyon de Nazaré à la station 161 (Lat. 39°35'N, Long. 9°24'O) à une profondeur de 918 mètres le 20 Mars 2011 (lors de la mission PACEMAKER coordonnée par Jérôme Bonnin et Jung-Hyun Kim) avec un carottier multi tubes MUC8+4. Sur le bateau, les deux centimètres superficiels du sédiment ont été découpés et placés dans des pots avec de l'eau de mer. Les pots ont été conservés à 12°C (Température in situ) durant le transport vers le laboratoire et lors de la conservation au laboratoire avant l'expérience. Les pots sont ouverts et conservés ainsi afin de maintenir l'oxygénation de l'eau dans les incubateurs en attendant le début de l'expérience. Les expériences ont eu lieu en Mai 2011 pour l'expérience I (hypoxie) et Avril 2012 pour l'expérience II (anoxie).

2.1.2. Identification des individus vivants

Quelques jours avant le début de l'expérience, du sédiment est tamisé par voie humide avec un tamis de mailles de 150 µm et de l'eau de mer microfiltrée (0.45 µm). Le refus de tamis est ensuite observé à la loupe binoculaire (grossissements) et les spécimens de *Melonis barleeanus* présentant des signes extérieurs de vitalité (couleur du cytoplasme,

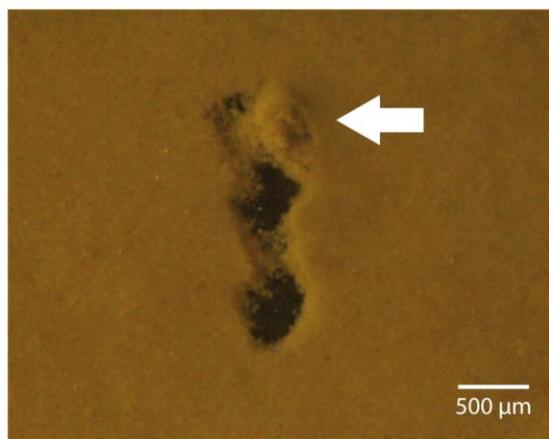


Figure 47 - Photographie au microscope optique d'un individu de l'espèce *Melonis barleeanus* (localisé au niveau de la flèche) s'étant déplacé et accumulant du sédiment fin autour de son test.

présence de kyste) sont isolés. Afin de confirmer leur vitalité, les spécimens isolés sont placés dans des boîtes de Pétri sur une fine couche de sédiment <38 µm. Seuls les individus s'étant déplacés (c'est-à-dire, qui ont laissé une trace sur le sédiment ; Figure 47) sont considérés comme vivants et sélectionnés pour les expériences. Pour chacune des deux expériences en anoxie et en hypoxie, 300 individus ont ainsi été utilisés (soit 600 au total).

2.2. Protocole expérimental

Dans le but d'identifier la réponse de *Melonis barleeanus* au manque d'oxygène, deux expériences successives ont été conduites et seront décrites et analysées dans ce chapitre. La première (expérience I) a eu lieu en Mai 2011 et la seconde (expérience II) en Avril

2012.

Pour chacune des deux expériences, trois aquariums sont mis en place, remplis d'eau de mer artificielle (mélange d'eau MilliQ et de sel de la Mer Rouge - commercialisé par la marque Red Sea - à une salinité de 35) initialement sans nitrates et placés dans des incubateurs à une température de 12°C. Les aquariums d'environ 18*20*35 cm contenant 8 litres d'eau étaient en plexiglas® lors de l'expérience I et en verre lors de l'expérience II (Figure 48). Différentes conditions sont simulées dans ces trois aquariums. Le premier est oxygéné avec des nitrates (à 50 µM) et nommé « OxN_I » et « OxN_{II} » lors de l'expérience I et II respectivement. Les deux autres étant désoxygéné, l'un sans et l'autre avec nitrates (50 µM) nommés respectivement « Hyp » ou « Ax » et « HypN » et « AxN » lors de l'expérience I et II respectivement (Tableau 29 ; Figure 48).

Pour atteindre l'hypoxie et l'anoxie, l'eau est bullée avec un mélange de N₂ et 0.04% CO₂ pour chasser l'oxygène dissous. Le CO₂ permet de maintenir le pH de l'eau. Afin de stabiliser la concentration en oxygène entre 0 et 63 µM lors de l'expérience I (hypoxie), un couvercle en plexiglas fin partiellement scellé (pour limiter les entrées d'air) est installé sur l'aquarium qui permet de limiter les entrées d'oxygène. Lors de l'expérience II (anoxie) un couvercle en plexiglas épais a été scellé

Tableau 29 – Ensemble des conditions et noms des aquariums au cours des deux expériences.

Expérience	Conditions		
	Oxygéné + Nitrates	Désoxygéné + Nitrates	Désoxygéné
Expérience I	OxN _I	HypN	Hyp
Expérience II	OxN _{II}	AxN	Ax

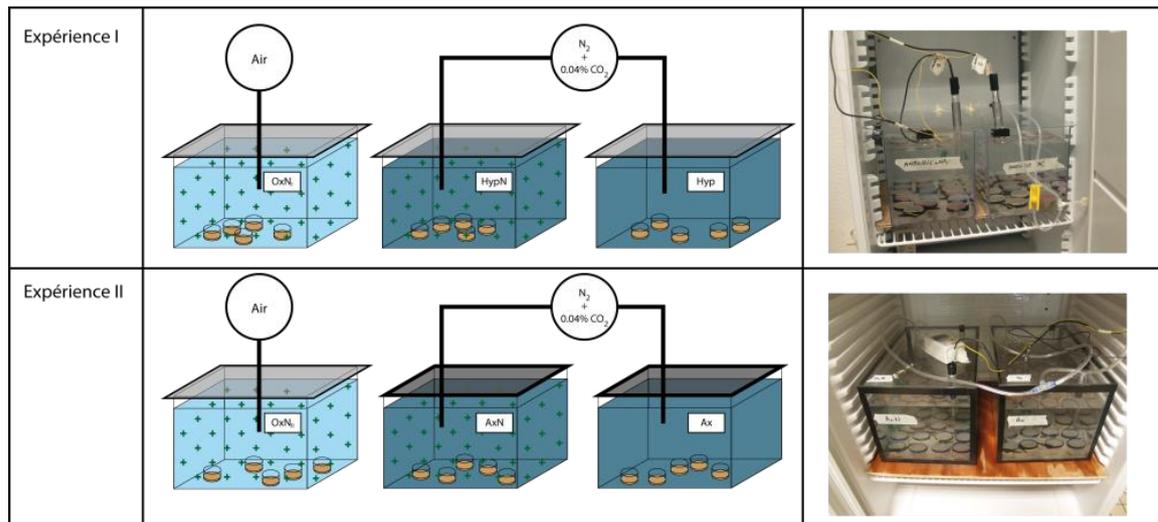


Figure 48- représentation schématique et photographies du dispositif expérimental utilisé lors des deux expériences. Le gaz utilisé pour buller l'eau de chaque aquarium est présenté dans les bulles blanches, la présence de nitrates dans l'eau est symbolisée par les croix vertes. L'oxygénation de l'eau est symbolisée par sa couleur, l'eau oxygénée étant bleue claire et l'eau hypoxique ou anoxique étant bleue foncée. Lors des deux expériences la concentration en oxygène est contrôlée par les microélectrodes que l'on voit sur les photographies. Les couvercles sont différents dans les deux expériences (voir description dans le texte).

avec du ruban adhésif en vinyle (adhésif destiné à l'isolation électrique) bloquant ainsi les entrées d'air et permettant de maintenir une concentration en oxygène dissous nulle (Figure 48). Lors des deux expériences la concentration en oxygène dissous est contrôlée par des microélectrodes à oxygène de type Clark (Revsbech, 1989) avec une pointe d'un diamètre de 100 μm placées dans les deux aquariums désoxygénés. Les électrodes sont calibrées fréquemment dans une solution saturée en air d'eau artificielle (à une salinité de 35 et à 12°C) et dans une solution anoxique d'ascorbate de sodium. Le suivi de l'évolution des conditions d'oxygénation s'est fait de manière différente dans les deux expériences. Lors de l'expérience I les concentrations sont acquises « manuellement » à des intervalles de temps variant de quelques heures à quelques jours (une personne faisait un relevé du signal de l'électrode) alors que lors de

l'expérience II les concentrations sont acquises « automatiquement » toutes les 30 secondes (acquises sur le logiciel SensorTrace d'Unisense).

Les individus sélectionnés sont distribués dans 15 cristallisoirs en verre (20 individus par cristallisoir de 3 cm de diamètre sur 2 cm de haut) pour chacune des deux expériences. Pour ajouter une source de nourriture, environ 1 mL de sédiment fin (< 38 μm ; provenant du Canyon de Nazaré) est ajouté dans le fond de chaque cristallisoir. Afin d'empêcher les foraminifères benthiques de quitter le cristallisoir au cours de l'expérience chacun des pots est recouvert d'un filet en nylon de maille de 100 μm . Cinq cristallisoirs sont placés à des positions aléatoires dans les trois aquariums. Chacun des 5 cristallisoirs de 20 individus vivants présents dans les aquariums sont ouverts à 5 temps d'échantillonnage différents. Les temps d'échantillonnage oscillent entre 7

et 56 jours pour l'expérience I et entre 7 et 69 jours pour l'expérience II (Tableau 30).

A la fin de chaque période d'incubation, les aquariums sont ouverts puis aussitôt refermés après avoir prélevé un cristalliseur dans chacun d'eux. Le contenu de chaque cristalliseur ainsi que les filets sont observés sous une loupe binoculaire. La majorité des individus introduits initialement ont été retrouvés à la fin de la période d'incubation (au cours de l'expérience hypoxie et anoxie seuls 5 et 2 individus respectivement sur 300 n'ont pas été retrouvés).

2.3. Analyse de la survie

Pour identifier avec précision et rapidement si les individus sont vivants à la fin de la période d'incubation, nous avons utilisé une sonde fluorescente : la Fluorescein Diacetate (FDA). Cette sonde est un composé non fluorescent (la Fluorescein) qui une fois hydrolysée par l'activité enzymatique intracellulaire apparaît fluorescent si elle est excitée à la longueur d'onde appropriée (Figure 49A). Cette sonde peut être utilisée de manière quantitative pour estimer l'activité enzymatique du foraminifère (Bernhard et al., 1995; Geslin et al., 2004) ou de façon qualitative pour identifier si un individu présente une activité enzymatique et s'il est par conséquent vivant (Piña-Ochoa et al., 2010b; Koho et al., 2011). Le FDA est solubilisé dans une solution de diméthyl sulphoxide (DMSO) et dilué

Tableau 30 – Durée d'incubation (en jours) des 5 temps d'échantillonnage au cours des deux expériences.

	T1	T2	T3	T4	T5
Expérience I	7	14	29	43	56
Expérience II	7	14	28	49	69

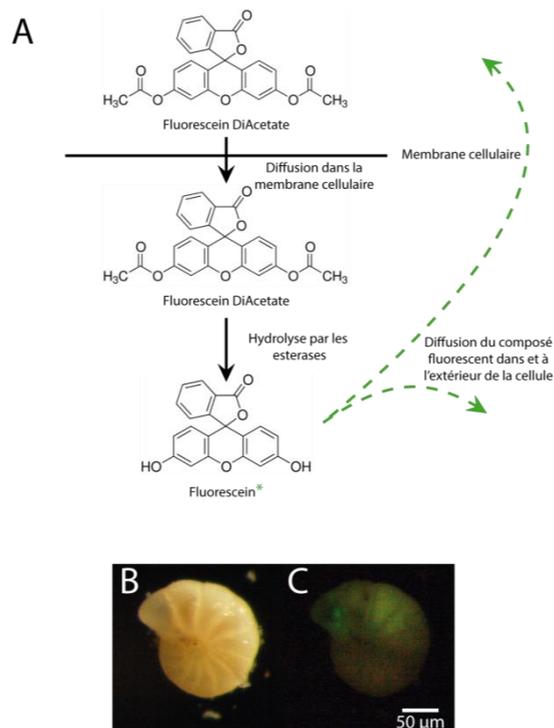


Figure 49 – Représentation schématique de l'hydrolyse et de la diffusion du FDA dans la cellule du foraminifère (A) et photographies d'un individu de *Melonis barleeanus* vivant à la loupe binoculaire (B) et à la loupe binoculaire à épifluorescence (C).

avec de l'eau de mer artificielle à une concentration finale en FDA de 100 µM. Tous les individus retrouvés sont incubés dans la solution de FDA pendant plus de 8h puis piqués et placés dans de l'eau artificielle sans FDA. Tous les spécimens sont observés séparément sous une loupe binoculaire à épifluorescence (Olympus SZW12 avec la source lumineuse Olympus URFL-T) à la longueur d'onde d'excitation de 492 nm et d'émission de 517 nm. Le nombre d'individus vivant (Figure 49B et C) ainsi déterminé permet de calculer les taux de survie à tous les temps et dans toutes les conditions.

2.4. Analyse de la croissance

Lors des deux expériences, la croissance des organismes est estimée. Les individus sont mesurés avant leur introduction dans les aquariums puis à la fin de la période d'incubation dans les différentes conditions expérimentales. Les individus sont mesurés initialement et à la fin de la période d'incubation à l'aide d'un microscope automatique monoculaire Leica Z16APO équipé d'un appareil photo numérique SIS/Olympus CC12. Tous les individus sont photographiés et les images sont analysées par le logiciel de traitement d'image analySIS (distribué par Olympus) permettant d'acquérir 21 paramètres d'envergure et de forme pour chacun des spécimens analysés (Bollmann et al., 2004; Movellan et al., 2012). Dans la présente étude nous nous intéressons aux variations du diamètre maximum de la coquille de *Melonis barleeanus*.

Si le principe de mesure est le même pour les deux expériences, les échantillons analysés dans les deux expériences ne sont pas tout à fait les mêmes. Pour l'expérience I, un cristalliseur supplémentaire contenant 10 individus a été ajouté dans chacun des trois aquariums. Ces individus sont mesurés avant le début de l'expérience (à T0) et à la fin des 56 jours d'incubation (à T5). Lors de l'expérience II, l'ensemble des 300 individus utilisés pour l'analyse de survie ont été mesurés avant d'être introduits dans l'expérience puis à la fin de chaque période d'incubation. Dans les résultats nous n'analyserons ici que les individus mesurés à T0 et T5 (n'ayant pas observé de croissance, les spécimens mesurés à T1,

T2, T3 et T4 n'apportant pas plus d'informations).

2.5. Analyse des nitrates intracellulaires

Des mesures de nitrates intracellulaires d'individus incubés lors des expériences I et II ont été réalisées par moi-même au centre de Géomicrobiologie de l'Université d'Aarhus en collaboration avec Nils Risgaard-Petersen. Chaque individu est rincé trois fois avec de l'eau de mer artificielle dépourvue de nitrates. Chaque individu est individuellement placé dans un tube à centrifugation de 1 mL et stocké et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse des échantillons. Les nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-) intracellulaires sont analysés par la méthode de Braman et Hendrix (1989) où les ions nitrates et nitrites sont réduits en monoxyde d'azote (NO) et détectés par chemiluminescence comme décrit dans la littérature (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008). Les spécimens sont injectés directement dans 0.6 mL d'une solution de Chlorure de Vanadium (VCl_3) à 0.1 M maintenue à 80°C dans un tube en verre en forme de U. Dans ce tube, un flux d'azote gazeux est maintenu par la pompe du détecteur de monoxyde d'azote (Eco Physics CLD 86, Eco Physics, Deurnten Suisse). L'azote gazeux est injecté dans une dérivation de l'ouverture extérieure du tube de réaction et le gaz en excès est éjecté par une ouverture dans laquelle les échantillons sont directement insérés dans le liquide de réaction évitant ainsi toute contamination par l'air et les change-

ments de pression. Les foraminifères analysés sont injectés individuellement et directement dans le réacteur. La solution d'acide chaude cause la désintégration du test et de la cellule du foraminifère et libère les nitrates intracellulaires et les transforme en monoxyde d'azote en quelques secondes. La calibration est réalisée par l'injection de 10 μL de solutions standards de nitrates préparées à partir de KNO_3 et d'eau milli-Q.

Pour l'expérience I, 5 individus par aquarium et pour T1, T2, T3 et T5 (resp. 7, 14, 29 et 56 jours) ont été prélevés et analysés dans un ordre aléatoire. Pour l'expérience II, 5 individus ont été prélevés aléatoirement pour T1, T3 et T5 (resp. 7, 18 et 69 jours) et l'ensemble des 45 individus sont analysés individuellement dans un ordre aléatoire. Pour pouvoir estimer une concentration en nitrates, la quantité de nitrates a été divisée par le biovolume du foraminifère ($0,75 * \text{le volume de la coquille}$, nous considérons que forme de la coquille est une sphéroïde prolata aplatie; Hannah et al. (1994)).

2.6. Mesure des taux de dénitrification

Les mesures de taux de dénitrification ont été réalisées au laboratoire de culture du LPG-BIAF d'après le protocole décrit par Risgaard-Petersen et al. (2006) et Høglund et al. (2008). En résumé, entre 6 et 10 individus (dont nous détaillerons l'origine en fin de paragraphe) sont placés dans une chambre de mesure anoxique. La réduction des nitrates est estimée par la production de N_2O (protoxyde

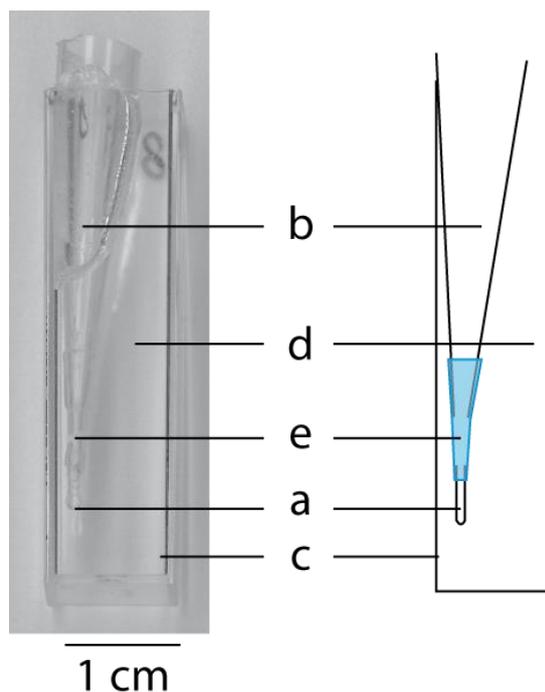


Figure 50 - Photographie et représentation schématique de la cuve de mesure des taux de dénitrification. Légende : a – chambre de mesure (0,5 mm de diamètre) ; b – milieu interne (eau de mer artificielle + HEPES + acétylène) ; c – cuve à spectrophotométrie ; d – milieu externe (acide ascorbique) et e – tube en silicone.

d'azote) mesurée avec une microélectrode (Andersen et al., 2001) placée à une centaine de microns au dessus des foraminifères. En déplaçant verticalement l'électrode, nous pouvons mettre en évidence un gradient de concentration de protoxyde d'azote produit qui permet d'estimer un taux de dénitrification.

En détail, lors de chaque mesure entre 6 et 10 individus sont placés dans un tube en verre de 0,5 mm de diamètre contenant de l'eau artificielle sans nitrates et de l'acétylène (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008). La dénitrification est la réduction de nitrates en diazote. Cette réaction est catalysée par plusieurs enzymes et a plusieurs produits intermédiaires tels que les nitrates sont

Tableau 31 – Date, nombre d’individus (Nb Indiv) de l’ensemble des mesures de dénitrification effectuées. L’origine des individus (dans le sédiment conservé au laboratoire ou de l’expérience II) et les éventuelles conditions préalables et la durée d’incubation sont précises.

Date	Nb Indiv	Origine	Conditions	Temps	Note
16/09/2011	6	sédiment	-	-	
14/06/2012	10	expérience II	OxN	T4-49j	
14/06/2012	10	expérience II	Ax	T4-49j	
14/06/2012	10	expérience II	AxN	T4-49j	
20/06/2012	10	expérience II	AxN	T4-49j	nitrites

successivement réduits en nitrites (NO_2^-), en monoxyde d’azote (NO), protoxyde d’azote (N_2O) et en diazote (N_2). Contrairement au protoxyde d’azote (N_2O), le diazote ne peut être mesuré directement. L’acétylène placée dans le milieu permet d’inhiber l’enzyme *nor* (nitrous oxide reductase) et fait par conséquent que le protoxyde d’azote (N_2O) devient le produit final de la dénitrification. Afin de créer des conditions anoxiques, le tube en verre est surmonté d’un tube en silicone poreux à l’oxygène emboîté à son ouverture supérieure dans un tube en verre conique fixé dans une cuve à spectrophotométrie (Figure 50). A l’extérieur de la chambre de mesure, dans la cuve, se trouve une solution d’ascorbate de sodium. L’oxygène dissous dans l’eau de la chambre de mesure va diffuser à travers le tube en silicone et va être piégé par la solution d’ascorbate créant l’anoxie en environ 1 h dans la chambre de mesure. Des mesures verticales de la concentration en N_2O sont effectuées dans le tube anoxique avec une microélectrode à N_2O d’un diamètre de 25 μm (Andersen et al., 2001) positionnées à $\sim 100 \mu\text{m}$ au dessus des foraminifères.

Les profils verticaux permettent de mettre en évidence une éventuelle production de N_2O due à la dénitrification. Les taux de dénitrifi-

cation sont estimés à partir du gradient de concentration, du flux de protoxyde d’azote, du nombre d’individus et de la section de la chambre (Équation 1).

Équation 1 – Calcul des flux de diffusion (J en $\text{pmol}/\text{cm}/\text{s}$), en fonction du coefficient de diffusion libre du protoxyde d’azote ($D_{\text{N}_2\text{O}}$ en cm^2/s) et du gradient de diffusion de l’oxygène ($d\text{N}_2\text{O}/dz$ en pmol/cm^4) et du taux de dénitrification (D en $\text{pmol}/\text{ind.}/\text{j}$), en fonction du flux (J en $\text{pmol}/\text{cm}/\text{s}$), de la section de la chambre de mesure (S en cm^2) et du nombre d’individus mesurés (N).

$$J = D_{\text{N}_2\text{O}} \times \frac{d\text{N}_2\text{O}}{dz}$$

$$D = \frac{J \times S \times 3600 \times 24}{N}$$

Un total de 5 mesures répliquées a été fait (Tableau 31). Deux séries de mesures ont été réalisées sur des individus trouvés vivants dans des conditions oxygénées (issus du sédiment oxygéné conservé dans les pots d’échantillonnage au laboratoire ou issus de l’aquarium OxN_{II} après 49 jours d’expérience ; Tableau 31). Les 3 autres séries de mesures sont faites sur des individus de l’expérience II prélevés à T4 (49 jours) dans les aquariums anoxiques (Ax et AxN). L’une de ces 3 séries de mesures à été faite en présence de nitrates (à 50 μM ; Tableau 31) dans la chambre de mesure afin d’identifier si *M.*

barleeanus pouvait réduire directement les nitrates présents dans l'eau interstitielle sans avoir à les accumuler au préalable.

2.7. Observation du déplacement des foraminifères benthiques

Afin d'avoir un indicateur visuel du niveau d'activité des foraminifères nous avons observé leurs déplacement au cours de l'expérience II (nous n'avons pas fait de telle observation lors de l'expérience I). Avant de placer les cristallisoirs dans les aquariums le sédiment n'était pas perturbé, l'état de perturbation final du sédiment permet ainsi d'estimer si les foraminifères se sont déplacés au cours de l'expérience.

La surface du sédiment dans les cristallisoirs a été photographiée après différentes périodes d'incubation dans les trois conditions expérimentales lors de l'expérience II. Chaque photographie a été prise quelques minutes après la sortie du cristallisoir de l'aquarium avant que les foraminifères soient extraits du sédiment pour analyser leur vitalité.

L'objectif de cette analyse est d'avoir un indicateur qualitatif de l'activité des individus, nous n'avons donc pas cherché à automatiser l'analyse de ces images. Ainsi, la part du sédiment bioturbé par le déplacement des foraminifères sera estimée visuellement.

2.8. Analyse de données

L'objectif de la présente étude est d'étudier l'effet du manque d'oxygène sur différentes variables dépendantes : la survie, la croissance et les nitrates intracellulaires de *Melonis bar-*

leeanus. Or, ces variables dépendantes sont de nature différente. La croissance et les nitrates intracellulaires (leur quantité et leur concentration) sont estimés par des mesures quantitatives. La survie est estimée par une variable binomiale : 0 si l'individu est mort et 1 si l'individu est vivant. Pour cette raison deux procédures statistiques différentes doivent être mises en place pour pouvoir traiter des données de natures différentes. Lorsque la variable dépendante (survie) est de type binomial nous utilisons des modèles linéaires généralisés (Nelder et Wedderburn, 1972) et lorsque la variable dépendante est quantitative et suit une distribution normale (croissance et nitrates) nous utilisons des modèles linéaires (Chambers et Hastie, 1992). Les deux procédures ont pour objectif de tester si une ou plusieurs variables indépendantes ont un effet significatif sur la variable dépendante.

Un ensemble de 12 modèles est créé (voir description ci-dessous ; Tableau 32). Pour chacun des 12 modèles une sélection de variables descendante (« backward selection ») est effectuée pour ne conserver que les variables indépendantes ayant un effet significatif (au seuil de 0.05) sur la variable dépendante. Seuls les tableaux mettant en évidence quelles variables ont un effet significatif sur la variable dépendante seront présentés dans le corps du présent manuscrit, les tableaux permettant d'estimer l'effet de chacune des variables dépendantes étant présentés en annexes. Les données sont analysées sur le logiciel R v. 2.14.0 (R Development Core Team, 2011).

2.8.1. Types de modèles

Deux types de modèles sont créés quelle que soit la méthode utilisée (GLM ou LM en fonction de la variable dépendante) et pour l'ensemble des 4 variables dépendantes (survie, taille, quantité et concentration de nitrates) : les modèles de type a et les modèles de type b.

1. Les modèles de type a ont pour but de quantifier l'effet du temps d'expérience et des conditions d'incubation lors de chacune des expériences (sans comparer ces effets dans les deux expériences). Deux modèles sont ainsi effectués pour tester l'effet temps, l'effet aquarium et leur interaction. Un modèle est fait pour les données des expériences I (hypoxie) et le second pour les données de

Tableau 32- Type de l'ensemble des modèles linéaires utilisés et description des variables et des données utilisées pour chacun des modèles. Entre parenthèse pour les variables quantitatives les transformations éventuellement appliquées et pour les variables qualitative l'ensemble des catégories sont présentées.

Méthode	Variable dépendante (transformation)	Type de modèle	Données	Variable indépendante (transformation)
glm	Survie (0 : mort, 1 : vivant)	a	Expérience I	Temps Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience
		b	Expérience I	Temps (T0, T5) Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps (T0, T5) Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps (T0, T5) Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience
lm	Diamètre Maximum (log)	a	Expérience I	Temps Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps (T0, T5) Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps (T0, T5) Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience
		b	Expérience I	Temps Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience
	Quantité de Nitrates (log)	a	Expérience I	Temps Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience
		b	Expérience I	Temps Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience
	Concentration en Nitrates (log)	a	Expérience I	Temps Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience
		b	Expérience I	Temps Aquarium (OxN _I , HypN et Hyp) Temps * Aquarium
			Expérience II	Temps Aquarium (OxN _{II} , AxN et Ax) Temps * Aquarium
			Expérience I et Expérience II	Temps Desoxygenation (OxN, DesoxN et Desox) Expérience (I et II) Temps * Desoxygenation * Expérience

- l'expérience II (anoxie).
2. Les modèles de type b ont pour objectif de comparer les effets du temps d'expérience et des conditions d'incubations observés entre les deux expériences. Pour ce faire, les effets de trois variables et leurs interactions sont quantifiés. Ces trois variables sont le temps d'expérience, l'expérience (I et II) et la désoxygénation. La variable désoxygénation permet de décrire les conditions d'incubation (3 conditions : OxN, DesoxN et Desox ; selon la définition qui suit). C'est la variable « Aquarium » modifiée telle que trois catégories sont prises en compte : 1) « OxN » est l'ensemble des données des aquariums oxygénés OxN_I et OxN_{II} , 2) « DesoxN » pour « Désoxygéné avec Nitrates » contient les données des aquariums HypN et AxN et 3) « Desox » pour « Désoxygéné (sans Nitrates) » contient les données Hyp et Ax. L'interaction entre la variable désoxygénation et la variable expérience permet de comparer les 6 aquariums entre eux (ex : OxN * expérience I correspond à l'aquarium OxN_I , Desox * expérience II correspond à l'aquarium Ax).

Comme précisé dans le paragraphe précédent, les variables ayant un effet significatif sont identifiées par sélection descendante.

2.8.2. Interprétation des résultats de modélisation

Nous présentons dans la Figure 51 une interprétation des résultats de modélisation pour la significativité de chacune des variables indépendantes.

Comme décrit précédemment, les modèles de type a sont estimés à partir des données de l'expérience I ou II et les modèles de type b sont effectués sur les données des deux expériences compilées. Ainsi, si on observe un effet significatif du temps dans un modèle de type a cela signifie que lors de l'expérience I ou II, la variable dépendante y varie avec le temps. Dans un modèle de type b, un effet significatif de cette même variable temps signifie que pour l'ensemble des données des expériences I et II la variable dépendant y varie avec le temps. Dans ces modèles de type b, l'effet de la variable temps est donc estimé en fonction de l'ensemble des deux jeux de données. Il est donc possible qu'un modèle de type a présente un effet temps non-significatif et qu'un modèle estime que cet effet temps est significatif puisque ces estimations sont basées sur deux jeux de données différents.

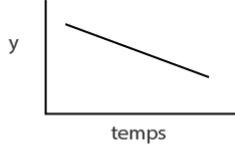
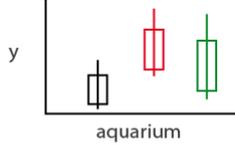
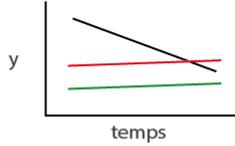
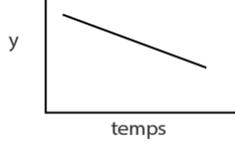
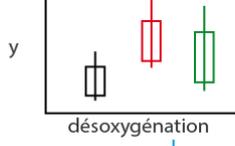
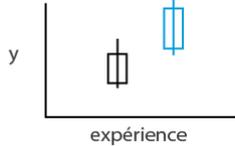
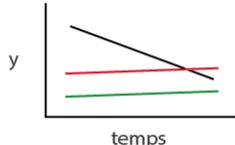
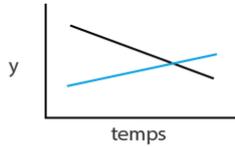
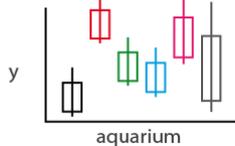
Modèles de type a		Y a t'il un effet significatif du temps et/ou des conditions lors de chaque expérience ?	$y = f(\text{temps} + \text{aquarium} + \text{temps} * \text{aquarium})$
Temps signif.	y change avec le temps		
Aquarium signif.	la moyenne d'y est différente dans les trois aquariums		
Temps * aquarium signif.	y change avec le temps de manière différente dans les trois conditions		
Modèles de type b		Est-ce que les effets des conditions et/ou du temps sont différents lors des deux expériences ?	$y = f(\text{temps} + \text{désoxygénation} + \text{expérience} + \text{temps} * \text{désoxygénation} * \text{expérience})$
Temps signif.	y change avec le temps		
Désoxygénation signif.	la moyenne d'y est différente dans les trois conditions de désoxygénation		
Expérience signif.	la moyenne d'y est différente dans les deux expériences		
Temps * désoxygénation signif.	y change avec le temps de manière différente dans les trois conditions de désoxygénation		
Temps * expérience signif.	y change avec le temps de manière différente dans les deux expériences		
Désoxygénation * expérience signif.	la moyenne d'y est différente dans les six aquariums		

Figure 51 – interprétation et représentation graphique schématique des résultats des modèles de types a et b pour chacune des variables indépendantes pour une variable y quelconque (survie, taille, quantité ou concentration de nitrates).

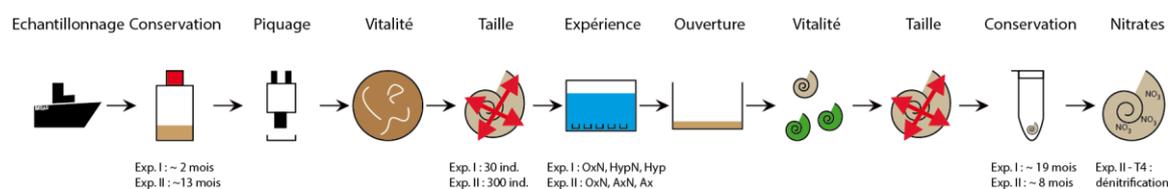


Figure 52 – séquence des différentes manipulations et particularités des expériences I et II.

2.9. Séquence expérimentale

La Figure 52 présente la séquence des différentes manipulations effectuées au cours des deux expériences. Le sédiment est prélevé au large de la marge portugaise puis rapatrié au laboratoire où ils sont conservés en attendant les expériences (cf. paragraphe 2.1.1). Des individus de *Melonis barleeanus* sont extraits du sédiment puis 300 individus vivants sont sélectionnés pour chacune des deux expériences (cf. paragraphe 2.1.2). Pour l'expérience I, la taille de 30 individus vivants et la taille des 300 individus sélectionnés lors de l'expérience II est mesurée (cf. paragraphe 2.4) avant de réaliser l'expérience d'incubation dans différentes conditions (cf. paragraphe 2.2). Après différentes périodes d'échantillonnage les cristallisoirs dans lesquels les individus sont placés sont ouverts, les individus extraits et l'on détermine avec la sonde fluorescente FDA s'ils sont vivants (cf. paragraphe 2.3). Les individus sont de nouveau mesurés pour déterminer si les organismes ont grandi dans les différentes conditions. Ces individus sont ensuite stockés individuellement dans des tubes à centrifugation dans l'attente des mesures de quantité de nitrates intracellulaires (cf. paragraphe 2.5).

Nous avons également testé la capacité à dénitrifier de certains individus de l'expérience II (après le test de vitalité des individus échantillonnés à T4).

3. Résultats

3.1. Suivi de l'oxygène dissous

Au cours des deux expériences la concentration en oxygène dissous a été suivie dans les deux aquariums désoxygénés (HypN, Hyp, AxN et Ax). Lors de l'expérience I (hypoxie), la concentration passe sous le seuil de l'hypoxie à 63 μM entre 24h et 48h après le début de l'expérience (Figure 53). Dès lors que l'hypoxie est atteinte le T0 est établi. La concentration en oxygène dissous est maintenue sous le seuil de l'hypoxie durant toute l'expérience à l'exception de 3 – 4 brefs pics de réoxygénation dans l'aquarium HypN (Figure 53). Au cours de l'expérience I, la concentration en oxygène dissous a atteint l'anoxie pour une période allant jusqu'à plus de 5 jours consécutifs (entre les échantillonnages T3 et T4). La concentration en oxygène dissous est passée sous la valeur arbitraire de 0.5 μM pendant environ 15% du temps de l'expérience, soit environ 8,5 jours cumulés sur les 56 jours de l'expérience.

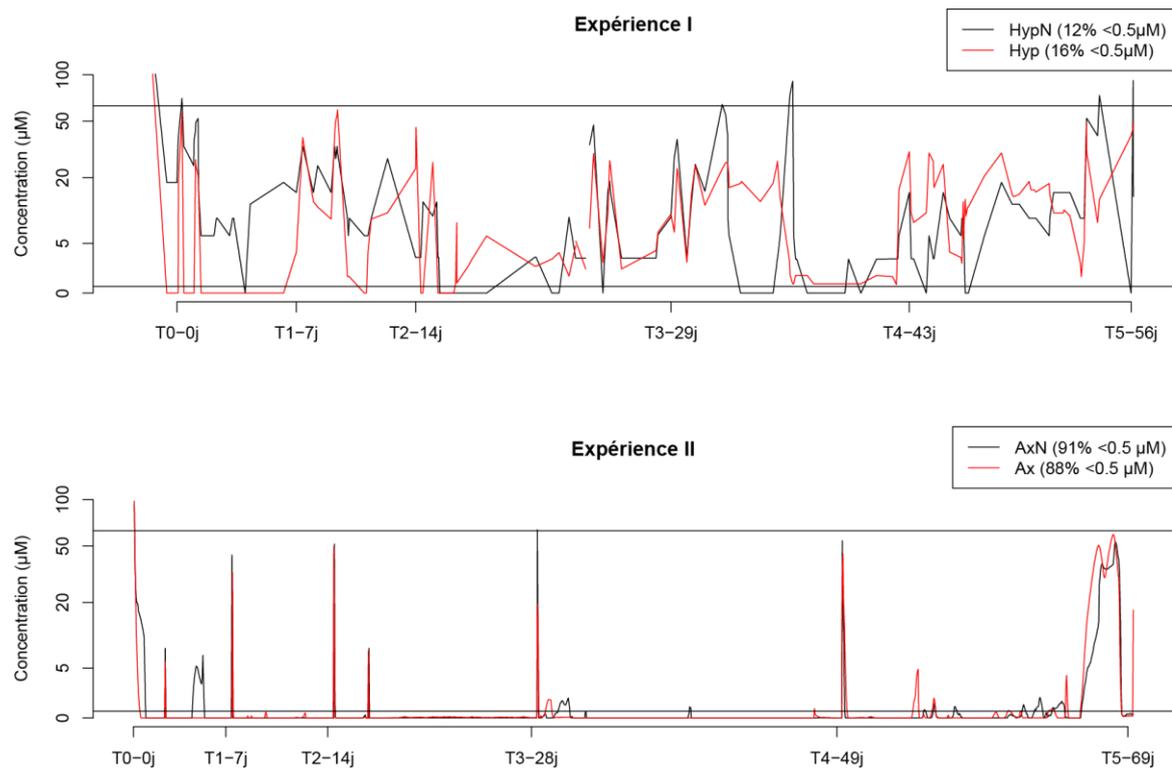


Figure 53 – Variation de la concentration en oxygène en fonction du temps au cours des deux expériences. Les données des électrodes placées dans les aquariums HypN et AxN sont présentés en trait plein noir et Hyp et Ax en trait plein rouge. Notez que les axes des ordonnées sont présentés en échelle logarithmique. Les deux lignes horizontales noires représentent le seuil de l’hypoxie à 63 μM et le seuil arbitraire de 0.5 μM .

Lors de l’expérience II (anoxie), la concentration en oxygène dissous a chuté rapidement pour passer sous le seuil des 63 μM en moins de 2h puis atteindre l’anoxie en 10 et 20 heures dans Ax et AxN respectivement (Figure 53). Au cours de l’expérience II, quelques pics de réoxygénation (durant environ 1h) sont observés après chaque événement d’échantillonnage ainsi que quelques autres petits pics de dérégulation du flux de gaz ne dépassant jamais 20 μM . Pendant 3 jours avant le dernier échantillonnage la concentration en oxygène dissous est remonté jusqu’à 60 μM en raison d’un problème de débit de gaz. Au cours des 69 jours d’expérience la concentration en oxygène dissous a été enregistrée sous le seuil arbitraire de 0.5 μM pen-

dant environ 90% du temps (soit environ 62 jours).

3.2. Survie

3.2.1. Expérience I : Hypoxie

Les taux de survie de *Melonis barleeanus* calculés à partir de la survie des 20 individus placés initialement (notez qu’à cause d’une erreur de manipulation 18 individus destinés à être placés dans le cristalliseur T2-Hyp ont été placés dans le cristalliseur T3-OxN) dans les cristalliseurs varient légèrement en fonction du temps et des conditions expérimentales de 75 à 100 % (Figure 54 et Tableau 33 ; soit entre 5 et 0 individus morts sur 20). En conditions oxygénées (OxN_I), le taux de survie varie entre 85 et 95%. Lorsque les conditions sont

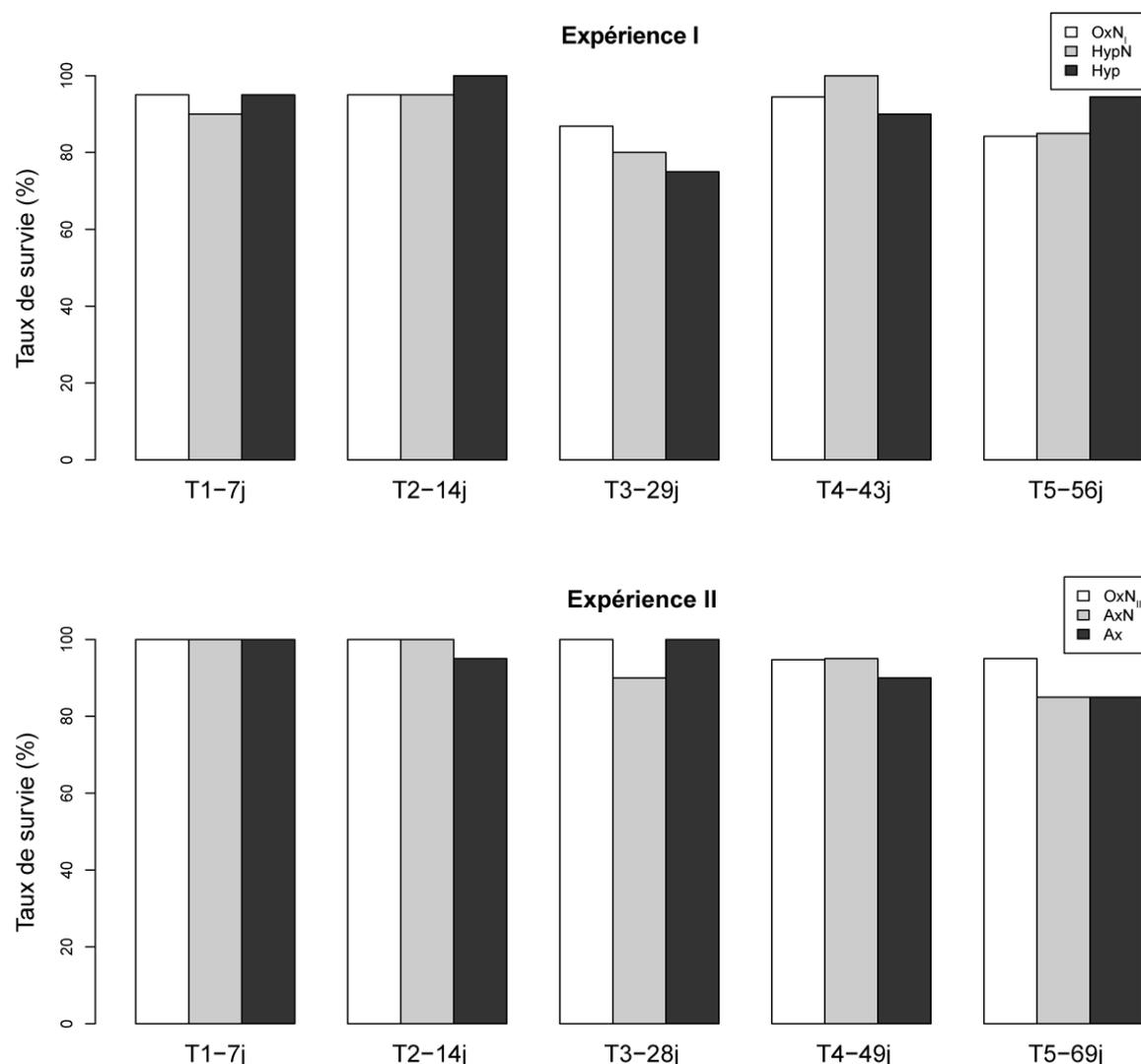


Figure 54 – Taux de survie en fonction du temps pour les deux expériences dans chacun des aquariums échantillonnés.

hypoxiques avec des nitrates (HypN), les plus forts taux de survie sont observés à T1, T2 et T4 avec respectivement 90, 95 et 100% de survie alors qu'à T3 et T5 les plus faibles valeurs sont observées avec 80 et 85 % de survie. Enfin, dans l'aquarium hypoxique sans nitrates les taux de survie sont supérieurs ou égaux à 90% à T1, T2, T4 et T5 (resp. 95, 100, 90 et 95%) alors qu'à T3 le taux de survie est de 75% (Figure 54 et Tableau 33).

Le modèle linéaire généralisé indique que ni le temps, ni les conditions ni leur interaction

n'a d'effet significatif sur le taux de survie de *Melonis barleeanus* (Tableau 34).

3.2.2. Expérience II : Anoxie

Au cours de la seconde expérience d'incubation de *Melonis barleeanus* en anoxie, les taux de survie dans chaque cristallisateur varient entre 85 et 100% (soit entre 3 et 0 individus morts sur 20 ; Tableau 33). Les taux de survie moyen diminuent graduellement avec le temps passant de 100% à T1 jusqu'à 88% à T5 (respectivement 7 et 69 jours) toutes conditions confondues. Les trois con-

Tableau 33 – Nombre de foraminifères vivants par nombre d’individus retrouvés dans les pots et taux de survie (entre parenthèses) à tous les temps d’échantillonnage dans tous les aquariums lors des expériences I et II.

Expérience I			
	OxN	HypN	Hyp
T1-7j	19/20 (95%)	18/20 (90%)	19/20 (95%)
T2-14j	19/20 (95%)	19/20 (95%)	2/2 (100%)
T3-29j	33/38 (86.8%)	16/20 (80%)	15/20 (75%)
T4-43j	17/18 (94.4%)	20/20 (100%)	18/20 (90%)
T5-56j	16/19 (84.2%)	17/20 (85%)	17/18 (94.4%)

Expérience II			
	OxN	AxN	Ax
T1-7j	20/20 (100%)	20/20 (100%)	20/20 (100%)
T2-14j	20/20 (100%)	19/19 (100%)	19/20 (95%)
T3-28j	20/20 (100%)	18/20 (90%)	20/20 (100%)
T4-49j	18/19 (94.7%)	19/20 (95%)	18/20 (90%)
T5-69j	19/20 (95%)	17/20 (85%)	17/20 (85%)

ditions montrent également des taux de survie moyen proches de 98% pour OxN_{II} et 94% pour AxN et Ax (Figure 54).

Dans l’aquarium oxygéné (OxN_{II}) aucun individu n’est retrouvé mort en début d’expérience (à T1, T2 et T3) alors qu’aux deux derniers temps d’échantillonnage le taux de survie est de 95%. Lorsque l’aquarium est anoxique avec des nitrates (AxN) le taux de survie est de 100% à T1 et T2 (resp. 7 et 14 jours d’expérience) et est de 90, 95 et 85% à T3, T4 et T5 respectivement (resp. 28, 49 et 69 jours). Enfin, dans l’aquarium anoxique (Ax), le taux de survie est de 100% à T1 et T3, de 95% à T2, de 90% à T4 et de 85% à T5 (Tableau 33). Dans les trois aquariums le taux

de survie de *Melonis barleeanus* diminue avec le temps d’expérience.

Le modèle linéaire généralisé indique que ni l’interaction Temps*Aquarium, ni la variable Aquarium n’ont d’effet significatif sur le taux de survie de *M. barleeanus*, alors que le taux de survie montre une diminution significative au cours du temps (Tableau 34).

3.2.3. Expérience I vs expérience II

En comparant les deux expériences nous pouvons observer que le taux de survie moyen (moyenne de tous les temps et tous les aquariums) au cours de l’expérience I (hypoxie) est inférieur à celui de l’expérience II (respectivement 90 et 95%). Au cours de ces deux expériences le taux de survie le plus fort est observé dans les conditions oxygénées avec 94.5% de moyenne (moyenne de tous les temps) dans les deux aquariums OxN (OxN_I et OxN_{II}; Figure 55). Ce taux de survie est plus important que celui observé dans les aquariums « DesoxN » (Désoxygénés avec Nitrates : HypN et AxN) et dans les aquariums « Desox » (Désoxygénés sans Nitrates : Hyp et Ax) dans lesquels le taux de survie moyen est de 92%.

La modélisation du taux de survie au cours des deux expériences indique que ni les inte-

Tableau 34 – Effet des conditions expérimentales sur la survie de *Melonis barleeanus* au cours des deux expériences. Les statistiques de degrés de liberté (Df et Resid. Df), la deviance (Deviance et Resid. Dev) ainsi que la probabilité (Pr(>Chi)) sont présentées pour chacune des variables indépendantes testées.

Modèle	Données	Variable indépendante	Df	Deviance	Resid. Df	Resid. Dev	Pr(>Chi)
type a	Expérience I	Residuals	NA	NA	294	194,0	NA
		Temps	1	11,2	296	101,7	0,001
	Expérience II	Residuals	NA	NA	297	113,0	NA
type b	Expériences I et II	Residuals	NA	NA	592	313,5	NA
		Temps	1	6,2	591	307,4	0,013
		Expérience	1	8,5	590	298,9	0,004

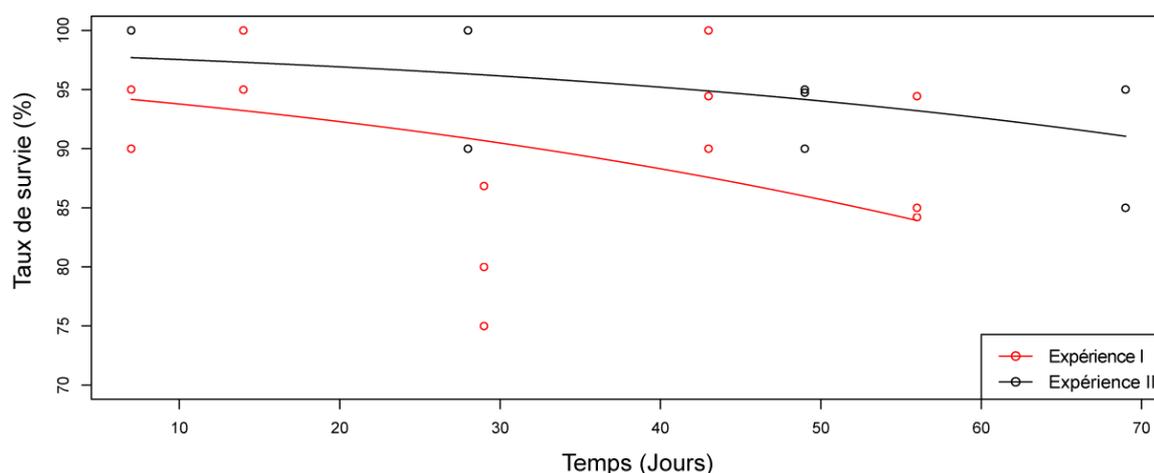


Figure 55 – Taux de survie en fonction du temps au cours des deux expériences. Les points rouges sont les valeurs observées dans chacun des aquariums de l'expérience I et les points noirs lors de l'expérience II. Les courbes rouges et noires sont estimées à partir du modèle linéaire.

rations testées ni la variable « Désoxygénation » n'ont d'effet significatif sur le taux de survie de *M. barleeanus* alors que le temps et l'expérience ont un effet significatif. Ces effets sont tels que le taux de survie diminue avec le temps et le taux de survie est significativement plus fort au cours de l'expérience anoxie qu'au cours de l'expérience hypoxie (Tableau 34).

3.3. Croissance

3.3.1. Expérience I : hypoxie

La croissance de *Melonis barleeanus* est estimée à partir de mesures de taille effectuées avant et après 56 jours d'incubation sur 10 individus pour chacune des trois conditions expérimentales. Initialement le diamètre maximal est similaire dans les trois aquariums. A T0, il est de 252, 258 et 252 μm en moyenne dans OxN_I, HypN et Hyp respectivement (Figure 56). Après 56 jours d'incubation les mêmes individus sont mesurés (à l'exception d'un individu dans OxN_I et HypN qui n'ont pas été retrouvés) et leur

diamètre maximal atteint 333, 338 et 332 μm en moyenne dans OxN_I, HypN et Hyp respectivement. La différence entre la taille initiale et la taille finale est de 81 μm dans OxN_I et 80 μm dans HypN et Hyp. Le modèle linéaire montre que ni l'effet aquarium ni l'interaction aquarium*temps n'est significatif contrairement à l'effet temps (Tableau 35). Ces résultats indiquent que la différence entre la taille finale et initiale est significative et que cette différence est la même dans les trois conditions. Il y a donc eu croissance de *Melonis barleeanus* au cours de l'expérience, et cette croissance est la même dans les aquariums hypoxiques que dans l'aquarium OxN_I.

3.3.2. Expérience II : Anoxie

Lors d'expérience II (anoxie), la taille de 20 individus a été mesurée à T0 et après la fin des cinq périodes d'incubation dans les trois conditions testées. N'observant pas de changements majeurs et par soucis de concision seuls les résultats du 5^{ème} temps d'incubation seront présentés ici. Avant de mettre les individus dans les conditions expérimentales la

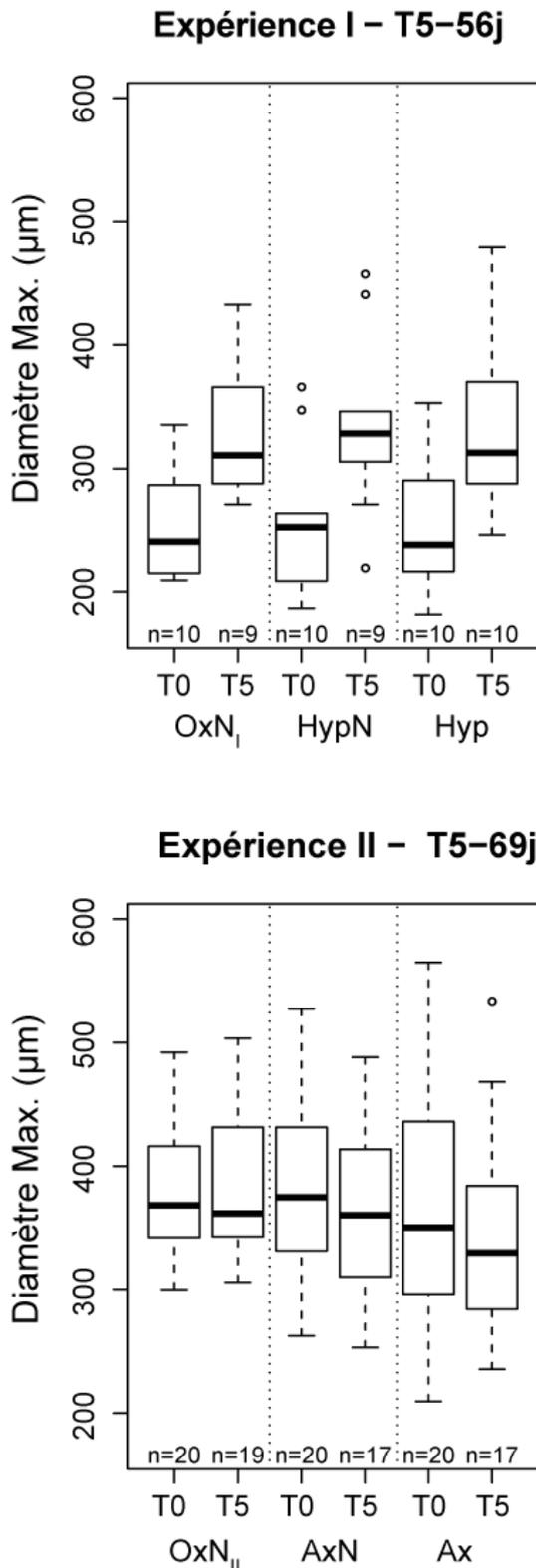


Figure 56 – Diamètre maximum et nombre d'individus mesurés dans chacun des aquariums à T0 et T5 au cours des expériences I et II.

taille moyenne des individus est similaire dans les trois conditions le diamètre maximal

étant de 380, 382 et 365 μm en OxN_{II}, AxN et Ax respectivement (Figure 56). Après 69 jours d'incubation le diamètre maximal est de 388, 370 et 352 μm en moyenne en OxN_{II}, AxN et Ax respectivement. En moyenne les individus sont plus grands de 8 μm en OxN_{II} alors qu'en AxN et Ax les individus sont plus petits de 12 et 13 μm respectivement. Il faut noter que dans ces deux conditions, seuls 17 des 20 individus initialement mesurés ont été retrouvés à la fin de l'expérience. L'absence des 3 individus manquants ou la possibilité que certaines loges des tests cassent lors de la manipulation des foraminifères pourraient expliquer la diminution de la taille moyenne à la fin de l'expérience. Un modèle linéaire montre que ni l'effet temps, ni l'effet aquarium ni leur interaction n'a d'effet significatif sur le diamètre maximal de *Melonis barleanus* (Tableau 35). Ce résultat indique que – contrairement à l'expérience I - aucune croissance n'a été détectée au cours de l'expérience II et ce quelles que soient les conditions.

3.3.3. Hypoxie vs Anoxie

En comparant les deux expériences nous pouvons observer que le diamètre maximal initial des individus utilisés pour l'expérience II est en moyenne plus important de 122 μm que celui des individus utilisés lors de l'expérience I (Figure 57). La taille initiale des foraminifères utilisés lors de l'expérience anoxie est proche de la taille finale de ceux de l'expérience hypoxie (376 μm contre 334 μm en moyenne respectivement). Lorsque les données décrites précédemment sont ana-

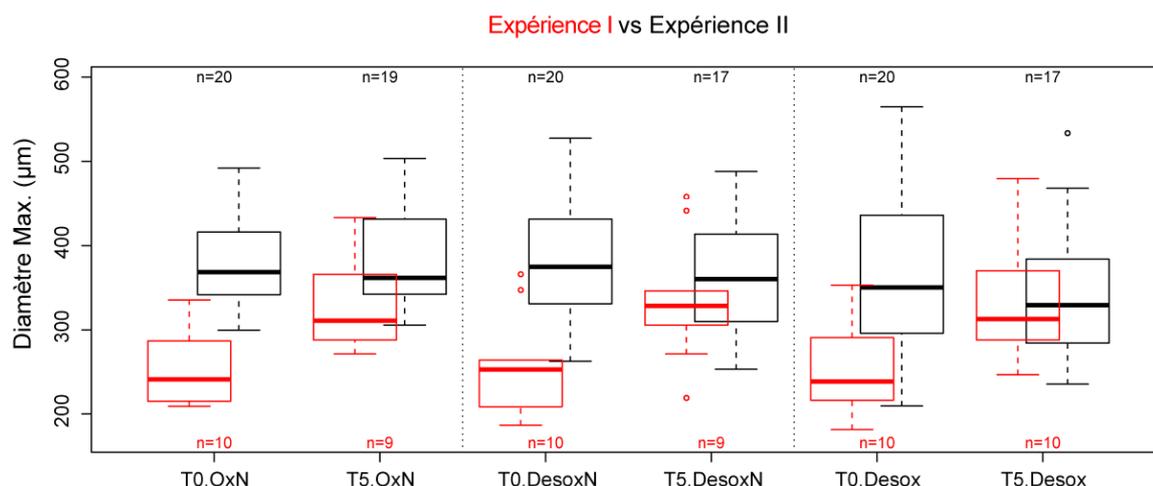


Figure 57 – Diamètre maximum et nombre d’individus mesurés dans chacun des aquariums à T0 et T5 pour l’expérience I (en rouge) et II (en noir).

lysées ensemble il apparaît que la « désoxygénation » et ses interactions avec le temps et l’expérience n’ont pas d’effet significatif sur la taille de *M. barleeanus* (Tableau 35). Au contraire, le temps, l’expérience et l’interaction temps*expérience ont un effet significatif sur le diamètre maximal des individus mesurés. Ces effets sont tels que les foraminifères utilisés lors de l’expérience anoxie sont significativement plus grands que ceux de l’expérience hypoxie. Ces résultats confirment les observations faites dans les paragraphes précédents : la croissance est observée uniquement lors de l’expérience hypoxie.

