



HAL
open science

Impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement de la sphagnosphère : relations polyphenols-communautés microbiennes

Vincent Jassey

► To cite this version:

Vincent Jassey. Impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement de la sphagnosphère : relations polyphenols-communautés microbiennes. Biologie végétale. Université de Franche-Comté, 2011. Français. NNT : 2011BESA2011 . tel-00802903

HAL Id: tel-00802903

<https://theses.hal.science/tel-00802903>

Submitted on 20 Mar 2013

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.

Université de Franche-Comté



U.F.R. DES SCIENCES, TECHNIQUES ET GESTION DE L'INDUSTRIE

Laboratoire CHRONO-ENVIRONNEMENT

(UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA)



Ecole Doctorale « Homme, Environnement, Santé »

Thèse en vue de l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE

Spécialité : Sciences de la Vie et de l'Environnement



Franche-Comté
Conseil régional

Impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement de la sphagnosphère : relations polyphénols – communautés microbiennes



Présentée et soutenue publiquement par

Vincent JASSEY

Le 25 novembre 2011

Composition du Jury :

| | |
|---|------------------------|
| BORNETTE Gudrun , Directeur de recherches, CNRS, Université Lyon 1 | Rapporteur |
| GALLET Christiane , Maître de Conférences, Université de Savoie | Rapporteur |
| LAGGOUN-DEFARGE Fatima , Chargé de recherche, CNRS, Université d'Orléans | Examinateur |
| MITCHELL Edward , Professeur, Université de Neuchâtel | Examinateur |
| GILBERT Daniel , Professeur, Université de Franche-Comté | Co-Directeur de thèse |
| CHIAPUSIO Geneviève , Maître de Conférences, Université de Franche-Comté | Co-Directrice de thèse |
| BINET Philippe , Maître de Conférences, Université de Franche-Comté | Co-Directeur de thèse |

Remerciements

Cette thèse a été financée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR PEATWARM) et la Région Franche-Comté. Ces deux organismes trouvent ici toute ma reconnaissance, ainsi que le Laboratoire Chrono-Environnement UMR 6249 CNRS-UFC qui m'a accueilli.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon directeur de thèse, Daniel Gilbert, ainsi que Geneviève Chiapusio (ou Chapiuso (?), Chiaposio (?), Chapiso (?); comment ça s'écrit déjà ??? ☺) et Philippe Binet mes co-directeurs de thèse, pour tous les conseils qu'ils m'ont donnés, pour le partage de leur expérience, la transmission de leur savoir, leur investissement et leur disponibilité, mais aussi pour avoir dirigé cette thèse dans un souci de qualité et de rigueur scientifiques, à la Montbéliardaise quoi !

J'adresse mes sincères remerciements à Gudrun Bornette et Christiane Gallet qui ont accepté d'être rapporteurs de ces travaux de recherche, ainsi qu'à Fatima Laggoun-Défarge et Edward Mitchell qui ont accepté d'examiner mon travail.

J'aimerais également remercier Marie-Laure « Mac Gyver » Toussaint pour son appui technique, sa patience (surtout lors des prélèvements saisonniers) et aussi sa bonne humeur.

Je remercie également Dorine « Red Siren » Desalme pour avoir partagé ces années de thèse avec moi, mais aussi son expérience, sa bonne humeur, etc. Je la remercie aussi d'avoir résisté à la tentation de broyer son computer sur son voisin de bureau quand elle rédigeait sereinement sa thèse :)

Je tiens à exprimer une spéciale dédicace à la t'naille Montbéliardaise du laboratoire Chrono-Environnement (Sergent-chef Chaudard, 1973). Merci à Geneviève, Nadine, Daniel, Philippe, Dorine et Marie-Laure pour leur bonne humeur quotidienne, pour les fous rires (sans modération aucune), les coups à boire (toujours avec modération), les repas improvisés, etc., que l'on a partagés durant ces trois ans de thèse. J'ai beaucoup appris professionnellement, scientifiquement et humainement à vos côtés. Je garde de nombreux souvenirs mémorables ! La t'naille a d'la thèque !

Petite pensée pour Sandrine « Tornade Blanche », toujours fidèle au poste et qui s'assure que notre espace de travail est toujours propre et agréable.

Je voudrais remercier tous les Peatwarmistes (de Poitiers à Rennes, en passant par Lausanne, Nancy, Orléans, Paris et Montbéliard). Je voudrais remercier tout particulièrement Alexandre Buttler, Edward Mitchell, André-Jean Francez et Fatima

Laggoun-Défarage pour les nombreuses discussions, aides, etc. J'adresse également un grand merci à mon autre collègue doctorant de Peatwarm, Frédéric Delarue. Je garde un très bon souvenir de notre Road Trip à Wien... et aussi des nombreuses discussions/rigolades que l'on a eues tout au long de ces trois ans de thèse !

J'en viens à mes collègues doctorants, post-doctorants et stagiaires qui ont partagé le bureau à Montbéliard quelque temps : Adeline « Testadeline », Caroline, Boutheina, Ifti (Statiftikahr[©]), Karine, Matthew et Quentin « Le Métalleux ». Merci pour toutes nos discussions sur nos recherches et le partage de l'expérience, mais aussi pour tous les moments de bonne humeur que l'on a partagés ensemble.

Je voudrais également remercier les pros de l'écologie numérique du laboratoire Chrono-Environnement que sont Patrick Giraudoux et François Gillet, pour avoir répondu patiemment à toutes mes questions statistiques.

Pour les échanges scientifiques enrichissants, j'aimerais remercier tous mes collègues thécamoebiologistes à travers le monde, et plus particulièrement Satoshi Shimano et Richard Payne.

Pour m'avoir chaleureusement accueilli et guidé lors de mes enseignements en tant que moniteur à l'Université STGI de Montbéliard, je tiens à remercier mes collègues de la section enseignement de Montbéliard : Ghislain Peter, Marielle Franchi, Isabelle Gester, Jean-Luc Sanner, Jean-Pierre Verovic et Catherine Llanes.

En écrivant ces remerciements, je ne peux m'empêcher de remercier entre autres James Hetfield, Dave Grohl, Trent Reznor et Mikael Alkerfeld pour tout le bon rock'n'roll qu'ils ont écrit ces dernières années. Un élément essentiel lors cette thèse pour mes oreilles de thésard lors des nombreuses heures passées devant le microscope !

Enfin, je termine en remerciant du fond de mon cœur ma famille, et surtout mes parents, ma sœur et Fanny pour m'avoir soutenu, encouragé (supporté ?) tout au long de ces longues études et surtout permis d'arriver là où j'en suis aujourd'hui! J'adresse aussi un grand merci à mes amis Baptiste, Paul, Elise et Julien.

Pour finir, une petite citation qui n'a rien à voir avec la science, mais qui aura marqué durablement ces trois années de thèse :

« Do you like heavy music ? **Metallica** give you heavy music ! »

(James Hetfield, Bercy, 2009).

Table des matières

| | |
|---|------------|
| INTRODUCTION | 21 |
| CHAPITRE 1 - - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE | 25 |
| 1. LES TOURBIERES ET LE RECHAUFFEMENT CLIMATIQUE | 27 |
| 1 LES TOURBIERES : DES ECOSYSTEMES TRES DIVERSIFIES | 27 |
| 2 LES TOURBIERES ET LE RECHAUFFEMENT CLIMATIQUE | 33 |
| 2. LA BRYOSPHERE : UN ELEMENT ESSENTIEL DU FONCTIONNEMENT DES TOURBIERES | 40 |
| 1 LE RESEAU DETRITIVORE DE LA BRYOSPHERE | 41 |
| 2 LES ROLES CLES DE LA BRYOSPHERE DANS LE FONCTIONNEMENT DES TOURBIERES | 46 |
| 3. LES COMPOSES PHENOLIQUES (OU POLYPHENOLS) DES SPHAIGNES | 47 |
| 1 LES POLYPHENOLS DES PLANTES VASCULAIRES | 49 |
| 2 LES COMPOSES PHENOLIQUES DES BRYOPHYTES DU GENRE SPHAGNUM | 52 |
| 3 LES ENZYMES PHENOXYDASES | 58 |
| CHAPITRE 2 - METHODOLOGIE: DISPOSITIF EXPERIMENTAL & MISES AUX POINTS ANALYTIQUES | 65 |
| 1. SITE D'ETUDE | 67 |
| 2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL | 69 |
| 3. MISES AU POINT ANALYTIQUES | 74 |
| 1 DOSAGE DES COMPOSES PHENOLIQUES | 74 |
| 2 EXTRACTION ET ANALYSES DES ACTIVITES PHENOXYDASES | 76 |
| CHAPITRE 3 - ECOLOGIE DES COMMUNAUTES DE THECAMOEBIENS ASSOCIES AUX SPHAIGNES LE LONG D'UN GRADIENT ECOLOGIQUE DU TYPE "HAUT - BAS" MARAIS | 79 |
| 1. MICRODISTRIBUTION HORIZONTALE ET VERTICALE DES AMIBES A THEQUE LE LONG D'UN GRADIENT ECOLOGIQUE DU TYPE « HAUT-BAS » MARAIS | 81 |
| 1 PREAMBULE | 81 |
| 2 FINE-SCALE HORIZONTAL AND VERTICAL MICRO-DISTRIBUTION PATTERNS OF TESTATE AMOEBAE ALONG A NARROW FEN/BOG GRADIENT | 82 |
| 2. CARACTERISATION DU REGIME ALIMENTAIRE DES AMIBES A THEQUE HYALOSPHENIA PAPILIO ET NEBELA TINCTA LE LONG D'UN GRADIENT ECOLOGIQUE DU TYPE « HAUT-BAS » MARAIS | 101 |
| 1 PREAMBULE | 101 |
| 2 CHARACTERIZING THE FEEDING HABITS OF THE TESTATE AMOEBAE HYALOSPHENIA PAPILIO AND NEBELA TINCTA ALONG A NARROW "FEN-BOG" GRADIENT USING DIGESTIVE VACUOLE CONTENT AND 13C AND 15N ISOTOPIC ANALYSES | 102 |

| | |
|--|------------|
| CHAPITRE 4 - INFLUENCE D'UNE HAUSSE MODEREE SUR LES ELEMENTS CLES DE LA BRYOSPHERE: LES COMMUNAUTES MICROBIENNES ET LES POLYPHENOLS | 121 |
| 1. EFFET D'UN GRADIENT DE TEMPERATURE SUR LES SPHAIGNES ET LEURS COMMUNAUTES MICROBIENNES ASSOCIEES : UNE ETUDE EN CONDITIONS CONTROLEES | 123 |
| 1 PREAMBULE | 123 |
| 2 EFFECT OF A TEMPERATURE GRADIENT ON SPHAGNUM FALLAX AND ITS ASSOCIATED LIVING MICROBIAL COMMUNITIES: A STUDY UNDER CONTROLLED CONDITIONS | 124 |
| 2. INFLUENCE D'UNE HAUSSE DE LA TEMPERATURE SUR LA VARIABILITE SAISONNIERE DES RELATIONS POLYPHENOLS – PHENOLOXYDASES CHEZ SPHAGNUM FALLAX LE LONG D'UN GRADIENT ECOLOGIQUE « HAUT-BAS » MARAIS | 141 |
| 1 PREAMBULE | 141 |
| 2 EXPERIMENTAL CLIMATE EFFECT ON SEASONAL VARIABILITY OF POLYPHENOL/PHENOLOXIDASE INTERPLAY ALONG A NARROW FEN-BOG ECOLOGICAL GRADIENT IN SPHAGNUM FALLAX | 142 |
| 3. INFLUENCE DE L'AUGMENTATION DES TEMPERATURES SUR LES ACTIVITES PHENOLOXYDASES ET PEROXYDASES DANS UNE TOURBIERE A SPHAIGNES | 161 |
| 1 PREAMBULE | 161 |
| 2 PHENOLOXIDASE AND PEROXIDASE ACTIVITIES IN SPHAGNUM-DOMINATED PEATLANDS IN A WARMING CLIMATE | 162 |
| 4. INFLUENCE D'UNE HAUSSE MODEREE DES TEMPERATURES SUR LA VARIABILITE ANNUELLE DES INTERACTIONS « MICROORGANISMES – VEGETATION – FACTEURS ABIOTIQUES » | 169 |
| 1 PREAMBULE | 169 |
| 2 MICROBIAL CONTROL OVER PEATLAND RESPONSE TO WARMING | 170 |
| CHAPITRE 5 - DISCUSSION GENERALE | 185 |
| 1. RELATIONS SPHAIGNES – MICROORGANISMES : DE LA BRYOSPHERE A LA SPHAGNOSPHERE | 187 |
| 1 STRUCTURE SPATIALE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES ASSOCIEES AUX SPHAIGNES | 187 |
| 2 RELATIONS SPECIFIQUES « POLYPHENOLS – MICROORGANISMES » | 195 |
| 3 DE LA BRYOSPHERE A LA SPHAGNOSPHERE | 198 |
| 2. IMPACT D'UNE HAUSSE DE LA TEMPERATURE SUR L'ASSOCIATION SPHAIGNES - MICROORGANISMES | 199 |
| 1 EFFET DE LA HAUSSE DES TEMPERATURES MOYENNES SUR LA SPHAGNOSPHERE | 200 |
| 2 IMPACT DU RECHAUFFEMENT CLIMATIQUE SUR LE FONCTIONNEMENT DE L'ECOSYSTEME | 204 |
| CONCLUSION & PERSPECTIVES | 209 |
| BIBLIOGRAPHIE | 213 |
| ANNEXES | 233 |

Liste des Figures

Chapitre 1

| | |
|---|----|
| Figure 1.1: Particularités morphologiques de la sphaigne (D'après Manneville et al.,1999)..... | 28 |
| Figure 1.2: Caractéristiques physiques et biologiques du gradient butte - dépression (synthèse d'après Bobrov et al., 1999 ; Mitchell et al., 2000a, 2008 ; Djurdjévic et al., 2003 ; Rydin & Jeglum, 2006). | 30 |
| Figure 1.3: Schéma conceptuel représentant les facteurs « internes » (processus géochimiques, biologiques, hydrologiques et physiques) et « externes » (activités anthropiques, climat, biogéographie) affectant le fonctionnement des tourbières au cours du temps. | 34 |
| Figure 1.4: Carte de répartition des tourbières à l'échelle du globe (D'après Charman, 2002) | 35 |
| Figure 1.5: Schéma simplifié du cycle du carbone à différentes échelles de temps en tourbières et effets potentiels du réchauffement climatique sur les tourbières (d'après Francez, 2000 et Dorrepaal et al., 2009)..... | 37 |
| Figure 1.6: Schéma conceptuel représentant les différents facteurs biotiques et abiotiques susceptibles d'être affectés par le réchauffement climatique (adapté de Singh et al., 2010)..... | 39 |
| Figure 1.7: Représentation schématique de la bryosphère..... | 40 |
| Figure 1.8: Schéma du réseau trophique microbien présent chez la sphaigne (stocks en mg C g ⁻¹ MS, sauf indication contraire). La couleur marron clair représente le groupe des décomposeurs, le vert foncé les producteurs primaires, le vert clair les protozoaires flagellés et le bleu le groupe des prédateurs (protozoaires et micro-métazoaires) (synthèse d'après Francez, 2000 ; Gilbert et al., 1998; Mitchell et al., 2003 ; Gilbert & Mitchell, 2006 ; Dorrepaal et al., 2009).. | 42 |
| Figure 1.9: Photos par microscopie inversée ou électronique de quelques espèces d'amibes à thèque trouvées en tourbières, illustrant la grande variabilité de morphologie de thèques ; (a) <i>Lesquereusia spiralis hirsuta</i> , (b) <i>Arcella dentata</i> , (c) <i>Heleopera rosea</i> , (d) <i>Centropyxis acuelata</i> , (e) <i>Physochilla griseola</i> , (f) <i>Archerella flavum</i> , (g) <i>Bullinaria indica</i> , (h) <i>Diffflugia corona</i> , (i) <i>Diffflugia linearis</i> , (j) <i>Hyalosphenia papilio</i> , (k) <i>Nebela carinata</i> , (l) <i>Nebela tinctoria</i> . (Meisterfeld & Mitchell, 2008) | 45 |
| Figure 1.10: Distinction entre monophénol et polyphénol et trois exemples de composés phénoliques simples en C6..... | 48 |
| Figure 1.11: Schéma de la voie de synthèse des composés phénoliques chez les plantes supérieures (voie du shikimate). | 50 |
| Figure 1.12: Schéma des différents rôles connus des composés phénoliques chez les végétaux (Adapté de Dixon & Paivai 1995). | 52 |
| Figure 1.13: Acide sphagnique (Rasmussen et al., 1996) | 53 |
| Figure 1.14: (a) Concentrations des différents composés phénoliques mis en évidence chez <i>S. fallax</i> et <i>S. Magellanicum</i> (adapté de Verhoeven & Liefveld, 1997). (b) Dendrogramme mettant en évidence les différences qualitatives et quantitatives entre <i>S. fallax</i> et <i>S. magellanicum</i> (Opelt et al., 2007). (c) Concentrations en acide sphagnique dans différents segments de <i>S. magellanicum</i> (Rudolph & Samland, 1985)..... | 55 |

| | |
|--|----|
| Figure 1.15: Effet d'un ajout d'eau distillé (+W), d'homogénats de feuilles de Carex (+C) et de capitulum de sphaigne (+S) sur la décomposition d'une litière à Carex (d'après Verhoeven & Toth, 1995). | 56 |
| Figure 1.16: Schéma de la barrière physicochimique induite par les composés phénoliques produits et/ou libérés par la sphaigne..... | 57 |
| Figure 1.17: (a) Principe des réactions d'oxydation catalysé par les phénoloxydases (exemple des laccases) et (b) des polymérisation spontanée entre les radicaux aromatiques qui en résultent (d'après Baldrian, 2006 et Gobat et al., 2010)..... | 61 |

Chapitre 2

| | |
|--|----|
| Figure 2.1: Localisation géographique de la station expérimentale au sein de la tourbière du Forbonnet. La zone en blanc représente le haut marais/marais de transition (i.e. la zone la plus active quant à l'accumulation de tourbe), quant à la zone en bleu elle représente le bas-marais. Zoom sur la station de recherche..... | 68 |
| Figure 2.2: Diagrammes météorologiques: mesures des températures et des précipitations effectuées entre les mois de janvier et décembre 2010 dans la tourbière du Forbonnet. | 69 |
| Figure 2.3: Dispositif expérimental et vue des placettes équipées d'Open-Top-Chambers. | 70 |
| Figure 2.4: Composition végétale des placettes en conditions « haut-marais » et « bas-marais ». Relevé floristique effectué en juillet 2008 (Buttler, 2008). Les axes x et y représentent le quadrillage du carré utilisé pour les relevés de végétation (Buttler, 1992). | 71 |
| Figure 2.5: Equipement des placettes d'expérimentations (équivalent pour les placettes contrôles et réchauffées). | 72 |
| Figure 2.6 : (a) Eléments méthodologiques testés pour le dosage des composés phénoliques chez la sphaigne, (b) rendement des extractions éthanol/eau à différentes températures. Field = conditions in situ au moment du prélèvement. | 75 |
| Figure 2.7: Comparaison de méthode de quantification des phénoloxydases. Les chiffres sur l'axe x représentent le numéro de placette d'échantillonnage sur la station expérimentale (cf Figure 2.3). | 77 |

Chapitre 3

| | |
|---|----|
| Figure 3.1 : (a) The two primary axes of the 3-dimensional NMDS ordination of testate amoebae communities in the "bog" area from Le Forbonnet mire (France) (n = 18, final stress = 4.1). The solution represents 75% of the variability in the data, with axes 1, 2 and 3 representing respectively 43%, 18% and 13%. Samples are coded by sampling area with open symbols. (b) The two primary axes of the 3-dimensional NMDS ordination of testate amoebae communities in the "fen" area (n = 18, final stress = 2.4). The solution represents 84% of the variability in the data, with axes 1, 2 and 3 representing respectively 55%, 19% and 10%. Samples are coded by sampling area with filled symbols. | 90 |
| Figure 3.2: Distribution maps of total testate amoeba abundance and of dominant testate amoeba taxa in Sphagnum fallax from the two sampling areas in Le Forbonnet mire (France). A = upper (0- | |

3cm) B = intermediate (3-6cm) and C = lower (6-9cm) segments. X and Y axes correspond to GPS data converted into Lambert 2 references. Dot sizes are directly proportional to the number of individuals per gram DW in the samples and are comparable among maps..... 92

Figure 3.3: Multiple factor analysis of the three testate amoeba communities (Hellinger-transformed) and environmental (chemical, physical and phenolics) data sets from the Forbonnet peatland. Projection of the MFA axes 1 and 2 with the result of a hierarchical agglomerative clustering (grey lines), obtained by the Ward method on the Euclidean distance matrix between MFA site scores, showing two main groups of sampling plots (orange symbols = "fen", pink symbols = "bog"). Sampling plots are indicated by F ("fen") or B ("bog") followed by a number.. 93

Figure 3.4: Redundancy analyses biplots (axes 1 and 2) of testate amoeba data from Le Forbonnet mire (France) in upper (a), intermediate (b) and lower (c) Sphagnum segments, and the overall data set (d). Sampling areas are coded with open symbol for the "fen" area and with filled symbol for the "bog" area. (e) List of main testate amoebae taxa (> 2% of the total abundance). Solid arrows show significant variables and dashed arrows show non-significant ones. Samples are indicated as follows: circles = upper segments, squares = intermediate segments, triangles = lower segments; open symbols = "fen", filled symbols = "bog". F_phe : free phenolics; B_phe : bound phenolics; W-temp: water temperature; Alt: average altitude (microtopography) of the sampled plot; Cond: conductivity. 95

Figure 3.5: Biplot of the two primary axes of the three-dimensional NMDS ordination of microbial community data (final stress = 5.1). Samples are coded by sampling area and by sampling depth, with open symbols represent the "fen" area and filled symbols the "bog" area. Circles represent Sphagnum's top segments and squares Sphagnum's bottom segments. Broken lines indicate homogeneous clusters determined by ANOSIM pairwise comparisons ($R = 0.41$, $P = 0.006$)......105

Figure 3.6: *H. papilio* associated with fungal hyphae (A), testate amoebae (*Archerella flavum*) (B), ciliate (C, E, F), and rotifer (D). *N. tinctoria* associated with plant cell and ciliate (G), fungal hyphae and (or) pieces of fungal spores (H, I, J) and cyanobacteria (J). Scale bars indicate approximately 50 μm107

Figure 3.7: (a) Relative proportions (%) of the different identified prey categories abundance ingested by *H. papilio* and *N. tinctoria* specimens along the "fen-bog" gradient. (b) Relative proportions (%) of the different identified prey categories ingested by *H. papilio* and *N. tinctoria* specimens along the "fen-bog" gradient converted into biovolumes.108

Figure 3.8: The first two primary axes of the three-dimensional NMDS ordination of testate amoebae feeding habit along the "fen-bog" gradient (*H. papilio* = HP; *N. tinctoria* = NT) (final stress = 9.4). Samples are coded by sampling area and by species, with open symbols represent the "fen" area and filled symbols the "bog" area. Circles represent *H. papilio* (HP) and squares *N. tinctoria* (NT). Broken lines indicate homogeneous clusters determined by ANOSIM pairwise comparisons ($R = 0.81$, $P = 0.001$).109

Figure 3.9: Spatial relative proportion of variations of the identified prey ingested (a) by *H. papilio* and (c) by *N. tinctoria*. Relative proportion of the abundance of the same categories in (b) top and (d) bottom segments of *Sphagnum fallax*. 110

Figure 3.10: Ciliates ingested by *H. papilio* (ind.g^{-1} DM) plotted against (a) the density of ciliates (ind.g^{-1} DM), (b) the density of *Playtorea sphagni* (ind.g^{-1} DM), (c) the density of *Paramecium*

bursaria and (d) the density of Uronema sp. Open symbols represents the “bog” area and filled symbols the “fen” area. Lines are regression line, significant at $P = 0.05$ level (ANOVA tests). ...112

Figure 3.11: Location of the Forbonnet Peatland with inset showing the location of the two sampling areas (“fen” and “bog”).117

Chapitre 4

Figure 4.1: Total carbon biomass ($\mu\text{gC.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, mean \pm S.E.) of all microbial groups and Carbon biomass ($\mu\text{gC.g}^{-1}.\text{cm}^{-2}$, mean \pm S.E.) of microbial groups in Sphagnum samples analyzed after 8 weeks related to the gradient of temperature. Letters indicate significant differences of biomass between temperatures in upper and lower segments (Friedman test, $P < 0.01$).133

Figure 4.2: Multiple factor analysis of the two Sphagnum biota communities and environmental (chemical, physical and phenolics) data sets. Biplot of axes 1 and 2 (both significant at $P = 0.001$) is given together with the result of a hierarchical agglomerative clustering (grey lines) obtained by the Ward method on the Euclidean distance matrix between MFA site scores, showing three main groups of temperature treatment (orange symbols = T15, blue symbols = T20, pink symbols = T25).135

Figure 4.3: Redundancy analyses (axes 1 and 2) of microbial data in upper segments (a) and lower segments (b). Environmental variables retained after model selection are represented by arrows. Microbial groups are represented by dotted lines. F_phe : free phenolics; Temp: temperature. ...138

Figure 4.4: Seasonal variations of Sphagnum moisture content in the two shoot segments (top and bottom) in controls and OTCs of the fen (a, b) and bog (c, d) areas. Mean \pm S.E. ($n = 3$). Asterisk indicates significant difference between controls and OTCs (ANOVA tests, $P < 0.05$).149

Figure 4.5: Seasonal variations of bound (a, b, c, d) and free (e, f, g, h) phenolics in the two shoot segments (top and bottom) in controls and OTCs of the bog and fen areas. Mean \pm S.E. ($n = 3$). Asterisk indicates significant difference between controls and OTCs (ANOVA tests, $P < 0.05$).151

Figure 4.6: Seasonal variations of densities of fungi producing phenoloxidases (a, b, c, d) and phenoloxidase activities (e, f, g, h) in the two shoot segments (top and bottom) in controls and OTCs of the bog and fen areas. Mean \pm S.E. ($n = 3$). Asterisk indicates significant difference between controls and OTCs (ANOVA tests, $P < 0.05$).153

Figure 4.7: Correlations between free phenolics and phenoloxidase activity for Sphagnum segments (top and bottom segments pooled) in controls and OTCs in the fen (a) and bog (b) areas.154

Figure 4.8: Biplots of redundancy analyses (RDA) of biochemical data measured on Sphagnum mosses (free and bound phenolics, phenoloxidases and fungi-producing phenoloxidases) in top (a) and bottom (b) Sphagnum segments of the fen area, and in top (c) and bottom (d) segments of the bog area. Climate treatments are coded with pink symbol for controls and with orange symbol for OTCs. Months are indicated next to the sample points by their number. Season effect has been removed by giving the variable months as covariable. Environmental variables are represented by vectors (arrows for quantitative or semi-quantitative variables): Sph_moist.: Sphagnum moisture content; Sph_moist:OTC: interactions between Sphagnum moisture and OTCs. Biochemical variables are given with dotted arrows: F_phen: free phenolics, B_phen: bound phenolics;

Phen_oxid: phenoloxidase activity; Fungi: culturable fungi-producing phenoloxidase. Axes are significant ($P < 0.05$), except for bottom segments. Axes 3 are never significant, with less than 1% of variance). Grey ellipses represent S.E. of site scores around the centroid of each treatment level.156

Figure 4.9: Multiple factor analysis (MFA) samples biplot of the entire data set split into 7 groups of variables describing Sphagnum biochemistry, environmental physical and chemical conditions, climate warming treatment, seasons and fen-bog areas. Biplot of axes 1 and 2 (both significant at $P = 0.001$) is given together with the result of a hierarchical agglomerative clustering (grey lines) obtained by the Ward method on the Euclidean distance matrix between MFA site scores, showing three main groups of sampling plots (circles = spring, squares = summer, triangles = autumn) and two sub-groups (pink symbols = controls, orange symbols = OTCs). Sampling areas are indicated with letters besides sampling plots (F: fen area; B: bog area).157

Figure 4.10: Fungal phenoloxidase activities (mean \pm S.E.; $n = 3$) characterized by DAF or L-DOPA substrates along the fen-bog gradient of the Forbonnet peatland in summer and autumn 2010 in different Sphagnum segments. Asterisks indicate significant differences of phenoloxidase activities (ANOVA; $P < 0.05$) between Sphagnum segments. Letters indicate significant differences of phenoloxidase activities (ANOVA; $P < 0.05$) between the fen and the bog area. Top = 0-3 cm; Bottom = 3-10 cm from capitulum.....165

Figure 4.11: Activity of peroxidases produced by Sphagnum (mean \pm S.E.; $n = 3$) along the fen-bog gradient of the Forbonnet peatland in summer and autumn 2010 in different Sphagnum segments. Asterisks indicate significant differences of peroxidase activities (ANOVA; $P < 0.05$) between Sphagnum segments. Letters indicate significant differences of peroxidase activities (ANOVA; $P < 0.05$) between seasons (summer/autumn). Triangles (Δ) indicate significant differences between ambient and warming plots. Perox = peroxidases; Mn-perox = manganese peroxidases. Top = 0-3 cm; Bottom = 3-10 cm from capitulum.166

Figure 4.12: Microbial community response to climate warming in a Sphagnum-dominated peatland. First principal response curve (PRC) with scores for microbial groups living in the surface (**a**) ($P = 0.03$) and in the litter (**b**) ($P = 0.065$) layers of Sphagnum lawns. Negative values of the curve indicate a negative effect of warming. Species scores allow an interpretation at microbial group level. The higher the score, the more the actual response pattern of the group follows the pattern in the PRC. **c**, Cumulative biomass ($\mu\text{gC g}^{-1}$ DM) of testate amoebae with a low and high trophic position (inferred from the small and large size of the shell aperture, respectively) in ambient and warmed plots. * $P < 0.01$, ANOVAR. **d**, Warming effect on testate amoeba species following the size of their shell-aperture. The warming effect was estimated using the F-value from ANOVAs. Species that occurred in less than 3% maximum biomass were removed from the data set to reduce the influence of rare taxa.173

Figure 4.13: Causal relationships among biotic communities and environmental variables in a Sphagnum-dominated peatland subjected to experimental warming or ambient conditions. Explanatory path diagram (Supplementary method) and path diagram on 2008-2009-2010 coupled years in ambient and warmed plots among similarity environmental matrices: biomass of microbial communities living in surface and litter layers of Sphagnum lawns, percent cover of moss and vascular plant species, polyphenols produced and released by Sphagnum, water chemistry and microtopography. The width of arrows is proportional to the standardized path coefficient (see

legend for scale). Numerals near each path indicate direct or partial Mantel's correlation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$176

Figure 4.14: Biplots of redundancy analyses (RDA) of vegetation communities (a), and water chemistry (b). Climate treatments were coded with open symbols for ambient (AMB) plots and with filled symbols for warming (WAR) plots, and years with figures (08 = 2008, 09 = 2009, 10 = 2010). Numbers after years characterize the sampling plot (1-12 plots). Environmental variables are represented by vectors for quantitative factor – sampling years (Year) and microtopography (MICRO) – and by asterisks for qualitative factors, treatment (AMB/WAR). Grey ellipses represent the standard error of site scores around the centroid of each treatment level. The three variables treatment, year and microtopography explained 41%, and 28% (adjusted R^2) of the variations in vegetation and water chemistry ($P < 0.001$), respectively. After variation partitioning, with adjusted R^2 , microtopography alone explained 42% of the variations of vegetation and water chemistry, respectively. No warming effect was detected on these data-sets ($P = 0.99, 0.55$, respectively).....179

Chapitre 5

Figure 5.1: Facteurs biotiques (végétation, microorganismes) et abiotiques caractéristiques du capitulum et de la tige des sphaignes. Facteurs biotiques (végétation, microorganismes) et abiotiques caractéristiques des conditions écologiques « haut » et « bas » marais.....188

Figure 5.2: Proportion relative moyenne (%) des groupes microbiens présents le long de la sphaigne et dans le « haut » et le « bas » marais de la tourbière de Frasne.189

Figure 5.3: Comparaison entre les espèces d'amibes à thèque retrouvées habituellement dans un haut et un bas marais (Heal, 1961, 1964) et celles retrouvées le long de la transition écologique « haut-bas » marais de la tourbière de Frasne (Jassey et al., 2011c). Les espèces communes apparaissent en rouge.....191

Figure 5.4: Proportion relative moyenne (%) des espèces d'amibes à thèque retrouvées dans le « haut » et le « bas » marais et le long de la tige de la sphaigne sur la tourbière de Frasne.....192

Figure 5.5: (a) Concentrations moyennes en polyphénols dans le capitulum et les tiges des sphaignes. Activités phénoloxydases (b) et peroxydases (c) moyennes enregistrées dans le capitulum et les tiges des sphaignes (d'après Chiapusio et al., soumis).....196

Figure 5.6: Mise en relation entre les concentrations en composés phénoliques et la densité de *Euglypha strigosa* chez *Sphagnum fallax* (d'après Chiapusio et al., soumis).....197

Figure 5.7: Schéma regroupant les différents effets biologiques induits par les polyphénols mis en évidence ou suggérés dans ces travaux de thèse.198

Figure 5.8: Schéma de la sphagnosphère.199

Figure 5.9: Représentation schématique des notions de bio-intégrations des communautés microbiennes des sphaignes et de leurs influences potentielles sur l'environnement dans un contexte de réchauffement climatique.200

Figure 5.10: Schéma bilan des effets positifs et (ou) négatifs du réchauffement climatique sur l'ensemble des facteurs formant la sphagnosphère.....203

| | |
|---|-----|
| Figure 5.11: Réponse des compartiments clés de la tourbière après deux années de réchauffement. | 205 |
| Figure 5.12: Boucle microbienne des tourbières dans un contexte de climat ambiant et réchauffé. Les flèches en pointillé représentent une diminution supposée des interactions prédateurs – proies. | 207 |

Annexes

| | |
|---|-----|
| Annexe 1: Densité des amibes à thèque les plus fréquentes dans les zones de « haut-marais » (ronds) et de « bas-marais » (triangles) en fonction de de la profondeur..... | 235 |
| Annexe 2: Variations spatiales de la proportion relative (%) des spécimens de <i>H. papilio</i> (HP) et <i>N. tincta</i> (NT) associée avec une proie le long du gradient « haut-bas » marais (Fen = Bas marais ; Bog = Haut marais)..... | 236 |
| Annexe 3: Photos par microscopie optique des principales espèces d’amibes à thèque observées sur la tourbière du Forbonnet; (a) <i>Physochilla griseola</i> , (b) <i>Nebela militaris</i> , (c) <i>Hyalosphenia papilio</i> , (d) <i>Amphitrema wrightianum</i> , (e) <i>Archerella flavum</i> , (f) <i>Nebela tincta</i> , (g) <i>Assulina muscorum</i> , (h) <i>Heleopera rosea</i> , (i) <i>Arcella arenaria</i> , (j) <i>Diffflugia elegans</i> | 237 |

Liste des tableaux

Chapitre 1

| | |
|---|----|
| Tableau 1.1: Principales caractéristiques des tourbières de type bas et haut-marais | 32 |
| Tableau 1.2: Différentes classes de composés phénoliques (D'après Macheix et al., 2005) | 48 |
| Tableau 1.3: Distinction entre peroxydases et phénoloxydases (D'après Duran & Esposito, 2000; Baldrian, 2006; Sinsabaugh, 2010)..... | 58 |
| Tableau 1.4: Effet d'une diminution des concentrations en composés phénoliques sur les activités enzymatiques hydrolases en tourbières (d'après Freeman et al., 2001a)..... | 62 |

Chapitre 3

| | |
|--|-----|
| Tableau 3.1: Environmental variables measured in the "fen" and "bog" sampling areas in Le Forbonnet mire (French Jura) (n = 12, average \pm S.E)..... | 88 |
| Tableau 3.2: Non-parametric correlation matrix of measured environmental variables along the "fen"/"bog" transition of Le Forbonnet mire..... | 89 |
| Tableau 3.3: RV-coefficients (below diagonal) and corresponding P-values (above diagonal) among the six groups of variables used in the MFA of the Forbonnet peatland. Significant coefficients appear in bold..... | 94 |
| Tableau 3.4: Summary of RDA on testate amoebae and environmental variables from Le Forbonnet mire (France): fraction of variance explained and significance of individual variables taken alone. | 94 |
| Tableau 3.5: Summary RDA and variance partitioning on testate amoebae and environmental variables data from Le Forbonnet mire (France). | 96 |
| Tableau 3.6: Densities (per g-1 DM \times 10 ³ ; mean \pm standard error) and biomass (μ gC g-1 DM; mean \pm standard error) of <i>N. tincta</i> , <i>H. papilio</i> and microbial groups in top and bottom segments along the "fen-bog" gradient of the Forbonnet mire (French Jura; n = 3). For fungi, figures represent the number of fungal hyphae pieces and spores counted in each sampling area. | 106 |
| Tableau 3.7: Preferential predation ratios (α) of the different prey ingested by <i>H. papilio</i> (HP) and <i>N. tincta</i> (NT) specimens along the "fen-bog" gradient | 109 |
| Tableau 3.8: Isotopic ratios (‰) of carbon and nitrogen in <i>Sphagnum fallax</i> leaf tissues ($\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$, mean \pm standard error, n = 6) and of pooled specimens of <i>N. tincta</i> and <i>H. papilio</i> ($\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$, n = 1) from the Forbonnet mire (French Jura)..... | 111 |

Chapitre 4 & 5

| | |
|--|-----|
| Tableau 4.1: Total concentrations (mg.g ⁻¹ DW) of <i>Sphagnum fallax</i> free and bound phenolics in two layers (upper and lower segments) for IS, T15, T20 and T25 (n = 4). Letters indicate significant differences of the total phenolic concentrations between the upper and the lower segments for a same treatment (P < 0.05) and Asterisk indicates significant difference between temperatures (P < 0.05). | 131 |
| Tableau 4.2: Summary table of 12 testate amoebae species in sample units of <i>Sphagnum fallax</i> in two layers (upper and lower segments) over 8 weeks period for IS, T15, T20 and T25 (n=4). Asterisks indicate significant differences of a same species related to the gradient of temperature in upper and lower segments (P < 0.05). | 134 |
| Tableau 4.3: Summary of RDA's on microorganisms and environmental variables: fraction of variance explained (%) and significance of individual variables taken alone or grouped..... | 136 |
| Tableau 4.4: Seasonal variations of environmental variables measured in controls and OTCs in the fen and bog sampling areas in Le Forbonnet mire (French Jura). Letters indicate significant seasonal variations (P < 0.05). Asterisks indicate significant variations between controls and OTCs (P < 0.05)..... | 150 |
| Tableau 4.5: Summary of RDA on <i>Sphagnum</i> related biochemical variables and environmental explanatory variables from Le Forbonnet mire (French Jura): fraction of variance explained and significance of individual variables taken alone. Sph moisture = <i>Sphagnum</i> moisture content; clim treat = climate treatment. | 155 |
| Tableau 4.6: RV-coefficients (RV) and corresponding P-values among the six groups of variables used in the Multiple factor analysis (MFA) of the entire data set split into 6 groups of variables describing <i>Sphagnum</i> biochemistry, environmental physical and chemical conditions, climate warming treatment, seasons, depth of moss segment and bog/fen areas. Significant coefficients are in bold..... | 158 |
| Tableau 4.7: Increases in air temperatures (°C) in response to the presence of open-top chambers during spring, summer and winter seasons, averaged over 3-years (n = 6 plots per treatments). *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05 (ANOVAR). | 178 |
| Tableau 4.8: RV coefficients (Pearson's correlation) among the six groups of environmental descriptors used in multiple factor analysis (MFA) – microbial communities in surface and litter layers of <i>Sphagnum</i> lawns, vascular plant communities, moss communities, polyphenols produced and released by <i>Sphagnum</i> and water chemistry – in ambient (AMB) and warming (WAR) plots in 2008, 2009 and 2010. Significant coefficients are shown in bold (P < 0.05). | 180 |
| Tableau 5.1: Contribution des différents facteurs abiotiques et biotiques enregistrés sur la tourbière de Frasne (%) à la variance des communautés microbiennes. | 194 |

Listes des publications et communications à congrès relatives à ces travaux de thèse

Publications

Vincent E.J. Jassey, Geneviève Chiapusio, Edward A.D. Mitchell, Philippe Binet, Marie-Laure Toussaint and Daniel Gilbert. 2011a. Fine-Scale Horizontal and Vertical Micro-Distribution Patterns of Testate Amoebae Along a Narrow Fen/Bog Gradient. *Microbial Ecology* 61(2) : 374-385 doi : 10.1007/s00248-010-9756-9.

Vincent E.J. Jassey, Daniel Gilbert, Philippe Binet, Marie-Laure Toussaint and Geneviève Chiapusio. 2011b. Effect of a temperature gradient on *Sphagnum fallax* and its associated living microbial communities : a study under controlled conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 57(3) : 226-235 doi : 10.1139/W10-116.

Vincent E.J. Jassey, Geneviève Chiapusio, Daniel Gilbert, Alexandre Buttler, Marie-Laure Toussaint and Philippe Binet. 2011c. Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog gradient in *Sphagnum fallax*. *Global Change Biology* 17(9) : 2945-2957 doi : 10.1111/j.1365-3486.2011.02437.x.

Vincent E.J. Jassey, Satoshi Shimano, Christine Dupuy, Marie-Laure Toussaint and Daniel Gilbert. 2011d. Characterizing the Feeding Habits of the Testate Amoebae *Hyalosphenia papilio* and *Nebela tinctoria* along a Narrow "Fen-Bog" Gradient Using Digestive Vacuole Content and ¹³C and ¹⁵N Isotopic Analyses. *Protist* (in press) doi : 10.1016/j.protis.2011.07.006.

Frédéric Delarue, Fatima Laggoun-Défarge, Alexandre Buttler, Sébastien Gogo, Vincent E.J. Jassey, Jean-Robert Disnar. 2011. Effects of short-term ecosystem experimental warming on water-extractable organic matter in ombrotrophic *Sphagnum* peatland (Le Forbonnet, France). *Organic Geochemistry* (sous presse) doi : 10.1016/j.orggeochem.2011.07.005

Vincent E.J. Jassey, Geneviève Chiapusio, Daniel Gilbert, Marie-Laure Toussaint, Philippe Binet. Phenoloxidase and peroxidase activities in a *Sphagnum*-dominated peatland in a warming climate. *Soil Biology and Biochemistry* (sous presse).

Geneviève Chiapusio, Vincent E.J. Jassey, M Iftikahr Hussain, Philippe Binet. Evidences of bryophyte chemical interactions: the case of *Sphagnum*. In Cheema ZA, Farooq M, Wahid A (eds), *Allelopathy: Current trends and future applications*. Springer (soumis).

Communications orales

Jassey V., Chiapusio G., Binet P., Toussaint M.L., Gilbert D., Impact d'une hausse de la température sur le système sphaigne-microorganismes. Dixièmes Journées de l'étude des sols, Mars 2009 (Strasbourg).

Jassey V., Chiapusio G., Binet P., Toussaint M.L., Gilbert D., Impact of elevated temperature on Testate Amoebae in *Sphagnum fallax* peatland : a microcosm study and perspectives in situ. 5th International Symposium on Testate Amoebae, Septembre 2009 (Montbéliard).

Jassey V., Binet P., Gilbert D., Toussaint M.L., Chiapusio G., Climatic effect on seasonal variations of polyphenol production and degradation in *Sphagnum* peatland. 25th Congress of Polyphenols, Août 2010 (Montpellier).

Jassey VEJ., Chiapusio G., Mitchell E.A.D., Binet P., Toussaint M.L., Gilbert D., Microdistribution horizontale et verticale des amibes à thèques chez *Sphagnum fallax* le long d'un gradient écologique. 10ème Journées de Limnologie, Octobre 2010 (Thonon-les-Bains).

Jassey V., Quelles interactions existent entre les composés phénoliques et les communautés microbiennes associées aux sphaignes ? Séminaire de l'UMR Chrono-Environnement Novembre 2010 (Besançon).

Jassey VEJ., Binet P., Gilbert D., Toussaint M-L., Chiapusio G., *Sphagnum* phenolic interactions in peatlands. International Workshop *Sphagnum* peatlands and long-range transboundary atmospheric pollutions Mai 2011 (Montbéliard). Oral.

Buttler A., Laggoun-Défarge F., Jassey VEJ., Delarue F., Impact of experimental warming on C sink function in a temperate peatland : the PEATWARM project. Meeting of Society of Wetlands Scientists Juillet 2011 (Prague).

Posters

Jassey V., Chiapusio G., Binet P., Toussaint M.L., Gilbert D., Impact of temperature increase on *Sphagnum* / microorganisms system : a microcosm study. Congrès Interaction entre les processus physico-chimiques et microbiologiques dans l'environnement, Octobre 2008 (Clermont-Ferrand)

Jassey VEJ., Chiapusio G., Gilbert D., Buttler A., Toussaint M-L., Binet P., Climate effect on seasonal polyphenol.phenoloxidase interplay in *Sphagnum fallax* along a narrow fen-bog gradient. EGU General Assembly - Avril 2011 (Wien).

Introduction

Les risques de changements climatiques induits par les activités anthropiques représentent l'un des challenges scientifiques et politiques majeurs de ce début du 21^{ème} siècle (Karl *et al.*, 2003). L'exploitation massive des énergies fossiles (charbon, pétrole, gaz naturel) a entraîné une augmentation significative des rejets atmosphériques de gaz à effets de serre (GES), favorisant le réchauffement que subit actuellement la surface de la terre (Solomon *et al.*, 2007). Selon les experts, ce réchauffement pourrait atteindre, en fonction des différents scénarios d'émissions, des valeurs de températures moyennes comprises entre +1.4°C et +6.4°C au cours des 100 prochaines années (Solomon *et al.*, 2007). De nombreux effets « directs » du réchauffement climatique ont déjà été observés ces dernières années : fonte des glaciers, hausse des précipitations moyennes, ou encore catastrophes météorologiques accrues. En parallèle à ces effets directs, des effets « indirects », encore mal connus, sont également attendus, telles que les rétroactions climatiques. Les rétroactions climatiques peuvent être soit positives, soit négatives. Une rétroaction positive se définit par une situation dans laquelle un changement climatique va provoquer une réponse qui va intensifier en retour ce changement climatique (Lashof *et al.*, 2007). La plupart des scientifiques pensent qu'une hausse des températures va favoriser la décomposition de la matière organique dans le permafrost, due au dégel du sol, libérant des quantités importantes de GES dans l'atmosphère, accentuant le réchauffement climatique lui-même. Les rétroactions dites « positives » favoriseraient donc le réchauffement planétaire. Les rétroactions dites « négatives » quant à elles conduiraient à une diminution de la concentration atmosphérique en GES, provoquant une réduction de l'impact du réchauffement climatique (Velbel, 1993).

A cet égard, les écosystèmes terrestres demeurent essentiels en raison de leur rôle primordial dans l'absorption et la libération de gaz à effet de serre (Meilillo *et al.*, 2002 ; Heinmann *et al.*, 2008). Les sols – incluant les zones humides et le permafrost – représentent des stocks de carbone terrestres importants, dont une large fraction réside dans les tourbières, les toundras et les forêts boréales (Davidson & Jansens, 2006 ; Mack *et al.*, 2009). Ces stocks de carbone résultent d'un déséquilibre entre les entrées et les

sorties de carbone au niveau du sol (Davidson & Jansens, 2006). Bien que les mécanismes exacts contrôlant la dynamique du carbone dans ces écosystèmes ne soient pas complètement connus, l'ensemble des paramètres biotiques (plantes et microorganismes) et abiotiques impliqués dans cette dynamique sont sans aucun doute affectés par le réchauffement climatique actuel, ce qui est susceptible de modifier la dynamique de l'écosystème et donc le cycle du carbone à plus ou moins long-terme (Wardle *et al.*, 2004 ; Bardgett *et al.*, 2008 ; Singh *et al.*, 2010).

Malgré l'importance mondiale de la dynamique du carbone, très peu de données existent quant à l'impact du réchauffement climatique sur les interactions entre les microorganismes et les plantes. Il est même surprenant que la sensibilité au réchauffement climatique à long terme des communautés microbiennes de l'un des plus importants stocks de carbone terrestre – à savoir les tourbières à sphaignes – ait été si peu étudiée jusqu'à présent. Pourtant, les communautés microbiennes associées aux sphaignes constituent un réseau alimentaire détritique crucial soutenant de nombreux processus éco-systémiques, et plus particulièrement la dynamique du carbone (Gilbert *et al.*, 1998 ; Gilbert & Mitchell, 2006). Or dans le contexte actuel du réchauffement global, il apparaît essentiel de connaître les conséquences de la hausse des températures sur les paramètres clés des tourbières – les sphaignes et les microorganismes – car le réchauffement est susceptible de favoriser la décomposition de la matière organique, libérant ainsi d'importantes quantités de carbone dans l'atmosphère, stimulant par rétroactions positives le réchauffement lui-même (Dorrepaal *et al.*, 2009). Il semble également nécessaire d'améliorer notre compréhension des interactions sphaignes – microorganismes et leurs réponses mutuelles au changement climatique. Bien que des liens évidents existent entre ces deux composants au travers du cycle de la matière organique (production par les sphaignes vs décomposition par les microorganismes), trop peu de travaux mettent en évidence des relations spécifiques entre ces deux éléments. Les conditions d'ennoyage permanentes, de faibles températures, et d'acidité du milieu sont largement reconnues comme les facteurs limitant les activités microbiennes des tourbières du nord de l'Europe (Weltzin *et al.*, 2001 ; Dorrepaal *et al.*, 2004 ; Sowerby *et al.*, 2005). Cependant, en plus de ces paramètres classiques, d'autres facteurs tels que les composés phénoliques produits par les sphaignes, sont peut-être aussi sous-estimés. Bien que les interactions entre les polyphénols et les microorganismes ont été étudiés dans les sols (Souto *et al.*, 2000 ; Brathen *et al.*, 2010), très peu d'études se sont attachées – à notre connaissance – aux relations pouvant exister entre les activités microbiennes et les polyphénols des sphaignes. Encore moins sous l'effet de perturbations environnementales tel que le réchauffement climatique. Pourtant, cette « communication » biologique pourrait se montrer déterminante quant au fonctionnement général de l'écosystème et expliquer certains phénomènes de dynamique

de populations et (ou) de communautés, parfois restés inexplicés, comme cela a été démontré dans d'autres écosystèmes (Brathen *et al.*, 2010).

C'est dans ce contexte général que s'inscrit ce travail de recherche réalisé dans le cadre du programme de recherche ANR PEATWARM, dont l'objectif est d'étudier l'influence d'une hausse modérée de la température *in situ* sur le fonctionnement des tourbières à sphaignes. Cette thèse vise plus particulièrement à étudier l'influence du réchauffement climatique sur les relations spécifiques entre les sphaignes et leurs communautés microbiennes associées, via les polyphénols produits et libérés par les sphaignes. Cette approche à petite échelle a été choisie, car elle a l'avantage (i) d'intégrer tous les paramètres biotiques et abiotiques environnants, et surtout, (ii) de s'intégrer dans la dynamique globale de l'écosystème.

Les deux principaux objectifs de cette thèse sont donc :

- acquérir une meilleure compréhension de l'écologie des communautés microbiennes associées aux sphaignes. Pour cela, l'étude de la distribution spatiale (horizontale et verticale) des communautés microbiennes, notamment celle des amibes à thèque, a été réalisée. Une première étude s'est focalisée sur les relations entre les amibes à thèque et les composés phénoliques. En parallèle, une seconde étude s'est concentrée sur les relations trophiques existantes entre les amibes à thèque et les autres groupes microbiens.
- évaluer l'impact du réchauffement climatique sur (i) les communautés microbiennes et leur activité *via* les activités enzymatiques oxydatives, (ii) la production et la libération de phénols par la sphaigne et (iii) les interactions entre ces compartiments biologiques. Pour cela, une troisième étude en conditions contrôlées a permis de mettre en évidence l'impact du réchauffement climatique sur l'ensemble des groupes microbiens et sur leurs relations avec les polyphénols. Par la suite, nous nous sommes intéressés tout particulièrement à l'effet du réchauffement *in situ* sur les relations polyphénols/phénoloxydases à travers une quatrième et une cinquième étude. Enfin, l'impact du réchauffement sur les interactions entre la végétation, les communautés microbiennes et les paramètres physicochimiques a été étudié dans une sixième étude, afin de déterminer quels facteurs réagissaient le plus rapidement au changement climatique et quel impact ces changements pouvaient avoir sur les tourbières en terme de rétroactions climatiques.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

1. Les tourbières et le réchauffement climatique

1 Les tourbières : des écosystèmes très diversifiés

a) Les tourbières à sphaignes

Par définition, les tourbières à sphaignes sont des milieux humides colonisés par une végétation qui se développe sur un sol peu perméable et formé de tourbe sur une épaisseur de quelques dizaines de centimètres à plusieurs mètres (Manneville *et al.*, 1999). La tourbe est constituée au minimum de 20% de matière organique mal dégradée. Cette dernière provient de l'accumulation de résidus de végétaux au cours du temps – du siècle au millénaire. Les tourbières à sphaignes sont des écosystèmes variables dans l'espace et dans le temps, dont le fonctionnement est lié à un élément majeur : les sphaignes (*Sphagnum* sp.) (Andrus, 1986 ; Payette & Rocheford, 2001 ; Rydin & Jeglum, 2006). Les sphaignes représentent un genre particulier de l'embranchement des bryophytes. Ces végétaux non vasculaires dépourvus de lignine et de racines possèdent en effet des particularités morphologiques et physiologiques qui les distinguent des autres mousses (Figure 1.1a). Les sphaignes ont une croissance continue, les feuilles les plus jeunes sont rassemblées en couronne dans la partie apicale de la plante et forment ce que l'on appelle le capitulum, i.e. la partie vivante de ces végétaux, tandis que les feuilles plus âgées se retrouvent sur les tiges sénescents. La structure cellulaire des feuilles constitue également une particularité des sphaignes (Figure 1.1b). Un réseau de petites cellules vivantes responsable de la photosynthèse – les chlorocystes – englobe dans ses mailles de grandes cellules mortes – les hyalocystes – chargées du stockage de l'eau. Les sphaignes sont adaptées aux conditions acides, froides, humides et de faible disponibilité en nutriments qui règnent dans le milieu, milieu hostile qu'elles façonnent elle-même (Clymo & Hayward, 1982 ; van Breemen, 1995 ; Rydin & Jeglum, 2006). Du fait de leur recouvrement pouvant dépasser 80% du couvert végétal total, les sphaignes accumulent plus de carbone que n'importe quel autre genre végétal présent dans ces écosystèmes (Clymo & Hayward, 1982 ; Hayward & Clymo, 1983 ; van Breemen, 1995). En effet, les conditions d'ennoyage permanentes, de faibles températures, et d'acidité du milieu limitent considérablement la décomposition de la

matière organique (Charman, 2002 ; Rydin & Jeglum, 2006). Les tourbières accumulent ainsi entre 2 à 16% du carbone fixé par photosynthèse (Francez, 2000 ; Laiho, 2006). Il en découle une accumulation de tourbe, horizon dominé par des vestiges de sphaignes peu dégradés, qui produisent une litière pauvre en nutriments et enrichie en composés organiques récalcitrants, comme les polyphénols (Gobat *et al.*, 2010). De ce fait, et malgré un recouvrement de seulement 3% de la surface terrestre mondiale (Charman, 2002), les tourbières stockent environ le tiers du carbone total contenu dans les sols (soit environ 400.10^9 tonnes de carbone) (Gorham, 1991 ; Strack, 2008).