3.4. Nitrates intracellulaires

3.4.1. Expérience I : hypoxie

La quantité de nitrates dans la cellule de 57 individus trouvés vivants a été dosée à la fin des différentes périodes d’incubation et pour les trois conditions expérimentales (Figure 58). Cette quantité a été normalisée par le biovolume de l’individu permettant d’estimer la concentration de nitrates intracellulaires. L’analyse des données se fera principalement sur les concentrations de nitrates intracellulaires. Parmi les 57 individus testés de l’expérience I (hypoxie), seuls deux présentent une concentration nulle. La concentration

Tableau 35 - Effet des conditions expérimentales sur la taille de *Melonis barleeanus* au cours des deux expériences. Les statistiques de degrés de liberté (Df), la somme et moyenne des carrés des écarts (Sum Sq et Mean Sq) ainsi que la probabilité (Pr(>F)) sont présentées pour chacune des variables indépendantes testées.

Modèle	Données	Variable indépendante	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Type a	Expérience I	Temps	1	1,1	1,1	29,7	< 10 ⁻³
		Residuals	56	2,1	0,0	NA	NA
	Expérience II	Residuals	112	4,4	0,0	NA	NA
Type b	Expériences I et II	Temps	1	0,2	0,2	5,8	0,017
		Expérience	1	2,3	2,3	59,5	< 10 ⁻³
		Temps:Expérience	1	0,9	0,9	22,4	< 10 ⁻³
		Residuals	167	6,5	0,0	NA	NA

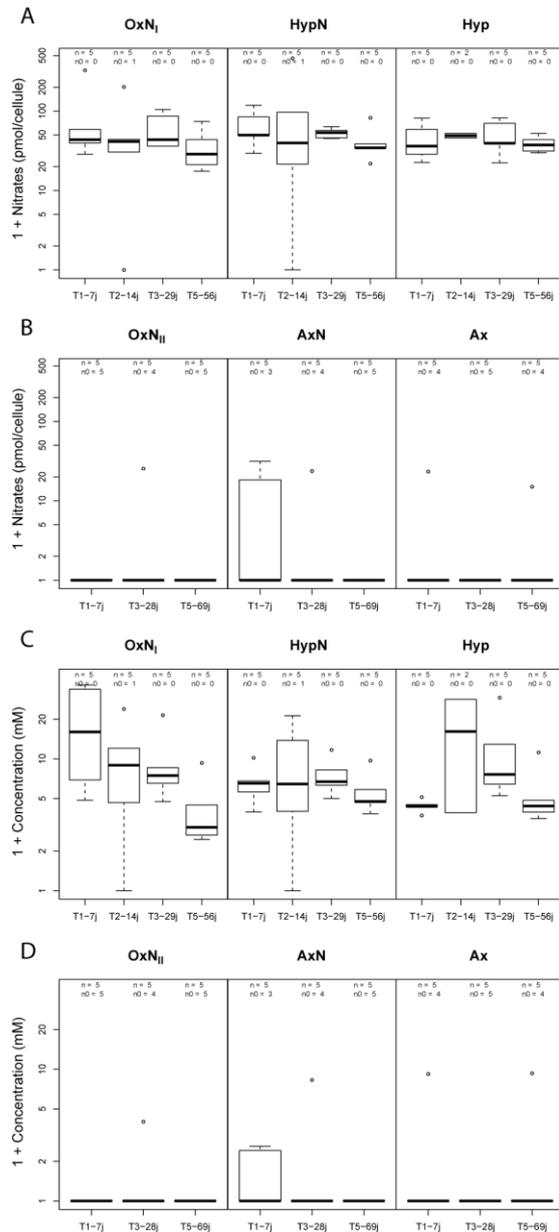


Figure 58 – Quantité (A et B) et concentration de nitrates cellulaires (C et D) en fonction du temps au cours des expériences I (A et C) et II (B et D) dans chacun des aquariums. Notez que les axes des ordonnées est exprimé en échelle logarithmique.

maximale est de 35 mM (mmol L^{-1}) et est observée après 7 jours d'expérience en OxN_I. Les plus fortes concentrations moyennes par aquarium (pour tous les temps) sont observées en OxN_I et Hyp (respectivement 10 et 8.6 mM contre 6.3 mM en HypN). En OxN_I la concentration diminue au cours du temps passant d'une concentration moyenne de 19 mM à 3.4

mM. En HypN (hypoxie avec des nitrates intracellulaires) la concentration est relativement stable au cours du temps variant entre 4.8 et 8.3 mM. En Hyp, des concentrations moyennes plutôt faibles sont observées à T1 et T5 (resp. 3.4 et 4.6 mM) alors qu'à T2 et T3 les concentrations sont plus élevées (15 et 11 mM resp.). La modélisation linéaire indique que le temps ni l'aquarium ni leur interaction influence significativement la concentration en nitrates intracellulaires (Tableau 36).

3.4.2. Anoxie

Parmi les 45 individus dosés au cours de l'expérience seuls 6 *Melonis barleeanus* présentent des nitrates intracellulaires (1 individu dans OxN_{II}, 3 dans AxN et 2 dans Ax). La concentration maximale atteint 8.3 mM (Figure 58). Les résultats de modélisation indiquent que la concentration n'est influencée ni par le temps ni par les conditions expérimentales (Tableau 36).

3.4.3. Expérience I vs expérience II

Le nombre d'individus présentant des nitrates dans leur cellule est nettement plus important lors de l'expérience I que dans l'expérience II (resp. 55 sur 57 et 6 sur 45 ; Figure 59). Les concentrations observées sont également plus importantes dans la première expérience (concentration maximale observée : 35.4 mM dans l'expérience I contre 8.3 mM dans l'expérience II).

Les données de l'expérience hypoxie et anoxie décrites précédemment ont été groupées et les résultats de modélisation linéaire

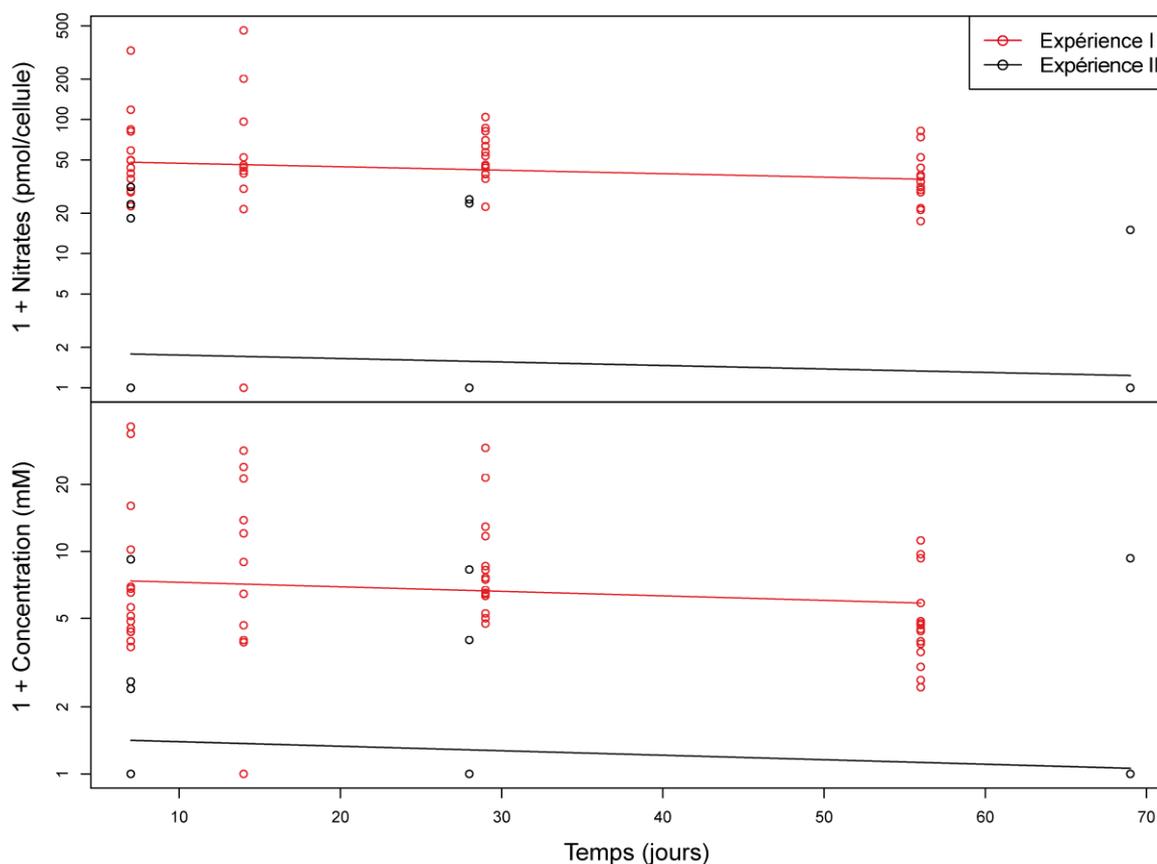


Figure 59 – Quantité et concentration en nitrates intracellulaires mesurées pour tous les individus en fonction du temps. Les points rouges et noirs représentent les individus mesurés lors de l’expérience I et II (respectivement). Les courbes sont estimées à partir des modèles linéaires établis. Notez que l’axe des ordonnées est présenté selon une échelle logarithmique.

indiquent que la « desoxygenation » (i.e. les traitements expérimentaux « OxN » (OxN_I et OxN_{II}), « DesoxN » (HypN et AxN) et « Desox » (Hyp et Ax)) n’a pas d’effet significatif sur la concentration en nitrates intracellulaire mais que la concentration est influencée et par le temps et par l’expérience

(Tableau 36). Ces variations sont telles que les concentrations sont plus importantes lors de l’expérience hypoxie que lors de l’expérience anoxie et que dans les deux cas la concentration diminue avec le temps d’incubation.

Tableau 36 - Effet des conditions expérimentales sur la quantité et la concentration de nitrates de *Melonis barleeanus* au cours des deux expériences. Les statistiques de degrés de liberté (Df), la somme et moyenne des carrés des écarts (Sum Sq et Mean Sq) ainsi que la probabilité (Pr(>F)) sont présentées pour chacune des variables indépendantes testées.

Variable dépendante	Modèle	Données	Variable indépendante	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Quantité de nitrates	Type a	Expérience I	Residuals	56	50,6	0,9	NA	NA
		Expérience II	Residuals	44	50,4	1,1	NA	NA
	Type b	Expériences I et II	Temps	1	16,7	16,7	16,6	< 10 ⁻³
			Expérience	1	265,4	265,4	264,8	< 10 ⁻³
			Residuals	99	99,2	1,0	NA	NA
Concentration en nitrates	Type a	Expérience I	Residuals	56	31,1	0,6	NA	NA
		Expérience II	Residuals	44	15,9	0,4	NA	NA
	Type b	Expériences I et II	Temps	1	16,7	16,7	16,6	< 10 ⁻³
			Expérience	1	265,4	265,4	264,8	< 10 ⁻³
			Residuals	99	99,2	1,0	NA	NA

Tableau 37 – Résultats des mesures de dénitrification effectuées sur *Melonis barleeanus*. Les conditions préalables à la mesure ainsi que la durée d'incubation dans ces conditions sont précisées. Le nombre d'individus placés dans la chambre ainsi que les conditions de mesure particulières sont présentées.

Durée d'incubation (j)	Conditions d'incubation	Date de mesure	Nombre d'individus	Dénitrification	Conditions particulières dans la chambre de mesure
T0	OxN	16/09/2011	6	NON	
T4 - 49j	OxN _{II}	14/06/2012	10	NON	
	Ax	14/06/2012	10	NON	
	AxN	14/06/2012	10	NON	
		20/06/2012	10	NON	50 µM NO ₃

3.5. Mesure des taux de dénitrification

Parmi les 5 mesures contenant de 6 à 10 individus de *Melonis barleeanus* et quelles que soient les conditions dans lesquelles les mesures ont été effectuées (avec ou sans incubation en anoxie préalable, anoxie avec ou sans nitrates et avec ou sans nitrates dans le milieu de mesure) aucune ne permet de mettre en évidence de la production de N₂O en concentration détectable (Tableau 37).

3.6. Activité (déplacement) des foraminifères benthiques durant l'expérience II

Les photographies de la surface du sédiment permettent d'identifier l'intensité du déplacement des foraminifères par l'observation des terriers formés par les individus. Malheureusement, les photographies ont été prises avec des appareils photos différents et dans des prises de vues de qualité et d'exposition en lumière différentes ne permettant pas une analyse d'image automatique. Néanmoins nous pouvons observer visuellement des différences entre les conditions d'expérimentations.

Nous pouvons voir qu'en conditions oxygénées (OxN_{II}), la surface couverte par les terriers augmente avec le temps (Figure 60). En effet, à T2 (14 jours), les terriers couvrent environ les 2/3 de la surface du sédiment et à partir de T3 (28 jours) la totalité de la surface du sédiment est couverte de pistes (de traces de déplacement des foraminifères à la surface du sédiment). En conditions anoxiques (AxN et Ax) nous n'observons pas de différences

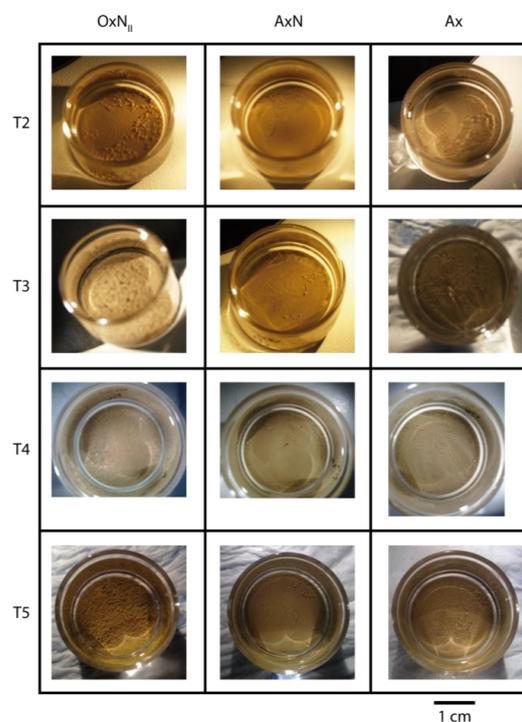


Figure 60 – Photographies de la surface du sédiment du cristalliseur à la fin de chaque période d'incubation (T2-14j, T3-28j, T4-49j et T5-69j) pour chacun des aquariums.

majeures entre les différents temps d'échantillonnages et entre les deux aquariums. La surface de couverture des pistes semble correspondre à moins d'1/4 de la surface totale du sédiment. Les traces sont dans certains cas bien séparés les uns des autres. L'intensité de la bioturbation (la surface couverte par les traces) dans les aquariums anoxiques à tous les temps est inférieure à celle de l'aquarium OxN_{II} à T2 (Figure 60).

Différentes observations visuelles ont également été faites lors de l'expérience II : après les différentes périodes d'échantillonnage, certains individus sont retrouvés dans des kystes de nutrition (ils agglomèrent de sédiment autour de leurs tests). De même, nous avons observé l'intensité de la fluorescence lors du test de détermination de la vitalité au FDA. Ces observations non-quantifiées montrent que la formation de kystes ainsi que l'intensité de la fluorescence des individus semble être plus importantes en conditions oxygénées (OxN_{II}) qu'en conditions anoxiques (Ax et AxN).

4. Discussion

4.1. Interprétation des résultats de modélisation statistique

Dans ce chapitre, la structure de la base de données nous permet de tester l'effet de toutes les variables expérimentales (temps, aquarium, expérience) ainsi que leurs interactions. Afin d'analyser spécifiquement les effets de l'hypoxie et de l'anoxie deux modèles par variable réponse ont été faits pour les deux bases de données respectivement (modèles de

type a). Afin de comparer les résultats obtenus lors des deux expériences et ainsi comparer les effets de l'hypoxie et de l'anoxie un troisième modèle est appliqué sur l'ensemble des deux bases de données (modèle de type b). Ainsi, la base de données de l'expérience I par exemple est traitée dans deux modèles différents (le premier uniquement sur les données de cette expérience, le second en comparant ces données à l'expérience II).

Plus nous faisons de modèles sur une même base de données, plus il y'a de chance pour que ces modèles nous donnent des résultats différents. C'est le cas par exemple des résultats d'analyse des quantités et concentration de nitrates. Les résultats de modélisation effectués sur la base de données de l'expérience I seule (modèle de type a) montrent qu'il n'y a pas d'effet significatif du temps suggérant que la quantité de nitrates ne change pas avec le temps (Tableau 36). Le modèle basé sur les bases de données des deux expériences (modèle de type b) montre quant à lui un effet du temps et de l'expérience significatif (Tableau 36). Ce modèle de type b peut être interprété pour dire que la quantité de nitrates moyenne est différente dans les deux expériences et que lors de ces deux expériences la quantité de nitrates diminue avec le temps (avec la même pente pour les deux expériences). Ces résultats sont contradictoires avec les résultats du modèle de type a précédent qui ne montraient pas d'effet significatif du temps. Cette différence s'explique par le fait que les temps d'échantillonnage sont différents lors des deux expériences – l'expérience II ayant duré plus longtemps que l'expérience I dans

l'espoir d'observer une mortalité des individus plus importante – et qu'au temps le plus important (T5-69j lors de l'expérience II), les quantités de nitrates intracellulaires sont quasi nulles (Figure 59). Ces valeurs basses en fin d'expérience et ce biais de la structure de la base de données (les différences de durée d'expérience) tendent ainsi créer cet effet temps significatif. Ce biais implique que dans la suite de cette discussion, lorsque nous discuterons de l'effet de l'hypoxie ou de l'anoxie, nous ne discuterons que des résultats obtenus par les modèles de type a. Lorsque nous tenterons de comparer les effets de l'hypoxie et de l'anoxie nous discuterons des résultats obtenus par les modèles de type b.

4.2. Protocole expérimental – réponse de *Melonis barleeanus* aux conditions expérimentales

Au cours de l'expérience, la concentration en oxygène dissous dans l'eau de l'aquarium est estimée et contrôlée par des microélectrodes placées à quelques centimètres du fond de l'aquarium. Nous pouvons ainsi assurer que les conditions hypoxiques sont maintenues tout au long de l'expérience I (avec quelques passages en anoxie dont nous ne discuterons pas ici de l'influence sur la réponse de *Melonis barleeanus*). Au cours de l'expérience II les aquariums sont maintenus en anoxie lors de la majorité de la durée de l'expérience. Quelques événements de réoxygénation ont été observés à chaque période d'échantillonnage car il était nécessaire d'ouvrir l'aquarium afin de prélever les cris-

talloirs contenant les foraminifères. Ces événements sont très brefs (entre 1 et 2h environ) et sont enregistrés dans l'eau surnageante. La question est de savoir si cette brève réoxygénation de l'eau contenue dans l'aquarium peut affecter les foraminifères. Nous pouvons nous attendre à ce qu'en raison de l'agitation de l'eau créée par le flux de gaz, de la présence du filet cet oxygène n'a pas le temps de diffuser dans le sédiment. Nous considérerons ainsi que les foraminifères sont maintenus dans un microenvironnement anoxique tout au long de l'expérience II et que ces événements de réoxygénation n'affectent pas leur réponse aux conditions expérimentales.

A notre connaissance cette étude est la première où *Melonis barleeanus* est utilisée seule lors d'une expérience en laboratoire (cette espèce a été reportée dans des expériences en laboratoire portant sur l'ensemble de la communauté de foraminifères). De nombreux indices montrent que cette espèce se comporte bien lorsqu'on la soumet à différentes conditions expérimentales. En effet, lors des deux expériences dans les conditions de contrôle bien oxygénées son taux de survie est assez important (avec une plus faible valeur observée de 85% ; soit 5 individus morts sur 38) même après 70 jours d'expérience. Ce taux de survie en conditions oxygénées est plus important que celui observé chez *Bulimina marginata* par exemple (36-64% ; Geslin et al., 2014). De plus, lors de l'expérience I, de nombreux individus ont grandi de plusieurs dizaines de micromètres. Les photographies de la surface du sédiment prises au cours de

l'expérience II montrent que le sédiment est fortement bioturbé (Figure 60). Les observations faites dans le milieu de contrôle oxygéné montrent ainsi que les individus de *Melonis barleeanus* placés dans l'expérience sont donc actifs au cours de l'expérience. Les faits que cette espèce 1) présente un taux de survie important, 2) est capable de calcifier en conditions expérimentales et 3) est très active durant l'expérience, indiquent qu'elle s'acclimate bien à la manipulation en laboratoire.

Dans cette étude nous cherchons à comparer les effets de l'hypoxie et de l'anoxie sur la survie et la croissance de *Melonis barleeanus*. Nous voulons donc comparer les résultats obtenus lors de deux expériences. Nous devons cependant noter que ces deux expériences ne se sont pas déroulées au même moment (un an d'intervalle) mais sur le même échantillon prélevés en mars 2011. Donc, l'expérience II a été réalisée avec des individus qui étaient restés plus d'un an dans leur sédiment initial dans des incubateurs à 12°C sans ajout de matière organique. Il est donc possible que l'état de santé des individus a pu être modifié entre les deux expériences. Des événements de reproduction ont également pu avoir lieu lors de l'incubation d'un an et donc les individus sélectionnés pour les deux expériences n'appartiennent pas forcément à la même génération. Nous nous sommes rendu compte après avoir mesuré les individus de la seconde expérience que les individus sélectionnés étaient plus grand de plus de 100 µm que ceux de la première expérience suggérant une influence de la sélection de

l'expérimentateur. Cette différence souligne la difficulté à comparer directement les effets des deux expériences surtout quand il s'agit d'interpréter les variations de croissance. Dans la suite de cette discussion nous comparerons les effets différentiels de l'hypoxie et de l'anoxie mais le lecteur doit garder en tête que les paramètres énumérés précédemment rendent la comparaison parfois délicate.

Avant de discuter des effets de l'hypoxie et de l'anoxie sur *Melonis barleeanus* nous déterminons ici si cette espèce est capable ou non d'accumuler des nitrates dans sa cellule i.e. si les concentrations en nitrates intracellulaires sont supérieures aux concentrations du milieu (50 µM dans les aquariums avec nitrates ; cf. paragraphe 2.2). Cela permet de déterminer si les nitrates sont présents dans la cellule par simple équilibre avec le milieu ou si les foraminifères maintiennent ces nitrates dans leur cellule contre les gradients chimiques. Piña-Ochoa et al. (2010a) ont établi que tous les individus présentant des concentrations > 0.1 mM ou plus de 10 fois la concentration maximale du milieu peuvent être considérés comme accumulant des nitrates. Parmi l'ensemble des individus testés la concentration non-nulle la plus faible mesurée est de 1.4 mM environ 30 fois la concentration en nitrates dans l'eau des aquariums avec nitrates (50 µM). L'ensemble des individus *M. barleeanus* présentant des nitrates dans leur cellule peuvent ainsi être considérés comme accumulant les nitrates dans leur cellule.

4.3. Effets des conditions expérimentales sur *Melonis barleeanus*

4.3.1. Effet des conditions oxiques sur *Melonis barleeanus*

Les résultats des expériences I et II montrent qu'en condition oxygénée, le taux de survie de *Melonis barleeanus* est très élevé (Figure 55) confirmant la bonne acclimatation de cette espèce aux conditions expérimentales.

Lorsque les conditions sont oxygénées, nous avons observé une augmentation du diamètre maximum de *M. barleeanus* de 80 microns en 56 jours d'expérience (expérience I, Figure 56). C'est la première fois que la croissance de cette espèce a pu être mise en évidence et quantifiée en conditions expérimentales. Néanmoins, lors d'une expérience durant laquelle du sédiment prélevé dans le Skagerrak est conservé en laboratoire en conditions oxygénées sans apport de nourriture pendant 2 ans, Alve (2010) observe une augmentation au cours du temps du nombre de *M. barleeanus* dans la fraction de taille 63-125 μ m. Cette observation suggère que cette espèce a grandi ou s'est éventuellement reproduit au cours des deux ans d'expérience. Murray (1983) a reporté que *Nonion depressulum* (espèce à test planispiralé) pouvait croître de 40 μ m durant le premier mois de sa croissance puis grandissait de 30 μ m pendant les trois ou quatre mois suivants. L'ordre de grandeur de la vitesse de *M. barleeanus* semble ainsi être proche de celui observé chez *N. depressulum*.

Lors de l'expérience I, d'autres espèces ont également été étudiées (Geslin et al., 2014).

Des juvéniles d'*Ammonia tepida* ont aussi montré une croissance en grandissant d'une trentaine de micromètres dans le même intervalle de temps (56 jours). La troisième espèce testée *Bulimina marginata* a montré aussi une capacité à grandir dans ces conditions avec un allongement d'environ 100 microns (Geslin et al., 2014). Il semblerait ainsi que lors de la croissance, le diamètre maximum des espèces spiralées (*A. tepida* et *M. barleeanus* respectivement trocho- et plani-spiralées) augmente plus lentement que l'allongement des espèces bisériées (*B. marginata*). Cette différence est due au fait que les loges sont formées les unes après les autres suivant un enroulement chez les espèces spiralées quand les loges se superposent les unes aux autres chez les espèces bisériées. L'ajout d'un même nombre de nouvelles loges affecte donc plus l'élongation des espèces bisériées que le diamètre des espèces trochospiralées.

Lors de l'expérience II nous n'avons pas observé de croissance de *Melonis barleeanus* en conditions oxiques (les données d'*Ammonia tepida*, qui a été également utilisée lors de l'expérience II ne sont pas à ce jour disponibles). Les individus de l'expérience II étaient initialement de taille supérieure à ceux utilisés lors de l'expérience I. De nombreux auteurs reportent que la vitesse de croissance est plus faible chez les individus de grande taille que chez les individus de petite taille (Murray, 1983; Stouff et al., 1999b). Dans nos expériences, la taille finale des individus de l'expérience I est d'en moyenne 40 μ m inférieure à la taille initiale lors de l'expérience II. Ces résultats suggèrent

que les individus de l'expérience II – contrairement aux individus de l'expérience I - ne présentent pas de croissance soit en raison du fait que leur taille initiale est proche de leur taille maximale, soit à la vitalité plus faible de ces individus (en raison de la différence de temps de conservation des échantillons).

Au cours de l'expérience I, la quasi-totalité des individus testés présente des nitrates dans leur cellule (Figure 58). Il semblerait qu'au cours du temps la quantité de nitrates reste stable autour d'une moyenne d'environ 50 pmol/cellule et que la concentration diminue légèrement. Le fait que la concentration diminue au cours du temps pourrait être dû au fait que la concentration est calculée en divisant la quantité de nitrates par le biovolume de l'individu. La concentration est donc dépendante de la quantité de nitrates et de la taille des individus. Or, la taille de *M. barleeanus* a augmenté au cours de l'expérience (Figure 56) sans que la quantité de nitrates ne change (Figure 58) ce qui explique la diminution de la concentration. Lors de l'expérience II seul 1 des 15 individus testés présente des nitrates dans sa cellule à une concentration de 3 mM. Les valeurs observées lors de cette expérience sont plus fortes que celles présentées dans Piña-Ochoa et al. (2010a) où les individus provenant de la Mer du Nord accumulent en moyenne à 0.6 mM (soit entre 1 et 27 pmol/cellule). Deux individus du Delta du Rhône ne contiennent pas de nitrates dans leurs cellules (Piña-Ochoa et al., 2010a). Des mesures de nitrates intracellulaire précédentes présentaient également une forte variabilité entre individus d'une même espèce (Risgaard-200

Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010b). Nous pouvons estimer que l'ordre de grandeur de la variabilité intra-spécifique observée dans la présente expérience est essentiellement le même que celui présenté dans la littérature. Il semblerait que la capacité à accumuler les nitrates a varié entre les deux expériences, les individus de l'expérience II ont peut être utilisé ou relargué leurs nitrates au cours de l'année de conservation en laboratoire avant le démarrage de l'expérience.

Dans les conditions oxygénées, nous avons également observé différents signes d'activité. La bioturbation observée à la surface du sédiment dans chaque cristalliseur (Figure 60) et le fait que les individus étaient également fréquemment retrouvés dans des kystes de nutrition suggèrent que *Melonis barleeanus* est actif lorsque le milieu est bien oxygéné.

Toutes ces indications montrent que *Melonis barleeanus* survit bien en conditions oxygénées et est même capable de grandir dans ces conditions. Cette espèce est assez rarement reportée en grand nombre dans les couches superficielles du sédiment et elle est généralement présente dans un microhabitat endopélique intermédiaire (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002). Cette espèce a néanmoins été observée à l'interface eau sédiment (Mackensen et al., 2000; Szarek et al., 2007; Koho et al., 2008; Duros et al., 2011). Plusieurs cas de migration verticale de *M. barleeanus* depuis des profondeurs intermédiaires vers la surface ont été observés en réponse à 1) un bloom de producteurs primaires dans le Golfe de Gascogne (Fontanier et al., 2003), 2) en réponse aux changements

d'oxygène et de matière organique (Schmiedl et al., 2000) ou 3) en réponse à l'ajout d'une espèce d'algue (Heinz et al., 2002) dans le Golfe du Lion. Dans le canyon de Nazaré, au site auquel nos échantillons ont été prélevés, *M. barleeanus* présente également une distribution endopélique intermédiaire avec un pic de densité au dessus de la profondeur de pénétration d'oxygène avec néanmoins de fortes densités à l'interface eau sédiment (Phipps, 2012). Ainsi, les individus prélevés à notre site d'étude sembleraient présenter une préférence pour les microhabitats hypoxiques mais sont néanmoins présents en grande quantité dans les microhabitats oxygénés.

Melonis barleeanus ayant de forts taux de survie et étant capable de grandir dans des conditions oxygénées, nous pouvons nous demander pourquoi cette espèce est observée préférentiellement dans des couches hypoxiques du sédiment. La vie en profondeur dans le sédiment pourrait simplement lui permettre de coloniser une niche écologique moins concurrentielle. En effet, les densités de foraminifères étant importantes dans les niveaux superficiels du sédiment, la compétition inter-spécifique pour l'accès à la matière organique est plus faible dans les microhabitats endopéliques intermédiaires ou profonds qu'à l'interface eau-sédiment. De plus, différentes observations de données micropaléontologiques et écologiques suggèrent que *M. barleeanus* pourrait présenter une préférence pour la matière organique altérée (Caralp, 1989a) et ou pour les bactéries dégradant cette matière organique réfractaire (Fontanier et al.,

2002, 2005) essentiellement présentes en profondeur dans le sédiment.

4.3.2. Effet de l'hypoxie sur *Melonis barleeanus*

Les résultats de l'expérience I indiquent qu'il n'y a pas de différence de la variation du taux de survie de *Melonis barleeanus* entre les conditions oxygénées et les conditions hypoxiques. Ainsi, en hypoxie (à la fois en HypN et Hyp) le taux de survie montre une légère diminution avec le temps (Figure 54).

De même, en hypoxie les individus montrent une croissance de la taille du test au cours des 56 jours d'expérience. Cette différence n'est pas significativement différente de la croissance observée lorsque les conditions sont bien oxygénées (Figure 56). Ces résultats indiquent que la survie et la croissance de *M. barleeanus* ne sont pas affectées par les conditions hypoxiques. Ces observations sont similaires à celles faites sur *Ammonia tepida* alors que *Bulimina marginata* montre une croissance plus faible en hypoxie que lorsque les conditions sont oxygénées (Geslin et al., 2014). De plus, les concentrations et quantité de nitrates intracellulaires ne sont pas différentes de celles observées lorsque les conditions sont bien oxygénées et ne montrent pas de changement majeur au cours du temps (bien que la concentration semble diminuer avec le temps en OxN_I ; Figure 58) indiquant que *Melonis barleeanus* ne consomme pas ses nitrates intracellulaires lorsque les conditions sont hypoxiques (et avec quelques jours d'anoxie). Ces résultats suggèrent que cette espèce n'a pas besoin de dénitrifier pour sur-

vivre en hypoxie ce qui semble être logique puisqu'en hypoxie de l'oxygène est présent, les foraminifères n'ont donc pas besoin de consommer leurs nitrates.

Des mesures de taux de respiration d'oxygène montrent que *M. barleeanus* présente un métabolisme aérobie de la même intensité que celui d'autres espèces de foraminifères benthiques (cf. Chapitre 4). Les foraminifères benthiques présentent à taille similaire des taux de respiration plus faibles que d'autres groupes de la méiofaune benthique (Geslin et al., 2011). La faible quantité d'oxygène dissous présent dans l'eau (< 63µM) semble ainsi être suffisante pour assurer les besoins métaboliques de *Melonis barleeanus* et permettrait d'expliquer son fort taux de survie en hypoxie.

Ces indications sont confirmées par les observations de la distribution de cette espèce sur le terrain. *Melonis barleeanus* est trouvé depuis les plateaux continentaux aux milieux profonds (de 300 à plus de 3000 m) (Caralp, 1989a; Fariduddin et Loubere, 1997; Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002; Alve, 2010) ainsi que dans certains canyons sous-marins (e.g. Koho et al., 2008; Duros et al., 2011; Phipps et al., 2012). En règle générale, les eaux de fonds dans ces milieux meso à eutrophiques sont bien oxygénées. L'analyse de la distribution verticale montre que cette espèce présente un microhabitat de type endopélique intermédiaire (Jorissen et al., 1998; Jorissen, 1999a; Mackensen et al., 2000; Heinz et al., 2001, 2001, 2002; Fontanier et al., 2002, 2005, 2008; Ernst et van der Zwaan, 2004; Szarek et al., 2007; Duros et al., 2011).

Melonis barleeanus vit ainsi à des profondeurs dans le sédiment comprises entre le premier centimètre (où l'essentiel de l'oxygène est consommé) et la profondeur de pénétration d'oxygène (où il n'y a plus d'oxygène). Cette espèce vit donc essentiellement dans la zone hypoxique du sédiment. Il a parfois été mis en évidence que la distribution verticale de *M. barleeanus* pouvait varier en fonction de la qualité et de la disponibilité de la matière organique (Linke et Lutze, 1993; Schönfeld, 2001; Heinz et al., 2002; Fontanier et al., 2003) et de la migration des fronts d'oxydo-reduction (Schmiedl et al., 2000; Szarek et al., 2007; Koho et al., 2008; Mojtafid et al., 2010a). Il semblerait néanmoins que *Melonis barleeanus* soit essentiellement une espèce peu mobile (Mackensen et al., 2000; Heinz et al., 2001; Ernst et van der Zwaan, 2004; Fontanier et al., 2005; Koho et Piña-Ochoa, 2012).

Le fait que *Melonis barleeanus* soit une espèce vivant essentiellement dans des conditions hypoxiques permet d'expliquer sa bonne résistance aux faibles concentrations en oxygène. Nos données expérimentales indiquent également que cette espèce est même capable de croître en conditions hypoxiques, mais nous n'avons pas observé de signe de reproduction. S'il est clair que *Melonis barleeanus* peut survivre et grandir en hypoxie nous n'avons pas d'indice permettant de conclure que cette espèce peut présenter un cycle de vie complet dans de telles conditions.

4.3.3. Effet de l'anoxie

Les résultats de la seconde expérience montrent que *Melonis barleeanus* survit aussi bien après 69 jours d'anoxie que lorsque le milieu est oxygéné (Figure 54). De même, ni la taille des individus ni la quantité de nitrates intracellulaire ne diffèrent entre les milieux oxygénés et anoxiques (Figure 56 et Figure 58). Ces résultats suggèrent que la survie, la croissance et la quantité de nitrates de *Melonis barleeanus* ne sont pas affectées par l'anoxie.

Les différentes études de la distribution verticale de cette espèce montrent qu'elle est essentiellement présente vivante dans un microhabitat intermédiaire (soit dans des conditions hypoxiques ou oxiques) mais également en nombre non négligeable dans sous la profondeur de pénétration d'oxygène (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002; Mojtahid et al., 2010a). Cette espèce est donc naturellement présente dans des microenvironnements anoxiques. Cette capacité à survivre en anoxie a été confirmée lors d'une expérience basée sur du sédiment prélevé à 550 m dans le Golfe de Gascogne incubé en anoxie avec et sans ajout de matière organique (Ernst et van der Zwaan, 2004). Les résultats de cette étude montrent qu'au cours des 20 jours d'expérience *M. barleeanus* survit à l'absence d'oxygène dissous dans les eaux porales et ne présente pas de migration verticale contrairement à ce qui est observé chez des espèces sensibles à l'anoxie (*Bolivina alata*, *Clavulina cylindrica* et *Uvigerina elongatastriata*; (Ernst et van der Zwaan, 2004). Dans ces études basées sur la discrimination de la vita-

lité avec du rose Bengale (qui tendrait à des surestimations de l'abondance en anoxie, cf. discussion dans le Chapitre 1), il apparaît clairement que cette espèce est capable de survivre plus de deux mois dans des conditions anoxiques.

Nous n'avons pu mettre en évidence de croissance de *M. barleeanus* en anoxie (à noter que lors de cette expérience nous n'avons pas observé de croissance dans l'aquarium oxygéné non plus, cf paragraphe 4.1). Il semblerait qu'une faible part des individus utilisés dans cette expérience contenaient des nitrates et en faible quantité (quelles que soient les conditions). En raison de sa distribution particulière, *Melonis barleeanus* a été précédemment décrite comme espèce pouvant potentiellement dénitrifier (Koho et Piña-Ochoa, 2012). Nous avons ainsi tenté de vérifier la capacité de cette espèce à dénitrifier.

Nous avons ainsi fait 5 tests de dénitrification sur des individus de plusieurs origines. Un test a été fait sur 6 individus prélevés dans le sédiment conservé au laboratoire et a eu lieu environ 3 mois après la fin de l'expérience I. Les données de nitrates intracellulaires indiquent que la quasi-totalité des foraminifères utilisés lors de l'expérience I présentaient des nitrates dans leurs cellules. Nous pouvons supposer que c'était également le cas de ces 6 individus. Le test de dénitrification ne nous a pas permis de détecter de production de protoxyde d'azote. Ce résultat suggère que ces individus pour lesquels nous supposons qu'ils accumulent les nitrates dans leurs cellules ne sont pas capables de réduire

ces nitrates par dénitrification. Quatre autres mesures ont été effectuées sur des foraminifères extraits de l'expérience II (à T4-49j ; individus provenant d'OxN, AxN et Ax). Les mesures de quantité de nitrates intracellulaires montrent que lors de cette expérience, seuls quelques individus présentent des nitrates dans leurs cellules. Ces individus ne disposant pas du réactif nécessaire à la dénitrification il semble ainsi logique de voir que ces individus ne sont pas capables de dénitrifier. Nous pouvons alors nous demander comment est ce que ces individus font pour survivre en anoxie. Nous avons émis l'hypothèse que *M. barleeanus* pourrait éventuellement utiliser directement les nitrates présents dans l'eau interstitielle sans les accumuler au préalable. Une des 4 mesures faites sur les individus de l'expérience II a été faite avec la présence de nitrates dans la chambre de mesure. Malgré la présence de nitrates dans le milieu anoxique, ces individus n'ont pas produit de protoxyde d'azote dans des quantités détectables (la limite de détection de la méthode est discutée dans le Chapitre 4). L'ensemble de ces résultats montrent que les spécimens que nous avons analysés ne sont pas en mesure de dénitrifier. Cette observation pourrait potentiellement être extrapolée à l'échelle de l'espèce et nous laisser penser que *Melonis barleeanus* ne peut pas réduire les nitrates contenus dans la cellule d'une partie des individus par dénitrification. Ces limites posées nous allons, pour faciliter la clarté de cette discussion, désormais considérer que *M. barleeanus* n'est pas capable de dénitrifier. Cela impliquerait que cette espèce utilise un autre mécanisme pour

vivre (ou survivre) en anoxie. La capacité à dénitrifier pourrait ne pas être le seul mécanisme qui permet aux foraminifères benthiques de survivre à l'anoxie. Nous discuterons dans le chapitre suivant du rôle potentiel des nitrates dans la survie en anoxie (Chapitre 4).

De plus, lors de l'ouverture de chaque pot aux différentes périodes d'incubation nous avons pu observer que le sédiment déposé dans chacun des pots était nettement plus perturbé dans les pots issus de l'aquarium OxN_{II} que ceux issus des aquariums anoxiques qui ne présentaient qu'une très faible bioturbation (Figure 60). De même, les individus de l'aquarium OxN_{II} lors du test de vitalité au FDA exhibaient une fluorescence plus intense que celle des individus incubés en anoxie (observations visuelles non-quantifiées). Dans le chapitre suivant (Chapitre 4) nous discutons également du cas d'*Ammonia tepida*, espèce pour laquelle nous avons identifié un arrêt de la mobilité après environ 36 h d'anoxie. De même, dans une expérience d'incubation en anoxie de sédiment du Drammensfjord, Bernhard et Alve (1996) montrent une diminution d'un indicateur de l'activité métabolique (la concentration d'ATP) en anoxie chez *Adercotryma glomeratum* et *Psammosphaera bowmanni*. Il semble donc que *M. barleeanus* – comme d'autres espèces – tende à réduire son activité en anoxie. Nous ne sommes pas en mesure d'expliquer par quel mécanisme *Melonis barleeanus* est capable d'abaisser son niveau d'activité afin - apparemment - de survivre à l'anoxie.

4.3.4. Distribution verticale de *Melonis barleeanus*

Les résultats de cette expérience montrent que *Melonis barleeanus* est aussi bien capable de survivre dans des milieux oxygénés, hypoxiques et anoxiques avec ou sans nitrates. Ces trois conditions correspondent aux trois microenvironnements dans lesquels cette espèce est trouvée. En effet, cette espèce est essentiellement présente en profondeur dans un environnement hypoxique mais on la retrouve parfois plus profondément en anoxie sous l'OPD ou encore à l'interface eau sédiment dans un milieu oxique. Cette présence préférentielle dans un microhabitat hypoxique s'explique par le fait que cette espèce est capable de survivre longtemps à l'hypoxie.

Au dessus de ce microhabitat sa présence n'est pas limitée par la présence d'oxygène puisqu'elle survit bien lorsque le milieu est saturé en oxygène mais par la compétition pour la nourriture fait par les nombreuses autres espèces vivant à l'interface eau sédiment. Sous ce microhabitat endopélique intermédiaire la présence de cette espèce n'est pas limitée directement par le manque d'oxygène puisque qu'elle est capable de survivre plus de 69 jours en anoxie. Sa présence dans des microhabitats anoxiques semble être limitée indirectement par ce manque d'oxygène parce que *M. barleeanus* n'est apparemment pas capable de dénitrifier (malgré sa capacité à accumuler les nitrates) l'obligeant vraisemblablement à réduire fortement son activité. Sous l'OPD sa distribution peut également être limitée par la pré-

sence d'espèces endopélique profondes capables de dénitrifier comme *Globobulimina* spp. ou *Bolivina* spp.. La capacité de dénitrifier de ces espèces leur permet d'avoir une activité suffisante pour supporter au minimum leurs besoins en alimentation (Piña-Ochoa et al., 2010b; Koho et al., 2011) et peut être également la croissance ou la reproduction.

4.4. Différences entre hypoxie et anoxie

Ces expériences ont permis de mettre en évidence que *Melonis barleeanus* survit aussi bien lorsque les conditions sont oxygénées que lorsque le milieu est hypoxique ou anoxique. Cette espèce présente néanmoins un comportement qui semble varier en fonction de la concentration en oxygène du milieu. Nos données montrent que lors de l'expérience I, *M. barleeanus* a grandi dans les milieux oxygénés et hypoxiques. La seconde expérience ne nous a pas permis de mettre en évidence la croissance de *M. barleeanus* en conditions oxygénées et en anoxie. De plus, les observations de l'activité des individus indiquent que lorsque l'oxygène vient à manquer ils ne se déplacent plus.

Chez les foraminifères benthiques nous pouvions nous attendre à observer une différence entre le comportement en milieu hypoxique et en anoxie. En effet, les foraminifères benthiques présentent des taux de respiration relativement faibles lorsqu'on le compare à celui d'autres groupes de la méiofaune benthique (Geslin et al., 2011). Ce métabolisme aérobie faible leur permettrait de respi-

rer de l'oxygène même lorsque la concentration tend à être faible. Des données extraites de Moodley et al. (2008) récemment publiées par Braeckman et al. (2013) montrent que lorsqu'emprisonnés dans un système clos, les foraminifères benthiques sont capables de consommer la totalité de l'oxygène piégé à la fermeture. Les auteurs notent en revanche que les taux de respiration diminuent avec la concentration en oxygène. Ces résultats montrent que ces organismes sont capables de consommer de l'oxygène jusqu'à épuisement du stock et ce même lorsque les conditions deviennent hypoxiques. La vitesse de consommation montre néanmoins une diminution lorsque les conditions deviennent hypoxiques. Ces résultats confirment le fait que leur métabolisme aérobie diminue mais reste actif lorsque la concentration en oxygène du milieu est faible. Nous pouvons nous attendre à ce que certaines espèces soient capables de passer d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie lorsque l'oxygène commence à manquer.

Le seuil de concentration d'oxygène auquel les foraminifères benthiques passent de la respiration de l'oxygène à la dénitrification n'a pas été identifié précédemment (nous savons seulement qu'ils sont capables de dénitrifier en anoxie). Nous allons donc nous intéresser à d'autres organismes anaérobies facultatifs. Des analyses géochimiques de la colonne d'eau des OMZ (Zones à Oxygène Minimum) révèlent que la transition entre le métabolisme aérobie et dénitrification des procaryotes pélagiques se fait lorsque la concentration en oxygène est entre 0.7 et 20 μM

(Yakushev et Neretin, 1997; Helly et Levin, 2004; Middelburg et Levin, 2009). Nous pouvons nous attendre à ce soit à des concentrations proches de ces valeurs seuils que les foraminifères qui en ont la capacité commencent à dénitrifier. Bien que la dénitrification produise moins d'énergie que la « respiration oxygène » (Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010a) elle permettrait aux organismes de maintenir une certaine activité en anoxie.

Nous nous attendions donc à ce que les foraminifères benthiques survivent facilement à l'hypoxie en raison de leur métabolisme aérobie relativement faible et qu'en anoxie, des espèces incapables de dénitrifier ne puissent pas survivre longtemps. Les résultats de survie et de dénitrification de *Melonis barleeanus* ne supportent pas cette hypothèse puisque cette espèce qui ne semble pas être capable de dénitrifier est néanmoins capable de survivre à 69 jours d'anoxie. Une telle résistance à l'anoxie chez des espèces n'étant pas capable de dénitrifier a également été mise en évidence dans l'expérience d'incubation de 10 mois en anoxie menée en Mer Adriatique (cf. Chapitre 1). Le fait que ces espèces soient capables d'accumuler les nitrates sans les utiliser via dénitrification suggère que soit ce stock de nitrates n'intervient pas dans la survie et le métabolisme anaérobie, soit il est utilisé par dénitrification à des taux non détectables, soit il est utilisé par d'autres voies métaboliques de réduction anaérobie des nitrates telles que l'ammonification (cf. Chapitre 4).

Il apparait ainsi clairement que ni l'hypoxie ni l'anoxie n'ont d'effet sur la survie des foraminifères benthiques. S'il semblerait que l'hypoxie n'ait pas d'effet en raison du faible besoin en oxygène des foraminifères, l'absence totale d'oxygène dissous n'affecte pas les organismes pour des raisons encore hypothétiques. Cette expérience apporte des indices qui mettent en évidence un ralentissement voire un arrêt de l'activité de mobilité des individus en absence d'oxygène. Cet arrêt de l'activité pourrait être le mécanisme qui permet à cette espèce - apparemment incapable de dénitrifier - de survivre à l'anoxie.

5. Conclusions

Deux expériences en laboratoire ont été menées pour tester et comparer les effets de l'hypoxie et de l'anoxie sur *Melonis barleeanus*. Nous avons mis en évidence que l'hypoxie et l'anoxie n'affectent pas le taux de survie de cette espèce. De nombreuses analyses de la distribution verticale de *M. barleeanus* montrent que cette espèce colonise principalement un microhabitat endopélique intermédiaire (dans un microenvironnement hypoxique) et est parfois trouvée dans des microhabitats profonds ou de surface (dans des microenvironnements respectivement anoxique et oxygéné). Nos expériences confirment ainsi que cette espèce peut survivre dans un milieu quelle que soit la concentration en oxygène. Les résultats suggèrent ainsi que la présence préférentielle de cette espèce dans un microenvironnement hypoxique n'est pas due à des limites dans la survie dans des envi-

ronnements oxygénés ou anoxiques. Cette distribution préférentielle permettrait hypothétiquement à cette espèce d'éviter la compétition avec les espèces de surface dans les habitats oxygénés et avec les espèces profondes dans les habitats anoxiques.

Au cours de la première expérience, nous avons pu observer de la croissance de *Melonis barleeanus* en conditions oxygénées, hypoxiques avec nitrates et hypoxiques sans nitrates. Il n'y a pas de différences entre les taux de croissance observés en conditions oxygénées et en hypoxie. L'hypoxie ne semble donc pas affecter la capacité à grandir et calcifier de cette espèce. Le fait que *Melonis barleeanus* présente un fort taux de survie et soit capable de calcifier en conditions contrôlées - notamment en hypoxie - offre un fort potentiel d'étude en paléocéanographie. En effet, cette espèce pourrait ainsi être utilisée en laboratoire pour calibrer des proxies de paléo-oxygénation.

Lors de la seconde expérience, nous n'avons pas pu mettre en évidence de croissance de *M. barleeanus* quelles que soient les conditions d'incubation (en milieu oxygéné ou anoxique). Cette seconde expérience s'est déroulée un an après la première, les individus utilisés n'étaient peut-être plus dans des conditions physiologiques favorables à leur croissance. Ces individus étaient également de taille supérieure à ceux utilisés lors de la première expérience. Cette différence de taille initiale peut également être à l'origine de cette absence de croissance. Dans la seconde expérience nous n'avons donc pu mettre en évidence de différences de croissance et de calci-

fication entre les milieux oxygénés et les milieux anoxiques. Nous ne sommes également pas en mesure de conclure quant à une différence de croissance entre les milieux hypoxiques et les milieux anoxiques.

Les deux expériences que nous avons menées montrent que de nombreux individus de *Melonis barleeanus* accumulent des nitrates dans leurs cellules. Au cours de la première expérience un grand nombre d'individus présentent des nitrates dans des concentrations similaires quels que soient le temps et les conditions d'incubation. Cela suggère que *Melonis barleeanus* ne consomme pas de nitrates lorsque l'hypoxie se développe dans le milieu. Lors de la seconde expérience, une très faible part des individus analysés présentent des nitrates dans leur cellule et cette quantité ne semble pas varier ni avec le temps ni avec les conditions expérimentales. La différence dans le nombre d'individus accumulant des nitrates dans leur cellule entre les deux expériences et le fait que ces deux expériences ont eu lieu à un an d'écart suggère qu'au cours de leur conservation en laboratoire les individus ont perdu – pour des rai-

sons inconnues - les nitrates qu'ils avaient accumulés.

L'ensemble des tests de mesure de dénitrification montre que les individus analysés ne peuvent pas dénitrifier. Ces tests ont été faits dans différentes conditions (incubation en anoxie avec ou sans nitrates préalable, avec ou sans nitrates dans le milieu de mesure) et les résultats suggèrent que cette espèce qui peut accumuler des nitrates dans sa cellule n'est pas capable de les réduire par dénitrification. Dans le chapitre suivant nous discuterons des métabolismes anaérobies alternatifs que cette espèce pourrait utiliser pour survivre en anoxie. Les observations de la bioturbation induite par la mobilité de *M. barleeanus* à la surface du sédiment suggèrent qu'après quelques jours d'anoxie les individus arrêtent de se déplacer. Cette observation pourrait être expliquée par une réduction voire un arrêt de l'activité métabolique des organismes en anoxie. Cette piste sera également étudiée et discutée dans le chapitre suivant traitant des métabolismes des foraminifères benthiques.

Chapitre 4. Nouvelles données expérimentales pour la compréhension des métabolismes aérobie et anaérobie des foraminifères benthiques

Dans les chapitres précédents nous avons décrit la réponse des communautés et des espèces de foraminifères à l'hypoxie et l'anoxie. Nous avons pu mettre en évidence que certaines espèces survivent aussi bien en hypoxie ou en anoxie qu'en milieu oxique. Nous nous intéressons ainsi dans ce chapitre au métabolisme aérobie des foraminifères benthiques afin d'identifier notamment le rôle joué par ces organismes dans l'ensemble de la respiration benthique. Afin de comprendre comment les foraminifères survivent en anoxie, nous nous intéressons dans une seconde partie à leur métabolisme anaérobie.

Dans ce chapitre, nous compilons les données de respiration d'oxygène, d'accumulation de nitrates et de dénitrification acquises lors de cette thèse. Certaines données ont été présentées et analysées individuellement dans les chapitres précédents. L'ensemble de ces données ainsi que des nouvelles données sont analysés et présentés ensemble pour identifier les paramètres qui influencent les métabolismes aérobie et anaérobie des foraminifères benthiques.

Partie I. Analyse du métabolisme aérobie

1. Introduction

Les foraminifères benthiques colonisent de nombreux environnements marins des milieux saumâtres aux milieux profonds et abyssaux (Murray, 2006). Ces organismes représentent une part importante de la biomasse benthique (Gooday, 1986). Les foraminifères benthiques semblent avoir, à taille comparable, des taux de respiration plus faibles que d'autres groupes de la méiofaune benthique comme les Ciliés, les Flagellés, les Copépodes et les Nématodes (Figure 61 ; Geslin et al., 2011). Néanmoins, d'après certains auteurs, ils jouent un rôle important dans la minéralisation aérobie rapide du carbone organique fraîchement déposé (> 25% du Carbone assimilé par les organismes > 300 μm à 2170 m de profondeur au large de l'Espagne ; Moodley et al., 2002). Dans des milieux pour lesquels,

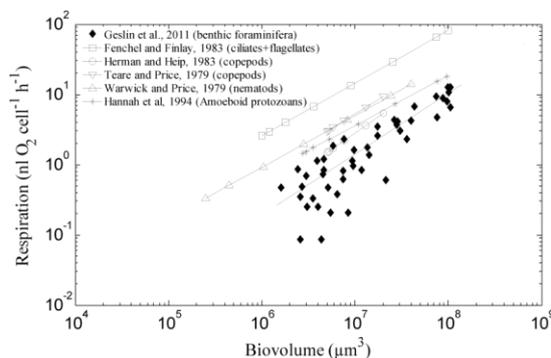


Figure 61- Taux de respiration (nL O₂/individu/h) en fonction du biovolume (μm^3) pour les différents groupes de la méiofaune. Modifié d'après Geslin et al. (2011).

le nombre de foraminifères, éventuellement leurs espèces et leur taille sont connus il est possible d'estimer le taux de respiration de l'ensemble de la population de foraminifères. En rapportant ce taux de respiration de la population de foraminifères au taux de consommation d'oxygène benthique total il est possible d'estimer la contribution des foraminifères à la respiration benthique. Ainsi, les premières estimations effectuées à 4 sites d'étude montrent que la part de la respiration aérobie benthique que l'on peut attribuer aux foraminifères varie entre 0.5 et 2.5 % (Geslin et al., 2011).

Pour pouvoir décrire et comprendre au mieux la contribution des foraminifères benthiques à la minéralisation aérobie certains auteurs se sont intéressés aux paramètres qui influencent la variabilité inter- et intra-spécifique de la respiration aérobie.

Comme chez les autres organismes de la méiofaune benthique, les taux de respiration des foraminifères semblent essentiellement être liés au volume de leurs cellules (au biovolume). Une telle observation n'a pas été faite par d'autres auteurs qui n'ont vraisemblablement pas travaillé avec des organismes d'une gamme de taille suffisante (Hannah et al., 1994; Nomaki et al., 2007). Sur l'ensemble des données précédemment publiées la relation entre taux de respiration et biovolume semble être assez nette (Figure 62 ; Bradshaw, 1961; Lee et Muller, 1973; Hannah et al.,

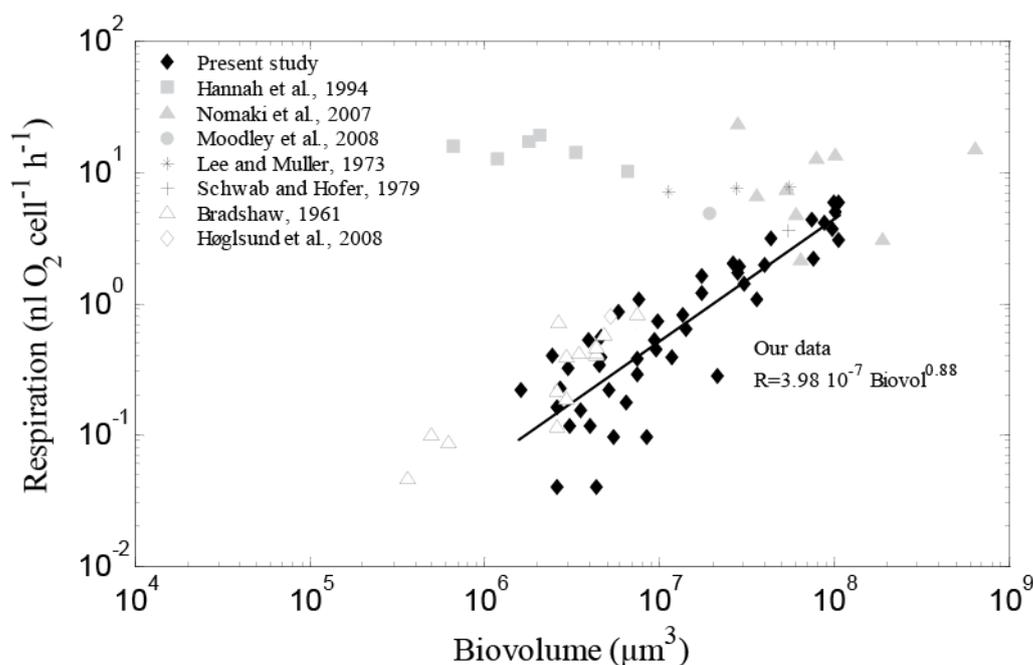


Figure 62 - Taux de respiration (nL O₂/individu/h) en fonction du biovolume (µm³) pour les foraminifères benthiques disponible dans la littérature. Modifié d'après Geslin et al. (2011).

1994; Nomaki et al., 2007; Høglund et al., 2008; Moodley et al., 2008; Geslin et al., 2011). Geslin et al. (2011) estiment à partir de leur jeu de données que cette relation est telle que $R = 3.98 \cdot 10^{-7} \text{ BioVol}^{0.88}$ (avec R exprimé en nL/individ./h et BioVol en µm³; Geslin et al., 2011).

La majorité des études précédemment citées sont réalisées sur différentes espèces vivant dans divers environnements. Les variations inter-spécifiques des taux de respiration ont essentiellement été supposées dues aux différences de taille entre espèces. Seuls (Høglund et al., 2008), comparant les taux de respiration de *Nonionella cf. stella* prélevés dans l'OMZ au large du Chili à ceux des 5 genres de foraminifères prélevés en milieu estuarien par Hannah et al. (1994) suggèrent une différence entre espèces. Les taux de respiration de l'espèce prélevée dans l'OMZ étant plus faibles que ceux des estuariennes,

les auteurs suggèrent que l'espèce vivant dans un environnement profond a un plus faible niveau d'activité que les espèces côtières (Høglund et al., 2008). Dans une autre étude, Nomaki et al. (2007) n'observent pas de différences de taux de respiration entre différentes espèces colonisant préférentiellement des microhabitats différents. Nous pouvons par exemple nous attendre à ce que les taux de respiration observés dans des milieux relativement pauvres en matière organique soient plus faibles que ceux observés dans des milieux riches. En effet, chez certaines amibes, ciliés ou flagellés il a été mis en évidence une diminution des taux de respiration avec l'affaînement des organismes (Fenchel et Finlay, 1983). A ce jour, il semble donc clairement que le taux de respiration est influencé par la taille des organismes (estimée par leur biovolume). L'influence d'autres paramètres tels que les différences entre espèces, micro-

habitat et sites n'ont à notre connaissance jamais été clairement mis en évidence chez les foraminifères benthiques.

Dans ce chapitre nous chercherons à savoir si la prise en compte de nouvelles données de respiration peut tendre à changer significativement l'estimation de la contribution des foraminifères à la respiration benthique. Pour préciser au mieux les estimations de contribution à l'activité benthique déjà existantes nous tentons également de contrôler les paramètres pouvant influencer les taux de respiration des foraminifères. Les objectifs complémentaires de ce chapitre sont ainsi être de préciser la relation entre biovolume et taux de respiration en intégrant de nouvelles données acquises. Nous chercherons également à mettre en évidence si d'autres facteurs tels que les conditions environnementales (profondeur du milieu et microhabitat) peuvent influencer les taux de respiration des foraminifères benthiques.

2. Matériel et Méthodes

2.1. Sites d'études

Dans le présent chapitre, nous analysons les résultats de deux séries de données. Les données acquises lors de cette thèse et les données publiées par Geslin et al. (2011) ; article pour lequel j'ai participé à l'acquisition des données). Un total de 20 espèces ont été analysées dans l'ensemble de ces deux bases de données. Les 20 espèces proviennent de différents sites d'échantillonnage certains interti-

daux d'autres subtidaux. Quelques cm³ de sédiment superficiel sont prélevés avec un carottier ou une benne pour les sites subtidaux et à la spatule dans les milieux intertidaux. Le sédiment prélevé est conservé dans des bouteilles d'échantillonnage dans de l'eau de mer à température et salinité in situ pendant le rapatriement au laboratoire. Au laboratoire les échantillons sont maintenus bouchon entre-ouvert (pour favoriser l'oxygénation en minimisant l'évaporation) à l'obscurité dans des incubateurs réglés à la température in situ et généralement sans ajout de source de nourriture.

Les sites échantillonnés dans la base de données Geslin et al. (2011) sont le Golfe de Gascogne, le prodelta du Rhône, l'estran de l'Île d'Yeu et la vasière de la baie de l'Aiguillon (pour plus de détails cf. Geslin et al. 2011).

Les données acquises au cours de cette thèse proviennent de différents sites de prélèvement :

1. La marge continentale du Portugal et plus précisément le Canyon de Nazaré à la station 161 (Lat. 39°35'N, Long. 9°24'O) a été échantillonné lors de la mission PACEMAKER (coordonnée par Jérôme Bonnin et Jung-Hyun Kim) le 20 Mars 2011. Cette station est à une profondeur de 918 mètres (voir Chapitre 3 et Geslin et al., 2014). Dans ces échantillons des individus de *Melonis barleeanus*, *Globobulimina* sp. et *Cibicidoides* sp. sont trouvés en nombre important.

2. Des échantillons ont été prélevés dans le Golfe de Gascogne lors des campagnes du programme FORCLIM PECH9 et PECH10 (respectivement les 2 Février et 28 Août 2011, missions coordonnées par Hélène Howa) et notamment à la station K (Lat. 43°38'N, Long. 1°43'O) localisée dans le canyon de Cap-Breton à plus de 650 mètres de profondeur. Dans ces échantillons *Globobulimina* sp., *Bulimina marginata* et *Bolivina subaenariensis* sont présents.
3. En Mer Adriatique, du sédiment de surface a été prélevé dans le Golfe de Trieste, à la station « Piran » (45°32.90'N, 13°33.00'E ; mission coordonnée par Michael Stachowitsch) à 24 mètres de profondeur (voir Langlet et al, (2013a)). Dans ces échantillons, *Bulimina aculeata* est testée.
4. A diverses reprises, du sédiment de la Baie de l'Aiguillon (45°54'N, 1°7'O) a été prélevé à pied à marée basse. A ce site *Ammonia tepida* est présente en grand nombre.

2.2. Identification et isolation des individus vivants

Une première difficulté dans la mise en œuvre des mesures de taux de respiration réside dans l'identification des individus vivants et actifs. Dans un premier temps, le sédiment échantillonné est tamisé (sur un tamis de maille de 125 ou 150 μm) avec de l'eau de mer (à température et salinité proches des conditions *in situ*). Le refus de tamis est

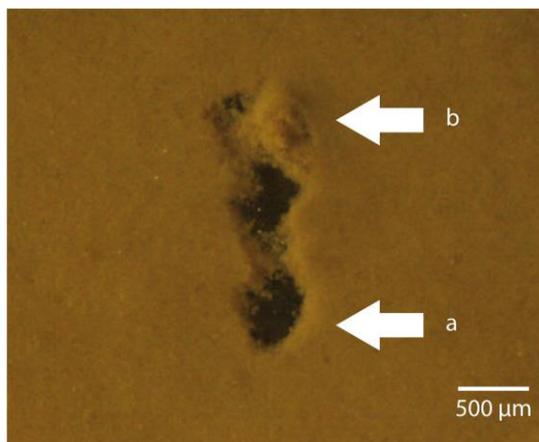


Figure 63 – Photographie au microscope optique d'un individu de l'espèce *Melonis barleeanus* (localisé à la flèche b) s'étant déplacé (de la position a initiale vers la b en environ 2h) et accumulant du sédiment fin autour de son test.

observé sous loupe binoculaire et les foraminifères présentant des signes extérieurs de vitalité sont isolés du sédiment (cytoplasme coloré, présence de kyste autour du test, etc.), piqués avec un pinceau fin puis déplacés dans une boîte de pétri. Ces individus sont placés sur une fine couche de sédiment <38 μm . Après quelques heures, certains individus se déplacent laissant une trace dans le sédiment (Figure 63). Ce sont ces individus qui sont considérés vivants et donc retenus pour nos expériences.

2.3. Détermination du biovolume des foraminifères benthiques

La coquille de chacun des individus est mesurée à l'aide d'une échelle micrométrique placée sur l'oculaire de la loupe binoculaire. Le diamètre maximal (D), minimal (d) et l'épaisseur (e) (ou la hauteur (h)) sont estimées pour chaque individu (Tableau 38). Ces mesures permettent d'estimer le volume de la coquille en fonction de la forme caractéristique de celle-ci (Équation 2). Nous considérons ensuite que le biovolume (le volume de

la cellule correspond à 75 % du volume de la coquille ; Hannah et al., 1994).

Équation 2 – Calcul du biovolume pour les foraminifères de forme Sphéroïde prolate, Demie sphère et de Cône à base plate (Hannah et al., 1994).

*Biovolume*_(Sphéroïde prolate)

$$= 0.75 \times \frac{4}{3} \times \pi \times \frac{D}{2} \times \frac{d}{2} \times \frac{e}{2}$$

*Biovolume*_(Demie Sphère)

$$= 0.75 \times \frac{1}{2} \times \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D}{2}\right)^3$$

*Biovolume*_(Cône Base Plate)

$$= 0.75 \times \frac{1}{3} \times \pi \times D \times \frac{d}{2} \times \frac{e}{2}$$

2.4. Mesure des taux de respiration d'oxygène

Quatorze nouvelles mesures de détermination du taux de respiration ont été réalisées au cours de cette thèse. Systématiquement, 3 à 10 individus vivants de la même espèce et de taille similaire sont rincés deux à trois fois dans une solution d'eau de mer artificielle (mélange d'eau Milli-Q et de sel de mer rouge, afin d'enlever un maximum de sédiment et d'ectosymbiontes). Selon le protocole établi par Høglund et al. (2008) et Geslin et

al. (2011), les individus sont ensuite placés dans une chambre en verre cylindrique d'un mm de diamètre et d'environ 1 cm de hauteur. La chambre est collée à l'intérieur d'une cuve à spectrophotométrie carrée d'un cm de côté. Elle contient de l'eau de mer artificielle à salinité 35 qui est placée dans un aquarium thermostaté (entre 12 à 14 °C ; Figure 64A). Dans cette chambre une électrode à oxygène de type Clark de pointe de 50 ou 100 µm de diamètre (Revsbech, 1989) est placée à environ 200 µm au-dessus des foraminifères. Le positionnement de l'électrode est assuré par deux loupes binoculaires dont les objectifs sont placés horizontalement et perpendiculairement l'une de l'autre. L'électrode (Unisense, Danemark) est préalablement calibrée en deux points : le zéro est obtenu à partir d'une solution d'ascorbate de sodium à 0.1 M. L'acide ascorbique est un réducteur puissant capable de fixer l'oxygène et rendre temporairement une solution préalablement saturée en oxygène complètement anoxique. Le deuxième point de calibration est obtenu à partir d'une solution d'eau de mer artificielle saturée en oxygène par bullage d'air à la température des expériences. Une fois dans la chambre de mesure, l'électrode est déplacée

Tableau 38 – Diamètre maximum, minimum et épaisseur (D, d et e en µm), forme de la coquille, espèce, nombre d'individus utilisés pour les mesures de taux de respiration oxygène (N indiv.), nombre de mesures effectuées sur l'espèce (N mesures), site d'origine et date de prélèvement des échantillons et temps entre le prélèvement et la mesure.

D (µm)	d (µm)	e (µm)	Forme	Espèce	N indiv	N mesures	Site
360	297	201	Sphéroïde Prolate	<i>Melonis barleeanus</i>	2 à 10	5	Portugal
408	373	193	Sphéroïde Prolate	<i>Cibicidoides</i> sp.	2	1	Portugal
363	250	250	Sphéroïde Prolate	<i>Globobulimina</i> sp.	2	1	Golfe gascogne (FC9K)
370	228	228	Sphéroïde Prolate	<i>Globobulimina</i> sp.	3	1	Portugal
335	NA	NA	Demie Sphère	<i>Ammonia tepida</i>	6 à 7	2	Baie de l'aiguillon
262	183	183	Sphéroïde Prolate	<i>Bulimina marginata</i>	8	1	Golfe gascogne (FC10K)
395	170	170	Sphéroïde Prolate	<i>Bulimina acuelata</i>	3	1	Piran

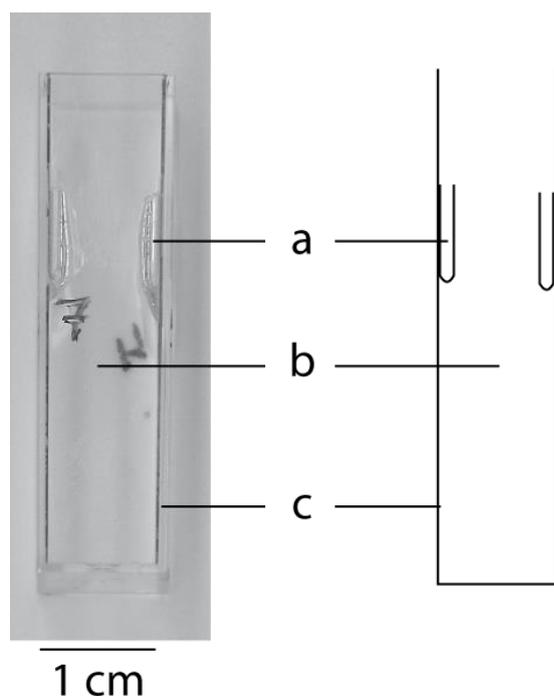


Figure 64 – Photographie et représentation schématique de la cuve de mesure des taux de respiration d'oxygène. Légende : a – chambre de mesure dans laquelle les foraminifères sont placés (1 mm de diamètre) ; b – milieu interne (eau de mer artificielle) ; c – cuve à spectrophotométrie.

verticalement vers le haut de la chambre grâce à un micromanipulateur motorisé MM-33 (Unisense, Danemark) et mesure ainsi la concentration en oxygène dissous au-dessus du foraminifère tous les 50 ou 100 μm . Cela permet de déterminer le gradient d'oxygène (dO_2/dz) induit par la respiration des organismes. A partir de ce gradient, il est possible de calculer un flux d'oxygène (J) en fonction de son coefficient de diffusion moléculaire (D_0) via la première loi de diffusion de Fick (voir Équation 1).

Équation 3 – Calcul des flux de diffusion (J en $\text{pmol}/\text{cm}/\text{s}$), en fonction du coefficient de diffusion libre de l'oxygène (D_0 en cm^2/s) et du gradient de diffusion de l'oxygène (dO_2/dz en pmol/cm^4).

$$J = -D_0 \times \frac{dO_2}{dz}$$

Équation 4 – Calcul du taux de respiration (R en $\text{pmol}/\text{ind.}/\text{j}$), en fonction du flux d'oxygène (J en $\text{pmol}/\text{cm}/\text{s}$), de la section de la chambre de mesure (S en cm^2) et du nombre d'individus mesurés (N).

$$R = \frac{J \times S \times 3600 \times 24}{N}$$

Ce flux rapporté à la section de la chambre et au nombre d'individus permet d'estimer le taux de respiration des foraminifères (R en $\text{pmol}/\text{ind.}/\text{j}$; Équation 4).

2.5. Analyse de données

Afin d'identifier et de quantifier l'effet du biovolume sur les taux de respiration des foraminifères benthiques, différents modèles linéaires (Chambers et Hastie, 1992) sont testés sur les jeux de données dont nous disposons. Nous attendons d'après la littérature que la relation entre ces deux paramètres suive une loi puissance. Ainsi la variable dépendante (le taux de respiration) et la variable indépendante (le biovolume) sont transformées par une fonction logarithmique de base 10 (\log_{10}).

Afin de tester l'effet de paramètres autres que le biovolume sur le taux de respiration (ex : effet site, effet microhabitat, etc.) il faut utiliser un estimateur du taux de respiration qui ne soit pas influencé par le biovolume de l'organisme. Dans notre étude, nous avons pris le parti d'extraire les résidus du modèle liant le taux de respiration au biovolume. Les résidus d'un modèle linéaire sont une mesure de la distance entre chaque point de mesure et le modèle estimé. Cette mesure est indépendante du biovolume de l'organisme et permet si elle est positive de dire que le point de mesure a – à biovolume équivalent – un taux de

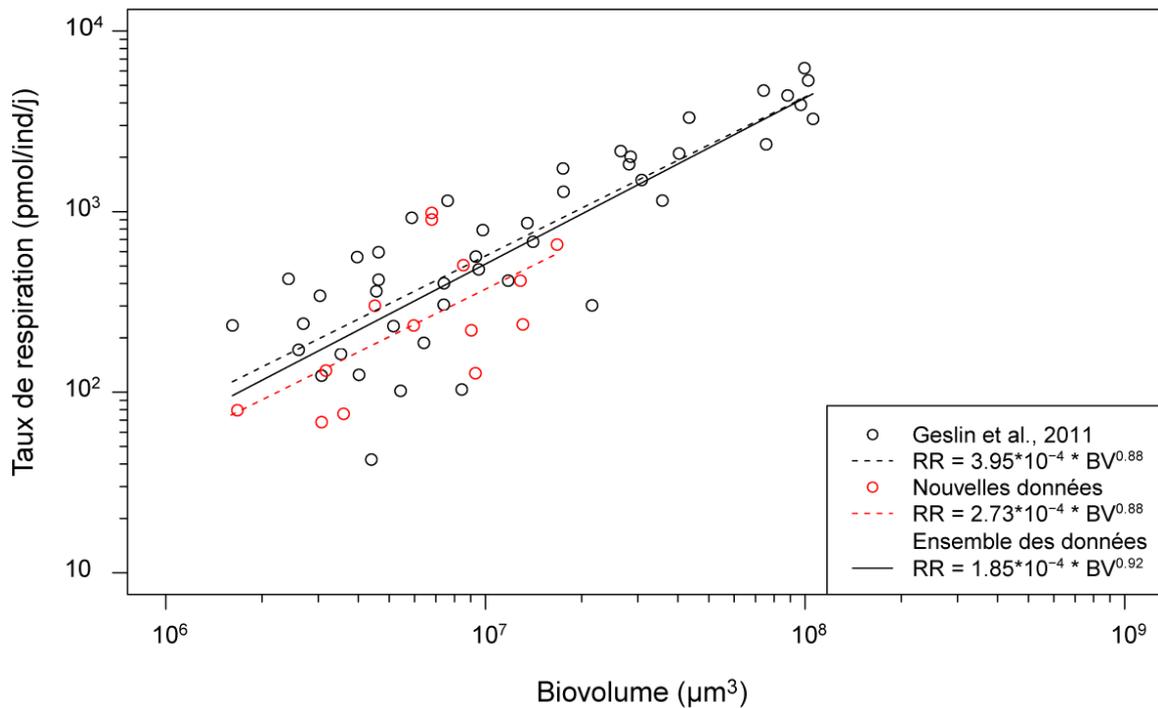


Figure 65 – Relation entre le taux de respiration (en pmol/indiv./j) et le biovolume des foraminifères pour les données publiées par Geslin et al. (2011) et les nouvelles données acquises lors de cette thèse. Les droites représentent les modèles liant le taux de respiration (RR) au biovolume (BV) pour les données de Geslin et al. (2011), les nouvelles données et l'ensemble des deux séries de données en pointillés noirs, pointillés rouges et en trait plein noir respectivement. Notez que les axes sont représentés selon des échelles logarithmiques.

respiration supérieur à celui attendu selon le modèle. De même, un résidu négatif signifie que le taux de respiration à un biovolume donné est inférieur à celui prédit par le modèle. Nous utiliserons les résidus comme une mesure de l'intensité de respiration normalisée par biovolume (et donc indépendante du biovolume).

Nous testerons de manière exploratoire l'influence potentielle du site de prélèvement des individus et du microhabitat de l'espèce analysée. L'ensemble de l'analyse de données est faite sur R v.2.14 (R Development Core Team, 2011).

3. Résultats et discussion

3.1. Relation entre taux de respiration et biovolume

Les 14 taux de respiration mesurés au cours de cette thèse varient entre 68 et 985 pmol/indiv./j pour des foraminifères de biovolume variant entre $1.7 \cdot 10^6$ et $16.7 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ (Tableau 39 ; Figure 65). Les taux de respiration estimés par Geslin et al. (2011) varient entre 42 et 6244 pmol/indiv./j pour des biovolumes variant entre $1.6 \cdot 10^6$ et $105.9 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$ (Figure 65). La gamme de variation des biovolumes présentés par Geslin et al. (2011) est ainsi plus importante que celle observée dans la nouvelle série de données. En effet, l'objectif de cet article étant d'identifier l'effet

de la taille des individus sur leurs taux de respiration, les auteurs ont fait des mesures sur une large gamme de taille. L'acquisition des nouvelles données faites durant cette thèse a pour objectif de tester des espèces particulières (ex : *Melonis barleeanus* sur laquelle nous avons effectué des expériences ; cf. Chapitre 3) à des sites d'études différents (ex : marge du Portugal, Mer Adriatique). Ces nouvelles données ont donc été acquises sur des individus de taille fréquemment rencontrés dans les études faunistiques et similaires aux tailles des individus utilisés dans les expériences (entre environ 260 et 400 μm de diamètre maximum ; Tableau 39). A biovolume similaire, les taux de respiration des deux séries de données sont du même ordre de grandeur (Figure 65).

Geslin et al. (2011) ont identifié que les taux de respiration des foraminifères benthiques augmentent avec le biovolume selon la loi puissance suivante : $RR = 3.95 \cdot 10^{-4} * BV^{0.88}$ (Avec RR : taux de respiration en $\text{pmol}/\text{ind}/\text{j}$ et BV : biovolume en μm^3 ; $df=1$ et 42 , $F=114$, $p<10^{-3}$). De la même manière, les

nouvelles données montrent également une augmentation significative du taux de respiration avec le biovolume suivant l'équation : $RR = 2.73 \cdot 10^{-4} BV^{0.88}$ ($df=1$ et 12 , $F=8.2$, $p=0.01$). Ces deux équations présentent une pente similaire mais l'ordonnée à l'origine est plus faible avec les nouvelles données qu'avec les données présentées par Geslin et al. (2011).

Ces observations confirment le fait que le biovolume des foraminifères influence positivement leurs taux de respiration. Nos résultats suggèrent également que les foraminifères analysés au cours de cette thèse présentent des taux de respiration plus faibles que ceux analysés par Geslin et al. (2011). Les foraminifères analysés dans ces deux séries de données étant d'espèces différentes et étant prélevés à différents sites nous chercherons à identifier dans les paragraphes suivants si ces paramètres jouent un rôle dans l'intensité des taux de respiration.

Lorsque les deux séries de données sont considérées ensemble, la relation liant le biovolume aux taux de respiration présente une

Tableau 39 – Taille moyenne, forme, nombre d'individus testés, biovolume moyen et taux de respiration de l'ensemble des espèces analysées à tous les sites lors de cette thèse.

Taille moyenne (μm)			Forme	N (ind.)	Biovolume (μm^3)	Taux de respiration ($\text{pmol}/\text{ind.}/\text{j}$)	Espèce	Site
D	d	e						
395	170	NA	Sphéroïde Prolate	3	4,5E+6	302	<i>Bulimina aculeata</i>	Piran
262	183	NA	Sphéroïde Prolate	8	3,6E+6	76	<i>Bulimina marginata</i>	Golfe de Gascogne
408	373	193	Sphéroïde Prolate	2	12,9E+6	415	<i>Cibicidoides</i> sp.	Portugal
339	278	155	Sphéroïde Prolate	4	6,0E+6	235	<i>Melonis barleeanus</i>	Portugal
276	219	129	Sphéroïde Prolate	4	3,2E+6	132	<i>Melonis barleeanus</i>	Portugal
425	355	280	Sphéroïde Prolate	2	16,7E+6	658	<i>Melonis barleeanus</i>	Portugal
350	302	187	Sphéroïde Prolate	7	8,5E+6	506	<i>Melonis barleeanus</i>	Portugal
409	330	254	Sphéroïde Prolate	10	13,1E+6	238	<i>Melonis barleeanus</i>	Portugal
335	NA	NA	Demie Sphère	7	6,8E+6	985	<i>Ammonia tepida</i>	Aiguillon
335	NA	NA	Demie Sphère	6	6,8E+6	905	<i>Ammonia tepida</i>	Aiguillon
457	175	80	Cone Base Plate	8	1,7E+6	80	<i>Bolivina subaenariensis</i>	Golfe de Gascogne
587	200	100	Cone Base Plate	7	3,1E+6	68	<i>Bolivina subaenariensis</i>	Golfe de Gascogne
363	250	250	Sphéroïde Prolate	2	9,3E+6	128	<i>Globobulimina</i> sp.	Golfe de Gascogne
370	228	228	Sphéroïde Prolate	3	9,0E+6	221	<i>Globobulimina</i> sp.	Portugal

pente plus forte et une ordonnée à l'origine plus faible que celles estimées précédemment (Équation 5). Dans le paragraphe 3.5, nous cherchons à quantifier l'impact de cette différence sur l'estimation de la contribution des foraminifères à la respiration benthique.

Équation 5 – Relation entre le taux de respiration (pmol/ind./jour) et le biovolume (μm^3) des foraminifères benthiques estimée à partir de l'ensemble des données (Geslin et al., 2011 et les nouvelles données).

Taux de respiration

$$= 1.85 \cdot 10^{-4} \times \text{Biovolume}^{0.92}$$

3.2. Différences spécifiques

Nous nous intéressons dans ce paragraphe aux différences de taux de respiration entre espèces. Pour cela, nous analysons les données présentées par Geslin et al. (2011) et les données acquises au cours de cette thèse.

Dans le paragraphe précédent nous avons pu observer que lorsque l'on considère toutes les espèces (12 espèces ; Tableau 40), le taux de respiration augmente avec le biovolume. Ainsi, logiquement, les espèces présentant les taux de respiration les plus importants sont les espèces qui ont un plus grand biovolume (*Allogromia* sp., *Ammonia inflata* et *Ammonia beccarii* ; Figure 66) et inversement, les plus petites espèces ont les taux de respiration les plus faibles (*Bolivina subaenariensis*, *Cassidulina carinata*, *Nonionella turgida*, *Rectuvigerina phlegeri*, etc. ; Figure 66 ; Geslin et al. (2011)).

En analysant espèce par espèce la relation entre biovolume et taux de respiration nous pouvons observer que pour la majorité des espèces de notre étude cette relation n'est pas

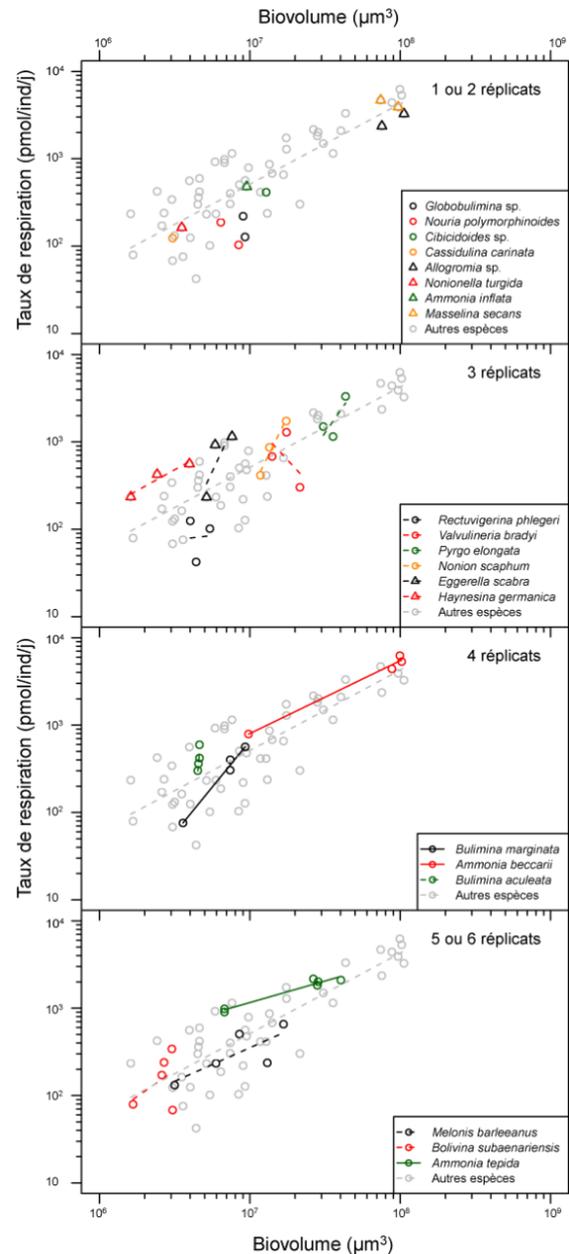


Figure 66 – Relation entre le taux de respiration (en pmol/indiv./j) en fonction du biovolume (en μm^3) pour l'ensemble des espèces étudiées. Pour faciliter la lisibilité le graphique est séparé en 4 panneaux en fonction du nombre de répliquats disponible par espèce (le nombre de répliquats augmente du panneau supérieur vers le panneau inférieur). Les traits pleins et pointillés représentent les modèles liant le taux de respiration au biovolume respectivement significatifs et non significatifs (au seuil de 5%). Notez que les axes sont représentés selon des échelles logarithmiques. La droite grise pointillée est tracée en fonction de l'Équation 5.

significative (Tableau 40 ; Figure 66). La forte variabilité des taux de respiration inter-

individuelle et la faible amplitude des variations de bio-volume empêchent de mettre en évidence un effet de taille intra-spécifique.

Le constat précédent peut-être nuancé pour trois espèces dont nous disposons d'une gamme de taille plus large et de suffisamment de répliquats. *Ammonia beccarii*, *Bulimina marginata* et *Ammonia tepida* montrent un effet significatif du biovolume sur le taux de respiration (Tableau 40 ; Figure 66). Si la pente de la relation pour *A. beccarii* est proche de celle identifiée pour l'ensemble des espèces (Équation 5), celle de *B. marginata* est plus forte et celle de *A. tepida* plus faible.

Ammonia beccarii, *Bulimina marginata* et *Ammonia tepida* ont la particularité de présenter de forts écarts entre les valeurs de biovolume maximales et minimales. Pour ces 3 espèces la relation va essentiellement être influencée par soit 1 soit 2 répliquats qui présentent un biovolume et un taux de respiration nettement plus faible(s) que les autres (qui sont relativement proches entre eux ;

Tableau 40 – Résultats de modélisation pour chaque espèce considérée. Les statistiques F et p indiquent si le biovolume (BV) a un effet significatif sur le taux de respiration (RR) au seuil de 0.05, dans ce cas les valeurs sont présentées en gras. L'intercept et la pente donnent respectivement l'ordonnée à l'origine et la pente de la relation telles que $RR = \text{Intercept} \times BV^{\text{Pente}}$.

Espèce	F	p	Intercept	Pente
<i>Rectuvigerina phlegeri</i>	0,003	0,97	4,4E+0	0,19
<i>Valvulineria bradyi</i>	0,4	0,64	16,5E+15	-1,85
<i>Pyrgo elongata</i>	1,5	0,44	335,0E-18	2,48
<i>Nonion scaphum</i>	27,7	0,12	77,2E-24	3,50
<i>Eggerella scabra</i>	2,3	0,37	107,1E-24	3,65
<i>Haynesina germanica</i>	13,6	0,17	297,7E-6	0,95
<i>Bulimina marginata</i>	124,6	0,01	1,1E-12	2,11
<i>Ammonia beccarii</i>	166,3	0,01	1,2E-3	0,83
<i>Bulimina aculeata</i>	6,1	0,13	693,6E-129	19,33
<i>Melonis barleeanus</i>	4,7	0,12	1,5E-3	0,77
<i>Bolivina subaenariensis</i>	0,7	0,48	3,4E-6	1,19
<i>Ammonia tepida</i>	79,9	0,001	404,6E-3	0,49

Figure 66). Dans une analyse de 12 répliquats d'*Ammonia tepida* dont les biovolumes varient entre $3.6 \cdot 10^5$ à $4.9 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$, Bradshaw (1961) montre une augmentation significative du taux de respiration avec le biovolume. Il semble ainsi qu'une part importante de la variabilité intra-spécifique des taux de respiration soit due aux variations de taille (de biovolume) des foraminifères benthiques.

Pour confirmer cette observation, il serait judicieux d'analyser un nombre plus important et à une plus large gamme de taille d'espèce facilement échantillonnables (telles qu'*Ammonia beccarii* et *Ammonia tepida* par exemple). Dans de telles conditions nous pourrions confirmer les résultats de Bradshaw (1961).

Les espèces les plus grandes étant les espèces ayant les plus forts taux de respiration, la variabilité inter-spécifique semble être essentiellement contrôlée par le biovolume. Dans le paragraphe suivant nous cherchons à identifier si le mode de vie des foraminifères (leur microhabitat et l'environnement dans lequel ils vivent) influence leur activité métabolique.

3.3. Analyse exploratoire des différences entre sites du métabolisme aérobie

Les taux de respiration aux différents sites d'étude sont présentés sur la Figure 67A. La comparaison des différences entre sites est rendue difficile par le fait que le taux de respiration est fortement influencé par le biovolume. Afin de s'affranchir de l'effet du biovo-

lume nous avons choisi d'analyser les résidus du modèle liant le taux de respiration au biovolume (Équation 5) permettant d'obtenir une mesure de la distance de chaque point au modèle (cf. paragraphe 2.5).

Nous pouvons observer sur la Figure 67B que les résidus diffèrent selon les sites d'études. La valeur moyenne croît selon cet ordre : marge du Portugal (918 m), Golfe de Gascogne (650 m), Delta du Rhône (24 / 25 des mesures sont issues de la station 18 de la mission BEHEMOTH ou I/K de la mission RIOMAR; 85 et 89 m), Piran (25 m), Ile d'Yeu (< 0 m) et Baie de l'Aiguillon (< 0 m). Les résidus du modèle semblent donc diminuer avec la bathymétrie (Figure 67B).

Ces différences observées entre les taux de respiration normalisés par le biovolume (résidus) entre les milieux profonds et les environnements côtiers pourraient potentiellement être dus à des biais méthodologiques. En effet, les foraminifères prélevés aux sites profonds sont analysés dans des conditions de pression nettement différentes des conditions dans lesquels ils ont été échantillonnés. De plus, contrairement aux échantillons prélevés aux sites intertidaux il est impossible de prélever des échantillons fréquemment. Ainsi, le temps entre l'échantillonnage et la mesure (et donc le temps de conservation des échantillons au laboratoire) est souvent plus important pour les échantillons issus de sites profonds que pour les individus prélevés en milieu intertidal. Ce temps de conservation des échantillons au laboratoire pourrait affecter négativement les taux de respiration. Dans la suite de cette discussion nous considérerons néan-

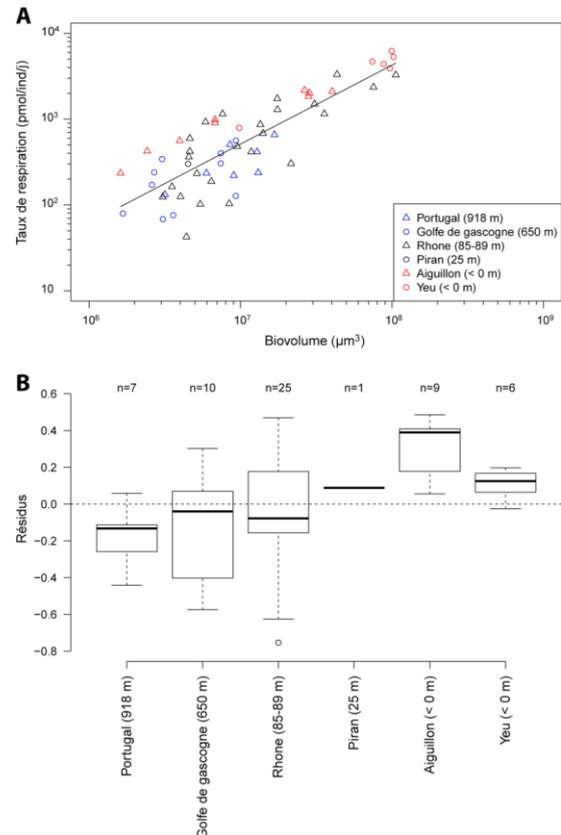


Figure 67 - Relation entre le taux de respiration et le biovolume en fonction du site d'échantillonnage (Panneau A) et résidus du modèle (Équation 5) en fonction de la profondeur du site d'échantillonnage (Panneau B).

moins que ces biais méthodologiques sont minimes et tenterons d'expliquer les différences de taux de respiration par un effet de la bathymétrie sur l'activité métabolique.

Dans le règne animal, les taux de respiration varient fortement entre groupes taxonomiques et individus de même espèce et les causes de ces variations sont largement débattues. Les contraintes géométriques (morphologiques) et environnementales, la limitation des ressources, le rôle écologique ou la demande énergétique seraient autant de sources de variation métabolique (voir review dans Seibel et Drazen, 2007). Ainsi, chez de nombreux groupes d'organismes marins (pélagiques tels que les poissons, les céphalopodes, les crusta-

cés et les méduses ou benthiques tels que certains décapodes de l'ordre Eucarida) les taux de consommation d'oxygène diminuent avec la profondeur de vie des organismes et cette diminution de l'activité métabolique des macro-organismes benthiques avec la profondeur serait liée aux changements de température et à la diminution de l'exposition aux prédateurs (Childress et al., 1990; Seibel, 2007; Seibel et Drazen, 2007). Chez les protozoaires marins, la mobilité ne représenterait qu'une part insignifiante du budget énergétique et lorsque ces organismes sont privés d'apports nutritifs, leur activité métabolique décroît rapidement (Fenchel et Finlay, 1983).

Chez les foraminifères benthiques, le dosage de la quantité d'ATP permet d'estimer l'activité métabolique des individus. Ainsi mesurée on sait que l'activité tend à diminuer en anoxie (Bernhard et Alve, 1996) mais il n'y a pas, à notre connaissance, d'observation de changement de concentration d'ATP avec la bathymétrie. Peu d'informations sont ainsi disponibles quand aux changements d'activité des foraminifères avec la profondeur d'eau. Des informations contradictoires concernant les vitesses de déplacement des espèces de milieux profonds et peu profonds sont présentées dans la littérature. Certains auteurs mettent en évidence que les espèces des milieux peu profonds se déplacent plus rapidement que les espèces des milieux très profonds (Kitazato, 1988; Hemleben et Kitazato, 1995; Bornmalm et al., 1997) quand d'autres estiment qu'il n'y a pas de différence (Groß, 2000, 2002). Ces mesures peuvent être affectées par différents paramètres tels qu'un effet

néfaste du changement de pression (pour les espèces prélevées en milieu très profond essentiellement) ou les différences de température entre sites ou entre les conditions expérimentales et les conditions in situ. D'après nos observations (non quantifiées ; lors des tests de vitalité pour identifier si les individus sont vivants), les foraminifères des milieux peu profonds se déplacent clairement plus rapidement que les espèces des milieux profonds. Cette potentielle diminution de la vitesse de déplacement avec la profondeur pourrait ainsi être liée à une activité métabolique de base réduite dans les milieux profonds.

Dans les milieux subtidaux, les flux de matière organique vers le sédiment sont liés à la bathymétrie. La matière organique provient en effet soit de la production primaire en surface ou des apports continentaux. Lors de son transport latéral ou en profondeur, une grande part de la matière organique est dégradée. La quantité de matière organique labile atteignant les fonds marins tend donc à diminuer avec la profondeur (e.g. Berger et Wefer, 1990). La quantité et la qualité de la matière organique métabolisable est donc plus importante dans les milieux peu profonds. Dans le Golfe de Gascogne par exemple, les apports de matière organique et les flux d'oxygène diminuent avec la bathymétrie (e.g. Mouret et al., 2010). La consommation globale d'oxygène est donc plus faible en profondeur ce qui semble se refléter dans les taux de respiration individuels des foraminifères benthiques. Les individus vivant dans les milieux profonds ont accès à moins de matière organique. Fenchel et Finlay (1983) ont mis en évidence une di-

minution de l'activité métabolique lors d'une privation d'accès à la nourriture. Nous pouvons donc supposer que l'activité métabolique plus faible des foraminifères benthiques dans les environnements profonds peut être expliquée par la faible quantité de matière organique.

Les milieux intertidaux de la côte Atlantique sont par définition soumis à l'action de la marée et ainsi très dynamiques. A chaque cycle de marée, les organismes benthiques subissent l'action de la houle, du dépôt ou du remaniement sédimentaire et doivent supporter la dessiccation (pour les espèces épiphytes colonisant les algues rouges fixés sur les rochers de l'estran de l'île d'Yeu par exemple) ainsi que des températures extrêmes à marée basse. L'érosion ou le dépôt sédimentaire affectent par exemple les polychètes intertidaux qui migrent verticalement en fonction du déplacement de la surface du sédiment (Zühlke et Reise, 1994). Dans de telles conditions, les individus doivent être actifs pour se maintenir dans leur milieu. Nos analyses pourraient ainsi suggérer que ces différences de dynamique sédimentaire et de conditions physico-chimiques peuvent être la cause de la différence d'activité métabolique entre les foraminifères des milieux intertidaux et les organismes des milieux subtidaux.

3.4. Analyse exploratoire de la variabilité du métabolisme en fonction du microhabitat

L'objectif de ce paragraphe est de déterminer si le microhabitat influence l'activité mé-

tabolique des foraminifères benthiques. Pour ce faire, nous nous intéresserons uniquement aux espèces échantillonnées en milieux subtidaux. En effet, dans le paragraphe précédent, nous suggérons que l'activité métabolique des individus prélevés en milieux intertidaux est supérieure à celle des individus des milieux subtidaux. De plus, en milieux côtiers et intertidaux les microhabitats sont nettement moins bien définis qu'en milieu profond (Buzas et al., 1993). Pour ces deux raisons (variabilité spatiale et difficulté à définir les microhabitats dans les milieux intertidaux) nous ne prendrons en considération dans cette analyse que les individus prélevés en milieux subtidaux.

Afin d'identifier si le microhabitat des foraminifères influence leur métabolisme aérobie, nous avons déterminé d'après la littérature le microhabitat typique des 16 espèces testées (Tableau 41; d'après Jorissen et al., 1992, 1998; Fontanier et al., 2002, 2008; Duijnsteet et al., 2003; Mojtahid et al., 2010a, 2010b). Cinq groupes de microhabitats sont définis selon les microhabitats des espèces étudiées: 1) microhabitats indéterminés, 2) microhabitat de surface, 3) surface-intermédiaire pour les espèces présentes à la fois à l'interface eau-sédiment et plus profondément dans le sédiment, 4) intermédiaire et 5) profond (Tableau 41).

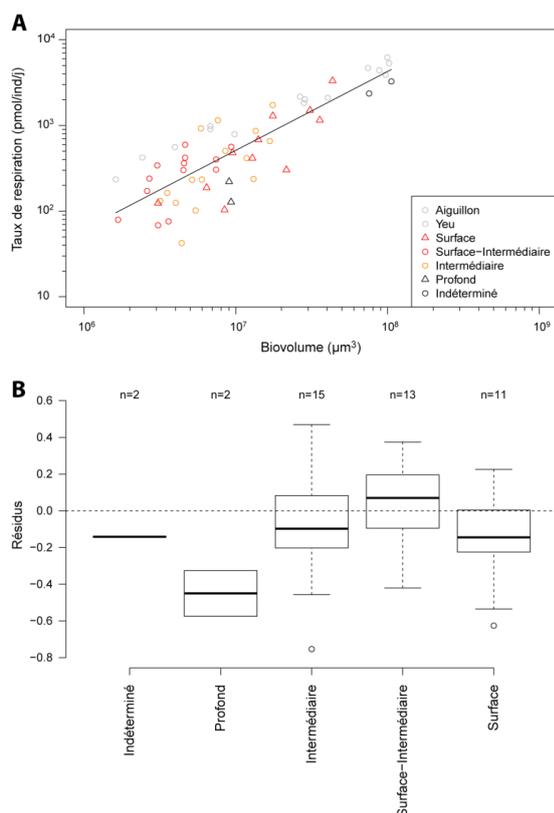


Figure 68 – Relation entre le taux de respiration et le biovolume en fonction du microhabitat des espèces (Panneau A) et résidus du modèle (Équation 5) en fonction du microhabitat (Panneau B).

Sur la représentation du taux de respiration en fonction du biovolume (Figure 68A), afin de nous affranchir de l'effet du biovolume nous avons choisi d'analyser les résidus du

modèle liant le taux de respiration au biovolume (Équation 5). La moyenne des résidus pour l'ensemble des 5 microhabitats sélectionnées est négative pour les groupes « Profond », « Indéterminé », « Surface » et « Intermédiaire » dans l'ordre croissant et positive pour le groupe « Surface-Intermédiaire » (Figure 68B). Les deux répliquats d'espèce à microhabitat profond (*Globobulimina* sp.) ont des résidus nettement inférieurs aux résidus des espèces à microhabitats intermédiaire, intermédiaire-surface et de surface qui ne présentent pas de fortes différences entre eux. Ces résultats suggèrent que les deux répliquats de l'espèce à microhabitat endopélique profond ont, à taille similaire, une activité métabolique inférieure à celle des espèces à microhabitats intermédiaire ou de surface.

Dans le paragraphe précédent nous avons mis en évidence des différences d'activité métabolique entre les foraminifères prélevés à des sites différents. Linke (1992) suggère également que l'activité métabolique varie en fonction de l'écologie des espèces de foraminifères. En effet, il a pu observer qu'une es-

Tableau 41 – Références bibliographiques permettant de déterminer le microhabitat des 16 espèces de cette étude.

Espèce	Microhabitat	Site de prélèvement	Référence bibliographique
<i>Allogromia</i> sp.	Indéterminé	Rhône	
<i>Ammonia inflata</i>	Surface	Rhône	
<i>Bolivina subaenariensis</i>	Surface-Intermédiaire	Golfe de gascogne	Mojtahid et al. 2010a
<i>Bulimina aculeata</i>	Surface-Intermédiaire	Piran, Rhône	Jorissen et al. 1998
<i>Bulimina marginata</i>	Surface-Intermédiaire	Golfe gascogne	Jorissen et al. 1998
<i>Cassidulina carinata</i>	Surface	Rhône	Fontanier et al. 2002
<i>Cibicidoides</i> sp.	Surface	Portugal	Mojtahid et al. 2010a
<i>Eggerella scabra</i>	Intermédiaire	Rhône	Jorissen et al. 1992
<i>Globobulimina</i> sp.	Profond	Golfe de gascogne, Portugal	Jorissen et al. 1998
<i>Melonis barleeanus</i>	Intermédiaire	Portugal	Fontanier et al. 2002
<i>Nonion scaphum</i>	Intermédiaire	Rhône	Mojtahid et al. 2010b
<i>Nonionella turgida</i>	Intermédiaire	Rhône	Mojtahid et al. 2010b
<i>Nouria polymorphinoides</i>	Surface	Rhône	Duijnsteet et al. 2003
<i>Pyrgo elongata</i>	Surface	Rhône	Mojtahid et al. 2010a
<i>Rectuvigerina phlegeri</i>	Intermédiaire	Rhône	Mojtahid et al. 2010b
<i>Valvulineria bradyi</i>	Intermédiaire	Rhône	Fontanier et al. 2008

pèce épipélique suspensivore (*Rupertina stabilis*) présente des concentrations d'ATP plus importantes que des espèces endopéliques détritivores à microhabitat de surface (*Cribrostomoides subglobosum*, *Pyrgo rotalaria* et *Rhabdammina abyssorum*). Les espèces endopéliques tendraient également à se déplacer plus lentement que les espèces épipéliques (Kitazato, 1988). De même, des analyses d'ingestion de carbone par les foraminifères de milieux profonds montrent que les espèces de surface ont des taux d'ingestion plus importants que les espèces à microhabitat intermédiaire ou profond (Nomaki et al., 2005b). Ces études suggèrent ainsi que les espèces vivant au dessus de l'interface eau-sédiment ont une activité métabolique plus importante que les espèces vivant dans le sédiment. Il est donc logique de trouver des taux de respiration plus faibles pour les espèces endopéliques intermédiaires ou profonds.

Nos observations, basées sur un nombre de réplicats relativement faible, suggèrent, une activité métabolique plus faible chez les foraminifères benthiques à microhabitats profonds que chez les espèces colonisant un microhabitat plus superficiel. Cette différence potentielle pourrait être expliquée par le fait que ces organismes vivent dans un microhabitat dans lequel la matière organique disponible est essentiellement réfractaire, et donc difficilement assimilable. Ce métabolisme relativement faible peut être un signe d'une minéralisation de la matière organique lente typique des milieux dans lesquels la matière organique est réfractaire (Froelich et al., 1979; Burdige, 2006). De plus, les conditions

d'oxygénation en profondeur sont également proches de l'anoxie et le genre que nous avons testé (*Globobulimina* sp.) est capable de dénitrifier (cf Paragraphe X ; Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010b; Koho et al., 2011). Cette espèce est donc capable d'utiliser alternativement cette voie métabolique anaérobie (moins productrice d'énergie que la respiration d'oxygène) et une respiration d'oxygène relativement faible afin de survivre dans des conditions d'hypoxie. Les espèces à microhabitat intermédiaire ou de surface vivent dans un milieu où la concentration en oxygène est moins limitante ainsi que dans des conditions d'apport en matière organique plus importante. Ces différences de conditions pourraient expliquer les différences d'activité entre les foraminifères colonisant les différents microhabitats.

Veillez noter que la différence que nous observons entre l'activité métabolique des foraminifères des différents microhabitats est basée sur un très faible nombre d'observation de foraminifères à microhabitat profond. De plus, les mesures effectuées sont faites dans des conditions d'oxygénation et de pression différentes (dans un milieu oxygéné, à la pression atmosphérique) des conditions dans lesquelles ces foraminifères d'environnement profond et de microhabitat endopélique profond vivent habituellement (soit des conditions anoxiques et à forte pression). Les conclusions que nous tirons de ces observations sont ainsi fortement hypothétiques et ne demandent qu'à être confirmées dans de futures études. Ces conclusions semblent néanmoins concorder avec les connaissances actuelles de

l'activité des foraminifères benthiques des milieux profonds.

3.5. Estimation de la contribution des foraminifères à la respiration benthique

Geslin et al. (2011) ont établi que la relation entre le taux de respiration (RR) et le biovolume (BV) d'un foraminifère était tel que $RR = 3.95 \cdot 10^{-4} * BV^{0.88}$. Lorsque les données acquises au cours de cette thèse sont ajoutées aux données publiées par Geslin et al. (2011), la relation devient $RR = 1.85 \cdot 10^{-4} * BV^{0.92}$. La pente de la relation tend ainsi à augmenter et l'ordonnée à l'origine à diminuer avec la nouvelle relation (Figure 65 et Équation 5). Nous cherchons à identifier dans ce paragraphe si cette différence entre les deux relations tend à modifier l'estimation de la contribution des foraminifères à la respiration benthique. Dans les paragraphes précédents, nous avons identifié que la bathymétrie et le microhabitat pouvait influencer les taux de respiration des foraminifères benthiques. Dans ce paragraphe nous ne prendrons pas en considération ces deux paramètres car nous n'avons pas été en mesure de quantifier précédemment les effets du microhabitat ou de la bathymétrie.

Les modèles établis peuvent être utilisés pour estimer le taux de respiration d'un foraminifère à partir de simples mesures de taille. Lorsque dans un milieu le nombre d'individus vivants et le taux de consommation d'oxygène total est connu il est alors possible d'estimer la part de la respiration benthique due aux foraminifères. Par exemple, dans le Chapitre 1

(Partie II) nous estimons la part de respiration benthique attribuée aux foraminifères à partir de la consommation d'oxygène totale, du nombre et de la taille des foraminifères d'après le modèle publié dans Geslin et al. (2011). Nous estimons ainsi que les foraminifères contribuent à ~0.46% de la respiration totale benthique dans les sédiments de Piran (Tableau 42A). Lorsque le nouveau modèle est pris en considération la contribution des foraminifères diminue à ~0.38 % (Tableau 42B). Les estimations effectuées à partir des deux modèles sont ainsi du même ordre de grandeur. La diminution observée entre les deux estimations est due au fait que la majorité des individus vivants trouvés dans les carottes de Piran appartiennent à la fraction de taille 63-125 μm . La pente et l'ordonnée à l'origine des deux modèles étant différente, le décalage entre les deux modèles augmente lorsque le biovolume diminue affectant ainsi l'estimation de la contribution des faunes de petite taille.

Si l'on considère que les plus petits foraminifères de la fraction 63-125 μm sont de forme hémisphérique et de 63 μm de diamètre alors leur biovolume est d'environ $49 \cdot 10^3 \mu\text{m}^3$. Or, les taux de respiration de foraminifères aussi petits n'ont pas été mesurés pour établir l'Équation 5 (le biovolume minimal estimé est de $1.7 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$; Figure 65). Les estimations des taux de respiration des plus petits individus sont donc des extrapolations du modèle. Afin de mieux pouvoir estimer les taux de respiration des petits individus – qui représentent en nombre une part très importante de la communauté des foraminifères

benthiques – il serait intéressant de quantifier les taux de respiration d’individus de faible biovolume.

Nous montrons dans le Tableau 42 que si les individus de la fraction de taille 63-125 μm représentent environ 70% du nombre d’individus vivants dans les sédiments oxygénés à Piran, ils ne contribueraient qu’à environ 20% de la respiration totale des foraminifères (selon notre modèle d’estimation de la contribution ; Tableau 42). Le modèle montre que ce sont les organismes de la fraction 150-315 μm (qui représentent 17 % du nombre d’individus) qui contribuent le plus à la respiration totale des foraminifères (à hauteur d’environ 60%).

Ces résultats complémentaires permettent d’affiner les premières estimations de la contribution des foraminifères à la respiration benthique et montrent qu’elles sont potentiel-

lement légèrement surestimées. Lorsque nous estimons la contribution des foraminifères à la respiration benthique, la respiration des foraminifères est rapportée par la respiration benthique totale. Cette respiration benthique totale prend en compte la diminution de la concentration d’oxygène d’un milieu oxygéné vers un milieu hypoxique puis anoxique. Pour estimer la respiration des foraminifères, nous considérons que les taux de respiration sont constants quelles que soient les conditions d’oxygénation. Or, il a récemment été mis en évidence que les organismes de la méiofaune montrent une diminution de leur taux de respiration en conditions hypoxiques (Braeckman et al., 2013 d’après des données de Moodley et al. (2008)). Ainsi, si les foraminifères présentent des taux de respiration plus faibles en hypoxie que ceux considérés, la contribution des foraminifères à la respiration benthique

Tableau 42 – Nombre d’individus vivants (d’après Langlet et al. (2013b) ; Chapitre 1), biovolume individuel minimum par fraction de taille dans la carotte « Normoxique » de Piran (Chapitre 1). Le taux de respiration estimé à partir du biovolume individuel et d’après la relation publiée dans Geslin et al. 2011 (Tableau A) et d’après l’Équation 5 (Tableau B). La contribution de chaque fraction à la respiration totale des foraminifères et à la respiration benthique totale est également estimée.

A						
Fraction de taille (μm)	Nombre d’individus	Biovolume minimum (μm^3)	Biovolume moyen (μm^3)	Taux de respiration estimé ($\text{pmol}/\text{j}/\text{cm}^2$)	Contribution de la fraction à la respiration des foraminifères (%)	Contribution de la fraction à la respiration benthique totale (%)
63-125	976	49,1E+3	180,3E+3	964	21	0,10
125-150	158	383,4E+3	516,6E+3	400	9	0,04
150-315	242	662,4E+3	2,8E+6	2696	60	0,27
> 315	15	6,2E+6	9,0E+6	469	10	0,05
> 63	1391	49,1E+3	775,6E+3	4528	100	0,46

B						
Fraction de taille (μm)	Nombre d’individus	Biovolume minimum (μm^3)	Biovolume moyen (μm^3)	Taux de respiration estimé ($\text{pmol}/\text{j}/\text{cm}^2$)	Contribution de la fraction à la respiration des foraminifères (%)	Contribution de la fraction à la respiration benthique totale (%)
63-125	976	49,1E+3	180,3E+3	736	20	0,07
125-150	158	383,4E+3	516,6E+3	317	8	0,03
150-315	242	662,4E+3	2,8E+6	2300	61	0,23
> 315	15	6,2E+6	9,0E+6	417	11	0,04
> 63	1391	49,1E+3	775,6E+3	3769	100	0,38

pourrait être surestimée. Néanmoins, il faut rappeler que les estimations de la contribution que nous faisons sont faites à partir du nombre d'individus de taille supérieure à 63 μm . Ainsi, tous les foraminifères de taille inférieure à 63 μm non comptabilisés dans les études faunistiques ne sont pas pris en compte dans l'estimation.

4. Bilan de l'analyse du métabolisme aérobie

Les données acquises au cours de cette thèse ajoutées aux autres données collectées ont permis de mettre à jour l'équation liant les taux de respiration aux biovolumes des foraminifères benthiques. La mise à jour de cette équation ne change pas fortement les estimations de la contribution des foraminifères à la respiration benthique qui varient entre environ 0.4 et 0.5% en Mer Adriatique.

L'analyse des données suggère également que le biovolume n'est pas le seul facteur qui influence les taux de respiration des foraminifères. Nos données mettent en évidence des différences entre les sites d'études, l'activité métabolique des foraminifères tendant à diminuer des milieux intertidaux vers les milieux océaniques profonds. Des différences entre espèces ont également été observées et pourraient en partie être expliquées par l'influence du microhabitat. Les quelques mesures dont nous disposons pour une espèce colonisant un microhabitat profond suggèrent une activité métabolique plus faible que les espèces vivant dans des microhabitats plus proches de l'interface eau sédiment.

Ces observations complémentaires permettent de mieux comprendre les interactions entre les foraminifères et leur milieu de vie. La base de données sur laquelle nos analyses sont basées est cependant assez modeste. Afin de pouvoir élaborer des conclusions plus tranchées concernant les effets potentiels des sites d'études ou du microhabitat des espèces sur le taux de respiration il faudrait qu'un maximum d'espèce et de site soit analysé sur une large gamme de taille. Les conclusions de notre analyse à vocation exploratoire permettent néanmoins d'établir des pistes de recherches précises afin de quantifier les différents effets que nous soupçonnons.