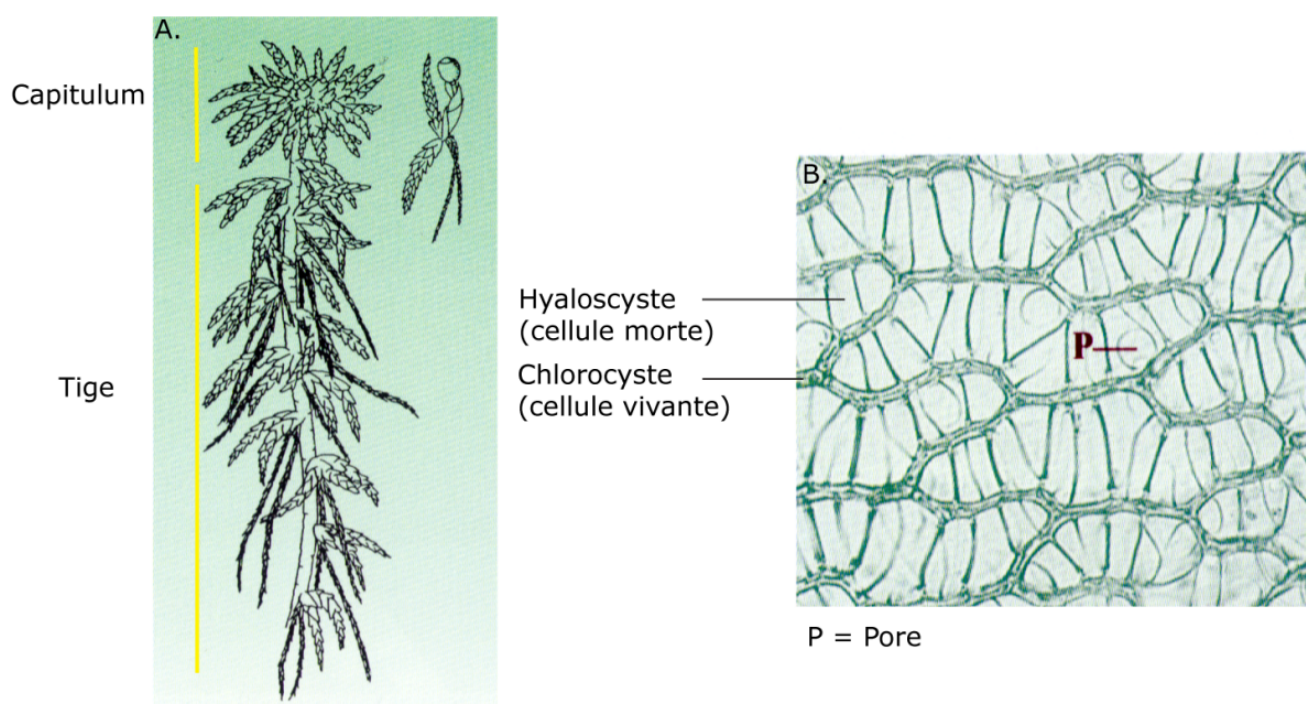


Figure 1.1: Particularités morphologiques de la sphaigne (D'après Manneville *et al.*, 1999)

Les tourbières à sphaignes sont des milieux très diversifiés comprenant de nombreux gradients écologiques. Leur caractérisation découle le plus souvent de l'identification de gradients de végétation, dont l'expression est claire sur le terrain (Bridgham *et al.*, 1998, 2001 ; Wheeler & Proctor, 2000). Les changements dans l'abondance, la composition ou la croissance d'espèces, ou de communautés végétales sont généralement fonction de l'espace et des variations physiques, chimiques et/ou biologiques. Les gradients écologiques en tourbières peuvent ainsi s'exprimer le long d'une échelle spatiale croissante : des gradients microtopographiques aux gradients « trophiques » entre les tourbières ombrotrophes et les tourbières minérotrophes.

La connaissance des différents facteurs biotiques et abiotiques responsables de la formation des gradients de végétation représente l'un des défis majeurs en écologie des tourbières. Ainsi, depuis quelques années, l'écologie des tourbières vise à expliquer les mécanismes impliqués dans le fonctionnement des différents gradients. Par exemple, un gradient chimique et (ou) microbien peut-il expliquer un gradient de végétation observé ?

b) Les gradients microtopographiques

Sur une échelle microtopographique de quelques mètres de longueur et quelques dizaines de centimètres de hauteur, les sphaignes, les plantes vasculaires et autres bryophytes se succèdent entre les buttes et les dépressions (Payette & Rocheford, 2001). Ce gradient est décrit en fonction de la distribution des sphaignes ou des mousses (Clymo & Hayward, 1982). Par exemple, les dépressions sont généralement colonisées par des espèces du groupe *Cuspidata*, comme *S. fallax* et *S. cuspidatum*. Toutefois les plantes vasculaires et les microorganismes telles que les amibes à thèque peuvent également suivre un tel gradient (Clymo & Hayward, 1982 ; Bobrov *et al.*, 1999 ; Payette & Rocheford, 2001) (Figure 1.2). D'autres travaux ont aussi mis en évidence des variations importantes des concentrations en composés phénoliques dans la tourbe entre les buttes et les dépressions (Katase, 1981, 1983 ; Djurdjévic *et al.*, 2003), soulignant ainsi le rôle des paramètres environnementaux sur la production de phénols chez la sphaigne (Figure 1.2). Les facteurs abiotiques sont également influencés par ce type de gradients. Par exemple, la nappe phréatique ne suit pas la microtopographie, de ce fait il existe de grandes différences d'humidité entre les dépressions et les buttes (Payette & Rocheford, 2001). Des variations de pH et autres éléments nutritifs (azote, phosphore et potassium) ont aussi été enregistrées le long de ce gradient écologique. En effet, l'apport en nutriments peut-être deux à trois fois plus élevé dans les dépressions en raison de la nappe phréatique à proximité (Payette & Rocheford, 2001). Par conséquent, au sein du même habitat, les variations environnementales entre les buttes et les dépressions impliquent des différences de fonctionnement en termes de production et de décomposition (Payette & Rocheford, 2001). Malheureusement, très peu de travaux mettent en relation les différents paramètres biotiques et abiotiques pour expliquer ces gradients.

c) Le gradient écologique haut-bas marais

La distinction fondamentale entre les différents types de tourbières présentes dans nos régions se fait entre le haut (tourbière ombrotrophe) et le bas marais (tourbière minérotrophe) (Bridgham *et al.*, 1998, 2001 ; Rydin & Jeglum, 2006). Globalement, ces deux types de tourbières présentent des communautés végétales différentes, ainsi que des propriétés hydrologiques et physicochimiques différentes (Tableau 1.1). Ce gradient s'exprime le plus souvent à une échelle régionale, voire à l'intérieur même d'une tourbière. Ce type de gradient a beaucoup été décrit au niveau de la végétation (Payette & Rocheford, 2001 ; Rydin & Jeglum, 2006).

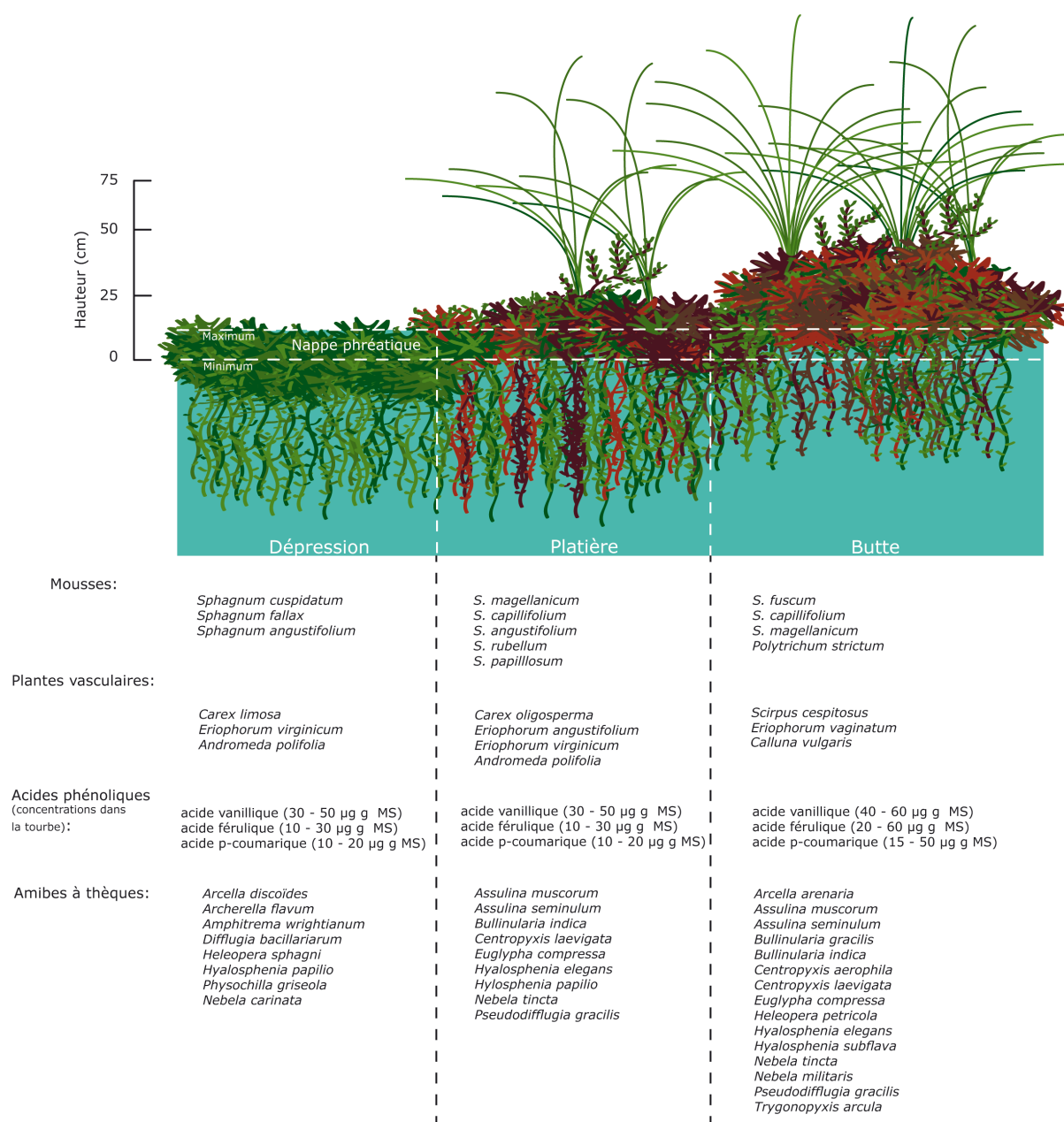


Figure 1.2: Caractéristiques physiques et biologiques du gradient butte - dépression (synthèse d'après Bobrov *et al.*, 1999 ; Mitchell *et al.*, 2000a, 2008 ; Djurdjévic *et al.*, 2003 ; Rydin & Jeglum, 2006).

Les tourbières de type bas-marais renferment une végétation diversifiée qui se développe en conditions humides, grâce à une nappe phréatique de surface. Ces tourbières sont généralement localisées dans des dépressions ou sur des pentes permettant à l'eau de circuler librement tout en transportant des éléments minéraux dissous provenant des milieux environnants. L'eau courante permet aussi une oxygénation du substrat organique, influençant ainsi la décomposition de la matière organique (Clymo, 1973 ; Rydin & Jeglum, 2006). Deux grands types de tourbières minérotrophes ont été identifiés selon la nature de leur couvert végétal : les tourbières de bas-marais riches en nutriments et les tourbières de bas-marais pauvres en nutriments (Rydin & Jeglum, 2006). Cette subdivision repose essentiellement sur les propriétés physicochimiques de la tourbe et de l'eau circulant au sein de la tourbière. Le pH des tourbières minérotrophes pauvres varie le plus souvent entre 3.8 et 6.5 (Rydin & Jeglum, 2006), alors que pour les tourbières minérotrophes riches il varie entre 5.5 et 7.5. La végétation des tourbières minérotrophes est généralement dominée par des herbacées, des bryophytes, des arbres et arbustes. La végétation présente dans ces tourbières renferme de nombreuses espèces de sphaignes tels que de *Sphagnum papillosum*, *S. fallax*, et *S. cuspidatum*, ainsi que plusieurs espèces herbacées, indicatrices des conditions minérotrophiques pauvres, comme *Eriophorum angustifolium*, *Menyanthes trifoliata*, plusieurs *Carex* dont *C. lasiocarpa*, *C. rostrata*, et *C. flava*. Des descriptions plus détaillées de la végétation pourront être trouvées dans les synthèses de Payette & Rocheford (2001) et Rydin & Jeglum (2006).

Alors que dans les tourbières de bas-marais la nappe d'eau est positionnée en fonction de la configuration du bassin, les tourbières de haut-marais créent une nappe d'eau « perchée », c'est-à-dire au delà des limites topographiques du bassin. De ce fait, ces écosystèmes ont une surface plutôt arrondie et sont isolés des déplacements des eaux souterraines riches en minéraux (Payette & Rocheford, 2001; Rydin & Jeglum, 2006). Les tourbières de haut-marais ont généralement une microtopographie très marquée avec beaucoup de dépressions et de buttes. Etant donné que ces écosystèmes sont nourris essentiellement par les précipitations, de faibles variations chimiques sont enregistrées dans ces milieux. Les tourbières de haut-marais sont de ce fait extrêmement pauvres en éléments nutritifs, très acides (pH < 4) et dépendantes des précipitations (Tableau 1.1). La végétation des tourbières ombrotrophes est généralement moins diversifiée que celle des tourbières minérotrophe, les principaux assemblages de végétation étant étroitement associés à la présence des buttes et dépressions. Cependant une constante demeure en la présence des sphaignes sur les buttes (ex *S. fuscum*, *S. rubellum* et *S. magellanicum*) et dans les dépressions (ex *S. rubellum* et *S. cuspidatum*) (Payette & Rocheford, 2001). Les sphaignes caractérisent ce type de tourbière car elles demeurent particulièrement bien adaptées aux faibles

concentrations en nutriments présents dans les tourbières ombrotrophes (Clymo & Hayward, 1982 ; Rydin, 1997).

Tableau 1.1: Principales caractéristiques des tourbières de type bas et haut-marais

| | Bas-marais (Fen) ^a | Haut-marais (Bog) ^b |
|------------------------------|---|---|
| Végétation | Espaces ouverts dominés par les bryophytes et les graminées et (ou) clairsemés de quelques arbres et arbustes | Espaces ouverts dominés par les bryophytes et les graminées et (ou) clairsemés de quelques arbustes nains et autres plantes vasculaires (Cypéracées) |
| Tourbe | Généralement > 40 cm | Généralement > 40 cm |
| pH et teneurs en ions | Basique à acide / calcique à non calcique et assez pauvre en ions | Acide à très acide / très peu minéralisée beaucoup d'acides humofulviques |
| Niveau trophique | Minérotrophe eu - oligotrophe | Oligotrophe oligotrophique |
| Forme | Plate, concave ou en pente | Bombée, convexe ou en pente |
| Régime hydrique | Bilan local précipitations - évaporations parfois déficitaire, Eau => origine terrestre (lac, étang, source, ruissellement, nappe phréatique) Milieu imbibé situé sous ou juste au niveau de la nappe d'eau | Bilan local précipitations - évaporations toujours excédentaire, Eau => origine précipitations, Milieu coupé de la circulation d'eau environnante à cause du bombement, Milieu au-dessus du niveau général de l'eau (sécheresse épisodique) |
| Microtopographie | Gradient butte - dépression | Gradient butte - dépression |

Synthèse d'après Rydin & Jeglum (2006)



Photo Rydin & Jeglum (2006)

Bas-marais



Haut-marais

Bien évidemment, des intermédiaires existent entre ces deux grands types de tourbières décrits ci-dessus. La plupart des tourbières ne sont pas strictement ombrotrophes ou minérotrophes, notamment dans les régions tempérées et boréales où elles forment des complexes écologiques intermédiaires. De plus, les zones de transition entre les tourbières ombrotrophes et les tourbières minérotrophes rencontrées à de plus petites échelles restent peu étudiées à ce jour, notamment en terme de perturbations environnementales. Or ces zones peuvent se révéler déterminantes quant à l'évaluation des processus écologiques perturbés par les changements globaux, car on s'aperçoit que le système entier – via les changements de végétation – réagit de façon systématique aux différents gradients écologiques présents en tourbières. L'étude de ces zones de transitions à des échelles intermédiaires, comprises entre le gradient microtopographique et le gradient trophique, permettrait donc d'apporter des informations utiles quant à la réponse globale des tourbières aux différents changements globaux.

2 Les tourbières et le réchauffement climatique

Les changements susceptibles de se produire en tourbières sur du long-terme peuvent provenir à la fois de facteurs « internes » à la tourbière (ex. processus géochimiques, biologiques, hydrologiques et physiques) et de facteurs « externes » à la tourbière (ex. le climat, les facteurs anthropiques). Tous ces facteurs interagissent évidemment entre eux sur des échelles de temps et d'espace variables, et il n'est pas rare que plusieurs facteurs « externes » et (ou) « internes » contribuent aux mêmes séquences de changement au sein de l'écosystème (Charman, 2002) (Figure 1.3). Même si les mécanismes liés à ces changements sont loin d'être tous identifiés, l'importance des gradients écologiques sur les facteurs biotiques (ex. végétation) et abiotiques (ex. chimie de l'eau) de l'écosystème est largement reconnue.

Il ne fait aucun doute que les conditions « externes » à l'écosystème représentent aussi un déterminant majeur du fonctionnement des différents processus biologiques présent en tourbières (Charman, 2002 ; Rydin & Jeglum, 2006 ; Strack, 2008). Les tourbières sont en effet associées, soit au climat froid, soit au climat humide, soit au deux (Figure 1.4). Le type de tourbière qui se développe est donc fortement lié au climat extérieur (Charman, 2002). Ainsi, des changements dans les conditions « externes », tels que ceux liés au réchauffement climatique, sont susceptibles d'avoir un impact important sur l'écologie et le fonctionnement des tourbières (Davidson & Janssens, 2006). Ce qui est moins évident à déterminer, c'est la manière dont les changements climatiques vont modifier les tourbières à travers le temps.

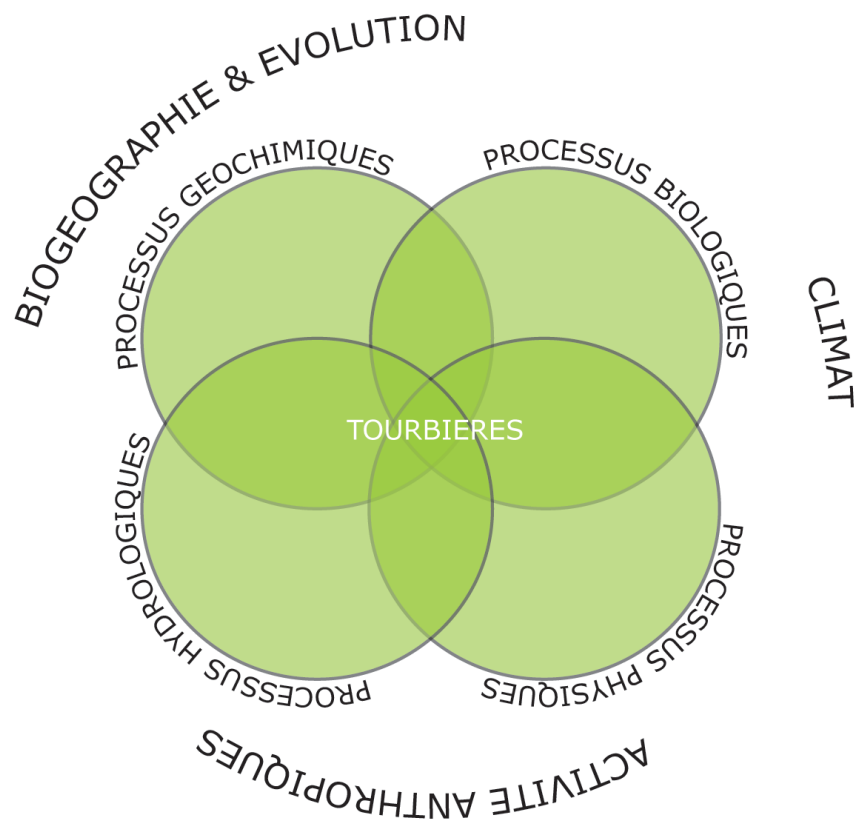


Figure 1.3: Schéma conceptuel représentant les facteurs « internes » (processus géochimiques, biologiques, hydrologiques et physiques) et « externes » (activités anthropiques, climat, biogéographie) affectant le fonctionnement des tourbières au cours du temps.

a) Impact du réchauffement climatique sur les paramètres climatiques des tourbières

Le réchauffement climatique actuel est susceptible d'avoir un fort impact sur les tourbières. Quelques études ont montré que la hausse des températures de l'air de 0.3 à 3.0°C pouvait augmenter la température de la tourbe de 0.4 à 2.2°C jusqu'à 20 cm de profondeur (Aerts *et al.*, 2004 ; Dorrepaal *et al.*, 2004, 2009). A l'opposé, dans certaines études, la hausse de la température de l'air n'a pas forcément entraîné une hausse de la température du sol mais plutôt une diminution de celle-ci. Ceci constitue le paradoxe « du sol plus froid dans un environnement plus chaud » (Groffman *et al.*, 2001 ; Decker *et al.*, 2003 ; Dabros & Fyles, 2010). Ce phénomène s'explique, selon ces auteurs, par une évapotranspiration plus importante au niveau du sol. Or un sol plus sec dû à une évapotranspiration accrue induit une conductivité thermique plus faible, et par conséquent des transferts de chaleur amoindris.

Les relations entre le réchauffement et les variations des précipitations sont encore floues. Certains auteurs estiment que la hausse des températures couplée à la hausse des précipitations entraînerait une diminution du niveau de la nappe d'eau, provoquant par conséquent un épaississement de l'acrotelme, zone où s'effectue

l'essentiel de la dégradation (Rydin & Jeglum, 2006). Moore (2002) estime que la hausse des précipitations contrebalancerait la diminution de la nappe d'eau due à la hausse des températures. Enfin, d'autres auteurs pensent que les changements climatiques auront un impact plus marqué à l'échelle saisonnière, notamment par des évènements secs plus longs, phénomène qui se traduirait par une diminution importante de la nappe d'eau (Bragazza, 2008).

De manière générale, il n'existe pas de scénario unique de l'effet du changement climatique sur les conditions environnementales en tourbières, en raison (i) de leur répartition dans différentes régions du globe avec différents climats, (ii) de la variabilité régionale des températures et des précipitations et (iii) des différents types de tourbières et autres gradients écologiques régnant à l'échelle du globe et (ou) au sein d'une même tourbière (Limpens *et al.*, 2008 ; Strack, 2008).

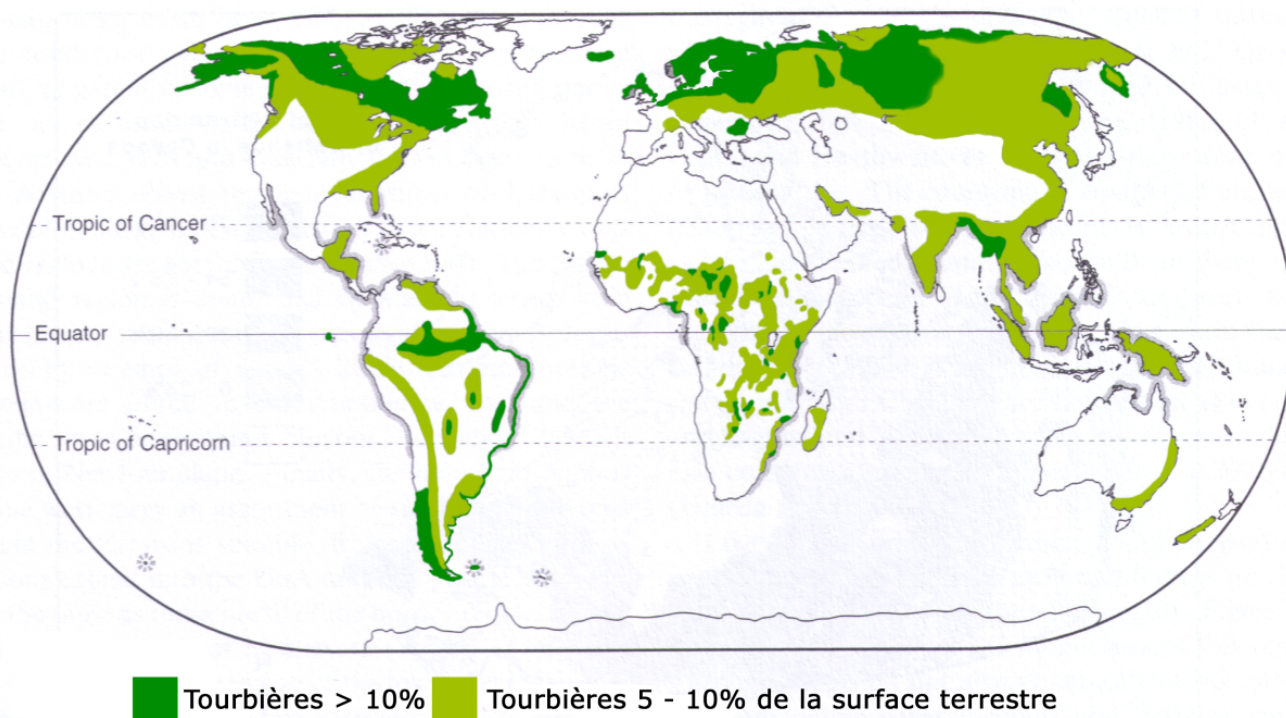


Figure 1.4: Carte de répartition des tourbières à l'échelle du globe (D'après Charman, 2002)

b) Impact du réchauffement climatique sur les paramètres biologiques des tourbières

La majorité des études portant sur les effets des changements climatiques en tourbière se sont principalement axées sur l'étude de la végétation et des gaz à effet de serre (CO₂, CH₄) (Bu *et al.*, 2011). Les auteurs qui ont étudié les changements climatiques sur la diversité végétale ont montré des effets contrastés. Certains auteurs ont souligné qu'une hausse de la température était à l'origine de changements en terme d'espèces de sphaignes, tandis que d'autres auteurs ont plutôt montré une hausse de la productivité des sphaignes dû à une hausse conjuguée de la photosynthèse et de l'apport en nutriments (Weltzin *et al.*, 2001 ; Dorrepaal *et al.*, 2004 ; Gunarsson, 2005 ; Breeuwer *et al.*, 2008).

L'effet de la température sur les sphaignes est également à mettre en relation avec la compétition des sphaignes avec les plantes vasculaires (Heijmans *et al.*, 2002). Une forte sécheresse induite par la hausse des températures et un manque de précipitations peut par exemple provoquer une dessiccation irréversible du tapis de sphaignes (Bragazza, 2008), et induire une diminution du recouvrement des bryophytes favorisant les espèces vasculaires (Weltzin *et al.*, 2003). Les travaux sur la végétation dans un contexte de réchauffement climatique en tourbière demeurent donc complexes et les changements ne sont pas toujours visibles, même après plusieurs années de réchauffement (Keuper *et al.*, 2011).

L'influence du réchauffement climatique sur les processus de décomposition de la matière organique est souvent approché par des mesures de respiration « globale » de l'écosystème grâce à l'étude des gaz (CO₂, CH₄) (ex. McNeil & Waddington, 2003; Bu *et al.*, 2011) (Figure 1.5). Ainsi, sous l'effet d'une hausse des températures de l'air, il est apparu que la respiration totale (plantes et microorganismes) pouvait augmenter de 25% en tourbières, et de 15 à 53% dans les tourbières minérotrophes et ombrotrophes (Waddington & Updegraff, 2001). De la même façon, Dorrepaal *et al.* (2009) ont mesuré, après huit années de réchauffement, une hausse de la respiration totale de 60% et 52%, respectivement au printemps et en été, démontrant ainsi une forte dynamique saisonnière contrôlée par la température. Ces auteurs ont également démontré que la respiration totale de l'écosystème augmentait en réponse à une forte hausse de la respiration hétérotrophe, suggérant une plus forte activité microbienne lorsque la température de l'air augmente en moyenne de 1°C. Dans les années à venir, le réchauffement climatique est donc susceptible d'accroître la libération de CO₂, dû à l'accélération de la décomposition par les microorganismes (Updegraff, 2001 ; Dorrepaal *et al.*, 2009).

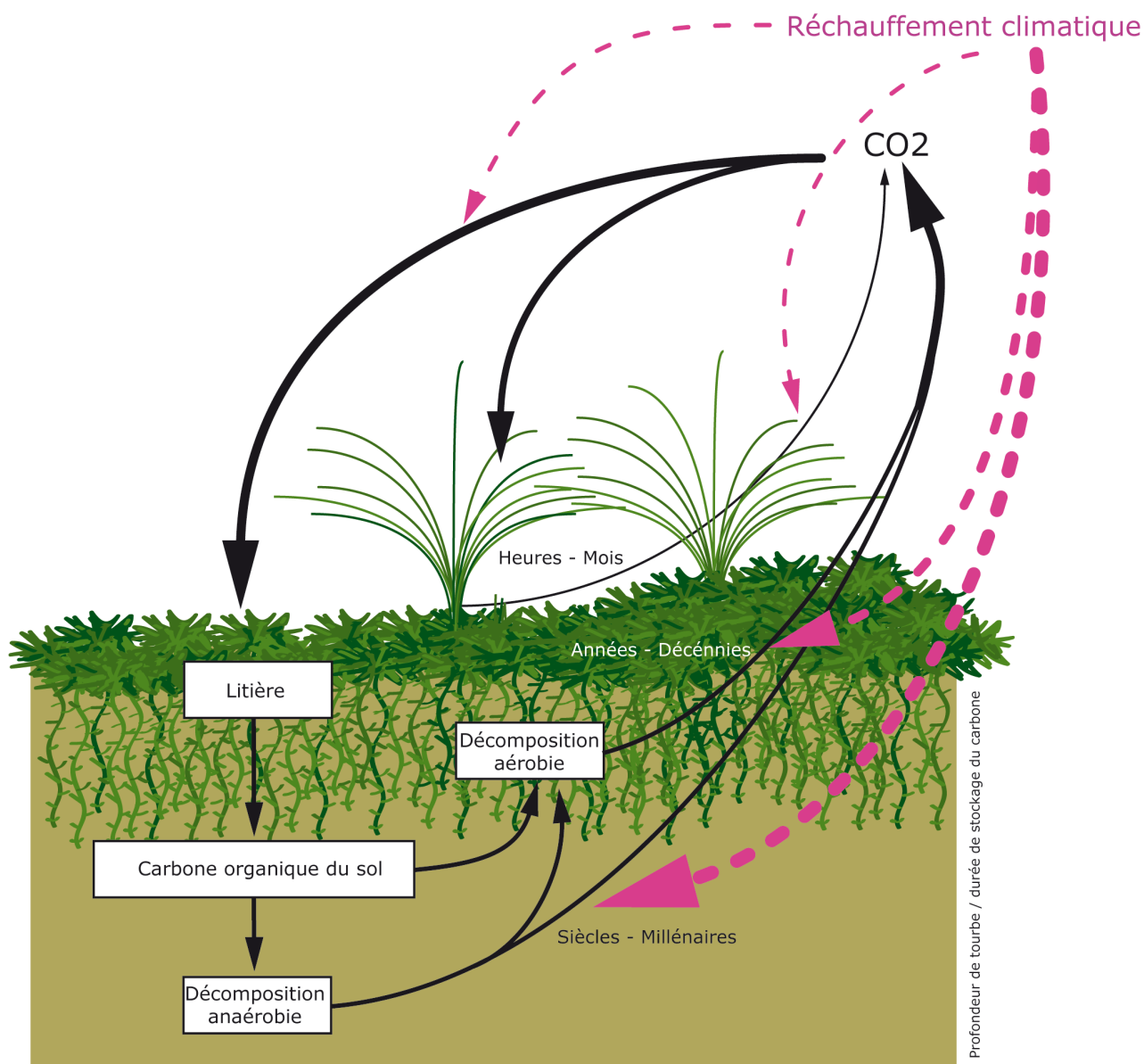


Figure 1.5: Schéma simplifié du cycle du carbone à différentes échelles de temps en tourbières et effets potentiels du réchauffement climatique (d'après Francez, 2000 et Dorrepaal *et al.*, 2009).

Toutefois, assimiler la réponse des microorganismes au réchauffement uniquement à celle des flux de gaz est un peu réducteur compte tenu de la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés microbiennes (Singh *et al.*, 2010). Lorsque l'on tient compte de l'importance des communautés microbiennes dans le fonctionnement des tourbières, il est surprenant de constater que si peu d'études se soient attachées à étudier précisément leur réponse au réchauffement climatique. Quelques études récentes ont tout de même abordé la question. Par exemple, suivant le type de tourbière, il a été observé soit une augmentation, soit une diminution de

l'abondance de certains groupes microbiens comme les amibes à thèque, lorsque la température de l'air augmentait d'environ 2.5°C (Tsyganov *et al.*, 2011a, b). Thormann *et al.* (2004) ont par ailleurs mesuré les taux de décomposition en microcosme de deux litières différentes – une composée de feuilles sénescentes de *Carex aquatilis* et une composée de *Sphagnum fuscum* – à 14 et 20°C. Les auteurs ont ainsi démontré que certains des champignons et bactéries les plus fréquemment isolés dans ces deux types de litières avaient des capacités de décomposition différentes sous un régime de températures élevées, ce qui pourrait se traduire par des rétroactions différentes suivant le type de tourbière considérée.

Les connaissances de l'impact du réchauffement climatique sur les tourbières apparaît donc particulièrement fractionnées et incomplètes. De nombreuses incertitudes demeurent sur les conséquences des changements envisagés en tourbières en raison de l'extrême diversité de ces écosystèmes et des nombreux facteurs biotiques et abiotiques, (incluant leurs interactions) contrôlant le fonctionnement de l'écosystème et le cycle du carbone. Il est également important de préciser que la mesure dans laquelle chaque tourbière est affectée par les changements climatiques dépend aussi d'autres facteurs externes très peu pris en compte (Charman, 2002):

- Les variations saisonnières du climat : dans certaines zones géographiques, les tourbières sont très sensibles aux variations saisonnières du climat. Par exemple, les tourbières en zones tempérées sont en excès d'eau tout au long de l'année, excepté en été. Or, de tels changements peuvent avoir, par exemple, des conséquences importantes sur la végétation, et donc le fonctionnement de l'écosystème (Bragazza, 2008).
- Le type de tourbière : bien que les tourbières présentes dans une même zone géographique soient dépendantes des mêmes conditions écologiques « extérieures », certaines sont plus sensibles que d'autres aux variations saisonnières. Par exemple, une tourbière minérotrophe (bas-marais) qui dépend des ruissellements de surface ou des eaux souterraines est moins dépendante des précipitations directes que les tourbières ombrotrophes (haut-marais) (Tableau 1.1 ; Figure 1.2).

L'étude de l'influence du réchauffement climatique sur les tourbières demeure donc complexe, et requiert une approche multi-variée à différentes échelles de temps et d'espace. De plus, les changements de végétations observés avec le réchauffement climatique sont rarement liés avec les changements au niveau du sol, ou inversement. De ce fait, il est actuellement difficile de savoir si les changements dans les processus de

l'écosystème associés au réchauffement climatique seront apportés par un effet direct sur (i) les microorganismes, (ii) la végétation, (iii) les facteurs abiotiques liés à la tourbe (chimie de l'eau), ou (iv) par des changements dans les interactions entre ces trois compartiments clés (Singh *et al.*, 2010) (Figure 1.6). Il apparaît également nécessaire d'inclure les informations sur la complexité et la diversité des tourbières. Ainsi, en tant qu'intégrateur de l'ensemble des paramètres biotiques et abiotiques à petite (ex. gradient microtopographique) et à grande échelle (ex. gradient haut-bas marais), la prise en compte de l'association « sphaignes – communautés microbiennes » (incluant leurs relations) apparaît plus que pertinente.

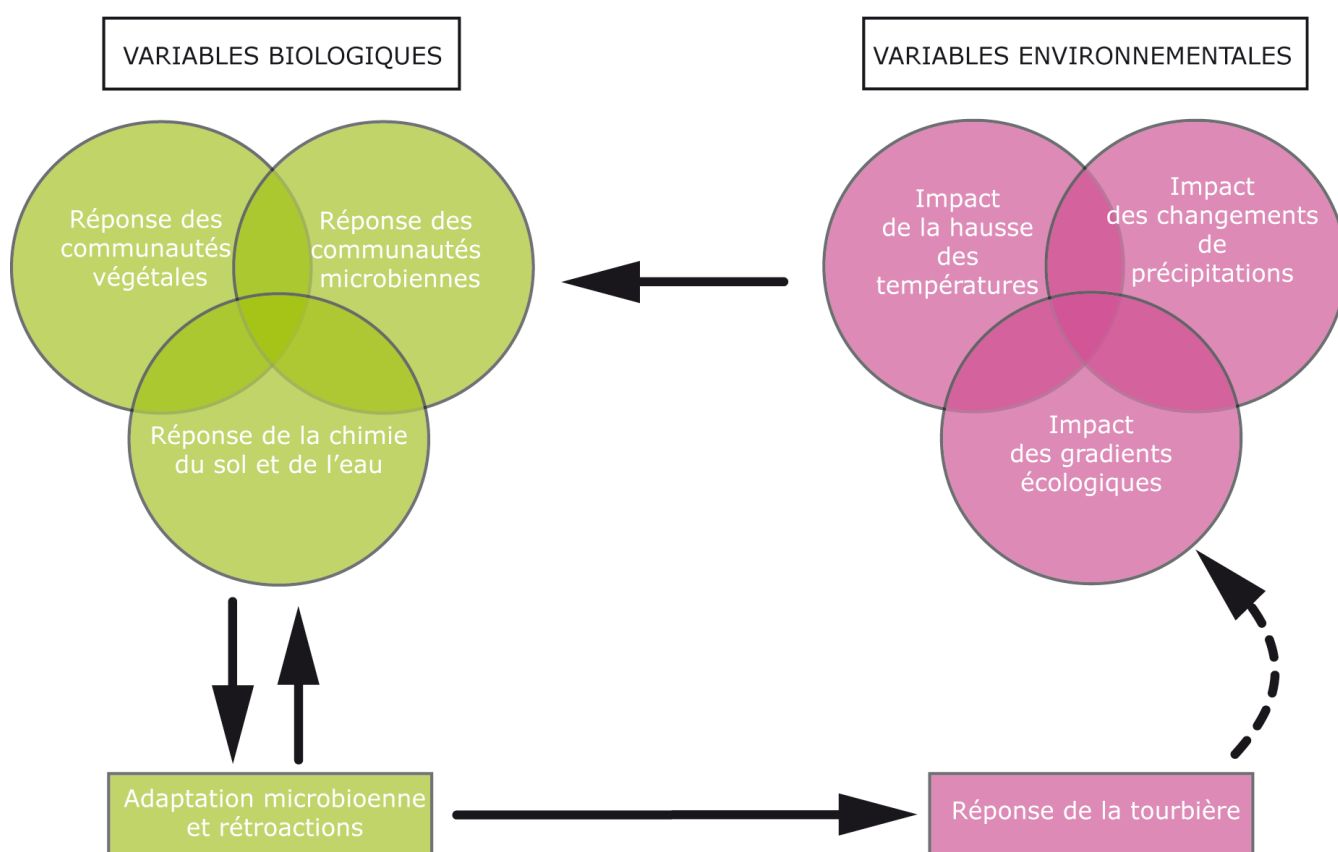


Figure 1.6: Schéma conceptuel représentant les différents facteurs biotiques et abiotiques susceptibles d'être affectés par le réchauffement climatique (adapté de Singh *et al.*, 2010).

2. La bryosphère : un élément essentiel du fonctionnement des tourbières

Depuis plusieurs années, la recherche sur les écosystèmes piégeant d'importantes quantités de carbone, telles que les tourbières, ont souligné le rôle fondamental des bryophytes dans leur fonctionnement (van Breemen, 1995). Les bryophytes sont l'habitat d'une large diversité de communautés microbiennes et autre mésofaune, incluant par exemple les bactéries, les champignons, les rotifères, les nématodes, et autres arthropodes, le tout formant un réseau détritovre complexe (Lindo & Gonzalez, 2010). C'est cet ensemble « bryophyte - microorganismes », que l'on défini comme la bryosphère (Figure 1.7).

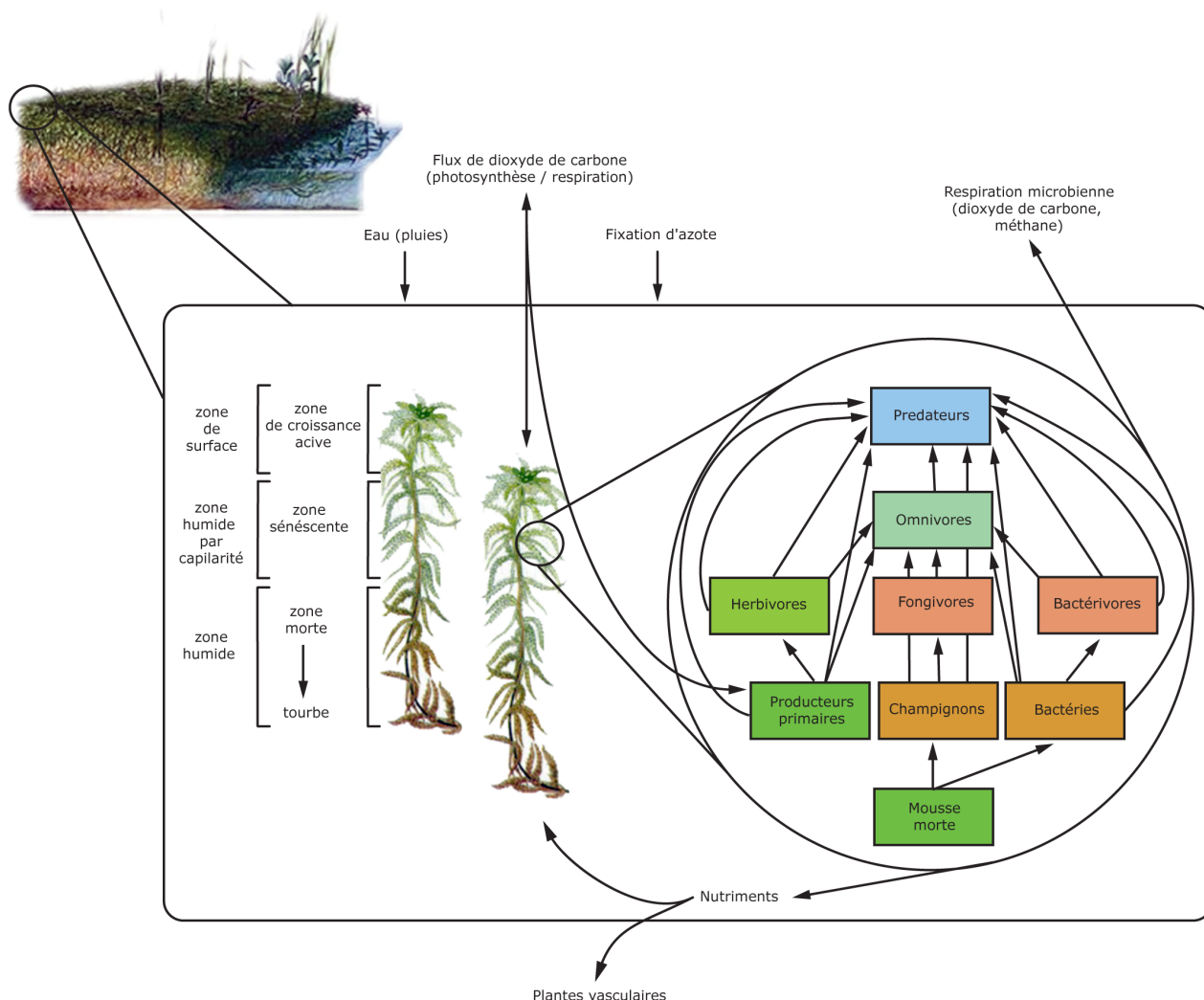


Figure 1.7: Représentation schématique de la bryosphère. Les différentes couleurs caractérisent les groupes fonctionnels microbiens présent dans la bryosphère.

1 Le réseau détritivore de la bryosphère

En raison de la forte acidité régnant dans le milieu, les scientifiques ont longtemps considéré les tourbières comme des habitats dépourvus de toute vie microbienne. Depuis, différentes études ont montré que ce n'était pas le cas (Fisher *et al.* 1998 ; Gilbert *et al.*, 1998 ; Mitchell *et al.*, 2003 ; Gilbert & Mitchell, 2006). La partie supérieure de la tourbe, appelée Acrotelme, se trouve régulièrement placée au dessus de la nappe d'eau, là où les microorganismes peuvent se développer en abondance. Parmi les différents habitats que l'on peut retrouver en tourbière, les sphaignes se révèlent être « l'habitat » renfermant la plus grande diversité de microorganismes : bactéries, cyanobactéries, micro-algues, protistes hétérotrophes, micro-métazoaires et champignons (Hooper, 1981 ; Howell & South, 1981 ; Gilbert *et al.*, 1998 ; Gilbert & Mitchell, 2006) (Figure 1.8). Le capitulum des sphaignes abrite le plus grand nombre d'espèces, les conditions d'oxygénation étant les plus favorables à ce niveau (Searles *et al.*, 1999). Les bactéries hétérotrophes constituent le groupe microbien le plus abondant, formant avec les champignons le groupe des décomposeurs de la matière organique (Fisher *et al.* 1998 ; Thormann *et al.*, 2001 ; Gilbert & Mitchell, 2006). Les micro-algues et les cyanobactéries participent à la production primaire de l'écosystème dans de très faibles proportions comparées aux sphaignes (Gilbert, 1998). Néanmoins, certaines cyanobactéries jouent un rôle important dans les tourbières à travers leur capacité à fixer l'azote atmosphérique, enrichissant ainsi le milieu en nutriments (Gilbert, 1998). Enfin, les protistes hétérotrophes (flagellés, ciliés, amibes à thèque) constituent avec les micro-métazoaires (rotifères et nématodes) le groupe des prédateurs microbiens (Gilbert *et al.*, 1998) (Figure 1.8).

Si les microorganismes interviennent dans la minéralisation de la matière organique et dans la libération du carbone, ils ont aussi un rôle essentiel dans le recyclage des éléments nutritifs au travers de la boucle microbienne (matière organique → bactéries → micro-prédateurs ; Gilbert *et al.*, 1998) (Figure 1.8), et par conséquent dans la croissance des sphaignes et autres végétaux des tourbières. Le réseau trophique microbien a donc un rôle particulièrement important à la fois dans la dynamique du carbone et des nutriments (Gilbert *et al.*, 1998a ; Gilbert & Mitchell, 2006).

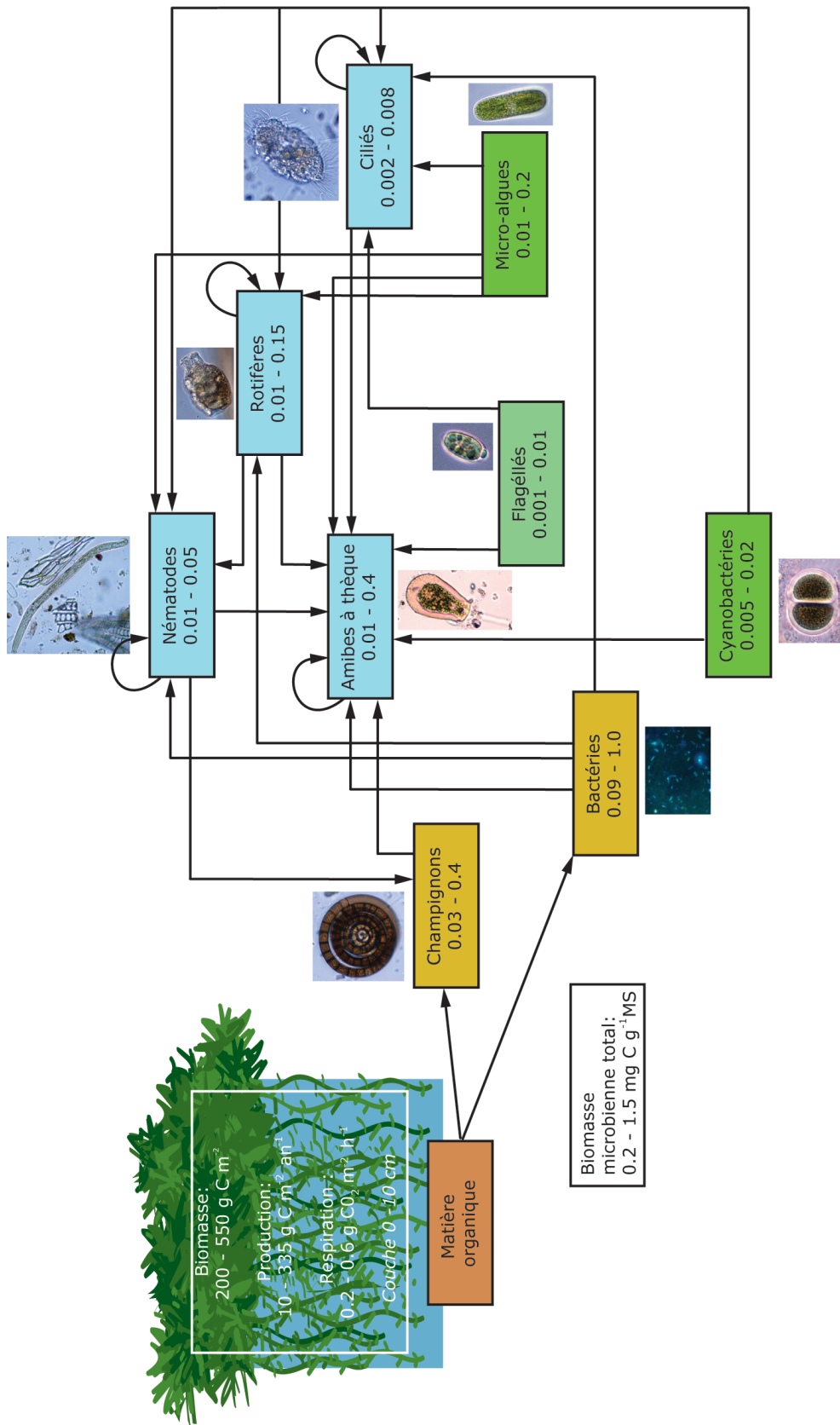


Figure 1.8: Schéma du réseau trophique microbien présent chez la sphaigne (stocks en mg C g⁻¹ MS, sauf indication contraire). La couleur marron clair représente le groupe des décomposeurs, le vert foncé les producteurs primaires, le vert clair les flagellés hétérotrophes et autotrophes et le bleu le groupe des prédateurs (protozoaires et micro-métazoaires) (synthèse d'après Francez, 2000 ; Gilbert *et al.*, 1998 ; Mitchell *et al.*, 2003 ; Gilbert & Mitchell, 2006 ; Dorrepaal *et al.*, 2009).

De plus, ce réseau trophique s'est révélé sensible à différents stress extérieurs. Des changements environnementaux tels que la pollution atmosphérique (plomb, oxyde d'azote, dioxyde de carbone), ou l'ajout de nutriments dans le milieu sont effectivement reconnus pour perturber la structure des différentes communautés microbiennes associées aux bryophytes, et plus particulièrement celles associées aux sphaignes (Gilbert *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; Mitchell et Gilbert, 2004 ; Nguyen-Viet *et al.*, 2004, 2007, 2008 ; Meyer *et al.*, 2010a, b), bouleversant ainsi le réseau alimentaire microbien, et par effet boule de neige, le fonctionnement des écosystèmes. En outre, parmi les différentes communautés microbiennes constituant la boucle microbienne, il s'est avéré que les amibes à thèque répondaient systématiquement à ces différents stress environnementaux (Gilbert *et al.*, 1998; Mitchell & Gilbert, 2004 ; Nguyen-Viet *et al.*, 2008).

Les amibes à thèque sont des eucaryotes unicellulaires, présents dans de nombreux écosystèmes tels que les lacs, les rivières, les tourbières et les sols (Meisterfeld, 2002a, b ; Mitchell *et al.*, 2008 ; Wall *et al.*, 2010a, b). Ce sont des microorganismes de petite taille (entre 20 et 200 μm), abondants (10^3 - 10^4 individus g^{-1} MS en tourbière), et caractérisés par une grande diversité (environ 2000 espèces ont été décrites jusqu'à présent, et on retrouve habituellement entre 10 et 30 espèces par échantillons observés) (Mitchell *et al.*, 2008). Les amibes à thèque construisent leur thèque (enveloppe) à partir de matériaux divers (calcaire, silice, etc.). Certaines d'entre-elles peuvent par exemple former leur thèque à partir d'agglomérats de particules organiques ou minérales trouvées dans leur environnement (Figure 1.9) (Ogden, 1984 ; Mitchell *et al.*, 2008 ; du Chatelet *et al.*, 2010). Les théques construites ont ainsi différentes tailles et morphologies, permettant le plus souvent une identification jusqu'à l'espèce. De plus, les théques se conservent bien dans la tourbe et les sédiments lacustres (Warner, 1987 ; Wall *et al.*, 2010a, b). De ce fait, les amibes à thèque ont une longue histoire en tant que fossiles, puisque des fossiles datant du Néoprotéozoïc, du Crétacé ou encore du Carbonifère ont été retrouvés (Porter & Knoll, 2000 ; Schönborn *et al.*, 1999 ; Charman, 2001). Les thécamoebiens retrouvés dans les sédiments lacustres et dans la tourbe sont par exemple utilisés comme paléo-indicateurs des changements climatiques et environnementaux à échelle locale ou globale (ex. Charman, 2001 ; Anderson *et al.*, 2010 ; Markel *et al.*, 2010 ; Wall *et al.*, 2010b).

La réponse des amibes à thèque aux variations écologiques majeures présentes en tourbières, telles que la différence haut/bas marais et les variations d'humidité, et de chimie de l'eau, ont été mis en évidence depuis longtemps (Heal, 1961, 1962, 1964 ; Schönborn, 1962 ; Bobrov *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 1999, 2000b ; Booth, 2001 ; Lamentowicz & Mitchell, 2005 ; Warner *et al.*, 2007 ; Lamentowicz *et al.*, 2010 ; Sullivan

& Booth, 2011). Des différences subtiles de distribution horizontale et/ou verticale des espèces d'amibes à thèque et de leur abondances ont aussi été enregistrées au sein d'un même micro-habitat, démontrant l'extrême sensibilité de ces microorganismes (Meisterfeld, 1977 ; Mitchell *et al.*, 2000a ; Booth, 2002 ; Mitchell & Gilbert, 2004 ; Sullivan & Booth, 2011).

Par ailleurs, bien que des liens étroits ont été démontrés entre les thécamoebiens et la végétation (Legedanck *et al.*, 2003 ; Carlson *et al.*, 2010) – notamment les bryophytes (Lamentowicz *et al.*, 2010) – les phénols produits et libérés par les sphaignes n'ont jamais été pris en compte en tant que variable environnementale pouvant influencer la structure de la communauté des thécamoebiens. Pourtant, ces composés pourraient se révéler déterminant quant à leur distribution, soit directement via des effets physiologiques, soit indirectement via des effets sur les niveaux trophiques inférieurs. Par ailleurs, la disponibilité des ressources alimentaires peut aussi se montrer déterminante quant à la distribution des amibes à thèque dans leur environnement. En effet, les thécamoebiens sont capables d'ingérer une grande variété de proies (bactéries hétérotrophes, champignons, micro-algues, protistes hétérotrophes et micro-métazoaires) (Gilbert *et al.*, 2000, 2003) (Figure 1.8). Par l'intermédiaire de ce comportement alimentaire, les amibes à thèque constituent un lien trophique clé au sein des communautés microbiennes des sphaignes et dans le cycle des nutriments (Gilbert *et al.*, 1998 ; Wilkinson & Mitchell, 2010). Leur régime alimentaire est plutôt connu de manière globale. Très peu d'espèces ont par exemple été identifiées soit comme généraliste soit comme spécialiste. De plus, différents gabarits caractérisent la communauté des thécamoebiens (Figure 1.9), reflétant probablement différents comportements alimentaires. Or, aucune indication n'a jusqu'à présent été donnée sur la structure trophique de leur communauté. De ce fait, leur dépendance aux proies disponibles est le plus souvent suggérée, plutôt que démontrée.