Deux problèmes ne nous permettent pas d'énoncer des conclusions très sûres : 1) le fait que les différentes espèces n'ont pas la même forme et que les estimations de biovolumes soient basés sur des modèles simplistes génère des biais dans la normalisation par le volume du taux de respiration des individus analysés et 2) dans la base de données actuelle, les individus échantillonnés aux divers sites d'étude ont des tailles très variables (entre $1.6 \cdot 10^6$ et $105.9 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$). La déconvolution de l'effet du site d'étude et de l'effet de taille sur le métabolisme du foraminifère implique d'étudier un genre unique qui serait présent dans des milieux contrastés. Par exemple, les espèces du genre *Ammonia* ont des morphologies similaires (une allure générale similaire) dans une grande variété de milieux. Et ces espèces sont trouvées dans du sédiment piégé dans des micro-algues rouges sur les estrans battus de l'île d'Yeu (*Ammonia beccarii*), dans les vasières de la Baie de

l'Aiguillon, du Bassin d'Arcachon ou de l'estuaire de la Loire (*Ammonia tepida*), dans l'estuaire du Grevelingenmeer présentant des anoxies saisonnières (*Ammonia batava*) ou en milieu subtidal de Mer Méditerranée (*Ammonia beccarii* f. *inflata*). Ces sites d'études sont assez faciles d'accès et peuvent ainsi être prélevés assez fréquemment et présentent des densités d'individus assez importante. Dans ces sédiments il serait intéressant d'extraire des *Ammonia* de taille similaire et de comparer leurs taux de respiration aux différents sites en minimisant ainsi les différents biais.

Pour pouvoir observer de claires différences inter-spécifiques ou entre sites, il faudrait idéalement, disposer de gammes de taille similaire pour chaque genre, espèce ou pour chaque milieu permettant d'établir une relation à 3 dimensions (entre taux de respiration, biovolume et espèces ou site).

De même, l'influence du microhabitat sur les taux de respiration des foraminifères benthiques ne peut se faire que si nous sommes en mesure d'extraire à un unique site des individus de biovolumes similaires appartenant à des espèces dont les microhabitats sont clairement identifiés et suffisamment contrastés.

Nos résultats suggèrent ainsi que le microhabitat et la bathymétrie du site d'étude devraient être pris en considération lors de la quantification la contribution des foraminifères à la respiration aérobie benthique.

Partie II. Analyse du métabolisme anaérobie

1. Introduction

A ce jour, toutes les espèces de foraminifères benthiques analysées sont capables de respirer de l'oxygène. Parmi ces espèces, certaines sont également capables de survivre dans un milieu dépourvu d'oxygène (Bernhard et Reimers, 1991; Bernhard, 1993; Bernhard et Alve, 1996; Duijnsteet al., 2003 ; Chapitres précédents). Cette survie en anoxie suggère que les foraminifères benthiques sont potentiellement des organismes anaérobies facultatifs (des organismes qui respirent de l'oxygène lorsqu'il est présent et qui en anoxie sont capables d'utiliser un métabolisme anaérobie).

Dans les milieux anoxiques, diverses stratégies vitales peuvent être mises en œuvre pour survivre à l'absence d'oxygène. Parmi ces stratégies, de nombreux organismes présentent des voies métaboliques anaérobies (Fenchel, 2012; Oren, 2012). Les organismes procaryotiques présentent une forte diversité de voies métaboliques anaérobies qui leur permettent de vivre et croître en anoxie. Le métabolisme anaérobie procaryote utilise divers composés comme accepteurs d'électrons (nitrates, nitrites, oxydes de manganèse, de fer, sulfates, diméthyl sulfoxyde, etc. ; Oren, 2012). Au contraire, les eucaryotes présenteraient une faible diversité de métabolisme

anaérobie (Oren, 2012). La plupart des organismes eucaryotes vivant dans des milieux anoxiques sont capables d'utiliser différents types de fermentation (ex : levures, champignons ; Oren, 2012). La fermentation du pyruvate notamment (produit final de la glycolyse, la voie d'assimilation du glucose) aurait lieu dans des organelles proches des mitochondries : les hydrogenosomes (Bernhard et Sen Gupta, 1999; Fenchel, 2012). De telles organelles sont présentes dans la cellule de certains ciliés anaérobies, trichomonidés (trichomonads, des protistes anaérobies) et certains organismes fongiques (Oren, 2012). Certains eucaryotes sont également capables de réduire les nitrates par dénitrification. Les foraminifères benthiques sont à ce jour les seuls eucaryotes capables de réduire les nitrates en diazote (et donc de faire une dénitrification complète) quand des ciliés ou des organismes fongiques sont capables de réduire les nitrates en nitrites ou en monoxyde d'azote seulement (Risgaard-Petersen et al., 2006).

Au cours des dernières années, de nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer la résistance des foraminifères à l'anoxie. De nombreuses adaptations physiologiques ont été suggérées par différents auteurs : la séquestration de chloroplastes, l'assimilation de l'enzyme nitrate réductase depuis des chloroplastes de diatomées, la for-

mation de kystes, la dormance (réduction du métabolisme), l'agrégation de réticulum endoplasmique et de peroxyosomes ou la présence de bactéries méthanogènes et réductrices de sulfates endo- et ecto-symbiontes (Leutenegger, 1984; Bernhard et Reimers, 1991; Cedhagen, 1991; Bernhard, 1996; Bernhard et Alve, 1996; Moodley et al., 1998b; Bernhard et al., 2000; Grzymski et al., 2002; Bernhard et Bowser, 2008).

En 2006, Risgaard-Petersen et collaborateurs mettent en évidence que des individus de *Globobulimina turgida* (initialement déterminé comme *Globobulimina pseudospinescens*) présentent dans leurs cellules des nitrates à des concentrations 500 fois supérieures aux concentrations des eaux porales. Les auteurs montrent ainsi que les foraminifères benthiques sont capables d'assimiler des nitrates et de mobiliser assez d'énergie pour maintenir des niveaux de concentration intracellulaires plusieurs ordres de magnitude au dessus des concentrations dans le milieu de vie (Risgaard-Petersen et al., 2006). Lorsque les individus de cette espèce ayant incorporés des nitrates marqués isotopiquement sont placés en anoxie, on mesure une production de diazote gazeux marqué. Ces résultats indiquent que les foraminifères sont capables de réduire les nitrates en diazote (par plusieurs réactions enzymatiques successives : $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$) et donc de réaliser une dénitrification complète (Risgaard-Petersen et al., 2006). Dans un second set d'expérience d'incubation de ces individus avec des nitrates et de l'ammonium marqués, les auteurs excluent que le diazote est produit

par d'autres voies métaboliques que la dénitrification (ils excluent la possibilité de l'anammox qui réduit l'ammonium et les nitrates en diazote). Diverses observations microscopiques (FISH, MEB et MET pour respectivement hybridation in situ en fluorescence, microscope électronique à balayage et microscope électronique en transmission) montrent un très faible nombre d'organismes procaryotes à la surface du test et une absence de bactéries dans la cellule de *G. turgida* (Risgaard-Petersen et al., 2006). Ces observations microscopiques suggèrent que le nombre de symbiontes procaryotes n'est pas suffisant pour supporter à eux seuls les taux de dénitrification mesurés et confirment ainsi le fait que la dénitrification peut être attribuée au foraminifère et pas à ses bactéries associées (Risgaard-Petersen et al., 2006). Ces travaux sont les premiers à mettre en évidence la faculté à réaliser une dénitrification complète chez des organismes eucaryotes. A partir de la quantification du stock de nitrates et de la vitesse de consommation de cet oxydant, les auteurs estiment que le stock de nitrates de *G. turgida* est suffisant pour supporter sa consommation par dénitrification pendant plus d'1 mois d'anoxie sans apport de nitrates. Cette durée a par la suite été réévaluée à la hausse, la dénitrification pouvant ainsi assurer l'activité métabolique de *G. turgida* pendant 3 à 5.5 mois (Piña-Ochoa et al., 2010b).

Plus tard, Høglund et al. (2008) montrent que *Nonionella* cf. *stella*, espèce dominant les faunes de l'OMZ chilienne, est également capable d'accumuler des nitrates et de les réduire par dénitrification. Les auteurs obser-

vent que la vitesse d'absorption des nitrates est 10 fois plus importante que la vitesse de consommation par dénitrification (Høgslund et al., 2008). Cette capacité à régénérer rapidement les stocks de nitrates permettrait aux foraminifères de survivre dans les conditions anoxiques et de disponibilité des nitrates variable, conditions typiques de l'OMZ chilienne (Høgslund et al., 2008).

Un grand nombre d'espèces de foraminifères benthiques est capable d'accumuler des nitrates dans leurs cellules. En effet, dans une analyse de 66 espèces de foraminifères benthiques, Piña-Ochoa et al. (2010a) montrent que 37 espèces accumulent des nitrates (espèces pour lesquelles la moyenne de concentration de l'ensemble des individus testés est supérieure à 0.1 mM). Ces espèces qui accumulent les nitrates sont présentes dans différents types d'habitats (des espèces colonisant les sédiments de l'OMZ péruvienne, les pentes et plateaux continentaux, l'étage bathyal ou les milieux côtiers) soulignant le caractère quasi-ubiquiste de la capacité à stocker et accumuler les nitrates chez les foraminifères (Piña-Ochoa et al., 2010a). Ces espèces stockant des nitrates sont essentiellement des espèces vivant dans des milieux hypoxiques ou anoxiques (dans les OMZ ou vivant à des profondeurs anoxiques dans le sédiment) mais d'autres espèces vivant dans des milieux oxiques sont également capables d'accumuler les nitrates. L'analyse des taux de dénitrification de 10 espèces montre que l'ensemble des espèces testées qui accumulent des nitrates sont capables de les respirer via dénitrification (Piña-Ochoa et al., 2010a).

Afin de comprendre le lien entre capacité à accumuler les nitrates, les consommer via dénitrification et survivre en conditions anoxiques avec et sans nitrates, une expérience en laboratoire a été menée sur *Globobulimina turgida* (Piña-Ochoa et al., 2010b). Dans cette expérience, le taux de survie de cette espèce est plus faible en anoxie sans nitrates que lorsque des nitrates sont présents dans le milieu. Le stock de nitrates intracellulaire varie fortement au cours de l'expérience, ce stock ne montre pas de différences majeures quelles que soient les conditions d'incubation (Oxique et Anoxique avec et sans nitrates ; Piña-Ochoa et al., 2010b). Les auteurs observent une diminution du stock de nitrates avec le temps d'incubation dans l'ensemble des conditions et suggèrent que cette diminution peut être due à une consommation par dénitrification et au fait qu'il peut être difficile de conserver les nitrates intracellulaires dans des milieux pauvres en matière organique (Piña-Ochoa et al., 2010b).

Récemment, le gène codant pour l'enzyme nir (*nitrite reductase*) – une enzyme catalysant une réaction intermédiaire de la dénitrification – a été identifié chez *Buliminella tenuata*, *Nonionella stella* et *Bolivina argentea* (Bernhard et al., 2012). Parmi ces trois espèces, seule *Buliminella tenuata* contenait des bactéries endobiontes proches du genre *Marinobacter* – genre capable de dénitrifier. Le gène codant pour l'enzyme nir détecté dans les extraits d'ADN n'a pas été localisé dans les endobiontes suggérant qu'il est présent dans le génome du foraminifère. Les observations ultrastructurales et moléculaires des

deux autres espèces ne montrent pas de présence de symbiontes dans la cellule. Les résultats de Bernhard et al. (2012) confirment les conclusions formulées par Risgaard-Petersen et al. (2006) selon lesquelles la capacité de dénitrification est propre au métabolisme des foraminifères et n'est pas due à la présence de symbiontes dans leurs cellules.

Il apparaît donc clairement qu'un grand nombre d'espèces de foraminifères benthiques est capable d'accumuler des nitrates dans leur cellule puis de les respirer par dénitrification lorsque leur milieu de vie devient anoxique. En revanche, nous ne savons pas si ce mécanisme permet d'expliquer à lui seul la survie en anoxie des différentes espèces de foraminifères benthiques. Au cours de cette thèse nous avons pu déterminer à l'aide d'observations sur le terrain et d'expériences en laboratoire, si certaines espèces étaient capables ou non de survivre en anoxie. La capacité à accumuler les nitrates et à les consommer par dénitrification des espèces dont nous avons parlé dans les chapitres précédents n'a pas été testée (ou pas en nombre suffisant) dans des études précédentes. Ainsi, dans ce chapitre, nous analyserons la capacité à accumuler des nitrates et à dénitrifier des espèces pour lesquelles nous avons identifié dans les chapitres précédents si elles étaient sensibles ou résistantes à l'anoxie.

L'accumulation de nitrates présente une grande variabilité intra- et inter-spécifique. Les conditions environnementales dans lesquelles les nitrates sont accumulés dans la cellule sont méconnues et le lieu de stockage de ces nitrates dans la cellule est à ce jour

inconnu. Nous allons mesurer la quantité de nitrates dans les cellules de foraminifères prélevés dans divers environnements. Ces mesures nous permettront de déterminer si les conditions d'accumulation peuvent expliquer en partie la forte variabilité des quantités de nitrates stockés observée dans les études précédentes. Nous chercherons à identifier les différents paramètres (taille, conditions du milieu, variabilité spatiale et temporelle, etc.) qui peuvent influencer la quantité de nitrates dans la cellule.

Nous savons également que certains foraminifères benthiques utilisent les nitrates qu'ils stockent dans leur cellule par dénitrification.

Melonis barleeanus vivant essentiellement dans un microhabitat hypoxique (Jorissen, 1999a) dans le pic de nitrates, nous chercherons à identifier par une expérience si la présence de nitrates dans le milieu influence les taux de dénitrification de *Melonis barleeanus*..

2. Matériel et Méthodes

2.1. Prélèvement et identification des individus vivants

Dans le présent chapitre nous analysons les résultats des données de métabolisme anaérobie acquises lors de cette thèse. Les données proviennent des différents chapitres de cette thèse.

1. Dans le chapitre 1, les quantités de nitrates intracellulaires sont déterminées pour les espèces *Eggerella scabra*, *Bulimina marginata*, *Ammonia beccarii*, *Lep-*

tohalysis scottii, *Textularia agglutinans*, *Fissurina* sp. et *Nonion* spp. et la capacité à dénitrifier est testée pour *Eggerella scabra* et *Bulimina marginata*. Ces échantillons proviennent de deux stations : la station « Piran » (45°32.90'N, 13°33.00'E) et la station « D10a » (45°35.5'N, 13°34.9'E) à 24 et 12 mètres de profondeur respectivement (voir Langlet et al., 2013a et Sabbatini et al., 2012).

2. Dans le chapitre 3, la quantité de nitrates intracellulaires est mesurée sur *Ammonia tepida*, *Bulimina marginata*, *Bolivina subaenariensis* et *Melonis barleeanus* après avoir été incubés pendant des périodes de temps variables et dans différentes conditions d'oxygénation (Oxique, Hypoxique et Anoxique, avec ou sans nitrates dans le milieu). La capacité à dénitrifier est testée pour *Bolivina subaenariensis* et *Melonis barleeanus* sur des spécimens issus d'échantillons oxygénés et préalablement incubés en anoxie. Les individus analysés proviennent d'environnements divers : *Ammonia tepida* provient de la zone intertidale de la Baie de l'Aiguillon (45°54'N, 1°7'O), *Bulimina marginata* et *Bolivina subaenariensis* proviennent du Golfe de Gascogne à la station K (Lat. 43°38'N, Long. 1°43'O) localisée dans le canyon de Cap-Breton à plus de 650 mètres de profondeur et ont été échantillonnées lors des campagnes du programme FORCLIM PECH9 et PECH10 (resp. les 2 Février et 28 Août 2011). *Melonis barleeanus* provient de la marge

continentale du Portugal et plus précisément le Canyon de Nazaré à la station 161 (Lat. 39°35'N, Long. 9°24'O, 918 m) échantillonnée lors de la mission PACEMAKER le 20 Mars 2011.

Certaines expériences n'ont pas encore été présentées dans ce manuscrit :

1. La concentration en nitrate intracellulaire et le taux de dénitrification ont été mesurés pour *Ammonia tepida* provenant de la vasière des Brillantes dans l'estuaire de la Loire le 27 Septembre 2012 (Lat. 47°16'57N, Long. 2°3'50 O).
2. Une mesure de dénitrification a été réalisée sur *Globobulimina* sp. provenant du Golfe du Gascogne (Station K).

Pour les différents sites d'échantillonnage, quelques cm³ de sédiment superficiel sont prélevés avec un carottier ou une benne pour les sites subtidaux et à la spatule dans les milieux intertidaux. Les échantillons ont été conservés dans quelques cm³ de sédiment recouvert d'eau de mer à température in situ et à l'obscurité. Les individus présentant un déplacement ont été sélectionnés pour ces mesures (cf. partie I paragraphe Partie I.2.2).

2.2. Mesures morphométriques

Dans le cadre des expériences menées au laboratoire, nous avons mesuré la quantité de nitrates intracellulaire de 323 individus. Afin d'estimer la concentration en nitrates d'une partie de ces individus, nous mesurons les différents paramètres morphométriques dans le but de d'estimer leur biovolume. Ces me-

sures se font avant de faire l'analyse des nitrates intracellulaires puisque celle-ci entraîne la destruction de la coquille des foraminifères,

Les diamètres minimum et maximum des individus sont mesurés par un microscope semi-automatique monoculaire Leica Z16APO équipé d'un appareil photo numérique SIS/Olympus CC12 (Bollmann et al., 2004; Movellan et al., 2012). Ces mesures d'envergure permettent de déterminer selon les formules identifiées précédemment le biovolume de chaque individu (Équation 2).

2.3. Mesure des nitrates intracellulaires

La concentration de nitrate intracellulaire des foraminifères benthiques a été mesurée à l'Université d'Aarhus (Danemark) au « Center for Geomicrobiology » où cette méthode a été initialement mise en place (Risgaard-Petersen et al., 2006). Ces mesures ont été réalisées lors d'un séjour à Aarhus de deux mois financé par une bourse de mobilité internationale des doctorants financée par l'UNAM (Université Nantes Angers Le Mans) et par l'obtention du « William V. Sliiter Research Award » de la Cushman Foundation for Foraminiferal Research.

Avant analyse, chaque spécimen a été rincé trois fois dans une eau de mer artificielle sans nitrates (mélange d'eau Milli-Q et de sel de mer rouge, commercialisé par Red Sea). Chaque individu est alors placé dans un tube à centrifugation de 1 mL et conservé à -20°C jusqu'à l'analyse. Les nitrates (NO_3^-) et nitrites (NO_2^-) intracellulaires sont analysés par

la méthode de Braman et Hendrix (1989) où les ions nitrates et nitrites sont réduits en monoxyde d'azote (NO) et détectés par chemiluminescence. La méthode consiste à injecter les échantillons de foraminifère directement dans 0.6 mL d'une solution de Chlorure de Vanadium (VCl_3) à 0.1 M dans un tube en verre en forme de U maintenu à 80°C (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høgslund et al., 2008). Dans ce tube, un flux d'azote gazeux est assuré par la pompe du détecteur de monoxyde d'azote (Eco Physics CLD 86, Eco Physics, Deurnten Suisse). La solution acide de Chlorure de Vanadium chauffée cause la désintégration du test et de la cellule du foraminifère et libère les nitrates intracellulaires en réduisant les nitrates en monoxyde d'azote en quelques secondes. Les solutions standard sont préparées à partir de KNO_3 .

Cette méthode permet de déterminer la quantité de nitrates présents dans la cellule de tous les individus (en pmol). Nous avons déterminé le biovolume de certains individus de la base de données à l'aide de mesures morphométriques (avant la destruction du test lors de la mesure des nitrates intracellulaires). En rapportant la quantité de nitrates (en pmol) et le biovolume (en μm^3) nous pouvons ainsi estimer la concentration en nitrates intracellulaires (en $\text{pmol}/\mu\text{m}^3$ converti en mM ; mmol/L).

2.4. Mesure des taux de dénitrification

La dénitrification est un des procédés de réduction des nitrates. Le produit final de cette

réaction est le diazote. Cette réduction est catalysée par 4 enzymes qui produisent successivement des nitrites, du monoxyde d'azote, du protoxyde d'azote et du diazote (tel que $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$).

Les 17 mesures de taux de dénitrification effectuées au cours de cette thèse ont été faites sur une centaine d'individus de 6 espèces différentes au laboratoire de culture de l'Université d'Angers et à l'Université d'Aarhus. Nous testons des espèces connues dans la littérature comme étant capables de dénitrifier (*Globobulimina* sp. et *Bolivina subaenariensis*; Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010a) pour avoir un contrôle positif et nous assurer de la capacité à détecter la dénitrification par notre dispositif. Les autres espèces testées n'ont pas été testées précédemment dans la littérature (*Bulimina marginata*, *Melonis barleeanus* et *Eggerella scabra*) ou sont des espèces apparemment incapables de dénitrifier (ex : *Ammonia tepida*; Piña-Ochoa et al., 2010a).

Les mesures des taux de dénitrification se font selon un protocole dérivé de celui utilisé pour mesurer les taux de respiration d'oxygène (Partie I, section Partie I.2.4). La différence réside dans le fait que l'environnement doit être anoxique pour que la dénitrification se fasse et dans l'utilisation de microélectrode à protoxyde d'azote.

Lors de chaque mesure un nombre d'individus variant entre 3 et 14 est placé dans un tube en verre de 0,5 mm de diamètre contenant de l'eau artificielle sans nitrates et de l'acétylène (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høgslund et al., 2008). L'acétylène inhibe

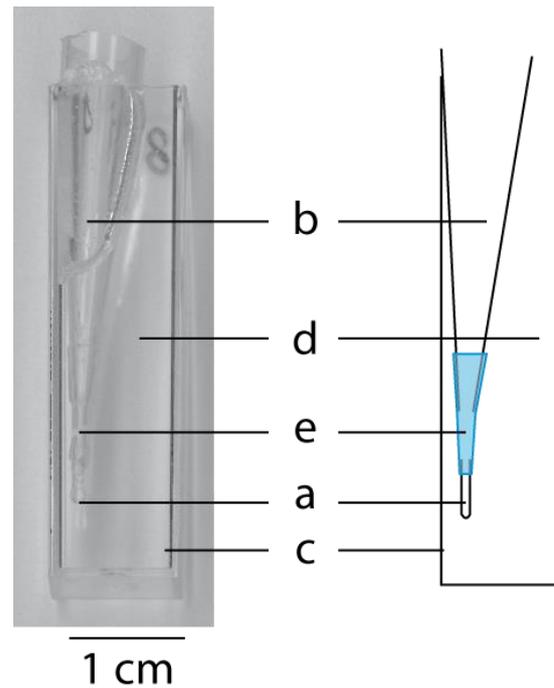


Figure 69 – Photographie et représentation schématique de la cuve de mesure des taux de respiration d'oxygène. Légende : a – chambre de mesure (0.5 mm de diamètre) ; b – milieu interne (eau de mer artificielle + HEPES + Acétylène) ; c – cuve à spectrophotométrie ; d – milieu externe (Ascorbate de Sodium) ; e – tube en silicone.

l'enzyme *nor* (nitrous oxide reductase, qui catalyse la réduction du N_2O en N_2) et fait par conséquent que le protoxyde d'azote (N_2O) devient le produit final de la dénitrification.

Pour maintenir le pH dans le milieu interne, le tampon organique HEPES est ajouté à 2mM à l'eau artificielle et à l'acétylène (Figure 69). Afin de réaliser l'anoxie, le tube en verre est surmonté d'un tube en silicone poreux à l'oxygène emboîté à son ouverture supérieure dans un tube en verre conique fixé dans une cuve à spectrophotométrie en plexiglas. À l'extérieur de la chambre de mesure, dans la cuve, se trouve une solution d'ascorbate de sodium. L'oxygène dissous dans l'eau de la chambre de mesure va diffuser à travers le tube en silicone et va être piégé par la solution

d'ascorbate créant l'anoxie dans la chambre de mesure (Figure 69).

Des profils verticaux de la concentration en N_2O sont effectués dans le tube anoxique avec une microélectrode à N_2O préparées sur mesure de pointe de 25 ou 50 μm de diamètre (Andersen et al., 2001) positionnée à $\sim 100 \mu m$ au dessus des foraminifères. Les profils verticaux permettent de mettre en évidence une éventuelle production de N_2O due à la dénitrification. De la même façon que les taux de respiration sont déterminés, nous estimons les taux de dénitrification à partir du gradient de concentration (ici positif), du flux de protoxyde d'azote, du nombre d'individus et de la section de la chambre. Un total de 17 expériences a été fait sur 6 espèces différentes. Parmi les expériences, certaines sont des pseudo-réplicats (expériences pour lesquelles certains individus ont été préalablement utilisés dans un autre réplicat) et sont notées comme telles. Pour d'autres expériences les individus ont été préalablement incubés pour

différentes durées en anoxie avec ou sans nitrates. Une mesure a également été effectuée en présence de nitrates dans la chambre de mesure.

3. Résultats

3.1. Nitrate intracellulaire

La quantité de nitrate intracellulaire a été analysée chez différentes espèces de foraminifères. Les données acquises proviennent soit d'individus analysés à différents sites d'étude soit d'individus utilisés dans le cadre des expériences de cette thèse. Nous supposons que les conditions préalables à la mesure peuvent influencer la quantité de nitrates. Nous décrivons ainsi ici séparément les foraminifères analysés directement après avoir échantillonnés dans le sédiment (3.1.1. Stock intracellulaire « naturel ») des individus analysés après manipulation et incubation préalable dans diverses conditions expérimentales (3.1.2. Stock intracellulaire après expériences).

Tableau 43 - Quantité de nitrates intracellulaires (pmol) dans les foraminifères benthiques analysés aux différents sites d'études. Pour chaque espèce le nombre d'individus analysés, le nombre d'individus présentant des nitrates intracellulaires ($N \neq 0$) ainsi que la moyenne, la moyenne des individus accumulant les nitrates ($N \neq 0$), l'écart-type (sd), l'écart-type des individus accumulant les nitrates ($N \neq 0$), les valeurs minimales, valeurs minimales différentes de zéro ($N \neq 0$) et la valeur maximale observée sont indiquées. L'ensemble de ces données ont été présentées précédemment dans la référence 1 (Chapitre 1. Partie III) ou sont nouvelles.

Espèce	Site	Quantité de Nitrates (pm)								Référence	
		n	n ($N \neq 0$)	moyenne	sd	min	min ($N \neq 0$)	max			
<i>Leptohalysis scotii</i>	Piran	2	0	0	-	0	-	0	-	0	1
<i>Textularia agglutinans</i>	Piran	3	0	0	-	0	-	0	-	0	
<i>Fissurina</i> sp.	Piran	1	0	0	-	-	-	0	-	0	
<i>Nonion</i> spp.	Piran	2	0	0	-	0	-	0	-	0	
<i>Ammonia beccarii</i>	D10a	4	0	0	-	0	-	0	-	0	
<i>Eggerella scabra</i>	Piran	2	0	0	-	0	-	0	-	0	1
	D10a	2	0	0	-	0	-	0	-	0	
<i>Bulimina marginata</i>	Piran	9	1	1	8	3	-	0	8	8	1
	D10a	1	1	433	433	-	-	433	433	433	
	Golfe de										
<i>Bolivina subaenariensis</i>	Gascogne	10	10	67	67	33	33	25	25	114	nouveau

3.1.1. Stock intracellulaire « naturel »

Parmi les 26 individus prélevés dans du sédiment stocké dans des incubateurs au laboratoire (pour le site Piran, les individus sont extraits moins de 48 h après le prélèvement du sédiment en conditions oxiques et pour le site D10a quelques semaines après l'échantillonnage) seuls deux individus de *Bulimina marginata* présentent des nitrates dans leur cellule (Tableau 43). L'individu provenant de Piran contient 8 pmol de nitrates quand l'individu de la station D10a en contient 433 pmol. L'ensemble des 10 *Bolivina subaenariensis* analysées présente des nitrates à une moyenne de 67 pmol (écart type : 33 ; Tableau 43). Nous n'avons pu déterminer le biovolume d'aucun de ces individus. Nous ne présentons donc pas ici la concentration en nitrates intracellulaires de ces organismes.

3.1.2. Stock intracellulaire après expériences

L'ensemble des espèces utilisées dans le cadre de nos expériences d'incubation en milieu contrôlé présente des nitrates dans leur cellule (N₂O : individus mesurés après un test

de dénitrification ; expérience I : expérience d'incubation en hypoxie (cf. Chapitre 3); expérience II : expérience d'incubation en anoxie (cf. Chapitre 3 ; Tableau 44). 3 des 6 individus d'*Eggerella scabra* analysés après une expérience de mesure de dénitrification contiennent des nitrates dans leur cellule (moyenne : 33 pmol, écart type : 47). De même, 7 *Ammonia tepida* provenant de l'estuaire de la Loire sur les 12 mesurés après un test de dénitrification ayant duré 47 heures présentent des nitrates intracellulaires (moyenne : 7 pmol, écart type : 9 ; Tableau 44). 52 individus de cette même espèce provenant de la Baie de l'Aiguillon ont été analysés dans le cadre d'expérience d'incubation en hypoxie et en anoxie. 20 des 52 individus testés accumulent des nitrates dans leur cellule (moyenne : 15 et 4 pmol, écart type : 23 et 17 au cours de l'expérience I et II respectivement).

Au cours de l'expérience II, dans l'ensemble des conditions (Oxique, Anoxique avec nitrates, anoxique sans nitrates) 19/42 *Bolivina subaenariensis* contiennent des nitrates (moyenne : 11, écart type : 14 ; Tableau 44).

Tableau 44 – Quantité de nitrates intracellulaires (pmol) dans les foraminifères benthiques analysés aux différents sites d'études dans le cadre des différentes expériences. Les différents paramètres estimés sont les mêmes que pour le tableau précédent (Tableau 43). Certaines données ont été présentées initialement dans différents chapitres et articles (1 : Chapitre 1.Partie III; 2 : Chapitre 3.Partie I; 3 : Chapitre 3.Partie II).

Espèce	Site	Expérience	Quantité de Nitrates (pm)									Références
			n	n (N≠0)	moyenne	sd	min	max				
<i>Eggerella scabra</i>	D10a	N ₂ O	6	3	33	67	47	46	0	37	119	1
<i>Ammonia tepida</i>	Estuaire de la Loire	N ₂ O	12	7	7	12	9	8	0	6	29	nouveau
		I	34	18	15	29	23	25	0	9	114	2
	Baie de l'Aiguillon	II	18	2	4	40	17	46	0	8	73	nouveau
<i>Bolivina subaenariensis</i>	Golfe de Gascogne	II	42	19	11	24	14	11	0	9	49	nouveau
<i>Bulimina marginata</i>	Golfe de Gascogne	I	61	36	40	68	56	59	0	12	220	2
		II	12	1	1	15	4	-	0	15	15	nouveau
<i>Melonis barleeanus</i>	Marge du Portugal	I	57	55	61	63	72	73	0	16	462	2 et 3
		II	45	6	3	22	8	6	0	14	30	3

37 des 73 *Bulimina marginata* analysées dans le cadre des expériences I et II (moyenne : 40 et 1, écart type : 56 et 4 pour les expériences I et II respectivement) et 61 des 102 *Melonis barleeanus* présentent des nitrates intracellulaires (moyenne : 61 et 3 pmol, écart type : 72 et 8 pour les expériences I et II respectivement ; Tableau 44).

Nous n'avons pu déterminer le biovolume de l'ensemble de ces individus, nous ne présentons donc pas ici de données de concentration.

3.1.3. Variabilité de taille

Dans ce paragraphe, nous essayerons de mettre en évidence un lien entre taille des organismes et stock de nitrate. Pour déterminer si une telle relation existe en s'affranchissant de la variabilité interspécifique, nous analyserons les résultats obtenus pour deux espèces. Nous avons choisi de travailler sur les données acquises sur *Melonis barleeanus* lors de l'expérience I (expérience hypoxie, cf. chapitre 3) pour lesquelles nous avons mesuré un grand nombre de réplicat. Parmi les 57 individus mesurés dans cette série de données, nous avons pris le parti de ne pas prendre en considération les deux individus ne contenant pas de nitrates (pour in-

formation ces deux individus présentaient des diamètres maximum de 299 et 373 μm).

Les individus de diamètre maximum variant entre 200 et 350 μm présentent entre environ 20 et 100 pmol de nitrates dans leur cellule, les individus de taille entre 350 et 450 μm présentent une forte dispersion entre moins de 20 pmol et plus de 300 pmol par cellule quand les individus de taille comprise entre 450 et 600 μm présentent entre 50 et 500 pmol de nitrates par cellule (Figure 70A). Un modèle linéaire montre que la taille a un effet significatif sur le logarithme de la quantité de nitrates ($df = 53$, $F = 9.3$, $p = 0.004$, $R^2 = 0.15$). La quantité de nitrates tend ainsi à augmenter exponentiellement avec le diamètre maximum de *Melonis barleeanus* suivant la relation suivante : $\text{Nitrates} = \exp(3.83 \cdot 10^{-3} * \text{Diamètre maximum} + 2.46)$. De même, pour ces individus, la concentration en nitrates diminue significativement avec le diamètre maximum (Figure 70B).

Nous avons fait le même type d'analyse pour les 36 individus de *Bulimina marginata* présentant des nitrates dans leur cellule. Pour cette espèce, il n'y a pas d'effet significatif de l'élongation sur la quantité de nitrates dans la cellule (Figure 70C) mais une diminution significative de la concentration avec l'élongation (Figure 70D).

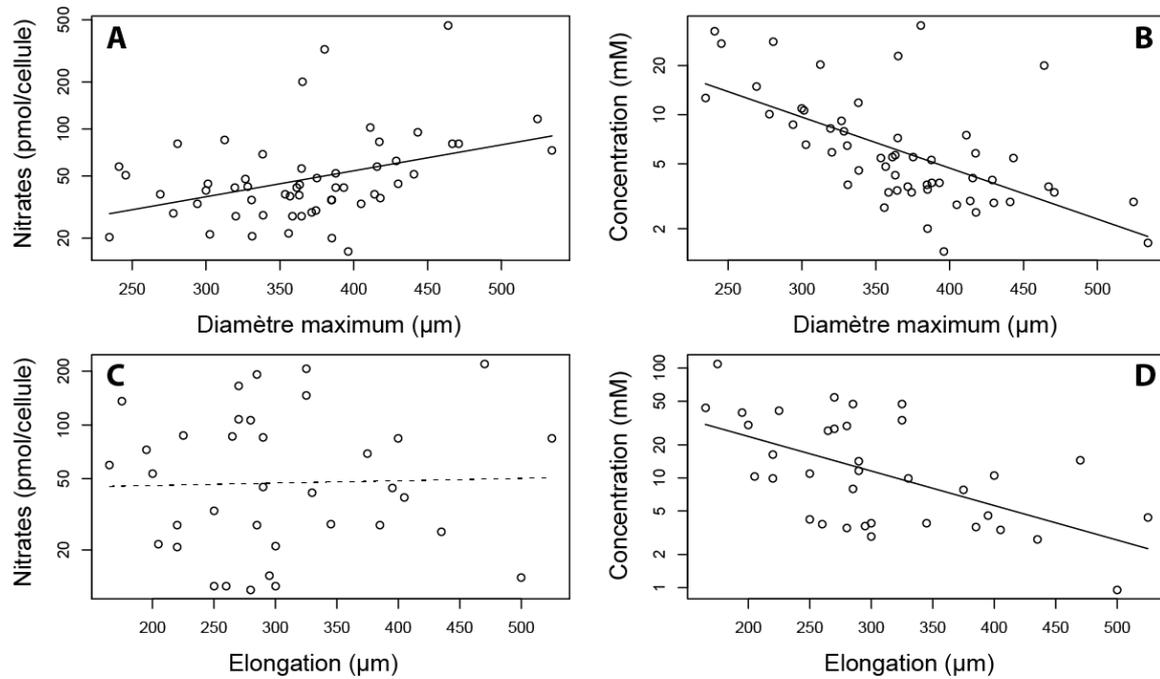


Figure 70 – Quantité de nitrates (A ; pmol/cellule) et concentration en nitrates (B ; mM) en fonction du Diamètre maximum (μm) pour *Melonis barleeanus* de l'expérience I et quantité (C) et concentration en nitrates (D) pour *Bulimina marginata* lors de l'expérience I. Notez que la quantité de nitrates est représentée suivant un axe logarithmique. La droite est le modèle liant ces deux paramètres cette droite est pleine lorsque le modèle est significatif et en pointillés lorsque le modèle n'est pas significatif.

3.2. Taux de dénitrification

Six espèces de foraminifères benthiques étant capables d'accumuler des nitrates dans leur cellule ont été testées pour déterminer leur capacité à dénitrifier. Les analyses effectuées avec plusieurs individus d'*Ammonia tepida* (dont 7/12 individus contenaient 12 pmol de nitrates après l'expérience ; Tableau 44), *Bulimina marginata*, *Eggerella scabra* (individus parmi lesquels 3/6 individus contenant 67 pmol de nitrates après la mesure de dénitrification ; Tableau 44) et *Melonis barleeanus* n'ont pas permis de détecter une production de protoxyde d'azote (Tableau 45). De la dénitrification a été détectée pour *Bolivina subaenariensis* et *Globobulimina* sp. à des taux de 1.3 et 48.0 pmol N par individu et par jour respectivement.

3.3. Mobilité en anoxie

Au cours d'un essai de quantification du taux de dénitrification nous avons pu observer que des spécimens d'*Ammonia tepida* provenant de l'estuaire de la Loire étaient capables de se déplacer verticalement dans la chambre de mesure et ce malgré le fait que les mesures de microélectrode à oxygène montraient que cette chambre de mesure était en anoxie (limite de détection des microélectrodes : 0,3 μM d'oxygène dissous). Suite aux mesures de dénitrification négatives la chambre a été placée en position horizontale, et le déplacement des individus a été enregistré. Le film présentant les photographies du déplacement des organismes est disponible au lien suivant : <http://youtu.be/-9rkQO4caoU>. Ces observations montrent que les individus sont capables

de se déplacer pendant 36h d'exposition à l'anoxie et donc sans consommer ni oxygène ni nitrates (par dénitrification). Au delà de cette durée il semblerait que les individus ne soient plus capables de se déplacer.

Tableau 45 – Taux de dénitrification (pmol N /ind/jour), nombre d'individus par expérience pour toutes les espèces d'origine différentes. Les mesures provenant de la littérature sont présentées en grisé. Références : (1 : Risgaard-Petersen et al., 2006; 2 : Høgslund et al., 2008; 3 et 4 : Piña-Ochoa et al., 2010a, 2010b; 5 : Bernhard et al., 2012a ; 6 : Article 2 Piran ; 7 : Chapitre *Melonis*). Les méthodologies particulières sont précisées.

Espèce	Origine	N (indiv.)	Taux (pmol indiv-1 d-1)	Référence	Note Methodologie
<i>Ammonia tepida</i>	Estuaire de la Loire	14	0		Déplacement pendant expérience
	Baie de l'Aiguillon	2	0	3	
<i>Bolivina subaenariensis</i>	Golfe de Gascogne	14	1,3		
	Golfe de Gascogne	10–12	78	3	
<i>Bulimina marginata</i>	Piran	3	0	6	
	Piran	6	0	6	pseudo-replication
	Golfe de Gascogne	8	0		
<i>Eggerella scabra</i>	Piran	3	0	6	
	Piran	4	0	6	pseudo-replication
	Piran	7	0	6	pseudo-replication
	D10a	7	0	6	
<i>Globobulimina sp.</i>	Golfe de Gascogne	3	48		
<i>Globobulimina turgida</i>	Gullmar fjord	3	565	1	N ¹⁵
	Gullmar fjord	2-3	263-453	4	
<i>Melonis barleeanus</i>	Golfe de Gascogne	6	0	7	9 jours Ax
	Golfe de Gascogne	9	0	7	9 jours AxN
	Golfe de Gascogne	10	0	7	49 jours Ax
	Golfe de Gascogne	10	0	7	49 jours AxN
	Golfe de Gascogne	10	0	7	49 jours OxN
	Golfe de Gascogne	10	0	7	49 jours AxN + 50µM NO ₃ pendant mesure
	Golfe de Gascogne	10	0	7	
<i>Uvigerina phlegeri</i>	Delta du Rhône	10	46	3	
<i>Valvulineria bradyana</i>	Delta du Rhône	10	183	3	
<i>Bolivina plicata</i>	OMZ Pérou	3	79	3	
<i>Bolivina seminuda</i>	OMZ Pérou	3	216	3	
<i>Nonionella cf. stella</i>	OMZ Chili	3-5	84	2	
<i>Stainforthia sp.</i>	OMZ Pérou	4	70	3	
<i>Valvulineria cf. laevigata</i>	OMZ Pérou	10	248	3	
<i>Bolivina argentea</i>	Santa Barbara	5-10	1976	5	N ¹⁵
<i>Fursenkoina cornuta</i>	Santa Barbara	5-10	1386	5	N ¹⁵

4. Discussion

4.1. Accumulation des nitrates intracellulaires

4.1.1. Est-ce que les foraminifères benthiques accumulent les nitrates dans leurs cellules ?

Certaines espèces testées au cours de cette thèse présentent des nitrates en quantité variable dans leur cellule. Nous cherchons ici à déterminer si les espèces sont capables ou non d'accumuler des nitrates dans leurs cellules i.e. si les concentrations en nitrates intracellulaires sont supérieures aux concentrations du milieu. Cela permet de déterminer si les nitrates sont présents dans la cellule par simple équilibre avec le milieu ou si les foraminifères maintiennent ces nitrates dans leur cellule contre les gradients chimiques. Piña-Ochoa et al. (2010a) ont défini que tous les individus présentant des concentrations > 0.1 mM ou plus de 10 fois la concentration maximale du milieu peuvent être considérés comme accumulant des nitrates.

Nous avons pu, pour certaines espèces estimer la concentration de nitrates (en divisant la quantité de nitrates par le biovolume de l'individu). Ainsi, pour les individus de *Melonis barleeanus* utilisés lors de l'expérience I (expérience d'incubation en conditions oxygènes, hypoxiques avec et sans nitrates) la concentration de nitrates moyenne dans la cellule est d'environ 8 mM (Figure 70). 1/3 de ces individus étaient incubés dans des conditions hypoxiques sans nitrates quand 2/3 étaient incubés dans des conditions oxygènes

ou hypoxiques avec 50 μ M de nitrates dans l'eau (voir Chapitre 3). La concentration en nitrates intracellulaire est ainsi environ 160 fois supérieure à la concentration en nitrates du milieu. Pour les *Bulimina marginata* de la même expérience, la plus faible concentration enregistrée est d'environ 1 mM (Figure 70) soit environ 20 fois la concentration en nitrates du milieu. D'après la définition énoncée par Piña-Ochoa et al. (2010a) tous les individus de ces deux espèces présentant des nitrates dans leurs cellules peuvent donc être considérés comme accumulant des nitrates dans leurs cellules.

Pour ces deux espèces la différence de concentration en nitrates intracellulaire et le milieu indique clairement que le milieu intracellulaire chez ces individus n'est pas à l'équilibre avec le milieu de vie vis-à-vis des nitrates et que ces foraminifères mobilisent de l'énergie pour accumuler des nitrates malgré un fort gradient chimique entre le milieu interne et externe.

Pour les autres espèces de notre étude nous pu déterminer la concentration de nitrates dans leur cellule et les concentrations en nitrates dans les milieux dans lesquels ces espèces vivent ne sont pas connues. Néanmoins, la quantité de nitrates intracellulaire minimale mesurée (différente de zéro) est 6 pmol (pour un spécimen d'*Ammonia tepida* utilisé lors d'une expérience de mesure de dénitrification ; Tableau 44). Pour que cet individu contenant le moins de nitrates atteigne la concentration seuil de 0.1 mM (seuil au delà duquel les foraminifères peuvent être considérés comme accumulant les nitrates dans leur cellule ;

Piña-Ochoa et al., 2010a) il faudrait que son biovolume soit de $60 \cdot 10^6 \mu\text{m}^3$. Un tel biovolume correspond à une demi-sphère d'environ $700 \mu\text{m}$ de diamètre. Lors de l'expérience I le diamètre maximum des *A. tepida* ne dépassait pas $400 \mu\text{m}$ et des foraminifères de plus de $500 \mu\text{m}$ de diamètre ne peuvent entrer dans la chambre de mesure de dénitrification. Les exemplaires des autres espèces étaient également de taille moyenne et ne dépassaient pas $500 \mu\text{m}$. Nous pouvons donc considérer que tous les foraminifères contenant plus de 6 pmol de nitrates dans leur cellule sont capables d'accumuler les nitrates.

Si nous pouvons considérer que tous les spécimens de notre étude contenant des nitrates sont capables d'accumuler des nitrates, nous observons néanmoins des taux d'accumulation plus faibles

que les taux observés chez les espèces accumulant les nitrates en très grande quantité. En effet, *Globobulimina turgida* prélevé dans le Gullmar Fjord (Suède) peut accumuler les nitrates à des concentrations 500 fois supérieures aux concentrations du milieu (Risgaard-Petersen et al., 2006). La capacité à accumuler les nitrates semble donc présenter une forte variabilité. Nous discutons dans les paragraphes suivants des paramètres pouvant influencer la variabilité intra- et interspécifique de la quantité de nitrates intracellulaire.

4.1.2. Variabilité intraspécifique et interspécifique de la capacité à accumuler les nitrates

Il apparaît que de nombreuses espèces sont capables d'accumuler des nitrates intracellulaires dans des quantités non négligeables. Il faut néanmoins noter que les espèces pour lesquelles aucun individu n'a été détecté avec des nitrates dans leur cellule sont souvent des espèces pour lesquelles peu d'individus ont été analysés. Un biais dû à une différence dans l'effort d'échantillonnage peut ainsi expliquer une grande partie de la variabilité interspécifique de la capacité à accumuler les nitrates. De plus, chez les espèces étant capables d'accumuler les nitrates, tous les individus n'ont pas de nitrates dans leur cellule (3/11 individus d'*E. scabra*, 2/10 *B. marginata*, 61/102 *M. barleeanus*, 27/63 *A. tepida*, 37/73 *B. marginata* et 29/52 *B. subaenariensis*). La variabilité de l'accumulation des nitrates est donc à la fois intra- et interspécifique.

Parmi les espèces étudiées ici, certaines ont déjà fait l'objet d'études (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høgslund et al., 2008; Piña-Ochoa et al., 2010a). Parmi les espèces n'accumulant pas de nitrates intracellulaires dans la présente étude, Piña-Ochoa et al. (2010a) présentent également *Ammonia beccarii* et *Nonion scaphum* comme des espèces n'étant pas capables d'accumuler des nitrates intracellulaires. Les trois autres espèces testées dans le cadre de notre étude (*Leptohalysis scottii*, *Textularia agglutinans* et *Fissurina* sp.) n'avaient pas été analysées précédemment par d'autres auteurs.

Parmi les espèces présentant des nitrates intracellulaires dans la présente étude seule *Eggerella scabra* n'avait pas été testée précédemment. Dans la littérature, *Bolivina subaenariensis*, *Ammonia tepida*, *Bulimina marginata* et *Melonis barleeanus* montrent des quantités de nitrates d'environ 280, 10, 30 et 5 pmol par cellule en moyenne respectivement (Piña-Ochoa et al., 2010a). Ces quantités de nitrates intracellulaires sont du même ordre de grandeur que celles que nous avons mesurées pour chacune des espèces *A. tepida*, *B. marginata* et *M. barleeanus* (Tableau 44). *Bolivina subaenariensis* présente des valeurs nettement supérieures dans Piña-Ochoa et al. (2010a) (280 pmol en moyenne dans la littérature contre 67 pmol/cellule dans les échantillons les plus riches de la présente étude). Les spécimens des deux études proviennent tous du Golfe de Gascogne (de la station G à 450 m de profondeur dans Piña-Ochoa et al. (2010a) et de la station K à 650m de profondeur dans la présente étude ; ces deux stations sont localisées à moins de 10 km l'une de l'autre et échantillonnées à deux moments différents). Nous discuterons du rôle de la variabilité spatiale dans le paragraphe suivant.

Finalement, la variabilité inter-spécifique pourrait également être liée à la capacité de survie en anoxie des foraminifères benthiques. Dans une expérience in situ d'analyse de l'effet de 10 mois d'anoxie sur les faunes de foraminifères benthiques, nous avons identifié les espèces résistantes et les espèces sensibles à l'anoxie (Langlet et al., 2013a). Nous avons observé que *Leptohalysis scottii* et *Textularia agglutinans* sont deux espèces sensibles à

l'anoxie (i.e. dont les densités diminuaient avec le temps d'incubation en anoxie) et qu'*Eggerella scabra* et *Bulimina marginata* sont résistantes à l'anoxie (i.e. ne montrent pas de diminution de densité avec le temps). Les 5 individus des deux espèces sensibles à l'anoxie que nous avons analysés (prélevés en conditions oxygénées) ne contiennent pas de nitrates dans leur cellule et 5 des 20 individus des deux espèces résistantes à l'anoxie contiennent des nitrates (Tableau 44). Les espèces étant capables d'accumuler les nitrates sembleraient donc mieux survivre en anoxie que les autres espèces suggérant que cette capacité est fortement liée au métabolisme anaérobie et que l'utilisation des nitrates – probablement via dénitrification (cette possibilité sera discutée dans une prochaine section) - permette de survivre plus longtemps à l'anoxie.

Si l'on sait désormais qu'en laboratoire l'apparition de l'anoxie stimule l'accumulation des nitrates dans la cellule (Høgslund et al., 2008) nous ne savons pas comment et quand les foraminifères prélèvent les nitrates dans l'eau interstitielle. Les différents auteurs suggèrent que les foraminifères vivant dans les microhabitats profonds anoxiques et sans nitrates migreraient verticalement vers des couches hypoxiques riches en nitrates pour recharger leur stock puis redescendre consommer ces nitrates en profondeur (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høgslund et al., 2008). En Mer Adriatique, les espèces résistantes à l'anoxie que sont *E. scabra* et *B. marginata* ne semblent pas migrer verticalement au cours de l'expérience. Cela pourrait être expliqué par le fait que des nitrates sem-

blent être présents à toutes les profondeurs à tous les temps d'échantillonnage (Koron et al., 2013). Le compartiment cellulaire dans lequel les nitrates sont stockés est également inconnu. En raison d'un grand nombre de vacuoles « vides » (vides de nourriture ou de bactéries lors d'une observation au MET) chez les foraminifères et les allogromiids, certains auteurs assurent que les nitrates sont stockés dans ces vacuoles (Bernhard et al., 2011, 2012) mais le faisceau de preuves est à ce jour relativement mince.

4.1.3. Quels sont les facteurs qui peuvent influencer la variabilité intraspécifique de quantité de nitrates intracellulaires ?

Taille des organismes

Nous avons pu mettre en évidence un effet positif de la taille des individus sur la quantité de nitrates intracellulaires de *Melonis barleeanus* quelque soit les conditions d'incubation lors de l'expérience I (Figure 70). Cette relation permet d'expliquer des changements exponentiels de la quantité de nitrates intracellulaire entre 29 et 90 pmol par cellule pour des individus de diamètre maximum compris entre 235 et 534 μm . Le coefficient de détermination du modèle est néanmoins relativement faible ($R^2 = 0.15$) confirmant la forte variabilité intraspécifique de la quantité de nitrates intracellulaire.

Les 36 individus de *Bulimina marginata* qui accumulent les nitrates ne montrent pas d'augmentation de leur stock de nitrates avec l'élongation des individus (Figure 70). Pour

les autres espèces les plus testées, le faible nombre d'individus d'*Ammonia tepida* utilisé lors de cette même expérience qui a accumulé des nitrates dans sa cellule ne permet pas de faire une telle analyse (seuls 18 individus présentent une quantité de nitrates non nulle).

Ces résultats suggèrent que pour certaines espèces les organismes de petite taille ont plus de nitrates que les organismes de grande taille dans leur cellule et que chez les deux espèces étudiées la concentration en nitrates est plus importante chez les petits individus que chez les grands individus.

A notre connaissance, une relation entre quantité de nitrates intracellulaire et la taille des foraminifères benthiques (comme chez *M. barleeanus*) n'a pas été mise en évidence précédemment dans la littérature. Une telle relation ne semble néanmoins pas être existante pour toutes les espèces de foraminifères benthiques.

Par contre, une diminution de la concentration de nitrates (i.e. la quantité de nitrates normalisée par le biovolume des individus) avec la taille est observée pour *Melonis barleeanus* et *Bulimina marginata* (Figure 70). Cette observation semble être strictement due à un effet géométrique. En effet, la concentration est une mesure de quantité de nitrates divisée par le biovolume de la cellule. Ce biovolume augmente de x^3 unités quand la taille individuelle augmente de x unités. En divisant la quantité de nitrates par une unité de taille à la puissance 3 il semble logique que cette mesure tende à diminuer avec la taille de l'organisme.

De telles relations entre quantité ou concentration de nitrates intracellulaire et taille de l'organisme ne peuvent être mises en évidence que chez des espèces pour lesquelles nous disposons d'un nombre important de mesures répliquées ainsi que chez des espèces pour lesquelles un nombre important d'individus présentent des nitrates dans leur cellule et une large gamme de taille. Les seuls jeux de données dont nous disposons pour supporter une telle analyse sont ceux des données expérimentales de *B. marginata* et *M. barleeanus*. Les différents individus utilisés proviennent ainsi de différentes conditions d'expérimentation, après différents temps d'incubation. Une étude complémentaire sur des individus issus de conditions environnementales plus homogènes pourrait permettre de confirmer ou d'infirmer les tendances que nous observons ici. Afin de mieux comprendre les changements de quantité et concentration de nitrates il est également nécessaire de mieux comprendre les processus qui régulent l'accumulation et la consommation des nitrates.

Variabilité spatiale

Certaines espèces comme *Melonis barleeanus* ont été analysées après des prélèvements à différents systèmes aquatiques. Les individus provenant de la marge continentale portugaise ou de la Mer du Nord semblent accumuler les nitrates en quantité relativement importante (Piña-Ochoa et al., 2010a; Geslin et al., 2014 ; Chapitre 3). Au contraire, les deux individus testés provenant du Delta du Rhône ne présen-

tent pas de nitrates dans leur cellule (Piña-Ochoa et al., 2010a).

De la même manière, *Bolivina subaenariensis* présente des quantités de nitrates moyennes différentes à deux stations dans le Golfe de Gascogne (47 individus varient entre 45 et 1023 pmol/cellule pour 285 pmol/cellule en moyenne à la station G à 450 m de profondeur dans Piña-Ochoa et al. (2010a) et 10 individus variant entre 25 et 114 pmol/cellule pour une moyenne de 67 pmol/cellule à la station K à 650m de profondeur dans la présente étude ; Tableau 43). Ces deux stations sont localisées à moins de 10 km l'une de l'autre dans le canyon de Cap Breton et ont été échantillonnées à deux moments différents.

Pour ces deux espèces, le nombre d'individus analysés aux divers sites d'échantillonnage est différent et les gammes de variations de chaque jeux de données sont parfois partiellement confondus (ex : *B. subaenariensis*). Ainsi, malgré une forte variabilité interindividuelle intra-sites, il semblerait qu'il puisse y avoir des différences entre deux sites d'études.

Cette variabilité inter-sites pourrait être expliquée par des différences de conditions environnementales aux deux stations ou à des différences biologiques.

Ne contrôlant pas les conditions géochimiques dans lesquelles les individus analysés ont été prélevés nous ne chercherons pas à expliquer ces différences spatiales par ces paramètres géochimiques. Nous pouvons néanmoins nous attendre à ce que ce soient essentiellement la disponibilité en oxygène et

la disponibilité en nitrates qui régulent l'accumulation de nitrates dans la cellule. Il semblerait que ce soit lorsque le milieu est anoxique et riche en nitrates que l'assimilation de nitrates est la plus importante (Høgslund et al., 2008). Nous discuterons également dans le paragraphe suivant de l'importance de l'histoire d'exposition à l'anoxie.

Les différences observées entre deux sites d'étude pourraient également s'expliquer par des différences biologiques. Bien que ce paramètre ne soit pas clairement contrôlé, nous avons identifié dans le paragraphe précédent que la taille des organismes pouvait influencer la quantité et la concentration de nitrates contenus dans la cellule des foraminifères. Si la capacité à accumuler les nitrates résulte d'une adaptation aux conditions environnementales, nous pouvons également nous attendre à ce que deux populations distinctes vivants des milieux différents à deux sites peu connectés présentent des quantités de nitrates différentes dans leurs cellules.

Histoire d'exposition à l'anoxie

La variabilité intra-spécifique pourrait être influencée par l'histoire d'exposition à l'oxygène et aux nitrates des individus (Piña-Ochoa et al., 2010b). Certains individus de *Globobulimina turgida* conserveraient leur nitrates intracellulaires plus longtemps lorsqu'ils sont incubés dans un milieu favorable à la respiration (soit bien oxygéné avec des nitrates) que lorsque l'oxygène et les nitrates sont absents (Piña-Ochoa et al., 2010b). Similairement, *Bulimina marginata* montre une

diminution de son stock de nitrates uniquement en conditions hypoxiques sans nitrates (Geslin et al., 2014). Ces observations suggèrent une utilisation de ce stock de nitrates – probablement via dénitrification – lorsque l'oxygène et les nitrates viennent à manquer dans le milieu. Ce mécanisme ne semble pas être présent chez toutes les espèces capables d'accumuler les nitrates. En effet, lorsqu'elles sont incubées en hypoxie ou en anoxie sans nitrates ni *Ammonia tepida* ni *Melonis barleeanus* ne montrent de diminution significative de leur stock de nitrates (Geslin et al., 2014 ; Chapitre 3).

La disponibilité de l'oxygène semblerait donc influencer la concentration en nitrates intracellulaire chez certaines espèces pour lesquelles la dénitrification a été mise en évidence. D'autres facteurs tels que la disponibilité de nourriture ou la variabilité spatiale semblent également expliquer une part de la variabilité des concentrations en nitrates. En effet, lors d'une incubation de *G. turgida* en milieu oxygéné pendant 84 jours sans apport complémentaire de nourriture, la concentration en nitrates intracellulaire a diminué fortement en fin d'expérience (Piña-Ochoa et al., 2010b). Ces résultats suggèrent que le manque d'accès à la nourriture rendrait plus difficile et extrêmement coûteux le maintien du stock de nitrates contre les gradients extérieurs (Piña-Ochoa et al., 2010b).

4.2. Etendue de la capacité à dénitrifier chez les foraminifères benthiques

Six espèces de foraminifères benthiques étant capables d'accumuler des nitrates dans leur cellule ont été testées pour déterminer leur capacité à dénitrifier.

Dans nos mesures, deux espèces semblent être capables de dénitrifier. *Bolivina subaenariensis* et *Globobulimina* sp. montrent une production de protoxyde d'azote permettant d'estimer des taux de dénitrification de 1.3 et 48.0 pmol/ind./jour respectivement (Tableau 45). Pour ces deux espèces les taux de dénitrification sont nettement inférieurs à ceux présentés dans la littérature (*B. subaenariensis* : 78 pmol/ind./jour et *G. turgida* : 263-565 pmol/ind./jour ; Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010a, 2010b). Cette différence peut être due au fait que les espèces de la présente étude ont été conservées au laboratoire relativement longtemps avant d'être analysées et auraient ainsi potentiellement pu perdre une partie de leur stock de nitrates intracellulaire (ce stock étant nécessaire à la dénitrification lors des mesures faites dans des eaux sans nitrates). Pourtant, la mesure effectuée sur *Bolivina subaenariensis* a été faite au moment du début de l'expérience II (expérience d'incubation en anoxie). A ce moment, nous avons analysé la quantité de nitrates intracellulaire de 10 autres individus. Ces 10 individus contenaient des nitrates à une dose moyenne de 67 pmol/cellule (Tableau 44). Comme discuté dans le paragraphe précédent, cette valeur est néanmoins 4 fois plus faible que les valeurs

reportées précédemment dans la littérature (Piña-Ochoa et al., 2010a) pour la même espèce prélevée également dans le Golfe de Gascogne (mais à deux moments et deux stations différentes). Nous n'avons pas analysé la teneur en nitrates intracellulaires des *Globobulimina* sp. provenant du Golfe de Gascogne sur lesquels nous avons faits les tests de dénitrification. Mais Piña-Ochoa et al. (2010a) ont analysé 1 individu de *Globobulimina affinis* du Golfe de Gascogne et 20 *Globobulimina turgida* du Gullmar fjord accumulant respectivement 3300 et 18000 pmol/individ.. Si ces différences sont dues à une différence de sites et pas à une différence inter-spécifique, il semblerait que les *Globobulimina* sp. du Golfe de Gascogne accumulent moins de nitrates que celles du Gullmar Fjord. Ainsi, pour ces deux genres, les spécimens sur lesquels nous avons fait les tests de dénitrification sembleraient avoir moins de nitrates dans leur cellule que ceux pour lesquels des taux de dénitrification supérieurs ont été précédemment reportés (Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010a, 2010b). La quantité de nitrates disponible dans la cellule semble ainsi influencer les taux de dénitrification.

Les analyses effectuées avec plusieurs individus d'*Ammonia tepida*, *Bulimina marginata*, *Eggerella scabra* et *Melonis barleeanus* n'ont pas permis de détecter une production de protoxyde d'azote (Tableau 45). Ces résultats sont étonnants pour certaines espèces qui présentent un mode de vie suggérant l'utilisation de nitrates en anoxie. Par exemple, *Melonis barleeanus* est une espèce qui présente un microhabitat endopélique intermédiaire et qui

vit principalement dans la zone hypoxique du sédiment où la réduction des nitrates a lieu (Jorissen et al., 1998; Fontanier et al., 2002; Koho et al., 2008). *Melonis barleeanus* a ainsi été qualifiée d'espèce potentiellement dénitrifiante (Koho et Piña-Ochoa, 2012) ce qui permettrait d'expliquer le fait qu'elle puisse survivre à 69 jours d'anoxie (cf. chapitre 3). Pour cette espèce, les 7 replicats de mesure effectués sont tous négatifs, *Melonis barleeanus* ne semble pas être capable de dénitrifier.

4.3. Rôle du métabolisme anaérobie dans la survie en anoxie

Nos observations permettent de mettre en évidence que certaines espèces telles qu'*Ammonia tepida*, *Bulimina marginata*, *Eggerella scabra* ou *Melonis barleeanus* sont capables d'accumuler les nitrates dans leurs cellules mais ne sont apparemment pas capables de les utiliser via dénitrification. De plus, les expériences que nous avons menées au cours de cette thèse montrent que ces espèces sont capables de survivre à plusieurs mois d'anoxie. En effet, *Melonis barleeanus* et *Ammonia tepida* sont capables de survivre en laboratoire à 69 jours d'anoxie (Chapitre 3, Geslin pers. com.) et en Mer Adriatique, *Eggerella scabra* et *Bulimina marginata* peuvent survivre à plus de 10 mois d'anoxie (Chapitre 1). Ces observations sont assez contradictoires avec le fait que nous n'ayons pu mettre en évidence de la dénitrification par l'expérience.

Nous discuterons dans les paragraphes suivants de trois hypothèses qui peuvent expliquer ces observations paradoxales : 1) soit la

méthode que nous employons ne permet pas de détecter la capacité à dénitrifier des foraminifères s'il les taux de dénitrification sont trop faibles, 2) soit la disponibilité des nitrates peut limiter la dénitrification et 3) les foraminifères peuvent utiliser d'autres voies métaboliques anaérobies.

4.3.1. Limites méthodologiques : limite de détection

Les taux de dénitrification sont estimés à partir de la méthode publiée initialement par Risgaard-Petersen et al. (2006). La limite de détection des microélectrodes commercialisées par Unisense est de $0.5 \mu\text{M}$. Les microélectrodes que nous utilisons sont des versions simplifiées des électrodes produites en série et ne possèdent pas de chambre extérieure contenant de l'ascorbate de sodium. Ces microélectrodes sont légèrement plus sensibles que la version produite en série. Les mesures de gradient de concentration sont faites sur une distance de $400 \mu\text{m}$. Sur la base d'une limite de détection de $0.5 \mu\text{M}$, le gradient minimal détectable serait de $12.5 \text{ nmol cm}^{-4}$. Calculé à partir de la loi de diffusion de Fick (cf. paragraphe Partie I.2.4), le taux de respiration minimal détectable pour l'ensemble des individus présents dans la chambre de mesure serait donc de 24 pmol/j (pour tous les individus). Reporté au nombre d'individus, ce taux de détection minimal atteint 4.8, 2.4 et 1.6 pmol/ind./j s'il y'a respectivement 5, 10 ou 15 individus dans la chambre de mesure.

Dans des conditions classiques de mesure, les individus sont placés dans la chambre de mesure dans laquelle la concentration en oxy-

gène diminue progressivement pour atteindre l'anoxie en moins d'une heure. Chez les espèces étant capables de dénitrifier, nous observons de la production de N_2O moins d'une heure après l'apparition de l'anoxie. Si aucune production de N_2O n'est observée au cours de l'heure ou des deux heures suivant l'installation de l'anoxie, nous considérons que les organismes ne dénitrifient pas. Afin de nous assurer que la production de N_2O n'est pas dépendante du temps d'acclimatation des espèces, nous avons parfois fait des mesures pendant plus de 12 h sur *Melonis barleeanus*. Nous avons également tenté d'incuber les individus préalablement pendant 9 ou 49 jours en anoxie avec et sans nitrates. Tous ces résultats indiquent que cette espèce n'est pas capable de dénitrifier. Ces résultats suggèrent également que si certaines espèces ne présentent pas de production de N_2O ce n'est pas en raison d'un problème de temps d'acclimatation aux conditions de mesure.

Il semblerait ainsi que si nous ne détectons pas de dénitrification chez des espèces résistantes à l'anoxie c'est soit car leurs taux de dénitrification sont inférieurs à quelques pmol/ind./j soit car ils ne dénitrifient pas.

4.3.2. Utilité des nitrates

Afin de pouvoir détecter l'un des produits intermédiaires de la dénitrification (le N_2O), il est nécessaire que les individus aient accès à une source de réactif (NO_3) suffisante. Nous discutons ici de la disponibilité des nitrates dans la cellule du foraminifère et dans l'eau du milieu qui l'entoure lors de la mesure.

Utilisation des nitrates intracellulaires par dénitrification

Dans la section précédente, nous suggérons qu'une faible quantité de nitrates intracellulaire peut tendre à diminuer le taux de dénitrification. De la même manière, une quantité de nitrates intracellulaire insuffisante pourrait éventuellement expliquer l'absence de dénitrification observée chez certaines espèces.

Nous avons quantifié pour deux espèces le stock de nitrates intracellulaire après un test de dénitrification négatif. 3 des 6 individus testés pour l'espèce *Eggerella scabra* présentaient 67 pmol de nitrates par individu en moyenne (moyenne des 3 individus positifs ; Tableau 44) après environ 24h de test en anoxie et 7 des 12 individus d'*Ammonia tepida* analysés présentaient en moyenne 12 pmol (moyenne des 7 individus positifs) après 45h d'exposition à l'anoxie. De plus, le stock de nitrates total minimum (la somme des quantités de l'ensemble des individus mesurés) à la fin de l'expérience pour ces deux espèces est de 200 et 84 pmol pour *E. scabra* et *A. tepida* respectivement. Ce stock total pourrait permettre de supporter la dénitrification pendant respectivement 8 et 3 jours au taux de dénitrification minimum détectable identifié précédemment (24 pmol/j ; paragraphe 4.3.1). Il semblerait ainsi que pour ces espèces le stock de nitrates était suffisant pour que de la dénitrification soit détectée avec la méthode que nous avons utilisé.

Néanmoins, nous ne savons pas si le taux de dénitrification minimum détectable est suffisant pour supporter la survie des organismes

en anoxie (si ce taux de dénitrification produit suffisamment d'énergie pour permettre aux individus d'être actifs). Nous ne savons pas non plus si la quantité de nitrates intracellulaire peut limiter le déclenchement de la dénitrification et si les foraminifères sont capables de puiser des nitrates jusqu'à épuisement de ce stock. Nous ne sommes pas en mesure de répondre à ces questions à partir de nos données ou à partir de la littérature. Dans la section suivante nous essayerons de proposer des hypothèses alternatives à la dénitrification qui pourrait permettre d'expliquer la présence de nitrates dans la cellule des foraminifères.

Les foraminifères peuvent-ils utiliser directement les nitrates présents dans l'eau ?

Dans la littérature, Risgaard-Petersen et al. (2006) reportent que les foraminifères benthiques peuvent assimiler les nitrates présents dans l'eau qui les entoure et Høgslund et al. (2008) estiment que la vitesse d'accumulation des nitrates peut atteindre au maximum 864 pmol de nitrates par individu par jour (correspondant à un passage 58 pmol/individ. à 242 pmol/individ. en 20h). Les foraminifères peuvent ainsi accumuler très rapidement des nitrates dans leur cellule mais nous ne savons pas s'ils peuvent utiliser directement les nitrates du milieu pour la dénitrification, sans les accumuler au préalable.

Afin d'apporter des réponses à cette question nous avons mené une expérience lors de laquelle nous testons la capacité à dénitrifier de *Melonis barleeanus* en présence de nitrates (à une concentration de 50 μM , sur des individus préalablement incubés pendant 49 jours

en anoxie avec nitrates) dans l'eau de la chambre de mesure. Ce test est négatif (Tableau 45), indiquant que cette espèce ne peut dénitrifier ni à partir de son stock de nitrates intracellulaire ni à partir des nitrates présents dans l'eau du milieu.

Si l'on extrapole cette mesure unique à l'ensemble des espèces qui ne sont pas capables de dénitrifier, nous pouvons nous attendre à ce que les espèces qui ne sont pas capables de consommer leurs nitrates intracellulaire par dénitrification ne soient pas capables n'ont plus d'utiliser directement les nitrates présents dans le milieu.

4.3.3. Stratégies de vie en anoxie et autres voies métaboliques

Arrêt potentiel de l'activité métabolique en anoxie ?

Il reste donc de nombreuses zones d'ombre concernant les voies métaboliques et les stratégies qui permettent aux foraminifères de survivre à l'anoxie. Aux cours de nos expériences, une observation complémentaire a été faite sur *Ammonia tepida*. Certains individus de cette espèce seraient capables d'accumuler les nitrates et de survivre à plus de 69 jours d'anoxie mais *A. tepida* n'est apparemment pas capable de dénitrifier. Au cours d'un essai de quantification de dénitrification nous avons pu observer que des spécimens provenant de l'estuaire de la Loire étaient capables de se déplacer verticalement dans la chambre de mesure et ce malgré le fait que les mesures de microélectrode à oxygène montraient que cette chambre de mesure était clairement en

anoxie (limite de détection de l'électrode : 0.3 μM). Suite aux mesures de dénitrification négatives la chambre a été placée en position horizontale, et le déplacement des individus a été enregistré. Nos observations montrent qu'*A. tepida* se déplace durant les 36 premières heures d'anoxie (<http://youtu.be/-9rkQO4caoU>). La vitesse de déplacement maximale des individus varie entre environ 1 et 2 mm/h ce qui est du même ordre de grandeur que la vitesse de déplacement vertical dans du sédiment oxygéné pour *Ammonia beccarii* (Groß, 2000). Entre 40 et 47 heures d'anoxie les individus sont immobiles et ne seraient ainsi plus capables de se déplacer. A la fin de l'expérience, 7 des 11 individus testés contenaient des nitrates dans leur cellule à une dose moyenne d'environ 12 pmol (Tableau 44).

Ces observations sur *Ammonia tepida* n'ont été faites que sur un réplicat mais des observations similaires ont été faites sur *Melonis barleeanus*. Dans le chapitre précédent, nous mettons en évidence dans l'expérience II (expérience d'incubation de spécimens en conditions oxygénées et anoxiques) que l'activité de déplacement de *M. barleeanus* est réduite voire stoppée entre le début de l'expérience et le premier échantillonnage analysé après les 2 premières semaines d'exposition à l'anoxie.

En résumé, *A. tepida* et *M. barleeanus* semblent pouvoir accumuler les nitrates sans les utiliser pour la dénitrification et peuvent être actives jusqu'à environ 36 heures en anoxie (pour *A. tepida* et entre 0 et 2 semaines pour *M. barleeanus*). Ces deux espèces peuvent survivre dans de telles conditions plus de 69

jours. Les mécanismes qui leur permettent de survivre en anoxie et de maintenir une activité de déplacement pendant quelques jours ne sont à ce jour pas connus.

Dans une expérience d'incubation en anoxie de sédiment du Drammensfjord, Bernhard et Alve (1996) montrent une diminution d'un indicateur de l'activité métabolique (la concentration d'ATP) en anoxie chez *Adercotryma glomeratum* et *Psammosphaera bowmanni*. Il semblerait ainsi qu'un nombre important d'espèces de foraminifères soit capable de maintenir une activité métabolique faible en anoxie.

Les foraminifères benthiques pourraient avoir une stratégie de réponse à l'anoxie en deux temps. Dans un premier temps, lorsque l'anoxie apparaît, les individus sont capables de se déplacer. Ce déplacement pourrait permettre aux organismes de tenter d'échapper à la zone affectée par l'anoxie. D'après les observations faites sur *A. tepida*, cette première phase pourrait durer une quarantaine d'heures. Dans un second temps, les individus n'ayant pas réussi à quitter la zone anoxique stopperaient leur déplacement pour économiser leur énergie et tenter de survivre à l'anoxie.

Nous avons pu mettre en évidence le fait que différentes espèces de foraminifères sont capables de se déplacer de plusieurs millimètres en anoxie, en complément il serait intéressant de tenter d'observer l'activité pseudopodiale de ces individus dans les mêmes conditions. Cela permettrait d'identifier si les foraminifères sont capables de présenter une « micro activité » et de voir si les pseudopodes peuvent éventuellement

permettre au foraminifère d'atteindre un microenvironnement oxygéné (Goldstein, 1999).

Plusieurs méthodes quantitatives ou simplement qualitatives permettent d'identifier l'activité d'un foraminifère benthique. L'ARNm actif peut être marqué par des sondes moléculaires fluorescentes (technique FISH ; Borrelli et al., 2011) permettant ainsi d'identifier les individus pour lesquels la transcription de l'ADN est en cours. Cette technique pourrait ainsi permettre d'identifier si les individus survivant à l'anoxie sont actifs métaboliquement. Ce type de technique ne permet néanmoins pas de connaître par quelle(s) voie(s) métabolique(s) les individus sont actifs.

Cette hypothèse de réduction de l'activité des foraminifères en anoxie présente néanmoins quelques limites. En effet, lors de l'expérience menée en Mer Adriatique nous avons pu observer que certaines espèces sont sensibles à l'anoxie quand d'autres ne présentent pas de changement de densité. Si la réduction de l'activité métabolique est le seul mécanisme de survie en anoxie, nos observations en Mer Adriatique suggèrent que toutes les espèces de foraminifères ne sont pas en mesure d'utiliser cette stratégie. Il faudrait ainsi pouvoir être en mesure d'expliquer pourquoi certaines espèces sont capables de réduire leur activité quand d'autres ne peuvent pas. De plus, les mesures d'activité moléculaire (mesures d'ARNr) ainsi que les observations qualitatives d'activité enzymatique (avec la sonde fluorescente CTG) que nous avons effectuées montrent que plusieurs espèces sont actives après 10 mois d'anoxie. Il faut

ainsi considérer que les foraminifères réduisent leur activité et non pas un arrêt complet de l'activité.

Dans le paragraphe suivant nous cherchons à identifier quels métabolismes anaérobies alternatifs pourraient être utilisés par les foraminifères.

Autres métabolismes à base de Nitrates

Certaines espèces de foraminifère pouvant survivre plusieurs mois en anoxie sont capables d'accumuler des nitrates (pour une partie des individus) dans leur cellule mais ne peuvent apparemment pas dénitrifier. Accumuler et maintenir des nitrates dans la cellule contre les gradients chimiques est coûteux (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008). Si l'on raisonne en termes d'optimisation des dépenses énergétiques, stocker des nitrates sans les utiliser n'a aucun intérêt pour le foraminifère. Il serait ainsi possible que les foraminifères utilisent les nitrates par d'autres voies métaboliques que la dénitrification.

Une voie de réduction des nitrates potentielle serait l'ammonification (*Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium* ; DNRA). L'ammonification est une voie métabolique anaérobie de réduction des nitrates en ammoniac ou en ammonium ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$; Simon, 2002). Ce processus a été observé chez un nombre important de bactéries (Simon, 2002). Cette voie métabolique produirait moins d'énergie libre que la dénitrification (Strohm et al., 2007) mais serait plus efficace dans des conditions riches en matière organique et pauvres en nitrates car elle per-

met de transférer 8 électrons contre 5 pour la dénitrification (Megonigal et al., 2003; Mohan et Cole, 2007). L'ammonification a été mise en évidence dans de nombreux estuaires et lagons côtiers (Jørgensen, 1989; Rysgaard et al., 1996). Dans les milieux ayant un ratio C/N (carbone organique/nitrates) important, tels que certains milieux côtiers (Zeebe et Wolf-Gladrow, 2001), l'ammonification serait la voie de réduction des nitrates dominante (Bonin, 1996; Megonigal et al., 2003; Burgin et Hamilton, 2007). Ce phénomène pourrait expliquer pourquoi est ce que contrairement aux foraminifères des milieux anoxiques permanents profonds les foraminifères des milieux côtiers ne sont pas capables de dénitrifier. L'ammonification pourrait ainsi être la voie de réduction des nitrates préférentielle pour les foraminifères benthiques des milieux côtiers. Pour pouvoir confirmer cette hypothèse il faudrait être en mesure de marquer isotopiquement des nitrates. Après vérification de l'assimilation de ces nitrates dans la cellule, la mesure d'ammonium marqué signifierait que les foraminifères sont capables de réduire les nitrates en ammonium.

Une autre voie de réduction des nitrates a été mise en évidence chez des bactéries oxydant le méthane colonisant des fossés d'eau douce anoxiques (Ettwig et al., 2010). Cette voie est un dérivé de la dénitrification avec la différence que le monoxyde d'azote (NO) n'est pas réduit en protoxyde d'azote (... \rightarrow NO \rightarrow N₂O \rightarrow N₂) mais forme de l'oxygène et du diazote (NO₃⁻ \rightarrow NO₂⁻ \rightarrow NO \rightarrow N₂ + O₂; Ettwig et al., 2010). Cette voie métabolique produit ainsi du dioxygène qui est utilisé par

cette bactérie anaérobie pour oxyder le méthane. A notre connaissance, l'enzyme qui catalyse cette réaction (*nitric oxyde dismutase*) n'a pas été identifiée chez d'autres organismes. Cette voie métabolique serait une piste à explorer, en effet, cette voie est proche de la dénitrification, certains foraminifères benthiques possèderaient ainsi la plupart des enzymes pour catalyser les étapes initiales de la réaction, elle est consommatrice de nitrates et ne produit pas de N₂O (ce qui pourrait expliquer les tests de dénitrification négatifs) mais de l'oxygène qui pourrait ainsi être potentiellement disponible pour la respiration des individus. Il semble ainsi peut probable que cet oxygène produit soit mesurable dans le milieu extérieur puisqu'il est fort vraisemblable qu'il soit directement consommé dans la cellule du foraminifère. Cette voie métabolique pourrait ainsi être mise en évidence par l'identification moléculaire du gène codant pour l'enzyme qui catalyse cette réaction.

Ammonia tepida, *Bulimina marginata* et *Melonis barleeanus* sont capables d'accumuler les nitrates mais ne semble pas pouvoir de les utiliser par dénitrification en anoxie. Il est possible que ces espèces soient capables d'utiliser une autre voie métabolique de réduction des nitrates telle que l'ammonification qui réduit les nitrates en ammonium. Il est également envisageable que les nitrates n'interviennent pas dans la survie de cette espèce à l'anoxie et que de réduire ou stopper leur activité métabolique leur permet de survivre en absence d'oxygène.

Autres métabolismes anaérobie ?

La plupart des organismes eucaryotes vivant dans des milieux anoxiques sont capables de faire différents types de fermentation (Oren, 2012). A notre connaissance, de tels mécanismes, qui forment souvent des produits toxiques (ex : la fermentation alcoolique ou lactique) n'ont pas été mis en évidence chez les foraminifères benthiques. Afin de mieux comprendre leur métabolisme, il serait intéressant de connaître le métabolisme anaérobie des organismes appartenant au phylum Lophotrochozoa. En effet, trois espèces appartenant à ce groupe ont été observées vivantes dans les sédiments du bassin méditerranéen hypersalin et anoxique en permanence de L'Atalante (Danovaro et al., 2010). Le métabolisme de ces organismes est encore inconnu mais les observations ultra-structurales montrent qu'ils ne possèdent pas de mitochondries mais des organelles semblables à des hydrogenosomes. Ce type d'organelle est observé chez certains ciliés anaérobies, trichomonadés (trichomonads, des protistes anaérobies) et certains organismes fongiques (Oren, 2012) et permettrait de générer de l'ATP par fermentation du pyruvate (qui est un produit de l'équivalent anaérobie de la glycolyse ; Bernhard et Sen Gupta, 1999; Fenchel, 2012). Ce type d'organelles n'est pas présent chez les foraminifères qui auraient plutôt des mitochondries (Bernhard et Sen Gupta, 1999). Nous ne sommes ainsi pas en mesure de mettre en évidence que les foraminifères benthiques sont capables de présenter ces voies métaboliques anaérobie observées chez d'autres or-

ganismes eucaryotes. La diversité des voies métaboliques anaérobies utilisées par les eucaryotes est plus faible que le grand nombre de stratégies qui permettent aux procaryotes de vivre et croître en anoxie.

Afin d'identifier de potentielles voies métaboliques anaérobies pour les foraminifères nous essayons de voir si certaines stratégies observées chez les bactéries peuvent être présentes chez les foraminifères. Le métabolisme anaérobie procaryote utilise une grande variété de composés comme accepteur d'électrons (nitrates, nitrites, oxydes de manganèse, de fer, sulfates, dimethyl sulfoxyde, etc. ; Oren, 2012).

Nous nous sommes focalisé sur les voies métaboliques basés sur un métabolisme azoté puisque nous avons montré que seules les espèces présentant des nitrates dans leur cellule seraient capables de survivre en anoxie. L'accepteur d'électron le plus susceptible d'être utilisé par les foraminifères serait ainsi les nitrates mais l'utilisation d'autres accepteurs d'électron tels qu'observés chez des organismes procaryotes. Si de telles voies métaboliques n'ont jamais été mis en évidence chez des eucaryotes tels que les foraminifères, il faut rappeler que c'était également le cas la dénitrification avant qu'elle ne soit mise en évidence chez les foraminifères benthiques en 2006 par Risgaard-Petersen et ses collaborateurs. L'ensemble de ces deux voies métaboliques alternatives seraient ainsi des pistes à explorer qui pourraient expliquer la survie en anoxie des espèces qui ne sont pas capables de faire de la dénitrification.

4.3.4. Différences entre les espèces des milieux côtiers et les espèces des milieux anoxiques permanents

Dans ce chapitre nous nous sommes focalisés essentiellement sur l'analyse du métabolisme anaérobie d'espèces affectées périodiquement par des phénomènes d'anoxie (des espèces des milieux côtiers à anoxie saisonnières et *Melonis barleeanus* qui vit dans un microhabitat intermédiaire hypoxique et parfois anoxique (cf. Chapitre 1). Dans les études précédentes, les auteurs se sont majoritairement intéressés aux espèces vivant dans des milieux anoxiques en permanence (espèces vivants sous l'OPD : Profondeur de pénétration d'oxygène ou dans les OMZ : Zone à oxygène minimum).

Nos observations montrent que les espèces des milieux ou microenvironnements périodiquement anoxiques contiennent des nitrates en relativement faible quantité (< 500 pmol/cellule) et ne sont apparemment pas capable de dénitrifier. Au contraire, les espèces des milieux anoxiques permanents accumulent des nitrates en grande quantité dans leur cellule (> 1000 pmol/cellule) et sont capables de les consommer par dénitrification (Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010a, 2010b; Bernhard et al., 2012).

La durée d'exposition à l'anoxie pourrait affecter la quantité de nitrates accumulés dans la cellule des foraminifères ainsi que leur capacité à dénitrifier. En effet, dans les milieux côtiers et dans l'ensemble des milieux périodiquement anoxiques, une réduction de l'activité métabolique (dormance) pourrait

être suffisant pour permettre aux organismes de survivre à quelques semaines d'anoxie. Ces individus reprendraient ensuite leur activité dès que l'oxygène est de nouveau présent dans le milieu. Au contraire, les foraminifères vivant dans les milieux anoxiques permanents OMZ ou sous l'OPD ne peuvent rester inactifs en attendant une éventuelle ré-oxygénation et maintiendraient ainsi leur activité par dénitrification.

Comme suggéré précédemment, les différences de conditions géochimiques (notamment de rapport Corg/Nitrates) entre les milieux côtiers et les environnements profonds (dans lesquels se trouvent les espèces vivant sous l'OPD ou dans l'OMZ) pourrait également expliquer le fait que les foraminifères des milieux côtiers utilisent une voie de réduction de nitrates alternative (l'ammonification).

Les analyses réalisées au cours de cette thèse suggèrent ainsi que les foraminifères des milieux côtiers n'utilisent pas les mêmes voies métaboliques anaérobies que les foraminifères des milieux profonds. Nos analyses permettent d'envisager quelles voies anaérobies sont des candidats potentiels pour expliquer la survie des foraminifères en milieux côtiers.

Partie III. Conclusions

Les analyses du métabolisme aérobie menées au cours de cette thèse permettent de confirmer les connaissances de la littérature qui montrent que le taux de respiration des foraminifères est lié au biovolume des organismes. Nos observations supplémentaires ont permis d'affiner l'estimation faite précédemment dans la littérature de la relation entre le biovolume et le taux de respiration des foraminifères benthiques. Cette relation entre biovolume et taux de respiration permet d'estimer la part des foraminifères à la respiration benthique à différents sites. Avec la nouvelle relation les estimations du rôle que jouent les foraminifères dans la respiration sont légèrement plus faibles que les précédentes estimations.

La taille des organismes semble ainsi être le principal facteur qui influence la variabilité inter- et intra-spécifique. Néanmoins, dans une analyse qui ne peut être considérée que comme étant exploratoire (en raison de la construction du jeu de données) nous suggérons que le microhabitat et la profondeur du site d'étude peuvent également influencer les taux de respiration. En effet, les taux de respiration (normalisés par le biovolume) des espèces vivant profondément dans le sédiment seraient plus faibles que ceux des espèces colonisant un microhabitat superficiel plus riche en matière organique et en oxygène. Nous suggérons également que la profondeur

du site d'échantillonnage influence le métabolisme aérobie. L'activité métabolique la plus importante est observée en milieu intertidal et tendent à diminuer avec la profondeur du milieu. Les conclusions de nos observations de l'influence de ces paramètres supplémentaires sur les taux de respiration sont à considérer comme strictement hypothétiques (en raison de la représentativité du jeu de données) et ont pour vocation essentielle de proposer des perspectives de travail pour les prochaines études du métabolisme aérobie.

Nos analyses du métabolisme anaérobie montrent une forte variabilité inter- et intra-spécifique de la capacité à accumuler les nitrates. Il semblerait que les espèces étant capables d'accumuler les nitrates soient des espèces qui survivent en anoxie suggérant que cet accepteur d'électron intervient dans la survie en anoxie potentiellement par la dénitrification. Des mesures de dénitrification ont été faites sur différentes espèces résistantes à l'anoxie. Nous montrons que toutes les espèces étant capables d'accumuler les nitrates et de survivre lorsque les conditions sont anoxiques ne sont pas systématiquement capables de dénitrifier. Cela suggère que soit les nitrates n'interviennent pas dans le métabolisme anaérobie ou qu'ils sont utilisés par une voie métabolique différente, et par exemple par l'ammonification. Nous montrons également que ces espèces capables d'accumuler

des nitrates et de survivre en anoxie sans dénitrifier peuvent être mobiles pendant les premiers jours du développement de l'anoxie. Les voies métaboliques utilisées pour permettre la mobilité de ces espèces pendant l'anoxie ne sont à ce jour pas connues. Au delà de ces quelques jours d'anoxie, les individus stoppent de se déplacer, suggérant un

arrêt – ou un ralentissement - de l'activité métabolique. Nos analyses ne permettent pas d'identifier les voies métaboliques anaérobies utilisées par les foraminifères benthiques qui résistent à l'anoxie dans nos expériences mais permettent d'orienter les recherches futures vers des voies de réduction des nitrates autres que la dénitrification.

Synthèse générale

1. Quels sont les effets de l'anoxie sur les foraminifères benthiques ?

Dans les chapitres précédents nous avons présenté la réponse des foraminifères benthiques en fonction des différentes approches utilisées (études *in situ*, expériences menées sur le terrain, expériences en laboratoire et mesures de métabolisme). Dans cette première section de la synthèse, nous résumerons les effets de l'anoxie en fonction des différentes structures biologiques et écologiques analysées. Dans cette thèse nous avons cherché à évaluer l'effet de l'anoxie sur les foraminifères benthiques à l'échelle de la communauté, de la population et de l'individu.

1.1. Réponse à l'anoxie à l'échelle de la communauté

Au cours de cette thèse, nous avons pu observer que les effets de l'anoxie sur les communautés de foraminifères benthiques sont différents aux deux sites d'études : l'ancien estuaire du Grevelingenmeer et la Mer Adriatique Nord.

Le Chapitre 1 présente l'expérience que nous avons menée dans le Golfe de Trieste (Mer Adriatique). Lors de cette expérience, 4 chambres benthiques ont été placées pendant 9 jours, 1 mois, 2 mois et 10 mois sur le sédiment à 24 m de profondeur. Une fois la chambre isolée du milieu extérieur, l'oxygène

dissous dans l'eau est consommé et l'anoxie est atteinte après 7 jours d'expérience. Les données issues de l'analyse de la géochimie des eaux porales (discutées en détail dans la partie I et IV du chapitre 1) indiquent qu'après 9 jours, 1 mois et 10 mois d'expérience les conditions dans l'eau surnageant le sédiment et dans l'eau interstitielle du sédiment sont réductrices. Les résultats suggèrent ainsi que l'anoxie qui apparaît 7 jours après le début de l'expérience est maintenue pendant les 10 mois de l'expérience.

Deux carottes sédimentaires ont été prélevées dans une zone non-affectée par l'anoxie (« Normoxie ») ainsi que dans chacune des 4 chambres benthiques après 9 jours, 1, 2 et 10 mois d'expérience. Dans l'ensemble de ces carottes nous avons déterminé les densités de foraminifères benthiques vivants de tailles supérieures à 63 μm .

Nos résultats montrent qu'il y'a des foraminifères vivants (positifs au CTG) dans l'ensemble des carottes analysées à des densités moyennes comprises entre ~ 1400 individus par 10 cm^2 en « Normoxie » et ~ 600 individus par 10 cm^2 après 10 mois d'exposition d'anoxie (Chapitre 1 Partie II). Ces résultats suggèrent très fortement que les foraminifères benthiques peuvent survivre à 10 mois d'anoxie.

Les densités sont estimées à partir de la méthode de détermination de la vitalité basée sur la sonde fluorescente CTG. Les foraminifères

répondant positivement au test de détermination CTG sont des individus ayant une membrane cytoplasmique intacte (permettant de maintenir la molécule fluorescente dans la cellule après fixation) et ayant une activité enzymatique (nécessaire à l'hydrolyse du CTG). Néanmoins, l'activité enzymatique peut provenir d'organismes indigènes colonisant le test des foraminifères après leur mort (par exemple des bactéries).

Pour cette raison, nous avons cherché à assurer que les nombreux individus répondant positivement au CTG étaient bien vivants. Pour ce faire, nous avons cherché à identifier si de l'ARNr était présent dans les sédiments après 10 mois d'anoxie. Cette molécule est peu stable et est ainsi considérée comme ayant une courte durée de vie ; sa présence permettrait d'indiquer que les foraminifères sont en cours de synthèse de protéines. Une étude récente fait état de molécules d'ARNr bien préservées dans des sédiments vieux de 2.7 millions d'années (Orsi et al., 2013), mais, à ce jour, il est généralement admis que la présence d'ARNr est un indicateur de l'activité des organismes. Ainsi, la combinaison de l'analyse de l'ARNr et de l'activité enzymatique estimée par le CTG nous permet d'être assez confiants vis-à-vis des conclusions que nous pouvons tirer de nos observations. Nos analyses de l'ARNr de sédiment prélevé dans la chambre benthique à la fin de l'expérience et les observations faites avec le CTG nous permettent de conclure qu'un grand nombre d'espèce de foraminifères a résisté à 10 mois d'anoxie.

Par contre, nous pouvons observer une diminution de la densité au cours de l'expérience. Malgré une différence de densité entre deux réplicats parfois importante (la différence maximale entre les deux carottes prélevées en « Normoxie » est d'un ordre de grandeur de 2.4), l'analyse statistique a permis de montrer que l'effet du temps d'expérience est supérieur à la variabilité inter-réplicats suggérant que la durée de l'expérience tend bel et bien à faire diminuer la densité des foraminifères benthiques vivants.

Cependant, cette diminution de la densité ne semble pas se faire de manière linéaire. En effet, la densité a diminué entre 0 et 9 jours d'expérience, puis après 1 mois d'expérience les stocks de foraminifères benthiques ont été similaires à ceux enregistrés en « Normoxie ». A ce stade de l'expérience, une quantité importante de sulfures a été enregistrée dans l'eau surnageante (Chapitre 1 Partie I). Au cours du premier mois de l'expérience nous pouvons observer que les organismes de la macrofaune sont morts entre le 7^{ème} et le 15^{ème} jour d'expérience (en fonction des chambres benthiques). Cette macrofaune morte pourrait être une source de matière organique qui enrichit l'interface eau-sédiment en carbone organique. Nous avons proposé l'hypothèse selon laquelle cette augmentation de la quantité de matière organique est à la fois la cause de l'augmentation de la concentration de sulfures dans l'eau surnageante et de l'augmentation de la densité de foraminifères vivants dans le centimètre superficiel du sédiment. En effet, en l'absence d'oxygène dans le milieu cette matière organique serait essentiellement dé-

gradée par sulfato-réduction produisant ainsi les sulfures. Étonnement, ces sulfures, qui sont considérés comme toxiques ne semblent pas avoir affecté négativement les densités de foraminifères. Les analyses de géochimie suggèrent que le sédiment sableux riche en oxydes de manganèse et de fer pourrait ainsi agir comme une barrière qui piègerait les sulfures libres en les empêchant de pénétrer dans le sédiment (Chapitre 1 Partie I, Partie IV bilan). Les foraminifères endopéliques (vivant dans le sédiment) seraient ainsi protégés des sulfures par le sédiment et pourraient ainsi profiter des apports en matière organique. Cette hypothèse – si elle est vérifiée – impliquerait que dans un milieu anoxique pauvre en sulfures les foraminifères benthiques répondent préférentiellement à des changements de la quantité de matière organique et moins à des changements des conditions d'oxygénation.

Dans le Grevelingenmeer (chapitre 2), l'anoxie apparaît tous les étés au fond des chenaux profonds (30-40m). Nous avons échantillonné en Août 2011 un transect de 3 stations dans le chenal (la station 1 (34 m) affectée par l'anoxie, la station 2 (23 m) avec une saturation d'environ 40% et la station 4 (17 m) avec une saturation en oxygène de 60%). Ces stations ont été échantillonnées de nouveau en Novembre 2011, environ un mois après la fin de l'anoxie. Les données montrent de fortes densités (300-2400 ind./28cm² entre 0 et 1 cm de profondeur) de foraminifères vivants aux deux stations les plus oxygénées (stations 2 et 4) en Août et en Novembre (méthode CTG citée plus haut). Par contre, à la

station profonde nous avons observé un très faible nombre d'individus vivants: 5-10 ind./28cm² en Août et 0-6 ind./28cm² individus en Novembre (entre 0 et 1 cm de profondeur). Cette observation peut être expliquée par différentes hypothèses :

1) Les quelques individus considérés comme étant vivants (positif au CTG) en anoxie seraient des faux-positifs et ne sont pas réellement vivants.

2) Un faible nombre d'individus autochtones est présent tout au long de l'année.

3) Les quelques individus vivants à la station profonde lors de la période sont les individus d'une population autochtone comprenant un plus grand nombre d'individus lors de la période oxygénée. Les organismes sont nés et ont grandi à cette station pendant la période oxygénée de l'année. Les individus observés vivant en anoxie pourraient ainsi être les quelques survivants d'une cohorte qui s'est développée avant l'installation de l'anoxie. Ces individus, s'ils réussissent à survivre à l'ensemble de la période d'anoxie, pourraient ainsi être potentiellement à l'origine d'une prochaine recolonisation de cette station dès la fin de la période d'anoxie.

4) les quelques individus vivants à la station profonde anoxique seraient des organismes qui vivaient dans les stations moins profondes et qui ont été transportés accidentellement au fond du chenal où ils réussissent à survivre – sans se reproduire - malgré l'anoxie.

Nous avons pu observer les individus répondant positivement au CTG présentaient une fluorescence intense et homogène dans l'ensemble de la cellule. Cette observation

suggère que les individus présentaient une activité enzymatique importante et que la fluorescence n'était pas due à la présence de bactéries colonisant un test mort (dans un tel cas la fluorescence apparaît plus laiteuse et plus hétérogène). Nous considérerons ainsi l'hypothèse 1 comme peu probable.

Ne trouvant pas de raison pour expliquer pourquoi une population se maintiendrait toute l'année à de très faibles densités au site profond où le sédiment est riche en matière organique, nous rejetons l'hypothèse 2.

Les hypothèses 3 et 4 nous semblent aussi probables l'une que l'autre mais nous ne disposons pas à ce jour de tous les arguments qui pourraient permettre de les départager. En effet, nous ne connaissons pas encore le nombre d'individus qui vivent à la station profonde avant l'installation de l'anoxie saisonnière. L'analyse d'échantillons prélevés en hiver et au printemps pourrait permettre d'identifier la validité de l'hypothèse 3.

Pour pouvoir confirmer ou infirmer l'hypothèse 4 il faudrait pouvoir identifier des marqueurs de transports des foraminifères. Lors de son master 2 effectué au laboratoire sous la direction de Frans Jorissen, Anaïs Guihéneuf a analysé la géochimie et la porosité des coquilles des foraminifères vivants du Grevelingenmeer. Nous supposons que la porosité et la géochimie de la coquille sont deux paramètres qui varient en fonction des conditions dans lesquelles la coquille est formée. Les résultats montrent que la taille des pores des individus de la station 1 est similaire à la taille des pores des individus de la station 4 (respectivement la station la plus

profonde et la moins profonde de notre étude). Les pores de l'avant-dernière loge formée par les individus de la station 2 (la station intermédiaire) sont de plus grande taille que ceux des stations 1 et 4. Si l'on considère que la porosité dépend de la saturation en oxygène et que la taille des pores augmente quand la saturation en oxygène diminue, alors ces résultats suggèrent que les individus de la station 1 ont calcifié dans des conditions d'oxygénation similaires aux individus de la station 4. Cette suggestion tendrait alors à supporter l'hypothèse 4 selon laquelle les faibles densités observées à la station profonde sont des individus transportés depuis les stations oxygénées.

Les analyses par LA-ICPMS (spectrométrie par torche à plasma et ablation laser de l'avant-dernière loge formée) de la géochimie des tests de foraminifères vivants trouvés aux trois stations montrent une augmentation de la concentration en manganèse dans la coquille avec la bathymétrie et/ou la diminution de la saturation en oxygène. Ces résultats suggèrent que l'avant dernière loge des tests des foraminifères des trois stations ont été toutes formées dans des conditions d'oxygénation différentes. Cette observation supporterait donc préférentiellement l'hypothèse 3 selon laquelle les foraminifères vivants à la station profonde observés pendant la saison anoxique sont quelques survivants d'une population autochtone plus dense lorsque le milieu est oxygéné.

Les résultats de l'analyse des pores et celle de la concentration en manganèse sont donc en désaccord. Pour le moment, il n'est donc

pas possible de choisir entre les hypothèses 3 et 4. Des études faunistiques de la station profonde en hiver et au printemps – en conditions oxygénées – ainsi que des analyses complémentaires de la porosité et de la chimie du test des foraminifères pourraient potentiellement permettre d'identifier si les foraminifères vivent en permanence à la station profonde ou si ce sont des individus transportés.

Nous venons de voir que les foraminifères de Mer Adriatique sont résistants à l'anoxie alors que dans le Grevelingenmeer au mieux très peu d'individus semblent (sur)vivre en anoxie. Nos analyses montrent donc que les foraminifères benthiques répondent à l'anoxie de manière différente aux deux sites étudiés. Avant de discuter dans la suite de cette synthèse des paramètres qui peuvent expliquer ces différences de réponse nous allons résumer les résultats observés à l'échelle de la population. Nous avons ainsi cherché à identifier les espèces résistantes et les espèces sensibles à l'anoxie.

1.2. A l'échelle de la population

1.2.1. Espèces sensibles à l'anoxie

Dans l'estuaire du Grevelingenmeer, les deux espèces majeures *Elphidium excavatum* et *Ammonia tepida* (nommée *A. batava* dans le **Chapitre 2**) présentent de fortes densités aux stations oxygénées quand seulement un faible nombre d'individus vivants est présent dans la station profonde anoxique. Ceci suggère une grande sensibilité à des conditions anoxiques.

Au cours de l'expérience menée en Mer Adriatique, nous avons observé que les espèces *Reophax nanus*, *Textularia agglutinans* et *Quinqueloculina stelligera* présentaient une diminution de leur densité avec la durée de l'expérience, sans disparaître totalement de l'écosystème après 10 mois d'anoxie (contrairement à ce que nous observons dans le Grevelingenmeer). Ces espèces ont ainsi été considérées comme étant sensibles à l'anoxie. Bien qu'étant aussi sensible à l'anoxie (diminution de la densité entre 0 et 10 mois), *Quinqueloculina seminula* présente une réponse différente des espèces précédentes, avec une augmentation à un mois d'anoxie. Cette réponse a été interprétée comme un potentiel caractère opportuniste vis-à-vis des apports de matière organique liés à la mortalité des organismes de la macrofaune. Cette augmentation de densité ayant pu être la conséquence d'un événement reproductif. Malgré le fait que les densités de *Q. seminula* augmentent en anoxie au cours du 1^{er} mois d'expérience, les stocks de cette espèce tendent à diminuer drastiquement entre 1 et 10 mois d'anoxie. Le caractère opportuniste vis-à-vis de la matière organique de cette espèce pourrait lui permettre de vivre à court-terme en anoxie, mais pas à long-terme. La réponse des foraminifères à l'anoxie est ainsi plus complexe qu'un simple rapport à l'oxygénation du milieu. En effet, d'autres processus, indirectement liés au développement de l'anoxie, tels que la quantité de l'apport de matière organique induit par un épisode de mortalité, peuvent contrôler la dynamique de certaines espèces de foraminifères.

1.2.2. Espèces résistantes

Parmi les espèces que nous avons pu identifier comme résistantes à l'anoxie au cours de nos études in situ en Mer Adriatique, nous trouvons *Eggerella scabra*, *Bulimina marginata*, *Lagenammia atlantica*, *Hopkinsina pacifica* et *Bolivina pseudoplicata*. L'ensemble de ces espèces présente des densités relativement stables au cours des 10 mois d'expérience avec cependant une légère augmentation après 1 mois d'anoxie.

Dans le cadre des expériences menées en laboratoire nous avons également montré que les taux de survie (déterminés avec le marqueur d'activité enzymatique FDA) de *Melonis barleeanus* (Chapitre 3) et d'*Ammonia tepida* (Geslin pers. com.) observés dans des conditions oxygénées et en anoxie ne sont pas significativement différents. De plus, la quasi-totalité des individus sont vivants après 69 jours d'expérience quelles que soient les conditions expérimentales soulignant la résistance de ces deux espèces à l'anoxie.

Pour mieux comprendre les mécanismes mis en place par les organismes pour résister à l'anoxie, nous avons réalisé une série d'expériences. Il s'agissait de tester notamment la capacité à dénitrifier de ces espèces à l'échelle individuelle. Nous discuterons de ces mécanismes après avoir cherché à expliquer les différences de réponses observées entre les espèces résistantes et sensibles à l'anoxie.

1.2.3. Comment expliquer les différences de réponses spécifiques ?

Les différences de réponse interspécifiques face à l'anoxie peuvent en partie être expliquées par le microhabitat préférentiellement colonisé par les espèces. En effet, en Mer Adriatique, les espèces sensibles à l'anoxie sont plutôt présentes à l'interface eau-sédiment (essentiellement entre 0 et 1 cm de profondeur) quand les espèces résistantes sont distribuées de manière relativement homogène à toutes les profondeurs d'échantillonnage (de 0 à 5 cm). Lorsque les eaux de fond sont oxygénées, la profondeur de pénétration d'oxygène est d'environ 0.5 cm, ainsi, la majorité des individus des espèces résistantes vivent une grande partie du temps dans des microhabitats anoxiques. Au contraire, les espèces dites sensibles vivent préférentiellement dans des microhabitats oxygénés. Le développement de l'anoxie va ainsi affecter préférentiellement ces espèces à microhabitat superficiel. Dans les milieux côtiers subtidaux tels que la Mer Adriatique et le Grevelingenmeer nous observons les variations environnementales les plus importantes dans le compartiment superficiel du sédiment. Le fait de vivre dans un microhabitat profond pourrait ainsi permettre de vivre dans des conditions plus stables. Une telle réponse face à l'anoxie dépendant du microhabitat des espèces a été décrite dans le modèle conceptuel de Van der Zwann et Jorissen en 1991. Ce modèle prédit que les espèces vivant dans un microhabitat endopélique profond en conditions oxygénées migrent vers la surface en anoxie pour coloni-

ser les habitats libérés par la disparition des espèces à microhabitat superficiel sensibles à l'anoxie.

Aux cours de ces travaux de thèse nous avons également pu observer des différences de réponse intraspécifiques. Des analyses moléculaires montrent que les *Ammonia tepida* du Grevelingenmeer appartiennent au même phylotype que les *Ammonia tepida* de la Baie de l'Aiguillon (Schweitzer, pers. com.). Or, dans le Grevelingenmeer, les très fortes différences de densité d'*Ammonia tepida* entre les stations oxygénées et la station anoxique suggèrent que cette espèce est sensible à l'anoxie. Au contraire, les individus d'*Ammonia tepida* prélevés dans la Baie de l'Aiguillon résistent à 69 jours d'anoxie. Nous discuterons dans le paragraphe 3 des paramètres qui peuvent expliquer cette différence.

1.3. A l'échelle de l'individu

Lors de nos recherches, nous avons également analysé le nitrate intracellulaire des foraminifères benthiques. Nos résultats montrent que la quantité de nitrates dans la cellule présente une forte variabilité interindividuelle. Une part de cette variabilité peut être expliquée par le biovolume de l'organisme (mis en évidence sur *Melonis barleeanus*). Parmi les différentes espèces analysées, les résultats suggèrent que seules les espèces résistantes à l'anoxie présentent des nitrates dans leur cellule (Chapitres 1 et 3). Il s'agissait ensuite de déterminer, si certaines de ces espèces sont capables de dénitrifier. En effet, la dénitrification est à ce jour la seule voie métabolique anaérobie identifiée chez les foraminifères

benthiques (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008; Piña-Ochoa et al., 2010a).

L'ensemble des tests de dénitrification menés sur certaines espèces clefs (*Eggerella scabra*, *Bulimina marginata*, *Ammonia tepida* et *Melonis barleeanus*) se sont tous révélés négatifs. L'espèce pour laquelle nous avons fait le plus de mesures est *Melonis barleeanus* (7 jeux de mesures sur 7 séries d'individus différents ou dans des conditions différentes). Parmi ces 7 tests, 5 ont été faits à une période lors de laquelle très peu d'individus de *M. barleeanus* présentaient des nitrates dans leurs cellules (lors de l'expérience II présentée dans le Chapitre 3). Une absence de nitrates, réactif nécessaire à la dénitrification pourrait donc être l'explication de ces 5 tests négatifs. Pour répondre à ce problème, nous avons fait un test de dénitrification sur l'une de ces 5 séries d'individus en présence de nitrates dans la cellule de mesure anoxique. Les conditions anoxiques et riches en nitrates sont censées maximiser l'accumulation des nitrates (Høglund et al., 2008). Ce test indique que même lorsque des nitrates sont potentiellement disponibles pour les individus, ils ne les utilisent pas. Trois autres séries de mesures ont été faites à une période lors de laquelle la quasi-totalité des individus contenaient des nitrates dans leur cellule (Chapitre 3, expérience I) qui se sont également révélées négatives.

Nous avons mesuré la quantité de nitrates présents dans la cellule de 12 *Ammonia tepida* provenant de l'estuaire de la Loire après un test de dénitrification négatif. Sept individus

sur 12 contenaient des nitrates à une quantité moyenne de 12 pmol par cellule après environ 45 heures passées en anoxie (Chapitre 4, Partie II). Même si cette quantité de nitrates est faible (*Globobulimina turgida* contient en moyenne 18 000 pmol/cellule dans le Gullmar Fjord ; Piña-Ochoa et al., 2010a), ces foraminifères disposaient de nitrates qui étaient ainsi potentiellement disponibles mais n'ont visiblement pas été consommés par la dénitrification. Ces résultats suggèrent ainsi que la présence de nitrate n'est pas une condition suffisante en milieu anoxique pour que la dénitrification ait lieu. Cela pourrait être expliqué par le fait que :

- 1) ces foraminifères sont capables de dénitrifier mais la quantité de nitrates disponible dans la cellule des individus n'est pas suffisante pour permettre au foraminifère de dénitrifier. En d'autres termes, les foraminifères ne peuvent pas consommer jusqu'à épuisement leur stocks de nitrates et doivent maintenir un niveau minimal.

- 2) ces individus dénitrifient à des taux plus faibles que les taux mesurables avec la technique que nous utilisons.

- 3) ces espèces ne sont pas capables de dénitrifier.

L'hypothèse 1 semble peu plausible. Pourquoi les foraminifères se priveraient-ils de ce réactif qui pourrait leur permettre de maintenir leur activité métabolique ? Lorsque l'on place des foraminifères dans un milieu oxygéné clos, il semblerait qu'ils consomment par respiration aérobie l'ensemble de l'oxygène disponible dans le milieu jusqu'à épuisement (Moodley et al., 2008; Braeckman et al., 2013).

Pourquoi n'en feraient-ils pas de même avec leurs stocks de nitrates en anoxie ?

L'hypothèse 2 nous semble être plus probable mais elle impliquerait néanmoins que les taux de dénitrification plus faibles que ceux mesurables soient suffisants pour supporter l'activité des foraminifères. Dans le Chapitre 4 nous avons estimé que le taux de dénitrification minimum détectable est d'environ 2.4 pmol/ind./j (pour une mesure faite dans une chambre contenant 10 individus ; cf. Chapitre 4, II, 4.3.1). Le fait de présenter des taux de dénitrification aussi faibles (entre 20 et 100 fois plus faible que les taux enregistrés chez les espèces capables de dénitrifier ; Piña-Ochoa et al., 2010a) pourrait permettre aux individus de vivre en anoxie plus longtemps. Ceci représenterait un réel intérêt pour les organismes accumulant peu de nitrates (ce qui est le cas des individus que nous avons analysés). Néanmoins, les taux de respirations aérobie sont plus importants que ce taux de dénitrification maximum non détectable (entre 30 et 400 fois plus de mole de réactif consommé ; calculé d'après les taux de respiration d'*A. tepida* et *Bolivina subaenariensis* présentés dans le Chapitre 4 partie I). La respiration aérobie étant en règle générale environ 1.07 fois plus intéressante énergétiquement (en terme de kJ produits par mole de glucose ; Burdige, 2006) que la dénitrification, les taux de dénitrification maximum non détectable apporteraient entre 30 et 400 fois moins d'énergie que si les individus respirent de l'oxygène. Nous ne sommes néanmoins pas en mesure de dire

si des niveaux d'énergie aussi faibles sont suffisamment bénéfiques à l'individu. Pour vérifier si les foraminifères peuvent dénitrifier à de très faibles taux il faudrait optimiser le dispositif de mesure en tentant de maximiser la sensibilité de l'électrode ainsi qu'en plaçant un maximum d'individus dans la chambre de mesure.

L'hypothèse 3 semble donc être la plus parcimonieuse mais elle n'explique pas la présence de nitrates dans la cellule d'un individu qui ne les utilise pas. Nous proposons trois explications pour ce paradoxe :

3.1 les nitrates sont le produit et non les réactifs d'un processus métabolique utilisé par les foraminifères qui resterait à identifier ;

3.2 les nitrates n'interviennent pas dans le fonctionnement de la cellule ;

3.3 les nitrates sont consommés par une voie de réduction autre que la dénitrification que nos techniques ne peuvent pas tracer.

Les principales voies de production des nitrates sont l'oxydation de l'ammonium et la respiration aérobie. Ces deux voies sont des mécanismes d'oxydation, ne pouvant avoir lieu qu'en présence d'oxygène dans le milieu. Or, des mesures effectuées sur des *Melonis barleeanus*, *Ammonia tepida* et *Bolivina subaenariensis* montrent que quelques individus incubés jusqu'à 69 jours en anoxie présentent des nitrates dans leurs cellules (Chapitre 4 ; Geslin pers. com.). L'explication 3.1, qui ne permet pas d'expliquer la production de nitrates en anoxie, nous semble ainsi très peu probable.

Nous avons montré que les foraminifères accumulaient les nitrates (la concentration en

nitrates intracellulaires est nettement plus importante que la concentration du milieu ; Chapitre 4), or, maintenir un stock de nitrates contre un gradient chimique est coûteux énergétiquement pour le foraminifère (Høgslund et al., 2008). Il semble donc peu probable que les nitrates soient présents dans la cellule sans avoir nécessairement un rôle dans le fonctionnement de celle-ci (explication 3.2).

L'hypothèse qui nous semble donc être la plus vraisemblable est celle selon laquelle les foraminifères réduiraient les nitrates par une voie de réduction alternative à la dénitrification. Cette option sera discutée en plus de détail dans le paragraphe 4.2.

Les différentes expériences que nous avons menées permettent de mettre en évidence un autre mécanisme de réponse à l'anoxie. Nous avons en effet pu observer que *Melonis barleeanus* et *Ammonia tepida* cessaient de se déplacer après quelques heures d'exposition à l'anoxie. Plus spécifiquement, nos observations montrent que plusieurs individus d'*A. tepida* sont capables de se déplacer durant 30 à 36h d'exposition à l'anoxie (Chapitre 4, partie II, <http://youtu.be/-9rkQO4caoU>). Après 36h d'anoxie les individus ne se déplacent plus. Ainsi, les individus de cette espèce accumulent des nitrates dans leur cellule mais ne peuvent apparemment pas les réduire par dénitrification ; malgré cela, ces individus semblent être capables de présenter une activité en anoxie. Cette observation semble donc supporter l'option 3.3 selon laquelle les foraminifères pourraient être capables d'utiliser des voies métaboliques de réduction de nitrates différentes de la dénitrification.

2. Est-ce qu'il y'a des effets différents de l'anoxie et de l'hypoxie ?

Deux expériences en laboratoire ont été menées pour tester et comparer les effets de l'hypoxie et de l'anoxie sur *Melonis barleeanus*. Nous avons mis en évidence que l'hypoxie et l'anoxie n'affectent pas le taux de survie de cette espèce (Chapitre 3). Nos expériences confirment ainsi les observations de l'écologie de cette espèce qui montrent que *M. barleeanus* peut survivre dans un milieu quelle que soit la concentration en oxygène.

Au cours de la première expérience, nous avons pu observer de la croissance de *Melonis barleeanus* en conditions oxygénées, hypoxiques avec nitrates et hypoxiques sans nitrates. Il n'y a pas de différences entre les taux de croissance observés en conditions oxygénées et en hypoxie. L'hypoxie ne semble donc pas affecter la capacité à grandir et calcifier de cette espèce. Lors de la seconde expérience nous n'avons pu observer de croissance, ni en conditions oxygénées ni en anoxie. Les individus sélectionnés pour cette seconde expérience étaient de taille supérieure à ceux utilisés lors de la première expérience. Cette différence de taille initiale est probablement à l'origine de cette absence de croissance.

Puisque dans les conditions de contrôle nous n'avons pas observé la même réponse entre les deux expériences, nous ne pouvons pas conclure quant à une potentielle différence de capacité à grandir entre un milieu hypoxique et un milieu anoxique. Ce biais mé-

thodologique est également observé sur les données de nitrates intracellulaires. Lors de la première expérience, une part importante des individus testés contenaient des nitrates quelles que soient les conditions alors que, lors de la seconde expérience, seuls quelques individus présentaient des nitrates.

Les conclusions que nous pouvons tirer de ces expériences pour comparer l'effet de l'hypoxie et de l'anoxie sont assez limitées en raison des limites méthodologiques évoquées précédemment. Nos résultats montrent néanmoins clairement que les taux de survie de *Melonis barleeanus* ne sont affectés ni par l'hypoxie ni par l'anoxie.

3. Comment expliquer les différences de réponse des communautés entre les sites d'étude ?

Comme évoqué précédemment, il semblerait que les communautés de foraminifères benthiques du Grevelingenmeer et de la Mer Adriatique présentent des réponses différentes à l'anoxie. Les foraminifères du Grevelingenmeer sont sensibles à l'anoxie et les foraminifères de Mer Adriatique résistent à 10 mois d'anoxie (cf. paragraphe 1.1). Deux hypothèses pourraient expliquer cette différence :

- 1) le temps depuis lequel les sites d'études sont affectés par des phénomènes d'anoxie.
- 2) les conditions physico-chimiques associées à l'anoxie (quantité et qualité de la matière organique, concentration en sulfure libre,...).