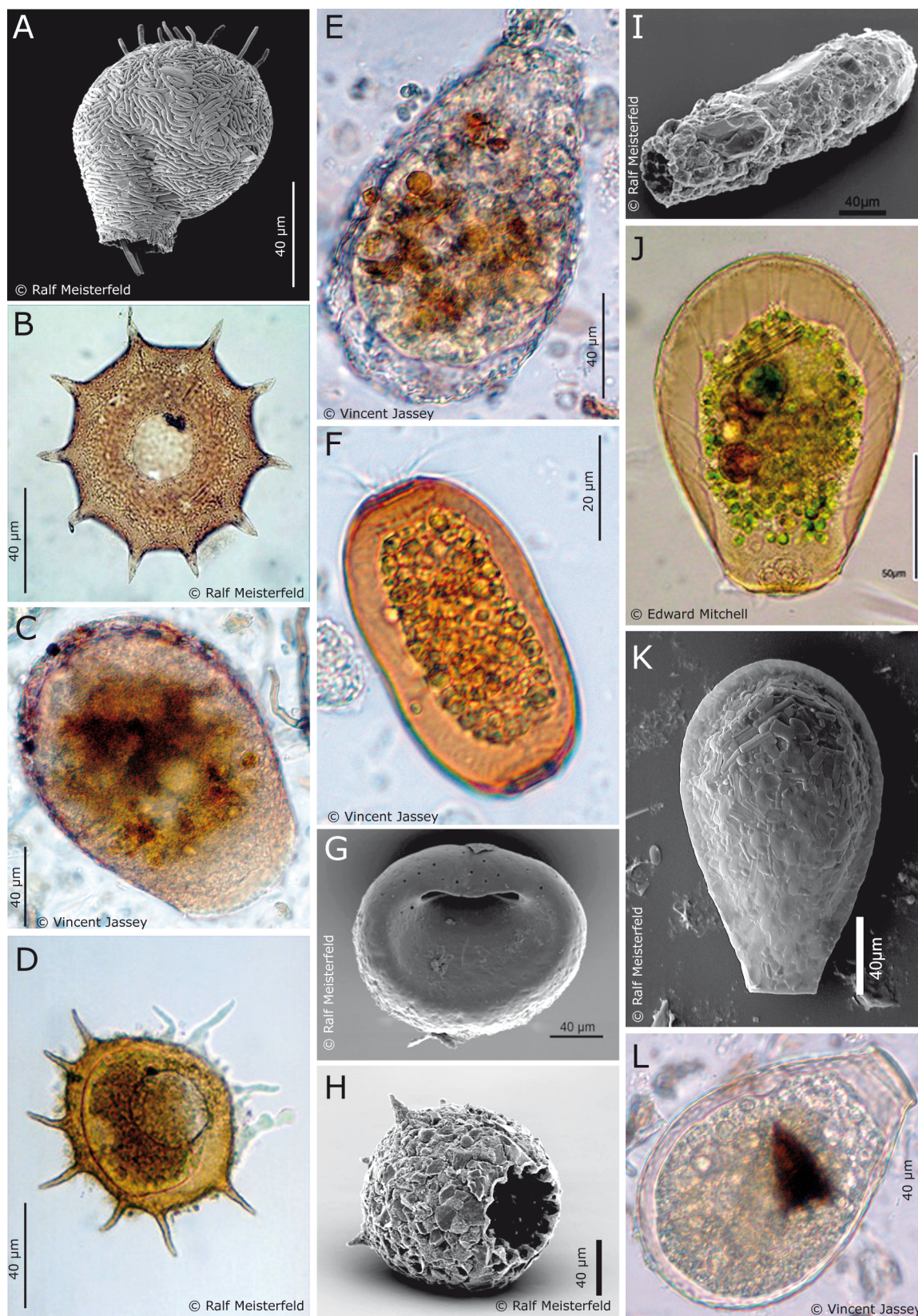


Figure 1.9: Photos par microscopie optique ou électronique de quelques espèces d'amibes à thèque trouvées en tourbières, illustrant la grande variabilité de morphologie de thèques ; (a) *Lesquereusia spiralis hirsuta*, (b) *Arcella dentata*, (c) *Heleopera rosea*, (d) *Centropyxis acuelata*, (e) *Physochilla griseola*, (f) *Archerella flavum*, (g) *Bullinularia indica*, (h) *Diffflugia corona*, (i) *Diffflugia linearis*, (j) *Hyalosphenia papilio*, (k) *Nebela carinata*, (l) *Nebela tincta*. (Meisterfeld & Mitchell, 2008)

2 Les rôles clés de la bryosphère dans le fonctionnement des tourbières

Du fait de sa composition, la bryosphère peut avoir une forte influence sur la structure et la dynamique de nombreux processus éco-systémiques clés attribués aux relations sol – végétation, comme le cycle du carbone ou le recyclage des nutriments (Turetsky, 2003 ; Wardle *et al.*, 2004). En effet, les sphaignes sont adaptées aux conditions d'oligotrophie des tourbières. Dans les interactions « sphaignes – plantes vasculaires », la compétition pour les nutriments favorise les sphaignes au détriment des plantes vasculaires, en raison de la capacité des sphaignes à former des tapis de mousses denses immobilisant les nutriments et à abriter différentes communautés microbiennes impliquées dans le recyclage des nutriments (Rydin, 1997 ; Gilbert & Mitchell, 2006). Les sphaignes contrôlent aussi l'humidité du milieu, par le biais des hyalocystes. Elles contribuent de façon très significative à la productivité primaire de l'écosystème, puisqu'elles représentent par exemple plus de 80% de la biomasse végétale des tourbières (Clymo & Hayward, 1982 ; Rydin & Jeglum, 2006). Enfin, la bryosphère contrôle également la chimie de l'eau et du sol via (i) la libération de composés organiques par les sphaignes (acide uronique, composés phénoliques) et (ii) l'activité des communautés microbiennes (van Breemen, 1995 ; Gilbert & Mitchell, 2006).

La capacité des sphaignes à créer un environnement propice à leur survie et à maintenir cet environnement demeure une préoccupation majeure depuis de nombreuses années (Clymo & Hayward, 1982 ; van Breemen, 1995). La nature poikilohydrique et les cycles de dessiccations des sphaignes sont en effet importants pour la dynamique des nutriments au sein de l'écosystème, mais également pour la dynamique des communautés floristiques et microbiennes qu'elles soutiennent (Rydin & Jeglum, 2006). Le rôle des composés organiques, tel que les composés phénoliques, produits par les sphaignes restent mal connus dans les interactions potentielles « sphaignes – milieu environnant » (Verhoeven & Liefveld, 1997 ; Michele *et al.*, 2011). Les composés phénoliques ont pourtant un rôle majeur dans la séquestration du carbone, grâce à leurs propriétés à la fois récalcitrantes et potentiellement inhibitrices des activités microbiennes (Verhoeven & Toth, 1995 ; Verhoeven & Liefveld, 1997). Peu d'études réalisées en tourbières ont testé les interactions entre les microorganismes associés aux sphaignes et les polyphénols excrétés passivement et (ou) activement par les sphaignes. Or, ces composés phénoliques sont susceptibles de jouer un rôle dans la dynamique des populations et (ou) des communautés microbiennes, et par conséquent dans le fonctionnement des tourbières.

3. Les composés phénoliques (ou polyphénols) des sphaignes

Les végétaux sont capables de synthétiser des substances biochimiques très diversifiées. En parallèle aux métabolites primaires (glucides, protides, lipides, acides nucléiques, etc) nécessaires aux activités fondamentales des plantes (croissance, développement, reproduction), celles-ci accumulent en parallèle des métabolites dits secondaires. Les trois familles principales sont les alcaloïdes, les terpènes et les phénols (Chiapusio *et al.*, 2005 ; Macheix *et al.*, 2005). Le terme « secondaire » est cependant inapproprié car ces composés peuvent jouer des rôles fondamentaux chez les végétaux, par exemple dans la protection de la plante face aux différents stress environnementaux (Dixon & Pavaï, 1995 ; Macheix *et al.*, 2005).

Les phénols constituent un groupe universel très diversifié avec plusieurs milliers de composés. Parfois très complexes, ils se matérialisent par la présence d'un ou plusieurs cycles benzéniques portant un (les phénols) ou plusieurs groupements hydroxyle (les polyphénols) dans leurs fonctions dérivatives (Hättenschwiler & Vitousek, 2000 ; Figure 1.10). Les composés phénoliques se distinguent ainsi en plusieurs classes, suivant la complexité de leur squelette de base (Tableau 1.2)¹.

Les physiologistes et les biochimistes ont caractérisé les voies de biosynthèse, la diversité et les rôles des composés phénoliques chez les végétaux vasculaires, même si beaucoup d'aspects restent encore à découvrir du fait de leur grande diversité. L'étude de ces composés a néanmoins permis de développer leurs utilisations dans de nombreux domaines. Leurs propriétés anti-oxydantes expliquent qu'ils aient des applications en pharmacologie. L'industrie agroalimentaire s'est aussi intéressée à ces composés en utilisant par exemple les anthocyanes comme colorant alimentaire d'origine naturelle (Macheix *et al.*, 2005). Le rôle de ces composés reste par ailleurs peu étudié en écologie des tourbières. Il est en effet difficile de mettre en évidence des relations de causes à effets parmi les multiples facteurs écologiques impliqués dans le fonctionnement de ces écosystèmes.

¹Les termes « composés phénoliques », « phénols » et « polyphénols » utilisés ici désigneront indifféremment des molécules possédant un noyau aromatique sur lequel est fixé un ou plusieurs groupements hydroxyles.

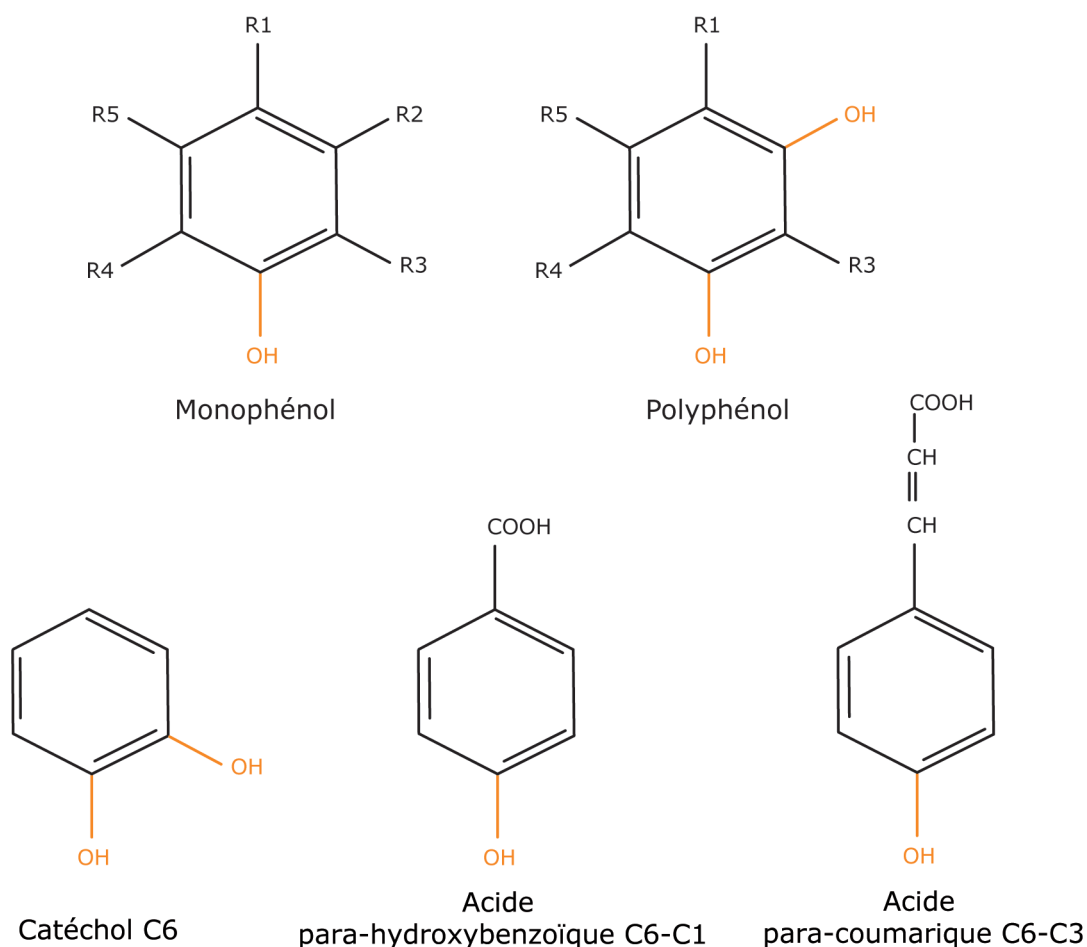


Figure 1.10: Distinction entre monophénol et polyphénol et trois exemples de composés phénoliques simples en C6.

Tableau 1.2: Différentes classes de composés phénoliques (D'après Macheix *et al.*, 2005)

| Squelette carboné | Classes | Exemples |
|----------------------|--|------------------------|
| C6 | Phénols simples | Epices |
| C6-C1 | Acides hydroxybenzoïques | Fraises |
| C6-C3 | Acides hydroxycinnamiques, Coumarines | Pomme de terre |
| C6-C4 | Naphtoquinones | Noix |
| C6-C2-C6 | Stilbènes | Vigne |
| C6-C3-C6 | Flavonoïdes | Fruits, Fleurs,... |
| (C6-C3) _n | Lignines | Bois, noyau des fruits |
| (C15) _n | Tannins | Raisin rouge |

Pourtant, de nombreuses espèces végétales ayant un rôle dans les écosystèmes via les composés phénoliques ont été révélées (Chiapusio *et al.*, 1997 ; Souto *et al.*, 2000, 2001 ; Wallstedt *et al.*, 2005 ; Brathen *et al.*, 2010 ; Ibanez *et al.*, 2010). Il existe toutefois des familles végétales plus étudiées que d'autres. Très peu de travaux portant sur les végétaux non vasculaires comme les bryophytes ont été recensés, contrairement aux plantes vasculaires (Ptéridophytes, Gymnospermes et Angiospermes). C'est pourquoi, afin de comprendre l'importance et l'utilité de ces composés chez la sphaigne, il est nécessaire dans un premier temps de résumer quelques généralités quant au rôle des polyphénols chez les plantes vasculaires, avant de présenter dans un second temps les composés phénoliques des sphaignes.

1 Les polyphénols des plantes vasculaires

a) Voie de biosynthèse

Chez les végétaux vasculaires, la voie principale de biosynthèse des polyphénols dérive du métabolisme primaire via des molécules charnières comme l'acide shikimique (Figure 1.11). La voie du shikimate permet d'une part la synthèse de deux acides aminés majeurs, la phénylalanine et la tyrosine, permettant la synthèse de composés phénoliques (Hattenschwiler & Vitousek, 2000 ; Macheix *et al.*, 2005). D'autre part, une autre voie mettant en jeu l'acétylco-enzyme A, issu de la photosynthèse, permet la formation d'acétates et de malonates, puis *in fine* des composés phénoliques. Des liens étroits existent donc entre le métabolisme primaire (photosynthèse et respiration) et la production de métabolites secondaires. Des réactions comme des méthylations, des oxydations, et des polymérisations permettent également la synthèse de composés plus complexes telle que la lignine, propre aux végétaux vasculaires (Macheix *et al.*, 2005). Suivant leurs propriétés chimiques, les phénols peuvent être plus ou moins hydrosolubles, et ainsi être localisé à différents niveaux cellulaires, soit dans les vacuoles pour les composés les plus hydrosolubles (souvent glycosylés), soit au niveau des parois, liés aux structures lipidiques, pour les composés plus hydrophobes (Macheix *et al.*, 2005).

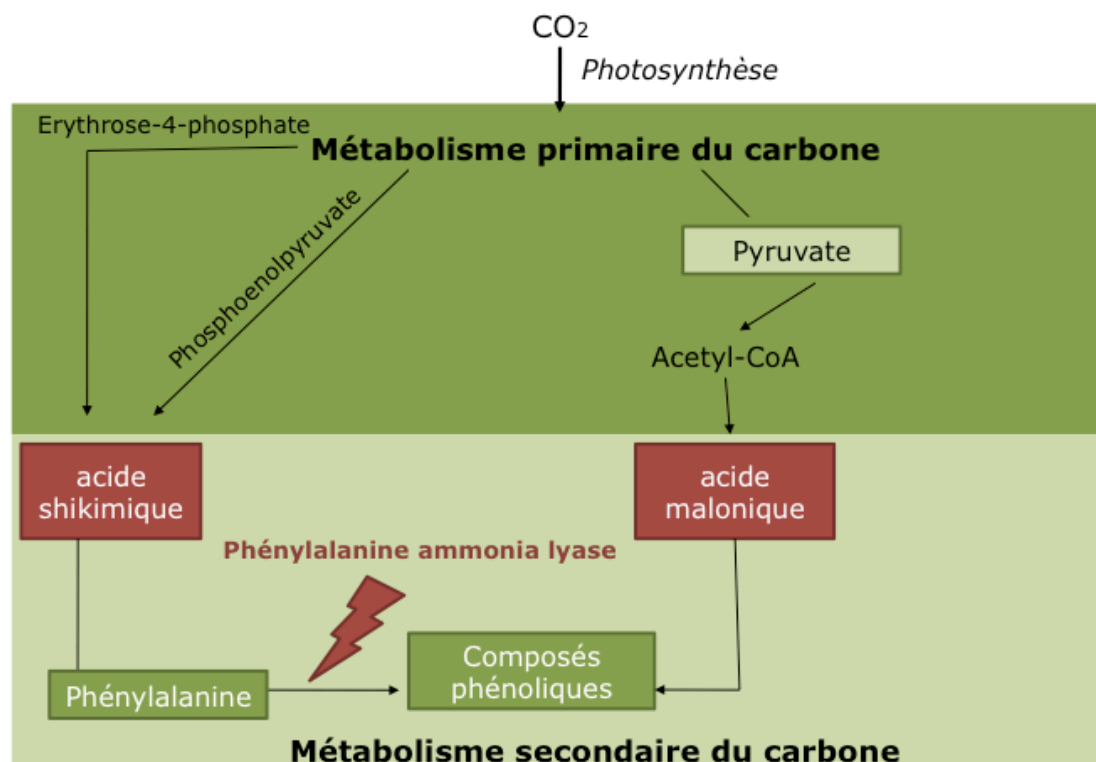


Figure 1.11: Schéma de la voie de synthèse des composés phénoliques chez les plantes supérieures (voie du shikimate).

b) Ecologie chimique : influence de l'environnement sur le métabolisme phénolique et influence des composés phénoliques dans l'environnement

Les concentrations en composés phénoliques chez les végétaux peuvent être très variables (Chiapusio *et al.*, 2005). Bien que la majorité des plantes produisent des phénols communs comme des acides caféiques, féruliques, ou coumariques, il existe une grande variabilité quant aux groupes majoritaires de polyphénols synthétisés chez les végétaux et leur répartition. Par exemple, les anthocyanes sont dominants chez *Arabidopsis* (Appel, 2001). Chez l'*Epicea*, certains tanins condensés sont rencontrés en quantité plus importante dans les racines que dans les aiguilles, alors que les acides phénoliques sont retrouvés préférentiellement dans les parties foliaires (Gallet & Lebreton, 1995 ; Hättenschwiller & Vitousek, 2000).

Le rôle des composés phénoliques au sein des écosystèmes peut aussi varier en fonction des facteurs écologiques (variations saisonnières et autres gradients écologiques), d'où la difficulté supplémentaire de mettre en évidence leur rôle dans les écosystèmes (Inderjit, 1996 ; Blanco, 2007). Différents facteurs environnementaux peuvent en effet agir dans l'espace et dans le temps sur la production de phénols rendant ainsi le métabolisme phénolique très sensible aux changements environnementaux

(Souto *et al.*, 2000, 2001 ; Chiapusio *et al.*, 2005). Par exemple, certaines plantes présentent une baisse de leur métabolisme phénolique lorsque les nutriments se font plus rares, favorisant le métabolisme primaire (ex. la croissance) au détriment du métabolisme secondaire (Lattanzio *et al.*, 2009). Des réponses identiques ont été démontrées pour divers stress environnementaux telle qu'une augmentation des concentrations en dioxyde de carbone atmosphérique ou de la température de l'air (Mattson *et al.*, 2005 ; Veteli *et al.*, 2007). Les phénols participent également à la défense des plantes contre les métaux lourds (Bialónska *et al.*, 2007) ou les rayonnements UV-B (Spitaler *et al.*, 2008). En effet, des composés comme les flavones et les flavonols localisés dans les cellules les plus externes des feuilles, réduisent la pénétration des UV au niveau du mésophylle foliaire, et expliquent donc l'adaptation des plantes alpines à des altitudes élevées, où le rayonnement UV-B est plus important (Waterman *et al.*, 1994). D'autres études, par exemple, au sein des écosystèmes méditerranéens ou boréaux, ont montré que les phénols expliquaient dans les associations et dynamiques végétales de ces écosystèmes (Gallet *et al.*, 1999 ; Wallstedt *et al.*, 2005), mais aussi sur les microorganismes des sols, comme les mycorhizes, les bactéries ou les activités enzymatiques extracellulaires (Wetzel, 1992 ; Souto *et al.*, 2000, 2001; Macheix *et al.*, 2005).

De part leur localisation dans la plante et leur grande diversité, les polyphénols peuvent également ne pas avoir le même rôle. Ainsi chez les végétaux vasculaires, ils contribuent par exemple à la défense des végétaux face aux herbivores dans les feuilles (Leitner *et al.*, 2005) et aux organismes pathogènes, à l'établissement de symbiose dans les racines (Gàlis *et al.*, 2004) (Figure 1.12). Les polyphénols jouent donc des rôles différents chez les végétaux, et leurs variations peuvent avoir un impact sur le fonctionnement des écosystèmes. Toutefois, en raison de leur grande complexité et diversité, il est souvent difficile d'identifier les composés impliqués dans les processus écologiques (ex. Wallstedt *et al.*, 2002, 2005). C'est pourquoi la méthode de dosage globale de composés phénoliques (méthode de Folin-Ciocalteu) est le plus souvent utilisée.

Les études concernant les phénols issus des végétaux non vasculaires, telles que les sphaignes, se font beaucoup plus rares (ex. Michele *et al.*, 2011). Leur production est souvent très faible par rapport aux plantes vasculaires. Par exemple les concentrations en phénols totaux enregistrées dans la tourbe sont d'environ 2 mg/g, contre, respectivement, 108 et 70 mg/g dans les feuilles de myrtilles et les aiguilles d'épicéas (Gallet & Lebreton, 1995 ; Djurdjévic *et al.*, 2003).

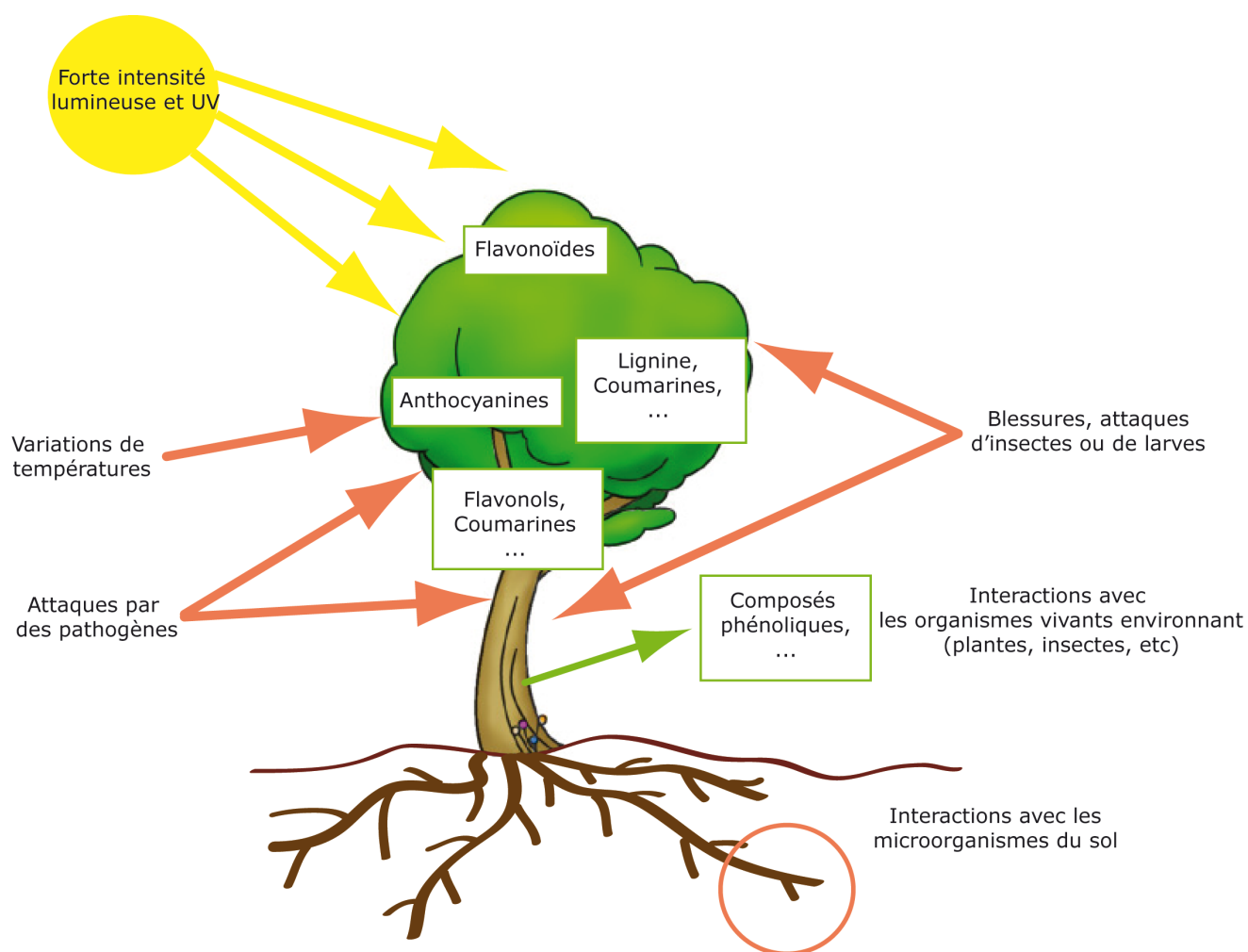


Figure 1.12: Schéma des différents rôles connus des composés phénoliques chez les végétaux (Adapté de Dixon & Paivai 1995).

2 Les composés phénoliques des bryophytes du genre *Sphagnum*

Bien que les voies de biosynthèse des composés phénoliques soient encore mal connues chez les bryophytes, elles font intervenir également la voie shikimate, et donc la phénylalanine, comme les Gymnospermes et les Angiospermes (Wilschke *et al.*, 1989 ; Zinsmeister & Mues, 1990).

Comme pour les végétaux vasculaires, une grande diversité de composés phénoliques existerait chez les bryophytes, différenciée en plusieurs classes : les acides phénoliques comme l'acide hydroxybenzoïque ou les dérivés bibenzyls. Les composés plus complexes, comme la lignine, seraient absents, et d'autres composés phénoliques participeraient alors à la rigidité des parois cellulaires.

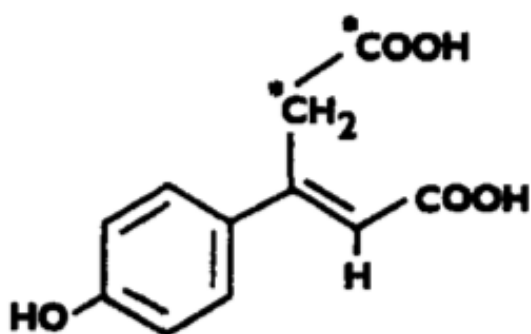


Figure 1.13: Acide sphagnique (Rasmussen *et al.*, 1996)

Chez la sphaigne, différentes études biochimiques ont permis de mettre en évidence la présence de polyphénols spécifiques. Par exemple, l'étude de la composition chimique de la sphaigne (*Sphagnum magellanicum*), Czapek (1899) a mis en évidence une molécule responsable de la coloration rouge de *S. magellanicum* – la sphagnorubine – sans toutefois déterminer sa composition exacte. Puis l'évolution des techniques et de la chimie a permis d'identifier différents composés spécifiques à la sphaigne tel que l'acide p-hydroxy- β -(carboxyméthyl)-cinnamic, ou acide sphagnique (Figure 1.13). Certains flavonoïdes et acides phénoliques communs, tel que les acides p-coumarique, p-hydroxybenzaldehyde, p-hydroxybenzoïque, vanilliques (4-hydroxy-3-méthoxybenzoïque) et ferullique (trans-4-hydroxy-3-méthoxy-cinnamic) ont aussi été observés (Tutschek & Rudolph, 1971 ; Tutschek, 1979 ; Rudolph & Samland, 1985 ; Wilschke, 1989 ; Djurdjevic *et al.*, 2003 ; Opelt *et al.*, 2007).

Par ailleurs, des variations inter- et intra-spécifiques ont été enregistrées chez la sphaigne (Rasmussen *et al.*, 1995a, b ; Verhoeven & Liefveld, 1997 ; Opelt *et al.*, 2007). Par exemple *S. magellanicum* a des concentrations en acide coumarique plus élevées que *S. fallax* (Figure 1.14a). Opelt *et al.* (2007) ont également démontré que des variations pouvaient exister lorsque les sphaignes étaient dans des milieux différents (Figure 1.14b). Enfin, Rudolph & Samland (1985) ont enregistré des variations de l'acide sphagnique chez *S. magellanicum*, avec une décroissance des concentrations entre le capitulum et les tiges de la sphaigne.

Le genre *Sphagnum* produit à la fois des composés phénoliques très récalcitrants (liés aux parois) et moins récalcitrants solubles dans l'eau, tel que l'acide sphagnique (Rasmussen *et al.*, 1996). Les formes récalcitrantes sont généralement présentes dans les zones anaérobiques de la tourbe suite à une accumulation au cours du temps (Djurdjevic *et al.*, 2003), contrairement aux formes solubles que l'on retrouve plutôt en conditions aérobiques, là où les microorganismes sont les plus actifs.

a) Rôle des composés phénoliques dans la relation « sphaignes – microorganismes »

Les études mettant en relation les microorganismes impliqués dans le recyclage des nutriments et du carbone et les polyphénols sont quasiment inexistantes. En effet, la fonction des métabolites secondaires produit par les sphaignes dans le fonctionnement des tourbières demeure non élucidée à l'heure actuelle, même si des observations ont suggéré leur rôle écologique potentiel. Par exemple, il est reconnu que « presque aucun organisme vivant ne consomme directement de sphaignes » (Clymo & Hayward, 1982). Il a également été observé que les microorganismes ne dégradent pas directement les mousses des tourbières. La composition chimique de la tourbe à sphaigne, et notamment la présence de composés phénoliques, est en effet reconnue comme possédant un impact certain sur la décomposition (Verhoeven & Toth, 1995). Malgré cela, le rôle direct que peuvent avoir les composés phénoliques des sphaignes reste encore mal connu.

Les composés liés à la sphaigne

L'existence de polymères phénoliques (réseau complexe de phénols) liés à la sphaigne a été détectée par rayons X. Bien que leur composition chimique exacte reste encore à démontrer, l'acide sphagnique est supposé être le constituant de base de ces polymères. La fonction de ces polymères serait semblable à celle de la lignine chez les plantes vasculaires (Verhoeven & Liefveld, 1997). La dégradation de l'acide sphagnique est en effet connue pour donner des composés moins solubles (par exemple la cétone p-hydroxyacetophenone et l'acide p-hydroxybenzoïc), généralement liés aux parois cellulaires de la sphaigne.

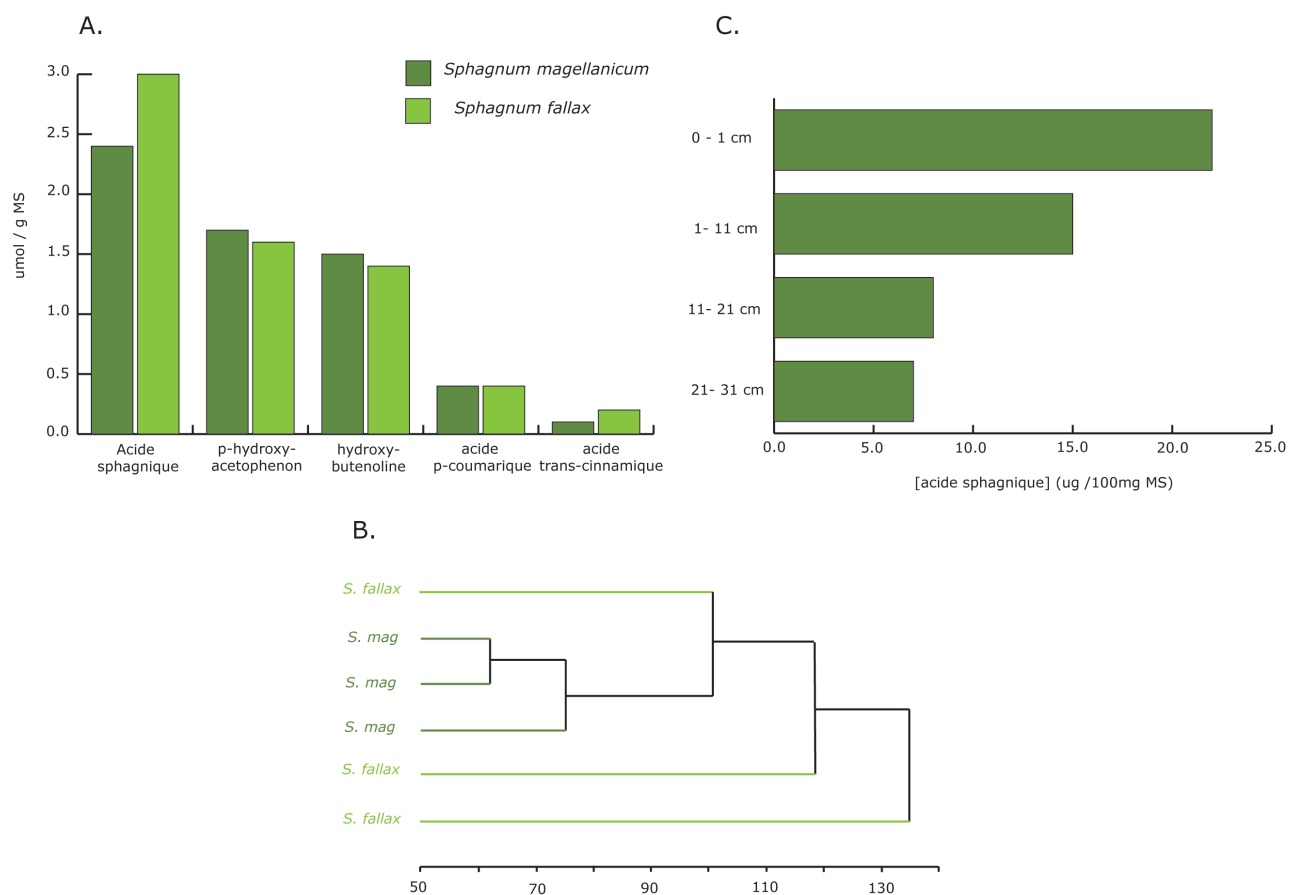


Figure 1.14: (a) Concentrations des différents composés phénoliques mis en évidence chez *S. fallax* et *S. Magellanicum* (adapté de Verhoeven & Liefveld, 1997). (b) Dendrogramme mettant en évidence les différences qualitatives et quantitatives entre *S. fallax* et *S. magellanicum* (Opelt *et al.*, 2007). (c) Concentrations en acide sphagnique dans différents segments de *S. magellanicum* (Rudolph & Samland, 1985).

Ainsi, les polymères phénoliques incorporés aux parois cellulaires de la sphaigne, tels que les acides p-hydroxyacetophenone et p-hydroxybenzoïque forment un réseau difficilement franchissable pour les microorganismes actifs dans les premières étapes de la dégradation de la matière organique, particulièrement pour les champignons (Tsuneda *et al.*, 2001). De plus, les phénols incorporés aux parois cellulaires sont aussi résistants à la plupart des dégradations enzymatiques, telles que les activités hydrolases ou β -glucosidases (Nimz & Tutschek, 1977 ; Tutschek, 1979 ; Wilschke *et al.*, 1989 ; Rasmussen *et al.*, 1995a, b).

Les composés phénoliques libérés par la sphaigne

Compte-tenu des caractéristiques anatomiques et morphologiques de la sphaigne (Figure 1.1), les phénols hydrophiles sont susceptibles d'être facilement libérés par la sphaigne, et ainsi d'interagir avec les différents composants du milieu environnant les sphaignes, notamment les microorganismes. Les acides phénoliques ayant un fort caractère hydrophile, par exemple l'acide sphagnique (Rasmussen *et al.*, 1995a, b), sont en effet excrétés dans le milieu environnant la sphaigne, où ils peuvent avoir des actions inhibitrices et (ou) excitatrices sur les différents microorganismes impliqués dans le processus de décomposition (Verhoeven & Liefveld, 1997). Les extraits de sphaigne se sont ainsi révélés « toxiques » pour les bactéries, démontrant un effet inhibiteur sur leur activité (Banerjee & Sen, 1979 ; Mellagard *et al.*, 2009). Des effets antifongiques sont également reconnus, mais à ce jour aucun composé spécifique n'a été mis en évidence (Verhoeven & Liefveld, 1997 ; Opelt *et al.*, 2007). Malgré ces incertitudes, une indication forte de l'effet inhibiteur des extraits de sphaigne a été démontré par Verhoeven & Toth (1995), qui a comparé en microcosmes la dégradation d'une litière à sphaigne (*S. fallax*) d'une à carex (*Carex diandra*). Premièrement, les auteurs ont remarqué que la litière dominée par les sphaignes se décomposait plus lentement que celle dominée par le carex. Deuxièmement, suite à l'addition d'un homogénat de capitulum de sphaigne, les auteurs ont observé que la décomposition des deux types de litières était considérablement ralentie, alors que l'ajout d'un homogénat de feuilles de carex n'avait aucun effet sur la dégradation. Cette étude a donc conduit les auteurs à supposer que les composés phénoliques solubles dans l'eau avaient un fort effet inhibiteur sur la décomposition. Les auteurs ont également supposé que cet effet était principalement dû à l'acide sphagnique (Figure 1.15).

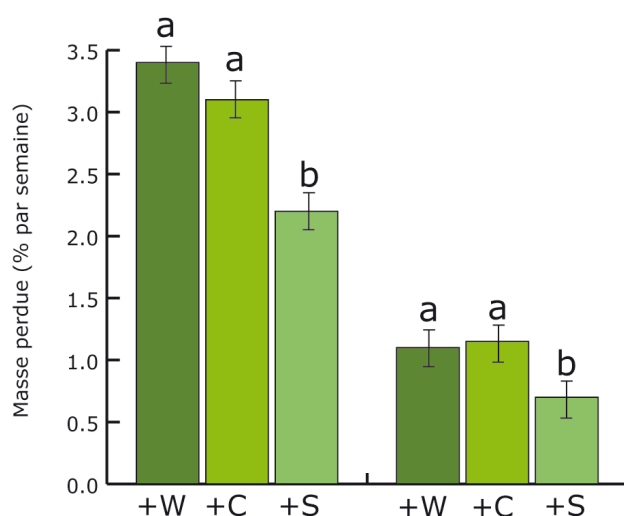


Figure 1.15: Effet d'un ajout d'eau distillé (+W), d'homogénats de feuilles de Carex (+C) et de capitulum de sphaigne (+S) sur la décomposition d'une litière à Carex (d'après Verhoeven & Toth, 1995).

Finalement, les polyphénols produits, stockés et (ou) libérés par les sphaignes forment une barrière physicochimique importante pour les microorganismes impliqués dans la décomposition de la matière organique morte, et donc le fonctionnement de l'écosystème (Figure 1.16). Cependant, ces effets n'ont été mis en évidence qu'en laboratoire, et les relations de causalité ne sont toujours clairement identifiées. De plus, il n'y a aucune donnée disponible sur les concentrations en phénols totaux chez la sphaigne, retrouvés dans l'eau et susceptibles d'agir directement. Les études réalisées *in situ* sont plus globales, et se focalisent plutôt sur les activités enzymatiques liées à la dégradation de la matière organique dans la tourbe. Une activité inhibitrice des polyphénols libérés par les sphaignes a en effet été observée sur l'activité des enzymes hydrolases, comme les enzymes sulphatases, phosphatases ou β -glucosidases (Wetzel, 1992 ; Freeman *et al.*, 1993, 2001a). C'est dans ce contexte qu'une relation clé a été observée : la relation polyphénol – phénoloxydase ; les activités phénoloxydases étant la seule famille d'enzymes extracellulaires capables de dégrader les polyphénols présents dans le milieu (Baldrian, 2006 ; Sinsabaugh, 2010).

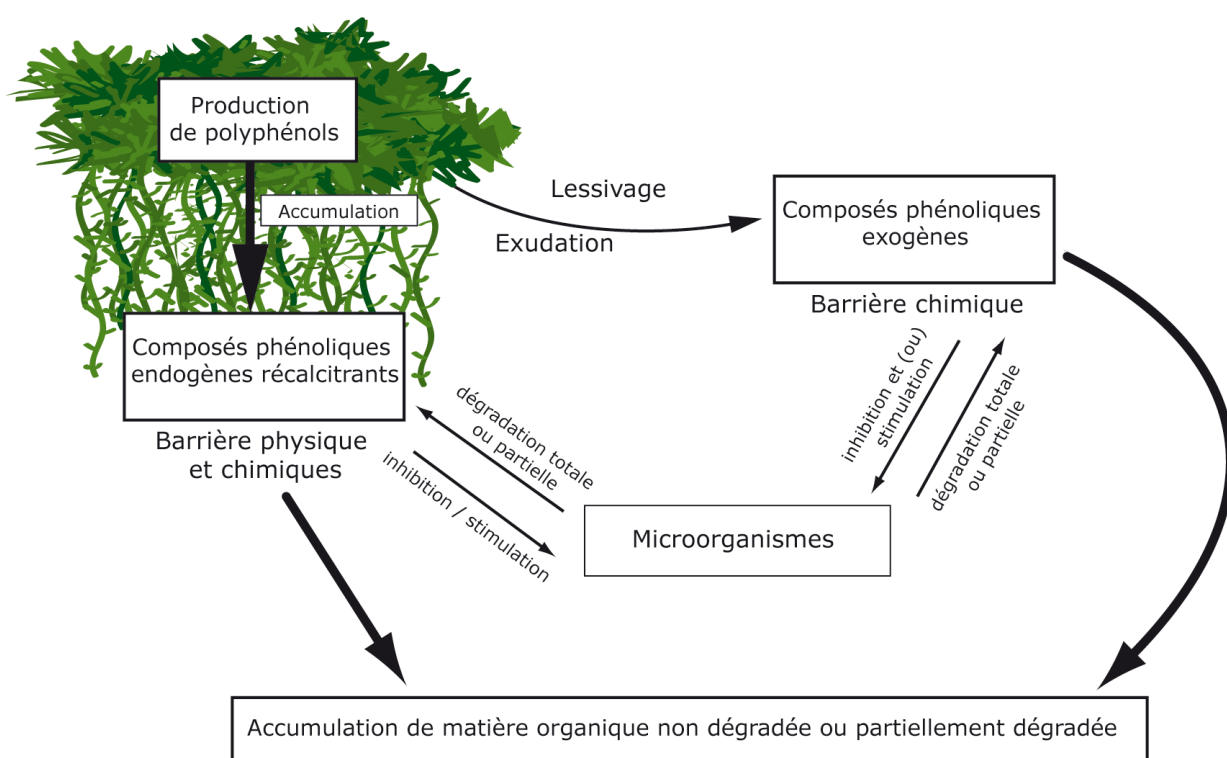


Figure 1.16: Schéma de la barrière physicochimique induite par les composés phénoliques produits et/ou libérés par la sphaigne.

3 Les enzymes phénoloxydases

Les enzymes jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement des sols. Certains composés du sol tels que les polyphénols (lignine, tannins) sont difficilement dégradables par les microorganismes du sol. De ce fait, certains décomposeurs possèdent une activité enzymatique extracellulaire afin d'atteindre ces composés plus récalcitrants. (Gobat *et al.*, 2010). Parmi ces enzymes extracellulaires, les enzymes de la famille des phénoloxydases sont les seules enzymes capables de dégrader partiellement ou totalement les composés phénoliques des sols. Majoritairement synthétisées par les champignons, les phénoloxydases regroupent plusieurs familles d'enzymes qui réalisent une transformation oxydative des composés phénoliques (Baldrian, 2006 ; Sinsabaugh, 2010). Les phénoloxydases représentent donc un élément essentiel du cycle du carbone en dégradant les polymères phénoliques récalcitrants, tels que les tannins ou les pigments bruns que l'on retrouve dans les litières forestières.

Plusieurs catégories d'enzymes sont regroupées sous le terme phénoloxydase. On distingue communément les phénoloxydases O₂ dépendantes, dans lesquelles se classe principalement les laccases et les tyrosinases, et les peroxydases H₂O₂ dépendantes (Duran & Esposito, 2000 ; Sinsabaugh, 2010) (Tableau 1.3).

Tableau 1.3: Distinction entre peroxydases et phénoloxydases (D'après Duran & Esposito, 2000; Baldrian, 2006; Sinsabaugh, 2010)

| Oxydation des composés phénoliques | Dégradation de polymères phénoliques |
|------------------------------------|---|
| Peroxydases | Catalyse de réactions redox entre les peroxydases et les phénols au moyen de l'eau oxygénée |
| Phénoloxydases | Catalyses l'oxydation de composés phénoliques au moyen de l'oxygène Ortho-hydroxylation de monophénols et oxydation d'ortho-diphénols en ortho-quinones (Tyrosinases) Oxydation de mono, di-, et polyphénols (Laccases) |

a) Les peroxydases

Les peroxydases sont abondantes dans les sols. Elles sont produites à la fois par les plantes, les champignons saprophytes (basidiomycètes ou ascomycètes) et certains champignons mycorrhiziens (Criquet *et al.*, 2000a, b, 2001 ; Duran & Esposito, 2000 ; Read *et al.*, 2005; Alarcon-Guitérrez *et al.*, 2009 ; Sinsabaugh, 2005, 2010). Ces enzymes catalysent des réactions d'oxydoréduction entre le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou un peroxyde organique, et des phénols (Sinsabaugh, 2010). Les réactions d'oxydoréduction des peroxydases engendrent le plus souvent des radicaux aromatiques très réactifs. Deux sous-classes principales de peroxydases ont été mises en évidence : les manganèse-peroxydases et les lignine-peroxydases. Les manganèse-peroxydases oxydent les composés phénoliques via le manganèse, tandis que les lignine-peroxydases oxydent les liaisons carbones entre les unités phénylpropane de la lignine (Sinsabaugh, 2010).

Généralement, ces enzymes sont synthétisés en réponse à un stress oxydatif (Rabinovich *et al.*, 2004). Elles sont également produites en réponse aux variations de composés phénoliques dans le milieu, et jouent, par conséquent, un rôle important dans le cycle du carbone (Alarcon-Guitérrez *et al.*, 2009 ; Sinsabaugh, 2010).

b) Les phénoloxydases

Les phénoloxydases sont des métalloprotéines contenant du cuivre. Contrairement aux peroxydases qui utilisent H₂O₂ comme accepteur d'électrons, les phénoloxydases catalysent l'oxydation de composés phénoliques au moyen de l'oxygène moléculaire (O₂). Tout comme les peroxydases, les plantes et les microorganismes produisent des phénoloxydases qui peuvent être intra- et extracellulaires. Les plantes utilisent ces enzymes notamment pour synthétiser la lignine et autres composés secondaires. La plupart des champignons, mais surtout les basidiomycètes et ascomycètes, utilisent les phénoloxydases intracellulaires pour synthétiser des molécules protectrices, telle que la mélanine (Sinsabaugh, 2010). Toutefois, la plupart de ces microorganismes utilisent les phénoloxydases pour dégrader des composés secondaires comme les phénols afin de récupérer du carbone et autres nutriments.

Plus généralement, les phénoloxydases extracellulaires sont produites par les champignons – le rôle des bactéries étant plutôt anecdotique (Criquet *et al.*, 2000a ; Baldrian, 2006), afin d'atténuer la toxicité des composés phénoliques (Sinsabaugh, 2010). Ainsi, les phénoloxydases libérées dans l'environnement sont des agents indépendants qui permettent la polypérisation, la dépolypérisation et (ou) la

transformation d'un large spectre de composés phénoliques. De ce fait, ces transformations peuvent affecter l'action des polyphénols sur l'activité et la composition des communautés microbiennes du sol.

Sous le terme phénoloxydase sont regroupés principalement les tyrosinases et les laccases. Les tyrosinases, essentiellement produites par les champignons, réalisent deux types d'oxydations : l'hydroxylation de monophénols en diphénols et l'oxydation de diphénols en quinones. Les laccases représentent probablement les phénoloxydases les plus abondantes dans les sols. Tout comme les peroxydases, les laccases sont aussi bien produites par les champignons saprophytes que par les champignons mycorrhiziens (Baldrian, 2006). Ces enzymes ont été très largement étudiées dans les sols et litières forestières (Criquet *et al.*, 1999; Baldrian, 2006 ; Sinsabaugh, 2010, 2011). Leur action consiste en un transfert d'électrons du substrat à l'oxygène, avec formation de deux molécules d'eau (Figure 1.17a). L'oxydation induite par les laccases ne se traduit donc pas par l'introduction d'atomes d'oxygènes dans la molécule oxydée. Le produit de cette réaction induit ensuite la formation de radicaux instables qui vont s'accoupler à d'autres composés phénoliques (Figure 1.17b). Les laccases peuvent ainsi oxyder des mono-, di- et polyphénols (Leonowicz *et al.*, 2001 ; Baldrian, 2006 ; Gobat *et al.*, 2010).

- c) Le « verrou enzymatique » : un élément essentiel de la fonction puits de carbone des tourbières.

Les activités enzymatiques des sols, comme toutes activités biologiques, sont influencées par des variations de l'environnement, telles que des variations saisonnières de pluviosité et de températures (Criquet *et al.*, 2000a ; Bonnett *et al.*, 2006 ; Alarcon-Gutiérrez *et al.*, 2008, 2009 ; Toberman *et al.*, 2008). Plus particulièrement, les phénols oxydases et les peroxydases sont influencés par le pH du milieu. Par exemple, leur optimum se situe aux alentours des pH 5.0 et 6.0 dans les litières forestières (Criquet *et al.*, 2000a ; Sinsabaugh, 2005, 2010). Le niveau d'oxygénation du milieu, ainsi que la température sont également des paramètres cruciaux quant au bon fonctionnement des activités phénoloxydases extracellulaires (Pind *et al.*, 1994 ; Criquet *et al.*, 2000a ; Freeman *et al.*, 2001a, b). Les activités oxydatives jouent donc un rôle capital dans le cycle du carbone des écosystèmes terrestres, rôle d'autant plus capital en tourbière lorsque l'on tient compte de la capacité d'accumulation de carbone de ces écosystèmes.

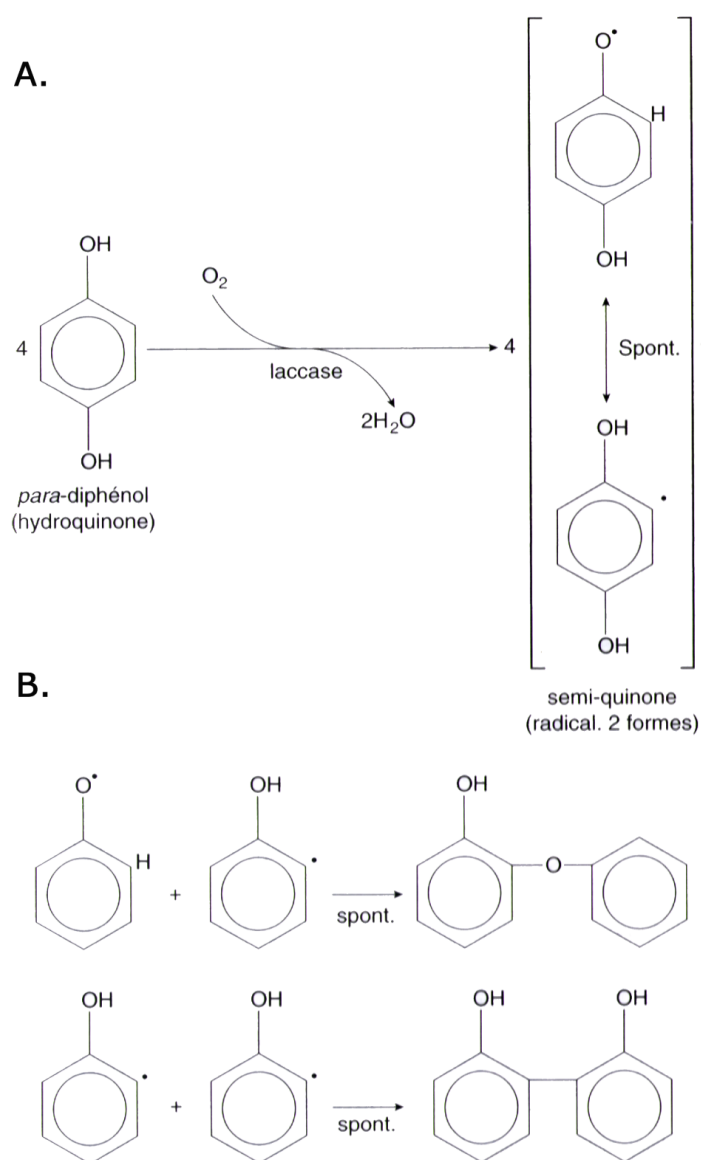


Figure 1.17: (a) Principe des réactions d'oxydation catalysé par les phénoloxydases (exemple des laccases) et (b) des polymérisation spontanée entre les radicaux aromatiques qui en résultent (d'après Baldrian, 2006 et Gobat *et al.*, 2010).

Contrairement aux sols ou aux litières forestières où différentes familles d'enzymes oxydatives sont généralement étudiées en même temps (laccases, tyrosinases, peroxydases) (Criquet *et al.*, 1999, 2000b ; Alarcon-Gutiérrez *et al.*, 2008, 2009), les enzymes oxydatives n'ont pas beaucoup été prises en compte en tourbières. Leur étude est le plus souvent effectuée de manière globale, c'est-à-dire qu'aucune distinction n'est faite entre, d'une part les phénoloxydases (accepteur d'électrons O_2) et les peroxydases (accepteur d'électrons H_2O_2). Il y a donc un besoin évident quant à la caractérisation des activités phénoloxydases dans ce type d'écosystème. Malgré tout, les

quelques études qui se sont intéressées à ces activités en tourbières ont suggéré leur rôle clé dans le fonctionnement des tourbières (Freeman *et al.*, 1993 ; 2001a, b, 2004).

Les différents mécanismes proposés pour expliquer la faible activité de décomposition de la matière organique en tourbières pointent à la fois la faible densité de champignons capables de produire des phénoloxydases (Thormann, 2001), et le rôle des facteurs environnementaux, incluant le plus souvent une faible disponibilité en oxygène, une forte acidité ou encore de faibles températures (Pind *et al.*, 1994 ; Freeman *et al.*, 2001a, b ; Toberman *et al.*, 2008, 2010). L'activité phénoloxydase est en effet fortement corrélée avec la disponibilité en oxygène dans le milieu (Freeman *et al.*, 1993, 2001a). Lorsque la disponibilité en oxygène augmente, l'activité phénoloxydase peut être jusqu'à sept fois plus élevée. Or, une activité plus importante induit une diminution des phénols présents dans le milieu, favorisant par conséquent les activités hydrolases (Tableau 1.4). Ces recherches supportent l'idée que la disponibilité en oxygène contraint l'activité phénoloxydase, ce qui indirectement minimise l'activité des enzymes hydrolytiques impliqués dans la décomposition de la tourbe en raison de l'effet inhibiteur des composés phénoliques libérés par la sphaigne. Ainsi, l'activité phénoloxydase représente une sorte de « verrou enzymatique » ayant une forte emprise sur la capacité des tourbières à stocker du carbone au cours du temps (Freeman *et al.*, 2001a, b, 2004). Cependant, l'évolution de ce verrou enzymatique face à une hausse des températures reste encore mal connue (Williams *et al.*, 2000 ; Toberman *et al.*, 2008, 2010), à l'instar des connaissances sur les relations entre les polyphénols libérés par la sphaigne et l'activité phénoloxydase.

Tableau 1.4: Effet d'une diminution des concentrations en composés phénoliques sur les activités enzymatiques hydrolases en tourbières (d'après Freeman *et al.*, 2001a).

| | Forte concentration en phénols | Faible concentration en phénols |
|-----------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Sulphatase | 579 ± 36 | 849 ± 43 |
| Phosphatase | 3707 ± 25 | 4369 ± 180 |
| β - Glucosidase | 1707 ± 120 | 2183 ± 180 |
| Xylosidase | 303 ± 3 | 134 ± 5 |
| Chitinase | 243 ± 14 | 296 ± 4 |

Les différentes interactions entre les sphaignes, via les composés phénoliques qu'elles sécrètent, et les communautés microbiennes qu'elles abritent, sont donc susceptibles de jouer un rôle important dans le fonctionnement écologique des tourbières, d'où le besoin d'étudier le fonctionnement de la bryosphère. De nombreuses questions restent en effet en suspens lorsque l'on considère la bryosphère. Les polyphénols jouent-ils un rôle dans le fonctionnement de la bryosphère ? Comment la bryosphère se comporte-t-elle face aux changements environnementaux (gradients écologiques et perturbations anthropiques) ? Les interactions biochimiques « sphaignes – microorganismes » sont-elles identiques et (ou) de la même intensité dans tous les types d'habitats recensés en tourbières ? Quel impact va avoir le réchauffement climatique sur ces relations ?

C'est dans l'optique de déterminer (i) les relations entre les communautés microbiennes, leurs activités enzymatiques et les composés phénoliques le long d'un gradient trophique « haut-bas marais », et d'évaluer (ii) la réponse de la bryosphère et de ses interactions avec le milieu environnant lors d'un réchauffement modéré que ce travail de recherche a été réalisé.

Chapitre 2

Méthodologie : Dispositif expérimental & Mises aux points analytiques

1. Site d'étude

La tourbière étudiée dans cette thèse est celle du Forbonnet (ou tourbière de Frasne). Cette tourbière a été choisie par le programme ANR PEATWARM car elle est réputée peu affectée par des perturbations anthropiques. Située à Frasne dans le département du Doubs (25, région Franche-Comté), elle se localise dans le bassin du Dugeon, vallée caractérisée par de nombreux habitats et espèces rares sensibles et d'intérêt européen. La mise en place de ces dispositifs de protection s'est justifiée par la présence, au sein de ce bassin d'habitats d'intérêts communautaires (pinède à crochets, haut-marais actifs, tourbières de transition) et de nombreuses espèces floristiques protégées à l'échelle européenne et nationale (par exemple, *Carex limosa*, *Drosera spp.*, *Scheuchzeria palustris*, *Andromeda polifolia*). De ce fait, le bassin du Dugeon est l'un des sites naturels les plus remarquables de Franche-Comté, protégé par de nombreux dispositifs réglementaires (Magnon & Terraz, 2002) au titre de son classement en tant que site Natura 2000, site RMASAR et réserve naturelle régionale, avec des arrêtés préfectoraux de protection de biotopes.

Au total, 37 sites tourbeux ont été recensés dans le bassin du Dugeon avec une superficie de 1057 ha dont 98 ha sont couverts par la tourbière du Forbonnet (Faucompré, 2003). Dans l'ensemble, les habitats tourbeux sont dans un état de conservation assez favorable (Magnon & Terraz, 2002), bien que le milieu subisse actuellement une fermeture progressive par le pin à crochet et l'épicéa.

La tourbière du Forbonnet (46°49'35"N ; 6°10'20"E ; Figure 2.1) se situe à environ 840 m d'altitude dans la commune de Frasne. Cette tourbière très peu perturbée est composée d'un bas-marais et d'un haut-marais. Le haut-marais est une tourbière de type ombrotrophe (Grosvernier, 2005), principalement alimentée par les eaux de pluie (cf Tableau 4), comprenant des zones de marais de transition bas marais → haut marais. Le milieu est très largement colonisé par les sphaignes, telles que *S. fallax*, *S. rubellum* et *S. magellanicum*, représentant 70 à 90% du couvert végétal. De nombreuses plantes vasculaires telles que *Eriophorum vaginatum*, *Scheuchzeria palustris*, *Andromeda polifolia*, *Vaccinium oxycoccos* et *Carex limosa*, sont également présentes, constituant environ 30 à 60% du couvert végétal (Bailly, 2005).

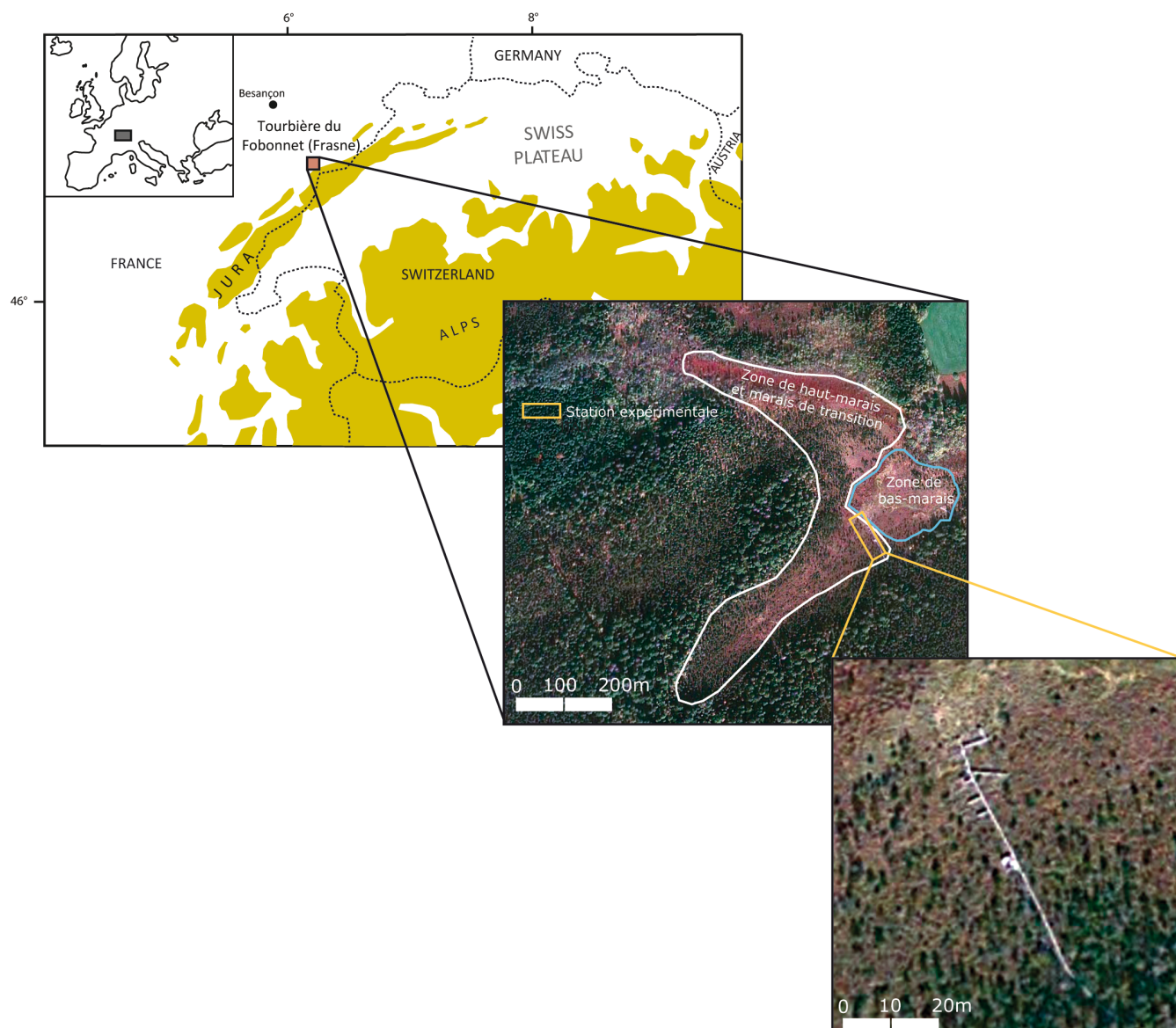


Figure 2.1: Localisation géographique de la station expérimentale au sein de la tourbière du Forbonnet. La zone en blanc représente le haut marais/marais de transition (i.e. la zone la plus active quant à l'accumulation de tourbe), quant à la zone en bleu elle représente le bas-marais. Zoom sur la station de recherche.

Un climat montagnard continental caractérise la région de Frasne (Manneville *et al.*, 1999) avec des températures moyennes annuelles de l'ordre de 5-7°C (température moyenne en hiver -2.3°C, température moyenne en été 13.2°C), et des précipitations comprises entre 1100 et 1300 mm/an (mesures réalisées entre janvier et décembre 2010 sur le site expérimental par le biais de la station météorologique) (Figure 2.2).

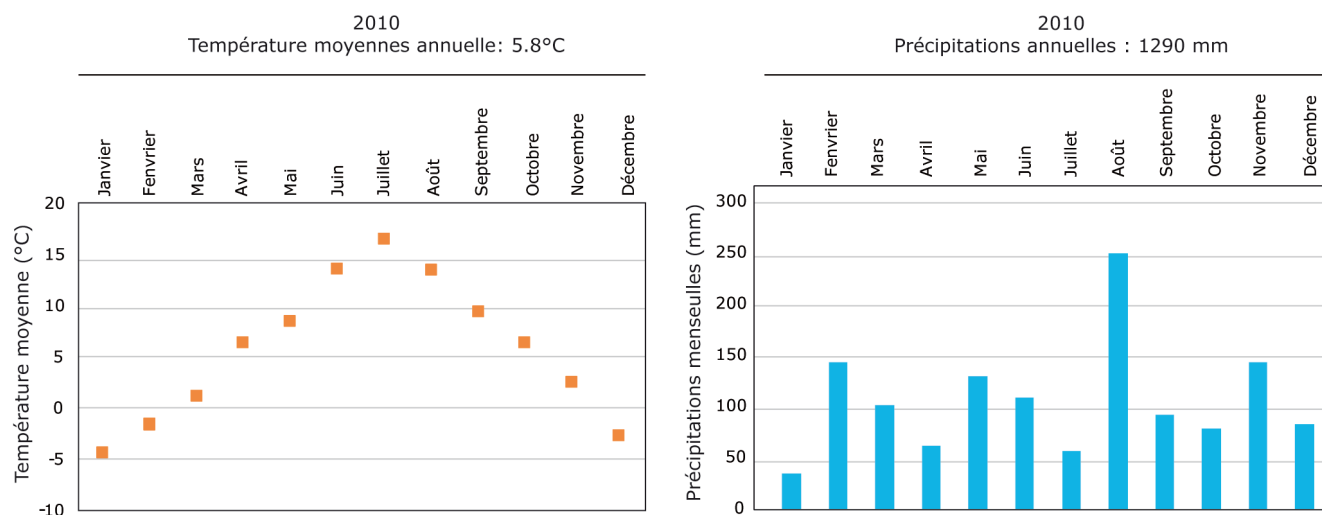


Figure 2.2: Diagrammes météorologiques: mesures des températures et des précipitations effectuées entre les mois de janvier et décembre 2010 dans la tourbière du Forbonnet.

2. Dispositif expérimental

La station de recherche, dont la surface avoisine les 100 m², a été installée en mai 2008 dans la zone de haut-marais (Figure 2.1 et 2.3). Douze placettes d'échantillonnage ont été délimitées le long d'une zone de transition entre un bas et un haut-marais. Ainsi, deux zones écologiques distinctes ont été délimitées : une zone dite de « haut-marais » (placettes 1 à 6 ; Figure 2.3) et une zone dite de « bas-marais » (placettes 7 à 12). La distinction entre ces deux zones a été effectuée en fonction de la végétation et de la microtopographie recensées dans ces deux zones. Ainsi, la zone de « haut-marais » est caractérisée par une microtopographie marquée (nombreux gradients butte-dépression) et une végétation mixte entre les bryophytes (*S. fallax*, *S. rubellum*, *S. magellanicum*) et les plantes vasculaires (*Eriophorum vaginatum*, *Vaccinium oxycoccus*, *Andromeda polifolia*), alors que la zone de « bas-marais » est plutôt caractérisée par une microtopographie moins marquée, une forte dominance de *S. fallax*, l'absence de butte de sphagne comprenant *S. magellanicum*, et un recouvrement par les plantes vasculaires moindre (Figure 2.4; Buttler, 2008). Bien entendu, ces deux zones ne sont pas strictement assimilées à un haut et un bas-marais, la zone expérimentale est plutôt une zone de transition écologique entre le bas et le haut-marais. La dénomination « haut » et « bas » marais (soit « bog » et « fen », respectivement dans les articles en anglais) utilisée tout au long de ce manuscrit a donc été en partie choisie pour sa simplicité d'utilisation.

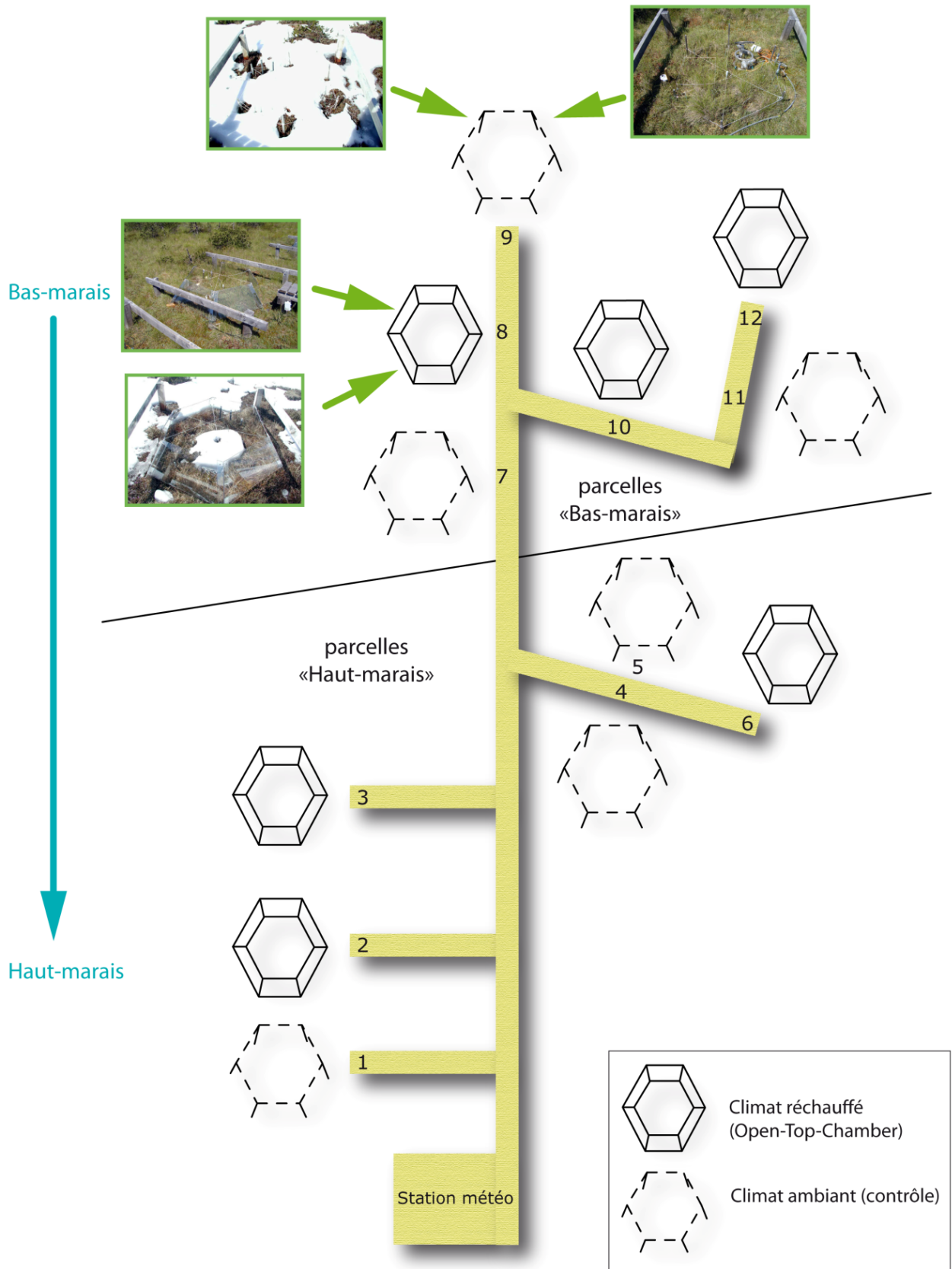


Figure 2.3: Dispositif expérimental et vue des placettes équipées d'Open-Top-Chambers.

Le devenir des tourbières lors d'un réchauffement climatique étant une préoccupation grandissante, de nombreuses méthodes d'investigation se sont développées afin de simuler la hausse des températures *in situ*. Les tourbières ont par exemple été étudiées dans des contextes parfois extrêmes, tel que le drainage ou suite à une canicule (Bragazza, 2008 ; Toberman *et al.*, 2010). En parallèle à ces études, des systèmes expérimentaux se sont basés sur des simulations actives ou passives pour la plupart moins agressives. Dans le cas des simulations actives, des lampes infrarouges ou des câbles chauffants sont utilisés, amenant une source externe de réchauffement appliquée en surface ou en profondeur du sol (Beyens *et al.*, 2009). Les systèmes passifs, quant à eux, n'apportent pas de source externe de réchauffement.



Figure 2.4: Représentation sous forme de pixels de la composition végétale des placettes en conditions « haut-marais » et « bas-marais ». Relevé floristique effectué en juillet 2008 (Buttler, 2008). Les axes x (A à T) et y (1 à 20) représentent le quadrillage du carré utilisé pour pixéliser les relevés de végétation (Buttler, 1992).

Parmi ces dispositifs dits passifs, les Open-Top-Chambers (OTCs ; Figure 2.3) sont les plus utilisés en tourbières (Marion *et al.*, 1997 ; Dorrepaal *et al.*, 2004 ; Aerts *et al.*, 2004 ; Dabros & Fyles, 2010). Bien qu'aucun dispositif ne soit parfait en terme de simulation, les OTCs permettent d'étudier le devenir des puits de carbone que sont les tourbières, à travers une hausse de la température plus réaliste, car dépendante du climat ambiant et associée à divers facteurs (pluviosité) contrôlant le fonctionnement des tourbières (Weltzin *et al.*, 2001 ; Keuper *et al.*, 2011).

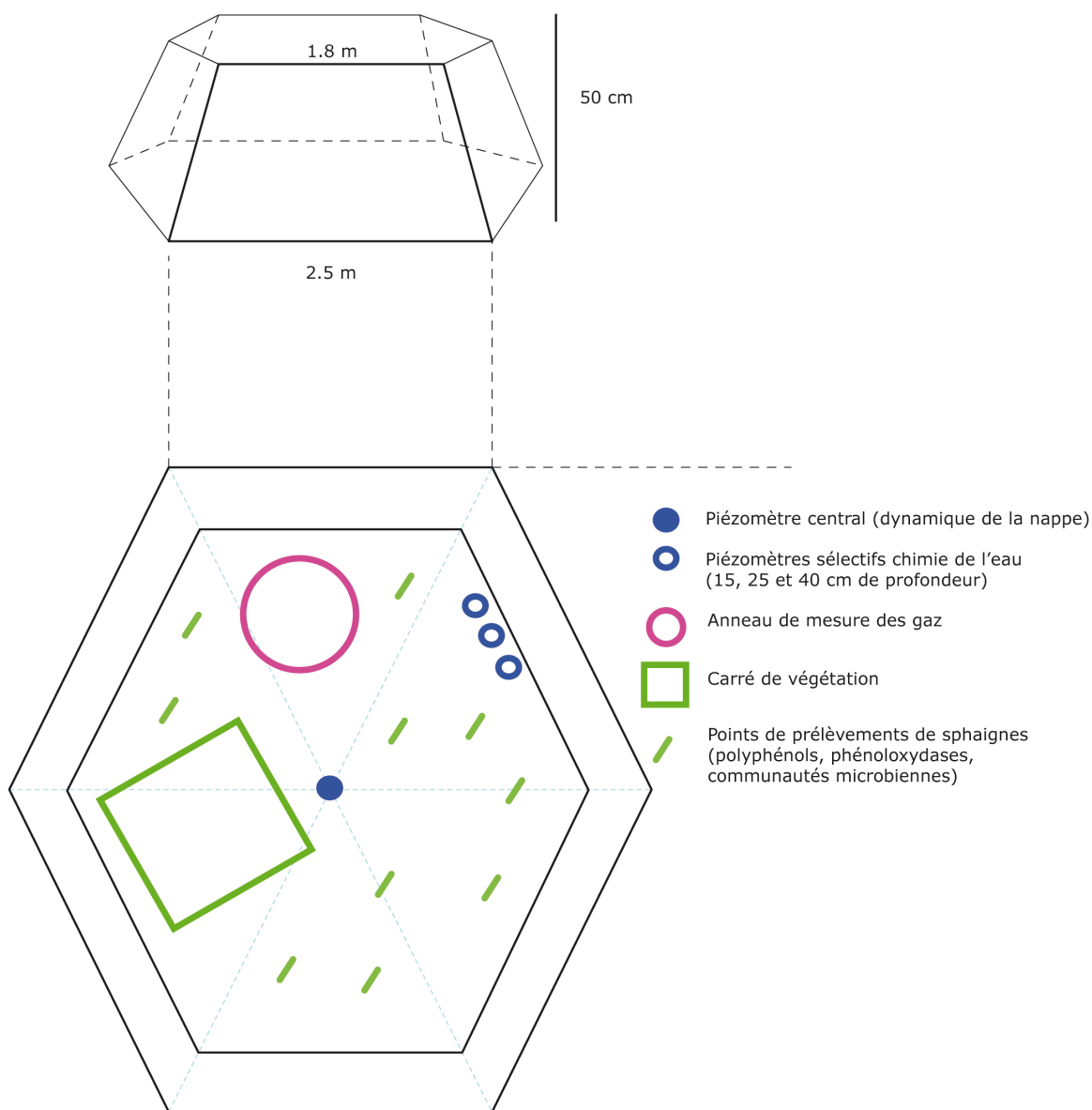


Figure 2.5: Equipement des placettes d'expérimentations (équivalent pour les placettes contrôles et réchauffées).

Ainsi, dans chacune des deux zones, trois parcelles témoins (climat ambiant) et trois parcelles équipées d'un dispositif de réchauffement (OTCs) ont été mises en place (Figure 2.3). Les OTCs ont été confectionnées conformément au système standardisé ITEX (International Tundra EXperiment), lequel permet d'obtenir une transmission des longueurs d'onde du visible proche de l'état naturel et de minimiser celle des longueurs d'ondes infrarouges réémises (Marion *et al.*, 1997). ITEX est un réseau scientifique d'expérimentation dont le but est d'étudier l'impact des changements climatiques sur les espèces végétales alpines de tundra et de tourbières subarctiques (Marion *et al.*, 1997 ; Dorrepaal *et al.*, 2004). Ce type de dispositif a ainsi été utilisé pour la première fois dans les tourbières en domaine tempéré. Les OTCs sont des hexagones transparents en polycarbonate de 50 cm de haut, 1.8 m de diamètre au sommet et 2,5 m de diamètre à la base (Figure 2.5). Chaque OTC a été surélevé d'une dizaine de centimètres par rapport au sol afin de permettre la circulation de l'air.

Chacune des douze placettes expérimentales a été équipée de (Figure 2.5) :

- quatre piézomètres : un piézomètre pour la mesure de la hauteur de la nappe d'eau et trois piézomètres plus spécifiques pour récupérer l'eau à trois profondeurs différentes, respectivement 15, 25 et 40 cm de profondeur,
- un cadre de suivi de végétation,
- un anneau pour réceptionner les cloches de mesure de gaz (CO₂ et CH₄),
- dix marqueurs de prélèvement de sphaignes. Ce dispositif a été mis en place afin (i) de prendre en compte l'hétérogénéité spatiale au sein de la placette (Mitchell *et al.*, 2000a) et (ii) de permettre un échantillonnage dans le temps.
- de capteurs de température : dans les 12 placettes, des capteurs ont été installés à +10 cm de hauteur et -7 cm de profondeur. Des capteurs ont également été installés à -20 et -50 cm de profondeur dans quelques placettes, mais les travaux liés à cette thèse se cantonnant uniquement aux 10 premiers centimètres de tourbe, ces derniers n'ont pas été pris en compte dans ces travaux. Les températures ont été mesurées toutes les 30 minutes,
- des capteurs de niveau de la nappe d'eau dans les placettes témoins 4 et 9 (respectivement dans le haut et le bas-marais). La hauteur de nappe a aussi été mesurée dans toutes les placettes lors de chaque campagne de prélèvements.

Une station météorologique a été installée, permettant l'acquisition de paramètres météorologiques (radiations solaires, direction du vent, hygrométrie, température de l'air, pluviométrie,...) toutes les trente minutes. Cette station expérimentale a donc

été conçue pour être durable, et constituer un site pilote en Europe pour l'étude du réchauffement climatique sur les tourbières.

3. Mises au point analytiques

Bien que chaque publication présentée par la suite possède une partie méthodologique, les différentes mises aux points analytiques préliminaires à ces travaux ne sont pas mentionnées. Il est cependant intéressant d'en faire une synthèse.

1 Dosage des composés phénoliques

Premièrement, de nombreux tests ont été effectués quant à l'extraction et la quantification des composés phénoliques. Etant donné qu'aucune étude ne s'était jusqu'à présent intéressée aux relations entre les phénols des sphaignes et les microorganismes, des mises aux points méthodologiques ont été nécessaires quant à la quantification des phénols totaux à la fois liés à la sphaigne et solubles dans l'eau. Les méthodes présentées dans les articles sont donc celles ayant été retenues après de nombreux essais (Figure 2.6a). L'extraction des composés phénoliques a été réalisée sur des échantillons préalablement lyophilisés. La quantité de matière, le volume d'extraction et le type de filtration sont les facteurs clés qui ont été testés et calibrés afin d'obtenir le meilleur rendement possible. Ainsi nous avons choisi un poids sec de 0.05g de sphaignes pour toutes nos extractions dans un volume total de 25 mL pour les composés « liés à la sphaigne » et 10 mL pour les composés « solubles dans l'eau ». La solution d'extraction retenue pour les composés liés à la sphaigne est celle comprenant 80% d'éthanol et 20% d'eau distillée. En outre, nous avons choisi de garder trois extractions successives pour la quantification des composés liés à la sphaigne (rendement de la quatrième extraction < 5%). La méthode d'extraction a également été validée pour une hausse de température de + 5°C et 10°C (Figure 2.6b). Enfin, nous avons choisi les filtres à cellulose régénérée qui donnaient le meilleur rendement.

A.

| Eléments testés | | | |
|---|--------------------|----------------|---------------------|
| Poids sec de sphaignes (g MS) | 0.08 | 0.05 | 0.025 |
| Type de filtre (0.45 µm) | Polyvinyl-Chloride | Poly-propylène | Cellulose régénérée |
| <i>Composés liés à la sphaigne</i> | | | |
| Nombre d'extractions successives | 4 | 3 | 2 |
| Volume d'extraction (mL) | 50 | 25 | |
| Solution d'extraction éthanol / eau distillée (v/v) | 80/20 | 70/30 | 50/50 |
| <i>Composés solubles dans l'eau</i> | | | |
| Volume d'extraction (mL) | 25 | 15 | 10 |

B.

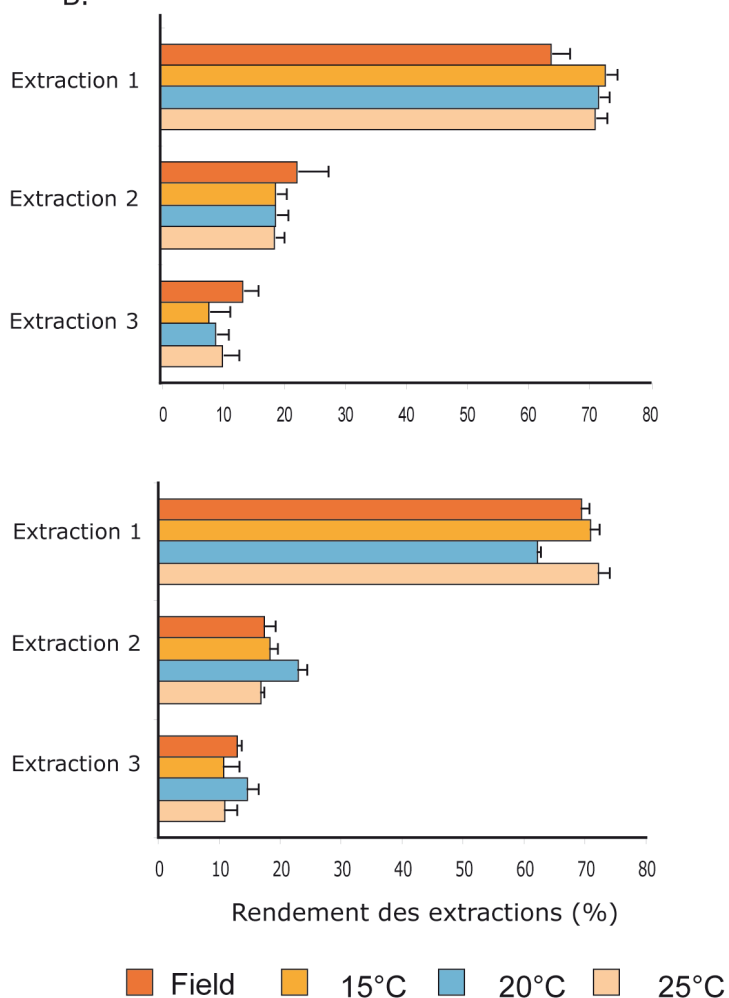


Figure 2.6 : (a) Eléments méthodologiques testés pour le dosage des composés phénoliques chez la sphaigne, (b) rendement des extractions éthanol/eau à différentes températures. Field = conditions *in situ* au moment du prélèvement.

2 Extraction et analyses des activités phénoloxydases

Bien que la mesure de l'oxydation enzymatique des composés phénoliques en tourbières soit un indicateur important de la capacité de la microflore à dégrader la matière organique potentiellement récalcitrante, les méthodes proposées en tourbières pour mesurer ce type de dégradation sont rares et parfois incertaines (Sinsabaugh, 2010). En effet, certains constituants du sol, notamment la matière organique, peuvent considérablement perturber les mesures enzymatiques dans les sols. Perucci *et al.* (2000) ont en effet démontré dans les sols riches en matière organique, que des extraits enzymatiques autoclavés avaient un niveau d'activité quasiment équivalent aux extraits non autoclavés. Parallèlement, les auteurs ont montré que l'activité d'un extrait enzymatique autoclavé d'un sol pauvre en matière organique était quasi nulle. Ces auteurs ont ainsi démontré l'influence de la teneur en matière organique d'un échantillon de sol sur la fiabilité des mesures d'activités phénoloxydases. De ce fait, nous avons décidé de comparer la méthode fréquemment utilisée en tourbière, basée sur une mesure directe de l'activité enzymatique sans traitement préalable (Pind *et al.*, 1994), à celle couramment utilisée dans les litières forestières, qui elle présente une étape de purification et de concentration des extraits enzymatiques (Criquet *et al.*, 1999). Ces deux méthodes étant basées sur la mesure de l'oxydation d'un même substrat, à savoir la L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) les résultats obtenus sont parfaitement comparables. La comparaison de méthodes démontre clairement que celles-ci diffèrent significativement (Figure 2.7). La méthode décrite par Pind *et al.* (1994) a donné des résultats très hétérogènes. En effet, plutôt que d'utiliser des contrôles contenant de l'eau distillée comme cela est décrit initialement dans la méthode, nous avons choisi des contrôles bouillis à 90°C pendant 2h, afin de dénaturer les enzymes (Sinsabaugh, 2010). Les contrôles bouillis ont donné des valeurs plus importantes que celles des extraits enzymatiques non bouillis. Or, afin d'obtenir l'activité enzymatique réelle de l'extrait, il est important de soustraire la valeur des contrôles bouillis à celle des extraits non bouillis, d'où l'obtention d'activités enzymatiques négatives (Figure 2.7). La mesure des activités enzymatiques par cette méthode semble donc biaisée, et met ainsi en évidence des interférences abiotiques (par exemple des composés issus de la tourbe) avec la réaction enzymatique (Floch *et al.*, 2007). De ce fait, la réaction enzymatique liée à cette méthode ne peut être linéaire et stable dans le temps. Au contraire, la méthode décrite par Criquet *et al.* (1999) a donné des résultats plutôt homogènes, avec des contrôles bouillis qui ne variaient pas, même après 24 heures (Figure 2.7). La phase de purification permet ainsi d'éliminer les résidus de matières organiques pouvant interférer avec la réaction enzymatique, et donne donc des extraits enzymatiques fiables dans des sols riches en matière organique tel qu'une tourbière. Autre avantage de cette méthode, la

phase de concentration des extraits permet de détecter plus facilement les activités phénoloxydases plutôt faibles en tourbières. Nous avons donc choisi cette seconde méthode pour la caractérisation des activités phénoloxydases et peroxydases lors de nos études.

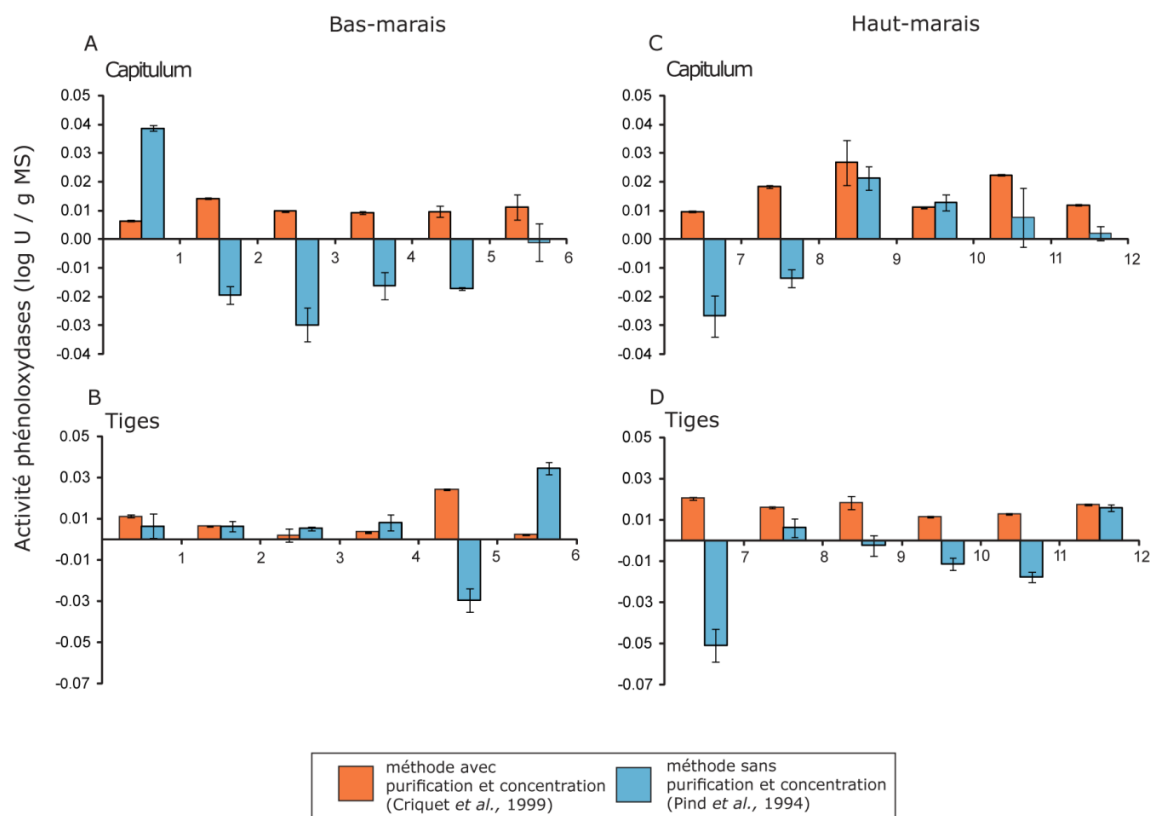


Figure 2.7: Comparaison de méthode de quantification des phénoloxydases. Les chiffres sur l'axe x représentent le numéro de placette d'échantillonnage sur la station expérimentale (cf Figure 2.3).

Chapitre 3

Écologie des communautés de thécamoebiens associés aux sphaignes le long d'un gradient écologique du type « haut -bas marais »

1. Microdistribution horizontale et verticale des amibes à thèque le long d'un gradient écologique du type « haut-bas » marais

Vincent E.J. Jassey, Geneviève Chiapusio, Edward A.D. Mitchell, Philippe Binet, Marie-Laure Toussaint et Daniel Gilbert (2011) Fine scale horizontal and vertical micro-distribution of testate amoebae along a narrow fen/bog gradient. Microbial Ecology 61: 374-385 doi: 10.1007/s00248-010-9756-9.

1 Préambule

A l'instar des autres écosystèmes, les composés phénoliques produits par les sphaignes sont susceptibles d'interagir avec les communautés microbiennes associées aux sphaignes (Verhoeven & Liefveld, 1997). Curieusement, en dehors de la relation polyphénols – phénoloxydases, aucune étude ne s'est intéressée, à notre connaissance, aux relations potentielles entre les polyphénols et les communautés microbiennes des sphaignes, tels que les protistes. On pourrait penser que ce manque d'attention résulte d'une faible densité et d'une faible importance fonctionnelle souvent soupçonnée chez les protistes. Pourtant ces microorganismes jouent des rôles fondamentaux dans la dynamique de nombreux écosystèmes (Wilkinson & Mitchell, 2010).

Dans ce contexte, une première étude se focalisant à la fois sur la distribution horizontale et verticale des amibes à thèque le long du gradient écologique « haut - bas » marais, et sur leur relation avec les polyphénols a été réalisée. Les amibes à thèque ont été choisies car (i) elles intègrent l'ensemble des communautés microbiennes dû à leur position trophique, (ii) elles représentent une part importante de la biomasse microbienne en tourbières, (iii) elles ont un rôle fonctionnel important, (iv) elles sont écologiquement sensibles, et (v) elles sont ubiquistes (Mitchell *et al.*, 2008).

Les résultats obtenus montrent que les polyphénols et les amibes à thèque varient tous deux le long du gradient écologique et que les polyphénols jouent un rôle dans les variations spatiales de thécamoebiens, même si cela reste à confirmer plus précisément. C'est également la première étude qui quantifie les phénols totaux chez la sphaigne dans deux zones écologiques différentes. L'étude présentée dans les pages suivantes constitue

donc une étude pionnière en ce qui concerne la mise en relations « sphaignes – communautés microbiennes des tourbières » par le biais des polyphénols.

2 Fine-scale horizontal and vertical micro-distribution patterns of testate amoebae along a narrow fen/bog gradient

a) Abstract

The ecology of peatland testate amoebae is well studied along broad gradient from very wet (pool) to dry (hummock) micro-sites where testate amoebae are often found to respond primarily to the depth to water table (DWT). Much less is known on their responses to finer-scale gradients, and nothing is known of their possible response to phenolic compounds, which play a key role in carbon storage in peatlands. We studied the vertical (0-3 cm; 3-6 cm; 6-9 cm sampling depths) micro-distribution patterns of testate amoebae in the same microhabitat (*Sphagnum fallax* lawn) along a narrow ecological gradient between a poor fen with an almost flat and homogeneous *Sphagnum* carpet (fen) and a “young bog” (bog) with more marked micro-topography and mosaic of poor-fen and bog vegetation. We analysed the relationships between the testate amoeba data and three sets of variables (1) “chemical” (pH, Eh potential & conductivity), (2) “physical” (water temperature, altitude i.e. *Sphagnum* mat microtopography & DWT) and (3) phenolic compounds in/from *Sphagnum* (water-soluble and primarily bound phenolics) as well as the habitat (fen/bog) and the sampling depth. Testate amoeba Shannon H' diversity, equitability J of communities, and total density peaked in lower parts of *Sphagnum*, but the patterns differed between the fen and bog micro-sites. Redundancy analyses revealed that testate amoeba communities differed significantly in relation to Eh, conductivity, water temperature, altitude, water-soluble phenolics, habitat, and sampling depth, but not to DWT, pH, or primarily bound phenolics. The sensitivity of testate amoebae to weak environmental gradients makes them particularly good integrators of micro-environmental variations and has implications for their use in paleoecology and environmental monitoring. The correlation between testate amoeba communities and the concentration of water-soluble phenolic suggests direct (e.g. physiological) and/or indirect (e.g. through impact on prey organisms) effects on testate amoebae, which requires further research.

b) Introduction

Testate amoebae are abundant and diverse-shelled protozoa living in a wide range of habitats ranging from soils, lakes, rivers, wetlands, and moss habitats (Warner, 1987; Charman, 1992; Booth, 2001). Owing to ecological gradients and the preservation of their shells in peat and sediments, these protists are useful proxies in paleoenvironmental and ecological studies of peatland and lakes (Booth *et al.*, 2006; Charman *et al.*, 2006; Mitchell *et al.*, 2008). In *Sphagnum* bogs, testate amoeba community composition is generally strongly correlated to surface wetness conditions (mostly assessed by the water table depth – hereafter DWT) and water chemistry (Tolonen *et al.*, 1992; Bobrov *et al.*, 1999; Opravilova & Hajek, 2006; Mieczan, 2009).

While the relationship between testate amoebae and DWT, and a few other variables such as pH are well documented along broad ecological gradient (e.g. wet pools to dry hummocks, fen to bog) (Heal, 1964; Opravilova & Hajek, 2006), much less is known on their finer-scale responses to micro-environmental gradients. Some data suggests that testate amoebae may be highly sensitive even to subtle micro-environmental gradients. For example Mitchell *et al.* (2000a) studied the horizontal distribution patterns of testate amoeba communities in a 40x60cm almost flat mono-specific *Sphagnum* lawn and found spatial heterogeneity in the communities that was significantly correlated to altitude (microtopography; despite a very short – ca. 6cm – elevation gradient). Assessing testate amoeba species-environment correlation along fine-scale environmental gradients is necessary to define the practical limits (i.e. the resolution) of their use as bioindicators in ecological and palaeoecological studies.

Another open question is the range of abiotic and biotic factors to which testate amoebae respond. Although many variables have been studied, DWT almost always emerges as the strongest variable despite the fact that testate amoebae are unlikely to be directly influenced by the position of the water table 10 or 30 cm below the level where they live (Mitchell *et al.*, 1999). Still some important potential factors have not yet been studied including peat and water chemistry beyond simple ions and elements. *Sphagnum* peatlands are indeed generally characterized by gradients such as nutrients (nutrient-poor ombrotrophic bogs vs. rich fens), hydrology (wet hollow vs. dry hummocks) and acidity (Clymo, 1973; Hajkova & Hajek, 2004; Rydin & Jeglum, 2006; Hajek & Beckett, 2008).

Recently, phenolic compounds (secondary metabolites) produced by plants have been described to play an important role in the interactions of plants with their environment including microorganisms (Hättenschwiler & Vitousek, 2000). For example in humus spruce forests such compounds have been shown to cause the increase of several microbial communities (i.e. cellulose hydrolyser) and in the decrease of others

(i.e. bacteria) (Souto *et al.*, 2000a, b). While the production of phenolic compounds by vascular plants is well documented, few studies have addressed phenols production by non-vascular cryptogams such as *Sphagnum*. The role of phenolics produced by vascular plants on the functioning of the bog ecosystem is established (Freeman *et al.*, 2001), as well as the phenolics content gradient between knoll forest-peat bogs and peat bogs (Djurdjevic *et al.*, 2003). Possible effects of phenolics produced by *Sphagnum* on microorganisms, including testate amoebae, are still unknown. *Sphagnum* contains weakly as well as primarily bound phenolics to the cell wall (Verhoeven & Liefveld, 1997). The unique morphology and anatomy of *Sphagnum*, allows water-soluble phenols to be easily released in the *Sphagnum* surrounding environment. Thus the patterns of phenol concentrations at the surface of *Sphagnum* peatlands may contribute to creating micro-patterned habitats and a range of ecological niches suitable for the establishment of diverse communities of organisms including testate amoebae (Andrus, 1986; Mitchell *et al.*, 2000; Charman *et al.*, 2007).

The aims of this study are to explore (1) the species-environment relationships and (2) vertical micro-distribution patterns of testate amoebae along a short ecological gradient from a *Sphagnum*-dominated poor fen (for simplicity hereafter referred to here as "fen") and a vegetation with mixed bog and poor fen plant elements and a more marked micro-topography (hereafter referred to as "bog"). Rather than sampling contrasted microhabitats or moss species, we sampled only within macroscopically homogenous and similar *Sphagnum fallax* carpets across the gradient. We assessed (1) how horizontal and vertical patterns of testate amoebae community structure varied along the gradient, and (2) the relationships between the testate amoeba communities and DWT, water chemistry and phenolic compound content. We hypothesized (1) that the vertical patterns of community structure would be more marked in the structurally more complex mixed *Sphagnum* "bog" habitat than in the more uniform poor fen, despite the fact that the sampled habitats were macroscopically identical and, (2) that phenolic compounds would explain a similar fraction of the community data structure as other more commonly studied environmental factors (i.e. altitude, DWT, water chemistry).

c) Methods

Sampling and laboratory analyses

The study site was an undisturbed ombrotrophic *Sphagnum*-dominated mire (Bailly, 2005) situated in the Jura Mountains (The Forbonnet peatland, France, 46°49'35"N, 6°10'20"E) at an altitude of 840 m above sea level. Cold winters (on average of -1.4°C) and mild summers (on average of 14.6°C) characterized the climate of the site. The

annual mean temperature measured at the site over a one year period from November 5th 2008 to November 30th 2009 was 6.5°C and the annual precipitations were 1,200 mm.

Samples of *S. fallax* were collected from two adjacent areas (ca. 10 x 12 m) selected in relation to their microtopography, vegetation and assessment of sources and decay of organic matter (Delarue *et al.*, 2011). The first sampling area (coded "fen") is a transitional *Sphagnum*-dominated poor fen area, relatively flat and homogeneous, characterized by a moss cover dominated by *S. fallax* and by the lack of *S. magellanicum*. Vascular plants as *Eriophorum vaginatum*, *Vaccinium oxycoccus* and *Andromeda polifolia* were recorded in very low abundance. *Scheuchzeria palustris* and *Carex limosa* occurred outside of the studied plots. The second sampling area (coded "bog") is an open bog area with mixed vegetation, directly adjacent to the fen area. Patterns of hummocks with *S. magellanicum*, *V. oxycoccus*, *E. vaginatum*, *C. rostrata* and *Calluna vulgaris*, and hollows with lawns of *S. fallax* and *A. polifolia* characterized the sampling area. The terms "fen" and "bog" are used here for simplicity and to denote the existence of a trophic gradient inferred from the vegetation. However the "bog" sub-site represents a mosaic of poor-fen (lawns, hollows) and bog (hummock) vegetation.

In each of the two sampling areas, six plots were selected in representative surfaces. Among the 12 sampling plots, the maximal distance between the two most distant plots was ca. 30 m. On June 26th 2008, samples of *S. fallax* were collected in each plot for the study of testate amoeba communities and phenolic compounds around 10 permanent markers in each plot. The goals of this sampling design were (1) to allow for multiple sampling at the site over time (this study representing the T0 of a warming experiment), and (2) to obtain a composite sample from each plot and avoid any bias due to spatial heterogeneity (Mitchell *et al.*, 2000a). Moreover in each plots, the Eh potential, the pH, the conductivity (K), the water temperature (W-Temp), the depth to the water table (DWT; measured in a piezometer in the centre of each plot), and the average altitude (microtopography, Alt) of the sampled plot were measured. To assess the effect of microtopography on spatial distribution patterns, the average altitude (in millimeters) of the 10 permanent markers was recorded in each sampling plots using an arbitrary reference (Mitchell *et al.*, 2000a). The values of pH and conductivity were standardized to 20°C. The conductivity caused by hydrogen ions was subtracted according to Sjörs (1952). Corrected conductivity (Kcorr) was then used as a proxy for total mineral richness of the water.

Primarily bound (hereafter "bound") and water-soluble phenolic (hereafter "free") compounds were extracted and quantified from lyophilized mosses. The green section (0-6 cm; 0 being defined as the top of the capitulum) was used for these analyses,

excluding the lower part where the mosses start to decay. Two methods were used to extract phenolic compounds from *Sphagnum*. For free phenolics, 0.05g dry weight (DW) of *Sphagnum* was ground in a mortar, mixed with 10 mL distilled water, bubbled with nitrogen and agitated on a reciprocal shaker (15 rpm) for 3 hours and filtered. For bound phenolic compounds, 0.05g DW of *Sphagnum* was ground in a mortar, mixed with 25 mL ethanol / distilled water (80/20 v/v) and warmed under reflux at 120°C for 30 minutes. This extract was filtered and evaporated by using a rotary evaporator. Finally, the dry extract was dissolved in 25 mL of boiling distilled water (adapted from Gallet & Lebreton, 1995). The free and bound total phenolic contents were quantified with the Folin-Ciocalteu reagent and were expressed in mg equivalent gallic acid (A_{760}).

For testate amoeba analysis, the *S. fallax* samples were cut in three levels (sampling depth): 0-3 cm (upper), 3-6 cm (intermediate), and 6-9 cm (lower). The samples were fixed with 20 mL glutaraldehyde (2% final concentration) and stored at 4°C in the dark. Testate amoebae were extracted from mosses using the following extraction method (Nguyen-Viet *et al.*, 2008): each sample was shaken for 1 min on a vortex and then pressed to extract microorganisms (first solution). The mosses were then soaked again with 20 mL of glutaraldehyde (2%), shaken a second time on a vortex and pressed to extract *Sphagnum* leachate. The leachate was left to settle for 12h, after which the supernatant was added to *Sphagnum* and the bottom to the first solution. The process was repeated six times, and all fractions were combined to obtain a final composite sample of 40 mL. The remaining fraction was dried at 80°C for 48h and weighted to express testate amoeba density by gram dry weight (DW) of *Sphagnum*. The testate amoebae were identified and counted to a total of 150 at x200 and x400 magnification by inverted microscopy (OLYMPUS IX71) following Uthermühl's method (1958). Testate amoebae were identified to the species level whenever possible. Only living amoebae (active only, encysted individuals were not included) were counted.

Numerical analyses

Total density, species richness (S), diversity index (the Shannon index H') and equitability index (J) were calculated. Because the distributions of these data were not normal, non-parametric Friedman tests were performed.

In all analyses, species that occurred in less than 2% of maximum density were removed from the data set to reduce the influence of rare taxa on multivariate analyses (Lavoie *et al.*, 2009). We analyzed differences among sampling depths and between the fen and bog zones (nominal variables) for the dominant testate amoeba species using a MANOVA test.

For all multivariate analyses, a Hellinger transformation was applied to stabilize the variance and reduce the influence of the dominant taxa (Legendre & Gallagher, 2001). A Non-metric multidimensional scaling (NMDS) was used to assess patterns of variation in testate amoeba community structure along the different segments of *Sphagnum* (upper, intermediate and lower segments) and between the fen and bog zones. As this analysis revealed clear differences among sampling depths and between “fen” and “bog” zones ($P < 0.001$), we further explored the species-environment correlations for the different sampling depths and in the two zones separately as well as conducting global analyses.

Multiple factor analysis (MFA) was used to assess the general structure of the data and to determine the relationships among the three Hellinger-transformed testate amoeba data sets and the three environmental variables data sets (chemical, physical and phenolics) (Escoufier & Pages, 1994). MFA was performed in two steps. Firstly, a PCA was performed on each subset, which was then normalized by dividing all its elements by the first eigenvalue obtained from its PCA. Secondly, the normalized subsets were assembled to form a unique matrix and a second PCA was performed on this matrix. RV-coefficient (ranging from 0 to 1) was used to measure the similarity between the geometrical representations derived from each groups of variables (Robert & Escoufier, 1976). RV-coefficients are then tested by permutations (Josse *et al.*, 2008). Euclidean distances of global PCA were used in MFA to perform cluster analysis according to the Ward method, and the resulting dendrogram was projected in the MFA ordination space. This analysis revealed the main differences in the structure of the data described by all biotic and abiotic subsets of variables.

We assessed the relationships among the testate amoeba communities in the upper, intermediate and lower sampling depth and the three sets of environmental variables (1) “chemical” (pH, Eh potential & conductivity), (2) “physical”: (water temperature, altitude & DWT) and (3) phenolic compounds (bound and free). The ordination patterns of testate amoeba communities and their causal relationships to environmental data-sets were assessed using redundancy analysis (RDA) (Ter Braak & Simlauer, 1998). The proportion of variance explained by environmental variables was quantified using variance partitioning. Adjusted R^2 were used in all RDA to estimate the proportion of explained variance (Peres-Neto *et al.*, 2006). The analysis was repeated with the sampling area and sampling depth data-sets transformed to presence/absence in order to reveal only testate amoeba communities differences.

All multivariate analyses were performed with the software R (R Development Core Team, 2010) using *vegan* (Oksanen *et al.*, 2010) and *FactoMineR* (Husson *et al.*, 2008) packages.

d) Results

Environmental Variables

Tableau 3.1: Environmental variables measured in the "fen" and "bog" sampling areas in Le Forbonnet mire (French Jura) (n = 12, average \pm S.E).

| Sampling Area | pH | Eh (mV) | Kcorr (μ S/cm) | W-Temp ($^{\circ}$ C) | DWT (cm) ^a | Altitude (m) | Bound phenolics (mg/g DW) | Free phenolics (mg/g DW) | |
|----------------------|------|----------------|---------------------|------------------------|-----------------------|----------------|---------------------------|--------------------------|---------------|
| «Bog» | mean | 3.57 \pm 0.1 | 255 \pm 20.1 | 38.4 \pm 10.5 | 15.2 \pm 0.1 | 18.6 \pm 0.6 | 0.82 \pm 0.01 | 1.5 \pm 0.1 | 1.3 \pm 0.1 |
| | min | 3.31 | 177 | 5.6 | 15.0 | 16.3 | 0.78 | 1.20 | 1.1 |
| | max | 3.90 | 333 | 79.3 | 15.4 | 18.8 | 0.88 | 1.83 | 1.44 |
| «Fen» | mean | 3.84 \pm 0.1 | 338 \pm 19.0 | 12.6 \pm 1.6 | 16.5 \pm 0.5 | 16.3 \pm 4.1 | 0.75 \pm 0.03 | 1.4 \pm 0.2 | 1.1 \pm 0.0 |
| | min | 3.77 | 304 | 8.1 | 16.2 | 11.0 | 0.69 | 1.22 | 0.93 |
| | max | 3.95 | 356 | 19.7 | 17.4 | 19.3 | 0.81 | 1.84 | 1.2 |
| p-value ^b | 0.15 | 0.03 | 0.06 | 0.03 | 0.21 | 0.03 | 0.56 | 0.03 | |

^a Average daily measurements over a period of 1 month.

^b Difference bog/fen (wilcoxon test)

The range of values for the eight measured environmental variables, minimum, maximum and averages for the "fen" and "bog" areas are given in Table 3.1. The Eh potential and water temperature were significantly higher in the "fen" area while altitude and free phenols were significantly higher in the "bog" area ($P < 0.05$). Water pH, conductivity, DWT and the concentration of slightly bound phenolic compounds did not differ significantly between the two areas. All environmental variables, except Kcorr, pH, DWT and altitude, were significantly correlated to free phenolics (Table 3.2) while no environmental variables were significantly correlated to primarily bound phenolics.

Testate amoeba Density and Diversity

The total density of testate amoebae increased significantly with depth in the "bog" area from 3.2×10^4 ind.g⁻¹ DW in the upper segments to respectively 7.45×10^4 and 10×10^4 ind.g⁻¹ DW in the intermediate and lower segments ($P < 0.05$). By contrast there was no significant difference with depth in the "fen" area (average density over the three depths: 4.34×10^4 ind.g⁻¹ DW).

Tableau 3.2: Non-parametric correlation matrix of measured environmental variables along the "fen"/"bog" transition of Le Forbonnet mire

| | Bound phenolics | Free phenolics |
|----------|-----------------|----------------|
| pH | 0.16 | -0.31 |
| Eh | -0.22 | - 0.62 * |
| Kcorr | 0.20 | 0.37 |
| W-Temp | -0.24 | - 0.72 * |
| DWT | 0.02 | 0.10 |
| Altitude | 0.17 | 0.46 |

* correlations significant at the level $P < 0.01$

A total of 28 testate amoeba taxa were identified in the 36 samples analyzed. In the "bog" area, species richness did not vary among the different *Sphagnum* segments (on average, 15 species), while in the "fen" area species richness significantly increased between the upper segments (on average, 12 species) and the intermediate/lower segments (on average, 15 species) ($P < 0.05$). In both areas, the highest diversities were measured in the intermediate and lower segments ($H' = 3.3$), and the lowest diversity in the upper segments ("fen", $H' = 1.8$; "bog", $H' = 2.5$). The equitability index also demonstrated a strong dominance of some species in upper segments ("fen", $J = 0.5$; "bog", $J = 0.7$), while in the intermediate and lower segments the communities were more balanced (both areas, $J = 0.85$).

Vertical micro-distribution

The NMDS ordination of samples from the two sampling areas showed that testate amoeba communities differed significantly along *Sphagnum* segments in the two sampling areas (Fig. 3.1; $P < 0.001$). In the "fen" area the upper segment was clearly different from the intermediate and lower segments, while in the "bog" area this difference was less marked.

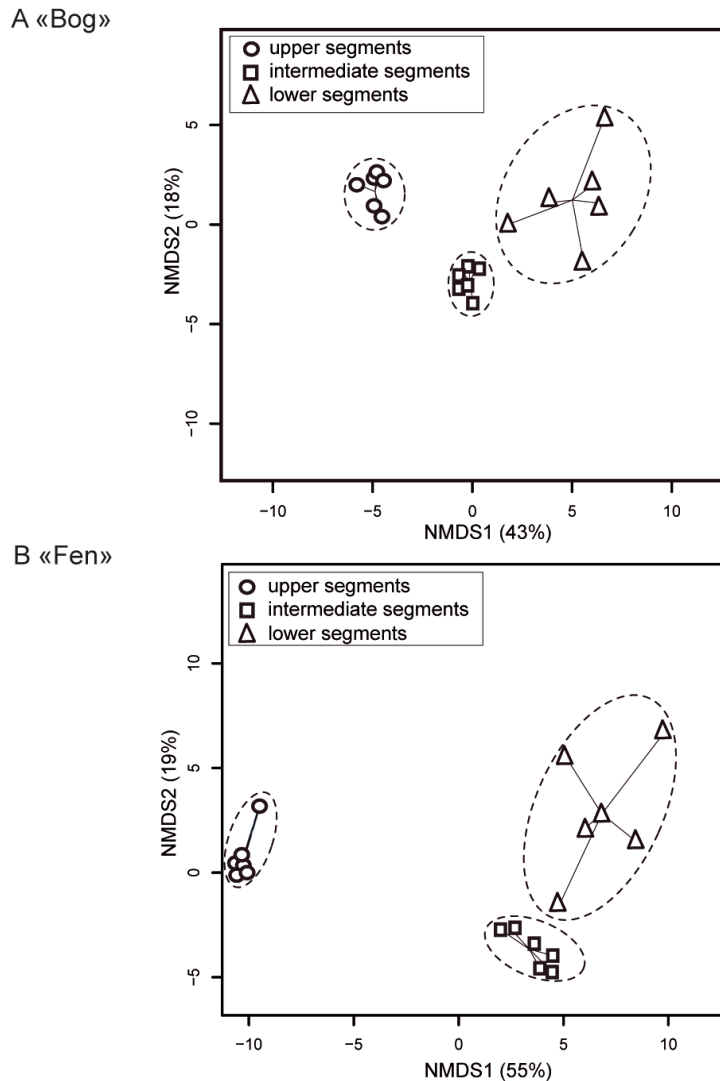


Figure 3.1 : (a) The two primary axes of the 3-dimensional NMDS ordination of testate amoebae communities in the “bog” area from Le Forbonnet mire (France) ($n = 18$, final stress = 4.1). The solution represents 75% of the variability in the data, with axes 1, 2 and 3 representing respectively 43%, 18% and 13%. Samples are coded by sampling area with open symbols. (b) The two primary axes of the 3-dimensional NMDS ordination of testate amoebae communities in the “fen” area ($n = 18$, final stress = 2.4). The solution represents 84% of the variability in the data, with axes 1, 2 and 3 representing respectively 55%, 19% and 10%. Samples are coded by sampling area with filled symbols.