3.1. Différences historiques et isolement géographique

La réponse différente des communautés aux deux sites d'étude pourrait être liée à l'historique du développement de l'anoxie et à l'isolement géographique des deux sites (hypothèse 1). En effet, la Mer Adriatique est une mer semi-fermée quand l'ancien estuaire du Grevelingenmeer n'est ouvert sur la Mer du Nord uniquement par une écluse placée sur le barrage en aval du lac marin. Les échanges entre l'intérieur et l'extérieur de ces deux bassins ainsi que leurs étendues respectives sont très différentes. Cet isolement géographique serait en mesure d'inhiber fortement l'installation de nouvelles espèces potentiellement résistantes à l'anoxie dans le Grevelingenmeer. Les foraminifères peuvent coloniser des nouveaux milieux par la dispersion des propagules ; ces cellules de taille plurimicrométrique sont transportées par les courants. Nous pouvons donc supposer que le barrage qui limite les entrées marines dans le Grevelingenmeer va ralentir l'installation d'espèces allogènes potentiellement résistantes à l'anoxie.

Les études paléo-océanographiques et les enregistrements à long-terme montrent que des phénomènes d'anoxie existent depuis des siècles en Mer Adriatique (Justić, 1987; Bar-mawidjaja et al., 1995). Des espèces résistantes ont ainsi eu tout le temps nécessaire pour s'installer et composer une part importante de la communauté des foraminifères benthiques en Mer Adriatique. Dans le Grevelingenmeer, des phénomènes d'hypoxie de

l'eau de fond ont été observés depuis 1979 (soit environ 8 ans après la fermeture du barrage). C'est en 1982 – soit 11 ans après la construction du barrage – que les premières anoxies ont été observées (Bureau d'études Waardenburg, pers. comm.). Des espèces résistantes à l'anoxie n'ont donc probablement pas eu le temps de coloniser ce milieu initialement estuarien et nouvellement impacté par l'anoxie.

3.2. Différences de conditions physico-chimiques

Les conditions physico-chimiques aux deux sites sont très différentes. Premièrement, la salinité des eaux de fond du site que nous avons étudié en Mer Adriatique varie entre 36 et 38.5 ; dans le Grevelingenmeer la salinité des eaux de fond était de 32 en Août 2011. Le sédiment de la station anoxique du Grevelingenmeer est vaseux alors que le sédiment de la station en Mer Adriatique est plus grossier (silty-sableux), ceci implique une perméabilité et donc une différence dans les processus de transport de l'oxygène et autres éléments dissous à travers l'eau interstitielle. Le sédiment plus fin est souvent plus riche en matière organique.

A ce jour, les données décrivant les conditions biogéochimiques actuelles dans le Grevelingenmeer ne sont pas disponibles dans la littérature. Il semblerait néanmoins qu'en période anoxique, le sédiment produise des sulfures qui diffusent vers la colonne d'eau en grande quantité (Meysman, pers. com.). Par contre, les analyses de la géochimie du sédi-

ment que nous avons menées, montrent que dans le sédiment étudié en Mer Adriatique, les sulfures produits dans le sédiment par sulfato-réduction ne restent pas sous forme libre assez longtemps pour diffuser à travers les eaux porales. La matrice sédimentaire riche en oxydes métalliques semble fournir suffisamment de fer pour que les sulfures produits par sulfato-réductions réagissent avec celui-ci et ne diffusent pas dans le sédiment. Nous pouvons donc considérer que lors de l'expérience menée en Mer Adriatique l'eau surnageante a été riche en sulfures pendant une période relativement courte (due à la dégradation anaérobie de la macrofaune) mais la diffusion des sulfures vers le sédiment a été bloquée par les oxydes ferreux présents dans le sédiment (Chapitre 1). De nombreux auteurs reportent que les sulfures sont toxiques pour de nombreux organismes marins (Jensen, 1987; Diaz et Rosenberg, 1995) y compris les foraminifères (Moodley et al., 1998b). Ainsi, une forte différence de concentration de sulfures dans les eaux interstitielles pourrait être à l'origine des densités de foraminifères différentes observées entre les deux sites.

Cette hypothèse pourrait être supportée par les observations faites sur *Ammonia tepida* de la Baie de l'Aiguillon et du Grevelingenmeer (paragraphe 1.2.3). En effet, si individus de la Baie de l'Aiguillon survivent à 69 jours d'anoxie sans sulfures (Geslin pers. com.) cette espèce est quasiment absente de la station profonde anoxique et riche en sulfures à Grevelingenmeer. Nos résultats suggèrent ainsi que les foraminifères peuvent survivre plusieurs mois en anoxie sans sulfures. Les

très faibles densités de foraminifères observées dans la station profonde du Grevelingenmeer pourraient être expliquées par la présence de sulfures.

4. Les foraminifères des milieux côtiers ont-ils une réponse différente des foraminifères des milieux profonds ?

Nos résultats suggèrent fortement que les espèces de foraminifères benthiques qui peuvent résister à l'anoxie ne sont pas capables de réduire les nitrates par dénitrification (cf. paragraphe 1.3). Cette voie métabolique anaérobie a été mise en évidence chez des espèces de foraminifères vivants dans des environnements profonds. Ces espèces vivent dans des microenvironnements affectés en permanence par l'anoxie. En effet, ce sont soit des espèces endopéliques profonds qui vivent sous la profondeur de pénétration d'oxygène (OPD) et donc dans un microhabitat anoxique (ex : *Globobulimina turgida* dans le Gullmar Fjord ; Risgaard-Petersen et al., 2006) ou ce sont des espèces vivant dans le cœur anoxique (pas d'oxygène détectable dans les eaux de fond) des « Zones d'Oxygène Minimum » (OMZ ; ex : *Nonionella stella* dans l'OMZ chilienne (Høgslund et al., 2008) ou *Bolivina seminuda* dans l'OMZ péruvienne (Piña-Ochoa et al., 2010a)). Deux hypothèses permettent d'expliquer les différences observées entre les foraminifères des milieux côtiers et les foraminifères des environnements pro-

fonds : 1) la durée d'exposition à l'anoxie et 2) les conditions géochimiques différentes.

4.1. Influence du temps d'exposition à l'anoxie

Dans les milieux côtiers, l'anoxie est saisonnière. Il semblerait que dans le Grevelingenmeer les foraminifères soient exposés à 2-3 mois d'anoxie et que les anoxies se développant « naturellement » en Mer Adriatique durent entre 1 et 3 semaines. A l'opposé, les foraminifères vivant sous la profondeur de pénétration de l'oxygène (OPD) sont par définition dans un environnement anoxique en permanence. Si ces foraminifères à microhabitat endopélique profond peuvent migrer plus ou moins ponctuellement vers des couches oxygénées du sédiment, il semblerait qu'ils passent la majeure partie de leur temps dans les couches anoxiques. Dans le cœur des OMZ, l'hypoxie est permanente et très intense pouvant présenter de longs épisodes d'anoxie des eaux de fond.

Il semblerait alors que les foraminifères des milieux côtiers soient exposés à des périodes d'anoxie et d'hypoxie nettement plus courtes que les foraminifères vivant dans les environnements profonds (sous l'OPD et dans les OMZ).

Les stratégies de vie dans ces deux types d'environnement sont ainsi différentes. Dans les milieux d'anoxie quasi-permanente, les foraminifères doivent pouvoir se déplacer et/ou maintenir leur activité (de déplacement, de croissance, et peut être même de reproduction). Ils ont donc besoin de produire de

l'énergie, l'utilisation d'un métabolisme anaérobie tel que la dénitrification leur permet ainsi de maintenir une activité. La dénitrification étant limitée par le stock de nitrates accumulés dans la cellule des foraminifères, ces espèces se déplaceraient verticalement pour atteindre les niveaux riches en nitrates et en oxygène pour recharger leurs stocks (Risgaard-Petersen et al., 2006; Høglund et al., 2008).

Les périodes d'anoxie étant plus courtes en milieu côtier (2 mois au maximum), l'arrêt temporaire (durant la période d'anoxie) de l'activité de déplacement pourrait être une stratégie permettant au foraminifère de survivre sans oxygène. Nous avons néanmoins vu lors de l'expérience menée en Mer Adriatique que l'arrêt de l'activité n'est pas total puisque les organismes maintiennent une activité cellulaire (identification de présence d'ARN permettant la synthèse de protéines). Les foraminifères benthiques des milieux côtiers tendraient ainsi à réduire leur activité de déplacement tout en maintenant leur activité cellulaire. Cette activité pourrait être supportée par un métabolisme de réduction des nitrates autre que la dénitrification dont nous discutons l'éventualité dans le paragraphe suivant.

4.2. Influence des conditions géochimiques

La dénitrification n'est pas la seule voie métabolique de réduction anaérobie des nitrates et certains auteurs estiment que le rôle de cette voie en tant que puits de nitrates dans les sys-

tèmes aquatiques a parfois été surestimé (Burgin et Hamilton, 2007). Ces derniers mettent en évidence que les voies de réduction des nitrates dominantes dépendent de la quantité de carbone organique, de soufre (sous forme de soufre élémentaire, de sulfures ou FeS) ou du ratio C/N (carbone organique/nitrates ; Burgin et Hamilton, 2007). Or, les milieux côtiers présentent des ratios C/N plus importants que les milieux profonds avec de forts apports de carbone organique (Lamb et al., 2006). Dans de telles conditions, la voie de réduction des nitrates dominante est l'ammonification (*Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium* ; DNRA Bonin, 1996; Megonigal et al., 2003; Burgin et Hamilton, 2007). Cette voie métabolique (DNRA) dans laquelle les nitrates sont réduits en ammonium ($\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NH}_4^+$; soit $\text{NO}_3^- + 4\text{H}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{NH}_4^+ + 3\text{H}_2\text{O}$) permet de transférer 8 électrons quand la dénitrification en transfère 5 (Megonigal et al., 2003; Mohan et Cole, 2007). Les gains en énergie libre calculé sur la base de l'accepteur d'électrons sont légèrement plus importants pour le DNRA que pour la dénitrification (- 600 kJ/mole de nitrates et -560kJ/mole de nitrates respectivement ; Tiedje, 1994) ce qui rendrait cette voie métabolique particulièrement efficace en conditions riches en matière organique et relativement pauvres en nitrates (Burgin et Hamilton, 2007). Les différences de conditions géochimiques entre les milieux côtiers et les milieux profonds peuvent contrôler ainsi les voies préférentielles de réduction des nitrates. L'essentiel des études reportant l'occurrence de la DNRA sont des articles portant sur des

sédiments continentaux (sols, lacs ou rivières), estuariens ou marins côtiers (revues dans Megonigal et al., 2003). Si l'absence de reports traitant de DNRA dans les milieux marins profonds peut simplement être dû au fait que ce mécanisme n'est simplement pas testé, son rôle dans la réduction des nitrates en milieu côtier n'est clairement pas négligeable (au maximum 97 % ; Bonin et al., 1998). La DNRA pourrait ainsi être la voie métabolique alternative de réduction des nitrates la plus probable pour expliquer le maintien de l'activité métabolique des foraminifères benthiques des milieux côtiers. A ce jour, une telle voie métabolique n'a été mise en évidence que chez des bactéries et son occurrence chez les foraminifères benthiques n'est qu'hypothétique.

5. Cinétique de la réponse des foraminifères benthiques à l'évolution des conditions d'oxygénation dans un milieu côtier

L'ensemble des travaux de cette thèse nous permet d'envisager un scénario de réponse des faunes de foraminifères benthiques aux changements de conditions d'oxygénation dans un milieu côtier initialement non-impacté par des phénomènes d'anoxie. Imaginons un système côtier peu profond (20-50 m) dans lequel :

- Étape 1 : les eaux de fonds sont oxygénées et des épisodes d'hypoxie saisonnière peuvent parfois être observés ;

- Etape 2 : suite à une perturbation quelconque (installation d'une barrière physique, développement de la stratification des eaux, changements climatiques ...) des phénomènes d'anoxie saisonniers se développent dans ce système ;
- Etape 3 : la durée des épisodes anoxiques s'allonge pour qu'à terme le système devienne anoxique en permanence.

Comment les travaux menés au cours de cette thèse nous permettent d'envisager la réponse des foraminifères benthiques à de tels changements des conditions d'oxygénation ?

A l'étape 1, les faunes de foraminifères benthiques dans ce site théorique sont diversifiées et composées majoritairement d'espèces sensibles à l'anoxie

A l'étape 2, nous observons l'effet de l'apparition des premiers événements d'anoxie. Nos résultats suggèrent que la réponse des foraminifères benthiques dépende de la présence ou l'absence de sulfures dans le milieu. Ainsi, dans le cas d'anoxies saisonnières associées à une production de sulfures – comme dans le Grevelingenmeer – nous nous attendons à observer de fortes mortalités des foraminifères benthiques. Si le milieu est anoxique sans sulfures les foraminifères survivent à l'anoxie, et, comme observé en Mer Adriatique, nous pourrions observer un changement de composition des faunes tel que les espèces sensibles à l'anoxie disparaissent au profit des espèces résistantes à l'anoxie.

Enfin, à l'étape 3, l'anoxie est permanente. En présence de sulfures dans le milieu les foraminifères meurent rapidement. En l'absence de sulfures nous savons que les foraminifères peuvent survivre au moins 10 mois sans oxygène. Nous savons également que, dans les enregistrements fossiles des sapropèles formées dans les bassins profonds méditerranéens au cours de longs événements anoxiques, il n'y a aucun test de foraminifères, suggérant que les foraminifères ne sont pas capables de survivre en anoxie permanente (Jorissen, 1999b). La durée maximale d'anoxie que les foraminifères peuvent supporter est encore à découvrir.

Perspectives

Les travaux menés au cours de cette thèse nous ont permis de décrire certains aspects de la réponse des foraminifères benthiques à l'anoxie mais de nombreuses questions restent en suspens :

- 1) *La disparition des foraminifères benthiques dans des conditions d'anoxie permanente peut être expliquée par une inhibition de la reproduction ?*

En Mer Adriatique, nos données montrent que certaines espèces auraient pu se reproduire au cours des premières semaines du développement de l'anoxie. Au contraire, dans le Grevelingenmeer, les densités extrêmement faibles observées aux sites affectés par l'anoxie et une forte production de sulfures suggèrent que les sulfures pourraient inhiber la reproduction et/ou la croissance des juvéniles. Cette inhibition de la reproduction par l'anoxie prolongée ainsi que par les sulfures pourrait être responsable de la disparition des foraminifères des écosystèmes affectés par des anoxies permanentes, comme par exemple les sapropèles de la Méditerranée. Pour chercher à répondre à cette question il est possible de mettre en place différentes expériences :

- Incubation à long-terme de foraminifères dans des conditions oxygénées, anoxiques avec et sans sulfures.

- Incubation de juvéniles dans des conditions anoxiques avec et sans sulfures.

- 2) *Comment expliquer le fait que deux populations répondent de manière différente à l'anoxie ?*

Nos résultats suggèrent que deux morphoespèces appartenant à un même phylotype peuvent présenter des réponses à l'anoxie différente. En effet, *Ammonia tepida* prélevée dans la Baie de l'Aiguillon résiste à 3 mois d'anoxie dans une expérience en laboratoire quand les observations faites sur le terrain dans le Grevelingenmeer montrent que cette espèce est sensible à l'anoxie associée aux sulfures. Pour confirmer la proximité génétique de ces deux populations (jusqu'à déterminée par une analyse de la petite sous unité 18S de l'ADNr) ainsi que pour confirmer que ces deux populations ont des réponses différentes nous suggérons de :

- Comparer une partie de l'ADN ribosomique plus variable (ex : l'ITS : Internal Transcribed Spacer).
- Incuber des spécimens des deux sites d'étude en anoxie avec et sans sulfures.

3) *La taille des pores des foraminifères benthiques influence t'elle l'intensité des échanges gazeux ?*

Dans le Grevelingenmeer, des résultats préliminaires nous ont permis d'observer que la taille des pores d'*Ammonia tepida* semblait varier entre spécimens et aux différentes stations échantillonnées suggérant un potentiel effet de la quantité d'oxygène dissous dans l'eau sur ces pores. En effet, les pores pourraient intervenir dans les échanges gazeux entre la cellule et le milieu et pourraient ainsi jouer un rôle important dans la survie dans des milieux peu oxygénés. Pour déterminer respectivement si la porosité joue un rôle dans la consommation d'oxygène et si la taille des pores permet de capter plus ou moins d'oxygène lorsque le milieu est appauvri en oxygène nous proposons de :

- Mesurer les taux de respiration d'individus ayant des pores de tailles différentes.
- Mesurer les taux de respiration en hypoxie d'individus ayant différentes tailles de pores.

4) *Les foraminifères benthiques peuvent-ils utiliser d'autres voies métaboliques anaérobies que la dénitrification ?*

Nous avons montré que certaines espèces résistantes à l'anoxie accumulent des nitrates dans leur cellule mais ne pourraient apparemment pas les consommer par dénitrification. Nous nous demandons ainsi si des voies

métaboliques de réduction des nitrates autres que la dénitrification peuvent être impliquées dans la survie des foraminifères en anoxie. Nous avons identifié une voie métabolique qui serait un candidat potentiel : l'ammonification (Dissimilative Nitrates Reduction to Ammonium). Cette voie réduit les nitrates en ammonium. Pour mettre en évidence l'existence de cette voie métabolique nous proposons de :

- Incuber des foraminifères dans un milieu enrichi en nitrates marqués ($^{15}\text{NO}_3$) puis quantifier la production potentielle d'ammonium marqué ($^{15}\text{NH}_4^+$).
- Identifier la présence chez les foraminifères d'un ou plusieurs gènes codant pour les enzymes impliqués dans la réduction de nitrates par ammonification.

Références bibliographiques

- Abril, G., Etcheber, H., Delille, B. et Borges, M. F. A. V.: Carbonate dissolution in the turbid and eutrophic Loire estuary, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 259, 129-138, doi:10.3354/meps259129, 2003.
- Alexander, E., Stock, A., Breiner, H.-W., Behnke, A., Bunge, J., Yakimov, M. M. et Stoeck, T.: Microbial eukaryotes in the hypersaline anoxic L'Atalante deep-sea basin, *Environ. Microbiol.*, 11(2), 360-381, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01777.x, 2009.
- Aller, R. C.: Benthic fauna and biogeochemical processes in marine sediments: the role of burrow structures, in *Nitrogen cycling in coastal marine environments*, p. 301-338, Blackburn TH, Sørensen J, Chichester., 1988.
- Aller, R. C.: Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation, *Chem. Geol.*, 114(3-4), 331-345, doi:10.1016/0009-2541(94)90062-0, 1994a.
- Aller, R. C.: The sedimentary Mn cycle in Long Island Sound: Its role as intermediate oxidant and the influence of bioturbation, O₂, and Corg flux on diagenetic reaction balances, *J. Mar. Res.*, 52(2), 259-295, doi:10.1357/0022240943077091, 1994b.
- Aller, R. C.: Transport and reactions in the bioirrigated zone, in *The Benthic Boundary Layer: Transport Processes and Biogeochemistry*, p. 269-301, Boudreau B.P. and Jorgensen B.B., New York., 2001.
- Almogi-Labin, A., Perelis-Grossovicz, L. et Raab, M.: Living Ammonia from a hypersaline inland pool, Dead Sea area, Israel, *J. Foraminifer. Res.*, 22(3), 257-266, 1992.
- Altenbach, A. V., Bernhard, J. M. et Seckbach, J., Éd.: Anoxia Evidence for Eukaryote Survival and Paleontological Strategies. [en ligne] Available from: <http://www.springerlink.com/content/978-94-007-1895-1/contents/?MUD=MP> (Consulté le 16 avril 2012), 2012.
- Alve, E.: Opportunistic features of the foraminifer *Stainforthia fusiformis* (Williamson): evidence from Frierfjord, Norway, *J. Micropaleontol.*, 13, 24, 1994.
- Alve, E.: A common opportunistic foraminiferal species as an indicator of rapidly changing conditions in a range of environments, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 57(3), 501-514, 2003.
- Alve, E.: Benthic foraminiferal responses to absence of fresh phytodetritus: A two-year experiment, *Mar. Micropaleontol.*, 76(3-4), 67-75, doi:10.1016/j.marmicro.2010.05.003, 2010.
- Alve, E. et Bernhard, J.: Vertical migratory response of benthic foraminifera to controlled oxygen concentrations in an experimental mesocosm, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 116, 137-151, doi:10.3354/meps116137, 1995.
- Alve, E. et Goldstein, S. T.: Propagule transport as a key method of dispersal in benthic foraminifera (Protista), *Limnol. Oceanogr.*, 48(6), 2163-2170, 2003.
- Alve, E. et Goldstein, S. T.: Dispersal, survival and delayed growth of benthic foraminiferal propagules, *J. Sea Res.*, 63(1), 36-51, 2010.
- Alve, E. et Murray, J. W.: Temporal variability in vertical distributions of live (stained) intertidal foraminifera, southern England, *J. Foraminifer. Res.*, 31(1), 12-24, 2001.

- Andersen, K., Kjær, T. et Revsbech, N. P.: An oxygen insensitive microsensor for nitrous oxide, *Sens. Actuators B Chem.*, 81(1), 42-48, doi:10.1016/S0925-4005(01)00924-8, 2001.
- Arčon, I., Ogrinc, N., Kodre, A. et Faganeli, J.: EXAFS and XANES characterization of sedimentary iron in the Gulf of Trieste (N. Adriatic), *J. Synchrotron Radiat.*, 6(3), 659-660, doi:10.1107/S0909049598017580, 1999.
- Armynot du Châtelet, E., Bout-Roumazielles, V., Coccioni, R., Frontalini, F., Guillot, F., Kaminiski, M. A., Recourt, P., Riboulleau, A., Trentesaux, A., Tribovillard, N. et Ventalon, S.: Environmental control on shell structure and composition of agglutinated foraminifera along a proximal–distal transect in the Marmara Sea, *Mar. Geol.*, 335, 114-128, doi:10.1016/j.margeo.2012.10.013, 2013.
- Bagarinao, T.: Sulfide as an environmental factor and toxicant: tolerance and adaptations in aquatic organisms, *Aquat. Toxicol.*, 24(1–2), 21-62, doi:10.1016/0166-445X(92)90015-F, 1992.
- Balzer, W.: On the distribution of iron and manganese at the sediment/water interface: thermodynamic versus kinetic control, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 46(7), 1153-1161, doi:10.1016/0016-7037(82)90001-1, 1982.
- Barmawidjaja, D. M., Jorissen, F. J., Puskaric, S. et Zwaan, G. J. van der: Microhabitat selection by benthic Foraminifera in the northern Adriatic Sea, *J. Foraminifer. Res.*, 22(4), 297-317, doi:10.2113/gsjfr.22.4.297, 1992.
- Barmawidjaja, D., Van der Zwaan, G., Jorissen, F. et Puskaric, S.: 150 years of eutrophication in the northern Adriatic Sea: evidence from a benthic foraminiferal record, *Mar. Geol.*, 122(4), 367–384, 1995.
- Barnett, P. R. O., Watson, J. et Connely, D.: A multiple corer for taking virtually undisturbed sample from shelf, bathyal and abyssal sediments, *Oceanol. Acta*, 7(4), 399-408, 1984.
- Barras, C., Duplessy, J.-C., Geslin, E., Michel, E. et Jorissen, F. J.: Calibration of $\delta^{18}\text{O}$ of cultured benthic foraminiferal calcite as a function of temperature, *Biogeosciences*, 7(4), 1349-1356, doi:10.5194/bg-7-1349-2010, 2010.
- Barras, C., Geslin, E., Duplessy, J.-C. et Jorissen, F. J.: Reproduction and Growth of the Deep-Sea Benthic Foraminifer *Bulimina Marginata* Under Different Laboratory Conditions, *J. Foraminifer. Res.*, 39(3), 155-165, doi:10.2113/gsjfr.39.3.155, 2009.
- Barras, C., Jorissen, F. J., Labrune, C., Andral, B. et Boissery, P.: Live benthic foraminiferal faunas from the French Mediterranean Coast: Towards a new biotic index of environmental quality, *Ecol. Indic.*, 36, 719-743, doi:10.1016/j.ecolind.2013.09.028, 2014.
- Di Bella, L., Bellotti, P., Frezza, V., Bergamin, L. et Carboni, M. G.: Benthic foraminiferal assemblages of the imperial harbor of Claudius (Rome): Further paleoenvironmental and geoarcheological evidences, *The Holocene* [en ligne] Available from: <http://hol.sagepub.com/content/early/2011/07/12/0959683611405239.abstract> (Consulté le 26 juin 2013), 2011.
- Benton, M. J. et Twitchett, R. J.: How to kill (almost) all life: the end-Permian extinction event, *Trends Ecol. Evol.*, 18(7), 358-365, doi:10.1016/S0169-5347(03)00093-4, 2003.
- Berger, W. H. et Wefer, G.: Export productivity: seasonality and intermittency, and paleoceanographic implications, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, 89, 245-254, 1990.
- Bernhard, J. M.: Postmortem Vital Staining in Benthic Foraminifera; Duration and Importance in Population and Distributional Studies, *J. Foraminifer. Res.*, 18(2), 143-146, doi:10.2113/gsjfr.18.2.143, 1988.

- Bernhard, J. M.: Experimental and field evidence of Antarctic foraminiferal tolerance to anoxia and hydrogen sulfide, *Mar. Micropaleontol.*, 20(3–4), 203–213, doi:10.1016/0377-8398(93)90033-T, 1993.
- Bernhard, J. M.: Microaerophilic and facultative anaerobic benthic foraminifera: a review of experimental and ultrastructural evidence, *Rev Paleobiol*, 15, 261–275, 1996.
- Bernhard, J. M.: Distinguishing live from dead foraminifera: methods review and proper applications, *Micropaleontology*, 46, 38–46, 2000.
- Bernhard, J. M.: Potential symbionts in bathyal foraminifera, *Science*, 299(5608), 861, 2003.
- Bernhard, J. M. et Alve, E.: Survival, ATP pool, and ultrastructural characterization of benthic foraminifera from Drammensfjord (Norway): response to anoxia, *Mar. Micropaleontol.*, 28(1), 5–17, doi:10.1016/0377-8398(95)00036-4, 1996.
- Bernhard, J. M., Blanks, J. K., Hintz, C. J. et Chandler, G. T.: Use of the fluorescent calcite marker calcein to label foraminiferal tests, *J. Foraminifer. Res.*, 34, 96–101, 2004.
- Bernhard, J. M. et Bowser, S. S.: Benthic foraminifera of dysoxic sediments: chloroplast sequestration and functional morphology, *Earth-Sci. Rev.*, 46(1–4), 149–165, doi:10.1016/S0012-8252(99)00017-3, 1999.
- Bernhard, J. M. et Bowser, S. S.: Peroxisome proliferation in foraminifera inhabiting the chemocline: An adaptation to reactive oxygen species exposure?, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 55(3), 135–144, doi:DOI 10.1111/j.1550-7408.2008.00318.x, 2008.
- Bernhard, J. M., Buck, K. R., Farmer, M. A. et Bowser, S. S.: The Santa Barbara Basin is a symbiosis oasis, *Nature*, 403(6765), 77–80, doi:10.1038/47476, 2000.
- Bernhard, J. M., Casciotti, K. L., McIlvin, M. R., Beaudoin, D. J., Visscher, P. T. et Edgcomb, V. P.: Potential importance of physiologically diverse benthic foraminifera in sedimentary nitrate storage and respiration, *J. Geophys. Res.*, 117(G3), G03002, doi:10.1029/2012JG001949, 2012.
- Bernhard, J. M., Edgcomb, V. P., Casciotti, K. L., McIlvin, M. R. et Beaudoin, D. J.: Denitrification likely catalyzed by endobionts in an allogromiid foraminifer, *ISME J.*, 6, 951–960, doi:10.1038/ismej.2011.171, 2011.
- Bernhard, J. M., Goldstein, S. T. et Bowser, S. S.: An ectobiont-bearing foraminiferan, *Bolivina pacifica*, that inhabits microxic pore waters: cell-biological and paleoceanographic insights, *Environ. Microbiol.*, 12(8), 2107–2119, 2010a.
- Bernhard, J. M., Gupta, B. K. S. et Borne, P. F.: Benthic foraminiferal proxy to estimate dysoxic bottom-water oxygen concentrations; Santa Barbara Basin, U.S. Pacific continental margin, *J. Foraminifer. Res.*, 27(4), 301–310, doi:10.2113/gsjfr.27.4.301, 1997.
- Bernhard, J. M., Martin, J. B. et Rathburn, A. E.: Combined carbonate carbon isotopic and cellular ultrastructural studies of individual benthic foraminifera: 2. Toward an understanding of apparent disequilibrium in hydrocarbon seeps, *Paleoceanography*, 25(4), doi:10.1029/2010PA001930, 2010b.
- Bernhard, J. M., Newkirk, S. G. et Bowser, S. S.: Towards a Non-Terminal Viability Assay for Foraminiferan Protists, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 42(4), 357–367, doi:10.1111/j.1550-7408.1995.tb01594.x, 1995.
- Bernhard, J. M., Ostermann, D. R., Williams, D. S. et Blanks, J. K.: Comparison of two methods to identify live benthic foraminifera: A test between Rose Bengal and CellTracker Green with implications for stable isotope paleoreconstructions, *Paleoceanography*, 21(PA4210), 8 PP., doi:200610.1029/2006PA001290, 2006.

- Bernhard, J. M. et Reimers, C. E.: Benthic foraminiferal population fluctuations related to anoxia: Santa Barbara Basin, *Biogeochemistry*, 15(2), 127-149, doi:10.1007/BF00003221, 1991.
- Bernhard, J. M. et Sen Gupta, B. K.: Foraminifera of oxygen-depleted environments, in *Modern Foraminifera*, p. 201-216, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-48104-9_12 (Consulté le 12 mars 2013), 1999.
- Bertuzzi, A., Faganeli, J. et Bflmbati, A.: Annual Variation of Benthic Nutrient Fluxes in Shallow Coastal Waters (Gulf of Trieste, Northern Adriatic Sea), *Mar. Ecol.*, 17(1-3), 261-278, doi:10.1111/j.1439-0485.1996.tb00507.x, 1996.
- Blackwelder, P., Hood, T., Alvarez-Zarikian, C., Nelsen, T. A. et McKee, B.: Benthic foraminifera from the NECOP study area impacted by the Mississippi River plume and seasonal hypoxia, *Quat. Int.*, 31, 19-36, doi:10.1016/1040-6182(95)00018-E, 1996.
- Blasnig, M., Riedel, B., Zuschin, M., Schiemer, L. et Stachowitsch, M.: Short-term post-mortality predation and scavenging and longer-term recovery after anoxia in the northern Adriatic Sea, *Biogeosciences Discuss*, 10(3), 4367-4401, doi:10.5194/bgd-10-4367-2013, 2013.
- Bollmann, J., Quinn, P. S., Vela, M., Brabec, B., Brechner, S., Cortés, M. Y., Hilbrecht, H., Schmidt, D. N., Schiebel, R. et Thierstein, H. R.: Automated Particle Analysis: Calcareous Microfossils, in *Image Analysis, Sediments and Paleoenvironments*, édité par P. Francus, p. 229-252, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-2122-4_12 (Consulté le 28 octobre 2013), 2004.
- Boltovskoy, E. et Lena, H.: On the Decomposition of the Protoplasm and the Sinking Velocity of the Planktonic Foraminifers, *Int. Rev. Gesamten Hydrobiol. Hydrogr.*, 55(5), 797-804, doi:10.1002/iroh.19700550507, 1970.
- Boltovskoy, E. et Wright, R. C.: *Recent Foraminifera*, Springer., 1976.
- Bonin, P.: Anaerobic nitrate reduction to ammonium in two strains isolated from coastal marine sediment: A dissimilatory pathway, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 19(1), 27-38, doi:10.1111/j.1574-6941.1996.tb00195.x, 1996.
- Bonin, P., Omnes, P. et Chalamet, A.: Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the French Mediterranean Coast, *Hydrobiologia*, 389(1-3), 169-182, doi:10.1023/A:1003585115481, 1998.
- Bornmalm, L., Corliss, B. H. et Tedesco, K.: Laboratory observations of rates and patterns of movement of continental margin benthic foraminifera, *Mar. Micropaleontol.*, 29(3-4), 175-184, 1997.
- Borrelli, C., Sabbatini, A., Luna, G. M., Nardelli, M. P., Sbaffi, T., Morigi, C., Danovaro, R. et Negri, A.: Technical Note: Determination of the metabolically active fraction of benthic foraminifera by means of Fluorescent In Situ Hybridization (FISH), *Biogeosciences*, 8(8), 2075-2088, doi:10.5194/bg-8-2075-2011, 2011.
- Bouchet, V. M. P., Alve, E., Rygg, B. et Telford, R. J.: Benthic foraminifera provide a promising tool for ecological quality assessment of marine waters, *Ecol. Indic.*, 23, 66-75, doi:10.1016/j.ecolind.2012.03.011, 2012.
- Bouchet, V. M. P., Debenay, J.-P., Sauriau, P.-G., Radford-Knoery, J. et Soletchnik, P.: Effects of short-term environmental disturbances on living benthic foraminifera during the Pacific oyster summer mortality in the Marennes-Oléron Bay (France), *Mar. Environ. Res.*, 64(3), 358-383, doi:10.1016/j.marenvres.2007.02.007, 2007.

- Bouchet, V. M. P., Sauriau, P.-G., Debenay, J.-P., Mermillod-Blondin, F., Schmidt, S., Amiard, J.-C. et Dupas, B.: Influence of the mode of macrofauna-mediated bioturbation on the vertical distribution of living benthic foraminifera: First insight from axial tomodesitometry, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 371(1), 20-33, doi:10.1016/j.jembe.2008.12.012, 2009.
- Boudreau, B.: *The Benthic Boundary Layer : Transport Processes and Biogeochemistry: Transport Processes and Biogeochemistry*, Oxford University Press., 2001.
- Bradshaw, J. S.: Laboratory studies on the rate of growth of the foraminifer, « *Streblus beccarii* (Linné) var. *tepida* (Cushman) », *J. Paleontol.*, 31(6), 1138-1147, 1957.
- Bradshaw, J. S.: Laboratory experiment on the ecology of foraminifera, *Contrib. Cushman Found. Foraminifer. Res.*, 12, 87-106, 1961.
- Braeckman, U., Vanaverbeke, J., Vincx, M., van Oevelen, D. et Soetaert, K.: Meiofauna Metabolism in Suboxic Sediments: Currently Overestimated, *PLoS ONE*, 8(3), e59289, doi:10.1371/journal.pone.0059289, 2013.
- Braman, R. S. et Hendrix, S. A.: Nanogram nitrite and nitrate determination in environmental and biological-materials by vanadium(III) reduction with chemi-luminescence detection, *Anal Chem*, 61, 2715-2718, doi:10.1021/ac00199a007, 1989.
- Brüchert, V., Jørgensen, B. B., Neumann, K., Riechmann, D., Schlösser, M. et Schulz, H.: Regulation of bacterial sulfate reduction and hydrogen sulfide fluxes in the central namibian coastal upwelling zone, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 67(23), 4505-4518, doi:10.1016/S0016-7037(03)00275-8, 2003.
- Brunner, C. A., Beall, J. M., Bentley, S. J. et Furukawa, Y.: Hypoxia hotspots in the Mississippi Bight, *J. Foraminifer. Res.*, 36(2), 95-107, 2006.
- Burdige, D. J.: *Geochemistry of marine sediments*, Princeton University Press., 2006.
- Burgess, R.: An improved protocol for separating meiofauna from sediments using colloidal silica sols, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 214(Iler 1979), 161-165, 2001.
- Burgin, A. J. et Hamilton, S. K.: Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways, *Front. Ecol. Environ.*, 5(2), 89-96, doi:10.1890/1540-9295(2007)5[89:HWOTRO]2.0.CO;2, 2007.
- Buzas, M. A.: Vertical distribution of foraminifera in the Indian River, Florida, *J. Foraminifer. Res.*, 7(3), 234-237, 1977.
- Buzas, M. A., Culver, S. J. et Jorissen, F. J.: A statistical evaluation of the microhabitats of living (stained) infaunal benthic foraminifera, *Mar. Micropaleontol.*, 20(3-4), 311-320, doi:10.1016/0377-8398(93)90040-5, 1993.
- Le Cadre, V., Debenay, J. P. et Lesourd, M.: Low pH effects on *Ammonia beccarii* test deformation: Implications for using test deformations as a pollution indicator, *J. Foraminifer. Res.*, 33(1), 1-9, 2003.
- Le Cadre, V. et Debenay, J.-P.: Morphological and cytological responses of ammonia (foraminifera) to copper contamination: implication for the use of foraminifera as bioindicators of pollution, *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987, 143(2), 304-317, doi:10.1016/j.envpol.2005.11.033, 2006.
- Cai, W.-J. et Sayles, F. L.: Oxygen penetration depths and fluxes in marine sediments, *Mar. Chem.*, 52(2), 123-131, doi:10.1016/0304-4203(95)00081-X, 1996.

- Caralp, M. H.: Abundance of *Bulimina exilis* and *Melonis barleeanum*: Relationship to the quality of marine organic matter, *Geo-Mar. Lett.*, 9(1), 37-43, doi:10.1007/BF02262816, 1989a.
- Caralp, M. H.: Size and morphology of the benthic foraminifer *Melonis barleeanum*; relationships with marine organic matter, *J. Foraminifer. Res.*, 19(3), 235-245, doi:10.2113/gsjfr.19.3.235, 1989b.
- Cearreta, A., Irabien, M. J., Leorri, E., Yusta, I., Croudace, I. W. et Cundy, A. B.: Recent Anthropogenic Impacts on the Bilbao Estuary, Northern Spain: Geochemical and Microfaunal Evidence, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 50(4), 571-592, doi:10.1006/ecss.1999.0582, 2000.
- Cedhagen, T.: Retention of chloroplasts and bathymetric distribution in the Sublittoral Foraminiferan *Nonionellina labradorica*, *Ophelia*, 33(1), 17-30, doi:10.1080/00785326.1991.10429739, 1991.
- Celia Magno, M., Bergamin, L., Finoia, M. G., Pierfranceschi, G., Venti, F. et Romano, E.: Correlation between textural characteristics of marine sediments and benthic foraminifera in highly anthropogenically-altered coastal areas, *Mar. Geol.*, 315-318, 143-161, doi:10.1016/j.margeo.2012.04.002, 2012.
- Chambers, J. M. et Hastie, T.: *Statistical models in S*, Chapman & Hall London. [en ligne] Available from: <http://www.lavoisier.fr/livre/notice.asp?id=OKRW3SA2OKOOWW> (Consulté le 12 mars 2013), 1992.
- Childress, J. J., Cowles, D. L., Favuzzi, J. A. et Mickel, T. J.: Metabolic rates of benthic deep-sea decapod crustaceans decline with increasing depth primarily due to the decline in temperature, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 37(6), 929-949, doi:10.1016/0198-0149(90)90104-4, 1990.
- Cloern, J. E.: Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 210, 223-253, doi:10.3354/meps210223, 2001.
- Corliss, B. H.: Morphology and microhabitat preferences of benthic foraminifera from the northwest Atlantic Ocean, *Mar. Micropaleontol.*, 17(3-4), 195-236, 1991.
- Corliss, B. H. et Emerson, S.: Distribution of rose bengal stained deep-sea benthic foraminifera from the Nova Scotian continental margin and Gulf of Maine, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 37(3), 381-400, doi:10.1016/0198-0149(90)90015-N, 1990.
- Crema, R., Castelli, A. et Prevedelli, D.: Long term eutrophication effects on macrofaunal communities in northern Adriatic Sea, *Mar. Pollut. Bull.*, 22(10), 503-508, doi:10.1016/0025-326X(91)90405-H, 1991.
- Danovaro, R., Dell'Anno, A., Pusceddu, A., Gambi, C., Heiner, I. et Kristensen, R. M.: The first metazoa living in permanently anoxic conditions, *BMC Biol.*, 8(1), 30, 2010.
- Davison, W., Grime, G. W., Morgan, J. a. W. et Clarke, K.: Distribution of dissolved iron in sediment pore waters at submillimetre resolution, *Nature*, 352(6333), 323-325, doi:10.1038/352323a0, 1991.
- Debenay, J. P., Pages, J. et Diouf, P. S.: Ecological zonation of the hyperhaline estuary of the Casamance River (Senegal): Foraminifera, zooplankton and abiotic variables, *Hydrobiologia*, 174(2), 161-176, doi:10.1007/BF00014063, 1989.
- Debenay, J.-P., Bénéteau, E., Zhang, J., Stouff, V., Geslin, E., Redois, F. et Fernandez-Gonzalez, M.: *Ammonia beccarii* and *Ammonia tepida* (Foraminifera): morphofunctional arguments for their distinction, *Mar. Micropaleontol.*, 34(3-4), 235-244, doi:10.1016/S0377-8398(98)00010-3, 1998.

- Debenay, J.-P., Bicchi, E., Goubert, E. et Armynot du Châtelet, E.: Spatio-temporal distribution of benthic foraminifera in relation to estuarine dynamics (Vie estuary, Vendée, W France), *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 67(1–2), 181–197, doi:10.1016/j.ecss.2005.11.014, 2006.
- Debenay, J.-P., Geslin, E., Eichler, B. B., Duleba, W., Sylvestre, F. et Eichler, P.: Foraminiferal assemblages in a hypersaline lagoon, Araruama (RJ) Brazil, *J. Foraminifer. Res.*, 31(2), 133–151, 2001.
- Debenay, J.-P., Guillou, J.-J., Redois, F. et Geslin, E.: Distribution Trends of Foraminiferal Assemblages in Paralic Environments, in *Environmental Micropaleontology*, vol. 15, édité par R. E. Martin, p. 39–67, Springer US, Boston, MA. [en ligne] Available from: http://link.springer.com.biblioplanets.gate.inist.fr/content/pdf/10.1007/978-1-4615-4167-7_3.pdf (Consulté le 11 septembre 2013), 2000.
- Debenay, J.-P., Pawlowski, J. et Decrouez, D.: *Les foraminifères actuels*, Masson, Paris., 1996.
- Deflandre, B., Mucci, A., Gagné, J.-P., Guignard, C. et Sundby, B. jør.: Early diagenetic processes in coastal marine sediments disturbed by a catastrophic sedimentation event, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 66(14), 2547–2558, doi:10.1016/S0016-7037(02)00861-X, 2002.
- Deslous-Paoli, J.-M., Souchu, P., Mazouni, N., Juge, C. et Dagault, F.: Relations milieu-ressources: impact de la conchyliculture sur un environnement lagunaire méditerranéen (Thau), *Oceanol. Acta*, 21(6), 831–843, doi:10.1016/S0399-1784(99)80010-3, 1998.
- Diaz, R. J. et Rosenberg, R.: Marine benthic hypoxia : A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna, *Oceanogr. Mar. Biol.*, 33, 245–303, 1995.
- Diaz, R. J. et Rosenberg, R.: Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems, *Science*, 321(5891), 926–929, 2008.
- Dissard, D., Nehrke, G., Reichart, G. J. et Bijma, J.: Impact of seawater pCO₂ on calcification and Mg/Ca and Sr/Ca ratios in benthic foraminifera calcite: results from culturing experiments with *Ammonia tepida*, *Biogeosciences*, 7(1), 81–93, doi:10.5194/bg-7-81-2010, 2010a.
- Dissard, D., Nehrke, G., Reichart, G. J. et Bijma, J.: The impact of salinity on the Mg/Ca and Sr/Ca ratio in the benthic foraminifera *Ammonia tepida*: Results from culture experiments, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 74(3), 928–940, doi:10.1016/j.gca.2009.10.040, 2010b.
- Diz, P., Barras, C., Geslin, E., Reichart, G.-J., Metzger, E., Jorissen, F. et Bijma, J.: Incorporation of Mg and Sr and oxygen and carbon stable isotope fractionation in cultured *Ammonia tepida*, *Mar. Micropaleontol.*, 2012.
- Diz, P. et Francés, G.: Distribution of live benthic foraminifera in the Ría de Vigo (NW Spain), *Mar. Micropaleontol.*, 66(3–4), 165–191, doi:10.1016/j.marmicro.2007.09.001, 2008.
- Donnici, S. et Serandrei Barbero, R.: The benthic foraminiferal communities of the northern Adriatic continental shelf, *Mar. Micropaleontol.*, 44(3–4), 93–123, doi:10.1016/S0377-8398(01)00043-3, 2002.
- Duchemin, G., Jorissen, F. J., Le Loc'h, F., Andrieux-Loyer, F., Hily, C. et Thouzeau, G.: Seasonal variability of living benthic foraminifera from the outer continental shelf of the Bay of Biscay, *J. Sea Res.*, 59(4), 297–319, doi:10.1016/j.seares.2008.03.006, 2008.
- Duijnste, I. A. P., de Nooijer, L. J., Ernst, S. R. et van der Zwaan, G. J.: Population dynamics of benthic shallow-water foraminifera: effects of a simulated marine snow event, *Mar. Ecol.-Prog. Ser.*, 285, 29–42, 2005.

- Duijnste, I., Ernst, S. et Van der Zwaan, G.: Effect of anoxia on the vertical migration of benthic foraminifera, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 246, 85–94, 2003.
- Duijnste, I., de Lugt, I., Vonk Noordegraaf, H. et van der Zwaan, B.: Temporal variability of foraminiferal densities in the northern Adriatic Sea, *Mar. Micropaleontol.*, 50(1–2), 125–148, doi:10.1016/S0377-8398(03)00069-0, 2004.
- Dupuy, C., Rossignol, L., Geslin, E. et Pascal, P.-Y.: Predation of mudflat meio-macrofaunal metazoans by a calcareous foraminifer, *Ammonia tepida* (Cushman, 1926), *J. Foraminifer. Res.*, 40(4), 305–312, 2010.
- Duros, P., Fontanier, C., Metzger, E., Pusceddu, A., Cesbron, F., de Stigter, H. C., Bianchelli, S., Danovaro, R. et Jorissen, F. J.: Live (stained) benthic foraminifera in the Whittard Canyon, Celtic margin (NE Atlantic), *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 58(2), 128–146, doi:10.1016/j.dsr.2010.11.008, 2011.
- Ellis, B. F. et Messina, A. R.: *Catalogue of Foraminifera*, American Museum of Natural History., 1940.
- Epping, E. H. G. et Helder, W.: Oxygen budgets calculated from in situ oxygen microprofiles for Northern Adriatic sediments, *Cont. Shelf Res.*, 17(14), 1737–1764, doi:10.1016/S0278-4343(97)00039-3, 1997.
- Ernst, S., Bours, R., Duijnste, I. et van der Zwaan, B.: Experimental effects of an organic matter pulse and oxygen depletion on a benthic foraminiferal shelf community, *J. Foraminifer. Res.*, 35(3), 177–197, doi:10.2113/35.3.177, 2005.
- Ernst, S., Duijnste, I. et van der Zwaan, B.: The dynamics of the benthic foraminiferal microhabitat: recovery after experimental disturbance, *Mar. Micropaleontol.*, 46(3–4), 343–361, doi:10.1016/S0377-8398(02)00080-4, 2002.
- Ernst, S. R., Morvan, J., Geslin, E., Le Bihan, A. et Jorissen, F. J.: Benthic foraminiferal response to experimentally induced Erika oil pollution, *Mar. Micropaleontol.*, 61(1–3), 76–93, doi:10.1016/j.marmicro.2006.05.005, 2006.
- Ernst, S. et van der Zwaan, B.: Effects of experimentally induced raised levels of organic flux and oxygen depletion on a continental slope benthic foraminiferal community, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 51(11), 1709–1739, doi:10.1016/j.dsr.2004.06.003, 2004.
- Ettwig, K. F., Butler, M. K., Le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J. C. T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M. L., van de Pas-Schoonen, K. T., Op den Camp, H. J. M., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K.-J., Stunnenberg, H., Weissenbach, J., Jetten, M. S. M. et Strous, M.: Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria, *Nature*, 464(7288), 543–548, doi:10.1038/nature08883, 2010.
- Faganeli, J., Avčič, A., Fanuko, N., Malej, A., Turk, V., Tušnik, P., Vrišer, B. et Vukovič, A.: Bottom layer anoxia in the central part of the Gulf of Trieste in the late summer of 1983, *Mar. Pollut. Bull.*, 16(2), 75–78, doi:10.1016/0025-326X(85)90127-4, 1985.
- Fariduddin, M. et Loubere, P.: The surface ocean productivity response of deeper water benthic foraminifera in the Atlantic Ocean, *Mar. Micropaleontol.*, 32(3–4), 289–310, doi:10.1016/S0377-8398(97)00026-1, 1997.
- Fedra, K., Ölscher, E. M., Scherübel, C., Stachowitsch, M. et Wurzian, R. S.: On the ecology of a North Adriatic benthic community: Distribution, standing crop and composition of the macrobenthos, *Mar. Biol.*, 38(2), 129–145, doi:10.1007/BF00390766, 1976.
- Fenchel, T.: Anaerobic Eukaryotes, in *Anoxia*, édité par A. V. Altenbach, J. M. Bernhard, et J. Seckbach, p. 3–16, Springer Netherlands. [en ligne] Available from:

- http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1896-8_1 (Consulté le 20 février 2013), 2012.
- Fenchel, T. et Finlay, B. J.: Respiration rates in heterotrophic, free-living protozoa, *Microb. Ecol.*, 9(2), 99-122, doi:10.1007/BF02015125, 1983.
- Fenchel, T. et Finlay, B. J.: Ecology and evolution in anoxic worlds, Oxford University Press., 1995.
- Filipsson, H. L., Bernhard, J. M., Lincoln, S. A. et McCorkle, D. C.: A culture-based calibration of benthic foraminiferal paleotemperature proxies: $\delta^{18}\text{O}$ and Mg/Ca results, *Biogeosciences*, 7(4), 1335-1347, doi:10.5194/bg-7-1335-2010, 2010.
- Filipsson, H. L. et Nordberg, K.: Climate variations, an overlooked factor influencing the recent marine environment. An example from Gullmar Fjord, Sweden, illustrated by benthic foraminifera and hydrographic data, *Estuaries Coasts*, 27(5), 867-881, 2004.
- Fones, G. R., Davison, W. et Grime, G. W.: Development of constrained DET for measurements of dissolved iron in surface sediments at sub-mm resolution, *Sci. Total Environ.*, 221(2-3), 127-137, doi:10.1016/S0048-9697(98)00273-3, 1998.
- Fontanier, C., Jorissen, F. ., Chaillou, G., David, C., Anschutz, P. et Lafon, V.: Seasonal and interannual variability of benthic foraminiferal faunas at 550 m depth in the Bay of Biscay, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 50(4), 457-494, doi:10.1016/S0967-0637(02)00167-X, 2003.
- Fontanier, C., Jorissen, F. ., Licari, L., Alexandre, A., Anschutz, P. et Carbonel, P.: Live benthic foraminiferal faunas from the Bay of Biscay: faunal density, composition, and microhabitats, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 49(4), 751-785, doi:10.1016/S0967-0637(01)00078-4, 2002.
- Fontanier, C., Jorissen, F. J., Chaillou, G., Anschutz, P., Grémare, A. et Griveaud, C.: Live foraminiferal faunas from a 2800 m deep lower canyon station from the Bay of Biscay: Faunal response to focusing of refractory organic matter, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 52(7), 1189-1227, doi:10.1016/j.dsr.2005.01.006, 2005.
- Fontanier, C., Jorissen, F. J., Lansard, B., Mouret, A., Buscail, R., Schmidt, S., Kerhervé, P., Buron, F., Zaragosi, S., Hunault, G., Ernoult, E., Artero, C., Anschutz, P. et Rabouille, C.: Live foraminifera from the open slope between Grand Rhône and Petit Rhône Canyons (Gulf of Lions, NW Mediterranean), *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 55(11), 1532-1553, doi:10.1016/j.dsr.2008.07.003, 2008.
- Frankel, L.: Pseudopodia of surface and subsurface dwelling *Miliammina fusca* (Brady), *J. Foraminifer. Res.*, 5(3), 211-217, 1975.
- Frias-Lopez, J., Thompson, A., Waldbauer, J. et Chisholm, S. W.: Use of stable isotope-labelled cells to identify active grazers of picocyanobacteria in ocean surface waters, *Environ. Microbiol.*, 11(2), 512-525, doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01793.x, 2009.
- Froelich, P. N., Klinkhammer, G. P., Bender, M. L., Luedtke, N. A., Heath, G. R., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B. et Maynard, V.: Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 43(7), 1075-1090, doi:10.1016/0016-7037(79)90095-4, 1979.
- Frontalini, F. et Coccioni, R.: Benthic foraminifera as bioindicators of pollution: A review of Italian research over the last three decades, *Rev. Micropaléontologie*, 54(2), 115-127, doi:10.1016/j.revmic.2011.03.001, 2011.

- Garnier, J., Servais, P., Billen, G., Akopian, M. et Brion, N.: Lower Seine River and estuary (France) carbon and oxygen budgets during low flow, *Estuaries*, 24(6), 964-976, doi:10.2307/1353010, 2001.
- Geslin, E., Barras, C., Langlet, D., Kim, J.-H., Bonnin, J., Metzger, E. et Jorissen, F. J.: Survival, Reproduction and Calcification of Three Benthic Foraminiferal Species in Response to Experimentally Induced Hypoxia, in *Experimental Approaches in Foraminifera: Collection, Maintenance and Experiments*, J. Bernhard and H. Kitazato, Berlin., 2014.
- Geslin, E., Heinz, P., Jorissen, F. et Hemleben, C.: Migratory responses of deep-sea benthic foraminifera to variable oxygen conditions: laboratory investigations, *Mar. Micropaleontol.*, 53(3-4), 227-243, doi:10.1016/j.marmicro.2004.05.010, 2004.
- Geslin, E., Risgaard-Petersen, N., Lombard, F., Metzger, E., Langlet, D. et Jorissen, F.: Oxygen respiration rates of benthic foraminifera as measured with oxygen microsensors, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 396(2), 108-114, doi:10.1016/j.jembe.2010.10.011, 2011.
- Giani, M., Djakovac, T., Degobbi, D., Cozzi, S., Solidoro, C. et Umani, S. F.: Recent changes in the marine ecosystems of the northern Adriatic Sea, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 115, 1-13, doi:10.1016/j.ecss.2012.08.023, 2012.
- Giere, O.: *Meiobenthology: The Microscopic Motile Fauna of Aquatic Sediments*, Springer., 2008.
- Gilbert, D., Rabalais, N. N., Díaz, R. J. et Zhang, J.: Evidence for greater oxygen decline rates in the coastal ocean than in the open ocean, *Biogeosciences*, 7(7), 2283-2296, doi:10.5194/bg-7-2283-2010, 2010.
- Glock, N., Eisenhauer, A., Milker, Y., Liebetrau, V., Schönfeld, J., Mallon, J., Sommer, S. et Hensen, C.: Environmental Influences on the Pore Density of *Bolivina spissa* (cushman), *J. Foraminifer. Res.*, 41(1), 22-32, doi:10.2113/gsjfr.41.1.22, 2011.
- Glud, R. N.: Oxygen dynamics of marine sediments, *Mar. Biol. Res.*, 4(4), 243-289, doi:10.1080/17451000801888726, 2008.
- Glud, R. N., Thamdrup, B., Stahl, H., Wenzhoefer, F., Glud, A., Nomaki, H., Oguri, K., Revsbech, N. P. et Kitazato, H.: Nitrogen cycling in a deep ocean margin sediment (Sagami Bay, Japan), *Limnol. Oceanogr.*, 54(3), 723-734, 2009.
- Gobeil, C., Macdonald, R. W. et Sundby, B.: Diagenetic separation of cadmium and manganese in suboxic continental margin sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 61(21), 4647-4654, doi:10.1016/S0016-7037(97)00255-X, 1997.
- Goineau, A., Fontanier, C., Jorissen, F., Buscail, R., Kerhervé, P., Cathalot, C., Pruski, A. M., Lantoiné, F., Bourgeois, S., Metzger, E., Legrand, E. et Rabouille, C.: Temporal variability of live (stained) benthic foraminiferal faunas in a river-dominated shelf – Faunal response to rapid changes of the river influence (Rhône prodelta, NW Mediterranean), *Biogeosciences*, 9(4), 1367-1388, doi:10.5194/bg-9-1367-2012, 2012.
- Goineau, A., Fontanier, C., Jorissen, F. J., Lansard, B., Buscail, R., Mouret, A., Kerhervé, P., Zaragosi, S., Ernoult, E., Artéro, C., Anschutz, P., Metzger, E. et Rabouille, C.: Live (stained) benthic foraminifera from the Rhône prodelta (Gulf of Lion, NW Mediterranean): Environmental controls on a river-dominated shelf, *J. Sea Res.*, 65(1), 58-75, doi:10.1016/j.seares.2010.07.007, 2011.
- Goldstein, S. T.: Foraminifera: A biological overview, in *Modern Foraminifera*, p. 37-55, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-48104-9_3 (Consulté le 12 mars 2013), 1999.