In the “fen” area, the most abundant taxa in the upper segments were *Archerella flavum* (on average 2.2×10^4 ind.g⁻¹ DW) and *Hyalosphenia papilio* (on average 1.5×10^4 ind.g⁻¹ DW) (Fig. 3.2; Annexe 1). The intermediate segments were characterized by an increased of the abundance of *Hyalosphenia elegans* (on average of 8.3×10^4 ind.g⁻¹ DW), *Nebela tinctoria* and *Physochila griseola* (both on average 3.5×10^4 ind.g⁻¹ DW), and a significant decrease in the abundance of *A. flavum* and *H. papilio*. The lower segments were characterized by the highest abundance of *P. griseola* (on average 1.07×10^4 ind.g⁻¹ DW) and *H. elegans* (on average 6.5×10^4 ind.g⁻¹ DW).

In the “bog” area, the most abundant taxa in the upper segments were also *A. flavum* (on average 1.22×10^4 ind.g⁻¹ DW), *N. tinctoria* (on average 3.8×10^4 ind.g⁻¹ DW), *H. papilio* (on average 3.5×10^4 ind.g⁻¹ DW), and *Assulina muscorum* (on average 8×10^4 ind.g⁻¹ DW) (Fig. 3.2; Annexe 1). The intermediate segments were characterized by significantly higher densities of *H. elegans* (on average 1.18×10^4 ind.g⁻¹ DW), *N. tinctoria* (on average 1.0×10^4 ind.g⁻¹ DW), *Amphitrema wrightianum* (on average 9.7×10^4 ind.g⁻¹ DW) and *P. griseola* (on average 7.0×10^4 ind.g⁻¹ DW) and lower density of *H. papilio*. In the lower segments, the most abundant taxa were *P. griseola* (on average 2.4×10^4 ind.g⁻¹ DW) and *N. tinctoria* (on average 9.0×10^4 ind.g⁻¹ DW).

Species-environment correlations

The multiple factor analysis (MFA) of the three environmental matrices and the three testate amoeba data sets confirmed the existence of an overall division between “fen” and “bog” areas (Fig. 3.3). The composition of testate amoebae community in the upper segments was significantly linked to the chemical data and to testate amoeba assemblages of the intermediate segments (Table 3.3). The testate amoeba communities from the intermediate segments were significantly correlated to both chemical and phenolic data. No significant correlation was found between the testate amoeba communities of the lower segment and the environmental data sets. These patterns are further explored in the RDAs.

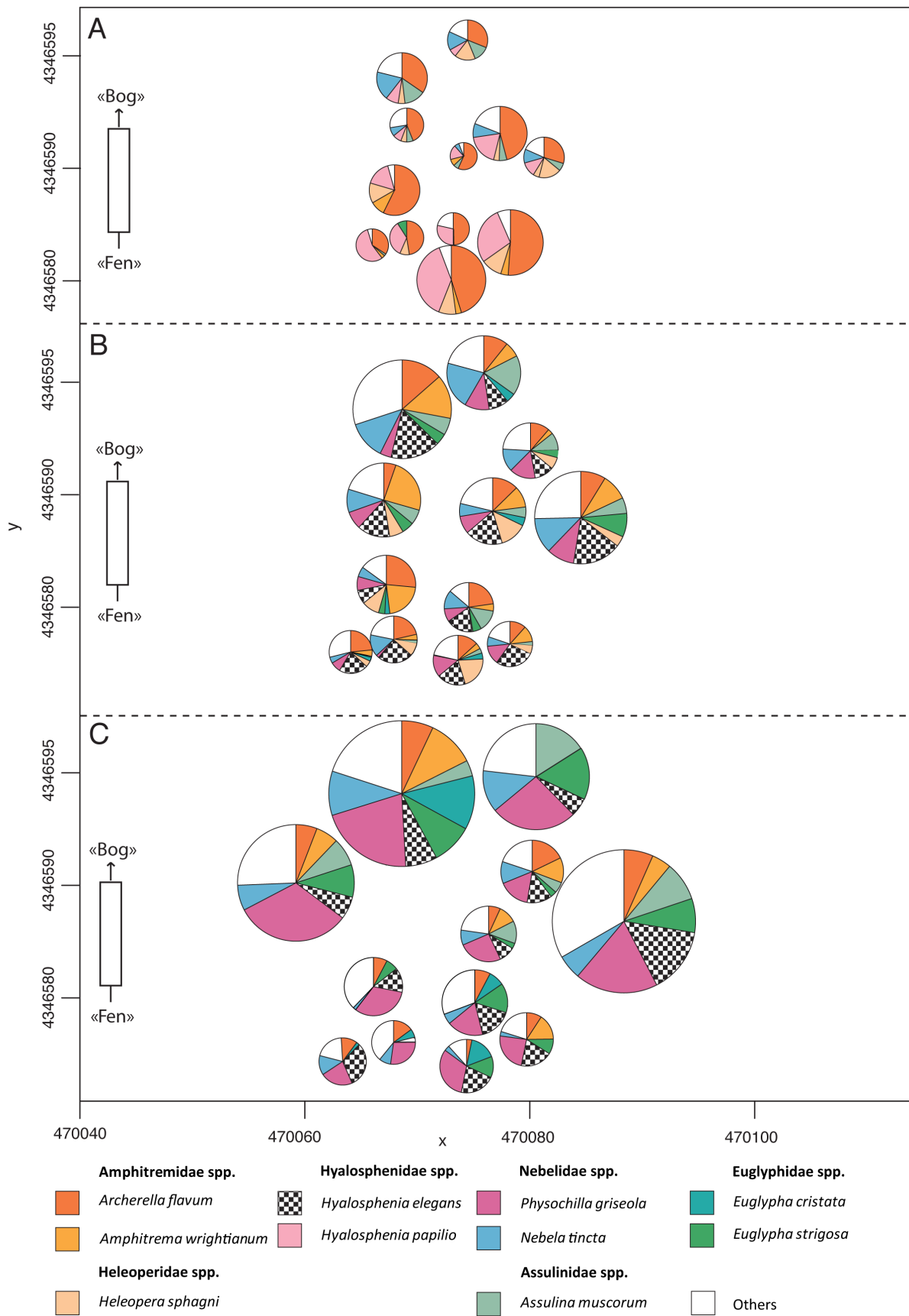


Figure 3.2: Distribution maps of total testate amoeba abundance and of dominant testate amoeba taxa in *Sphagnum fallax* from the two sampling areas in Le Forbonnet mire (France). A = upper (0-3cm) B = intermediate (3-6cm) and C = lower (6-9cm) segments. X and Y axes correspond to GPS data converted into Lambert 2 references. Dot sizes are directly proportional to the number of individuals per aram DW in the samples and are comparable among maps.

In the RDA ordinations (Fig. 3.4), the two areas were clearly separated in the overall analysis as well as for each of the three sampling depths. The model explained 51.8% (adjusted R^2) of the variability in testate amoeba data in the overall analysis and 27.5%, 52.7% and 41.9% (adjusted R^2) of the variability in the data for the upper, intermediate and lower sections respectively. In the overall RDA, testate amoeba communities in the “fen” area were related to higher values of Eh, pH and W-temp, while testate amoeba communities in the “bog” area were related to higher values of phenolics, altitude and conductivity (Fig. 3.4).

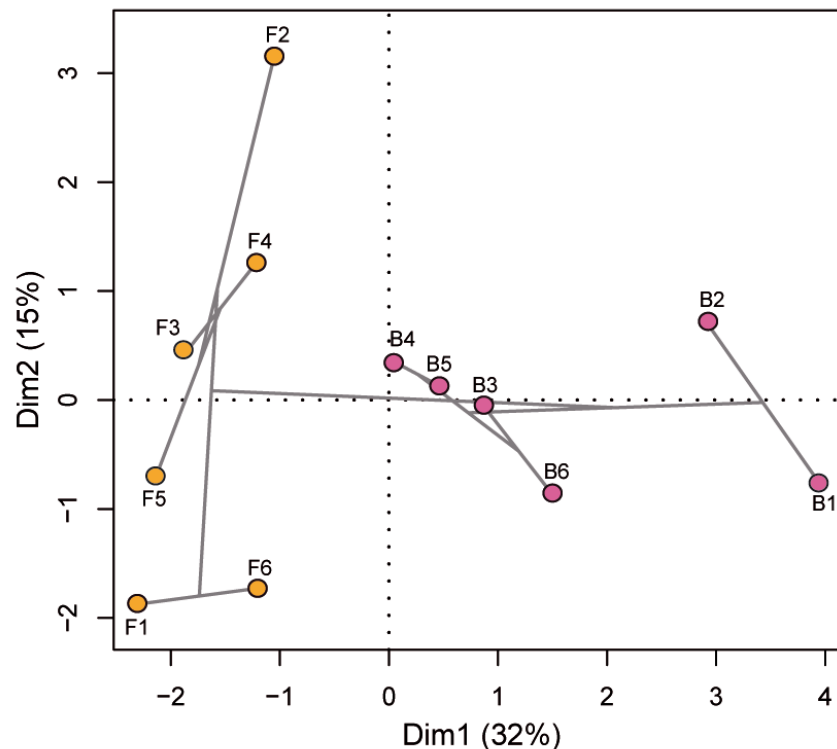


Figure 3.3: Multiple factor analysis of the three testate amoeba communities (Hellinger-transformed) and environmental (chemical, physical and phenolics) data sets from the Forbonnet peatland. Projection of the MFA axes 1 and 2 with the result of a hierarchical agglomerative clustering (grey lines), obtained by the Ward method on the Euclidean distance matrix between MFA site scores, showing two main groups of sampling plots (orange symbols = “fen”, pink symbols = “bog”). Sampling plots are indicated by F (“fen”) or B (“bog”) followed by a number.

The RDA on individual environmental variables revealed that the proportion of testate amoebae data explained by each explanatory variable and the significance varied strongly among variables, between the two areas, and among the three vertical positions (Table 3.5). In the separate RDAs on the “fen” and “bog” samples all sampling depths were significant but no physical or chemical variable was found significant. Free phenolics explained a high proportion of variance in the upper and intermediate *Sphagnum* segments.

Tableau 3.3: RV-coefficients (below diagonal) and corresponding *P*-values (above diagonal) among the six groups of variables used in the MFA of the Forbonnet peatland. Significant coefficients appear in bold.

| | Upper segments | Intermediate segments | Lower segments | Chemical | Physical | Phenolic compounds |
|-----------------------|----------------|-----------------------|----------------|----------|----------|--------------------|
| Upper segments | 1.00 | 0.001 | 0.10 | 0.01 | 0.22 | 0.07 |
| Intermediate segments | 0.78 | 1.00 | 0.16 | 0.02 | 0.32 | 0.02 |
| Lower segments | 0.45 | 0.55 | 1.00 | 0.09 | 0.31 | 0.56 |
| Chemical | 0.51 | 0.43 | 0.34 | 1.00 | 0.57 | 0.14 |
| Physical | 0.21 | 0.24 | 0.26 | 0.05 | 1.00 | 0.82 |
| Phenolic compounds | 0.34 | 0.45 | 0.23 | 0.21 | 0.02 | 1.00 |

The partial RDAs showed that chemical, physical and phenolic data sets each significantly explained, independently of the other two data sets, about 7% of the species data variance ($P = 0.02-0.08$) in the overall RDA. The proportion of variance explained by these data was however much higher in the upper two segments (16.5–34.1%) but on average lower in the third segment where no significant correlation was found for the lower segment (Table 3.5).

Tableau 3.4: Summary of RDA on testate amoebae and environmental variables from Le Forbonnet mire (France): fraction of variance explained and significance of individual variables taken alone.

| Variables | Overall RDA | | «Bog» | | «Fen» | | Upper | | Intermediate | | Lower | |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value |
| Eh | 7.0 | 0.01 | 1.5 | 0.20 | 0.7 | 0.85 | 23.8 | 0.02 | 10.7 | 0.002 | 5.3 | 0.09 |
| Kcorr | 7.0 | 0.01 | 5.1 | 0.10 | 0.3 | 0.77 | 20.9 | 0.01 | 12.4 | 0.02 | 4.9 | 0.11 |
| pH | 0.6 | 0.24 | 0.4 | 0.31 | 0.2 | 0.38 | 2.0 | 0.25 | 2.5 | 0.24 | 2.4 | 0.25 |
| DWT ^b | 0.3 | 0.34 | 0.0 | 0.65 | 5.7 | 0.84 | 1.8 | 0.26 | 0.3 | 0.40 | 1.1 | 0.33 |
| W-Temp | 8.1 | 0.005 | 0.4 | 0.44 | 5.7 | 0.84 | 33.6 | 0.005 | 16.2 | 0.01 | 7.8 | 0.03 |
| Altitude | 7.6 | 0.02 | 7.0 | 0.06 | 0.1 | 0.98 | 30.9 | 0.005 | 15.8 | 0.005 | 7.7 | 0.03 |
| Bound phenolics | 1.4 | 0.13 | 2.1 | 0.27 | 2.0 | 0.98 | 0.1 | 0.32 | 5.4 | 0.11 | 0.1 | 0.97 |
| Free phenolics | 7.0 | 0.02 | 3.2 | 0.16 | 4.4 | 0.79 | 27.1 | 0.02 | 16.9 | 0.005 | 2.3 | 0.25 |
| «Fen»/«Bog» (0/1) | 8.8 | 0.01 | n.a | n.a | n.a | n.a | 38.4 | 0.005 | 14.5 | 0.05 | 8.3 | 0.01 |
| Upper (0/1) | 36.3 | 0.01 | 35.4 | 0.004 | 47.5 | 0.008 | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a |
| Intermediate (0/1) | 4.9 | 0.01 | 3.5 | 0.01 | 3.7 | 0.008 | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a |
| Lower (0/1) | 19.9 | 0.01 | 16.3 | 0.001 | 26.9 | 0.007 | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a |
| Sample depth (1-3) | 35.8 | 0.001 | 33.3 | 0.005 | 52.0 | 0.05 | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a | n.a |

^a Percentage of variance explained (Adjusted R^2)

^b Depth to water table

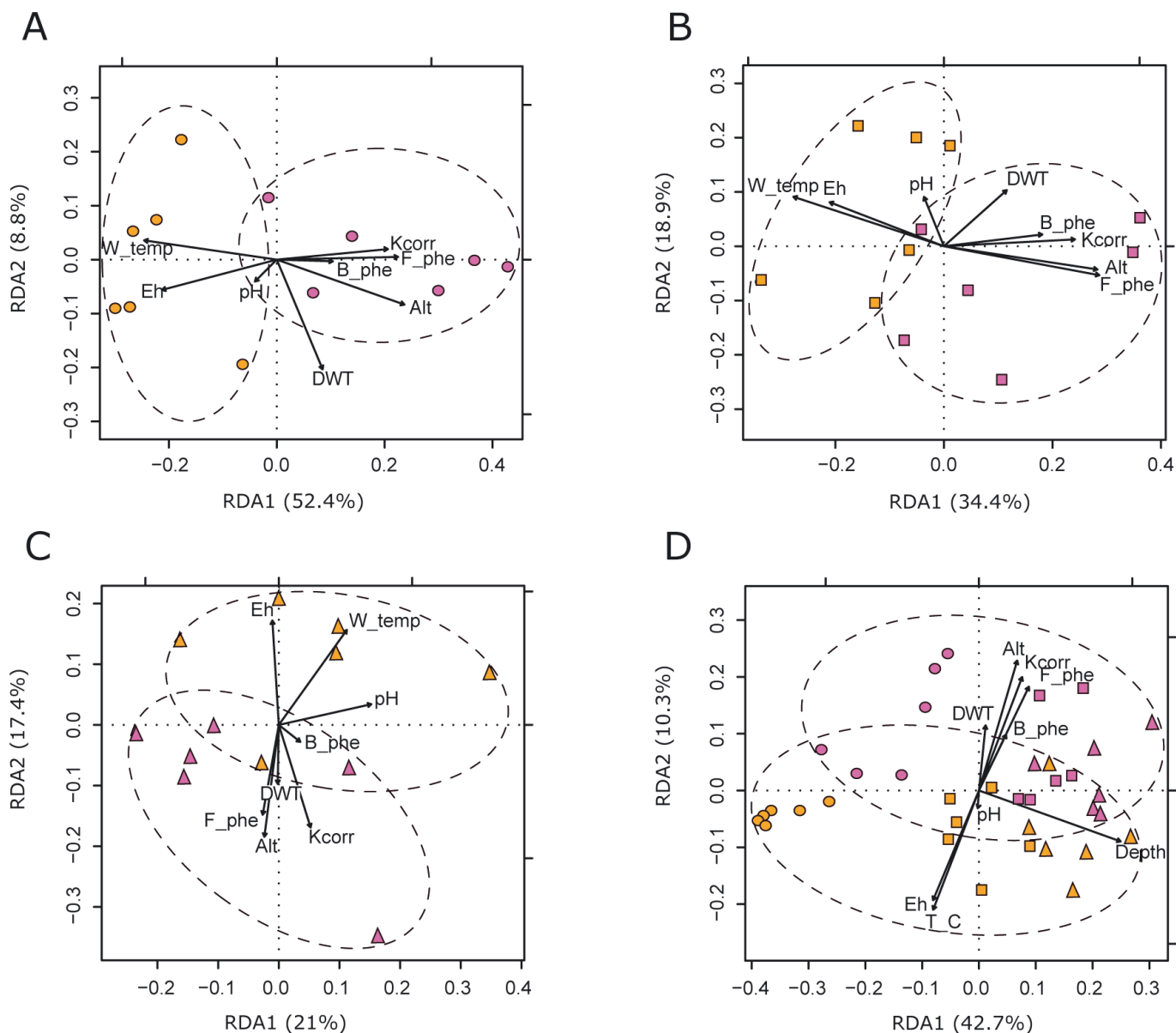


Figure 3.4: Redundancy analyses biplots (axes 1 and 2) of testate amoeba data from Le Forbonnet mire (France) in upper (a), intermediate (b) and lower (c) Sphagnum segments, and the overall data set (d). Sampling areas are coded with open symbol for the “fen” area and with filled symbol for the “bog” area. (e) List of main testate amoebae taxa (> 2% of the total abundance). Solid arrows show significant variables and dashed arrows show non-significant ones. Samples are indicated as follows: circles = upper segments, squares = intermediate segments, triangles = lower segments; open symbols = “fen”, filled symbols = “bog”. F_phe : free phenolics; B_phe : bound phenolics; W-temp: water temperature; Alt: average altitude (microtopography) of the sampled plot; Cond: conductivity.

e) Discussion

Testate amoeba density and diversity

The communities of testate amoeba were dominated by representative of the *Amphitremidae* and *Hyalosphenidae*. This community composition is similar to the hummock fauna described by Heal (Heal, 1961, 1964) along a fen-bog gradient. The similarities between these surveys are not surprising, and support previous studies in illustrating the cosmopolitan distribution of many peatland testate amoeba morphospecies from the same habitat type (Mitchell *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2009). Density is also similar to that reported in other studies on peatlands (Mitchell & Gilbert, 2004; Gilbert & Mitchell, 2006).

Tableau 3.5: Summary RDA and variance partitioning on testate amoebae and environmental variables data from Le Forbonnet mire (France).

| Variables in RDA model | Covariables | Overall RDA | | Upper | | Intermediate | | Lower | |
|---|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value |
| Chemical factors (Eh, pH and Kcorr) | DWT, Altitude, W-temp phenolics compounds | 5.2 | 0.08 | 16.8 | 0.09 | 18.4 | 0.02 | 3.9 | 0.28 |
| Physical factors (DWT ^b , Altitude and W-temp) | Eh, pH, Kcorr phenolics compounds | 7.9 | 0.07 | 34.1 | 0.002 | 16.5 | 0.01 | 8.1 | 0.08 |
| Phenolic compounds (free and bounds phenolics) | Eh, pH, Kcorr DWT, Altitude, W-temp | 6.6 | 0.02 | 25.6 | 0.01 | 14.8 | 0.03 | 6.2 | 0.14 |

^a Percentage of variance explained (Adjusted R^2)

^b Depth to water table

Vertical micro-distribution

Testate amoebae reached their highest Shannon diversity and equitability in the intermediate and lower *Sphagnum* segments. The density of some taxa also differed significantly between the two sampling areas in some segments. The NMDS and RDA revealed contrasting vertical patterns of the testate amoeba communities especially in the "fen" area. *Archerella flavum*, *Heleopera sphagni* and *Hyalosphenia papilio* together represented between 57% ("bog") and 88% ("fen") of the total community in the upper segments, but much less in the intermediate and lower segments. Thus in agreement with previous studies (Heal, 1962; Meisterfeld, 1977; Schönborn, 1965; Mazei *et al.*, 2007; Mieczan, 2009), mixotrophic species largely dominated the community in the upper segments, while heterotrophic species (e.g. *P. griseola* or *Hyalosphenia elegans*) occurred principally in the intermediate and lower segments of *Sphagnum* in both areas.

The vertical micro-distribution of testate amoebae in *Sphagnum* reflects some gradients such as light, temperature, oxygen, prey organisms (Schönborn, 1962; Meisterfeld, 1977). A vertical niche separation among co-generic or otherwise closely related species also appeared in both sampling areas (e.g. the Amphitematidae *Archerella* and *Amphitrema*, and the Hyalospheniidae *Nebela*, *Hyalosphenia* and *Physochila*). This would support the idea of a competitive exclusion mechanism between closely related species of testate amoebae (Mitchell & Gilbert, 2004). Mixotrophic species preferentially colonize the uppermost segments of *Sphagnum*, where their endosymbionts can photosynthesize (Chacharonis, 1956; Heal, 1962; Schönborn, 1965). Testate amoebae also need to find the required material to build their test, and this requirement may be another constraint that determines their vertical micro-distribution (Meisterfeld, 1977; Schönborn, 1963). For example, *Amphitrema wrightianum* and *Archerella flavum*, two closely related mixotrophic taxa, have an ecological niche separation along *Sphagnum* segments (Heal, 1962). *A. flavum* produces a shell composed of self-secreted proteinaceous material whereas *A. wrightianum* uses xenosomes (e.g. organic debris, diatom frustules) (Ogden, 1984). This difference in shell construction explains the different vertical distribution pattern between *A. flavum* (upper segments) and *A. wrightianum* (intermediate segments) in the two sampling areas (Mitchell *et al.*, 2008). The source of material for test construction and the availability of appropriate food thus appear as major regulators of the abundance and the repartition of these species along *Sphagnum* parts (Heal, 1962; Gilbert & Mitchell, 2006; Mieczan, 2007b). In addition, these different constraints could also be taken into account to explain some species distribution patterns along micro-environmental gradients (Mitchell *et al.*, 2008).

Species-environment correlations

Our results agree with earlier studies in identifying the fen/bog gradient as an important factor shaping the structure of testate amoeba communities (Heal, 1961, 1964; Booth, 2002; Mazei *et al.*, 2007; Mieczan, 2007a; Warner *et al.*, 2007). Indeed in the “fen” habitat, *A. flavum*, *H. sphagni* and *H. papilio* were found in greatest abundance and marked the ecological transition in *Sphagnum* upper segments. These species are typically found in habitats with high (> 95%) soil water content (Lamentowicz *et al.*, 2007; Warner *et al.*, 2007; Booth *et al.*, 2008). Other species such as *N. tincta* and *A. muscorum* described as xerophilous (Charman, 1992; Charman *et al.*, 2007) were more abundant in the “bog” habitat. Nevertheless, DWT did not emerge as strongly correlated to testate amoeba communities. The DWT gradient (ca. 3 cm) may not have been long enough to emerge as a significant relationship. However other factors, including altitude,

temperature, Eh, conductivity, and free phenolics did explain a high proportion of the species data and all of these were significantly different or nearly so between the two areas. Thus although DWT almost always emerges as the strongest variable explaining testate amoeba community structure in *Sphagnum* peatlands (Bobrov et al., 1999; Warner et al., 2007), other variables become more important when the DWT gradient is short.

Direct gradient analysis (RDA) with single explanatory variables revealed the correlations of chemical factors (i.e. Eh and conductivity) with testate amoeba communities in upper and intermediate segments. Water chemistry is known to influence testate amoebae reproduction (Heal, 1962) and to contribute to changes in testate amoeba distribution (Opravilova & Hajek, 2006; Mitchell *et al.*, 2000b; Lamentowicz *et al.*, 2007), but generally strongest correlations were reported with pH (Mitchell *et al.*, 1999, 2000b). Mieczan (2009) demonstrated that testate amoeba in the lower section (5-10 cm) were influenced by a combination of chemical and physical factors (DWT and total organic carbon). Chemical factors explained a high proportion of the testate amoeba data in the upper and intermediate segments, and their influence decreased in lower segments. Testate amoebae from the upper segments were most strongly correlated with the physical variables (i.e. altitude and water temperature) while in the lowest segment, of all measured variables only water temperature and altitude were significant. These results illustrate how vertical gradients lead to ecological niche separations in *Sphagnum* peatlands.

Influence of phenolic compounds on testate amoeba communities

Sphagnum phenolics quantified in this work were extracted either water (free phenolics) or solvent (bound phenolics) and the two methods yielded different results and patterns: bound phenolics did not differ along the gradient whereas water-soluble phenolics did suggesting that the amount of free phenolics may respond more strongly to micro-environmental conditions (e.g. moisture content of mosses). These results also suggested that different kind of phenolic compounds or phenolic concentrations characterized those extract. The correlation between free phenolics and testate amoeba communities was particularly clear in the upper and intermediate segments that correspond to the depth sampled for total polyphenol analyses (0 – 6 cm). As the upper segment constitutes most of the biomass of *Sphagnum* mosses owing to the weight of the capitulum (top 1 cm), most of the measured phenols are contained in this segment. This may explain that the correlation between testate amoebae and free phenols was highest in the upper segment and was also high in the intermediate segment. We tentatively interpret the fact that no significant correlation was observed between free or

bound phenols and testate amoebae in the lower segment as an indication that either the patterns of phenol concentration at that depth is not correlated with that of the upper 6 cm or that the amoebae are more influenced by other aspects of water chemistry closer to the water table. These results clearly call for a detailed analysis of phenolics and testate amoebae at different depth, which could not be done at our site owing to the limited amount of material that could be harvested in this long-term experiment.

Among competitive interactions, this study outlines potential chemical interaction between *Sphagnum* and testate amoebae. Recently, phenolic compounds released by *Sphagnum* mosses (e.g. *p*-hydroxyl phenolics) have been shown to possess antibacterial activity (Mellegard *et al.*, 2009). Thus it is possible that free phenolic compounds play a role in testate amoeba assemblages due to their selective positive or negative effects. Although results do not allow to drawing any conclusions on a possible direct (e.g. physiological) and/or indirect (e.g. through impact on prey organisms) effect of phenolics on testate amoeba communities, they raise the issue of the possible role of such compounds. An experimental approach to test such effects is necessary.

f) Conclusions

In this study we explored the community patterns and species-environment relationships of testate amoebae living in *Sphagnum fallax* along a narrow ecological gradient from a poor fen (homogeneous *Sphagnum* carpet) to a “young bog” (mosaic of poor fen and bog microsites). In agreement with our hypotheses we observed differences between the two sampled habitats and a vertical stratification of communities. These results illustrate how strongly microbial communities respond even to short ecological gradients in *Sphagnum*-dominated peatlands. The analysis of testate amoebae from three *Sphagnum* segments allowed us to explore the detailed patterns of species-environment relationships at the time of sampling and showed that slight environmental variations (e.g. altitude and related variables) are significant at the microbial level. This study therefore confirmed that testate amoebae are sensitive to environmental gradients at a very fine scale (Mitchell *et al.*, 2000a). The importance of temporal patterns also would deserve more attention. Indeed, the location and size of different microhabitats and related communities in *Sphagnum* peatlands are not stable over time (Breeuwer *et al.*, 2008) and this is clearly also true for testate amoeba assemblages as attested by the limited existing data on seasonal patterns (Warner *et al.*, 2007) as well as the changes documented in numerous palaeoecological records (Charman, 2001). Understanding environmental controls on testate amoebae communities at these finer spatial and temporal scales is key to improving our ability to interpret the high-resolution fossil

testate amoeba records in peatlands that is starting to be produced (Lamentowicz *et al.*, 2010). This will require both further detailed descriptive studies as well as manipulative experiments using biotic (phenols) and abiotic data and aiming to determine which factors influence testate amoebae and what the mechanisms are.

Acknowledgments

This research is a contribution of the ANR PEATWARM project (Effect of moderate warming on the functioning of *Sphagnum* peatlands and their function as carbon sink). PEATWARM is supported by the French National Agency for Research under the “Vulnerability: Environment—Climate” Program (ANR-07-VUL-010). Further funding to V. Jasseby by the Franche-Comté Region and to E. Mitchell by Swiss National Science Foundation (grants no: 205321-109709/1 and 205321-109709/2) is kindly acknowledged. We thank Michal Hajek and the two anonymous reviewers for their fruitful comments.

2. Caractérisation du régime alimentaire des amibes à thèque *Hyalosphenia papilio* et *Nebela tinctoria* le long d'un gradient écologique du type « haut-bas » marais

Vincent E.J. Jasey, Satoshi Shimano, Christine Dupuy, Marie-Laure Toussaint et Daniel Gilbert (2011) Characterizing the feeding habit the testate amoebae *Hyalosphenia papilio* and *Nebela tinctoria* along a narrow "fen-bog" gradient using digestive vacuole content and ^{13}C and ^{15}N isotopic analyses. *Protist* (in press) doi: 10.1016/j.protis.2011.07.006.

1 Préambule

Lors de l'étude précédente, il a été montré que les paramètres environnementaux (chimie de l'eau, microtopographie, phénols totaux) avaient une grande importance dans la microdistribution spatiale (horizontale et verticale) des amibes à thèque. Toutefois, cette étude n'a pas abordé l'aspect régime alimentaire. En effet, la disponibilité de la nourriture (proies) est également susceptible d'influencer la distribution des thécamoebiens. Les résultats présentés ici sont particulièrement originaux. En effet, il s'agit de la première étude portant sur la comparaison du régime alimentaire de deux espèces de thécamoebiens dans deux zones écologiques différentes. Il s'agit également de la première étude mesurant les isotopes ^{13}C et ^{15}N chez les amibes à thèque, utilisés ici pour caractériser la position trophique de *H. papilio* et *N. tinctoria*, comme cela a été démontré pour les foraminifères dans les réseaux trophiques aquatiques (Iken *et al.*, 2001).

Les résultats obtenus montrent que les deux espèces d'amibes à thèque *H. papilio* et *N. tinctoria* n'ont pas le même régime alimentaire et que leur régime alimentaire est susceptible de jouer un rôle dans leur distribution spatiale horizontale et verticale. De plus, l'utilisation des isotopes ^{13}C et ^{15}N a montré que *H. papilio* et *N. tinctoria* n'avaient probablement pas la même position trophique dans le réseau alimentaire microbien. Ces

résultats soulignent ainsi le fait que la communauté des amibes à thèque présente une structure trophique, jusque là jamais caractérisée.

2 *Characterizing the Feeding Habits of the Testate Amoebae *Hyalosphenia papilio* and *Nebela tinctoria* along a Narrow "Fen-Bog" Gradient Using Digestive Vacuole Content and ^{13}C and ^{15}N Isotopic Analyses*

a) Abstract

Population dynamics and feeding habits of the testate amoebae *Nebela tinctoria* and *Hyalosphenia papilio* were studied along a short "fen" to "bog" gradient in a *Sphagnum*-dominated mire (Jura, France). Samples were collected in living "top segments" (0-3 cm) and early declining "bottom segments" (3-6 cm) of *Sphagnum fallax* peat. Observations of digestive vacuole content and stable isotope analyses (^{13}C and ^{15}N) were used to establish the feeding behavior of both testate amoeba species. Owing to their vertical distribution, the feeding habit of *H. papilio* was described from top segments, and that of *N. tinctoria* from bottom segments. Among identified food sources, those most frequently ingested by *N. tinctoria* were spores and mycelia of fungi (55%), microalgae (25%) and cyanobacteria (8.5%). For *H. papilio*, the most frequently ingested prey were ciliates (55%) and microalgae (35%). Nonmetric Multidimensional Scaling analysis clearly demonstrated that the two species did not have the same feeding habit along the "fen-bog" gradient, and furthermore that a significant spatial split exists in the feeding behavior of *H. papilio*. Additionally, isotope analyses suggested that *H. papilio* and *N. tinctoria* did not have the same trophic position in the microbial food web, probably resulting from their different feeding strategies.

Key words: Ecological gradient; Food reference; ^{13}C and ^{15}N isotopes; Peatland; *Sphagnum*; Testate amoebae.

b) Introduction

Testate amoebae are abundant and diverse unicellular microorganisms (Protozoa) that are especially common in organic-rich soils, lakes, wetlands, and moss habitats (Ogden & Hedley, 1980; Charman & Warner, 1992; Booth, 2001; Mitchell *et al.*, 2008). Because they represent a common and abundant group of free-living terrestrial protists and a major group of predators in the microbial food web (Ogden & Hedley, 1980; Gilbert *et al.*, 1998, 2003), these microorganisms are increasingly recognized as an important component of many ecosystems, especially in peatlands (Mitchell *et al.*, 2008).

Testate amoebae are sensitive to a variety of environmental variables along ecological gradients, including hydrology, pH, or nutrient status (Heal, 1961, 1962, 1964; Mitchell *et al.*, 2000; Mitchell & Gilbert, 2004; Opravilova & Hajek, 2006; Booth *et al.*, 2008). Owing to their decay-resistant shells, testate amoebae are of considerable interest for the study of past and present environmental dynamics in peatlands (Charman, 2001; Andersson & Schoning, 2010; Markel *et al.*, 2010; Tsyganov *et al.*, 2011). The considerable sensitivity of testate amoeba communities to defined ecological features makes them a useful tool in ecological and paleoecological studies (Charman, 2001; Mitchell *et al.*, 2008). However, how different local ecological settings influence their distribution remains unclear. Some data show that testate amoebae may be directly affected by environmental gradients, such as physicochemical factors and/or vegetation composition, which strongly influence their community composition (Mitchell *et al.*, 2000; Booth *et al.*, 2008; Lamentowicz *et al.*, 2010; Jassey *et al.*, 2011a; Tsyganov *et al.*, 2011). In parallel, other studies also suggest that indirect effects on their community composition may be modulated by microbial food webs (e.g. trophic effect) (Mitchell *et al.*, 2003; Beyens *et al.*, 2009; Jassey *et al.*, 2011b). Indeed, as intermediaries between bacterial and invertebrate soil communities (Gilbert *et al.*, 1998), testate amoebae occupy top positions in the microbial food web. Usually considered as having a wide range of feeding preferences, including small organisms (e.g. bacteria, fungi, algae and other protozoa) (Schönborn, 1965, 1982; Ogden and Hedley, 1980; Coûteaux & Pussard, 1983; Coûteaux & Ogden, 1988; Ogden and Coûteaux, 1988; Gilbert *et al.*, 2000, 2003; Schroeter, 2001), and larger organisms (i.e. rotifers and nematodes) (Yeates & Foissner, 1995; Han *et al.*, 2008; Wilkinson & Mitchell, 2010), testate amoebae are potentially sensitive to changing abundance and community structure in lower trophic levels (Gilbert *et al.*, 2000). However, the understanding of the sensitivity of feeding habit of testate amoebae still suffers from the scarcity of available data concerning the range of foods preferentially ingested by testate amoebae, as well as about their feeding behavior in different ecological settings.

Furthermore, little is known concerning the feeding structure of testate amoeba communities, even for dominant species. Although the general nature of ingested foods have been highlighted in peatlands (Gilbert *et al.*, 2000, 2003), it remains unknown whether species commonly described as omnivores (e.g. *Nebela tincta* or *Hyalosphenia papilio*; Gilbert *et al.*, 2000) share the same trophic position in the microbial food web. In this context, stable carbon and nitrogen isotope signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) of testate amoebae have the potential to provide useful and complementary information concerning trophic relationships in soil ecosystems (Vander Zanden & Rasmussen, 1999; Post, 2002; Hyodo *et al.*, 2010). Both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures are effective bulk integrators of long-term diet and complex interactions such as omnivory (Cabana & Rasmussen, 1994; Post, 2002; Anderson & Cabana, 2009). Nitrogen isotope ratios are especially useful estimators of the trophic position among predators and omnivores (Post, 2002; Anderson & Cabana 2005, 2009; Kohzu *et al.*, 2009a).

The present paper introduces a detailed record of testate amoeba feeding habits spanning different ecological settings. Multi-proxy analyses, i.e. digestive vacuole content, abundance of their prey, predation preference estimations, and stable isotope analyses are exploited to establish the feeding behavior of two commonly dominant testate amoebae in *Sphagnum* peatlands: *Nebela tincta*/*N. tincta major* complex (for simplicity hereafter referred to here as *N. tincta*) and *Hyalosphenia papilio* (Heal, 1964; Warner, 1987). Their feeding habits were studied in living *Sphagnum* shoots (living “top segments” and early declining “bottom segments”) along a short ecological gradient from a transitional *Sphagnum*-dominated poor fen (hereafter referred to here as “fen”) to a *Sphagnum* bog with more pronounced micro-topography (hereafter referred to here as “bog”). We hypothesized that the feeding habit of these species would differ and would vary along this ecological gradient, despite their general characterization as omnivores. Considering the different functional traits of *N. tincta* (heterotrophy) and *H. papilio* (mixotrophy) (Mitchell *et al.*, 2004), we also hypothesized that these two species have a different feeding behavior and occupy different trophic position within their community.

c) Results

Microbial Structure

Testate amoeba specimens were differentially distributed along *Sphagnum* segments. Active forms of *H. papilio* were significantly more abundant in top segments than in bottom segments along the gradient (“fen” area: an average of $18\,000 \pm 5\,400$ and $2\,200 \pm 850$ ind.g⁻¹ DM respectively; “bog” area: an average of $4\,100 \pm 1\,400$ and 680 ± 480 ind.g⁻¹ DM respectively). Conversely, active forms of *N. tincta* were significantly less

abundant in top segments than in bottom segments ("fen" area: an average of 160 ± 50 and 1500 ± 710 ind.g⁻¹ DM respectively; "bog" area: an average of 3300 ± 1500 and 8900 ± 2600 ind.g⁻¹ DM respectively) (Tableau 3.6; $P < 0.05$, ANOVA tests). Differences among sampling areas were also recorded, since *H. papilio* was more abundant in the "fen" area than in the "bog" area, while *N. tinctoria* had higher density in the "bog" area than in the "fen" area (Tableau 3.6; $P < 0.05$, ANOVA tests). All of these observations were also recorded for the biomass of *H. papilio* and *N. tinctoria* (Tableau 3.6).

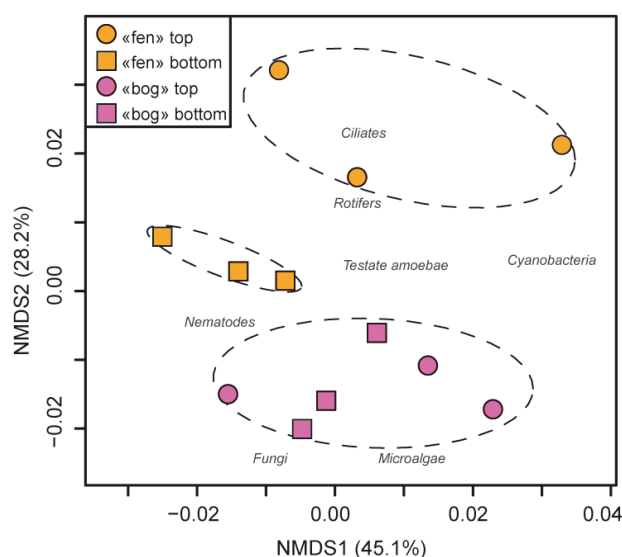


Figure 3.5: Biplot of the two primary axes of the three-dimensional NMDS ordination of microbial community data (final stress = 5.1). Samples are coded by sampling area and by sampling depth, with open symbols represent the "fen" area and filled symbols the "bog" area. Circles represent *Sphagnum*'s top segments and squares *Sphagnum*'s bottom segments. Broken lines indicate homogeneous clusters determined by ANOSIM pairwise comparisons ($R = 0.41$, $P = 0.006$).

The structure of microbial communities along the "fen-bog" gradient differed significantly. The NMDS leading-axis biplot showed that samples of top and bottom segments were clearly separated in the ordination space between the "fen" and the "bog" area (Fig. 3.5; $P = 0.04$, ANOSIM). The densities and the biomasses of the different microbial groups were similarly distributed along the "fen-bog" gradient, with the exception of microalgae and fungi which were more abundant in the "bog", and ciliates which were more common in the "fen" area (Fig. 3.5; Tableau 3.6; $P < 0.05$, ANOVA tests). Microalgae were dominated by Chlorophyceae in both areas (e.g. *Eudorina* sp. and *Cylindrocystis brebissonii*). The community of ciliates was dominated by three species in the two sampling area: *Uronema* sp. ("fen": 41.7% of the total density; "bog": 82.8%), *Playtorea sphagni* ("fen": 24.8%; "bog": 7.9%) and *Paramecium bursaria* ("fen": 32.6%; "bog": 6.4%). An increase of the density and the biomass of fungi was also observed between top and bottom segments in the "fen" area, and for testate amoebae and nematodes in the "bog" area ($P < 0.05$; ANOVA tests).

Tableau 3.6: Densities (per g-1 DM x 103; mean ± standard error) and biomass (µgC g-1 DM; mean ± standard error) of *N. tincta*, *H. papilio* and microbial groups in top and bottom segments along the “fen-bog” gradient of the Forbonnet mire (French Jura; n = 3). For fungi, figures represent the number of fungal hyphae pieces and spores counted in each sampling area.

| | | Fen | | Bog | |
|-------------------------------|---------|--------------|-----------------|--------------|-----------------|
| | | Top segments | Bottom segments | Top segments | Bottom segments |
| | | Mean ± S.E. | Mean ± S.E. | Mean ± S.E. | Mean ± S.E. |
| <i>Hyalosphenia papilio</i> Δ | Density | 18 ± 5.4 | 2.2 ± 0.85 * | 4.1 ± 1.4 | 0.68 ± 0.48 * |
| | Biomass | 518 ± 166 | 65 ± 25 * | 114 ± 34 | 20.3 ± 14 * |
| <i>Nebela tincta</i> Δ | Density | 0.16 ± 0.05 | 1.5 ± 0.71 * | 3.3 ± 1.5 | 8.9 ± 2.6 * |
| | Biomass | 5.2 ± 2 | 50 ± 23 * | 110 ± 49 | 295 ± 85 * |
| Microalgae Δ | Density | 670 ± 300 | 880 ± 470 | 2 900 ± 870 | 3 600 ± 290 |
| | Biomass | 190 ± 47 | 157 ± 105 | 459 ± 99 | 199 ± 36 * |
| Cyanobacteria | Density | 530 ± 370 | 130 ± 64 | 510 ± 340 | 500 ± 380 |
| | Biomass | 35 ± 30 | 9.4 ± 3.5 | 20.6 ± 13 | 61 ± 54 |
| Flagellate | Density | 52 ± 24 | 93 ± 50 | 160 ± 16 | 22 ± 6.4 |
| | Biomass | 4 ± 2 | 21.6 ± 3 * | 15.1 ± 14 | 10.5 ± 3 |
| Testate amoebae Δ | Density | 31 ± 7.3 | 40 ± 3.4 | 49 ± 8.8 | 62 ± 4.8 * |
| | Biomass | 701 ± 150 | 574 ± 67 | 344 ± 98 | 877 ± 108 * |
| Ciliate Δ | Density | 26 ± 5.1 | 22 ± 4.4 | 9.9 ± 3.2 | 12 ± 5.9 |
| | Biomass | 32 ± 4 | 90 ± 46 | 5.4 ± 2.2 | 50 ± 18 * |
| Rotifera | Density | 24 ± 9.7 | 14 ± 1.7 | 12 ± 3.2 | 20 ± 6.4 |
| | Biomass | 359 ± 9 | 429 ± 52 | 324 ± 112 | 443 ± 105 |
| Nematoda | Density | 3.1 ± 1.7 | 9.0 ± 4.7 | 3.9 ± 0.91 | 8.7 ± 2.7 |
| | Biomass | 57 ± 29 | 153 ± 64 | 79.5 ± 27 | 170 ± 86 |
| Fungi | Density | 83 ± 36 | 1 100 ± 97 * | 630 ± 180 | 1 100 ± 290 |
| | Biomass | 21 ± 9 | 290 ± 25 * | 161 ± 46 | 276 ± 75 |

Δ indicates fen/bog difference ($P < 0.05$, ANOVA test)

* indicates top/bottom difference ($P < 0.05$, ANOVA test)

General Feeding Habit of Testate Amoeba Specimens

The frequencies of *H. papilio* specimens associated with a prey was the same in the two sampling areas (“fen”: $57.9 \pm 10\%$; “bog”: $53.7 \pm 4\%$), while frequencies of *N. tincta* specimens associated with a prey were higher in the “fen” area ($89.1 \pm 5\%$) than in the “bog” area ($55.8 \pm 4\%$) (Annexe 2). The frequency of unidentified prey was $< 5\%$ in both sampling areas for both testate amoeba species. The number of specimens observed in association with a prey was positively correlated with the number of active individuals ($n = 12$, $r = 0.78$, $P < 0.01$). Because of the vertical microdistribution of the two species in the top and bottom segments (Table 3.6), the feeding habit of *H. papilio* was investigated in detail from top segments only, and similarly that of *N. tincta* from bottom segments.

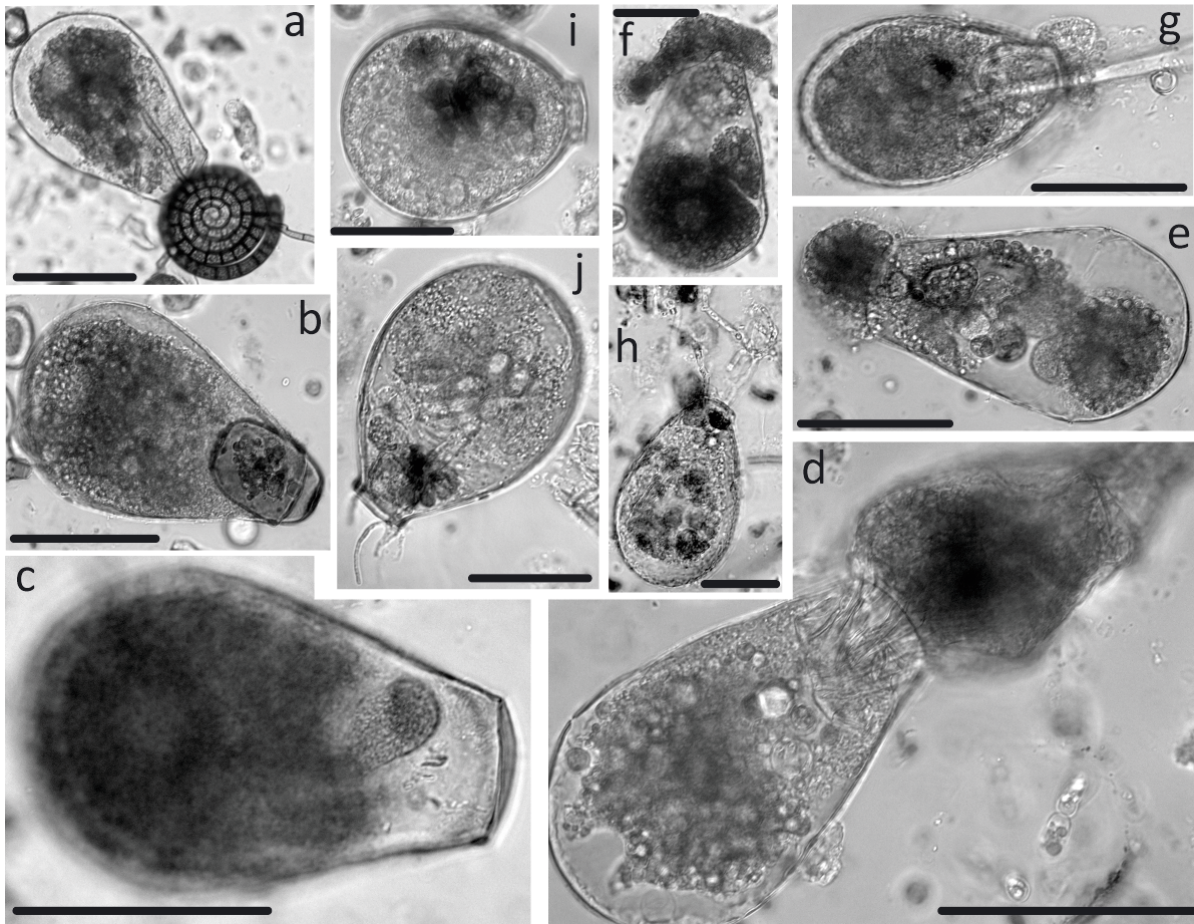


Figure 3.6: *H. papilio* associated with fungal hyphae (A), testate amoebae (*Archerella flavum*) (B), ciliate (C, E, F), and rotifer (D). *N. tincta* associated with plant cell and ciliate (G), fungal hyphae and (or) pieces of fungal spores (H, I, J) and cyanobacteria (J). Scale bars indicate approximately 50 μm .

Among the identified food sources, those most frequently ingested by *N. tincta* along the “fen-bog” gradient were spores and mycelia of fungi (“fen”: 55.6% of the total identified predator-prey associations; “bog”: 59.3%; including hyphae of ascomycetes and spores of *Helicoon pluriseptatum*), microalgae (“fen”: 27.3%; “bog”: 23.9%; primarily *Eudorina* sp. and *Cylindrocystis brebissonii*) and cyanobacteria (“fen”: 8.6%; “bog”: 9.1%, notably *Anabaena* spp.) (Figs 3.6g-j, 3.7a). Predation of protozoa and micrometazoa such as rotifers and testate amoebae (e.g. *Archerella flavum*) was low along the “fen-bog” gradient. Conversion of these data to total biovolumes ingested modified these proportions considerably: the proportion of fungi decreased (“fen”: 25.5%; “bog”: 31.8%), and that of ciliates (“fen”: 19.6%; “bog”: 11.9%) and rotifers (“fen”: 21.8%; “bog”: 25.1%) increased (Fig. 3.7b). Preferential predation indices highlighted that *N. tincta* fed evenly on rotifers, microalgae, ciliates and fungi in the “fen” area ($\alpha = 0.2$), while in the “bog” area they fed preferentially on ciliates ($\alpha = 0.6$) and rotifers ($\alpha = 0.2$) (Table 3.7).

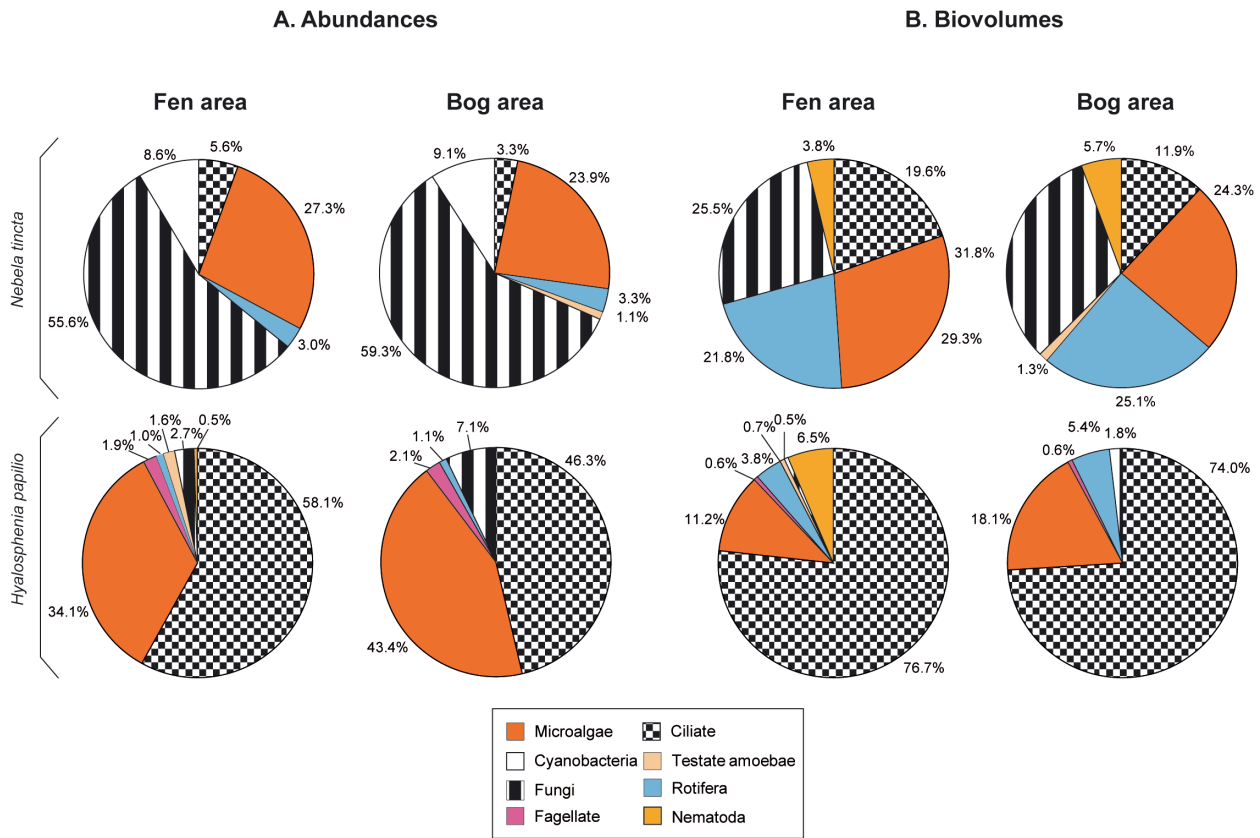


Figure 3.7: (a) Relative proportions (%) of the different identified prey categories abundance ingested by *H. papilio* and *N. tinctoria* specimens along the “fen-bog” gradient. (b) Relative proportions (%) of the different identified prey categories ingested by *H. papilio* and *N. tinctoria* specimens along the “fen-bog” gradient converted into biovolumes.

For *H. papilio*, the most frequently identified food sources in the “fen” area were ciliates (58.1% of the total identified predator-prey associations, including *Paramecium bursaria* and *Platytricha sphagni*) and microalgae (34.1%, predominantly *Eudorina* sp. and *Cylindrocystis brebissonii*). In the “bog” area, the most frequently ingested prey were ciliates (46.3%), microalgae (43.4%), spores and mycelia of fungi (7.1%) (Figs 3.6a-f, 3.7a). Predation of rotifers (e.g. *Habrotricha* sp.) and testate amoebae (e.g. *Archerella flavum*) appeared to be low along the “fen-bog” gradient. With consideration to the biovolume ingested by *H. papilio*, ciliates represent an average of 75% of the total identified predator-prey associations in the two sampling areas, microalgae only 15%, and rotifers increased up to 5.4% (Fig. 3.7b). The preferential predation ratio revealed that ciliates ($\alpha \geq 0.8$) were preferentially ingested by *H. papilio* in the two sampling areas, while the index of preference for microalgae was very low ($\alpha < 0.05$) (Table 3.7).

Spatial Feeding Activity of Testate Amoeba Specimens

NMDS ordination of the feeding habit of the two testate amoeba species from the two sampling areas showed that *H. papilio* and *N. tincta* differed markedly between the two sampled areas ($P = 0.001$, ANOSIM; Fig. 3.8). This ordination showed that ciliates were essentially associated to *H. papilio* and fungi to *N. tincta*. NMDS also highlighted that feeding habits of *H. papilio* differed only slightly along the “fen-bog” gradient, while no spatial differences of feeding activity at all were detected in *N. tincta*.

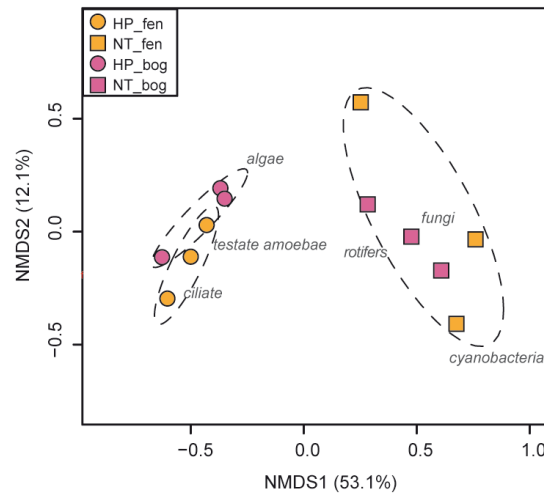


Figure 3.8: The first two primary axes of the three-dimensional NMDS ordination of testate amoebae feeding habit along the “fen-bog” gradient (*H. papilio* = HP; *N. tincta* = NT) (final stress = 9.4). Samples are coded by sampling area and by species, with open symbols represent the “fen” area and filled symbols the “bog” area. Circles represent *H. papilio* (HP) and squares *N. tincta* (NT). Broken lines indicate homogeneous clusters determined by ANOSIM pairwise comparisons ($R = 0.81$, $P = 0.001$).

Tableau 3.7: Preferential predation ratios (α) of the different prey ingested by *H. papilio* (HP) and *N. tincta* (NT) specimens along the “fen-bog” gradient

| | microalgae | cyanobacteria | flagellate | testate amoebae | ciliate | rotifer | nematoda | fungi |
|--------|-------------|---------------|-------------|-----------------|--------------|-------------|------------|-------------|
| HP_fen | 0.05 ± 0.04 | 0.0 ± 0.0 | 0.01 ± 0.01 | 0.01 ± 0.01 | 0.76 ± 0.1 * | 0.02 ± 0.01 | 0.12 ± 0.1 | 0.02 ± 0.01 |
| NT_fen | 0.21 ± 0.2 | 0.14 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.19 ± 0.1 | 0.28 ± 0.2 | 0.0 ± 0.0 | 0.18 ± 0.1 |
| HP_bog | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.12 ± 0.07 | 0.0 ± 0.0 | 0.85 ± 0.1 * | 0.02 ± 0.02 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |
| NT_bog | 0.01 ± 0.0 | 0.08 ± 0.06 | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 | 0.57 ± 0.1 * | 0.21 ± 0.1 | 0.0 ± 0.0 | 0.11 ± 0.1 |

Figure 3.9 illustrates variations among the dominant ingested food types along the “fen-bog” gradient: microalgae, fungi (mycelia and spores), ciliates, and other protozoa and micrometazoa (flagellates, testate amoebae, rotifers, nematodes). A significant relationship was identified between the density of fungi and the frequency of their ingestion by *H. papilio* between the “fen” and “bog” areas ($r = 0.83$, $P = 0.01$) (Fig. 3.9a, b). Another significant relationship was found between the densities of ciliates along the gradient and the frequency of their ingestion by *H. papilio* ($r = 0.91$, $P =$

0.001) (Figs 3.9a, b, 3.10a), and more specifically with the mixotrophic species *Playtorya sphagni* ($r = 0.80$, $P = 0.051$) and *Paramecium bursaria* ($r = 0.94$, $P = 0.004$) (Fig. 3.10c, d). No correlation was found between the dominant group of ciliate (*Uronema* sp.) and the frequency of ciliate ingestion by *H. papilio* ($r = 0.44$, $P = 0.38$) along the ecological gradient (Fig. 3.10d). On the other hand, a positive correlation was found between the densities of ciliates and *H. papilio* along the ecological gradient ($r = 0.84$, $P = 0.03$). Such relationships were not identified between *N. tincta* predation and the ambient densities of various food sources. However, a significant linear correlation exists between the density of fungi and the density of *N. tincta* in both *Sphagnum* ecotypes ("fen": $r = 0.71$, $P = 0.03$; "bog": $r = 0.67$, $P = 0.04$).

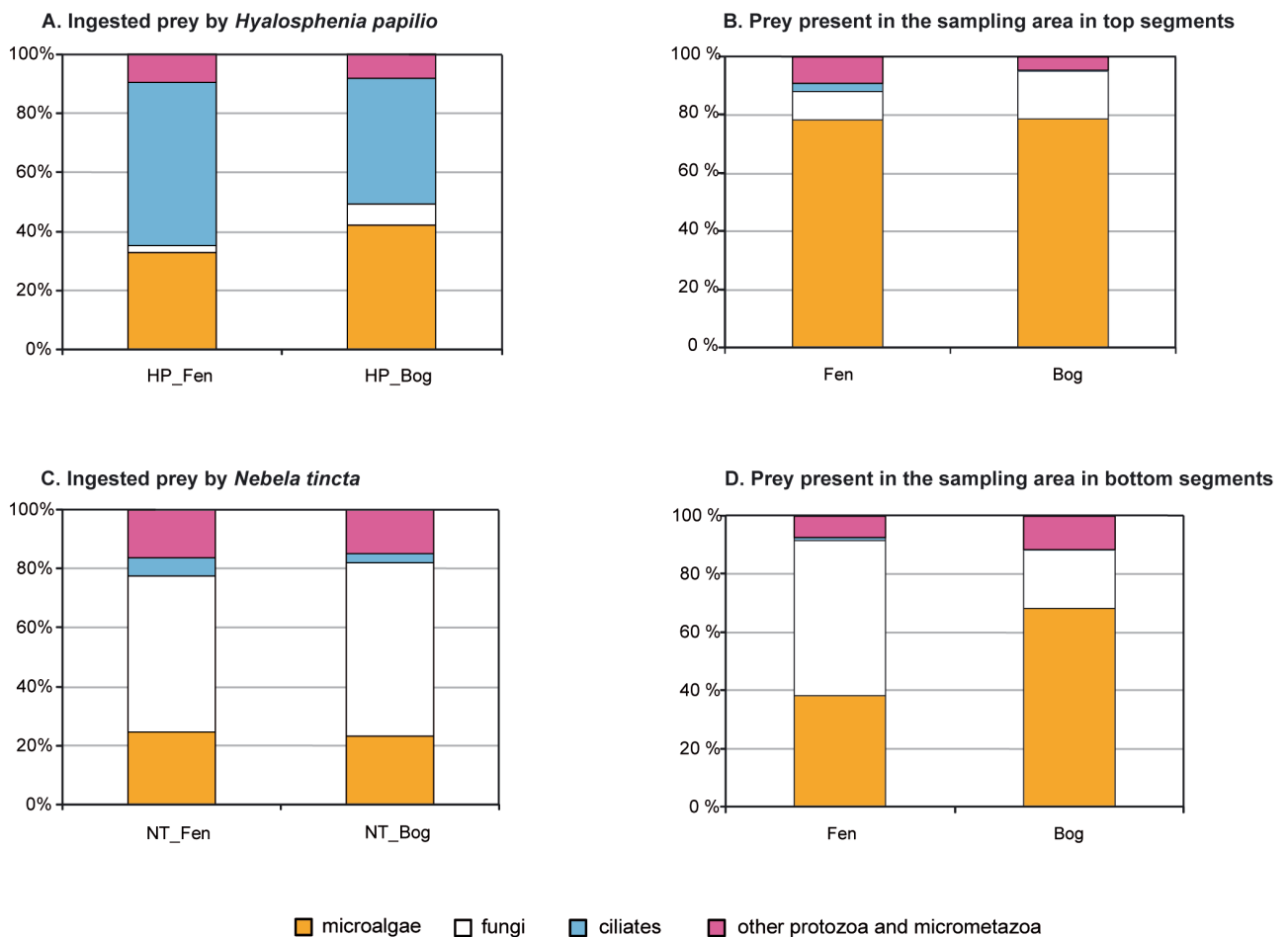


Figure 3.9: Spatial relative proportion of variations of the identified prey ingested (a) by *H. papilio* and (c) by *N. tincta*. Relative proportion of the abundance of the same categories in (b) top and (d) bottom segments of *Sphagnum fallax*.

Isotopic Composition of Testate Amoeba Specimens

Composite testate amoeba samples produced enriched $\delta^{15}\text{N}$ and $\delta^{13}\text{C}$ values relative to baseline values determined from *S. fallax* foliage (Table 3.8). The average enrichment is in the order of 9‰ for $\delta^{15}\text{N}$ and 3‰ for $\delta^{13}\text{C}$. Among the two species considered, *N. tincta* isotopic values are consistently enriched relative to those obtained from *H. papilio*, by 0.9 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ and 2.4 ‰ for $\delta^{15}\text{N}$. This level of consistent inter-specific isotopic variability implies that *N. tincta* occupies a slightly higher trophic position than *H. papilio* in the peat-soil microfauna.

Tableau 3.8: Isotopic ratios (‰) of carbon and nitrogen in *Sphagnum fallax* leaf tissues ($\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$, mean \pm standard error, n = 6) and of pooled specimens of *N. tincta* and *H. papilio* ($\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$, n = 1) from the Forbonnet mire (French Jura).

| Species name | $\delta^{13}\text{C}$ (‰) | $\delta^{15}\text{N}$ (‰) |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| <i>Sphagnum fallax</i> | -27.3 \pm 0.1 | -6.2 \pm 0.1 |
| <i>Nebela tincta</i> | -23.5 | 4.6 |
| <i>Hyalosphenia papilio</i> | -24.4 | 2.2 |

d) Discussion

Feeding Behavior of Testate Amoeba Specimens along the Ecological Gradient

The feeding behavior of *N. tincta* and *H. papilio* differs markedly irrespective of ecological settings. The variability of their functional traits (heterotrophy vs. mixotrophy, respectively) could explain such variability. Indeed the mixotrophic taxons – *H. papilio* – preferentially live in top *Sphagnum* segments, while the heterotrophic taxons – *N. tincta* – live in deeper *Sphagnum* segments (Booth, 2002; Mitchell & Gilbert, 2004; Jassey *et al.*, 2011a). In addition to environmental parameters influencing their vertical microdistribution (Jassey *et al.*, 2011a), we showed a certain variability of the biomass and the abundance of their identified prey along *Sphagnum* shoots, which may also influence their distribution and their feeding behavior.

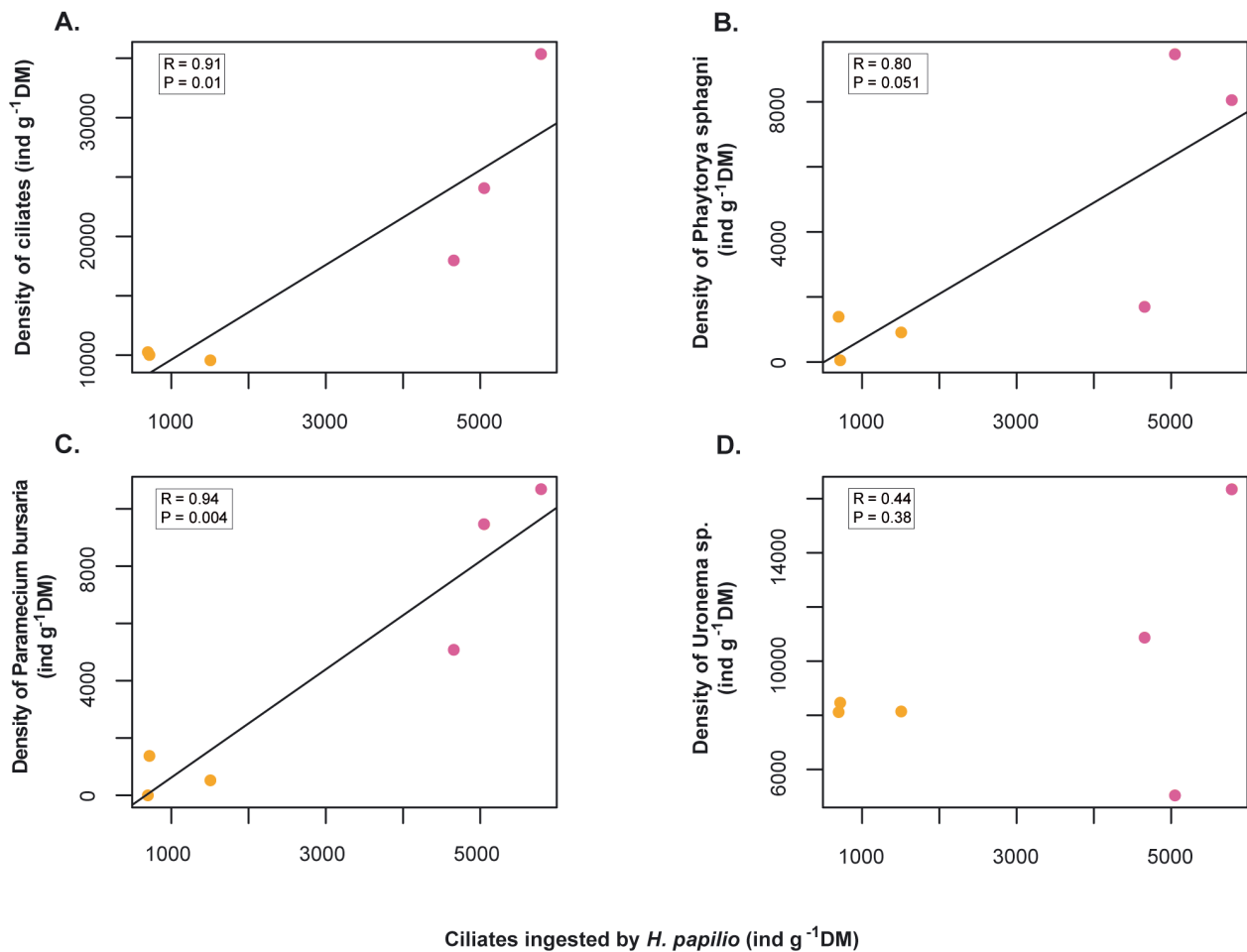


Figure 3.10: Ciliates ingested by *H. papilio* (ind.g⁻¹ DM) plotted against (a) the density of ciliates (ind.g⁻¹ DM), (b) the density of *Playtorya sphagni* (ind.g⁻¹ DM), (c) the density of *Paramecium bursaria* and (d) the density of *Uronema* sp. Open symbols represents the "bog" area and filled symbols the "fen" area. Lines are regression line, significant at $P = 0.05$ level (ANOVA tests).

Among identified foods, those most frequently ingested by *N. tincta* were fungi (55%) and microalgae (25%). Gilbert *et al.* (2003) previously identified fungi and microalgae as the primary food source for *N. tincta*, accounting for 36% and 45% of total annual diet, respectively. Our feeding observations now further demonstrate that feeding activity of *N. tincta* is essentially unchanged along the ecological gradient despite differences within the ambient microbial community abundance and structure. The lack of spatial variation is perhaps not surprising given the high density of fungi and microalgae in both sampling areas. We predict that seasonal dynamics of food sources remain a key factor regulating feeding behavior of *N. tincta*, as described by Gilbert *et al.* (2003).

The positive correlation between the densities of fungi and *N. tincta* within *Sphagnum* shoots, and the high frequency of fungal associations suggested that fungal standing crop was a primary determinant of the ecology of *N. tincta*, as supposed for *Phryganella acropodia* in soils (Coûteaux, 1985; Ogden & Pitta, 1990; Schröter, 2001; Vohnik *et al.*, 2009, 2011). Although these results seem to indicate that *N. tincta* is

rather a fungal specialist (Coûteaux & Dévaux, 1983; Coûteaux, 1985; Ogden & Pitta, 1990), two lines of evidence contrast with such a conclusion. First, grazing by *N. tincta* on the most common co-occurring microorganisms was frequently observed, as well as an opportunistic feeding behavior on protozoa and micrometazoa. Additionally, it remains unclear if mycophagous species preferentially consume hyphae, feed on exudates from hyphae, or ingest bacteria feeding on fungal exudates (Coûteaux, 1985; Wilkinson & Mitchell, 2010).

Second, it is important to recognize the inherent limitations of studying feeding behavior using light microscopy alone, despite the value of these data with respect to gaining a better understanding of testate amoebae autecology. With consideration to the biovolumes ingested by *N. tincta*, the data highlight the potential role of ciliates or rotifers in its feeding habit. Indeed, an ingested ciliate or rotifer is 10 up to 20 times larger than the pieces of fungal mycelium frequently ingested by testate amoebae. The preferential predation ratios likewise suggested that *N. tincta* preferred to select protozoa and micrometazoa when they were easily available. In addition, fungal mycelia or spores were easily identifiable (even dead) among digestive vacuole content of *N. tincta* because of their rigid cell walls (Ogden & Pitta, 1990). Ultimately, their ingestion frequencies were probably quite accurate, whereas those recorded for ciliates or rotifers were most likely underestimated (Gilbert *et al.*, 2003). Unicellular protozoa may disappear faster from the digestive vacuole of testate amoebae (Gilbert *et al.*, 2000), while fungal mycelia or spores recorded in shells are not always assimilated by testate amoebae and simply ended in the shells by chance (Coûteaux & Dévaux, 1983; Ogden & Pitta, 1990). Therefore, the feeding habit of *N. tincta* seems to be rather generalist than fungal specialist and focused on the major sources of carbon and nitrogen.

Information on general feeding behavior in *H. papilio* showed that this species essentially fed on ciliates (52%) and microalgae (38%). Generally, this species is described as having a wide variety of food sources including fungi, cyanobacteria, microalgae, ciliates and metazoans (Gilbert *et al.*, 2000). However, few data are available concerning the frequency of prey ingestion in *Sphagnum* habitats. Together, our results indicate that this species preferentially selected ciliates in the environment. In particular, *H. papilio* associated with ciliates were more closely correlated with the larger mixotrophic species *Playtorya sphagni* and *Paramecium bursaria* than with the smaller yet dominant ciliate *Uronemasp*. Although our results showed that *H. papilio* fed on resources within a wide range of body size, the results on ciliate assimilation seem support the optimal foraging theory which states that organisms forage in such a way as to maximize their net energy intake (Stephens and Krebs, 1986; Petchey *et al.*, 2008). The frequent and rapid shifts of *Uronema* in the environment may also explain such

results. Because the size of our data set is limited, and ciliates associated with *H. papilio* were not always recognizable, it is difficult to draw strong conclusions regarding the ability of *H. papilio* to select among mixotrophic ciliates. Finally, the significant correlation between the densities of *H. papilio* and ciliates imply that predation was density-dependant along the investigated environmental gradients.

The slight spatial variability of feeding behavior of *H. papilio* means that this species has different ecological niches along the ecological gradient relative to *N. tinctoria*. Jassey *et al.* (2011a) showed that the specific environmental features described in the “fen” and the “bog” areas (i.e. a suite of distinct microhabitats with respect to water chemistry, microtopography, and vegetation cover) clearly affected the distribution of testate amoebae, especially *H. papilio*. In the same way, ciliates were also influenced by these distinct microhabitats. For instance, strong variations in the density of *Paramecium bursaria* and *Playtorea sphagni* were recorded between the two areas. The structure of the *Sphagnum* carpet (i.e. patchiness of vegetation) has been recognized as influencing ciliate community structure and abundance at fine ecological scales (Mieczan, 2010). Therefore, vegetation patchiness along the “fen-bog” gradient may directly influence the occurrence of ciliates and *H. papilio*, and indirectly that of *H. papilio* through its feeding behavior.

$\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ Trophic Enrichment in Peatland Microbial Food Web

Isotopic signatures of peatland trophic interactions are relatively scarce. A few studies have used $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ in plant tissues to infer past moisture variations, although such relationships remain complex (Loader *et al.*, 2007; Loisel *et al.*, 2008; Andersson and Schoning, 2010; Markel *et al.*, 2010). The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signatures of *S. fallax* (-27‰ and -6‰, respectively) reported here correspond well to those previously found in peatlands (Price *et al.*, 1997; Asada *et al.*, 2005; Bragazza *et al.*, 2005, 2010; Loader *et al.*, 2007; Andersson & Schoning, 2010; Markel *et al.*, 2010).

The $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ signals recorded for testate amoeba specimens were enriched relative to those of *S. fallax* (an average increase of 3‰ and 9‰ respectively, occurred) suggesting trophic enrichment between *Sphagnum* mosses and testate amoebae. As the major source of organic matter in peatlands (Francez & Loiseau, 1999; Gilbert & Mitchell, 2006), *Sphagnum* represents a potential isotopic baseline of the microbial food web. However, the consumer $\delta^{13}\text{C}$ values are generally similar (< 1‰ difference) to those of their diet, while consumer $\delta^{15}\text{N}$ values are about 3‰ higher than those of their diet (Post, 2002; Hyodo *et al.*, 2010). These findings indicate that preferential incorporation and accumulation of ^{13}C and ^{15}N from *Sphagnum* to testate amoebae occurs, probably mediated by the microbial food web. Even though microorganisms are consistently

enriched in ^{13}C relative to adjacent plant substrates (Dijkstra *et al.*, 2006; Hyodo *et al.*, 2010), testate amoebae cannot directly feed on *Sphagnum*. *Sphagnum* cells are difficult to assimilate by protozoa and require prior decomposition by fungi or bacteria (Gilbert, 1998; Gilbert *et al.*, 2000, 2003; Gilbert & Mitchell, 2006). Conversely, and as described in this paper, microalgae and fungi are directly assimilated by both testate amoeba species. In this context, the characterization of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ enrichment at each trophic level of the microbial food chain should be investigated, following the lead taken in other aquatic or terrestrial ecosystems (Vander Zanden & Rasmussen, 1999; Kohzu *et al.*, 2009b; Hyodo *et al.*, 2010).

The differential $\delta^{15}\text{N}$ enrichment of 2.4‰ between *H. papilio* and *N. tinctoria* suggests that these two species do not occupy identical trophic positions in the microbial food web, corroborating our previous observations on their feeding habits. Although, there is a still lack of isotopic data addressing the various food sources commonly ingested by these species, one hypothesis is that differences in the $\delta^{15}\text{N}$ signature of *N. tinctoria* and *H. papilio* emerge from their different feeding strategies. Indeed, fungal mycelia are typically enriched in ^{15}N (Hobbie & Colpaert, 2004; Lindahl *et al.*, 2007; Bragazza *et al.*, 2010). For example, the $\delta^{15}\text{N}$ of fungi in tundra varies between 1.5 and 3‰ (Mayor *et al.*, 2009). Although our results suggest some importance of ciliates and rotifers in the diet of *N. tinctoria*, more than 50% of predator-prey associations were with fungi. Thus, the ^{15}N enrichment of *N. tinctoria* may result from this mycophagous behavior. At the same time, peatland ciliates are recognized as bacterivores and algivores that typically retain depleted ^{15}N signatures (Mieczan, 2007, 2009). Bacteria have a greater potential for immobilizing nitrate depleted in ^{15}N in bog litter (Bragazza *et al.*, 2010). An alternative hypothesis is that mixotrophy alters the $\delta^{15}\text{N}$ signature of *H. papilio*. In addition to ingested food particles, *H. papilio* also contains endosymbiotic algae, which represent a potential alternate source of energy (Wilkinson & Mitchell, 2010). Few studies have attempted to quantify the energetic benefits of endosymbiotic algae, although a strong case has been made about the importance of this energy source in *H. papilio* (Schönborn, 1965).

Because $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ data pertaining to peatland microbial food webs are presently limited, more research in this area is warranted. Our data set is also limited, rendering it to draw difficult strong conclusions about the trophic positions of *N. tinctoria* and *H. papilio*. However, the pooled species-specific isotopic values verify that both *N. tinctoria* and *H. papilio* in *Sphagnum* peatlands target specific foods types, and these species probably do not occupy the same trophic position in the microbial food web of peatlands. Further measurements are required to assess seasonal variations of feeding behavior among these microbial communities.

e) Methods

Field sampling and laboratory analyses: Experiments were conducted on Le Forbonnet peatland, an undisturbed *Sphagnum*-dominated mire situated in the Jura Mountains (Doubs, France, 46°49'35"N, 6°10'20"E) at an altitude of 840 m above sea level (Fig. 3.11). Cold winters (on average -1.4 °C) and mild summers (on average 14.6 °C) characterized the site. The annual mean temperature measured at the site over a one-year period from 5th November 2008 to 30th November 2009 was 6.5 °C and the annual precipitations 1200 mm.

Samples of *Sphagnum fallax* were collected on June 26th 2008 within homogeneous and similar plots of *S. fallax* carpet across two adjacent areas selected in relation to their wetness, soil micro-topography, vegetation, and degree of humification (Delarue *et al.*, 2011). The first sampling area (called "fen") was a transitional *Sphagnum*-dominated poor fen, relatively flat and homogeneous, characterized by a moss cover dominated by *S. fallax* and by the lack of *S. magellanicum*. Vascular plants such as *Eriophorum vaginatum*, *Vaccinium oxycoccus* and *Andromeda polifolia* were recorded in very low abundance. *Scheuchzeria palustris* and *Carex limosa* occurred outside of the studied plots. The second sampling area (called "bog") was a *Sphagnum* bog directly adjacent to the fen area. Patterns of hummocks with *S. magellanicum*, *V. oxycoccus*, *E. vaginatum* and *Calluna vulgaris*, and hollows with lawns of *S. fallax*, *Carex rostrata* and *A. polifolia* characterized the sampling area. The terms "fen" and "bog" are used for simplicity and to denote the existence of a trophic and wetness gradient inferred from the vegetation. In each of the two sampling areas, three plots were selected in representative surfaces. The maximal distance between the two most distant plots was ca. 30 m. *S. fallax* mosses were collected in each plot around 10 permanent markers. The goal of this sampling design was to obtain a composite sample from each plot and avoid any bias due to spatial heterogeneity (Mitchell *et al.*, 2000).

For microbial preparations, *S. fallax* samples were cut into two levels (sampling depth): 0-3 cm (living "top segments") and 3-6 cm (early declining "bottom segments") of the capitulum. Then, the samples were fixed with glutaraldehyde (2% final concentration) and stored at 4 °C in the dark. Microorganisms were extracted from *Sphagnum* mosses using the method describe in Jassey *et al.* (2011b). The remaining fraction of *Sphagnum* was dried at 80 °C for 48h and weighted to express microbial density in grams of dry mass (DM) of *Sphagnum*. Microalgae, cyanobacteria, protozoa, rotifers, nematodes and fungi were identified and counted at x200 and x400 magnification using an inverted microscope (OLYMPUS IX71) following Uthermöhl's method (Ütermöhl, 1958). For each community, the average biovolume (μm^3) was

estimated by assuming geometrical shapes and the biomass of each microbial group was calculated (Gilbert *et al.*, 1998). In parallel, a minimum a 20 specimens of *Hyalosphenia papilio* and *Nebela tinctoria* (total for this study: 1240 specimens) was observed for each sample. Among active specimens, we distinguished those either with a prey within the tests or those which are feeding on a prey, i.e. any organic matter particle, to determine the feeding habit of these two species, as described in Gilbert *et al.*, (2003). Subsequently, ingested organisms were expressed as identified prey abundance per gram DM of *Sphagnum* and as total biovolume of ingested prey per grams DM of *Sphagnum*.

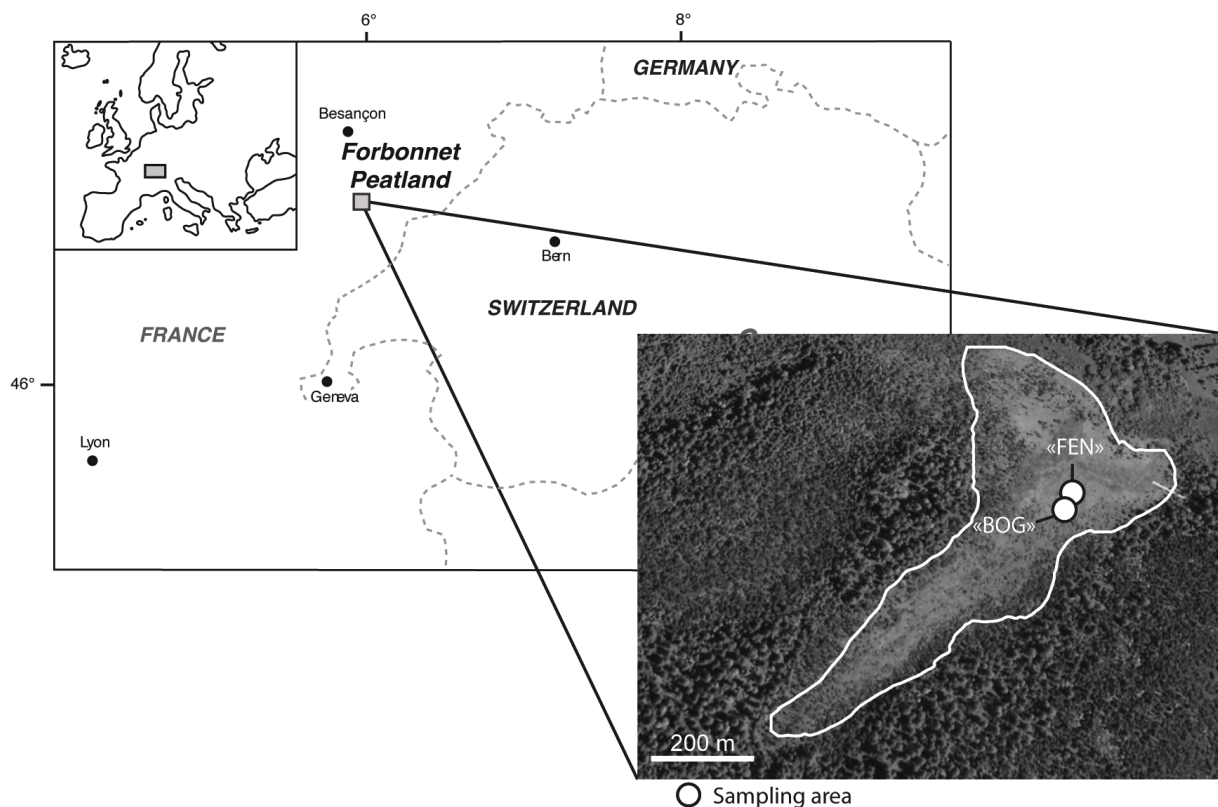


Figure 3.11: Location of the Forbonnet Peatland with inset showing the location of the two sampling areas ("fen" and "bog").

For isotope analyses, *Nebela tinctoria* and *Hyalosphenia papilio* were extracted from fresh mosses by six successive rinsing of *S. fallax* using distilled water and successively filtrated at 100 and 40 μm (Millipore, Nylon net filters). Testate amoebae were picked up randomly and individually using micropipette. In order to obtain reliable measurements for isotope analyses, all samples have been pooled to acquire a final sample of 600 living specimens for each testate amoeba species. Consequently, we were unable to obtain repeatedly isotopic measurements for testate amoeba specimens. To discern trophic position of testate amoebae using ^{13}C and ^{15}N signatures, it is essential to estimate the

^{13}C and ^{15}N baseline values of food web by directly measuring primary producers (Post, 2002). Thus, samples of *S. fallax* were also analyzed to obtain the baseline of the ecosystem.

Samples were precisely weighed (0.001 mg) in a tin capsule for stable isotope analysis and were analyzed using an isotope ratio mass spectrometer (Isoprime Micromass, UK) coupled to an elemental analyzer (EuroVector EA 3024, Italy). Stable isotope ratios are expressed in delta (δ) notation, defined as parts per thousand (‰) deviation from a standard material; $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N} = ([R_{\text{sample}}/R_{\text{standard}}] - 1) \times 1000$, where $R = ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ or $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$. A more positive (less negative for carbon) isotopic signature is defined as isotopically enriched, meaning that the sample contains proportionally more of the heavy stable isotope (^{13}C or ^{15}N).

Preferential predation index: An index of prey preferentially selected by testate amoeba specimens was achieved using a preferential predation ratio (a) adapted from Gaucel (2005):

$$a_i = (C_i/N_i) / ((C_i/N_i) + (C_j/N_j) + (C_k/N_k) + \dots + (C_z/N_z))$$

where, a_i represent the preferential predation ratio of the ingested microbial group i ; i, j, k, z the different microbial groups ingested by testate amoebae; C_i the total abundance of the microbial group i ingested by testate amoebae; N_i the total abundance of the microbial group i in the environment. The ratio varies between 0 and 1. A value a_i near 1 means that the group i is preferentially ingested by testate amoebae. No corrections for biomass were added in this index because we were not always able to estimate the biomass of ingested prey. Thus this index may misrepresent the major source of C and N in testate amoeba feeding habits.

Numerical analyses: Correlations between the density of ciliates and *H. papilio* associated with ciliates in top segments, as well as between the density of fungi and *N. tinctoria* in two segments along the "fen-bog" gradient were determined using one-way analysis of variance (ANOVA). The normality of the data distribution was examined by plotting residuals of the model, and the homogeneity of variance was examined with a test of variance. The variability among sampling areas and *Sphagnum* segments of microbial communities assemblages was tested using linear mixed-effect model included three factors: (1) blocks (three levels, random), (2) sampling area (two levels, fixed), and (3) sampling depth (two levels, fixed), with $n = 3$ observations per combination of factor levels. Thereafter, ANOVA was performed for testing the model and interaction among factors. The assumptions of parametric tests were also visualized and tested.

Differences among preferential prey ingested by testate amoeba specimens were achieved using Student's *t* tests.

Non-metric multidimensional scaling (NMDS) and analysis of similarities (ANOSIM) using the Bray-Curtis dissimilarity metric were computed to highlight patterns of variations of the microbial communities, and feeding habit of the two testate amoeba specimens along the "fen-bog" gradient. Since rare ingested groups could have a large influence on ordination, microbial groups in less than 1% of the total abundance were excluded from the data set prior to analyses (Lavoie *et al.*, 2009). Homogeneous clusters of habitat groups and feeding behavior using pairwise comparisons in ANOSIM were added on NMDS plots. The output statistic, *R*, takes a value of 0 if there is no separation of community structure attributable to a factor, and 1 if perfect separation occurs. All statistical analyses were performed using R (R Development Core Team, 2010; Borcard *et al.*, 2011).

Acknowledgements

This research is a contribution of the ANR PEATWARM project (Effect of moderate warming on the functioning of *Sphagnum* peatlands and their function as carbon sink). PEATWARM is supported by the French National Agency for Research under the "Vulnerability: Environment—Climate" Program (ANR-07-VUL-010). Further funding to VEJ Jassey by the Franche-Comté Region is kindly acknowledged. The authors thank G. Chiapusio, N. Bernard and P. Binet for their help for sampling and sorting of testate amoeba specimens. They also thank A. P. Wolfe (University of Alberta, Canada) for his fruitful comments on the manuscript and his English edits, and the two anonymous reviewers for their valuable comments of this work.

Chapitre 4

***Influence d'une hausse modérée
de la température sur les
éléments clés de la bryosphère :
les communautés microbiennes
et les polyphénols***

1. Effet d'un gradient de température sur les sphaignes et leurs communautés microbiennes associées : une étude en conditions contrôlées

Vincent E.J Jasey, Daniel Gilbert, Philippe Binet, Marie-Laure Toussaint et Geneviève Chiapusio (2011) *Effect of a temperature gradient on Sphagnum fallax and its associated living microbial communities: a study under controlled conditions. Canadian Journal of Microbiology 57: 226-225 doi: 10.1139/W10-116.*

1 Préambule

Les études précédentes ont démontré que (i) les polyphénols des sphaignes avaient une importance dans l'écologie des communautés des amibes à thèque et (ii) les relations trophiques au sein du réseau alimentaire microbien étaient importantes quant à la dynamique de cette même communauté. Afin d'identifier l'influence du réchauffement climatique sur ces relations clés, une étude en conditions contrôlées a été réalisée. Pour cela, des carottes de sphaignes ont été mises à trois températures différentes : 15°C, 20°C et 25°C. Cette étude a montré que la hausse de la température avait une forte influence sur la structure des communautés microbiennes, notamment sur les bactéries et les amibes à thèque où des relations de cause à effet ont pu être identifiées. Cette étude a aussi démontré l'effet de la température sur le métabolisme phénolique, puisque une augmentation des polyphénols a été enregistrée. Une relation spécifique entre un thécamoebien et les phénols a ainsi pu être identifiée. Ces résultats montrent que l'ensemble de la bryosphère réagit à une hausse de la température, suggérant une modification des interactions entre ces différents compartiments et donc du fonctionnement de la bryosphère. Cette étude a également confirmé que l'analyse de la bryosphère constituait un intégrateur biologique pertinent des effets du réchauffement *in situ*, en raison notamment de sa capacité à répondre rapidement aux perturbations.

*2 Effect of a temperature gradient on *Sphagnum fallax* and its associated living microbial communities: a study under controlled conditions*

a) Abstract

Microbial communities living in *Sphagnum* are known to constitute early indicators of ecosystem disturbances, but little is known about their response (including their trophic relationships) to climate change. A microcosm experiment was designed to test the effects of a temperature gradient (15, 20 and 25°C) on microbial communities including different trophic groups (primary producers, decomposers and unicellular predators) in *Sphagnum* segments (0-3 cm and 3-6 cm of the *capitulum*). Relationships between microbial communities and abiotic factors (pH, conductivity, temperature, and polyphenols) were also studied.

The density and the biomass of testate amoebae in *Sphagnum* upper segments increased and their community structure changed in heated treatments. The biomass of testate amoebae was linked to the biomass of bacteria and to the total biomass of other groups added and, thus, suggests that indirect effects on the food-web structure occurred. Redundancy analysis revealed that microbial assemblages differed strongly in *Sphagnum* upper segments along a temperature gradient in relation to abiotic factors. The sensitivity of these assemblages made them interesting indicators of climate change. Phenolic compounds represented an important explicative factor in microbial assemblages and outlined the potential direct and/or indirect effects of phenolics on microbial communities.

Keywords: *Sphagnum*, Testate amoebae, Temperature gradient, Phenolic compounds, Bioindicators

Résumé

Les microorganismes des sphaignes sont connus comme indicateurs précoces des perturbations environnementales. Or, peu d'études portent sur l'influence de la température sur ces communautés. Dans cette étude, l'effet d'un gradient de températures (15, 20 et 25°C) sur les microorganismes des sphaignes, incluant différents groupes trophiques (producteurs primaires, décomposeurs, micro-prédateurs), a été testé dans les différentes parties des sphaignes (0 à 3 cm et 3 à 6 cm du *capitulum*). Les relations entre les microorganismes et les facteurs abiotiques (pH, conductivité, température, polyphénols) ont également été analysées.

La densité et la biomasse des amibes à thèque ont augmenté dans les parties supérieures des sphaignes. Une modification de la structure de leur communauté a aussi été mise en évidence. La biomasse des amibes à thèque est apparue liée à celle des bactéries et à la biomasse additionnée des autres groupes, suggérant des effets indirects de la température sur les relations trophiques. Les analyses par redondance ont révélé que la structure des communautés microbiennes variait entre les différents traitements dans les parties supérieures des sphaignes. Ainsi, les communautés microbiennes des sphaignes apparaissent comme un outil intéressant quant au suivi *in situ* des changements climatiques. Les polyphénols ont également été identifiés comme un facteur explicatif important de la structure des communautés microbiennes, montrant ainsi leurs effets potentiels sur les microorganismes des sphaignes.

Mots-clés : Sphaignes, Amibes à thèque, Gradient de température, Composés phénoliques, Bioindicateurs

b) Introduction

Climatic change models cover a wide range of temperature-increase scenarios (2°C up to 8°C), especially at high latitudes where the majority of *Sphagnum*-peatlands occurs (Gorham, 1991; IPCC, 2007). Peatlands are complex ecosystems, because of the diversity of habitats and micro-habitats allowing the establishment of diverse communities (Rydin & Jeglum, 2006). Studying the impact of climate change on these ecosystems remains particularly difficult and complex because of several biological and chemical parameters interacting (Davidson & Janssens, 2006). Some microcosm studies were elaborated to test the impact of a temperature increase on *Sphagnum* plant communities (Breuwer *et al.*, 2008, 2009). However, such studies were carried out at the scale of simple organisms or populations and did not incorporate the interactions between different populations. Thus, a simplified ecosystem including different trophic levels could be then an interesting approach to better understand the effect of a temperature increase. In this context, the use of microbial communities living in *Sphagnum* represents a simplified ecosystem (Nguyen-Viet *et al.*, 2007; Meyer *et al.*, 2009). *Sphagnum* mosses are ubiquitous, cosmopolitan, and characterized peatlands (Shaw *et al.*, 2003; Rydin & Jeglum, 2006). Moreover, *Sphagnum* mosses shelter a large number of microbial species belonging to the different trophic groups, including bacteria, algae, testate amoebae, ciliates, or fungi, which have a short generation time (hours up to few weeks) (Schönborn, 1986; Gilbert *et al.*, 1998).

Some studies have demonstrated that the richness and density of single microbial groups (e.g. testate amoebae, microalgae) and/or the structure of microbial communities living in *Sphagnum* are affected by environmental perturbations such as nitrogen addition and atmospheric pollution (Howell & South, 1981; Gilbert *et al.*, 1998; Mitchell *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2007, 2008). In addition, the integration of testate amoebae into an experimental model is interesting because they feed on a wide range of prey, (i.e. bacteria, fungi, organic matter, algae, other protozoa) and could integrate ecosystem perturbations (Gilbert *et al.*, 2000, 2003). Thus, such a simplified system not only would notably give insight into the interactions between species but also would incorporate biotic and abiotic factors (including phytochemicals) interactions between *Sphagnum* and its associated microbial communities.

The potential phytochemical interactions between *Sphagnum* and microbial communities are rarely studied. However, phenolic compounds (secondary metabolites) produced by plants play an important role in the interaction of vegetation with its environment (Hättenschwiler & Vitousek, 2000; Chiapusio *et al.*, 2005). For example, in humus spruce forests, such compounds are involved in the increase of several microbial

communities (i.e. cellulose hydrolysers) and in the decrease of others (i.e. bacteria) (Souto *et al.*, 2000, 2001). Some studies have addressed phenolic production by *Sphagnum* (e.g. Rasmussen *et al.*, 1995), more specifically the phenolics weakly and primarily bound to the cell wall (Verhoeven & Liefveld, 1997). Because of *Sphagnum* morphology and anatomy, water-soluble phenolics can be easily released in *Sphagnum* environments. Recently, Jassey *et al.* (2011) demonstrated that such compounds were associated to the fine-scale microdistribution of testate amoebae along an ecological gradient. A multitude of environmental factors cause significant shifts in the quantity of phenolic compounds in vascular plants (e.g. UV-B; Spitaler *et al.*, 2008), but they are understudied in *Sphagnum*. The patterns of phenolic compounds at the surface of *Sphagnum* layers may be susceptible to temperature increase and to interactions with microbial communities living in *Sphagnum*.

In this study, we assessed the response of vertical patterns of microbial communities living in *Sphagnum* and the relationships among microbial communities, temperature, and total phenolic compounds along a temperature gradient. The abundance and the structure of microbial communities and the concentrations of phenolic compounds were quantified in *Sphagnum* peat cores placed at 3 different temperatures (15, 20, and 25°C) after 8 weeks in a growth chamber. According to the gradient of temperature, we addressed the following hypotheses: (i) that the structure and biomass of microbial communities would vary among temperature treatments and *Sphagnum* layers (upper and lower), (ii) that the effect of temperature would be different for each microbial group according to their trophic position, and (iii) that total phenolic compound concentrations quantified in *Sphagnum fallax* would change along the temperature gradient and *Sphagnum* layers, and would explain a similar fraction of the community data as other environmental factors.

c) Materials and Methods

Sphagnum sampling and experimental setup

Sphagnum fallax was collected in a peat bog in the Jura Mountains (Sur-les-Seignes, Frambouhans-Les-Ecorces, France, 47°18'N, 6°79'E) at an altitude of 846 m above sea level on 19th October 2007 (temperature 10°C). The climate of the area is characterized by cold winters (an average of -2.4°C in January) and mild summers (an average of 14.6°C in July). The annual mean temperature of the region is about 6.6°C. The annual amount of precipitations is 1417 mm, and the duration of snow cover is an average of 50

day. year⁻¹. Surfaces of *S. fallax* as homogenous and pure as possible were selected. Sixteen *Sphagnum* peat cores (25 cm x 15 cm) were randomly sampled with a knife.

Four peat cores were assigned in quadruplicates to describe the initial stage (IS) and 12 peat cores for the three treatments 15, 20 and 25°C (designated T15, T20 and T25, respectively). A large gradient of temperature was chosen to observe the response of communities. Peat cores were randomly placed between the different levels of the growth chamber (Cryonext RTH600). General conditions selected were a relative humidity of > 70%, a light intensity of 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, and a photoperiod of 12h (light)/12h (dark). Each treatment corresponded to 1 level of the growth chamber. For each treatment, peat cores were placed in 1 big tray full of water (water level = 20 cm) and were humidified with a standard nutrient solution (Volvic water). The water depth was kept at 2 cm below the top of *Sphagnum* and readjusted with demineralized water every 2 days. The average relative humidity of *Sphagnum* was around 90% in *Sphagnum* segments for each treatment during the experiment. The 15°C temperature corresponded to the temperature of the growth chamber. The 20°C and 25°C temperatures were obtained by heating the water of the tray with respectively 2 thermo-divers of 50 and 200 W and 2 thermo-divers of 200 W. Moreover, aquarium pumps (5L.min⁻¹) were installed in the warm trays to obtain homogeneous temperatures. The position of peat cores was changed in each tray every 2 days to avoid experimental differences. The temperature was recorded several times a day during the experiment in each peat cores. The water chemistry (pH, conductivity and Eh potential) was also measured in each peat cores every 2 days.

Before and after 8 growing weeks 20 *S. fallax* were sampled in each peat cores and cut into 2 layers from the capitulum 0-3 cm (upper segments) and 3-6 cm (lower segments). For microbial analysis, the samples were fixed in 20 mL of glutaraldehyde (2% final concentration). No mosses were taken from the 5 cm bordering peat cores to avoid a border effect.

Total phenolic compounds assay

Phenolic compounds were extracted from lyophilized mosses following two methods as described in Jassey *et al.* (2011a) and commonly used in phytochemical interactions (Waterman *et al.*, 1994; Macheix *et al.*, 2005). Water-soluble phenolics (hereafter "free phenolics") were extracted using distilled water and corresponded to phenolics susceptible to directly interact with microorganisms. Primarily bound phenolics (hereafter "bound phenolics") were extracted using ethanol/distilled water solution (80:20, v/v) and mainly corresponded to phenolic acids slightly bound to cell-wall. Thereafter, free and

bound total phenolic contents were quantified with the Folin-Ciocalteu reagent and were expressed in milligrams of equivalent gallic acid (A_{760}) (Gallet & Lebreton, 1995).

Microbial Communities analyses

Microbial organisms were extracted from *S. fallax* with the standard method of Nguyen-Viet *et al.* (2007). Each sample was shaken for 1 min on a vortex and then *Sphagnum* mosses were pressed to extract microorganisms (first solution). The mosses were then soaked again with 20 mL of glutaraldehyde (2% final concentration), shaken a second time on a vortex, and pressed to extract *Sphagnum* leachate. The leachate was settled for 12h, and afterward the supernatant was added to the *Sphagnum* and the material on the bottom was added to the first solution. The process was repeated 6 times, and all fractions were combined to obtain a final composite sample of 40 mL. The remaining fraction was dried at 80°C for 48h and weighted to express microbial density in grams of dry weight of *Sphagnum*.

Primary producers, fungi and unicellular predators: a 3 mL subsample of the final composite sample was settled for 2h in a plankton chamber and analyzed at x 400 magnification by inverted microscopy (Olympus IX71) following UthermöhI's method (1958). The whole slide was analyzed and the different groups of cyanobacteria, microalgae, unicellular predators (flagellates, testate amoebae and ciliates) and fungi hyphae and spores were counted and measured. For testate amoebae, only living tests were counted.

Bacteria: a 1 mL subsample of the final composite sample was stained with 50 μ L of 4,6 diamino-2-phenylindol (DAPI, 0.2% of final concentration) for 15 min in the dark, filtered through 0.2 μ m black membrane filters, and examined by epifluorescence microscopy at x 1000 magnification (Porter & Feig, 1980). Bacteria numbers and size were estimated with an image analysis program (LUCIA 4.0). For each sample, between 8 and 35 photographic fields were observed. The number of bacteria cells counted and measured was situated between 514 and 1132. This direct counting using DAPI gave the total density of bacteria.

The biovolume of each community was estimated by assuming geometrical shapes and converted to carbon using the following conversion factors: bacteria, $1\mu\text{m}^3 = 5.6 \times 10^{-7}\mu\text{gC}$ (Bratbak, 1985); cyanobacteria and microalgae, $1 \mu\text{m}^3 = 1.2 \times 10^{-7} \mu\text{g C}$ (Borsheim & Bratbak, 1987); ciliates and testate amoebae, $1 \mu\text{m}^3 = 1.1 \times 10^{-7} \mu\text{g C}$ (Weisse *et al.*, 1990); fungi, $1 \mu\text{m}^3 = 2.5 \times 10^{-7} \mu\text{g C}$ (Gilbert *et al.*, 1998). The data were expressed as micrograms of Carbon per gram of *Sphagnum* dry mass per square centimeter ($\mu\text{g C} \cdot (\text{g DW})^{-1} \cdot \text{cm}^{-2}$).

Numerical analysis

Since the data distributions of microbial communities, phenolic compounds and water chemistry were not normal and statistically dependant, a non-parametric 2-way analysis of variance test (Friedman test) was used to determine the differences among the temperatures (T15, T20 and T25).

To reduce the influence of dominant taxa in the multivariate analysis, carbon biomass of microbial communities was transformed using the relation $\ln(x+1)$ (Nguyen-Viet *et al.*, 2007). Multiple factor analysis (MFA) was used to assess the general structure of the data and to determine the relationships among the 2 microbial community's data sets (upper and lower) and the 3 environmental variables data sets (water chemistry, temperature and phenolics). MFA was chosen because it allows the simultaneous coupling of several groups or subsets of variables defined on the same objects (Escofier & Pagès, 1994). The MFA was performed in 2 steps. Firstly, a first principal component analysis (PCA) was applied to the whole set of variables in which each subset was weighted by dividing all its elements by the first eigenvalue obtained from its PCA. Secondly, the normalized subsets were assembled to form a unique matrix and a second PCA was performed on this matrix. Euclidean distances of global PCA were then used in MFA to perform cluster analysis according to the Ward method, and the resulting dendrogram was projected in the MFA ordination space. This analysis revealed the main differences in the structure of the data described by all biotic and abiotic subsets of variables (Lamentowicz *et al.*, 2010).

We assessed the relationships among the microbial communities in the upper and lower sampling depth and the 3 sets of environmental variables: (i) water chemistry (pH, Eh potential and conductivity), (ii) temperature and (iii) phenolic compounds (bound and free). The ordination patterns of microbial communities and their causal relationships to environmental data-sets were assessed using redundancy analysis (RDA) (TerBraak & Simlauer, 1998). A forward selection of explanatory variables was computed for each of the *Sphagnum* segments, using automatic stepwise model building for constrained ordination methods ("ordistep" function). The proportion of variance explained by environmental variables was quantified using variance partitioning. Adjusted R^2 were used in all RDA to estimate the proportion of explained variance by each environmental variable (Peres-Neto *et al.*, 2006).

All multivariate analyses were performed with the software R (R Development Core Team, 2010) using the vegan (Oksanen *et al.*, 2010) and FactoMineR (Husson *et al.*, 2009) packages.

d) Results

Environmental variables

During the experiment, temperatures recorded were stable in both *Sphagnum* segments with $14.8 \pm 0.4^\circ\text{C}$ for T15, $19.4 \pm 0.3^\circ\text{C}$ for T20 and $23.9 \pm 0.5^\circ\text{C}$ for T25. The conductivity and the Eh potential were significantly lower ($P < 0.05$) in T15 ($30 \pm 9.4 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and $370.1 \pm 16.2 \text{ mV}$, respectively) than in T20 and T25 ($19.1 \pm 3 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ and $335.5 \pm 20 \text{ mV}$, respectively). The pH was stable during the experiment ($\text{pH} = 4.1 \pm 0.5$ in IS, T15, T20 and T25).

Temperature effect on total phenolic compounds

The concentrations in the 3 treatments were 1.5 times higher in upper segments (bound: an average of $2.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$, free: an average of $1.8 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$) than in lower segments (bound: an average of $1.6 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$, free: an average of $0.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$) (Table 4.1). Bound phenolics produced by *S. fallax* did not significantly differ between the upper and the lower segments, with the different temperatures. Free phenolics were significantly higher in upper segments ($P < 0.04$) for T25 than for the other treatments. A significant relation was also found between bound and free phenolics ($P < 0.001$, $r = 0.62$).

Tableau 4.1: Total concentrations ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1} \text{ DW}$) of *Sphagnum fallax* free and bound phenolics in two layers (upper and lower segments) for IS, T15, T20 and T25 ($n = 4$). Letters indicate significant differences of the total phenolic concentrations between the upper and the lower segments for a same treatment ($P < 0.05$) and Asterisk indicates significant difference between temperatures ($P < 0.05$).

| Time (weeks) | | Bound phenolics | | Free phenolics | |
|--------------|-----|-------------------------|-------------------------|---------------------------|-------------------------|
| | | Upper segments | Lower segments | Upper segments | Lower segments |
| 0 | IS | $2.5 \pm 0.1 \text{ a}$ | $1.7 \pm 0.1 \text{ b}$ | $1.1 \pm 0.1 \text{ a}$ | $0.7 \pm 0.0 \text{ b}$ |
| | T15 | $2.4 \pm 0.3 \text{ a}$ | $1.8 \pm 0.2 \text{ b}$ | $1.5 \pm 0.3 \text{ a}$ | $0.8 \pm 0.1 \text{ b}$ |
| | T20 | $3.4 \pm 1.1 \text{ a}$ | $1.7 \pm 0.1 \text{ b}$ | $1.6 \pm 0.1 \text{ a}$ | $0.6 \pm 0.1 \text{ b}$ |
| 8 | T25 | $2.8 \pm 0.9 \text{ a}$ | $1.6 \pm 0.1 \text{ b}$ | $2.4 \pm 0.3 \text{ a}^*$ | $0.7 \pm 0.0 \text{ b}$ |

Microbial communities

The main change in the total biomass of microbial communities occurred in the upper segments of *Sphagnum* whereas it was quite stable in lower segments (Fig. 4.1). Indeed the total biomass in upper segments was nearly twice as high with elevated temperature (T15: $1400 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$, T20 and T25: 1700 and $2700 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$, $P < 0.01$).

Primary Producers. The biomass of primary producers did not significantly vary between T15, T20, and T25 (Fig. 4.1). The biomass of microalgae was $85 \pm 31 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ in upper segments and $106 \pm 31 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ in lower segments. The community was dominated by the same species along *Sphagnum* segments in any treatments. *Chlorophyceae* (e.g. *Cylindrocystis* sp and *Penium* sp) and *Bacillariophyceae* (e.g. *Pinnularia viridis*) were the main identified genus. Cyanobacteria represented a small proportion ($< 5\%$) of the total biomass along *Sphagnum* segments in any treatments with an average biomass of $50 \pm 17 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ in upper segments and $31 \pm 10 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ in lower segments. Cyanobacteria were dominated by *Chroococcales* (e.g. *Chroococcus giga*) and *Nostocales* (e.g. *Anabaenae cylindrica* and *Aphanothece nidulans*) along *Sphagnum* segments.

Decomposers. The biomass of bacteria was twice higher in upper and lower segments with elevated temperature (T20 and T25) than in T15. For example, bacterial biomass increased from $200 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ in T15 to $440 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ at T25 in upper segments ($P < 0.01$; Fig. 4.1). Fungal biomass was not significantly different among treatments ($70 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ in upper segments and $10 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$ in lower segments) (Fig.1).

Unicellular predators. The biomass of testate amoebae increased from T15 ($380 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$) to T25 ($600 \mu\text{g C.}(\text{g DW})^{-1}.\text{cm}^{-2}$) ($P < 0.01$; Fig. 4.1). At the IS the most frequent testate amoebae were *Archerella (Amphitrema) flavum* (29%), *Nebela tincta* (18%) and *Hyalosphenia papilio* (18%) in the upper segments and *A. flavum* (30%), *N. tincta* (28%) and *Diffflugia bacillariarum* (27%) in the lower segments (Table 2). The same species were dominant at T15 with *H. papilio* (42%), *A. flavum* (16%), and *N. tincta* (16%) in the upper segments, and *A. flavum* (29%), *E. strigosa* (27%), and *N. tincta* (16%) in the lower segments. For T20-T25 communities, the upper segments were dominated by *H. papilio* (35% and 43%, respectively) and *E. strigosa* (30% and 27%, respectively) (Table 4.2). The biomass of testate amoebae was correlated with the total biomass of other groups added ($r = 0.63$, $P < 0.01$) in upper segments but not in lower segments ($r = 0.15$, $P = 0.57$). The density of *Euglypha strigosa* was significantly correlated to the temperature increase ($r = 0.62$), the density of bacteria ($r = 0.49$) and

free phenolics ($r = 0.58$) in upper segments of *Sphagnum* ($P < 0.01$). In lower segments, no species was significantly influenced by the temperature gradient nor free phenolics.

The results obtained for flagellates and ciliates strongly varied among treatments in upper and lower segments but no effect of temperature was clearly observed.