- Goldstein, S. T. et Corliss, B. H.: Deposit feeding selected deep-sea and shallow-water benthic foraminifera, *Deep-Sea Res. I*, 41(2), 229-241, 1994.
- Goldstein, S. T. et Moodley, L.: Gametogenesis and the life cycle of the foraminifer *Ammonia beccarii* (Linne) forma tepida (Cushman), *J. Foraminifer. Res.*, 23(4), 213-220, 1993.
- Gooday, A. J.: Meiofaunal foraminiferans from the bathyal Porcupine Seabight (northeast Atlantic): size structure, standing stock, taxonomy composition, species diversity and vertical distribution in the sediment, *Deep Sea Res.*, 33(10), 1345-1373, 1986.
- Gooday, A. J. et Jorissen, F. J.: Benthic Foraminiferal Biogeography: Controls on Global Distribution Patterns in Deep-Water Settings, *Annu. Rev. Mar. Sci.*, 4(1), 237-262, doi:10.1146/annurev-marine-120709-142737, 2012.
- Gooday, A. J., Jorissen, F., Levin, L. A., Middelburg, J. J., Naqvi, S. W. A., Rabalais, N. N., Scranton, M. et Zhang, J.: Historical records of coastal eutrophication-induced hypoxia, *Biogeosciences*, 6(8), 1707-1745, 2009.
- Gooday, A. J., Levin, L. A., Linke, P. et Heeger, T.: The Role of Benthic Foraminifera in Deep-Sea Food Webs and Carbon Cycling, in *Deep-Sea Food Chains and the Global Carbon Cycle*, édité par G. T. Rowe et V. Pariente, p. 63-91, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-2452-2_5 (Consulté le 19 août 2013), 1992.
- Grego, M., Riedel, B., Stachowitsch, M. et De Troch, M.: Meiofauna winners and losers of coastal hypoxia: case study harpacticoid copepods, *Biogeosciences*, 11(2), 281-292, doi:10.5194/bg-11-281-2014, 2014.
- Grego, M., Stachowitsch, M., De Troch, M. et Riedel, B.: CellTracker Green labelling vs. rose bengal staining: CTG wins by points in distinguishing living from dead anoxia-impacted copepods and nematodes, *Biogeosciences*, 10(7), 4565-4575, doi:10.5194/bg-10-4565-2013, 2013.
- Groß, O.: Influence of temperature, oxygen and food availability on the migrational activity of bathyal benthic foraminifera: evidence by microcosm experiments, in *Life at Interfaces and Under Extreme Conditions*, édité par G. Liebezeit, S. Dittmann, et I. Kröncke, p. 123-137, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-4148-2_12 (Consulté le 22 octobre 2013), 2000.
- Groß, O.: Sediment Interactions of Foraminifera: Implications for Food Degradation and Bioturbation Processes, *J. Foraminifer. Res.*, 32(4), 414-424, doi:10.2113/0320414, 2002.
- Grzymiski, J., Schofield, O. M., Falkowski, P. G. et Bernhard, J. M.: The function of plastids in the deep-sea benthic foraminifer, *Nonionella stella*, *Limnol. Oceanogr.*, 47(6), 1569-1580, doi:10.4319/lo.2002.47.6.1569, 2002.
- Gupta, B. K. S., Turner, R. E. et Rabalais, N. N.: Seasonal oxygen depletion in continental-shelf waters of Louisiana: Historical record of benthic foraminifers, *Geology*, 24(3), 227-230, doi:10.1130/0091-7613(1996)024<0227:SODICS>2.3.CO;2, 1996.
- Gustafsson, M. et Nordberg, K.: Living (Stained) Benthic Foraminifera and their Response to the Seasonal Hydrographic Cycle, Periodic Hypoxia and to Primary Production in Havstens Fjord on the Swedish West Coast, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 51(6), 743-761, doi:10.1006/ecss.2000.0695, 2000.
- Hagy, J. D., Boynton, W. R., Keefe, C. W. et Wood, K. V.: Hypoxia in Chesapeake Bay, 1950-2001: Long-term change in relation to nutrient loading and river flow, *Estuaries*, 27(4), 634-658, doi:10.1007/BF02907650, 2004.

- Haig, D. W.: Buliminid foraminifera from inner neritic sand and mud facies of the Papuan Lagoon, New Guinea, *J. Foraminifer. Res.*, 23(3), 162-179, doi:10.2113/gsjfr.23.3.162, 1993.
- Hall, P. O. J., Anderson, L. G., van der Loeff, M. M. R., Sundby, B. et Westerlund, S. F. G.: Oxygen uptake kinetics in the benthic boundary layer, *Limnol. Oceanogr.*, 34(4), 734-746, 1989.
- Hallock, P.: Symbiont-bearing Foraminifera, in *Modern Foraminifera*, p. 123-139, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-48104-9_8 (Consulté le 12 mars 2013), 1999.
- Hannah, F. et Rogerson, A.: The Temporal and Spatial Distribution of Foraminiferans in Marine Benthic Sediments of the Clyde Sea Area, Scotland, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 44(3), 377-383, 1997.
- Hannah, F., Rogerson, R. et Laybourn-Parry, J.: Respiration rates and biovolumes of common benthic Foraminifera (Protozoa), *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.*, 74(02), 301-312, doi:10.1017/S0025315400039345, 1994.
- Harper, M. P., Davison, W. et Tych, W.: Temporal, Spatial, and Resolution Constraints for in Situ Sampling Devices Using Diffusional Equilibration: Dialysis and DET, *Environ. Sci. Technol.*, 31(11), 3110-3119, doi:10.1021/es9700515, 1997.
- Havach, S. M., Chandler, G. T., Wilson-Finell, A. et Shaw, T. J.: Experimental determination of trace element partition coefficients in cultured benthic foraminifera, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 65(8), 1277-1283, 2001.
- Hayek, L.-A. C. et Buzas, M. A.: *Surveying Natural Populations*, Columbia University Press., 1997.
- Hayward, B. W., Holzmann, M., Grenfell, H. R., Pawlowski, J. et Triggs, C. M.: Morphological distinction of molecular types in *Ammonia* – towards a taxonomic revision of the world's most commonly misidentified foraminifera, *Mar. Micropaleontol.*, 50(3-4), 237-271, doi:10.1016/S0377-8398(03)00074-4, 2004.
- Heinz, P. et Geslin, E.: Ecological and Biological Response of Benthic Foraminifera Under Oxygen-Depleted Conditions: Evidence from Laboratory Approaches, in *Anoxia*, édité par A. V. Altenbach, J. M. Bernhard, et J. Seckbach, p. 287-303, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1896-8_15 (Consulté le 20 février 2013), 2012.
- Heinz, P., Hemleben, C. et Kitazato, H.: Time-response of cultured deep-sea benthic foraminifera to different algal diets, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 49(3), 517-537, 2002.
- Heinz, P., Kitazato, H., Schmiedl, G. et Hemleben, C.: Response of Deep-Sea Benthic Foraminifera from the Mediterranean Sea to Simulated Phytoplankton Pulses Under Laboratory Conditions, *J. Foraminifer. Res.*, 31(3), 210-227, doi:10.2113/31.3.210, 2001.
- Helly, J. J. et Levin, L. A.: Global distribution of naturally occurring marine hypoxia on continental margins, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 51(9), 1159-1168, doi:10.1016/j.dsr.2004.03.009, 2004.
- Hemleben, C. et Kitazato, H.: Deep-sea foraminifera under long time observation in the laboratory, *Deep Sea Res. I*, 42(6), 827-832, 1995.
- Hess, S. et Jorissen, F. J.: Distribution patterns of living benthic foraminifera from Cap Breton canyon, Bay of Biscay: Faunal response to sediment instability, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 56(9), 1555-1578, doi:10.1016/j.dsr.2009.04.003, 2009.

- Hess, S., Jorissen, F. J., Venet, V. et Abu-Zied, R.: Benthic foraminiferal recovery after recent turbidite deposition in Cap Breton canyon, Bay of Biscay, *J. Foraminifer. Res.*, 35(2), 114-129, 2005.
- Hess, S. et Kuhnt, W.: Deep-sea benthic foraminiferal recolonization of the 1991 Mt. Pinatubo ash layer in the South China Sea, *Mar. Micropaleontol.*, 28(2), 171-197, doi:10.1016/0377-8398(95)00080-1, 1996.
- Hines, M. E., Faganeli, J. et Planinc, R.: Sedimentary anaerobic microbial biogeochemistry in the Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea: Influences of bottom water oxygen depletion, Biogeochemistry, 39(1), 65-86, doi:10.1023/A:1005806508707, 1997.
- Hintz, C. J., Chandler, G. T., Bernhard, J. M., McCorkle, D. C., Havach, S. M., Blanks, J. K. et Shaw, T. J.: A physicochemically constrained seawater culturing system for production of benthic foraminifera, *Limnol. Oceanogr. Methods*, 2(JUNE), 160-170, 2004.
- Hintz, C. J., Shaw, T. J., Bernhard, J. M., Chandler, G. T., McCorkle, D. C. et Blanks, J. K.: Trace/minor element:calcium ratios in cultured benthic foraminifera. Part II: Ontogenetic variation, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 70(8), 1964-1976, 2006a.
- Hintz, C. J., Shaw, T. J., Chandler, G. T., Bernhard, J. M., McCorkle, D. C. et Blanks, J. K.: Trace/minor element:calcium ratios in cultured benthic foraminifera. Part I: Interspecies and inter-individual variability, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 70(8), 1952-1963, 2006b.
- Hofmann, A. F., Peltzer, E. T., Walz, P. M. et Brewer, P. G.: Hypoxia by degrees: Establishing definitions for a changing ocean, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 58(12), 1212-1226, doi:10.1016/j.dsr.2011.09.004, 2011.
- Høgslund, S., Revsbech, N. P., Cedhagen, T., Nielsen, L. P. et Gallardo, V. A.: Denitrification, nitrate turnover, and aerobic respiration by benthic foraminiferans in the oxygen minimum zone off Chile, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 359(2), 85-91, 2008.
- Hohenegger, J., Piller, W. et Baal, C.: Reasons for Spatial Microdistributions of Foraminifers in an Intertidal Pool (Northern Adriatic Sea), *Mar. Ecol.*, 10(1), 43-78, doi:10.1111/j.1439-0485.1989.tb00065.x, 1989.
- Hohenegger, J., Piller, W. E. et Baal, C.: Horizontal and vertical spatial microdistribution of foraminifers in the shallow subtidal Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea, *J. Foraminifer. Res.*, 23(2), 79-101, doi:10.2113/gsjfr.23.2.79, 1993.
- Horton, B. P. et Murray, J. W.: The roles of elevation and salinity as primary controls on living foraminiferal distributions: Cowpen Marsh, Tees Estuary, UK, *Mar. Micropaleontol.*, 63(3-4), 169-186, doi:10.1016/j.marmicro.2006.11.006, 2007.
- Hyams-Kaphzan, O., Almogi-Labin, A., Benjamini, C. et Herut, B.: Natural oligotrophy vs. pollution-induced eutrophy on the SE Mediterranean shallow shelf (Israel): Environmental parameters and benthic foraminifera, *Mar. Pollut. Bull.*, 58(12), 1888-1902, doi:10.1016/j.marpolbul.2009.07.010, 2009.
- Irigoien, X., Post, J., Castel, J., Pfeiffer, K. et Hellmann, B.: Nycthemeral variations of the dissolved oxygen concentration in the turbidity maximum of three European estuaries: biological vs. physical processes, *J. Mar. Syst.*, 22(2-3), 173-177, doi:10.1016/S0924-7963(99)00039-1, 1999.
- Jannink, N. T., Zachariasse, W. J. et Van der Zwaan, G. J.: Living (Rose Bengal stained) benthic foraminifera from the Pakistan continental margin (northern Arabian Sea), *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 45(9), 1483-1513, doi:10.1016/S0967-0637(98)00027-2, 1998.

- Jenkyns, H. C.: Geochemistry of oceanic anoxic events, *Geochem. Geophys. Geosystems*, 11(3), n/a–n/a, doi:10.1029/2009GC002788, 2010.
- Jensen, P.: Differences in microhabitat, abundance, biomass and body size between oxybiotic and thiobiotic free-living marine nematodes, *Oecologia*, 71(4), 564–567, doi:10.1007/BF00379298, 1987.
- Jézéquel, D., Brayner, R., Metzger, E., Viollier, E., Prévot, F. et Fiévet, F.: Two-dimensional determination of dissolved iron and sulfur species in marine sediment pore-waters by thin-film based imaging. Thau lagoon (France), *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 72(3), 420–431, doi:10.1016/j.ecss.2006.11.031, 2007.
- Jones, C. E. et Jenkyns, H. C.: Seawater Strontium Isotopes, Oceanic Anoxic Events, and Seafloor Hydrothermal Activity in the Jurassic and Cretaceous, *Am. J. Sci.*, 301(2), 112–149, doi:10.2475/ajs.301.2.112, 2001.
- Jørgensen, B. B. et Gallardo, V. A.: *Thioploca* spp.: filamentous sulfur bacteria with nitrate vacuoles, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 28(4), 301–313, doi:10.1111/j.1574-6941.1999.tb00585.x, 1999.
- Jørgensen, B. B., Glud, R. N. et Holby, O.: Oxygen distribution and bioirrigation in Arctic fjord sediments (Svalbard, Barents Sea), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 292, 85–95, doi:10.3354/meps292085, 2005.
- Jørgensen, B. B. et Revsbech, N. P.: Oxygen uptake, bacterial distribution, and carbon-nitrogen-sulfur cycling in sediments from the Baltic Sea - North Sea transition, *Ophelia*, 31(1), 29–49, doi:10.1080/00785326.1989.10430849, 1989.
- Jørgensen, K. S.: Annual Pattern of Denitrification and Nitrate Ammonification in Estuarine Sediment, *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(7), 1841–1847, 1989.
- Jorissen, F. J.: The distribution of benthic foraminifera in the Adriatic Sea, *Mar. Micropaleontol.*, 12, 21–48, doi:10.1016/0377-8398(87)90012-0, 1987.
- Jorissen, F. J.: Benthic foraminifera from the Adriatic Sea: principles of phenotypic variation, *Utrecht Micropaleontol. Bull.*, 37, 176 pp., 1988.
- Jorissen, F. J.: Benthic foraminiferal microhabitats below the sediment-water interface, in *Modern Foraminifera*, p. 161–179, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/0-306-48104-9_10 (Consulté le 12 mars 2013a), 1999.
- Jorissen, F. J.: Benthic foraminiferal successions across Late Quaternary Mediterranean sapropels, *Mar. Geol.*, 153(1–4), 91–101, doi:10.1016/S0025-3227(98)00088-7, 1999b.
- Jorissen, F. J., Barmawidjaja, D. M., Puskaric, S. et van der Zwaan, G. J.: Vertical distribution of benthic foraminifera in the northern Adriatic Sea: The relation with the organic flux, *Mar. Micropaleontol.*, 19(1–2), 131–146, doi:10.1016/0377-8398(92)90025-F, 1992.
- Jorissen, F. J., de Stigter, H. C. et Widmark, J. G. V.: A conceptual model explaining benthic foraminiferal microhabitats, *Mar. Micropaleontol.*, 26(1–4), 3–15, doi:10.1016/0377-8398(95)00047-X, 1995.
- Jorissen, F. J., Wittling, I., Peypouquet, J. P., Rabouille, C. et Relexans, J. C.: Live benthic foraminiferal faunas off Cape Blanc, NW-Africa: Community structure and microhabitats, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 45(12), 2157–2188, doi:10.1016/S0967-0637(98)00056-9, 1998.
- Josefson, A. B. et Widbom, B.: Differential response of benthic macrofauna and meiofauna to hypoxia in the Gullmar Fjord basin, *Mar. Biol.*, 100(1), 31–40, doi:10.1007/BF00392952, 1988.

- Justić, D.: Long-term eutrophication of the Northern Adriatic Sea, *Mar. Pollut. Bull.*, 18(6), 281-284, doi:10.1016/0025-326X(87)90505-4, 1987.
- Justić, D., Rabalais, N. N. et Turner, R. E.: Simulated responses of the Gulf of Mexico hypoxia to variations in climate and anthropogenic nutrient loading, *J. Mar. Syst.*, 42(3-4), 115-126, doi:10.1016/S0924-7963(03)00070-8, 2003.
- Kemp, W. M., Boynton, W. R., Adolf, J. E., Boesch, D. F., Boicourt, W. C., Brush, G., Cornwell, J. C., Fisher, T. R., Glibert, P. M., Hagy, J. D., Harding, L. W., Houde, E. D., Kimmel, D. G., Miller, W. D., Newell, R. I. E., Roman, M. R., Smith, E. M. et Stevenson, J. C.: Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 303, 1-29, doi:10.3354/meps303001, 2005.
- Kitazato, H.: Locomotion of some benthic foraminifera in and on sediments, *J. Foraminifer. Res.*, 18(4), 344-349, 1988.
- Kitazato, H.: Vertical distribution of benthic foraminifera within sediments (Preliminary Report), *Benthos Results Bull Jpn Assoc Benthol*, 35-36:41-51, 1989.
- Kitazato, H.: Foraminiferal microhabitats in four marine environments in Japan, *Mar. Micropaleontol.*, 24, 29-41, 1994.
- Kitazato, H., Shirayama, Y., Nakatsuka, T., Fujiwara, S., Shimanaga, M., Kato, Y., Okada, Y., Kanda, J., Yamaoka, A., Masukawa, T. et Suzuki, K.: Seasonal phytodetritus deposition and responses of bathyal benthic foraminiferal populations in Sagami Bay, Japan: preliminary results from « Project Sagami 1996-1999 », *Mar. Micropaleontol.*, 40, 135-149, 2000.
- Koho, K. A., García, R., de Stigter, H. C., Epping, E., Koning, E., Kouwenhoven, T. J. et van der Zwaan, G. J.: Sedimentary labile organic carbon and pore water redox control on species distribution of benthic foraminifera: A case study from Lisbon-Setúbal Canyon (southern Portugal), *Prog. Oceanogr.*, 79(1), 55-82, doi:10.1016/j.pcean.2008.07.004, 2008.
- Koho, K. A., Kouwenhoven, T. J., de Stigter, H. C. et van der Zwaan, G. J.: Benthic foraminifera in the Nazaré Canyon, Portuguese continental margin: Sedimentary environments and disturbance, *Mar. Micropaleontol.*, 66(1), 27-51, doi:10.1016/j.marmicro.2007.07.005, 2007.
- Koho, K. A. et Piña-Ochoa, E.: Benthic Foraminifera: Inhabitants of Low-Oxygen Environments, in *Anoxia*, édité par A. V. Altenbach, J. M. Bernhard, et J. Seckbach, p. 249-285, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1896-8_14 (Consulté le 20 février 2013), 2012.
- Koho, K. A., Piña-Ochoa, E., Geslin, E. et Risgaard-Petersen, N.: Vertical migration, nitrate uptake and denitrification: survival mechanisms of foraminifers (*Globobulimina turgida*) under low oxygen conditions, *FEMS Microbiol. Ecol.*, 75(2), 273-283, doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01010.x, 2011.
- Koron, N., Ogrinc, N., Metzger, E., Riedel, B. et Faganeli, J.: Diagenesis and benthic fluxes of nutrients and metals during experimentally induced anoxia in the Gulf of Trieste (northern Adriatic Sea), *Biogeosciences Discuss*, 10(7), 11729-11755, doi:10.5194/bg-10-11729-2013, 2013.
- Krachler, M.: Environmental applications of single collector high resolution ICP-MS, *J. Environ. Monit.*, 9(8), 790-804, doi:10.1039/B703823M, 2007.

- Kristiansen, K. D., Kristensen, E. et Jensen, E. M. H.: The Influence of Water Column Hypoxia on the Behaviour of Manganese and Iron in Sandy Coastal Marine Sediment, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 55(4), 645–654, doi:10.1006/ecss.2001.0934, 2002.
- Kuypers, M. M. M.: Anaerobic ammonium oxidation by anammox bacteria in the Black Sea, *Nature*, 422, 608–611, doi:10.1038/nature01472, 2003.
- Lamb, A. L., Wilson, G. P. et Leng, M. J.: A review of coastal palaeoclimate and relative sea-level reconstructions using $\delta^{13}\text{C}$ and C/N ratios in organic material, *Earth-Sci. Rev.*, 75(1–4), 29–57, doi:10.1016/j.earscirev.2005.10.003, 2006.
- Langezaal, A. M., van Bergen, P. F. et van der Zwaan, G. J.: The recovery of benthic foraminifera and bacteria after disturbance: experimental evidence, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 312(1), 137–170, doi:10.1016/j.jembe.2004.06.010, 2004.
- Langezaal, A. M., Jannink, N. T., Pierson, E. S. et van der Zwaan, G. J.: Foraminiferal selectivity towards bacteria: an experimental approach using a cell-permeant stain, *J. Sea Res.*, 54(4), 256–275, doi:10.1016/j.seares.2005.06.004, 2005.
- Langezaal, A. M., Jorissen, F. J., Braun, B., Chaillou, G., Fontanier, C., Anschutz, P. et van der Zwaan, G. J.: The influence of seasonal processes on geochemical profiles and foraminiferal assemblages on the outer shelf of the Bay of Biscay, *Cont. Shelf Res.*, 26(15), 1730–1755, doi:10.1016/j.csr.2006.05.005, 2006.
- Langlet, D., Baal, C., Geslin, E., Metzger, E., Zuschin, M., Riedel, B., Risgaard-Petersen, N., Stachowitsch, M. et Jorissen, F. J.: Foraminiferal species responses to in situ experimentally induced anoxia in the Adriatic Sea, *Biogeosciences Discuss*, 10(7), 12065–12114, doi:10.5194/bgd-10-12065-2013, 2013a.
- Langlet, D., Geslin, E., Baal, C., Metzger, E., Lejzerowicz, F., Riedel, B., Zuschin, M., Pawlowski, J., Stachowitsch, M. et Jorissen, F. J.: Foraminiferal survival after long-term in situ experimentally induced anoxia, *Biogeosciences*, 10(11), 7463–7480, doi:10.5194/bg-10-7463-2013, 2013b.
- Lanoux, A., Etcheber, H., Schmidt, S., Sottolichio, A., Chabaud, G., Richard, M. et Abril, G.: Factors contributing to hypoxia in a highly turbid, macrotidal estuary (the Gironde, France), *Environ. Sci. Process. Impacts*, 15(3), 585, doi:10.1039/c2em30874f, 2013.
- Lecroq, B., Lejzerowicz, F., Bachar, D., Christen, R., Esling, P., Baerlocher, L., Osteras, M., Farinelli, L. et Pawlowski, J.: Ultra-deep sequencing of foraminiferal microbarcodes unveils hidden richness of early monothalamous lineages in deep-sea sediments, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 108(32), 13177–13182, doi:10.1073/pnas.1018426108, 2011.
- Lee, J. J., Faber, W. W., Anderson, O. R. et Pawlowski, J.: Life cycles of foraminifera, in *Biology of Foraminifera*, édité par J. J. Lee et J. Anderson, p. 285–334, Academic Press, London., 1991.
- Lee, J. J. et Muller, W. A.: Trophic Dynamics and Niches of Salt Marsh Foraminifera, *Am. Zool.*, 13, 215–223, 1973.
- Leiter, C. et Altenbach, A. V.: Benthic Foraminifera from the Diatomaceous Mud Belt Off Namibia: Characteristic Species for Severe Anoxia, *Palaeontol. Electron.*, 13(2), 19, doi:Artn 11a, 2010.
- Lejzerowicz, F., Voltsky, I. et Pawlowski, J.: Identifying active foraminifera in the Sea of Japan using metatranscriptomic approach, *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, 86–87, 214–220, doi:10.1016/j.dsr2.2012.08.008, 2013.
- Lengkeek, W., Bouma, S. et Waardenburg, H. W.: Het effect van zuurstofdeficiëntie op het bodemleven in het Grevelingenmeer : een blik onder water - Rapport - Rijksoverheid.nl, rapport, Rijksoverheid. [en ligne] Available from:

- <http://www.rijksoverheid.nl/documenten-en-publicaties/rapporten/2007/10/27/het-effect-van-zuurstofdeficientie-op-het-bodemleven-in-het-grevelingenmeer-een-blik-onder-water.html> (Consulté le 23 septembre 2013), 2007.
- Di Leonardo, R., Bellanca, A., Capotondi, L., Cundy, A. et Neri, R.: Possible impacts of Hg and PAH contamination on benthic foraminiferal assemblages: An example from the Sicilian coast, central Mediterranean, *Sci. Total Environ.*, 388(1-3), 168-183, doi:10.1016/j.scitotenv.2007.08.009, 2007.
- Leutenegger, S.: Symbiosis in benthic foraminifera; specificity and host adaptations, *J. Foraminifer. Res.*, 14(1), 16-35, doi:10.2113/gsjfr.14.1.16, 1984.
- Leutenegger, S. et Hansen, H. J.: Ultrastructural and radiotracer studies of pore function in foraminifera, *Mar. Biol.*, 54(1), 11-16, doi:10.1007/BF00387046, 1979.
- Levin, L.: Benthic processes on the Peru margin: a transect across the oxygen minimum zone during the 1997-98 El Nino, *Prog Ocean.*, 53, 1-27, doi:10.1016/S0079-6611(02)00022-8, 2002.
- Levin, L.: Oxygen minimum zone benthos: adaptation and community response to hypoxia,, 2003.
- Levin, L. A., Ekau, W., Gooday, A. J., Jorissen, F., Middelburg, J. J., Naqvi, S. W. A., Neira, C., Rabalais, N. N. et Zhang, J.: Effects of natural and human-induced hypoxia on coastal benthos, *Biogeosciences*, 6(10), 2063-2098, 2009.
- Licari, L. N., Schumacher, S., Wenzhofer, E., Zabel, M. et Mackensen, A.: Communities and microhabitats of living benthic foraminifera from the tropical East Atlantic: Impact of different productivity regimes, *J. Foraminifer. Res.*, 33(1), 10-31, 2003.
- Linke, P.: Metabolic adaptations of deep-sea benthic foraminifera to seasonally varying food input., *Mar. Ecol. Prog. Ser. Oldendorf*, 81(1), 51-63, 1992.
- Linke, P. et Lutze, G. F.: Microhabitat preferences of benthic foraminifera—a static concept or a dynamic adaptation to optimize food acquisition?, *Mar. Micropaleontol.*, 20(3-4), 215-234, doi:10.1016/0377-8398(93)90034-U, 1993.
- Logares, R., Audic, S., Santini, S., Pernice, M. C., de Vargas, C. et Massana, R.: Diversity patterns and activity of uncultured marine heterotrophic flagellates unveiled with pyrosequencing, *ISME J.*, 6(10), 1823-1833, doi:10.1038/ismej.2012.36, 2012.
- Loubere, P., Jacobsen, B., Klitgaard Kristensen, D., Husum, K., Jernas, P. et Richaud, M.: The structure of benthic environments and the paleochemical record of foraminifera, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 58(5), 535-545, doi:10.1016/j.dsr.2011.02.011, 2011.
- Mackensen, A., Schumacher, S., Radke, J. et Schmidt, D. N.: Microhabitat preferences and stable carbon isotopes of endobenthic foraminifera: clue to quantitative reconstruction of oceanic new production?, *Mar. Micropaleontol.*, 40(3), 233-258, doi:10.1016/S0377-8398(00)00040-2, 2000.
- Mahar, M., Tyson, J. F., Neubauer, K. et Grosser, Z.: High throughput sample introduction system for the analysis of drinking waters and wastewaters by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23(9), 1204-1213, doi:10.1039/B800599K, 2008.
- Malej, A.: Gelatinous aggregates in the northern Adriatic Sea, *Bull. Inst. Océan.*, 149-157, 1995.
- Malej, A. et Malacic, V.: Factors affecting bottom layer oxygen depletion in the Gulf of Trieste (Adriatic Sea), *Ann Istrske Mediter StudHist Nat*, 6, 33-42, 1995.

- Mateu-Vicens, G., Box, A., Deudero, S. et Rodríguez, B.: Comparative Analysis of Epiphytic Foraminifera in Sediments Colonized by Seagrass *Posidonia oceanica* and Invasive Macroalgae *Caulerpa* spp., *J. Foraminifer. Res.*, 40(2), 134-147, doi:10.2113/gsjfr.40.2.134, 2010.
- McCorkle, D. C., Bernhard, J. M., Hintz, C. J., Blanks, J. K., Chandler, G. T. et Shaw, T. J.: The carbon and oxygen stable isotopic composition of cultured benthic foraminifera, *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.*, 303(1), 135-154, doi:10.1144/SP303.10, 2008.
- McIntyre, A. D. et Warwick, R. M.: Meiofauna techniques, in *Methods for the Study of Marine Benthos*, p. 217-244, N.A. Holme, A.D. McIntyre, Oxford., 1984.
- Megonigal, J. P., Hines, M. E. et Visscher, P. T.: 8.08 - Anaerobic Metabolism: Linkages to Trace Gases and Aerobic Processes, in *Treatise on Geochemistry*, édité par H. D. Holland et K. K. Turekian, p. 317-424, Pergamon, Oxford. [en ligne] Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0080437516081329> (Consulté le 10 février 2014), 2003.
- Meire, L., Soetaert, K. E. R. et Meysman, F. J. R.: Impact of global change on coastal oxygen dynamics and risk of hypoxia, *Biogeosciences*, 10(4), 2633-2653, doi:10.5194/bg-10-2633-2013, 2013.
- Mendes, I., Dias, J. A., Schönfeld, J. et Ferreira, Ó.: DISTRIBUTION OF LIVING BENTHIC FORAMINIFERA ON THE NORTHERN GULF OF CADIZ CONTINENTAL SHELF, *J. Foraminifer. Res.*, 42(1), 18-38, doi:10.2113/gsjfr.42.1.18, 2012.
- Mesnager, V., Ogier, S., Bally, G., Disnar, J.-R., Lottier, N., Dedieu, K., Rabouille, C. et Copard, Y.: Nutrient dynamics at the sediment-water interface in a Mediterranean lagoon (Thau, France): Influence of biodeposition by shellfish farming activities, *Mar. Environ. Res.*, 63(3), 257-277, doi:10.1016/j.marenvres.2006.10.001, 2007.
- Metzger, E., Langlet, D., Viollier, E., Koron, N., Riedel, B., Stachowitsch, M., Faganeli, J., Tharaud, M., Geslin, E. et Jorissen, F.: Artificially induced migration of redox layers in a coastal sediment from the Northern Adriatic, *Biogeosciences Discuss*, 10(7), 12029-12063, doi:10.5194/bgd-10-12029-2013, 2013a.
- Metzger, E., Simonucci, C., Viollier, E., Sarazin, G., Prévot, F., Elbaz-Poulichet, F., Seidel, J.-L. et Jézéquel, D.: Influence of diagenetic processes in Thau lagoon on cadmium behavior and benthic fluxes, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 72(3), 497-510, doi:10.1016/j.ecss.2006.11.016, 2007.
- Metzger, E., Viollier, E., Simonucci, C., Prévot, F., Langlet, D. et Jézéquel, D.: Millimeter-scale alkalinity measurement in marine sediment using DET probes and colorimetric determination, *Water Res.*, 47(15), 5575-5583, doi:10.1016/j.watres.2013.06.038, 2013b.
- Meysman, F. J. R., Boudreau, B. P. et Middelburg, J. J.: Modeling reactive transport in sediments subject to bioturbation and compaction, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 69(14), 3601-3617, doi:10.1016/j.gca.2005.01.004, 2005.
- Middelburg, J. J. et Levin, L. A.: Coastal hypoxia and sediment biogeochemistry, *Biogeosciences*, 6(7), 1273-1293, 2009.
- Middelburg, J. J., Soetaert, K., Herman, P. M. J. et Heip, C. H. R.: Denitrification in marine sediments: A model study, *Glob. Biogeochem. Cycles*, 10(4), 661-673, doi:10.1029/96GB02562, 1996.
- Minghelli-Roman, A., Laugier, T., Polidori, L., Mathieu, S., Loubersac, L. et Gouton, P.: Satellite survey of seasonal trophic status and occasional anoxic 'malaïgue' crises in the Thau lagoon using MERIS images, *Int. J. Remote Sens.*, 32(4), 909-923, doi:10.1080/01431160903485794, 2011.

- Mohan, S. B. et Cole, J. A.: Chapter 7 - The Dissimilatory Reduction of Nitrate to Ammonia by Anaerobic Bacteria, in *Biology of the Nitrogen Cycle*, édité par H. Bothe, S. J. Ferguson, et W. E. Newton, p. 93-106, Elsevier, Amsterdam. [en ligne] Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444528575500084> (Consulté le 10 février 2014), 2007.
- Mojtahid, M. (1981): Les foraminifères benthiques : bio-indicateurs d'eutrophisation naturelle et anthropique en milieu marin franc, [s.n.], [S.l.], 2007.
- Mojtahid, M., Griveaud, C., Fontanier, C., Anschutz, P. et Jorissen, F. J.: Live benthic foraminiferal faunas along a bathymetrical transect (140–4800 m) in the Bay of Biscay (NE Atlantic), *Rev. Micropaléontologie*, 53(3), 139-162, doi:10.1016/j.revmic.2010.01.002, 2010a.
- Mojtahid, M., Jorissen, F., Durrieu, J., Galgani, F., Howa, H., Redois, F. et Camps, R.: Benthic foraminifera as bio-indicators of drill cutting disposal in tropical east Atlantic outer shelf environments, *Mar. Micropaleontol.*, 61(1–3), 58–75, doi:10.1016/j.marmicro.2006.05.004, 2006.
- Mojtahid, M., Jorissen, F., Lansard, B. et Fontanier, C.: Microhabitat Selection of Benthic Foraminifera in Sediments Off the Rhône River Mouth (nw Mediterranean), *J. Foraminifer. Res.*, 40(3), 231-246, doi:10.2113/gsjfr.40.3.231, 2010b.
- Mojtahid, M., Jorissen, F., Lansard, B., Fontanier, C., Bombléd, B. et Rabouille, C.: Spatial distribution of live benthic foraminifera in the Rhône prodelta: Faunal response to a continental–marine organic matter gradient, *Mar. Micropaleontol.*, 70(3–4), 177–200, doi:10.1016/j.marmicro.2008.12.006, 2009.
- Mojtahid, M., Jorissen, F. et Pearson, T. H.: Comparison of benthic foraminiferal and macrofaunal responses to organic pollution in the Firth of Clyde (Scotland), *Mar. Pollut. Bull.*, 56(1), 42–76, doi:10.1016/j.marpolbul.2007.08.018, 2008.
- Molina-Cruz, A. et Ayala-López, A.: Influence of the hydrothermal vents on the distribution of benthic foraminifera from the Guaymas Basin, Mexico, *Geo-Mar. Lett.*, 8(1), 49–56, doi:10.1007/BF02238006, 1988.
- Moodley, L., Chen, G., Heip, C. et Vincx, M.: Vertical distribution of meiofauna in sediments from contrasting sites in the adriatic sea: Clues to the role of abiotic versus biotic control, *Ophelia*, 53(3), 203–212, doi:10.1080/00785326.2000.10409450, 2000.
- Moodley, L., Heip, C. H. R. et Middelburg, J. J.: Benthic activity in sediments of the northwestern Adriatic Sea: sediment oxygen consumption, macro- and meiofauna dynamics, *J. Sea Res.*, 40(3–4), 263–280, doi:10.1016/S1385-1101(98)00026-4, 1998a.
- Moodley, L. et Hess, C.: Tolerance of infaunal benthic foraminifera for low and high oxygen concentrations, *Biol. Bull.*, 183(1), 94–98, 1992.
- Moodley, L., Middelburg, J. J., Boschker, H. T. S., Duineveld, G. C. A., Pel, R., Herman, P. M. J. et Heip, C. H. R.: Bacteria and Foraminifera: key players in a short-term deep-sea benthic response to phytodetritus, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 236, 23–29, 2002.
- Moodley, L., Middelburg, J. J., Herman, P. M. J., Soetaert, K. et Lange, G. J. de: Oxygenation and organic-matter preservation in marine sediments: Direct experimental evidence from ancient organic carbon–rich deposits, *Geology*, 33(11), 889–892, doi:10.1130/G21731.1, 2005.
- Moodley, L., Schaub, B. E. M., Zwaan, G. J. van der et Herman, P. M. J.: Tolerance of benthic foraminifera (Protista: Sarcodina) to hydrogen sulphide, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169, 77–86, doi:10.3354/meps169077, 1998b.

- Moodley, L., Steyaert, M., Epping, E., Middelburg, J. J., Vincx, M., van Avesaath, P., Moens, T. et Soetaert, K.: Biomass-specific respiration rates of benthic meiofauna: Demonstrating a novel oxygen micro-respiration system, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 357(1), 41-47, doi:10.1016/j.jembe.2007.12.025, 2008.
- Moodley, L., Zwaan, G. J. van der, Herman, P. M. J., Kempers, L. et Breugel, P. van: Differential response of benthic meiofauna to anoxia with special reference to Foraminifera (Protista: Sarcodina), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 158, 151-163, doi:10.3354/meps158151, 1997.
- Morigi, C. et Geslin, E.: Qualification of benthic foraminiferal abundance, in *Methods for the Study of Deep-Sea Sediments, Their Functioning and Biodiversity*, Danovaro, R., London. [en ligne] Available from: <http://www.biogeosciences.net/10/4565/2013/bg-10-4565-2013.xml> (Consulté le 2 mars 2014), 2009.
- Mouret, A., Anschutz, P., Deflandre, B., Chaillou, G., Hyacinthe, C., Deborde, J., Etcheber, H., Jouanneau, J.-M., Grémare, A. et Lecroart, P.: Oxygen and organic carbon fluxes in sediments of the Bay of Biscay, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 57(4), 528-540, doi:10.1016/j.dsr.2009.12.009, 2010.
- Movellan, A., Schiebel, R., Zubkov, M. V., Smyth, A. et Howa, H.: Protein biomass quantification of unbroken individual foraminifers using nano-spectrophotometry, *Biogeosciences*, 9(9), 3613-3623, doi:10.5194/bg-9-3613-2012, 2012.
- Murray, J. W.: Population dynamics of benthic foraminifera; results from the Exe Estuary, England, *J. Foraminif. Res.*, 13(1), 1-12, doi:10.2113/gsjfr.13.1.1, 1983.
- Murray, J. W.: *Ecology and palaeoecology of benthic foraminifera*, Longman, Harlow., 1991.
- Murray, J. W.: Introduction to benthic foraminifera, in *Quaternary Environmental Micropaleontology*, édité par S. K. Haslett, p. 5-13, Arnold, London., 2002.
- Murray, J. W.: *Ecology And Applications of Benthic Foraminifera*, Cambridge University Press., 2006.
- Murray, J. W. et Bowser, S. S.: Mortality, Protoplasm Decay Rate, and Reliability of Staining Techniques to Recognize 'living' Foraminifera: A Review, *J. Foraminif. Res.*, 30(1), 66-70, doi:10.2113/0300066, 2000.
- Murray, J. W., Jannasch, H. W., Honjo, S., Anderson, R. F., Reeburgh, W. S., Top, Z., Friederich, G. E., Codispoti, L. A. et Izdar, E.: Unexpected changes in the oxic/anoxic interface in the Black Sea, *Nature*, 338(6214), 411-413, doi:10.1038/338411a0, 1989.
- Nardelli, M., Jorissen, F., Pusceddu, A., Morigi, C., Dell'Anno, A., Danovaro, R., De Stigter, H. et Negri, A.: Living benthic foraminiferal assemblages along a latitudinal transect at 1000m depth off the Portuguese margin, *Micropaleontology*, 56(3), 323, 2010.
- Nelder, J. A. et Wedderburn, R. W. M.: Generalized Linear Models, *J. R. Stat. Soc. Ser. Gen.*, 135(3), 370-384, doi:10.2307/2344614, 1972.
- Neretin, L. N.: *Past And Present Water Column Anoxia*, Springer-Verlag New York Inc., 2005.
- Nolte, A., Troost, T., de Boer, G., Spiteri, C. et van Wesenbeeck, B.: Verkenning oplossingsrichtingen voor een betere waterkwaliteit en ecologische toestand van het Grevelingenmeer: verkenning Grevelingen, water en getij. [en ligne] Available from: <http://nl.scribd.com/doc/86393509/Verkenning-oplossingsrichtingen-voor-een-betere-waterkwaliteit-en-ecologische-toestand-van-het-Grevelingenmeer-verkenning-Grevelingen-water-en-getij> (Consulté le 23 septembre 2013), 2008.
- Nomaki, H., Heinz, P., Hemleben, C. et Kitazato, H.: Behavior and Response of Deep-Sea Benthic Foraminifera to Freshly Supplied Organic Matter: A Laboratory Feeding Experiment

- in *Microcosm Environments*, J. Foraminifer. Res., 35(2), 103-113, doi:10.2113/35.2.103, 2005a.
- Nomaki, H., Heinz, P., Nakatsuka, T., Shimanaga, M. et Kitazato, H.: Species-specific ingestion of organic carbon by deep-sea benthic foraminifera and meiobenthos: in situ tracer experiments, *Limnol Ocean.*, 50(1), 134-146, 2005b.
- Nomaki, H., Yamaoka, A., Shirayama, Y. et Kitazato, H.: Deep-sea benthic foraminiferal respiration rates measured under laboratory conditions, *J. Foraminifer. Res.*, 37(4), 281, 2007.
- Nooijer, L. J. de, Toyofuku, T. et Kitazato, H.: Foraminifera promote calcification by elevating their intracellular pH, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106(36), 15374-15378, doi:10.1073/pnas.0904306106, 2009.
- Nordberg, K., Filipsson, H. L., Linné, P. et Gustafsson, M.: Stable oxygen and carbon isotope information on the establishment of a new, opportunistic foraminiferal fauna in a Swedish Skagerrak fjord basin, in 1979/1980, *Mar. Micropaleontol.*, 73(1-2), 117-128, doi:10.1016/j.marmicro.2009.07.006, 2009.
- Nordberg, K., Gustafsson, M. et Krantz, A. L.: Decreasing oxygen concentrations in the Gullmar Fjord, Sweden, as confirmed by benthic foraminifera, and the possible association with NAO, *J. Mar. Syst.*, 23(4), 303-316, 2000.
- Ogorelec, B., Mišič, M. et Faganeli, J.: Marine geology of the Gulf of Trieste (northern Adriatic): Sedimentological aspects, *Mar. Geol.*, 99(1-2), 79-92, doi:10.1016/0025-3227(91)90084-H, 1991.
- Ogrinc, N., Fontolan, G., Faganeli, J. et Covelli, S.: Carbon and nitrogen isotope compositions of organic matter in coastal marine sediments (the Gulf of Trieste, N Adriatic Sea): indicators of sources and preservation, *Mar. Chem.*, 95(3-4), 163-181, doi:10.1016/j.marchem.2004.09.003, 2005.
- Oren, A.: Diversity of Anaerobic Prokaryotes and Eukaryotes: Breaking Long-Established Dogmas, in *Anoxia*, édité par A. V. Altenbach, J. M. Bernhard, et J. Seckbach, p. 39-47, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1896-8_3 (Consulté le 20 février 2013), 2012.
- Orsi, W., Biddle, J. F. et Edgcomb, V.: Deep Sequencing of Subseafloor Eukaryotic rRNA Reveals Active Fungi across Marine Subsurface Provinces, *PLoS ONE*, 8(2), e56335, doi:10.1371/journal.pone.0056335, 2013.
- Osterman, L. E.: Benthic foraminifers from the continental shelf and slope of the Gulf of Mexico: an indicator of shelf hypoxia, *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 58(1), 17-35, doi:10.1016/S0272-7714(02)00352-9, 2003.
- Ott, J.: The Adriatic benthos: problems and perspectives, in *Marine eutrophication and population dynamics*, édité par G. Colombo, I. Ferrari, V. Ceccherelli, et R. Rossi, p. 367-378, Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark., 1992.
- Panieri, G.: Foraminiferal response to an active methane seep environment: A case study from the Adriatic Sea, *Mar. Micropaleontol.*, 61(1-3), 116-130, 2006.
- Panieri, G. et Gamberi, F.: Benthic foraminifera from a recent, shallow-water hydrothermal environment in the Aeolian Arc (Tyrrhenian Sea), *Mar. Geol.*, 218, 207-229, doi:10.1016/j.margeo.2005.04.002, 2005.
- Pascal, P.-Y., Dupuy, C., Richard, P. et Niquil, N.: Bacterivory in the common foraminifer *Ammonia tepida*: Isotope tracer experiment and the controlling factors, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 359(1), 55-61, doi:10.1016/j.jembe.2008.02.018, 2008.

- Paulmier, A. et Ruiz-Pino, D.: Oxygen minimum zones (OMZs) in the modern ocean, *Prog. Oceanogr.*, 80(3–4), 113–128, doi:10.1016/j.pocean.2008.08.001, 2009.
- Pawlowski, J.: Introduction to the molecular systematics of foraminifera, *Micropaleontology*, 46(supplement 1), 1–12, 2000.
- Pawlowski, J., Fontaine, D., da Silva, A. A. et Guiard, J.: Novel lineages of Southern Ocean deep-sea foraminifera revealed by environmental DNA sequencing, *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, 58(19–20), 1996–2003, doi:10.1016/j.dsr2.2011.01.009, 2011.
- Pawlowski, J. et Lecroq, B.: Short rDNA barcodes for species identification in foraminifera, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 57(2), 197–205, doi:10.1111/j.1550-7408.2009.00468.x, 2010.
- Pearson, T. H. et Rosenberg, R.: A comparative study of the effects on the marine environment of wastes from cellulose industries in Scotland and Sweden, *Amibo*, 5, 77–79, 1976.
- Pearson, T. H. et Rosenberg, R.: Macrobenthic succession in relation to organic enrichment and pollution of the marine environment, *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 16 [en ligne] Available from: <http://www.vliz.be/imis/imis.php?refid=116646> (Consulté le 24 septembre 2013), 1978.
- Phipps, M.: Les foraminifères benthiques de la marge portugaise: Impact des apports organiques sur la densité, la biodiversité et la composition des faunes, Thèse doctorat, Université d'Angers, Angers., 2012.
- Phipps, M., Jorissen, F., Pusceddu, A., Bianchelli, S. et De Stigter, H.: Live Benthic Foraminiferal Faunas Along a Bathymetrical Transect (282–4987 M) on the Portuguese Margin (ne Atlantic), *J. Foraminifer. Res.*, 42(1), 66–81, doi:10.2113/gsjfr.42.1.66, 2012.
- Phleger, F. B. et Soutar, A.: Production of benthic foraminifera in three east Pacific oxygen minima, *Micropaleontology*, 19, 110–115, 1973.
- Piña-Ochoa, E., Høglund, S., Geslin, E., Cedhagen, T., Revsbech, N. P., Nielsen, L. P., Schweizer, M., Jorissen, F., Rysgaard, S. et Risgaard-Petersen, N.: Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among Foraminifera and Gromiida, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 107(3), 1148–1153, 2010a.
- Piña-Ochoa, E., Koho, K., Geslin, E. et Risgaard-Petersen, N.: Survival and life strategy of the foraminiferan *Globobulimina turgida* through nitrate storage and denitrification, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 417, 39–49, doi:10.3354/meps08805, 2010b.
- Platon, E. et Gupta, B. K. S.: Benthic foraminiferal communities in oxygen-depleted environments of the Louisiana Continental Shelf, *Coast. Estuar. Stud.*, 58, 147–163, doi:10.1029/CE058p0147, 2001.
- Poag, C. W.: Paired Foraminiferal Ecophenotypes in Gulf Coast Estuaries: Ecological and Paleocological Implications, , 28 [en ligne] Available from: <http://archives.datapages.com/data/gcags/data/028/028001/0395.htm> (Consulté le 7 juin 2013), 1978.
- Poulain, P.-M. et Hariri, S.: Transit and residence times in the surface Adriatic Sea as derived from drifter data and Lagrangian numerical simulations, *Ocean Sci. Discuss.*, 10(1), 197–217, doi:10.5194/osd-10-197-2013, 2013.
- Pucci, F., Geslin, E., Barras, C., Morigi, C., Sabbatini, A., Negri, A. et Jorissen, F.: Survival of benthic foraminifera under hypoxic conditions: Results of an experimental study using the CellTracker Green method, *Mar. Pollut. Bull.*, 59(8–12), 336–351, 2009.
- R Development Core Team: R: A Language and Environment for Statistical Computing, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [en ligne] Available from: <http://www.R-project.org/>, 2011.

- Rabalais, N. N.: Eutrophication of estuarine and coastal ecosystems, in *Environmental Microbiology*, p. 115-134, John Wiley & Sons., 2010.
- Rabalais, N. N., Díaz, R. J., Levin, L. A., Turner, R. E., Gilbert, D. et Zhang, J.: Dynamics and distribution of natural and human-caused hypoxia, *Biogeosciences*, 7(2), 585-619, doi:10.5194/bg-7-585-2010, 2010.
- Rabalais, N. N., Turner, R. E. et Jr., W. J. W.: Gulf of Mexico Hypoxia, a.k.a. « The Dead Zone », *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33, 235-263, doi:10.2307/3069262, 2002.
- Reimers, C. E., Jahnke, R. A. et McCorkle, D. C.: Carbon fluxes and burial rates over the continental slope and rise off central California with implications for the global carbon cycle, *Glob. Biogeochem. Cycles*, 6(2), 199-224, doi:10.1029/92GB00105, 1992.
- Revsbech, N., Madsen, B. et Jorgensen, B. B.: Oxygen production and consumption in sediments determined at high spatial resolution by computer simulation of oxygen microelectrode data, *Limnol. Oceanogr. - LIMNOL Ocean.*, 31(2), 293-304, doi:10.4319/lo.1986.31.2.0293, 1986.
- Revsbech, N. P.: An oxygen microelectrode with a guard cathode, *Limnol Ocean.*, 34, 474-478, 1989.
- Riedel, B., Pados, T., Pretterebner, K., Schiemer, L., Steckbauer, A., Haselmair, A., Zuschin, M. et Stachowitsch, M.: Effect of hypoxia and anoxia on invertebrate behaviour: ecological perspectives from species to community level, *Biogeosciences Discuss*, 10(8), 14333-14438, doi:10.5194/bgd-10-14333-2013, 2013.
- Riedel, B., Zuschin, M., Haselmair, A. et Stachowitsch, M.: Oxygen depletion under glass: Behavioural responses of benthic macrofauna to induced anoxia in the Northern Adriatic, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 367(1), 17-27, doi:10.1016/j.jembe.2008.08.007, 2008.
- Riedel, B., Zuschin, M. et Stachowitsch, M.: Tolerance of benthic macrofauna to hypoxia and anoxia in shallow coastal seas: a realistic scenario, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 458, 39-52, doi:10.3354/meps09724, 2012.
- De Rijk, S., Jorissen, F. J., Rohling, E. J. et Troelstra, S. R.: Organic flux control on bathymetric zonation of Mediterranean benthic foraminifera, *Mar. Micropaleontol.*, 40(3), 151-166, doi:10.1016/S0377-8398(00)00037-2, 2000.
- De Rijk, S., Troelstra, S. et Rohling, E. J.: Benthic foraminiferal distribution in the Mediterranean Sea, *J. Foraminifer. Res.*, 29(2), 93-103, 1999.
- Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A. M., Ingvarsdén, S., Schmid, M. C., Jetten, M. S. M., Op Den Camp, H. J. M., Derksen, J. W. M., Piña-Ochoa, E., Eriksson, S. P., Nielsen, L. P., Revsbech, N. P., Cedhagen, T. et Van Der Zwaan, G. J.: Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer, *Nature*, 443(7107), 93-96, 2006.
- Romano, E., Bergamin, L., Ausili, A., Pierfranceschi, G., Maggi, C., Sesta, G. et Gabellini, M.: The impact of the Bagnoli industrial site (Naples, Italy) on sea-bottom environment. Chemical and textural features of sediments and the related response of benthic foraminifera, *Mar. Pollut. Bull.*, 59(8-12), 245-256, doi:10.1016/j.marpolbul.2009.09.017, 2009.
- Rysgaard, S., Risgaard-Petersen, N. et Sloth, N. P.: Nitrification, denitrification, and nitrate ammonification in sediments of two coastal lagoons in Southern France, in *Coastal Lagoon Eutrophication and ANaerobic Processes (C.L.E.AN.)*, édité par P. Caumette, J. Castel, et R. Herbert, p. 133-141, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-009-1744-6_11 (Consulté le 5 décembre 2013), 1996.

- Sabbatini, A., Bonatto, S., Bianchelli, S., Pusceddu, A., Danovaro, R. et Negri, A.: Foraminiferal assemblages and trophic state in coastal sediments of the Adriatic Sea, *J. Mar. Syst.*, 105–108, 163–174, doi:10.1016/j.jmarsys.2012.07.009, 2012.
- Sabbatini, A., Bonatto, S., Gooday, A. J., Morigi, C., Pancotti, I., Pucci, F. et Negri, A.: Modern benthic foraminifers at Northern shallow sites of Adriatic Sea and soft-walled, monothalamous taxa: a brief overview, *Micropaleontology*, 56(3-4), 359–376, 2010.
- Sarazin, G., Michard, G. et Prevot, F.: A rapid and accurate spectroscopic method for alkalinity measurements in sea water samples, *Water Res.*, 33(1), 290–294, 1999.
- Sass, A. M., McKew, B. A., Sass, H., Fichtel, J., Timmis, K. N. et McGenity, T. J.: Diversity of *Bacillus*-like organisms isolated from deep-sea hypersaline anoxic sediments, *Aquat. Biosyst.*, 4(1), 8, doi:10.1186/1746-1448-4-8, 2008.
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J. et Weber, C. F.: Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(23), 7537–7541, doi:10.1128/AEM.01541-09, 2009.
- Schmiedl, G., de Bovée, F., Buscail, R., Charrière, B., Hemleben, C., Medernach, L. et Picon, P.: Trophic control of benthic foraminiferal abundance and microhabitat in the bathyal Gulf of Lions, western Mediterranean Sea, *Mar. Micropaleontol.*, 40(3), 167–188, doi:10.1016/S0377-8398(00)00038-4, 2000.
- Schmiedl, G. et Mackensen, A.: Late Quaternary paleoproductivity and deep water circulation in the eastern South Atlantic Ocean: Evidence from benthic foraminifera, *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.*, 130(1–4), 43–80, doi:10.1016/S0031-0182(96)00137-X, 1997.
- Schnitker, D.: Ecotypic variation in *Ammonia beccarii* (Linné), *J. Foraminifer. Res.*, 4(4), 217–223, 1974.
- Schönfeld, J.: Benthic Foraminifera and Pore-Water Oxygen Profiles: A Re-Assessment of Species Boundary Conditions at the Western Iberian Margin, *J. Foraminifer. Res.*, 31(2), 86–107, doi:10.2113/0310086, 2001.
- Schumacher, S., Jorissen, F. J., Dissard, D., Larkin, K. E. et Gooday, A. J.: Live (Rose Bengal stained) and dead benthic foraminifera from the oxygen minimum zone of the Pakistan continental margin (Arabian Sea), *Mar. Micropaleontol.*, 62(1), 45–73, doi:10.1016/j.marmicro.2006.07.004, 2007.
- Schweizer, M., Polovodova, I., Nikulina, A. et Schönfeld, J.: Molecular identification of *Ammonia* and *Elphidium* species (Foraminifera, Rotaliida) from the Kiel Fjord (SW Baltic Sea) with rDNA sequences, *Helgol. Mar. Res.*, 65(1), 1–10, doi:10.1007/s10152-010-0194-3, 2011.
- Scott, D. B., Medioli, F. S. et Schafer, C. T.: Monitoring in coastal environments using foraminifera and thecamoebian indicators, Cambridge University Press. [en ligne] Available from: www.cambridge.org/0521561736 (Consulté le 27 septembre 2012), 2001.
- Seibel, B. A.: On the depth and scale of metabolic rate variation: scaling of oxygen consumption rates and enzymatic activity in the Class Cephalopoda (Mollusca), *J. Exp. Biol.*, 210(1), 1–11, doi:10.1242/jeb.02588, 2007.
- Seibel, B. A. et Drazen, J. C.: The rate of metabolism in marine animals: environmental constraints, ecological demands and energetic opportunities, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, 362(1487), 2061–2078, doi:10.1098/rstb.2007.2101, 2007.

- Sell, K. S. et Morse, J. W.: Dissolved Fe²⁺ and Σ H₂S Behavior in Sediments Seasonally Overlain by Hypoxic-to-anoxic Waters as Determined by CSV Microelectrodes, *Aquat. Geochem.*, 12(2), 179-198, doi:10.1007/s10498-005-4574-2, 2006.
- Semensatto-Jr., D. L., Funo, R. H. F., Dias-Brito, D. et Coelho-Jr., C.: Foraminiferal ecological zonation along a Brazilian mangrove transect: Diversity, morphotypes and the influence of subaerial exposure time, *Rev. Micropaléontologie*, 52(1), 67-74, doi:10.1016/j.revmic.2008.06.004, 2009.
- Sen Gupta, B. K.: *Modern Foraminifera*, Springer., 1999.
- Sen Gupta, B. K. et Machain-Castillo, M. L.: Benthic foraminifera in oxygen-poor habitats, *Mar. Micropaleontol.*, 20(3-4), 183-201, doi:10.1016/0377-8398(93)90032-S, 1993.
- Sen Gupta, B. K. et Platon, E.: Tracking Past Sedimentary Records of Oxygen Depletion in Coastal Waters: Use of the Ammonia-Elphidium Foraminiferal Index, *J. Coast. Res. Spec. Issue No 39 Proc. 8th Int. Coast. Symp. ICS 2004, III*, 1351-1355, 2006.
- Sergeeva, N. G., Anikeeva, O. V. et Gooday, A. J.: Soft-shelled, monothalamous foraminifera from the oxic/anoxic interface (NW Black Sea), *Micropaleontology*, 56(3-4), 393-407, 2010.
- Simon, J.: Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification, *FEMS Microbiol. Rev.*, 26(3), 285-309, doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00616.x, 2002.
- Skei, J.: Geochemical and sedimentological considerations of a permanently anoxic fjord — Framvaren, south Norway, *Sediment. Geol.*, 36(2-4), 131-145, doi:10.1016/0037-0738(83)90006-4, 1983.
- Skoog, A. C. et Arias-Esquível, V. A.: The effect of induced anoxia and reoxygenation on benthic fluxes of organic carbon, phosphate, iron, and manganese, *Sci. Total Environ.*, 407(23), 6085-6092, doi:10.1016/j.scitotenv.2009.08.030, 2009.
- Smith, M. S., Firestone, M. K. et Tiedje, J. M.: The Acetylene Inhibition Method for Short-term Measurement of Soil Denitrification and its Evaluation Using Nitrogen-131, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 42(4), 611, doi:10.2136/sssaj1978.03615995004200040015x, 1978.
- Sørensen, K. B. et Teske, A.: Stratified Communities of Active Archaea in Deep Marine Subsurface Sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 4596-4603, doi:10.1128/AEM.00562-06, 2006.
- Souchu, P., Gasc, A., Collos, Y., Vaquer, A., Tournier, H., Bibent, B. et Deslous-Paoli, J.: Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France), *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 164, 135-146, doi:10.3354/meps164135, 1998.
- Stachowitsch, M.: Mass Mortality in the Gulf of Trieste: The Course of Community Destruction, *Mar. Ecol.*, 5(3), 243-264, doi:10.1111/j.1439-0485.1984.tb00124.x, 1984.
- Stachowitsch, M.: Anoxia in the Northern Adriatic Sea: rapid death, slow recovery, *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.*, 58(1), 119-129, doi:10.1144/GSL.SP.1991.058.01.09, 1991.
- Stachowitsch, M., Riedel, B. et Zuschin, M.: The Return of Shallow Shelf Seas as Extreme Environments: Anoxia and Macrofauna Reactions in the Northern Adriatic Sea, in *Anoxia*, édité par A. V. Altenbach, J. M. Bernhard, et J. Seckbach, p. 353-368, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1896-8_19 (Consulté le 20 février 2013), 2012.
- Stachowitsch, M., Riedel, B., Zuschin, M. et Machan, R.: Oxygen depletion and benthic mortalities: The first in situ experimental approach to documenting an elusive phenomenon, *Limnol. Oceanogr. Methods*, 5(OCT), 344-352, 2007.