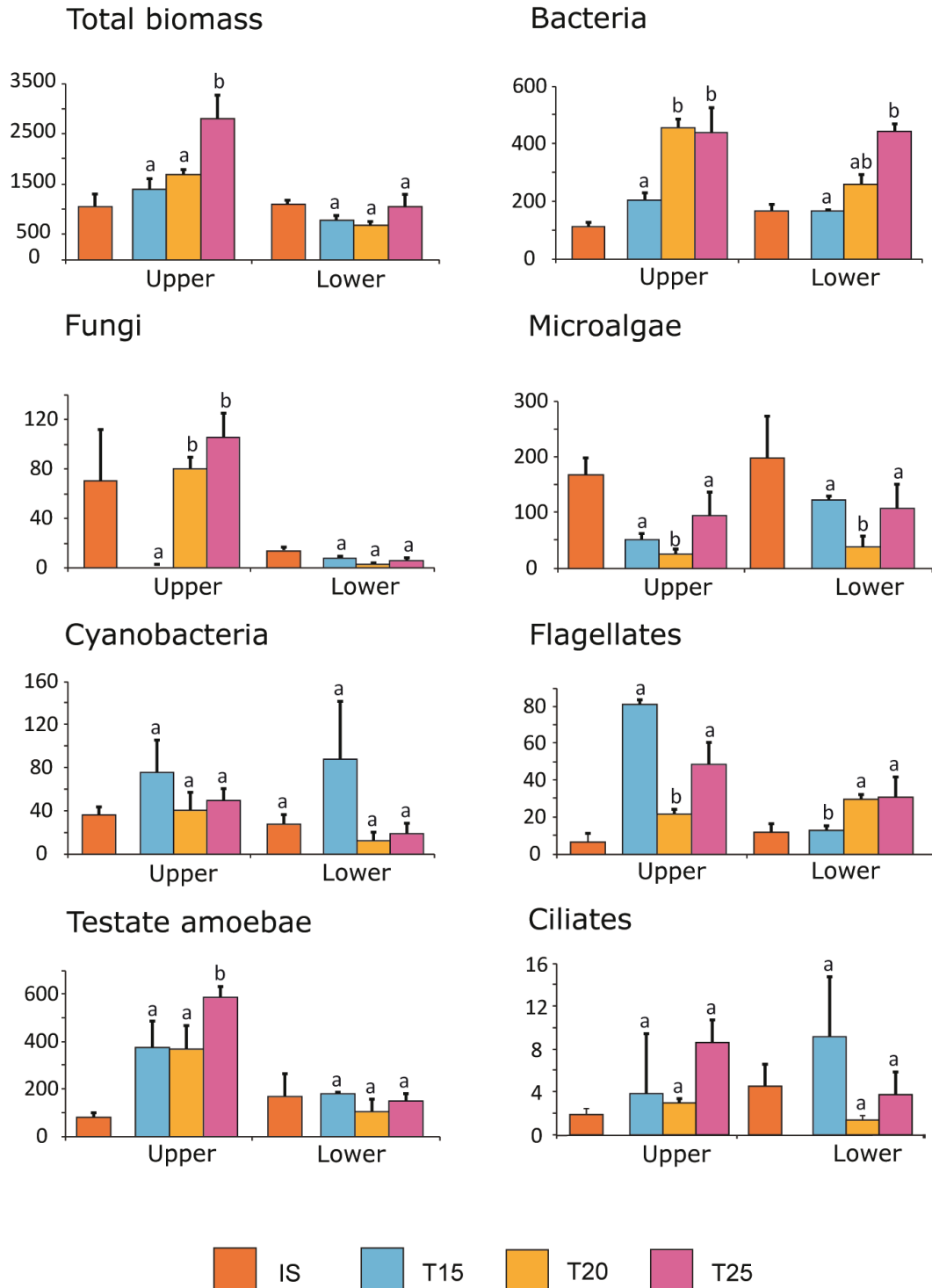


Figure 4.1: Total carbon biomass ($\mu\text{gC}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, mean \pm S.E.) of all microbial groups and Carbon biomass ($\mu\text{gC}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$, mean \pm S.E.) of microbial groups in *Sphagnum* samples analyzed after 8 weeks related to the gradient of temperature. Letters indicate significant differences of biomass between temperatures in upper and lower segments (Friedman test, $P < 0.01$).

Effet de la température : étude en microcosme

Tableau 4.2: Summary table of 12 testate amoebae species in sample units of *Sphagnum fallax* in two layers (upper and lower segments) over 8 weeks period for IS, T15, T20 and T25 (n=4). Asterisks indicate significant differences of a same species related to the gradient of temperature in upper and lower segments ($P < 0.05$).

| | | Relative abundance (%) ^a | | Abundance per gram (DW) | | |
|-----------------|-------------------------------|-------------------------------------|-----------|-------------------------|------------|---------------|
| | | IS | IS | T 15 | T 20 | T 25 |
| | | Mean ± SE | Mean ± SE | Mean ± SE | Mean ± SE | Mean ± SE |
| Upper segments | <i>Archerella flavum</i> | 28.7 ± 8.1 | 287 ± 85 | 574 ± 358 | 300 ± 170 | 683 ± 471 |
| | <i>Nebela tincta</i> | 18.4 ± 3.9 | 191 ± 30 | 587 ± 161 | 465 ± 127 | 370 ± 87 |
| | <i>Hyalosphenia papilio</i> | 17.9 ± 8.9 | 191 ± 72 | 1489 ± 451 | 1188 ± 298 | 2063 ± 425 |
| | <i>Euglypha strigosa</i> | 12.2 ± 8.3 | 123 ± 34 | 423 ± 130 | 1025 ± 248 | 1291 ± 297 * |
| | <i>Diffugia bacilliarum</i> | 6.2 ± 25.0 | 55 ± 30 | 7 ± 7 | 137 ± 103 | 55 ± 22 |
| | <i>Assulina muscorum</i> | 4.8 ± 12.2 | 48 ± 24 | 205 ± 52 | 82 ± 35 | 164 ± 87 |
| | <i>Euglypha cristata</i> | 3.4 ± 25.0 | 34 ± 34 | 14 ± 8 | 0 ± 0 | 41 ± 24 |
| | <i>Centropyxis acuelata</i> | 3.1 ± 18.9 | 34 ± 26 | 7 ± 7 | 41 ± 26 | 55 ± 55 |
| | <i>Trinema complanatum</i> | 2.0 ± 16.8 | 21 ± 13 | 0 ± 0 | 0 ± 0 | 27 ± 16 |
| | <i>Hyalosphaenia subflava</i> | 1.4 ± 14.6 | 14 ± 8 | 130 ± 21 | 41 ± 26 | 55 ± 40 |
| | <i>Arcella arenaria</i> | 1.2 ± 25.0 | 14 ± 14 | 27 ± 19 | 0 ± 0 | 0 ± 0 |
| | Total abundance | - | 1020 ± 87 | 3600 ± 525 | 3400 ± 500 | 4860 ± 1000 * |
| Lower segments | <i>Archerella flavum</i> | 30.1 ± 5.4 | 200 ± 50 | 246 ± 84 | 153 ± 120 | 297 ± 242 |
| | <i>Nebela tincta</i> | 28.2 ± 9.4 | 170 ± 61 | 136 ± 50 | 110 ± 35 | 59 ± 16 |
| | <i>Diffugia bacilliarum</i> | 27.5 ± 14.0 | 166 ± 31 | 30 ± 4 | 21 ± 4 | 110 ± 53 |
| | <i>Assulina muscorum</i> | 8.4 ± 6.5 | 51 ± 10 | 21 ± 11 | 17 ± 17 | 4 ± 4 |
| | <i>Euglypha strigosa</i> | 1.4 ± 0.8 | 9 ± 5 | 230 ± 26 | 221 ± 97 | 110 ± 16 |
| | <i>Centropyxis acuelata</i> | 1.4 ± 25.0 | 9 ± 9 | 9 ± 5 | 9 ± 5 | 13 ± 8 |
| | <i>Hyalosphenia elegans</i> | 0.0 ± 0.0 | 0 ± 0 | 21 ± 16 | 0 ± 0 | 17 ± 17 |
| | <i>Hyalosphenia papilio</i> | 0.0 ± 0.0 | 0 ± 0 | 34 ± 14 | 9 ± 5 | 81 ± 55 |
| Total abundance | - | 600 ± 20 | 850 ± 80 | 680 ± 240 | 800 ± 250 | |

^a Relative abundance = 100 x abundance/total number of individuals in the sample.

Relationships between environmental parameters and *Sphagnum* biota

The MFA of the 3 environmental matrices (water chemistry, temperature and phenolics) and the 2 microbial community (upper and lower segments) data sets confirmed the existence of an overall division among the temperature treatments (i.e. T15, T20 and T25) with different global structure of microbial communities (Fig. 4.2).

In the separate RDAs, T20 and T25 microbial assemblages and T15 microbial assemblage were clearly separated in upper segments (Fig. 4.3a), while in lower segments the separation between treatments was unclear (Fig. 4.3b). The models explained respectively 56.4% and 27.6% of the variability in microbial data in upper and lower segments analysis ($P < 0.01$ for each axes, Monte-Carlo permutation test, 999 permutations). T20 and T25 microbial assemblages (particularly bacteria, fungi and testate amoebae) in upper segments were related with temperature and free phenolics, while microbial assemblage in T15 was related to Eh potential. In lower segments, microbial community structures along the temperature gradient were not clearly separated, except some T20 and T25 replicates correlated with elevated temperatures and the biomass of bacteria.

The successive RDAs on individual environmental variables revealed that the proportion of microbial data explained by each explanatory variable varied among variables both between the environmental data sets and along the 2 vertical positions (Table 4.3). The overall RDA (upper and lower segments) showed that free phenolics and temperature data sets explained, independently of the other 2 data sets, respectively 11.9% ($P = 0.004$) and 7.6% ($P = 0.02$) of the microbial data variance. However, the variance explained by these variables was however much higher in the partial RDA’s of upper and lower segments (Table 4.3). For example, temperature explained 42.1% of the microbial data variance in upper segments ($P < 0.001$) and decreased to 2.5% in lower segments, while the variance explained by free phenolics increased from 5.2% to 15.7% ($P < 0.05$) between the upper and lower segments.

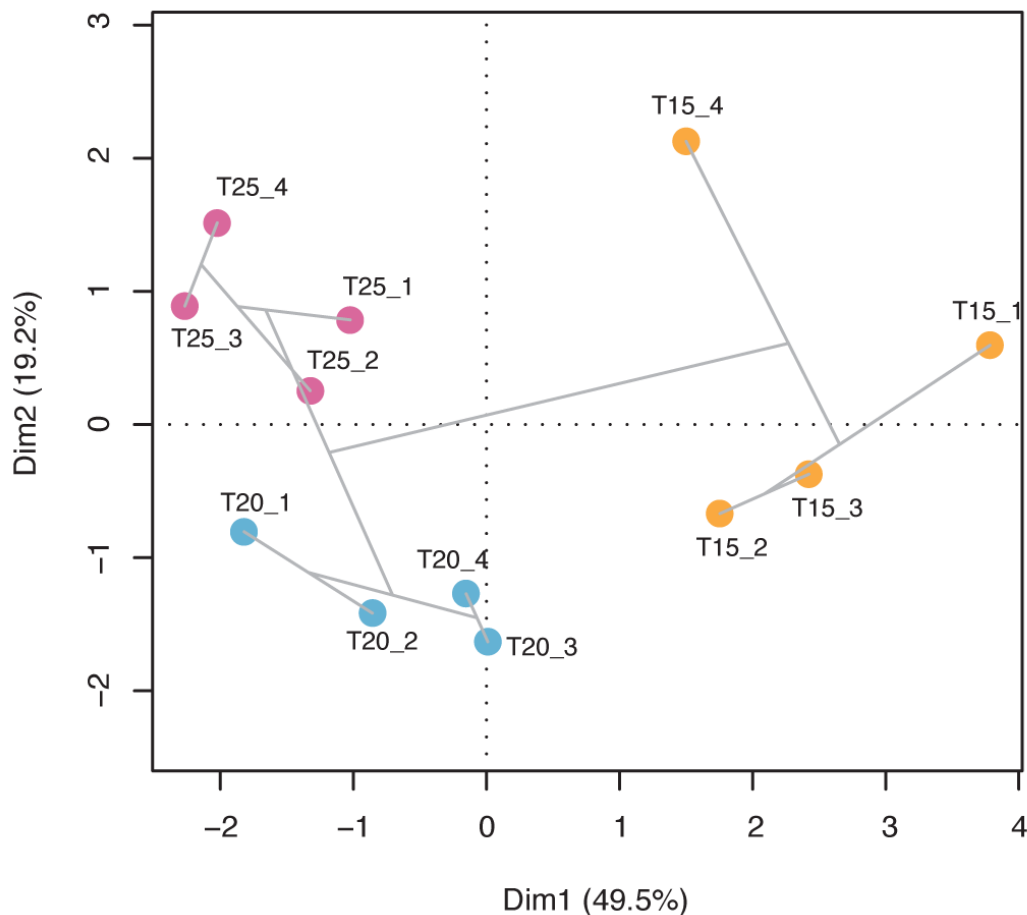


Figure 4.2: Multiple factor analysis of the two *Sphagnum* biota communities and environmental (chemical, physical and phenolics) data sets. Biplot of axes 1 and 2 (both significant at $P = 0.001$) is given together with the result of a hierarchical agglomerative clustering (grey lines) obtained by the Ward method on the Euclidean distance matrix between MFA site scores, showing three main groups of temperature treatment (orange symbols = T15, blue symbols = T20, pink symbols = T25).

e) Discussion

Temperature gradient effect on microbial food web

This study is unique in that it addressed the effects of experimental high temperature gradient on microbial communities living in *Sphagnum*, including different trophic groups. MFA confirmed the existence of 3 microbial community assemblages along the temperature gradient (T15, T20, and T25 microbial assemblages) and the validity of using *Sphagnum* and its associated microbial communities as an indicator of climate change. Interestingly, the results revealed different behavior of the trophic groups related to the temperature gradient. The biomass of the microbial primary producers (microalgae and cyanobacteria) did not vary at any temperature while an increase of the biomass of the microorganisms (bacteria and testate amoebae) involved in the microbial loop was recorded (dissolved organic matter → bacteria → heterotrophic protists (ciliates, flagellates, testate amoebae) → macrozoorganisms; Gilbert *et al.*, 1998).

Tableau 4.3: Summary of RDA's on microorganisms and environmental variables: fraction of variance explained (%) and significance of individual variables taken alone or grouped.

| Variables in RDA models | Overall RDA | | Upper segments | | Lower segments | |
|-----------------------------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | % ^a | <i>p</i> -value | % ^a | <i>p</i> -value | % ^a | <i>p</i> -value |
| Eh | 3.4 | 0.13 | 33.1 | 0.01 | 3.3 | 0.55 |
| Cond | 2.9 | 0.12 | 17.1 | 0.03 | 3.1 | 0.51 |
| pH | 0.4 | 0.87 | 0.8 | 0.95 | 0.4 | 0.64 |
| Water chemistry (pH, Eh, Cond) | 1.6 | 0.57 | 23.9 | 0.08 | 4.4 | 0.87 |
| Temperature | 7.6 | 0.02 | 42.1 | 0.003 | 2.5 | 0.25 |
| Free phenols | 11.9 | 0.004 | 5.2 | 0.02 | 15.7 | 0.05 |

^a Percentage of variance explained (Adjusted R^2)

Along the temperature gradient, the density and the biomass of testate amoebae in *Sphagnum* upper segments increased and their community structure changed in heated treatments. These results combined with the significant relation between the biomass of testate amoebae and the total biomass of other groups added suggested that indirect effects on the food-web structure occurred. The significant link between *Euglypha strigosa* and bacteria along the temperature gradient seemed to confirm this hypothesis. Indeed, *Euglypha* is described as bacterivorous in literature (Gilbert *et al.*, 2000; Beyens *et al.*, 2009). The increase of bacteria density in *Sphagnum* upper segments probably influenced the abundance of *E. strigosa*. Beyens *et al.* (2009) also observed similar results for the correlation between testate amoeba communities and temperature effect. For example, *Trachelocorythion* and *Euglypha* genera reacted positively with heatwave and were linked to the increase of bacteria. The high density and high relative abundance of *H. papilio* in heated treatments also suggested indirect effects on the food-web structure, since this species feed on a wide range of prey, notably small euglyphids (Gilbert *et al.*, 2000, Meisterfeld, 2000a, b). Conversely, the biomass and the density of *N. tinctoria* did not vary along the temperature gradient. This species was recognized to essentially feed on autotrophic microorganisms during summer (Gilbert *et al.*, 2003), and the biomass of these groups was not affected by the temperature increase. Microbial primary producers (microalgae and cyanobacteria) living in *Sphagnum* are well known to be sensitive to water chemistry, and to N and P addition (Hooper, 1981; Howell & South, 1981; Gilbert *et al.*, 1998).

Because testate amoebae are at the end of the microbial food web and they feed on a wide range of prey, their community integrates the variations of the food web due to environmental perturbations (Gilbert *et al.*, 1998, 2003; Nguyen-Viet *et al.*, 2007; Mitchell *et al.*, 2008). Thus, they could be interesting candidates for monitoring the impact of elevated temperatures in *Sphagnum* peatlands. On the other hand, to deepen our knowledge about the changes in the microbial food web with elevated temperatures, complementary experiments focusing on the feeding habit progression of testate amoebae would be necessary.

Effet de la température : étude en microcosme

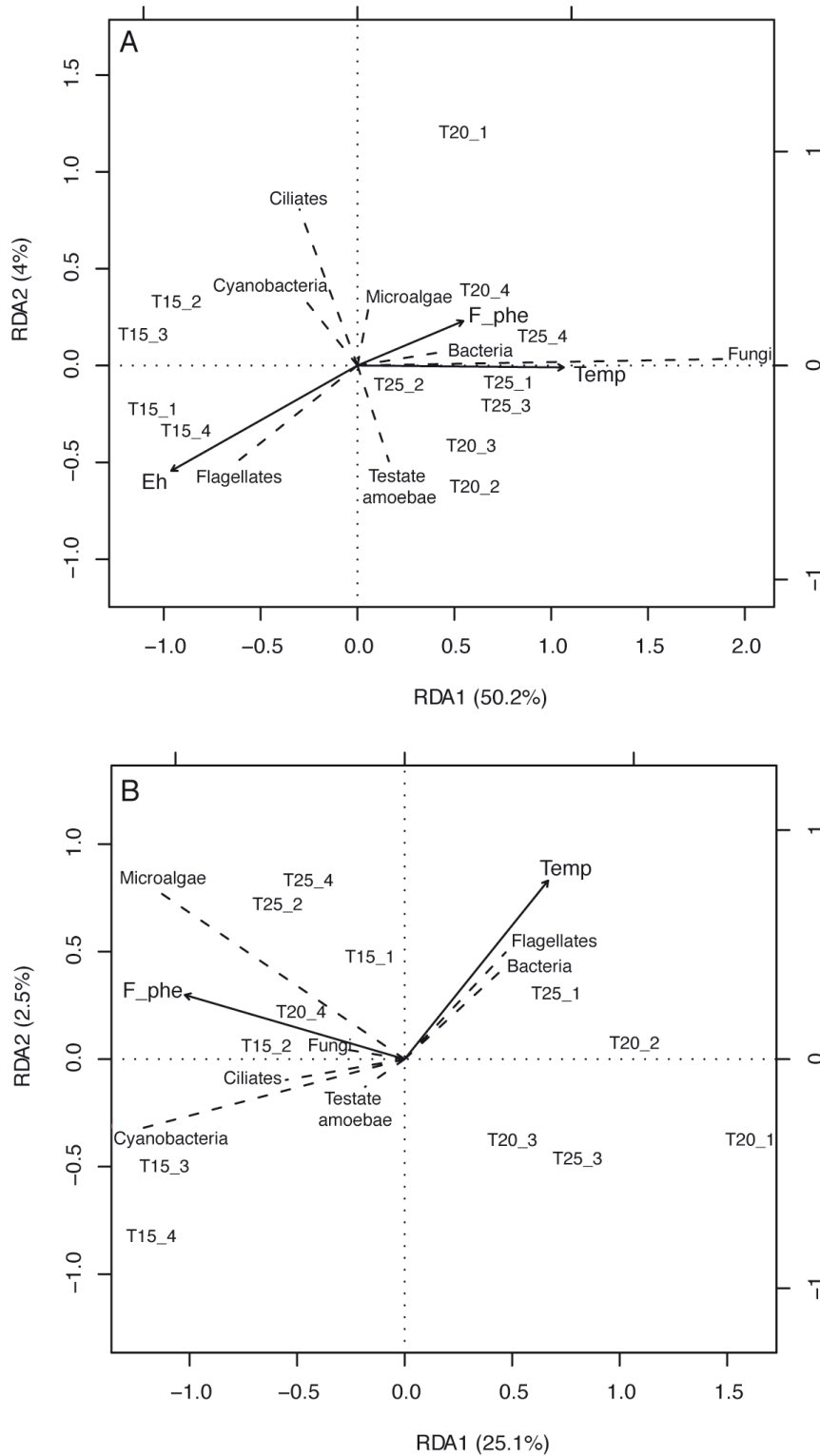


Figure 4.3: Redundancy analyses (axes 1 and 2) of microbial data in upper segments (a) and lower segments (b). Environmental variables retained after model selection are represented by arrows. Microbial groups are represented by dotted lines. F_phe : free phenolics; Temp: temperature.

Sphagnum biota – environmental factors relationships

Among environmental factors, temperature appeared as the principal factor that determines microbial community variations. Direct gradient analysis (RDA) revealed that in upper segments temperature, Eh potential and conductivity significantly explained a high proportion of microbial data set variations. This result was not surprising since water chemistry generally contributed to a change in microbial community distribution that occurred at the top of *Sphagnum* carpet (Howell & South, 1981; Mitchell *et al.*, 2003; Mieczan, 2009). Conversely, in lower segments, only free phenolics significantly explained microbial data variations. Studying both upper and lower segments along a temperature gradient demonstrated that the response of microbial communities to abiotic factors differed between *Sphagnum* segments. These results illustrate (i) how vertical gradients lead to ecological niches separations in *Sphagnum* and (ii) the potential influence of phenolic compounds on microbial community distribution.

The *Sphagnum* upper segments were characterized by a higher phenolic content (bound and free) compared to the lower segments, and constituted original results about phenolic repartition in *Sphagnum*. These results were in accordance with *Sphagnum* biology, given that *capitula* constituted the dominant life parts of *Sphagnum* where main metabolic processes occurred (Clymo & Hayward, 1982). The metabolism of phenolic compounds in *Sphagnum* was more important at the *capitulum* layer than in lower segments. The observed correlation between free and bound phenolic compounds demonstrated that their production by *Sphagnum* was linked and similar. However, only free phenolics were affected by elevated temperature through an increase in top segments. Such result suggested that phenolic content was also affected qualitatively by elevated temperature. Different kinds of phenolics (e.g. phenolic acids and flavonoids) are known to be present in the *Sphagnum* genus (Rudolph & Samland, 1985; Opelt *et al.*, 2007). To better understand phenolic *Sphagnum* metabolism under elevated temperatures, it would be necessary to characterize both qualitatively and quantitatively the phenolic extracts from the different segments by using a high-pressure liquid chromatography technique.

Free phenolics were related to microbial communities and explained a large part of the variance observed, particularly in the lower segments. This relation outlines (i) the potential chemical interaction between *Sphagnum* and microbial communities living in *Sphagnum* and (ii) the role of such compounds in the structure of microbial communities regardless of their increase at 25°C in upper segments. Similar results were found with the testate amoebae community structure (Jassey *et al.*, 2011). Nonetheless, the significant relation between *E. strigosa* and free phenolics in upper segments suggested a potential direct effect of these compounds on this species since its density did not

increase in lower segments while the density of bacteria increased. Although this result does not allow a conclusion to be drawn on a possible direct positive effect of water-soluble phenolic compounds on *E. strigosa*, it raises the issue of the possible role of such compounds. Recently, *p*-hydroxyl phenolic acids released by *Sphagnum* mosses have been shown to possess antibacterial and antifungal activity (Opelt *et al.*, 2007; Mellegård *et al.*, 2009). Thus it is possible that water-soluble phenolic compounds released by *Sphagnum* play a role in microbial assemblages through direct (e.g. physiological) and/or indirect (e.g. through impact on prey–predator relationships) effects.

f) Conclusion

This original approach of studying *Sphagnum* upper and lower segments revealed a strong relationship between microbial community structures and rising temperatures in upper segments of *Sphagnum*. Because of the different biotic and abiotic gradients in *Sphagnum*-dominated peatlands, our study highlighted the need to study together different microbial groups along the living parts of *Sphagnum*. A destabilization of the microbial food web by elevated temperatures (5°C) through their trophic relationships is suggested in upper segments. Therefore, microbial assemblages and/or testate amoebae may be useful indicator to monitor climate change in peatlands. The relationships between water-soluble phenolics compounds and microbial communities living in *Sphagnum* remained an interesting result. Further *in situ* investigations characterized by a realistic warming and moisture variations should be undertaken.

Acknowledgments

This article is a contribution of the Agence National de la Recherche (ANR) PEATWARM project (Effect of moderate warming on the functioning of *Sphagnum* peatlands and their function as carbon sink). PEATWARM is supported by the French National Agency for Research under the “Vulnerability: Environment—Climate” Program (ANR-07-VUL-010). V. E. J. Jassey has been supported by a grant from the Franche-Comté Region.

2. Influence d’une hausse de la température sur la variabilité saisonnière des relations polyphénols – phénoloxydases chez *Sphagnum fallax* le long d’un gradient écologique « haut-bas » marais

*Vincent E.J. Jassey, Geneviève Chiapusio, Daniel Gilbert, Alexandre Buttler, Marie-Laure Toussaint et Philippe Binet (2011) Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in *Sphagnum fallax*. Global Change Biology 17: 2945-2957 doi: 10.1111/j.1365-2486.2011.02437.x.*

1 Préambule

Les précédents résultats ont démontré que les relations entre les composés phénoliques totaux libérés par la sphaigne et les communautés microbiennes étaient influencées par l’augmentation des températures. Bien que ces résultats soient importants, la dynamique spatiale et temporelle de ces relations sous un climat plus chaud, ainsi que les relations entre polyphénols et activités microbiennes, restent encore floues. C’est pourquoi, afin de suivre *in situ* la dynamique spatio-temporelle de ces relations, nous avons choisi de poursuivre plus spécifiquement nos travaux sur les relations entre les polyphénols, les densités et les activités des champignons producteurs de phénoloxydases. L’étude présentée dans les pages suivantes correspond à une étude détaillée des variations saisonnières de chacun de ces paramètres biologiques le long du gradient écologique « haut-bas » marais sous l’influence d’une hausse des températures.

Dans un premier temps, cette étude a révélé que le réchauffement climatique accentuait les variations saisonnières déjà existantes en conditions ambiantes. Dans un second temps, les résultats ont montré que le réchauffement climatique avait peu d’effet sur la densité des champignons producteurs de phénoloxydases et les activités phénoloxydases. Cependant, une forte diminution des concentrations des polyphénols totaux, et donc du métabolisme phénolique, a été observée. De plus, une relation

négative a été trouvée entre les composés phénoliques et les activités phénoloxydases, soulignant un effet inhibiteur potentiel des composés phénoliques sur les activités phénoloxydases. Pour conclure, les résultats ont également démontré qu'une différence de réponse très nette existait entre le « haut » et le « bas » marais, suggérant que les tourbières ne répondaient pas toutes de façon similaire au réchauffement.

*2 Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in *Sphagnum fallax**

a) Abstract

Extracellular phenoloxidase enzymes play an important role in the stability of soil carbon storage by contributing to the cycling of complex recalcitrant phenolic compounds. Climate warming could affect peatland functioning through an alteration of polyphenol/phenoloxidase interplay, which could lead them to becoming weaker sinks of carbon. Here, we assessed the seasonal variability of total phenolics and phenoloxidases subjected to 2-3°C increase in air temperature using Open Top Chambers. The measurements were performed along a narrow fen-bog ecological gradient over one growing season. Climate warming had a weak effect on phenoloxidases, but reduced phenolics in both fen and bog areas. Multivariate analyses revealed a split between the areas and also showed that climate warming exacerbated the seasonal variability of polyphenols, culminating in a destabilization of the carbon cycle. A negative relationship between polyphenols and phenoloxidases was recorded in controls and climate treatments suggesting an inhibitory effect of phenolics on phenoloxidases. Any significant decrease of phenolics through repeatedly elevated temperature would greatly impact the ecosystem functioning and carbon cycle through an alteration of the interaction of polyphenols with microbial communities and the production of extracellular enzymes. Our climate treatments did not have the same impact along the fen-bog gradient and suggested that not all the peatland habitats would respond similarly to climate forcing.

Key words: Carbon cycle, Climate warming, Ecological gradient, Open-Top-Chambers, Peatland, Phenoloxidases, Polyphenols.

b) Introduction

Boreal peatlands currently represent a terrestrial sink of carbon with approximately one-third of the world's organic carbon (390-455 Pg) (Gorham, 1991; Moore, 2002). The ability of peatlands to store atmospheric carbon resides in the long-term accumulation of partially decomposed organic matter. The accumulated peat is mainly dominated by remnants of mosses of the *Sphagnum* genus, highly enriched in recalcitrant organochemical compounds such as polyphenols (van Breemen, 1995; Verhoeven&Toth, 1995). Such compounds play a role both through a polyphenolic network linked to cell walls which could directly preserve *Sphagnum*-derived organic matter from degradation, and through the release of water soluble phenolics which directly interact with the surrounding environment (van Breemen, 1995; Verhoeven & Liefveld, 1997). Phenolics produced by *Sphagnum* have a potential inhibitory effect on fungal and bacterial activity and/or on enzymes involved in organic matter decomposition (Wetzel, 1992; Fenner *et al.*, 2005; Opelt *et al.*, 2007; Mellegard *et al.*, 2009). Among the diversity of enzymatic activities recorded in peat soils, only phenoloxidases – mainly produced by fungi – are involved in the polymerization, depolymerisation and transformation of both complex and simple phenolic compounds (Pindet *et al.*, 1994; Thormann *et al.*, 2002; Fenner *et al.*, 2005; Baldrian, 2006; Sinsabaugh, 2010). However, acidic conditions, waterlogging and low soil temperatures that occur in peat soils were recognized to limit phenoloxidase activity (Pind *et al.*, 1994, Williams *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2001a, b; Toberman *et al.*, 2008, 2010). Thus, carbon sequestration in peatlands is thought to partly result from a suppression of phenoloxidase activity (Freeman *et al.*, 2001a, 2004).

The expected increase of air temperatures in boreal regions is predicted to lead to a destabilization of peatland carbon stores (Smith *et al.*, 2004; Strack, 2008). Owing to the temperature regimes that currently constrain biological activities, climate warming may significantly impact the stability of the carbon cycle of peatlands by the breakdown of its recalcitrant organic matter and thus act on "the enzymatic latch" (Freeman *et al.*, 2001a, 2004). However, recent researches on the effect of climate change on phenoloxidases highlight equivocal results in peatlands (Laiho, 2006; Fenner *et al.*, 2007; Toberman *et al.*, 2008, 2010).

In regions without permafrost the most fundamental distinction among peatland types is between bog and fen (Bridgman *et al.*, 1998, 2001; Rydin & Jeglum, 2006). Bogs and fens have been found to have different plant communities, hydrology, nutrient availability, and soil chemistry (Bridgman *et al.*, 1998, 2001; Wheeler & Proctor, 2000; Rydin & Jeglum, 2006). Owing to these differences in biotic and abiotic settings, bogs and fens are likely to differ in their response to climate change, (Weltzin *et al.*, 2000,

2001, 2003). Recently, Jassey *et al.* (2011a) demonstrated that microorganisms (e.g. testate amoebae) and their interplay with polyphenols varied along a short fen-bog gradient. Accordingly, an understanding of how climate change modifies carbon cycling in peatlands by modifying the polyphenol/phenoloxidase interplay in different ecological settings is essential to assess the capacity of peatlands to continue to store carbon.

The aim of this study was to investigate the impact of experimental climate warming on seasonal variation of polyphenols, phenoloxidases and their interplay in different ecological settings. These factors were studied at two depths along the living *Sphagnum* shoot on a short ecological gradient from a transitional *Sphagnum*-dominated poor fen to a *Sphagnum* bog with more pronounced micro-topography. Temperatures were manipulated using open-top chambers placed on half of the sampling plots, and compared with control plots. We hypothesized that (1) seasonal variations of polyphenols, phenoloxidases and their interplay would be different between the structurally more complex *Sphagnum* "bog" habitat and the more uniform poor fen, and (2) the warming effect would alter the seasonal variations of these factors along the fen-bog gradient.

c) Materials and methods

Field site and vegetation

The study site is an undisturbed *Sphagnum*-dominated mire situated in the Jura Mountains (The Forbonnet peatland, France, 46°49'35"N, 6°10'20"E) at an altitude of 840 m a.s.l. Cold winters (on average -1.4°C) and mild summers (on average 14.6°C) characterize the site. The annual mean temperature measured at the site over a one-year period from 5th November 2008 to 30th November 2009 was 6.5°C and the annual precipitation 1200 mm.

Samples of *Sphagnum fallax* were collected within homogeneous areas of *S. fallax* carpet across two adjacent areas selected in relation to their wetness, soil micro-topography, vegetation and assessment of sources and decay of organic matter according to Delarue *et al.*, (2011). The first sampling area (called "fen") was a transitional *Sphagnum*-dominated poor fen with a relatively flat and homogeneous topography, characterized by a moss cover dominated by *S. fallax* and by the lack of *S. magellanicum*. Vascular plants such as *Eriophorum vaginatum*, *Vaccinium oxycoccus* and *Andromeda polifolia* were recorded in very low abundance. *Scheuchzeria palustris* and *Carex limosa* occurred outside of the studied plots. The second sampling area (called "bog") was a *Sphagnum* bog directly adjacent to the fen area. Patterns of hummocks

with *S. magellanicum*, *V. oxycoccus*, *E. vaginatum* and *Calluna vulgaris*, and hollows with lawns of *S. fallax*, *Carex rostrata* and *A. polifolia* characterized the sampling area. The terms "fen" and "bog" are used for simplicity and to denote the existence of a trophic and wetness gradient inferred from the vegetation.

Environmental manipulations and data collection

In each of the two sampling areas, six plots were selected in representative surfaces. Among the 12 sampling plots, the maximal distance between the two most distant plots was ca. 30 m. In both sampling areas, 3 plots (replicates) were randomly assigned as controls and 3 plots were assigned as climate warming treatment (begin April, 2008). An increase of air and soil temperatures was passively achieved by placing hexagonal ITEX open-top chambers (hereafter "OTC") over the vegetation (Marion *et al.*, 1997). Since warming in OTC chambers also affects the top-soil humidity, we hereafter name this treatment "climate effect". Hexagonal OTCs were 50 cm high, had a diameter of 1.8 m at the top and 2.5 m at the bottom, and were made of transparent polycarbonate. To reduce edge effects such as reduced precipitation in the chamber we used the OTC design described by Aerts *et al.* (2004) and Dorrepaal *et al.* (2004). In each plot, air temperature (10 cm above the *Sphagnum* surface) and soil temperature (7 cm below the *Sphagnum* surface) were recorded continuously every 30 minutes using thermocouple probes and a datalogger (CR-1000 Campbell). Moreover, in each plot, pH, conductivity, water content of *Sphagnum* and the depth to the water table (DWT) were measured at each sampling campaign.

Every month from 25th May 2009 to 25th November 2009, samples of *S. fallax* were collected in each plot for the study of phenolic compounds, fungi-producing phenoloxidases and phenoloxidase activities around 10 permanent markers inserted in moss carpets. The goals of this sampling design were (1) to allow for multiple sampling at the site over time, and (2) to obtain a composite sample from each plot and avoid any bias due to spatial heterogeneity. *S. fallax* shoots were cut into two pieces (sampling depth): 0-3 cm (living "top segments") and 3-10 cm (early declining "bottom segments") from the capitulum.

Phenolic compounds quantification

Primarily bound (hereafter "bound phenolics") and water-soluble phenolic (hereafter "free phenolics") compounds were extracted from lyophilized mosses as described in Jassey *et al.* (2011a). Briefly, bound phenolic compounds were extracted using ethanol / distilled water solution (80/20 v/v) and free phenolics using distilled water. Free and bound total

Relations polyphénol - phénoloxydase

phenolic contents were quantified with the Folin-Ciocalteu reagent and were expressed in mg equivalent gallic acid (A_{760}) per gram of *Sphagnum* dry mass (mg g^{-1} DM).

Quantification of culturable fungi-producing phenoloxidasés

Culturable fungi-producing phenoloxidasés were counted as described by Criquet *et al.* (2000). Two grams fresh weight of *Sphagnum* was powdered (< 0.5 mm; SEB®*Optimo* compact mixer) and suspended in 250 mL of a 0.85% NaCl solution with 0.05% Tween 80. This mixture was agitated for 2h on a reciprocal shaker (120 rpm). The extract was diluted (10^{-1} to 10^{-3}) in NaCl (0.85%) solution and 0.1 mL of each dilution was used to inoculate a medium containing 5 g of malt (Sigma), 15 g of agar (Sigma), 50 mg of chloramphenicol (Sigma) and 0.5 mL of guaiacol (Sigma) per liter. The fungi-producing phenoloxidasés were revealed by the red color of the environment related to the oxidation of guaiacol. Results are expressed in colony forming units per gram of *Sphagnum* dry mass (CFU g^{-1} DM).

Phenoloxidase activities quantification

Phenoloxidase activities were quantified following the method described by Criquet *et al.* (1999). Phenoloxidasés were extracted by adding in a Pyrex bottle 3 g of fresh weight of powdered *Sphagnum* with 50 mL of a 0.1 M CaCl_2 solution with 0.05% Tween 80 and 20 g of polyvinylpyrrolidone. The samples were shaken at room temperature for 1h on a reciprocal shaker (120 rpm). The suspension of each extract was filtered through a double layer of gauze to remove floating debris and centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C. Then the supernatant was filtrated through 1.2 μm Whatman GF / D filters and concentrated for 24h in a cellulose-dialysis tube (Medicell International Ltd.) with a 10 kDa molecular mass cut-off, covered with polyethylene glycol (PEG, Sigma-Aldrich), until a final volume of 1/10 of the initial volume. Enzymatic activities were measured using a 96 well microtiter plate with L-DOPA (10 mM). For each sample, 8 pseudo-replicate wells were included. Assay wells received 150 μl of extract. Phenoloxidase activities were measured by adding 100 μL of L-DOPA. For each sample, 8 pseudo-replicate wells containing 150 μl of boiled extract (2h at 90°C) were performed as control. Then samples were incubated at 23°C and L-DOPA oxidation rates were monitored spectrophotometrically at 460 nm for 24h using a microstation plate reader (Bioadvance).

Enzymatic activities were calculated by subtracting the mean absorbance of control wells from the mean absorbance of extract wells and by using Beers Law. The molar absorbancy coefficient for the L-DOPA product 3-dihydroindole-5,6-quinone-2-carboxylate (dicq) ($3.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; Mason, 1948) was used and activities were

expressed in enzymatic units (U) defined as one nmol of substrate oxidized per h⁻¹ per g of dry mass.

Numerical analysis

To compare the general effects of the OTCs on environmental parameters during the 7 months of our study, daily average temperature, as well as minimum and maximum daily temperatures, pH and conductivity were calculated for spring (May-June), summer (late-June-September) and autumn (late-September-November). Then repeated measures ANOVA were computed among sampling areas to focus on the effect of OTCs on these factors with time as repeated measure (time = 3: spring, summer and autumn). The depth and climatic effect on phenolic compounds (free and bound), culturable fungi-producing phenoloxidases and phenoloxidase activities were also analysed using repeated measures ANOVA with time as repeated measure (time = 7: May-November). Each dataset was thereafter split by month to get one response matrix per month for each biological factor using one-way ANOVA. In parallel, correlations between free phenolics, fungi-producing phenoloxidases and phenoloxidase activity in controls and OTCs were determined along the fen-bog gradient using general linear models (GLM) and one-way ANOVAs. The residuals from ANOVAs were tested for normality. Moreover, the coefficient of determination of each variable in the models (adjusted R^2) was determined with an analysis of variance.

Redundancy analyses (RDA) were applied to *Sphagnum* related biochemical variables (polyphenols, phenoloxidases, culturable fungi-producing phenoloxidases) for each *Sphagnum* segment among the fen and the bog areas using climatic treatment (a binary variable with two levels: Control and OTC), *Sphagnum* moisture content and time (months coded as classes) as explanatory variables. The interactions between climatic treatment and *Sphagnum* moisture content were also included in the model. The significance of the model and of each explanatory variable included in the model was tested using 1,000 permutations (Gillet *et al.*, 2010). Partial RDAs were also computed after removing the time effect (months) from the ordination following the same method. Additionally, variation partitioning using RDA and adjusted R^2 was applied to compare the respective effect of each explanatory variable alone (Peres-Neto *et al.* 2006).

Multiple factor analysis (MFA) was used to symmetrically link seven groups of descriptors split in seven sub-matrices: the two *Sphagnum* related biochemical matrices (phenolic compounds and phenoloxidase data sets), the two abiotic data sets describing physical (depth to water table, air and soil temperature, rainfall and *Sphagnum* moisture content) and chemical (conductivity and pH) environmental conditions, the climatic data set describing climate treatment (a binary variable with two levels: OTC coded with 1 and

control with 0), and the two data sets describing the seasons (spring, summer or autumn coded as classes), and the sampling areas (fen or bog coded as classes). MFA was chosen because it allows the simultaneous coupling of several groups or subsets of variables defined on the same objects and to assess the general structure of the data (Escoufier & Pagès, 1994). Briefly, MFA is basically a PCA applied to the whole set of variables in which each subset is weighted, which balances inertia between the different groups and thus balances their influences. RV-coefficients (Pearson correlation coefficient, ranging from 0 to 1) were used to measure the similarities between two data matrices and were tested by permutations (Robert & Escoufier, 1976; Josse *et al.*, 2008). Euclidean distances of global PCA were used in MFA to perform cluster analysis according to the Ward method, and the resulting dendrogram was projected in the MFA ordination space. This allows discovering the main discontinuities among groups and/or sites described by all biotic and abiotic subsets of variables (Carlson *et al.*, 2010; Borcard *et al.*, 2011).

All multivariate analyses were performed with the software R 2.10.1 (R Development Core Team 2010) using the *vegan* (Oksanen *et al.*, 2010) and *FactoMineR* (Husson *et al.*, 2009) packages.

d) Results

Seasonal variation of climate variables

In spring and summer (May to September), the OTCs significantly increased the daily maximum air temperature (an average of 3°C; ANOVA $P < 0.01$) and the average air temperature (an average of 1°C; ANOVA $P < 0.01$). Climate treatment also significantly affected the daily soil temperature in spring in the bog area (an average increase of 0.6°C; ANOVA $P < 0.05$) and in summer in the fen area (an average increase of 0.8°C; ANOVA $P < 0.05$). No significant differences emerged for the minimum and maximum soil temperatures. In autumn, no significant effect of OTCs was recorded along the gradient for air and soil temperature. An indirect effect of climate treatment was also observed in *Sphagnum* mosses, since a significant decrease of *Sphagnum* water content in OTCs was recorded in summer (August and September) in both *Sphagnum* segments in the bog area, and in top segments in the fen area (ANOVA $P < 0.05$. Fig. 4.4).

Rainfall significantly varied following the seasons with a decrease from June (156 mm) to August, September and October (a monthly average of 72 mm) and an increase in November (231 mm). These variations were also reflected in the depth to water table. Following the seasons and climate treatments, average monthly pH did not significantly

vary in both sampling areas (Table 4.4). Conversely, the conductivity increased from spring to autumn in both sampling areas, with significant differences between controls and OTCs in summer (bog area, $P = 0.05$) and in autumn (fen area, $P = 0.01$).

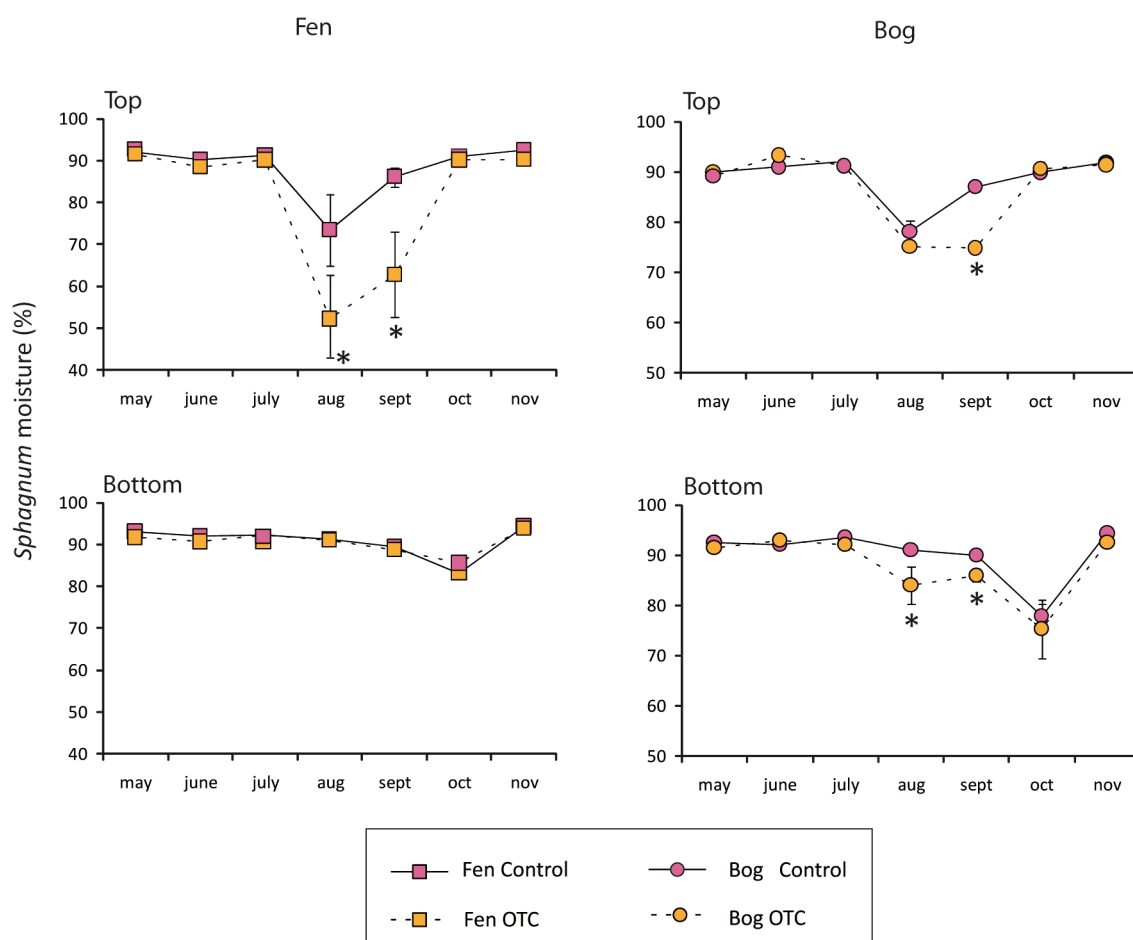


Figure 4.4: Seasonal variations of *Sphagnum* moisture content in the two shoot segments (top and bottom) in controls and OTCs of the fen (a, b) and bog (c, d) areas. Mean \pm S.E. ($n = 3$). Asterisk indicates significant difference between controls and OTCs (ANOVA tests, $P < 0.05$).

Climate effect on phenolic compounds and seasonal variations

Regardless of seasonal variations, climate effect and fen-bog gradient, bound and free phenolic contents were significantly higher (ANOVA $P < 0.001$) in top segments as compared to bottom segments (Fig. 4.5), except bound phenolics in the bog area ($P = 0.16$). The two phenolics variables were also positively correlated, with respectively $r = 0.38$ and 0.37 in the bog area (ANOVA, $P < 0.01$) and $r = 0.70$ and 0.41 in the fen area (ANOVA, $P < 0.001$). The climate effect on bound phenolics resulted in a decrease of concentration of an average of $0.4 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ in the two sampling areas, particularly in spring and summer in top segments ($P = 0.04$ and 0.02 , respectively). The climate effect on free phenolics was essentially recorded in the fen area for both *Sphagnum* segments, with constantly lower concentrations in OTCs than in controls over the seasons (ANOVA, $P = 0.001$) (Fig. 4.5), whereas the climate effect in the bog area was more rare.

In controls, seasonal variations of bound phenolics were recorded in top segments along the fen-bog gradient ($P = 0.04$ and 0.05 , respectively) (Fig. 4.5a, b, c, d), especially from May to August with a significant decrease of an average of $1.5 \text{ mg.g}^{-1} \text{ DM}$. In bottom segments of controls, no significant seasonal variations of bound phenolics were recorded along the fen-bog gradient ($P = 0.86$ and 0.66 , respectively), with an average of respectively $1.5 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ in the bog area and $1.0 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ in the fen area. As for bound phenolics, seasonal variations of free phenolics in controls were recorded in top segments with a significant decrease in summer (from 1.4 to $0.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ in the two sampling areas; $P < 0.01$ and 0.03 , respectively). In bottom segments, no seasonal variations of free phenolics were recorded, with an average of $0.8 \text{ mg g}^{-1} \text{ DM}$ along the fen-bog gradient (Fig. 4.5e, f, g, h). In addition, a significant correlation was found between the decrease of phenolics (free and bound) and the decrease of *Sphagnum* moisture content in summer (ANOVA, $P < 0.01$) in both segments in the bog area, and in top segments in the fen area.

In OTCs, the same seasonal variations as in controls were recorded in *Sphagnum* segments and for both phenolics along the fen-bog gradient ($P < 0.05$ for all) (Fig. 4.5). As for controls, the same significant correlations were recorded between the decrease of phenolics (free and bound) and the decrease of *Sphagnum* moisture content in summer (ANOVA, $P < 0.05$).

Tableau 4.4: Seasonal variations of environmental variables measured in controls and OTCs in the fen and bog sampling areas in Le Forbonnet mire (French Jura). *Letters* indicate significant seasonal variations ($P < 0.05$). *Asterisks* indicate significant variations between controls and OTCs ($P < 0.05$).

| | | Spring 2009 | | Summer 2009 | | Autumn 2009 | |
|-----|-------------------|-----------------------|-------------------|-----------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | | May – June | | Late-June – September | | Late-September – November | |
| | | Control (mean± SE) | OTC (mean± SE) | Control (mean± SE) | OTC (mean± SE) | Control (mean± SE) | OTC (mean± SE) |
| Fen | Conductivity (mV) | 35 ± 7 a | 41 ± 3 a | 35 ± 5 a | 42 ± 9 a | 45 ± 14 a | 58 ± 12 b * |
| | pH | 4.3 ± 0.3 | 4.1 ± 0.3 | 4.2 ± 0.2 | 3.9 ± 0.3 | 4.0 ± 0.2 | 3.8 ± 0.1 |
| Bog | Conductivity (mV) | 45 ± 6 a | 45 ± 5 a | 57 ± 6 a | 50 ± 7 a * | 70 ± 16 b | 68 ± 10 b |
| | pH | 4.0 ± 0.1 | 4.2 ± 0.4 | 4.0 ± 0.3 | 4.0 ± 0.1 | 3.7 ± 0.3 | 3.8 ± 0.4 |

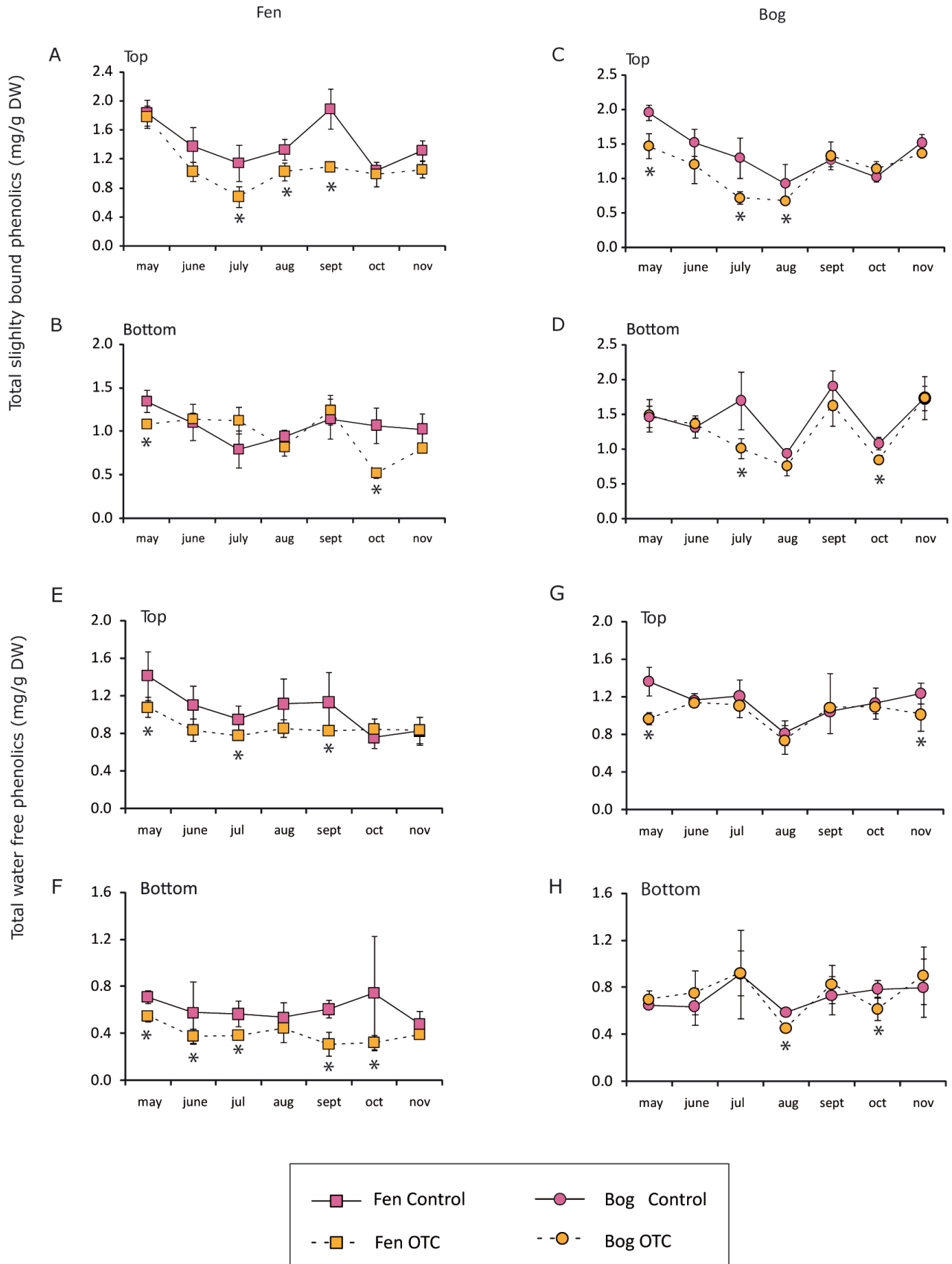


Figure 4.5: Seasonal variations of bound (a, b, c, d) and free (e, f, g, h) phenolics in the two shoot segments (top and bottom) in controls and OTCs of the bog and fen areas. Mean \pm S.E. (n = 3). Asterisk indicates significant difference between controls and OTCs (ANOVA tests, $P < 0.05$).

Climate effect on culturable fungi-producing phenoloxidasés and enzymatic activity, and seasonal variations

Significant differences between top and bottom segments of *Sphagnum* were recorded with overall higher densities of fungi-producing phenoloxidasés and higher phenoloxidase activities in bottom segments as compared to top segments in both sampling areas (ANOVA $P < 0.05$).

For densities of culturable fungi-producing phenoloxidasés, the climate effect was only significant in the fen area in top segments (ANOVA $P = 0.03$), with a significant lower value in June in OTCs compared to control (Fig. 4.6a, b). Seasonal variations were recorded for both *Sphagnum* segments in the fen and bog area, with a peak in June in controls ($P < 0.05$) (Fig. 4.6a, b, c, d), while in OTCs this peak was only recorded in the bog area (Fig. 4.6c, d). Climate effects on phenoloxidase activity demonstrated equivocal results in the fen area, while phenoloxidase activity tended to be higher in OTCs in the bog area (Fig. 4.6e, g).

Significant positive correlations were also found between densities of fungi-producing phenoloxidasés and extracellular phenoloxidase activities, in both sampling areas and both climate treatments (on average $r = 0.40$; ANOVA, $P < 0.05$). In parallel, significant negative correlations between free phenolic compounds and phenoloxidase activities were found for controls in the fen and bog areas when top and bottom *Sphagnum* segments were pooled (Fig. 4.7a, b). The same tendency was recorded in OTCs, except in the bog area (Fig. 4.7b). Additionally, the combination of fungi and free phenols in a general linear model explained respectively 27.4% and 10.6% of the variability of phenoloxidase activity in controls, and 29.6% and 0.6% in OTCs in the bog area (adjusted R^2 ; $P < 0.001$). For the fen area another patterns occurred since fungi and free phenolics explained respectively 13.7% and 9.8% of the variability of phenoloxidase activity in controls, and 11.3% and 25.8% in OTCs (adjusted R^2 ; $P < 0.001$).