- Stigter, H. C. de, Jorissen, F. J. et Zwaan, G. J. van der: Bathymetric distribution and microhabitat partitioning of live (Rose Bengal stained) benthic Foraminifera along a shelf to bathyal transect in the southern Adriatic Sea, *J. Foraminifer. Res.*, 28(1), 40-65, 1998.
- Stock, A., Breiner, H.-W., Pachiadaki, M., Edgcomb, V., Filker, S., La Cono, V., Yakimov, M. M. et Stoeck, T.: Microbial eukaryote life in the new hypersaline deep-sea basin Thetis, *Extrem. Life Extreme Cond.*, 16(1), 21-34, doi:10.1007/s00792-011-0401-4, 2012.
- Stoeck, T., Zuendorf, A., Breiner, H.-W. et Behnke, A.: A molecular approach to identify active microbes in environmental eukaryote clone libraries, *Microb. Ecol.*, 53(2), 328-339, doi:10.1007/s00248-006-9166-1, 2007.
- Stouff, V., Debenay, J.-P. et Lesourd, M.: Origin of double and multiple tests in benthic foraminifera: Observations in laboratory cultures, *Mar. Micropaleontol.*, 36(4), 189-204, 1999a.
- Stouff, V., Lesourd, M. et Debenay, J.-P.: Laboratory observations on asexual reproduction (schizogony) and ontogeny of *Ammonia tepida* with comments on the life cycle, *J. Foraminifer. Res.*, 29(1), 75-84, 1999b.
- Stramma, L., Johnson, G. C., Sprintall, J. et Mohrholz, V.: Expanding Oxygen-Minimum Zones in the Tropical Oceans, *Science*, 320(5876), 655-658, doi:10.1126/science.1153847, 2008.
- Stramma, L., Prince, E. D., Schmidtko, S., Luo, J., Hoolihan, J. P., Visbeck, M., Wallace, D. W. R., Brandt, P. et Körtzinger, A.: Expansion of oxygen minimum zones may reduce available habitat for tropical pelagic fishes, *Nat. Clim. Change*, 2(1), 33-37, doi:10.1038/nclimate1304, 2012.
- Stramma, L., Schmidtko, S., Levin, L. A. et Johnson, G. C.: Ocean oxygen minima expansions and their biological impacts, *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.*, 57(4), 587-595, 2010.
- Strohm, T. O., Griffin, B., Zumft, W. G. et Schink, B.: Growth Yields in Bacterial Denitrification and Nitrate Ammonification, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(5), 1420-1424, doi:10.1128/AEM.02508-06, 2007.
- Sundby, B., Anderson, L. G., Hall, P. O. J., Iverfeldt, Å., van der Loeff, M. M. R. et Westerlund, S. F. G.: The effect of oxygen on release and uptake of cobalt, manganese, iron and phosphate at the sediment-water interface, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 50(6), 1281-1288, doi:10.1016/0016-7037(86)90411-4, 1986.
- Sundby, B., Martinez, P. et Gobeil, C.: Comparative geochemistry of cadmium, rhenium, uranium, and molybdenum in continental margin sediments, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 68(11), 2485-2493, doi:10.1016/j.gca.2003.08.011, 2004.
- Szarek, R., Nomaki, H. et Kitazato, H.: Living deep-sea benthic foraminifera from the warm and oxygen-depleted environment of the Sulu Sea, *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, 54(1-2), 145-176, 2007.
- Takishita, K., Kakizoe, N., Yoshida, T. et Maruyama, T.: Molecular evidence that phylogenetically diverged ciliates are active in microbial mats of deep-sea cold-seep sediment, *J. Eukaryot. Microbiol.*, 57(1), 76-86, doi:10.1111/j.1550-7408.2009.00457.x, 2010.
- Tapia: Living (stained) calcareous benthic foraminifera from recent sediments off Concepcion, central-southern Chile (similar to 36 degrees S), *Rev. Chil. Hist. Nat.*, 81, 403-416, 2008.
- Theede, H., Ponat, A., Hiroki, K. et Schlieper, C.: Studies on the resistance of marine bottom invertebrates to oxygen-deficiency and hydrogen sulphide, *Mar. Biol.*, 2(4), 325-337, doi:10.1007/BF00355712, 1969.

- Tiedje, J. M.: Denitrifiers, in SSSA Book Series, Bottomley, Angle & Weaver. [en ligne] Available from: <https://dl.sciencesocieties.org/publications/books/abstracts/sssabookseries/methodsofsoil/an2/245> (Consulté le 6 mars 2014), 1994.
- Treude, T.: Biogeochemical Reactions in Marine Sediments Underlying Anoxic Water Bodies, in Anoxia, édité par A. V. Altenbach, J. M. Bernhard, et J. Seckbach, p. 17-38, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-007-1896-8_2 (Consulté le 20 février 2013), 2012.
- De Troch, M., Roelofs, M., Riedel, B. et Grego, M.: Structural and functional responses of harpacticoid copepods to anoxia in the Northern Adriatic: an experimental approach, *Biogeosciences*, 10(6), 4259-4272, doi:10.5194/bg-10-4259-2013, 2013.
- Tsuchiya, M., Tazume, M. et Kitazato, H.: Molecular characterization of the non-costate morphotypes of buliminid foraminifers based on internal transcribed region of ribosomal DNA (ITS rDNA) sequence data, *Mar. Micropaleontol.*, 69(2), 212-224, doi:10.1016/j.marmicro.2008.07.008, 2008.
- Tyson, R. V. et Pearson, T. H.: Modern and ancient continental shelf anoxia: an overview, *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.*, 58(1), 1-24, 1991.
- Vallius, H.: Permanent Seafloor Anoxia in Coastal Basins of the Northwestern Gulf of Finland, Baltic Sea, *AMBIO J. Hum. Environ.*, 35(3), 105-108, doi:10.1579/0044-7447(2006)35[105:PSAICB]2.0.CO;2, 2006.
- Vandewiele, S., Cowie, G., Soetaert, K. et Middelburg, J. J.: Amino acid biogeochemistry and organic matter degradation state across the Pakistan margin oxygen minimum zone, *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.*, 56(6-7), 376-392, doi:10.1016/j.dsr2.2008.05.035, 2009.
- Viollier, E., Rabouille, C., Aplitz, S., Breuer, E., Chaillou, G., Dedieu, K., Furukawa, Y., Grenz, C., Hall, P., Janssen, F., Morford, J., Poggiale, J.-C., Roberts, S., Shimmield, T., Taillefert, M., Tengberg, A., Wenzhöfer, F. et Witte, U.: Benthic biogeochemistry: state of the art technologies and guidelines for the future of in situ survey, *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 285-286, 5-31, doi:10.1016/S0022-0981(02)00517-8, 2003.
- Walton, W. R.: Techniques for recognition of living foraminifera, in *Contributions from the Cushman Foundation for Foraminiferal Research*, vol. 3, p. 56-60, Scripps Institution of Oceanography., 1952.
- Walton, W. R. et Sloan, B. J.: The genus *Ammonia* Bruennich, 1772; its geographic distribution and morphologic variability, *J. Foraminifer. Res.*, 20(2), 128-156, doi:10.2113/gsjfr.20.2.128, 1990.
- Ward, B. B. et Kilpatrick, K. A.: Nitrogen Transformations in the Oxic Layer of Permanent Anoxic Basins: The Black Sea and the Cariaco Trench, in *Black Sea Oceanography*, édité par E. İzdar et J. W. Murray, p. 111-124, Springer Netherlands. [en ligne] Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-2608-3_7 (Consulté le 11 décembre 2013), 1991.
- Wenzhöfer, F. et Glud, R. N.: Small-scale spatial and temporal variability in benthic O₂ dynamics of coastal sediments: Effects of fauna activity, *Limnol. Oceanogr.*, 49(5), 1471-1481, doi:10.4319/lo.2004.49.5.1471, 2004.
- Wieser, W. et Kanwisher, J.: Ecological and physiological studies on marine nematodes from a small salt marsh near Woods Hole, Massachusetts, *Limnol. Oceanogr.*, 6, 262-270, 1961.

- Wignall, P. B. et Twitchett, R. J.: Oceanic Anoxia and the End Permian Mass Extinction, *Science*, 272(5265), 1155-1158, doi:10.1126/science.272.5265.1155, 1996.
- Wilson-Finelli, A., Chandler, G. T. et Spero, H. J.: Stable isotope behavior in paleoceanographically important benthic foraminifera: results from microcosm culture experiments, *J. Foraminifer. Res.*, 28(4), 312-320, 1998.
- Yakushev, E. V. et Neretin, L. N.: One-dimensional modeling of nitrogen and sulfur cycles in the aphotic zones of the Black and Arabian Seas, *Glob. Biogeochem. Cycles*, 11(3), 401-414, doi:10.1029/97GB00782, 1997.
- Zeebe, R. E. et Wolf-Gladrow, D.: *CO₂ in Seawater: Equilibrium, Kinetics, Isotopes*, Elsevier, Amsterdam., 2001.
- Zühlke, R. et Reise, K.: Response of macrofauna to drifting tidal sediments, *Helgoländer Meeresunters.*, 48(2-3), 277-289, doi:10.1007/BF02367041, 1994.
- Zwaan, G. J. V. D. et Jorissen, F. J.: Biofacial patterns in river-induced shelf anoxia, *Geol. Soc. Lond. Spec. Publ.*, 58(1), 65-82, doi:10.1144/GSL.SP.1991.058.01.05, 1991.

Table des matières

SOMMAIRE	1
AVANT PROPOS	3
1. <i>Missions d'échantillonnage</i>	3
2. <i>Travail d'analyse des échantillons et rédaction</i>	3
3. <i>Obtention de financements</i>	4
4. <i>Participation à des congrès et séminaires</i>	5
5. <i>Encadrement de stagiaires</i>	5
6. <i>Activités d'enseignement.....</i>	6
INTRODUCTION.....	7
1. <i>Les phénomènes d'hypoxie et d'anoxie dans les milieux marins</i>	8
1.1. Définitions et unités.....	8
1.2. Dynamique et diversité des milieux hypoxiques et anoxiques	9
2. <i>Géochimie des sédiments marins</i>	16
2.1. Principes de géochimie benthique.....	17
2.2. Caractéristiques géochimiques des sédiments des milieux anoxiques	19
3. <i>Réponse des foraminifères benthiques à l'anoxie</i>	20
3.1. Généralités sur les foraminifères benthiques	21
3.2. Réponse des foraminifères benthiques à l'hypoxie et à l'anoxie	24
3.3. Métabolisme anaérobie	30
4. <i>Problématique(s)</i>	32
CHAPITRE 1. EXPERIENCE IN SITU D'INCUBATION EN ANOXIE A LONG-TERME EN MER ADRIATIQUE : GEOCHIMIE BENTHIQUE ET REPNSE DES FAUNES DE FORAMINIFERES	35
PARTIE I. ARTIFICIALLY INDUCED MIGRATION OF REDOX LAYERS IN A COASTAL SEDIMENT FROM THE NORTHERN ADRIATIC 37	
1. <i>Abstract</i>	37
2. <i>Introduction</i>	38
3. <i>Material and Methods.....</i>	40
3.1. Study Area.....	40
3.2. Experimental setup	40
3.3. Oxygen and sulfide sensors.....	41
3.4. DET gel preparation and deployment	41
3.5. DET preservation and analyses	42
4. <i>Results.....</i>	43
4.1. Dissolved oxygen and sulfide in the chamber	43
4.2. Dissolved manganese and iron	44
4.3. Sulfate	45
4.4. Alkalinity	46

4.5.	H ₂ S-sensitive white tape coloration	47
5.	<i>Discussion</i>	48
5.1.	Sedimentary geochemistry under summer “Normoxic” conditions	48
5.2.	Vertical redox fluctuations versus lateral heterogeneity	50
5.3.	Unexpected sulfide feature.....	52
5.4.	Representativeness of the in situ experiments.....	54
6.	<i>Conclusions</i>	55
7.	<i>Acknowledgements</i>	55
PARTIE II.	FORAMINIFERAL SURVIVAL AFTER LONG-TERM IN SITU EXPERIMENTALLY INDUCED ANOXIA	57
1.	<i>Abstract</i>	57
2.	<i>Introduction</i>	58
3.	<i>Material and methods</i>	61
3.1.	Experimental set-up and sampling.....	61
3.2.	Meiofaunal analysis	62
3.3.	Ribosomal RNA analysis	64
3.4.	Data analysis	65
4.	<i>Results</i>	66
4.1.	Foraminiferal survival under various experimental conditions.....	66
4.2.	Density variation with time.....	67
4.3.	Density variation with sediment depth.....	69
4.4.	Ribosomal RNA analysis	71
5.	<i>Discussion</i>	71
5.1.	Pore water geochemistry and macrofaunal behavior during the experiment.....	71
5.2.	Methodological strategy of the study	73
5.3.	Foraminiferal survival under the experimental conditions	75
5.4.	Variations in foraminiferal densities	77
6.	<i>Conclusions</i>	81
PARTIE III.	FORAMINIFERAL SPECIES RESPONSES TO IN SITU EXPERIMENTALLY INDUCED ANOXIA IN THE ADRIATIC SEA	
	83	
1.	<i>Abstract</i>	83
2.	<i>Introduction</i>	84
3.	<i>Material and methods</i>	85
3.1.	Study area	85
3.2.	Faunal analysis	87
3.3.	Statistical analysis	88
3.4.	Nitrate content and denitrification measurements	89
4.	<i>Results</i>	89
4.1.	Effect of anoxia on standing stocks and diversity	89
4.2.	Species response to the experimental conditions	90
4.3.	Three different response types to long-term anoxia	93

4.4.	Species microhabitats	94
4.5.	Nitrate content and denitrification	95
5.	<i>Discussion</i>	96
5.1.	Sediment geochemistry and faunal response to experimentally induced anoxia.....	96
5.2.	Variation of foraminiferal standing stocks and diversity.....	97
5.3.	Species responses to experimentally induced anoxia	98
5.4.	Foraminiferal community response to the experimental conditions.....	106
5.5.	Understanding foraminiferal survival during exposure to anoxia	108
6.	<i>Conclusions</i>	109
7.	<i>Acknowledgements</i>	110
PARTIE IV.	BILAN DU CHAPITRE 1.....	111
1.	<i>Contrôle du développement de l'anoxie dans les chambres benthiques</i>	111
1.1.	Suivi de l'oxygène.....	111
1.2.	Migration des éléments chimiques dissous	111
2.	<i>Production de sulfures et changements dans la quantité de matière organique</i>	113
3.	<i>Effet des conditions expérimentales sur les foraminifères benthiques</i>	114
3.1.	Survie des foraminifères benthiques	114
3.2.	Réponse spécifique	115
4.	<i>Comment les foraminifères benthiques font-ils pour survivre à 10 mois d'anoxie ?</i>	119
CHAPITRE 2. VARIABILITE SPATIO-TEMPORELLE DES COMMUNAUTES DE FORAMINIFERES BENTHIQUES DANS L'ESTUAIRE FERME DE GREVELINGENMEER.....		121
PARTIE I.	SPATIAL AND TEMPORAL VARIABILITY OF BENTHIC FORAMINIFERA IN THE GREVELINGENMEER, MAY, AUGUST AND NOVEMBER 2011	123
1.	<i>Abstract</i>	123
2.	<i>Introduction</i>	124
3.	<i>Material and Methods</i>	125
3.1.	Sampling strategy.....	125
3.2.	Foraminiferal faunal analysis	126
4.	<i>Results and interpretation</i>	127
4.1.	Analysis of Foraminiferal Faunas.....	127
4.2.	Vertical distribution of the foraminiferal assemblages	133
4.3.	Influence of bottom water oxygen saturation on the foraminiferal density in August and November 2011.....	133
4.4.	A tentative bio-indication method for the Grevelingenmeer	136
4.5.	Morphology of benthic foraminifera in the Grevelingenmeer: an adaptive response to low- oxygen conditions?.....	137
5.	<i>Conclusions</i>	139
6.	<i>Perspectives</i>	139
PARTIE II.	RESUME ET NOUVEAUX RESULTATS DU PROJET	141

CHAPITRE 3. SURVIE, CROISSANCE ET METABOLISME DES FORAMINIFERES BENTHIQUES EN HYPOXIE ET EN ANOXIE..... 145

PARTIE I. SURVIVAL, REPRODUCTION AND CALCIFICATION OF THREE BENTHIC FORAMINIFERAL SPECIES IN RESPONSE TO EXPERIMENTALLY INDUCED HYPOXIA.....	147
1. <i>Abstract</i>	147
2. <i>Introduction</i>	148
3. <i>Ecological characteristics of the three tested species</i>	150
3.1. <i>Ammonia tepida</i>	150
3.2. <i>Bulimina marginata</i>	151
3.3. <i>Melonis barleeanus</i>	151
4. <i>Methodology</i>	151
4.1. Experimental design.....	151
4.2. Size measurements using an automatic particle analyser	154
4.3. Metabolism: oxygen respiration rates	154
4.4. Internal nitrate contents in foraminifera	154
4.5. Statistical analyses	155
5. <i>Results</i>	156
5.1. Monitoring of the oxygen conditions.....	156
5.2. Survival rates of adult specimens.....	156
5.3. Reproduction	157
5.4. Growth	157
5.5. Respiration rates.....	160
5.6. Intracellular nitrate content in foraminifera	160
6. <i>Discussion</i>	161
6.1. Species responses to hypoxic conditions	161
6.2. Metabolism in hypoxic conditions	165
6.3. Intracellular nitrate content.....	166
6.4. Discussion regarding experimental methodologies	167
7. <i>Conclusion</i>	169
PARTIE II. ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFET DE L'HYPOXIE ET DE L'ANOXIE SUR LA SURVIE ET LA CROISSANCE DE MELONIS BARLEEANUS. 171	
1. <i>Introduction</i>	171
2. <i>Matériel et Méthodes</i>	175
2.1. Collecte, conservation et traitement des échantillons	175
2.2. Protocole expérimental	176
2.3. Analyse de la survie.....	178
2.4. Analyse de la croissance	179
2.5. Analyse des nitrates intracellulaires	179
2.6. Mesure des taux de dénitrification	180
2.7. Observation du déplacement des foraminifères benthiques.....	182
2.8. Analyse de données	182

2.9.	Séquence expérimentale.....	186
3.	<i>Résultats</i>	186
3.1.	Suivi de l'oxygène dissous	186
3.2.	Survie	187
3.3.	Croissance	190
3.4.	Nitrates intracellulaires.....	192
3.5.	Mesure des taux de dénitrification	195
3.6.	Activité (déplacement) des foraminifères benthiques durant l'expérience II.....	195
4.	<i>Discussion</i>	196
4.1.	Interprétation des résultats de modélisation statistique.....	196
4.2.	Protocole expérimental – réponse de <i>Melonis barleeanus</i> aux conditions expérimentales.....	197
4.3.	Effets des conditions expérimentales sur <i>Melonis barleeanus</i>	199
4.4.	Différences entre hypoxie et anoxie	205
5.	<i>Conclusion</i>	207
CHAPITRE 4. NOUVELLES DONNEES EXPERIMENTALES POUR LA COMPREHENSION DES METABOLISMES AEROBIE ET ANAEROBIE DES FORAMINIFERES BENTHIQUES.....		209
PARTIE I.	ANALYSE DU METABOLISME AEROBIE	211
1.	<i>Introduction</i>	211
2.	<i>Matériel et Méthodes</i>	213
2.1.	Sites d'études.....	213
2.2.	Identification et isolation des individus vivants	214
2.3.	Détermination du biovolume des foraminifères benthiques	214
2.4.	Mesure des taux de respiration d'oxygène	215
2.5.	Analyse de données	216
3.	<i>Résultats et discussion</i>	217
3.1.	Relation entre taux de respiration et biovolume	217
3.2.	Différences spécifiques	219
3.3.	Analyse exploratoire des différences entre sites du métabolisme aérobie	220
3.4.	Analyse exploratoire de la variabilité du métabolisme en fonction du microhabitat	223
3.5.	Estimation de la contribution des foraminifères à la respiration benthique	226
4.	<i>Bilan de l'analyse du métabolisme aérobie</i>	228
PARTIE II.	ANALYSE DU METABOLISME ANAEROBIE	231
1.	<i>Introduction</i>	231
2.	<i>Matériel et Méthodes</i>	234
2.1.	Prélèvement et identification des individus vivants	234
2.2.	Mesures morphométriques	235
2.3.	Mesure des nitrates intracellulaires.....	236
2.4.	Mesure des taux de dénitrification	236
3.	<i>Résultats</i>	238
3.1.	Nitrate intracellulaire	238

3.2.	Taux de dénitrification	241
3.3.	Mobilité en anoxie	241
4.	<i>Discussion</i>	243
4.1.	Accumulation des nitrates intracellulaires.....	243
4.2.	Etendue de la capacité à dénitrifier chez les foraminifères benthiques	249
4.3.	Rôle du métabolisme anaérobie dans la survie en anoxie	250
PARTIE III.	CONCLUSIONS	259
SYNTHESE		261
1.	<i>Quels sont les effets de l'anoxie sur les foraminifères benthiques ?</i>	261
1.1.	Réponse à l'anoxie à l'échelle de la communauté	261
1.2.	A l'échelle de la population.....	265
1.3.	A l'échelle de l'individu	267
2.	<i>Est-ce qu'il y'a des effets différents de l'anoxie et de l'hypoxie ?</i>	270
3.	<i>Comment expliquer les différences de réponse des communautés entre les sites d'étude ?</i>	270
3.1.	Différences historiques et isolement géographique	271
3.2.	Différences de conditions physico-chimiques.....	271
4.	<i>Les foraminifères des milieux côtiers ont-ils une réponse différente des foraminifères des milieux profonds ?</i>	272
4.1.	Influence du temps d'exposition à l'anoxie	273
4.2.	Influence des conditions géochimiques	273
5.	<i>Cinétique de la réponse des foraminifères benthiques à l'évolution des conditions d'oxygénation dans un milieu côtier</i>	274
PERSPECTIVES		277
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		279
TABLE DES MATIERES.....		307
TABLE DES FIGURES		313
LISTE DES TABLEAUX.....		319

Table des figures

- Figure 1 – Nomogramme montrant la relation entre les différentes unités utilisées pour caractériser la concentration ou la pression en oxygène dans l'eau de mer (SW, en pointillés) et dans l'eau douce (FW, en traits plein) à 10 et 30 °C. D'après Diaz et Breitburg (2009). Les lignes rouges représentent le seuil de l'hypoxie établi à 63 μM . 8
- Figure 2 – Synthèse de la variabilité temporelle et spatiale des environnements hypoxiques et de leurs effets sur les écosystèmes. Figure adaptée d'après Rabalais et al. (2010)..... 10
- Figure 3 – Cartographie des OMZ permanentes en zones grises (redessinées d'après Kamykowski et Zentara, 1990; Paulmier et Ruiz-Pino, 2009; Hofmann et al., 2011) et de la circulation thermohaline (les flèches rouges étant les courants de surface et les flèches bleues localisent les courants profonds. Le fond de carte est d'après Rahmstorf (2002). 11
- Figure 4 – Cartographie des sites pour lesquelles des phénomènes d'hypoxie ont été observés. Données d'après (Diaz et Rosenberg, 2008) et mises à jour sur <http://www.wri.org/media/maps/eutrophication/fullscreen.html>..... 12
- Figure 5 – Représentation du développement de l'anoxie dans les milieux côtiers semi-fermés extrait de Treude (2012). 13
- Figure 6 – Localisation du site d'étude en Mer Adriatique Nord, dans le Golfe de Trieste..... 14
- Figure 7 – Localisation du lac de Grevelingen et de l'estuaire Westerschelde. Les repères a et b marquent respectivement la position barrage du barrage du Brouwersdam et le barrage du Grevelingendam. 15
- Figure 8 – Distribution de la concentration en oxygène (mg/L) en fonction de la profondeur (m) le long du chenal du Grevelingenmeer d'après des données de Rijkswaterstaat dans (Zijl et Nolte, 2006). La station 20 est localisée au barrage du Brouwersdam (en aval) et la station 1 au barrage du Grevelingendam (en amont)..... 16
- Figure 9 – A : représentation schématique des profils de concentration des éléments chimiques (u.a.) en fonction de la profondeur (u.a.) lors des réactions diagénétiques dans le sédiment marin. Les réactifs sont présentés en traits pleins et les produits en traits pointillés, d'après Froelich et al. (1979b). B et C : représentations schématiques de l'effet de la bioturbation via bio-irrigation (B) et via le remaniement sédimentaire (C) sur les profils de concentration d'oxygène (les traits plein et pointillés représentent respectivement des profils théoriques en conditions bioturbées et non-bioturbées) et les particules (Matière organique : MO représentée par les croix magenta, oxydes de manganèse et de fer : MnO_2 et $\text{Fe}(\text{OH})_3$ respectivement les astérisques bleues et jaunes). 17
- Figure 10- Comportement de la matière organique (MO ; A), de la concentration en oxygène, nitrates et sulfures (B) et de la densité de foraminifères (C) en fonction de la profondeur (unité arbitraire dépendant de la quantité de matière organique) dans les sédiments marins. La distribution des différents types de microhabitats endopéliques est présentée. 24
- Figure 11 - In situ dissolved oxygen concentration inside EAGU chamber (9 days incubation time). Dashed line: oxygen probe 5 cm above SWI. Full line: oxygen probe 4 mm above SWI. Sulfide was always below detection limit for both probes. 43
- Figure 12 - Pore-water dissolved manganese (orange diamonds) and iron (green diamonds) distribution from DET probes. From left to right: "Normoxic" situation, "9 days" incubation, "1 month" incubation", "10 months" incubation. White tape sulfide sensor corresponding to the DET probe is shown for each profile..... 44

Figure 13 - Normalized dissolved sulfate distribution in pore water from DET probes.....	45
Figure 14 - Pore water alkalinity distribution from DET probes.	46
Figure 15 - Dissolved H ₂ S occurrence during DET deployment as indicated by PVC white tapes (brown coloration).	47
Figure 16 - A: “Normoxic” DET probe on seabed. B: “9 days” chamber (EAGU) directly after chamber closure. C: “9 days” chamber after 8 days. D: “9 days” chamber directly before opening of chamber. E: “1 month” chamber on 10 August. F: “1 month” chamber on 17 August. G: 6 cores on the left sampled inside the “1 month” chamber. 2 cores on the right sampled outside the “1 month” chamber. H: photo of “10 months” chamber 1 month before opening (photo: T. Makovec).	50
Figure 17 - Foraminiferal standing stocks in all sampled cores for the whole cores (0-5 cm; panel A) and for the 0-0.5 cm depth intervals (panel B)	67
Figure 18 - Foraminiferal standing stocks plotted against deployment time. Open circles represent standing stock in the 0-5cm depth interval, full black circles correspond to the standing stock in 0-0.5cm depth. Full black lines represent the modeled standing stocks plotted against time, for the two depth intervals, after Model 3. Note that incubation time is represented on a transformed log scale (5 + time).	68
Figure 19 - Foraminiferal density plotted against sediment depth for all sampled cores. Open circles represent the density in replicate core 1, full black circles that in core 2. Full black line represents the modeled density according to Model 4.	70
Figure 20 - Taxonomic composition of the foraminiferal ribosomal RNA OTUs (Operational Taxonomy Unit) clustered at 96% sequence identity from the top centimeter of the sediment in the “10 Months” chamber. (A) Relative proportions of the 32 OTUs identified the order level or left unassigned after taxonomic assignment based on Needleman-Wunsch, global alignments of the 37f hypervariable region as in Lejzerowicz et al., (2013). (B) Relative proportion of OTUs (inner circle) and sequences (outer circle) assigned to the genus level.	71
Figure 21: Standing stock, species richness, Shannon index and evenness variations with time in two size fractions (full circles: >63 µm and open circles: >125 µm). The lines are estimated after the “models 1” group, full black line indicates that for the considered size the relationship between the dependent variable and the independent variable is significant, while grey dashed lines indicate no significant relationship.	90
Figure 22: Standing stock of the 9 major species in all the sampled cores (two replicate cores each time) in all studied size fractions in the whole core (0-5 cm). Note the different vertical scales for the various species.	91
Figure 23: Standing stock variation with time and sampling depth (full circles: 0-5 cm, open circles 0-0.5 cm) for the 9 major species. The lines are estimated after the “models 2” group, full lines indicating a significant effect of time and dashed lines indicating a non-significant effect of time. Two lines are drawn for the significantly different depth intervals.	92
Figure 24: Relationship between sediment depth and foraminiferal density for the 9 major species at all sampling times. Open circles and triangles represent replicate cores 1 and 2, respectively.	94
Figure 25: Vertical profiles of dissolved manganese, iron, sulfates and alkalinity with sediment depth at all sampling points after data presented in Metzger et al. (2013a) and vertical profiles of the total densities of the types A, B and C species. The raw geochemistry data are presented as small grey open circles and triangles for the two replicate probes. Large black open circle: concentration values averaged for each depth interval (0-	

- 0.5cm, ... 4-5 cm), black line: average for both replicates. The foraminiferal densities are presented as open circles and triangles for cores 1 and 2, respectively. 96
- Figure 26: Standing stock (upper panel) and relative density (lower panel) variation with time for the 3 types of response (black circles: type A, red squares: type B and blue triangles: type C) in the whole core (0-5 cm). Note that for representation purposes the standing stocks and relative density of type C were multiplied by 10 (refer to axis on the right). The lines are estimated after the “models 3” group, full lines indicating a significant effect of time, dashed lines a non-significant effect. 107
- Figure 27 - Concentration de manganèse, fer, sulfates et d'alcalinité entre 0 et 5 cm de profondeur dans les eaux porales aux différents temps d'échantillonnage d'après des données de Metzger et al. (2013a). Pour chaque réplikat (DET1 et DET2) les données brutes sont présentées en points et triangles gris, les valeurs moyennées par intervalles de profondeur (les intervalles utilisés pour les analyses faunistiques : 0-0,5 cm, ..., 4-5 cm) sont présentées en points et triangles noirs et la moyenne des deux réplikats par intervalle de profondeur est présentée en trait plein noir. Les profondeurs de production ou de consommation de manganèse, fer et sulfates sont présentées en trait pointillés orange, vert et rouge respectivement. 112
- Figure 28 - Variations de la saturation en oxygène, de la profondeur de production ou consommation de manganèse, fer, sulfates, alcalinité, de la production de sulfures, de la disponibilité de la matière organique, de la densité et de la densité relative des foraminifères benthiques en fonction de la durée de l'expérience. La saturation en oxygène est schématisée d'après les données de Metzger et al. (2013). La profondeur de production ou consommation des différents composés chimiques et la disponibilité de la matière organique sont estimées d'après les données de Metzger et al. (2013). La densité de foraminifères dans l'intervalle de profondeur 0-0,5 cm est présentée dans (Langlet et al., 2013b). Les densités relatives sont présentées dans (Langlet et al., 2013a). 118
- Figure 29 - Map of bottom water oxygen concentration, July 2010 124
- Figure 30 - Schematic representation of bathymetrical biogeochemical zonation along the southern channel transect (after Meysman et al., pers. com.) 125
- Figure 31 - Location of the sampling sites (Left panel: May 2011 sampling stations; right panel: August and November 2011 sampling stations. 126
- Figure 32 - Foraminiferal densities (standardized as the number of individuals per 25cc) in May 2011 at stations 6, 12, 22 and 26.5. Left panel is replicate A and right panel is replicate B. 130
- Figure 33 - Foraminiferal densities (standardised as the number of individuals per 25cc) in August 2011 at stations 1, 2 and 4. Left panel is replicate A and right panel is replicate B... 131
- Figure 34 - Foraminiferal densities (standardised as the number of individuals per 25cc) in November 2011 at stations 1, 2 and 4. Left panel is replicate A and right panel is replicate B. 132
- Figure 35 - Plot of the variation of the foraminiferal density versus estimated oxygen saturation in the bottom water in August and November for the three sampled stations. Note that the density is expressed on a log scale. The plotted values are the densities (individuals per 25cc) for the two pairs of replicates cores and the two studied depth intervals (0-0.5 and 0.5-1cm). 134
- Figure 36 - Plot of the foraminiferal density in August (black open circles) and November (red open circles) for two species (*Elphidium* ex. gr. *E. excavatum* and *Ammonia* cf. *A. batava*) at the three sampled stations for the two analysed depth intervals with estimated oxygen saturation. The lines represent the statistical model in August and

November in black and red respectively (F=197.2; df=3, 44; p.value<0.05; R ² =0.92).	136
Figure 37 - SEM micrographs of 3 living <i>Ammonia</i> cf. <i>A. batava</i> from 3 different stations (ST1, ST2 and ST4) in August 2011 with close-ups of the pore distribution in the penultimate chamber, at a magnification of 250, 500, 2000 and 10000 times.....	138
Figure 38 - SEM micrographs of a living <i>Ammonia</i> cf. <i>A. batava</i> (ST3 - August 2011).....	138
Figure 41 - Survival rates of <i>Ammonia tepida</i> after 7, 14, 29, 43 and 56 days under 3 experimental conditions.....	156
Figure 41 - Survival rates of <i>Melonis barleeanus</i> after 7, 14, 29, 43 and 56 days under 3 experimental conditions.....	156
Figure 41 - Survival rates of <i>Bulimina marginata</i> after 7, 14, 29, 43 and 56 days under 3 experimental conditions.....	156
Figure 42 - Growth of <i>Ammonia tepida</i> : comparison of the size of the individuals that did not add new chambers (T5.NoGrowth) and those that calcified one or more new chambers (T5), for each tested condition (OxN, HypN, Hyp). On the box-and-whisker plot the two borders of each box are the first and third quartile while whiskers are 1.5 times the interquartile range of the lower and higher quartiles.	157
Figure 43 - Growth of <i>Bulimina marginata</i> : comparison of the size of the individuals that did not add new chambers (T5.NoGrowth) and those that calcified one or more new chambers (T5), for each tested condition (OxN, HypN, Hyp). On the box-and-whisker plot the two borders of each box are the first and third quartile while whiskers are 1.5 times the interquartile range of the lower and higher quartiles	158
Figure 44 - Growth of <i>Melonis barleeanus</i> between T0 and T5 for each tested condition (OxN, HypN, Hyp). On the box-and-whisker plot the two borders of each box are the first and third quartile while whiskers are 1.5 times the interquartile range of the lower and higher quartiles.....	159
Figure 45 - Nitrate content (pmol.cell ⁻¹) recorded in the cell of the three species along the incubation time. The red line is statistically significant (only the case for <i>B. marginata</i> , Hyp).	161
Figure 46 - Représentation schématique du comportement de la matière organique (A), des concentrations en oxygène et nitrates d'après (Froelich et al., 1979; Burdige, 2006) (B) et des différents microhabitats de foraminifères benthiques (C) dans le sédiment marin. Abréviations utilisées : MO (matière organique), OxN caractérise les zones avec oxygène et nitrates, HypN les zones hypoxiques avec nitrates, AxN les zones anoxiques avec nitrates et Ax les zones anoxiques sans nitrates.	171
Figure 47 - Photographie au microscope optique d'un individu de l'espèce <i>Melonis barleeanus</i> (localisé au niveau de la flèche) s'étant déplacé et accumulant du sédiment fin autour de son test.....	176
Figure 48- représentation schématique et photographies du dispositif expérimental utilisé lors des deux expériences. Le gaz utilisé pour buller l'eau de chaque aquarium est présenté dans les bulles blanches, la présence de nitrates dans l'eau est symbolisée par les croix vertes. L'oxygénation de l'eau est symbolisée par sa couleur, l'eau oxygénée étant bleue claire et l'eau hypoxique ou anoxique étant bleue foncée. Lors des deux expériences la concentration en oxygène est contrôlée par les microélectrodes que l'on voit sur les photographies. Les couvercles sont différents dans les deux expériences (voir description dans le texte).....	177

- Figure 49 – Représentation schématique de l'hydrolyse et de la diffusion du FDA dans la cellule du foraminifère (A) et photographies d'un individu de *Melonis barleeanus* vivant à la loupe binoculaire (B) et à la loupe binoculaire à épifluorescence (C). 178
- Figure 50 - Photographie et représentation schématique de la cuve de mesure des taux de dénitrification. Légende : a – chambre de mesure (0,5 mm de diamètre) ; b – milieu interne (eau de mer artificielle + Hepes + acétylène) ; c – cuve à spectrophotométrie ; d – milieu externe (acide ascorbique) et e – tube en silicone. 180
- Figure 51 – interprétation et représentation graphique schématique des résultats des modèles de types a et b pour chacune des variables indépendantes pour une variable y quelconque (survie, taille, quantité ou concentration de nitrates)..... 185
- Figure 52 – séquence des différentes manipulations et particularités des expériences I et II. 186
- Figure 53 – Variation de la concentration en oxygène en fonction du temps au cours des deux expériences. Les données des électrodes placées dans les aquariums HypN et AxN sont présentés en trait plein noir et Hyp et Ax en trait plein rouge. Notez que les axes des ordonnées sont présentés en échelle logarithmique. Les deux lignes horizontales noires représentent le seuil de l'hypoxie à 63 μM et le seuil arbitraire de 0.5 μM 187
- Figure 54 – Taux de survie en fonction du temps pour les deux expériences dans chacun des aquariums échantillonnés. 188
- Figure 55 – Taux de survie en fonction du temps au cours des deux expériences. Les points rouges sont les valeurs observées dans chacun des aquariums de l'expérience I et les points noirs lors de l'expérience II. Les courbes rouges et noires sont estimées à partir du modèle linéaire. 190
- Figure 56 – Diamètre maximum et nombre d'individus mesurés dans chacun des aquariums à T0 et T5 au cours des expériences I et II. 191
- Figure 57 – Diamètre maximum et nombre d'individus mesurés dans chacun des aquariums à T0 et T5 pour l'expérience I (en rouge) et II (en noir). 192
- Figure 58 – Quantité (A et B) et concentration de nitrates cellulaires (C et D) en fonction du temps au cours des expériences I (A et C) et II (B et D) dans chacun des aquariums. Notez que les axes des ordonnées est exprimé en échelle logarithmique..... 193
- Figure 59 – Quantité et concentration en nitrates intracellulaires mesurées pour tous les individus en fonction du temps. Les points rouges et noirs représentent les individus mesurés lors de l'expérience I et II (respectivement). Les courbes sont estimées à partir des modèles linéaires établis. Notez que l'axe des ordonnées est présenté selon une échelle logarithmique..... 194
- Figure 60 – Photographies de la surface du sédiment du cristalliseur à la fin de chaque période d'incubation (T2-14j, T3-28j, T4-49j et T5-69j) pour chacun des aquariums. 195
- Figure 61- Taux de respiration (nL O_2 /individu/h) en fonction du biovolume (μm^3) pour les différents groupes de la méiofaune. Modifié d'après Geslin et al. (2011). 211
- Figure 62 - Taux de respiration (nL O_2 /individu/h) en fonction du biovolume (μm^3) pour les foraminifères benthiques disponible dans la littérature. Modifié d'après Geslin et al. (2011). 212
- Figure 63 – Photographie au microscope optique d'un individu de l'espèce *Melonis barleeanus* (localisé à la flèche b) s'étant déplacé (de la position a initiale vers la b en environ 2h) et accumulant du sédiment fin autour de son test. 214
- Figure 64 – Photographie et représentation schématique de la cuve de mesure des taux de respiration d'oxygène. Légende : a – chambre de mesure dans laquelle les

foraminifères sont placés (1 mm de diamètre) ; b – milieu interne (eau de mer artificielle) ; c – cuve à spectrophotométrie.....	216
Figure 65 – Relation entre le taux de respiration (en pmol/individ./j) et le biovolume des foraminifères pour les données publiées par Geslin et al. (2011) et les nouvelles données acquises lors de cette thèse. Les droites représentent les modèles liant le taux de respiration (RR) au biovolume (BV) pour les données de Geslin et al. (2011), les nouvelles données et l'ensemble des deux séries de données en pointillés noirs, pointillés rouges et en trait plein noir respectivement. Notez que les axes sont représentés selon des échelles logarithmiques.....	217
Figure 66 – Relation entre le taux de respiration (en pmol/individ./j) en fonction du biovolume (en μm^3) pour l'ensemble des espèces étudiées. Pour faciliter la lisibilité le graphique est séparé en 4 panneaux en fonction du nombre de réplicats disponible par espèce (le nombre de réplicats augmente du panneau supérieur vers le panneau inférieur). Les traits pleins et pointillés représentent les modèles liant le taux de respiration au biovolume respectivement significatifs et non significatifs (au seuil de 5%). Notez que les axes sont représentés selon des échelles logarithmiques. La droite grise pointillée est tracée en fonction de l'Équation 5.....	219
Figure 67 - Relation entre le taux de respiration et le biovolume en fonction du site d'échantillonnage (Panneau A) et résidus du modèle (Équation 5) en fonction de la profondeur du site d'échantillonnage (Panneau B).....	221
Figure 68 – Relation entre le taux de respiration et le biovolume en fonction du microhabitat des espèces (Panneau A) et résidus du modèle (Équation 5) en fonction du microhabitat (Panneau B).....	224
Figure 69 – Photographie et représentation schématique de la cuve de mesure des taux de respiration d'oxygène. Légende : a – chambre de mesure (0.5 mm de diamètre) ; b – milieu interne (eau de mer artificielle + Hepes + Acétylène) ; c – cuve à spectrophotométrie ; d – milieu externe (Ascorbate de Sodium) ; e – tube en silicone.....	237
Figure 70 – Quantité de nitrates (A ; pmol/cellule) et concentration en nitrates (B ; mM) en fonction du Diamètre maximum (μm) pour <i>Melonis barleeanus</i> de l'expérience I et quantité (C) et concentration en nitrates (D) pour <i>Bulimina marginata</i> lors de l'expérience I. Notez que la quantité de nitrates est représentée suivant un axe logarithmique. La droite est le modèle liant ces deux paramètres cette droite est pleine lorsque le modèle est significatif et en pointillés lorsque le modèle n'est pas significatif.....	241

Liste des tableaux

Tableau 1 – Ensemble des réactions diagénétiques primaires et liste non-exhaustive de réactions secondaires qui produisent (+) ou consomment (-) de la matière organique (MO, telle que $MO = C_{106}H_{263}O_{110}N_{16}P$), de l'oxygène (O_2), des nitrates (NO_3^-) et des sulfures (H_2S ; Froelich et al., 1979b).....	18
Tableau 2 – Ensemble des méthodes les plus couramment utilisées pour identifier la vitalité des foraminifères benthiques (liste non exhaustive), mode d'action, type d'utilisation et leurs points positifs et négatifs. Voir Walton, 1952; Alve et Bernhard, 1995; Bernhard et al., 1995, 2006; Bernhard et Alve, 1996; Bernhard, 2000; Borrelli et al., 2011; Lejzerowicz et al., 2013a, 2013b pour plus de détails sur chaque méthode.	29
Tableau 3 - Time schedule of deployment for each chamber.....	40
Tableau 4 - Oxygen uptake estimated from previous studies in the Northern Adriatic and corresponding organic carbon percentage when available	48
Tableau 5 – Deployment and sampling dates as well as duration of the experimental period for the cores representing in situ conditions (“Normoxia”) and the various periods of anoxia in the four different benthic chambers.....	62
Tableau 6 - Summary of the variables used in each of the three linear models, describing the name of the variable, its type (dependent or independent), its unit, nature (quantitative or qualitative) and the used transformation. For the quantitative variables the minimum and maximum values of the non-transformed data are presented in brackets, whereas for the qualitative variables the different categories are presented in brackets.	66
Tableau 7 - Total counts and standing stocks of living (CTG labeled) foraminifera at every sampling time for every replicate core	67
Tableau 8 - Results of the Models 1, 2, 3 and 4. For each Model, the degrees of freedom (Df), the sum and mean of squares (SumSq. And MeanSq.), the F-value (F) and its p-value (p) are given for each variable. The p-values indicate whether the variable has a significant effect ($p < 0.05$) or not ($p > 0.05$).	69
Tableau 9 – Deployment and sampling dates as well as duration of the experimental period for the cores representing in situ conditions (“normoxia”) and the various periods of anoxia in the four different benthic chambers.....	86
Tableau 10 - Name and number of the linear models. For each model type the different dependent and independent variables are listed and the used transformation is presented in brackets. As the models are executed on different data, the categories of the selection are presented.....	88
Tableau 11 - Statistical parameters (Df: degrees of freedom, Sum Sq: Sum of Squares, Mean Sq: Mean of Squares, F value: value of the F-test, Pr(>F): probability of the F-test) for the models 1 at all sampled Size fractions and Depth intervals for the 4 tested dependent variables. For the cases where no significant effect of either the time or time ² was observed, only the “residuals” parameters are estimated.	91
Tableau 12 - Statistical parameters (Df: degrees of freedom, Sum Sq: Sum of Squares, Mean Sq: Mean of Squares, F value: value of the F-test, Pr(>F): probability of the F-test) for the models 2 for all the 9 major species and for the standing stock.	93
Tableau 13 - Estimation of the coefficient associated to independent variables after models 2 for the 9 major species. Only the independent variables having a significant effect on the standing stock are retained by the backward model selection. Depending on the presence or absence of a significant effect of time on the density and the coefficient sign, three types of responses have been determined.	94

Tableau 14 - Denitrification rates of the two tested species from two different sites. The number of individuals added to the measurement chamber is indicated. In two cases some individuals were reused in a second set of measurements, generating pseudoreplication; the number of individuals used in the second set of measurements is indicated. 95

Tableau 15 - Nitrate contents (in pmol) for 7 different species of the two response types A and B from two sampling sites (the Gulf of Trieste station Piran and the station D10 on the west coast of the Adriatic Sea). The number of tested individuals (n), the number of individuals with a nitrate content different from 0, the mean nitrate content, the minimum measured nitrate content, the minimum nitrate content different from 0 and the maximum measured nitrate content. 95

Tableau 16 - Type of environment, microhabitat, and response to anoxia in the literature and in the present study for all the major species (their synonymous names are also given). Abbreviations: O₂ = oxygen or oxygenated, OM = organic matter, N = density or standing stock, relativ. = relatively, M = months..... 99

Tableau 17 - Statistical parameters (Df: degrees of freedom, Sum Sq: Sum of Squares, Mean Sq: Mean of Squares, F value: value of the F-test, Pr(>F): probability of the F-test) for the models 3 for all 3 response types and for the two tested dependant variables (standing stock and frequency). 108

Tableau 18 - Sampling sites, depth, coordinates, sampling dates and number of cores. O₂ saturation measured by CTD at station 1, the values given for stations 2 and 4 are based on the CTD profile obtained at station 1. NA: no data available..... 125

Tableau 19 - Depth intervals analysed for all the sampled cores..... 126

Tableau 20 - Total number of living foraminifera (per 28.3 cm³) and relative density of the main species found in the 0-1cm depth interval of the 20 studied cores. 127

Tableau 21 - Summary of the results of the analysis of variance. Df = degrees of freedom; F value = value of the statistical estimate F; p value = probability associated to the test..... 135

Tableau 22 – Estimation of the coefficients of the statistical model. 136

Tableau 23 - Total number of living foraminifera (per 28.3 cm³) and relative density of the main species found in the 0-1cm depth interval of the 20 studied cores. 142

Tableau 24 - Effect of the experimental conditions on survival rates of the three species under oxic conditions (upper panel) and under all conditions (lower panel). The Degrees of freedom (Df), the Deviance and the probability (p(Chi)) statistic values are presented for every tested variables. 157

Tableau 25 - Effect of the experimental conditions on the maximum diameter of *A. tepida*: estimation of the coefficient, its standard error (Std. error) and the t and p statistics for the linear model. Note that the estimated Intercept corresponds to average of the reference category (here T5.NoGrowth) whereas all other estimated values are indicative of the average difference between the experimental and the reference population. 158

Tableau 26 - Effect of the experimental conditions on the maximum diameter of *B. marginata*: estimation of the coefficient, its standard error (Std. error) and the t and p statistics for the linear model. Note that the estimated Intercept corresponds to average of the reference category (here T5.NoGrowth) whereas all other estimated values are indicative of the average difference between the experimental and the reference population. 159

Tableau 27 - Respiration rates (average value and standard error of the replicate measurements) of benthic foraminifera studied in the present paper with detailed data on their size (average size of maximal diameter or length and estimated biovolume).	160
Tableau 28 - Intracellular nitrate contents recorded in the present study compared to the previous published data for the same species. n is the number of measured specimens. *Values are mean values. Standard Error of the Mean (SEM) is given in parentheses.	160
Tableau 29 – Ensemble des conditions et noms des aquariums au cours des deux expériences..	176
Tableau 30 – Durée d’incubation (en jours) des 5 temps d’échantillonnage au cours des deux expériences.	178
Tableau 31 – Date, nombre d’individus (Nb Indiv) de l’ensemble des mesures de dénitrification effectuées. L’origine des individus (dans le sédiment conservé au laboratoire ou de l’expérience II) et les éventuelles conditions préalables et la durée d’incubation sont précisées. Une mesure a été effectuée en présence de nitrates dans la chambre de mesure.	181
Tableau 32- Type de l’ensemble des modèles linéaires utilisés et description des variables et des données utilisées pour chacun des modèles. Entre parenthèse pour les variables quantitatives les transformations éventuellement appliquées et pour les variables qualitative l’ensemble des catégories sont présentées.	183
Tableau 33 – Nombre de foraminifères vivants par nombre d’individus retrouvés dans les pots et taux de survie (entre parenthèses) à tous les temps d’échantillonnage dans tous les aquariums lors des expériences I et II.	189
Tableau 34 – Effet des conditions expérimentales sur la survie de <i>Melonis barleeanus</i> au cours des deux expériences. Les statistiques de degrés de liberté (Df et Resid. Df), la deviance (Deviance et Resid. Dev) ainsi que la probabilité (Pr(>Chi)) sont présentées pour chacune des variables indépendantes testées.	189
Tableau 35 - Effet des conditions expérimentales sur la taille de <i>Melonis barleeanus</i> au cours des deux expériences. Les statistiques de degrés de liberté (Df), la somme et moyenne des carrés des écarts (Sum Sq et Mean Sq) ainsi que la probabilité (Pr(>F)) sont présentées pour chacune des variables indépendantes testées.	192
Tableau 36 - Effet des conditions expérimentales sur la quantité et la concentration de nitrates de <i>Melonis barleeanus</i> au cours des deux expériences. Les statistiques de degrés de liberté (Df), la somme et moyenne des carrés des écarts (Sum Sq et Mean Sq) ainsi que la probabilité (Pr(>F)) sont présentées pour chacune des variables indépendantes testées.	194
Tableau 37 – Résultats des mesures de dénitrification effectuées sur <i>Melonis barleeanus</i> . Les conditions préalables à la mesure ainsi que la durée d’incubation dans ces conditions sont précisées. Le nombre d’individus placés dans la chambre ainsi que les conditions de mesure particulières sont présentées.	195
Tableau 38 – Diamètre maximum, minimum et épaisseur (D, d et e en μm), forme de la coquille, espèce, nombre d’individus utilisés pour les mesures de taux de respiration oxygène (N indiv.), nombre de mesures effectuées sur l’espèce (N mesures), site d’origine et date de prélèvement des échantillons et temps entre le prélèvement et la mesure.	215
Tableau 39 – Taille moyenne, forme, nombre d’individus testés, biovolume moyen et taux de respiration de l’ensemble des espèces analysées à tous les sites lors de cette thèse...	218
Tableau 40 – Résultats de modélisation pour chaque espèce considérée. Les statistiques F et p indiquent si le biovolume (BV) a un effet significatif sur le taux de respiration (RR) au seuil de 0.05, dans ce cas les valeurs sont présentées en gras. L’intercept et la pente	

	donnent respectivement l'ordonnée à l'origine et la pente de la relation telles que $RR = \text{Intercept} \times BV^{\text{Pente}}$	220
Tableau 41	– Références bibliographiques permettant de déterminer le microhabitat des 16 espèces de cette étude.	224
Tableau 42	– Nombre d'individus vivants (d'après Langlet et al. (2013b) ; Chapitre 1), biovolume individuel minimum par fraction de taille dans la carotte « Normoxique » de Piran (Chapitre 1). Le taux de respiration estimé à partir du biovolume individuel et d'après la relation publiée dans Geslin et al. 2011 (Tableau A) et d'après l'Équation 5 (Tableau B). La contribution de chaque fraction à la respiration totale des foraminifères et à la respiration benthique totale est également estimée.	227
Tableau 43	- Quantité de nitrates intracellulaires (pmol) dans les foraminifères benthiques analysés aux différents sites d'études. Pour chaque espèce le nombre d'individus analysés, le nombre d'individus présentant des nitrates intracellulaires (N≠0) ainsi que la moyenne, la moyenne des individus accumulant les nitrates (N≠0), l'écart-type (sd), l'écart-type des individus accumulant les nitrates (N≠0), les valeurs minimales, valeurs minimales différentes de zéro (N≠0) et la valeur maximale observée sont indiquées. L'ensemble de ces données ont été présentées précédemment dans la référence 1 (Chapitre 1.Partie III) ou sont nouvelles.	238
Tableau 44	– Quantité de nitrates intracellulaires (pmol) dans les foraminifères benthiques analysés aux différents sites d'études dans le cadre des différentes expériences. Les différents paramètres estimés sont les mêmes que pour le tableau précédent (Tableau 43). Certaines données ont été présentées initialement dans différents chapitres et articles (1 : Chapitre 1.Partie III; 2 : Chapitre 3.Partie I; 3 : Chapitre 3.Partie II).	239
Tableau 45	– Taux de dénitrification (pmol N /ind/jour), nombre d'individus par expérience pour toutes les espèces d'origine différentes. Les mesures provenant de la littérature sont présentées en grisé. Références : (1 : Risgaard-Petersen et al., 2006; 2 : Høgslund et al., 2008; 3 et 4 : Piña-Ochoa et al., 2010a, 2010b; 5 : Bernhard et al., 2012a ; 6 : Article 2 Piran ; 7 : Chapitre <i>Melonis</i>). Les méthodologies particulières sont précisées.	242

Thèse de Doctorat

Dewi LANGLET

Réponse des foraminifères benthiques à l'anoxie dans les milieux côtiers : études in situ de l'écologie des foraminifères benthiques, expériences en laboratoire et analyse du métabolisme anaérobie

Résumé

Ce travail de thèse a pour objectif d'identifier les effets de l'anoxie sur les foraminifères benthiques essentiellement dans les environnements côtiers. Pour mettre en évidence l'impact de ce phénomène naturel qui tend à être amplifié par les activités anthropiques, nous avons utilisé différentes approches : des observations environnementales, des expériences menées sur le terrain et des expériences en laboratoire.

Les études menées sur le terrain présentent des résultats contrastés. En Mer Adriatique - un milieu affecté depuis le début de l'Holocène (10 ka) par des hypoxies périodiques - l'expérience menée in situ montre que la majorité des espèces composant la communauté de foraminifères benthiques peut survivre à 10 mois d'anoxie. Nous avons ainsi observé un changement de la composition des faunes passant d'une communauté dominée par des espèces sensibles à l'anoxie (*Reophax nanus*, *Textularia agglutinans*, *Quinqueloculina seminula* et *Quinqueloculina stelligera*) lorsque les conditions sont oxygénées à une communauté dominée par des espèces résistantes à l'anoxie après 10 mois d'expérience (*Eggerella scabra*, *Bulimina marginata*, *Lagenammia atlantica*, *Hopkinsina pacifica* et *Bolivina pseudoplicata*). Au contraire, dans un milieu nouvellement affecté par des phénomènes d'anoxie saisonniers (depuis 40-30 ans) tel que le bras d'estuaire fermé de Grevelingen (Pays-Bas), nous avons observé que seul un très faible nombre d'individus vit dans les sites anoxiques. A ce site d'étude, les communautés de foraminifères benthiques sont composées d'un faible nombre d'espèces qui semblent ainsi toutes être sensibles à l'anoxie.

Dans les expériences en laboratoire nous montrons que les taux de survie de *Melonis barleeanus* sont similaires après plus de 3 mois d'hypoxie et d'anoxie. Ces résultats montrent néanmoins que l'absence totale d'oxygène tend à inhiber la croissance de ces organismes.

Afin de comprendre comment les foraminifères benthiques survivent à l'anoxie nous nous sommes intéressés au métabolisme anaérobie des organismes. D'après les études précédentes, la dénitrification est la seule voie métabolique anaérobie identifiée chez les foraminifères (Risgaard-Petersen et al., 2006 ; Piña-Ochoa et al., 2010). Nos analyses montrent qu'apparemment seules les espèces résistantes à l'anoxie contiennent des nitrates dans leurs cellules. Nous avons initialement émis l'hypothèse que ces nitrates pouvaient être réduits par dénitrification. Or, les expériences menées au cours de cette thèse montrent que les foraminifères côtiers n'utilisent pas la dénitrification. Nos travaux suggèrent ainsi que les voies métaboliques anaérobies utilisées par les foraminifères benthiques sont bien plus diversifiées que ce qui est aujourd'hui admis.

Mots clés

Milieux côtiers, anoxie, foraminifères benthiques, survie, métabolisme anaérobie

Abstract

This PhD thesis aims to identify the effects of anoxia on benthic foraminifera, essentially in coastal seas. To show the impact of this natural phenomenon reinforced by human activities, we used different approaches: ecosystem observations and field and laboratory experiments.

Our in situ studies show contrasted results. In the Adriatic Sea – that is impacted since the early Holocene (10ky) by episodic anoxia – the in situ experiment shows that most benthic foraminiferal species can survive 10 months of anoxia. However, we observed a change in the faunal composition from a community dominated by anoxia-sensitive species (*Reophax nanus*, *Textularia agglutinans*, *Quinqueloculina seminula* and *Quinqueloculina stelligera*) in well-oxygenated conditions to a dominance of anoxia-resistant species after a 10-months anoxic period (*Eggerella scabra*, *Bulimina marginata*, *Lagenammia atlantica*, *Hopkinsina pacifica* and *Bolivina pseudoplicata*). Conversely, in the recently anoxia-impacted (for 40-30 years) closed estuary that is the Grevelingenmeer (The Netherlands) only scarce living individuals have been found at the anoxic sites. In general, in the Grevelingenmeer, the foraminiferal communities are composed by few species that all seem to be anoxia-sensitive.

In laboratory experiments we conclusively demonstrate that *Melonis barleeanus* survival rates are similar after 3 months of incubation in well-oxygenated, hypoxic and anoxic conditions. Nevertheless, our results suggest that anoxia inhibits the growth of this species.

We finally analyzed the foraminiferal anaerobic metabolism to try to understand their survival in anoxic conditions. Denitrification is the only foraminiferal anaerobic metabolic pathway identified in the literature (Risgaard-Petersen et al., 2006; Piña-Ochoa et al., 2010). Our analyses suggest that only the anoxia-resistant species can accumulate nitrates in their cell. We initially thought that these nitrates could be reduced by denitrification under anoxia but the analyzed species were not able to perform denitrification. This work suggests that unlike deep-sea foraminifera the coastal-seas species may dispose of an alternative anaerobic metabolic pathway. This implies that the foraminiferal metabolism could be more diverse than is generally admitted.

Key Words

Coastal environments, anoxia, benthic foraminifera, survival, anaerobic metabolism