The phenol-phenoloxidase complex and its relation to abiotic variables

The contribution of the explanatory variables in the RDA (Table 4.5) showed that time (months) has a major influence on the moss biochemical patterns. In bottom segments sampling time explained between 41% and 66% of the variation. In top moss segments, biplots of partial RDAs showed that *Sphagnum* related biochemical variables were influenced by climate treatment, as shown by the separation of control and OTC plots along the first RDA axis (Fig. 4.8.a, c). Together, OTCs and *Sphagnum* moisture content explained 20.6% (fen) and 27.1% (bog) of the variation of biochemical factors ($P < 0.05$) in top segments. Variation partitioning and adjusted R^2 showed that OTCs alone

explained a higher variation in the fen area than in the bog area, whereas *Sphagnum* moisture content has higher influence in the bog than in the fen (Table 4.5). On the other hand, the biochemical descriptors showed a strong opposition between phenolics and warming treatment (OTC) in all biplots, while fungi appears linked to *Sphagnum* moisture content, particularly in top segments.

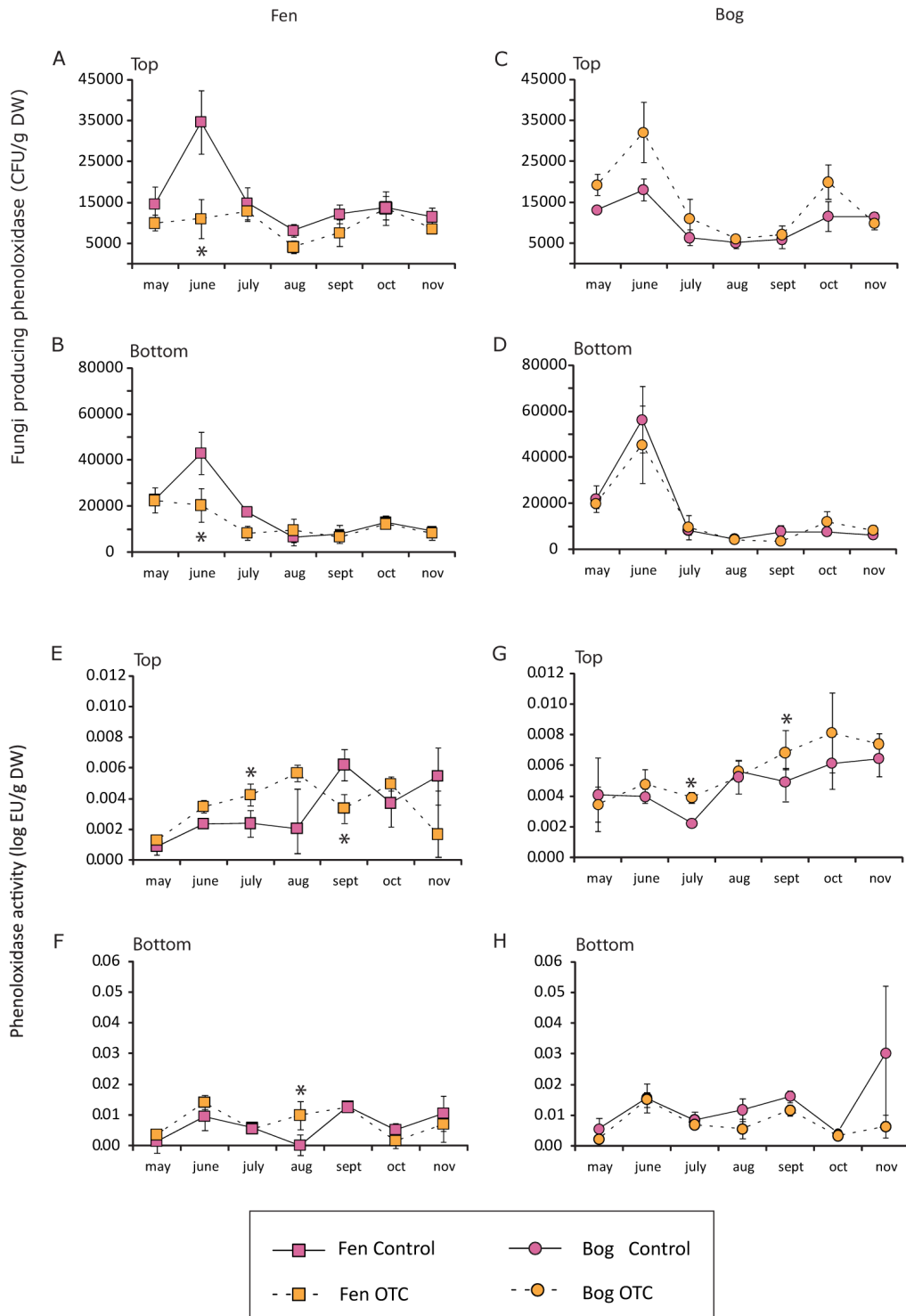


Figure 4.6: Seasonal variations of densities of fungi producing phenoloxidases (a, b, c, d) and phenoloxidase activities (e, f, g, h) in the two shoot segments (top and bottom) in controls and OTCs of the bog and fen areas. Mean \pm S.E. ($n = 3$). Asterisk indicates significant difference between controls and OTCs (ANOVA tests, $P < 0.05$).

If we consider all samples together along the fen-bog gradient in the multiple factor analysis (Fig. 4.9), a clear pattern appeared, with a split into the three seasons (spring, summer and autumn) and within each partition a subdivision into fen and bog areas, each of these subdivisions being further divided into OTC and control plots. The RV-coefficients (Table 4.6) indicate strongest links between *Sphagnum* related biochemical variables, sampling area, climate warming and seasons, and between sampling area and physicochemical environment.

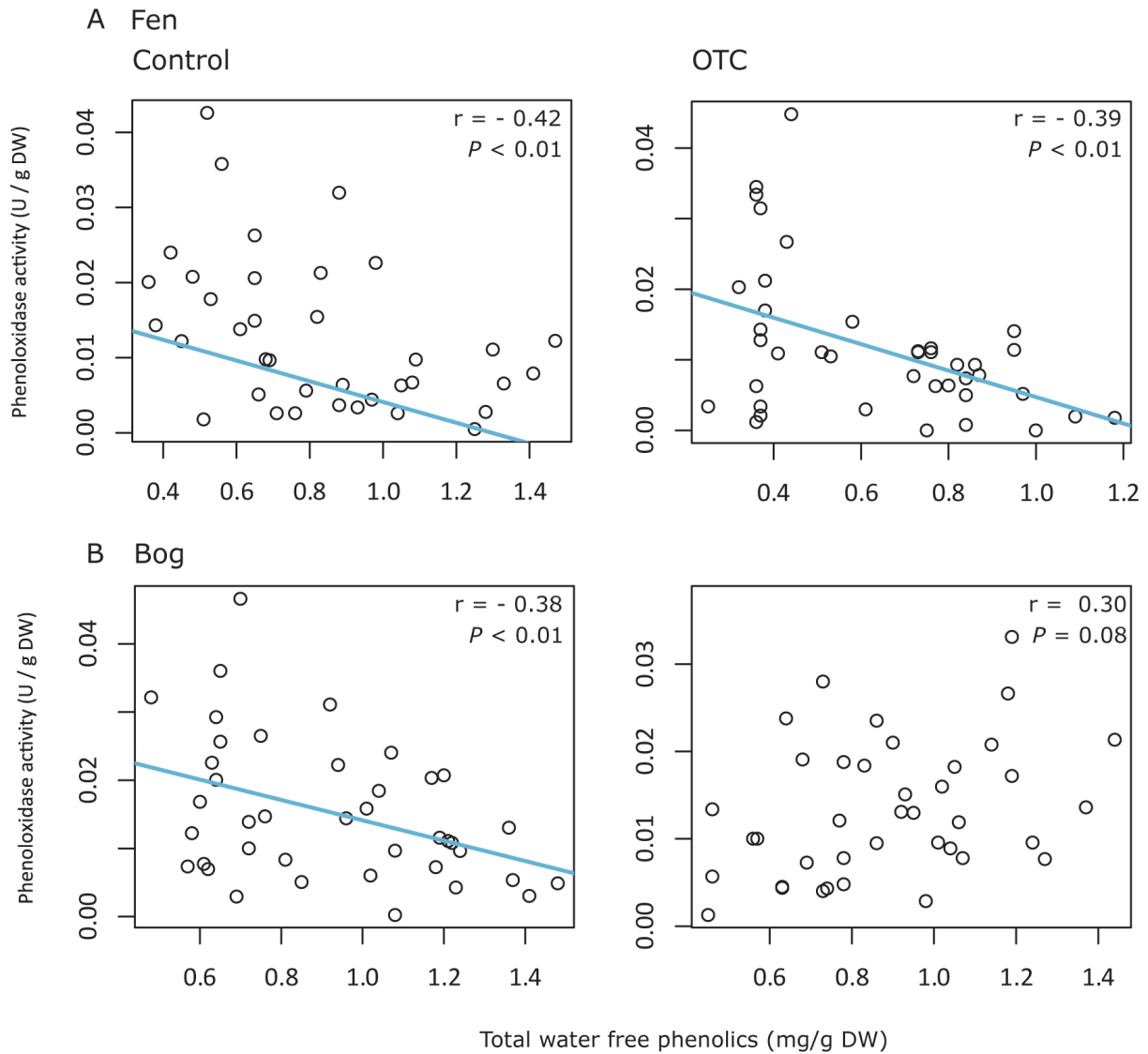


Figure 4.7: Correlations between free phenolics and phenoloxidase activity for *Sphagnum* segments (top and bottom segments pooled) in controls and OTCs in the fen (a) and bog (b) areas.

Tableau 4.5: Summary of RDA on *Sphagnum* related biochemical variables and environmental explanatory variables from Le Forbonnet mire (French Jura): fraction of variance explained and significance of individual variables taken alone. *Sph* moisture = *Sphagnum* moisture content; clim treat = climate treatment.

| Variables | Fen area | | | | Bog area | | | |
|--------------------------|----------|---------|--------|---------|----------|---------|--------|---------|
| | Top | | Bottom | | Top | | Bottom | |
| | % a | p-value | % a | p-value | % a | p-value | % a | p-value |
| Month ^b | 14.2 | 0.001 | 41.2 | 0.001 | 47.1 | 0.001 | 66.2 | 0.001 |
| Sph moisture | 11.0 | 0.032 | 0.2 | 0.80 | 21.7 | 0.001 | 0.3 | 0.12 |
| Clim treat (OTC/control) | 9.3 | 0.007 | 1.8 | 0.23 | 3.2 | 0.05 | 1.7 | 0.13 |

(a) percentage of variance explained (adjusted R^2)

(b) RDAs constrained by months

e) Discussion

Polyphenol/phenoloxidase interplay in *Sphagnum* mosses and along the fen-bog gradient

Sphagnum related biochemical factors quantified in this work yielded different results according to *Sphagnum* segments. Total phenolic content (free and bound) was higher in living top segments as compared to decaying bottom segments in both sampling areas. Such differences have been also observed in *S.fallax* under controlled conditions (Jassey *et al.*, 2011b). This phenomenon is explained by a higher phenolic metabolism in capitulum than in lower part of the shoot, since *Sphagnum* capitula (top segments) constitute the living part of the moss where most of the metabolic processes occur, including the growth (Clymo & Hayward, 1982). The reduction of phenolics towards the lower part of the shoot was also accompanied by an increase of culturable fungi-producing phenoloxidases and of phenoloxidase activity, suggesting a higher degradation of recalcitrant phenolics in early declining *Sphagnum* segments (Baldrian, 2006; Toberman *et al.*, 2010; Sinsabaugh & Follstad Shah, 2011). These results also pointed to the fact that at low concentrations free phenols may induce phenoloxidase activity, and inhibit the oxidation activity at high concentration (Sinsabaugh, 2010). Given that no clear correlation was found between fungi and free phenols, such vertical gradient also highlighted a possible direct inhibitory effect of free phenols on phenoloxidase activity (Wetzel, 1992; Freeman *et al.*, 2001a; Fenner *et al.*, 2005).

Relations polyphénol - phénoloxydase

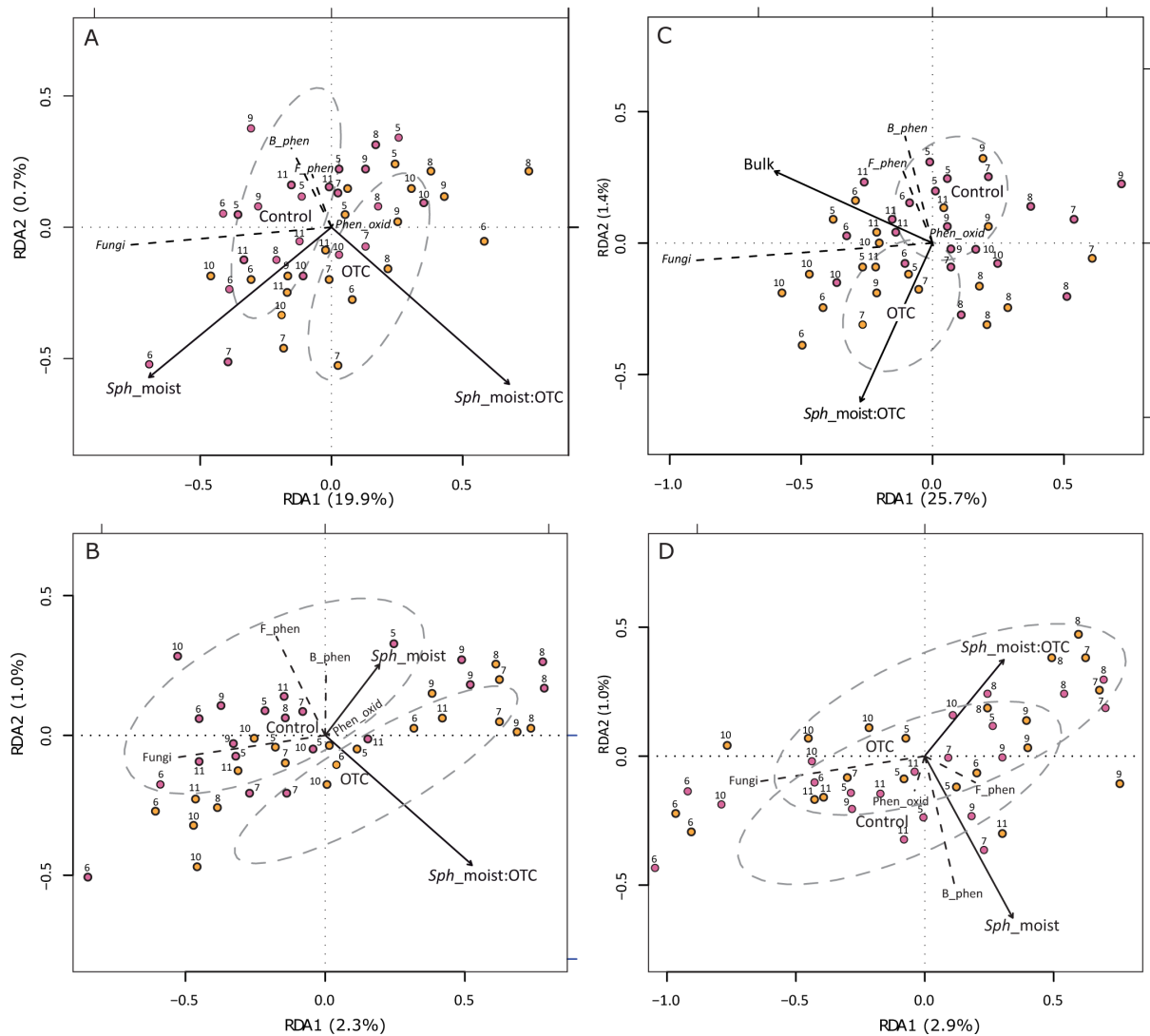


Figure 4.8: Biplots of redundancy analyses (RDA) of biochemical data measured on *Sphagnum* mosses (free and bound phenolics, phenoloxidasés and fungi-producing phenoloxidasés) in top (a) and bottom (b) *Sphagnum* segments of the fen area, and in top (c) and bottom (d) segments of the bog area. Climate treatments are coded with pink symbol for controls and with orange symbol for OTCs. Months are indicated next to the sample points by their number. Season effect has been removed by giving the variable months as covariable. Environmental variables are represented by vectors (arrows for quantitative or semi-quantitative variables): *Sph_moist*: *Sphagnum* moisture content; *Sph_moist*:OTC: interactions between *Sphagnum* moisture and OTCs. Biochemical variables are given with dotted arrows: F_phen: free phenolics, B_phen: bound phenolics; Phen_oxid: phenoloxidasé activity; Fungi: culturable fungi-producing phenoloxidasé. Axes are significant ($P < 0.05$), except for bottom segments. Axes 3 are never significant, with less than 1% of variance). Grey ellipses represent S.E. of site scores around the centroid of each treatment level.

Our results likewise demonstrated a strong relationship between fungi and phenoloxidasé activities. Phenoloxidasé activity is essentially attributable to lignolytic fungi such as basidiomycetes (Criquet *et al.*, 2000; Thormann *et al.*, 2002; Baldrian, 2006). Fungal activity is known to be directly influenced by the supply of organic matter (Berg *et al.*, 1998; Criquet *et al.*, 2000). A study in the same experimental site demonstrated over the fen-bog gradient an increase of organic matter content in the

upper 10 cm soil layer, which induced higher fungal activity (Delarue *et al.*, 2011a). Thus, all of these findings emphasize that phenoloxidase activity was mainly controlled by fungi and secondarily by phenols.

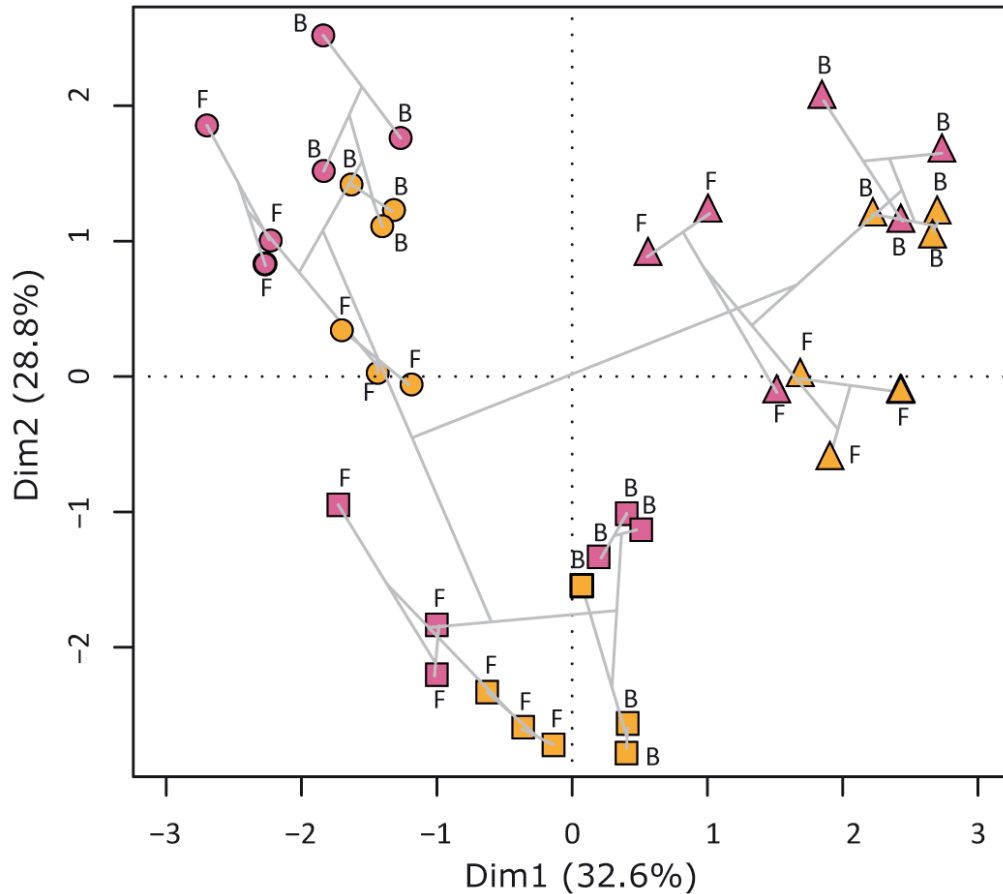


Figure 4.9: Multiple factor analysis (MFA) samples biplot of the entire data set split into 7 groups of variables describing *Sphagnum* biochemistry, environmental physical and chemical conditions, climate warming treatment, seasons and fen-bog areas. Biplot of axes 1 and 2 (both significant at $P = 0.001$) is given together with the result of a hierarchical agglomerative clustering (grey lines) obtained by the Ward method on the Euclidean distance matrix between MFA site scores, showing three main groups of sampling plots (circles = spring, squares = summer, triangles = autumn) and two sub-groups (pink symbols = controls, orange symbols = OTCs). Sampling areas are indicated with letters besides sampling plots (F: fen area; B: bog area).

Beside the differences between *Sphagnum* segments, different patterns of polyphenol content and phenoloxidase activities were recorded along the fen-bog gradient over the seasons. In particular, phenoloxidase activities were more intense in the bog area than in the fen area. Again, this result appeared linked to fungi. The abundance of vascular plants is higher in the bog area and supplies more easily decomposable organic matter, favouring fungal activity (Delarue *et al.*, 2011). A number of studies have demonstrated that fen and bog litters were characterized by distinct

patterns of microfungal community, especially in the surface horizons (Thormann *et al.*, 2001, 2002, 2004; Thormann, 2006; Artz *et al.*, 2007). Thus, vegetation patchiness along the fen-bog gradient may directly affect fungal community composition, and indirectly phenoloxidase activity. In particular, the quality and quantity of plant-derived labile carbon resulting from vegetation succession may directly influence fungal diversity, e.g. polymer- and recalcitrant polymer degraders (Thormann, 2006). On the other hand, the influence of free phenols on phenoloxidases was higher in the fen area than in the bog and this could be explained by qualitative differences of phenolics in *Sphagnum* along the gradient (Opelt *et al.*, 2007). When comparing phenolic content in *Sphagnum* from different ecological setting, Folin assay only gives a global tendency of phenolic variation, and not the quality of free phenols that may influence phenoloxidase activity. Such results clearly call for a detailed analysis of phenolic variation (e.g. phenolic acids or flavonoids).

Tableau 4.6: RV-coefficients (RV) and corresponding *P*-values among the six groups of variables used in the Multiple factor analysis (MFA) of the entire data set split into 6 groups of variables describing *Sphagnum* biochemistry, environmental physical and chemical conditions, climate warming treatment, seasons, depth of moss segment and bog/fen areas. Significant coefficients are in bold.

| | phenolics | | phenoloxidases | | physical | | chemical | | climatic | | Sampling area | | Season | |
|-------------------------------------|-----------|---------|----------------|---------|----------|---------|-------------|---------|-------------|---------|---------------|---------|-------------|---------|
| | RV | p-value | RV | p-value | RV | p-value | RV | p-value | RV | p-value | RV | p-value | RV | p-value |
| Phenolics (free and bounds) | 1.00 | 1.00 | 0.23 | 0.01 | 0.09 | 0.78 | 0.004 | 0.10 | 0.18 | 0.01 | 0.14 | 0.02 | 0.25 | 0.01 |
| Phenoloxidases (fungi and activity) | | | 1.00 | 1.00 | 0.08 | 0.11 | 0.13 | 0.03 | 0.01 | 0.53 | 0.001 | 0.82 | 0.47 | 0.01 |
| Physical environment | | | | | 1.00 | 1.00 | 0.35 | 0.01 | 0.01 | 1.00 | 0.007 | 0.74 | 0.76 | 0.01 |
| Chemical environment | | | | | | | 1.00 | 1.00 | 0.02 | 0.46 | 0.31 | 0.01 | 0.30 | 0.01 |
| Climatic (OTCs) | | | | | | | | | 1.00 | 1.00 | n.a. | n.a. | n.a. | n.a. |
| Sampling area (fen/bog) | | | | | | | | | | | 1.00 | 1.00 | n.a. | n.a. |
| Season (spring, summer, autumn) | | | | | | | | | | | | | 1.00 | 1.00 |

Climate effect on polyphenols, phenoloxidases and their interactions along the fen-bog gradient

As described in previous studies (Dorrepaal *et al.*, 2004; Aerts, 2006), higher air temperatures induced higher evapotranspiration, which resulted in lower *Sphagnum* moisture content during summertime. Obviously, higher evapotranspiration also could have sometimes induced lower soil temperature by heat loss towards atmosphere and reduction of soil thermal conductivity, thus explaining the so-called marginal effect of OTCs on soil temperature (Dabros *et al.*, 2010). Despite contrasted effects of OTCs on air and soil temperature, a climate effect has been recorded on biochemical variables measured along *Sphagnum* segments.

Seasonal effects were predominant for the biochemical variation in *Sphagnum* carpet. However, multivariate analyses revealed a climate warming effect beyond the seasonal variations of *Sphagnum* biochemical related factors. As observed elsewhere (Aerts, 2006; Bragazza, 2008; Dabros & Fyles, 2010; Dabros *et al.*, 2010), the increase of air temperature associated with the reduction in rainfall led to heat waves, and the impact of these events was exacerbated in OTCs increasing drought in top-soil. Enhanced top-soil aeration as a result of water table drawdown and air temperature increase was recognized to influence phenoloxidase activity and polyphenols (Freeman *et al.*, 1993, 2001a, b; Toberman *et al.*, 2008; Ellis *et al.*, 2009). As supported by current findings in peatlands (Pind *et al.*, 1994; Williams *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 2001a; Toberman *et al.*, 2008, 2010; Sinsabaugh, 2010), peat soil environmental factors (i.e. acidic pH, water table depth, and oxygen) mainly inhibit phenoloxidase activity, explaining our weak variations of phenoloxidases with climate warming.

In parallel, climate warming had greatest impact on the phenolic metabolism with a decrease of phenolics related to the decrease of *Sphagnum* moisture in OTCs and the increase of air temperatures. The level of total phenolic compounds tends to be lower in several boreal species under elevated temperatures (Veteli *et al.*, 2007). Such decrease may be explained by a diminution of carbon partitioning to phenolics (Herms & Mattson, 1992; Mattson *et al.*, 2005). Elevated temperatures are recognized to induce better growth of *Sphagnum* species (Breeuwer *et al.*, 2008). It might well be that a trade-off between growth and differentiation (i.e. the production of carbon-based secondary metabolites such as phenols) occurred, with a potential diminution of carbon skeletons allocation to phenolics (Mattson *et al.*, 2005; Veteli *et al.*, 2007). Such results imply that any repeated significant decrease of phenolics through more intense and frequent heat waves – as predicted by climate scenarios (Meehl & Tabaldi, 2004; Schär *et al.*, 2004; IPCC, 2007) – will probably lead to the opening of the enzymatic latch, as described by Freeman *et al.* (2001b).

Furthermore, our climate experiment demonstrated that climate warming has not had the same impact along the fen-bog gradient since a stronger decrease of polyphenols was recorded in the fen area. This decrease induced a switch between fungi and free phenols, leading to a reduction of the potential inhibitory effect of free phenols on phenoloxidases. However, the decrease in the density of culturable fungi-producing phenoloxidase during dryer periods could not compensate for the decrease of phenolics and lowering of their inhibitory effect on phenoloxidase activity. Alternatively, or additionally, phenolics may also have inhibitory effects on other microbial activities with implication for the carbon cycle, such as hydrolase activity (Fenner *et al.*, 2005, 2007). Thus, the reduction of the inhibitory effect of free phenols could affect carbon cycling in

the fen area through another microbial/polyphenols interplay (e.g. Jassey *et al.*, 2011a). In the bog area phenoloxidase activity remained the key factor influenced by climate treatment with a slight increase of activity in top segments, leading to potentially higher degradation of recalcitrant materials in surface horizons. In contrast to the fen area, it appeared that fungi mainly influenced phenoloxidases in OTCs, as shown by GLMs.

Although a slight increase of temperature induced by OTCs is not strong enough to significantly affect the decomposition rate of *Sphagnum* litter on short-time scale (Dabros *et al.*, 2010), our results demonstrated that already within a 7-month period key elements of the carbon cycle can be altered in surface horizons. Furthermore, our climate experiment highlights different responses of *Sphagnum* related biochemical variables along the fen-bog gradient. The main consequence is that not all the peatland habitats would respond similarly to climate forcing. Ultimately, our results suggest a destabilization of peatland ecosystems and reinforce the point that phenoloxidase/polyphenol interplay is especially critical to understanding the response of peatlands to climate change.

Acknowledgments

This research is a contribution of the ANR PEATWARM project (Effect of moderate warming on the functioning of *Sphagnum* peatlands and their function as a carbon sink). PEATWARM is supported by the French National Agency for Research under the “Vulnerability: Environment—Climate” Program (ANR-07-VUL-010). Further funding to V. Jassey by the Franche-Comté Region is kindly acknowledged. The authors would like to thank F. Gillet (Université de Franche-Comté, France) for his statistical assistance. They also thank R. Payne (University of Manchester, England) for his English edits, and the three reviewers for their valuable review of this work.

3. Influence de l'augmentation des températures sur les activités phénoloxydases et peroxydases dans une tourbière à sphaignes

Vincent E.J. Jasey, Geneviève Chiapusio, Daniel Gilbert, Marie-Laure Toussaint et Philippe Binet (sous presse) *Phenoloxidase and peroxidase activities in a Sphagnum-dominated peatland in a warming climate. Soil Biology and Biochemistry.*

1 Préambule

Lors de l'étude précédente, le suivi saisonnier des activités phénoloxydases a montré qu'elles étaient peu sensibles à l'augmentation des températures. Cependant, la mesure de ces activités en tourbières a été réalisée de manière globale, sans distinguer les phénoloxydases O₂ dépendantes des peroxydases H₂O₂ dépendantes. Fort de ce constat, une étude complémentaire à la précédente a été réalisée afin (i) de caractériser les différentes activités oxydatives en tourbières, (ii) de définir les substrats les plus sensibles quant à la quantification de ces activités en tourbières, et (iii) de mesurer l'impact du réchauffement climatique sur ces activités.

Ainsi, différents substrats, généralement utilisés dans les sols et litières forestières, ont été testés, tels que la syringaldazine, le 2,7-diaminofluorène (DAF) ou le 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulphonate) (ABTS) (Criquet *et al.*, 2000a ; Baldrian, 2006 ; Theuerl & Buscot, 2010).

La comparaison de substrats utilisés pour mesurer les activités enzymatiques O₂ et H₂O₂ dépendantes a montré que le DAF était le substrat le plus sensible et le plus stable pour quantifier les activités phénoloxydases et peroxydases en tourbière. Les résultats de cette étude ont aussi démontré que les peroxydases étaient les activités enzymatiques oxydatives dominantes en tourbières, et ce quelque soit le type de tourbière pris en compte (« haut » ou « bas » marais). Ces résultats ont aussi démontré que ces activités étaient plutôt d'origine végétale, en l'occurrence en provenance des

sphaignes. Par ailleurs, l'étude de la hausse des températures sur ces activités a confirmé les résultats de l'étude précédente quant à l'effet du réchauffement sur les phénoloxydases. En revanche, le réchauffement a induit une augmentation systématique des activités peroxydases en surface dans le « bas-marais », confirmant par la même occasion la différence de réponse entre les deux zones écologiques. Cette étude constitue alors une étude pionnière en ce qui concerne la différenciation des activités peroxydases et phénoloxydases en tourbières.

2 Phenoloxidase and peroxidase activities in Sphagnum-dominated peatlands in a warming climate

a) Abstract

Peatlands still suffer from the scarcity of available data about the characterization and the response to climate forcing of the main oxidative enzymes that occur over the seasons. In the present study, phenoloxidase and peroxidase activities were examined in *Sphagnum* lawns along a narrow fen-bog gradient under experimental elevated temperatures. We showed that peroxidase activities from *Sphagnum* mosses were 1000-fold higher than those of phenoloxidases irrespective of seasons and sampling areas. Peroxidase activities increased (+ 30%) with the rise of air temperatures (an average of 1°C), while warming did not alter phenoloxidase activities. These results suggest that the monitoring of peroxidase activities in peatlands may represent a suitable and forward indicator of the impact of climate warming on carbon cycle in peatlands.

Keywords: 2,7-diaminofluorene; peroxidases; phenoloxidases; climate warming; peatland; open top chambers

b) Introduction

Extracellular phenoloxidase and peroxidase measurements in ecosystems provide essential information on the stability of the carbon cycle (Sinsabaugh, 2010; Theuerl et al., 2010). By contributing to the oxidation and transformation of both complex and simple phenolic compounds, these enzymes induce partial or complete degradation of such recalcitrant compounds, and finally act on carbon cycling (Baldrian, 2006; Sinsabaugh, 2010; Theuerl et al., 2010). Considering the ongoing global warming, these enzymes gain scientific concern in terrestrial carbon reservoirs, such as peatlands (Fenner et al., 2005; Laiho, 2006; Jassey et al., 2011b). The accumulation of carbon in peat soils is thought to partly result from a suppression of the normal pathways of enzymatic decomposition in which oxidative enzymes, such as phenoloxidases, play a key role (Freeman et al., 2001, 2004).

Although phenoloxidases (PO) involved in the degradation of polyphenols are divided into PO O₂ (e.g. laccases, tyrosinases) and PO H₂O₂ (e.g. lignin and manganese peroxidases) dependent (Criquet et al., 2000a; Duran & Esposito, 2000; Sinsabaugh et al., 2003, Alarcón-Gutiérrez et al., 2008; Sinsabaugh, 2010), only phenoloxidase O₂ dependent have been predominantly investigated to date in peatlands. In forest litters, different spatiotemporal variations of PO O₂ and H₂O₂ dependent were recorded, emphasizing that all of these extracellular enzymes do not respond similarly to environmental changes (Criquet et al., 2000a; Duran and Esposito, 2000; Alarcón-Gutiérrez et al., 2008; Kaiser et al., 2010). Thus, peatlands suffer from the scarcity of available data about the characterization and the response to warming of these oxidative enzymes that occur over the seasons and ecological settings.

The purpose of the present paper was to determine the impact of an experimental climate warming on phenoloxidase activities O₂ and H₂O₂ dependent in peatlands over two seasons along a transitional fen-bog gradient. Because our assays do not discriminate individual enzymes, we use here the generic terms phenoloxidase and peroxidase to describe the activity of enzymes that use O₂ and H₂O₂ as an acceptor, respectively.

c) Materials & Methods

During field campaigns of summer and autumn 2010, peroxidases and phenoloxidases were investigated within a larger mire complex in fen and bog areas situated in the Jura Mountains (France, 46°49'35''N, 6°10'20''E). Sampling areas were situated along a transitional gradient between a poor fen and a raised bog with vegetation composition dominated by *Sphagnum fallax* (Jassey et al., 2011b). Samples of *S. fallax* were collected and cut into two levels: 0-3 cm (living segments = Top) and 3-10 cm (early declining segments = Bottom) from the capitulum. In fen and bog areas, 6 *Sphagnum* plots were selected in representative surfaces including 3 replicates as ambient treatment and 3 replicates as warming treatment (beginning of the warming treatment April 2008). Increasing of air temperature was passively achieved in warming plots using open-top chambers (hereafter referred as OTC) over the vegetation (Jassey et al., 2011b). Air temperatures (10 cm above *Sphagnum* surface) were monitored continuously in each plot.

Because soil organic matter could affect enzyme activities, a specific method of extraction was used (Criquet et al., 1999). 3 g FW of *S. fallax* in 50 mL 0.1 M CaCl₂ with 0.05% Tween 80 and 20 g PVPP were shaken for 1h. After centrifugation, the supernatant was filtrated (0.2 µm) and concentrated in cellulose dialysis tubing (10 kDa molecular mass cut-off) covered with polyethylene glycol. Then, concentrated extracts were resuspended in phosphate buffer (pH 5.6) until 1/10 of the initial volume. Enzyme activities were measured by spectrophotometry using a 96 wells microtiter plate. For phenoloxidase quantification, each replicates wells contained 150 µL of enzyme-extract with, either 100 µL of L-DOPA (10 mM), or 2 µL of 2,7-diaminofluorene (DAF; 0.68 mM; $\epsilon^M = 10\,228\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$), or 2 µL of syringaldazine (5 mM; $\epsilon^M = 65\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) or 5 µL of ABTS (0.1 mM; $\epsilon^M = 36\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) in assay wells, and monitored at 460, 600, 525 and 420 nm, respectively (Criquet et al., 2000a; Jassey et al., 2011b). Peroxidase activities were measured using 2 µL DAF (0.68 mM) with 10 µL of H₂O₂ (0.3%), and manganese peroxidases (Mn-peroxidases) with 12 µL of MnSO₄ (0.1 mM) (Criquet et al., 2001). Their oxidation rate was monitored at 600 nm. Peroxidase activity was subtracted to the Mn-peroxidase assay to obtain the Mn-peroxidase activity. We also quantified fungal lignin-peroxidases using 12 µL veratrylic alcohol (0.4 mM; $\epsilon^M = 9300\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) with 10 µL of H₂O₂ (0.3%) and monitored at 310 nm in quartz cuvettes (Tien and Kirk, 1984). Enzymatic activities were expressed as one µmol of substrate oxidized per minute per gram of dry mass (U.g⁻¹ DM).

Differences of phenoloxidase and peroxidase pools between *Sphagnum* segments, sampling areas, seasons and climate treatments were analysed using repeated measures ANOVA with time as a within subject repeated factor (time = 2: Summer and Autumn)

and warming treatment, area or sampling depth as between-subject factors. Interactions between sampling area, seasons and treatments were also considered. The assumptions of parametric tests were visualized and tested. An identical procedure was used to detect differences of air and soil temperatures between ambient and warming plots.

d) Results & Discussion

The highest values of phenoloxidase activities were recorded with DAF. Syringaldazine and ABTS substrates induced a formation of precipitates after 1h of enzyme kinetic. Indeed, quinones produced from syringaldazine or ABTS were not soluble over time in aqueous medium (Floch et al., 2007). Phenoloxidase activities quantified with DAF showed significant differences along *Sphagnum* segments and between fen and bog ecological areas, whereas phenoloxidases quantified with L-DOPA did not change (Fig. 4.10). Therefore, the use of DAF is ideal to quantify phenoloxidases in *Sphagnum* peatlands.

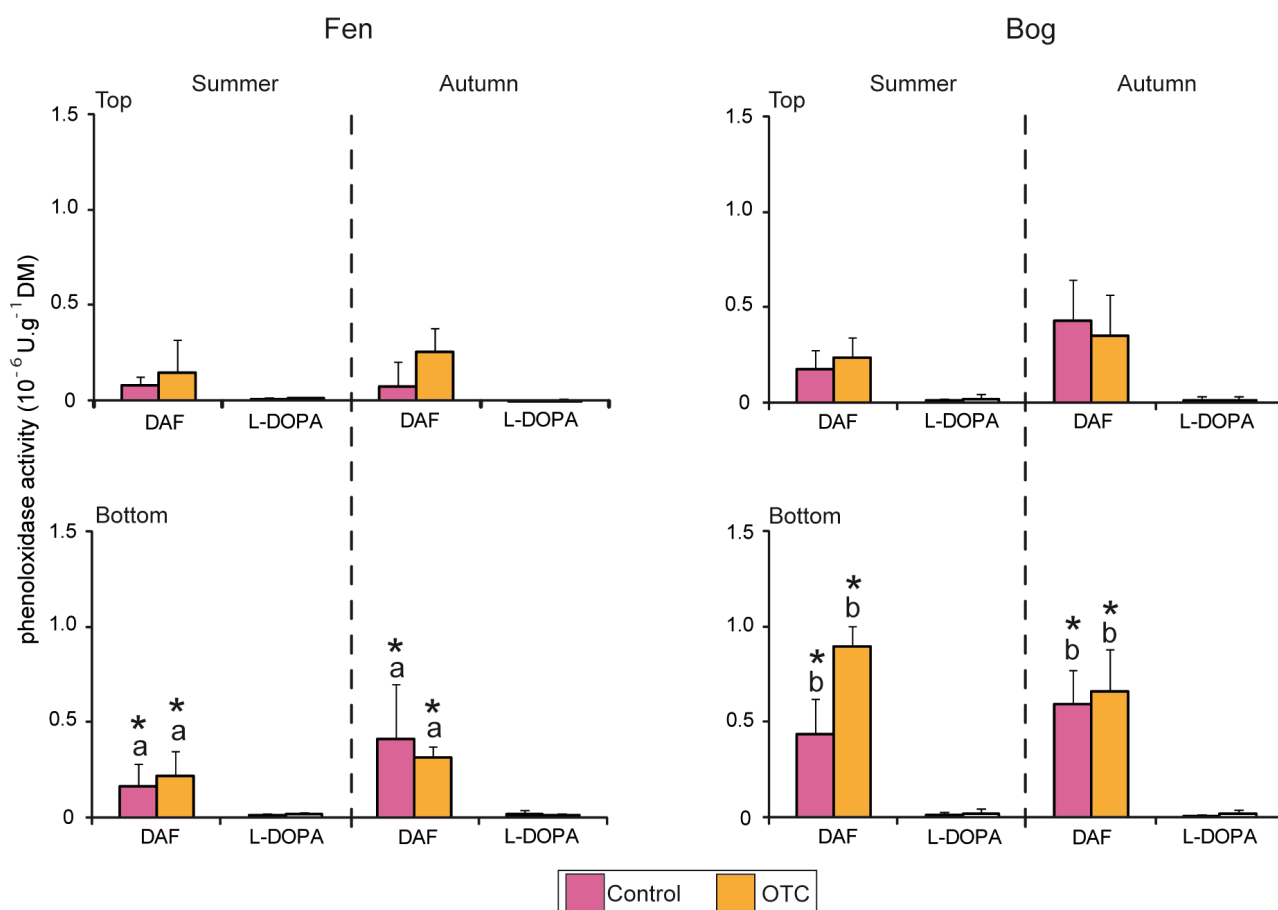


Figure 4.10: Fungal phenoloxidase activities (mean \pm S.E.; $n = 3$) characterized by DAF or L-DOPA substrates along the fen-bog gradient of the Forbonnet peatland in summer and autumn 2010 in different *Sphagnum* segments. Asterisks indicate significant differences of phenoloxidase activities (ANOVA; $P < 0.05$) between *Sphagnum* segments. Letters indicate significant differences of phenoloxidase activities (ANOVA; $P < 0.05$) between the fen and the bog area. Top = 0-3 cm; Bottom = 3-10 cm from capitulum.

We showed that peroxidases constituted the main oxidative system in *Sphagnum*-peatlands, with values of peroxidase activities 10 000-fold higher than those of phenoloxidasés (Figs 4.10 and 4.11). Although peroxidase activities 120-fold higher than phenoloxidasés activities have been recorded in surface forest litter (Alarcón-Gutiérrez et al., 2009), peroxidases 10 000-fold greater than phenoloxidasés is unique, to our knowledge (Sinsabaugh, 2010). Moreover, such ratio strongly suggested that peroxidases had a plant origin for several reasons. First, *Sphagnum* lawns largely dominate fen and bog areas. Second, DAF-H₂O₂ is known to be the most sensitive substrate for the detection of plant-peroxidases (Criquet et al., 2000b, 2001). Third, no fungal lignin-peroxidase activity was highlighted (< 10⁻⁷ U.g⁻¹ DM), corroborating the *Sphagnum* origin of our high peroxidase activities. Furthermore, among the different fungus taxa identified in *Sphagnum* litter, few (only 24%) are identified as phenoloxidasés producers (Thormann et al., 2001). Abiotic conditions (e.g. acidic conditions and waterlogging) of peatlands are largely known to limit fungal oxidation activity (Williams et al., 2000; Toberman et al., 2008, 2010).

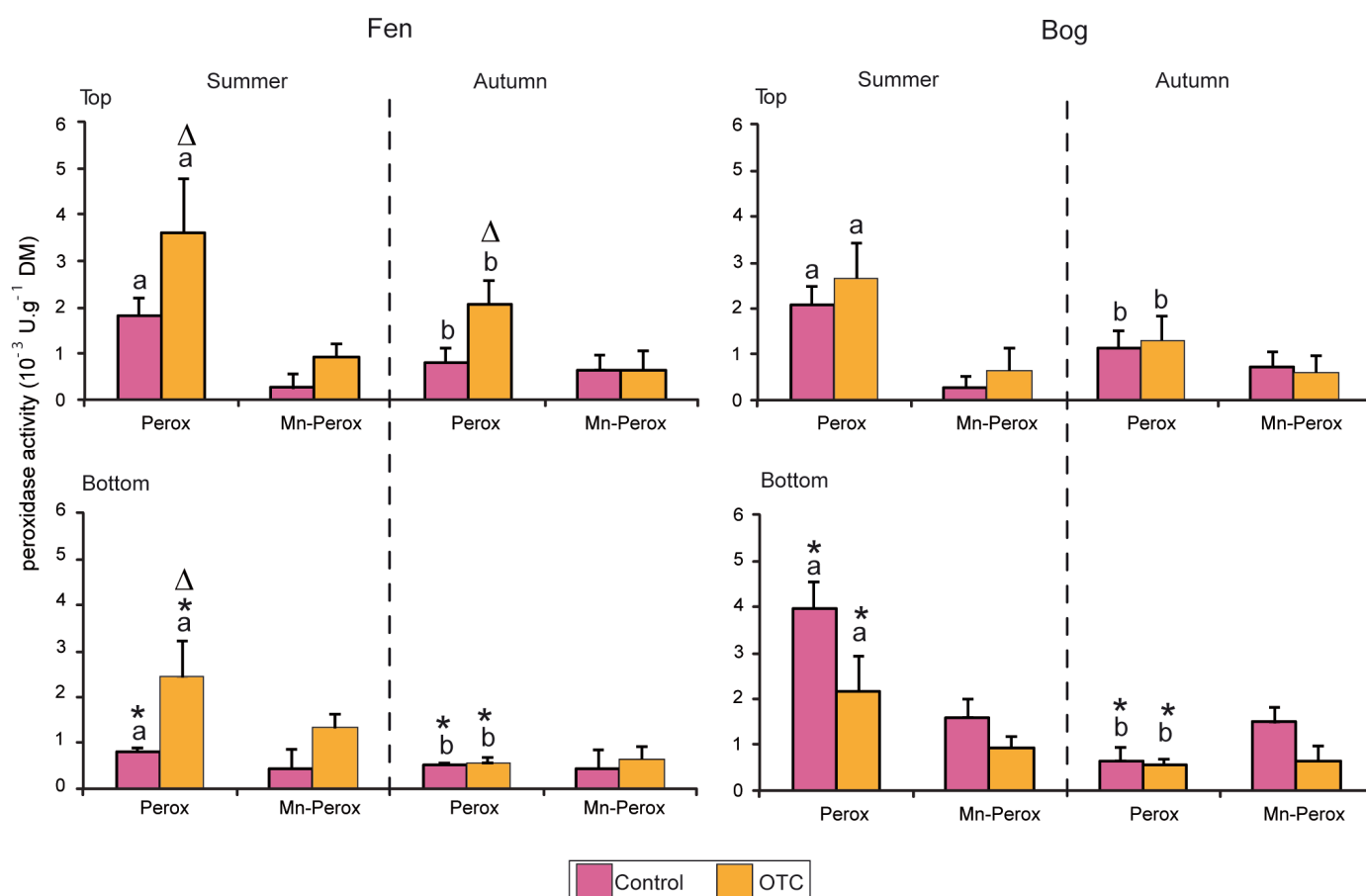


Figure 4.11: Activity of peroxidases produced by *Sphagnum* (mean ± S.E.; n = 3) along the fen-bog gradient of the Forbonnet peatland in summer and autumn 2010 in different *Sphagnum* segments. Asterisks indicate significant differences of peroxidase activities (ANOVA; P < 0.05) between *Sphagnum* segments. Letters indicate significant differences of peroxidase activities (ANOVA; P < 0.05) between seasons (summer/autumn). Triangles (Δ) indicate significant differences between ambient and warming plots. Perox = peroxidases; Mn-perox = manganese peroxidases. Top = 0-3 cm; Bottom = 3-10 cm from capitulum.

Significant decreased of peroxidases were recorded both along *Sphagnum* segments and over the seasons (ANOVA, $P < 0.01$; Fig. 4.11). Such temporal variations suggest a positive relationship between peroxidase activities and polyphenol content. Jassey et al. (2011a, b) actually demonstrated that phenolic release from *Sphagnum* mosses changed over seasons, and decreased along *Sphagnum* shoots.

Warming by OTCs significantly increased the daily average air temperature (ANOVA, $P < 0.001$) in both sampling areas (an average increase of 1 °C), whereas the daily soil temperature did not change. Higher air temperatures rather induce higher evapotranspiration in temperate zones, which result in lower *Sphagnum* moisture content during summertime (Jassey et al., 2011b). Despite this rise of air temperatures, phenoloxidase activities were not significantly influenced. Previous studies, which attempted to evaluate warming effect on phenoloxidases in peatlands, found equivocal results and concluded that the interactive effects of moisture and pH largely inhibited their oxidation activity (Toberman et al., 2010; Jassey et al., 2011b). On the contrary, the rise of air temperatures led to a significant increase of peroxidase activities in the fen area (+ 30%), especially in living top segments (ANOVA, $P = 0.017$; Fig. 4.11). The response of peroxidase activities to climate warming between the fen and bog areas also showed that oxidative pools change in different directions in response to climate warming, as already showed for phenolics (Jassey et al., 2011b). Although temperature was identified as an enhancer of peroxidase activities, it still remains difficult to predict the effect of global warming on soil organic matter sequestration in peatlands because of multiple functions of peroxidases, both in mineralization and humification pathways (Sinsabaugh, 2010).

To conclude, our results point out that (i) the DAF is a relevant oxidative substrate to quantify both phenoloxidase and peroxidase activities in enzymatic extract from *Sphagnum* lawns, (ii) *Sphagnum*-peroxidase activities constituted the main oxidative system in *Sphagnum*-peatlands and (iii) the monitoring of plant-peroxidases represents a suitable and forward indicator of changes in carbon cycle in peatlands under a climate warming.

Acknowledgements

This research is a contribution of the ANR PEATWARM project (Effect of moderate warming on the functioning of *Sphagnum* peatlands and their function as carbon sink). PEATWARM is supported by the French National Agency for Research under the "Vulnerability: Environment—Climate" Program (ANR-07-VUL-010). Further funding to VEJ Jassey by the Franche-Comté Region is kindly acknowledged.

4. Influence d'une hausse modérée des températures sur la variabilité annuelle des interactions « microorganismes – végétation – facteurs abiotiques »

Vincent EJ Jassey, Geneviève Chiapusio, Philippe Binet, Alexandre Buttler, Fatima Laggoun-Défarge, Frédéric Delarue, Nadine Bernard, Edward AD Mitchell, Marie-Laure Toussaint, André-Jean Francez, et Daniel Gilbert (en préparation) Microbial control over peatland response to warming.

1 Préambule

Par le biais des études précédentes, l'influence de la hausse des températures a été mise en évidence sur des éléments clés du fonctionnement des tourbières (les communautés microbiennes, les polyphénols et les activités enzymatiques oxydatives). Bien que ces travaux apportent une meilleure compréhension sur la réponse de ces mécanismes biologiques au réchauffement climatique, la compréhension des interactions entre les facteurs biologiques et/ou abiotiques résultant de ces changements demeure encore limitée. Dans le but de synthétiser les changements d'interactions qui ont lieu entre les différents compartiments de l'écosystème (tourbe – végétation – microorganismes), nous avons choisi dans une dernière étude de réaliser une synthèse de la réponse de la tourbière face au réchauffement climatique.

L'étude présentée dans les pages suivantes a été réalisée en collaboration avec des partenaires du programme ANR PEATWARM. La réponse de chaque compartiment clé du fonctionnement de la tourbière a donc été analysée le long du gradient écologique, à savoir : la dynamique de végétation, les polyphénols, les communautés microbiennes et la chimie de l'eau. En plus des réponses « individuelles » de chacun des compartiments biotiques et abiotiques, les interactions et les relations de causalité entre ces compartiments ont été quantifiées après deux années complètes de réchauffement (2008-2009 et 2009-2010).

Les résultats de ces travaux montrent que le réchauffement climatique affecte directement les communautés microbiennes associées aux sphaignes, et plus particulièrement les top-prédateurs du réseau trophique microbien, c'est-à-dire les amibes à thèque. Cette étude a également montré que le réchauffement affectait indirectement les végétaux (plantes vasculaires et bryophytes) via une modification des interactions entre les microorganismes, les plantes et la chimie de l'eau. Enfin, cette étude souligne le rôle des composés phénoliques dans la régulation de la dynamique des communautés microbiennes sous un régime de températures plus élevées.

2 Microbial control over peatland response to warming

a) Abstract

Ongoing climate change raises considerable interest in understanding the biological mechanisms that regulate the carbon cycle in terrestrial ecosystems (Meililo *et al.*, 2002; Heinman & Reichstein, 2008). Northern peatlands contain approximately one-third of all soil carbon (C) (390-450 Pg) and play an important role in the global carbon cycle (Dise, 2009). Soil microbial communities are the main actors of organic matter decomposition in peatlands and understanding their response to warming is therefore highly relevant to assess peatland-climate feedbacks. However, the effects of warming on the structure of microbial food web and complex plant-soil-microbial interactions involved in carbon balance are not well known (Bardgett *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010). Here we show that warming by approximately 1°C directly affected the microbial food web structure and indirectly the interplay between microorganisms, biotic (vegetation, polyphenols) factors and water chemistry of a *Sphagnum* peatland. Warming did not alter vegetation composition and water chemistry, but reduced the biomass of top-predators (testate amoebae) by 70%, especially the larger taxa with higher trophic position, and enhanced the biomass of bacteria. We also showed, using path analysis, that moss-microbial interactions were enhanced, which supposed an increase of the influence of microbes on aboveground properties (Wardle *et al.*, 2004). These effects of warming on microbial communities and functional linkages suggest increased decomposition and nutrient cycling and provide an explanation for observed changes the net carbon balance of peatland ecosystems (Davidson & Janssens, 2006; Carrera *et al.*, 2009). The observation that peatlands are both resistant (vegetation composition) and sensitive (microorganisms) to warming highlights the need for a multifactor approach to understand the response of peatlands to climate change.

b) Introduction

Soil organic carbon (SOC) is the largest terrestrial reservoir of carbon, and a large fraction of this lies in northern peatlands and wetlands, boreal forest and tundra soils (Davidson & Janssens, 2006; Mack *et al.*, 2011). The stocks of SOC depend largely on the balance between inputs to and outputs of carbon from the belowground environment, which is regulated by complex interactions between abiotic factors, plants, and soil organisms (Wardle *et al.*, 2004; Bardgett *et al.*, 2008). Although the exact mechanisms controlling carbon dynamic are not completely understood, plant and soil organisms are directly or indirectly affected by ongoing climate change. Warming is a climate-sensitive process that can rapidly alter the biological processes that regulate SOC dynamics and ecosystem C balance, and several studies indicate that warming can result in SOC losses to the atmosphere (Davidson & Janssens, 2006). This raises concerns of a likely ongoing positive feedback to global warming.

Sphagnum-dominated peatlands store more carbon than any other terrestrial ecosystem³. Despite the global significance of microbial communities in SOC dynamics of peatlands, their sensitivity to climate change has so far received little attention. However, microbial communities living on *Sphagnum* mosses constitute a crucial detrital food web sustaining a variety of ecosystem processes, and in particular carbon balance (Gilbert *et al.* 1998; Turetsky, 2003; Lindo & Gonzales, 2010). Considerable gaps remain in our understanding of the impacts of warming on plant-soil-microbial interactions (Singh *et al.*, 2010). Aboveground-belowground interactions nevertheless play a crucial role as drivers of ecosystem carbon dynamic (Wardle *et al.*, 2004; Bardgett *et al.*, 2008). The understanding of *Sphagnum* – microbial interactions responses to climate change is especially important given that long-term global warming is expected to induce considerable shifts in peat-forming areas via substantial carbon loss due to modifications in microbial processes associated to *Sphagnum* species (Dorrepaal *et al.*, 2009). For instance, global warming diminishes the release of organochemical compounds (e.g. polyphenols) produced by *Sphagnum* mosses in the environment, which may enhance enzymatic and microbial activities (Verhoeven & Toth, 1995; Jassey *et al.*, 2011a).

Here we present results from a two-year field warming experiment in a *Sphagnum*-dominated peatland. We assessed the effects of warming on mosses, vascular plants, water chemistry, microbial communities living in surface and litter layers of *Sphagnum* lawns, and polyphenols produced and released by *Sphagnum* along a narrow vegetation gradient corresponding to different microtopography (Supplementary Methods). The interactions among these parameters were also examined in order to determine the factors that control the response of peatlands to warming. Soil microbial

communities are highly diverse (and both this diversity and the function of individual taxa are poorly known) and climate change can be expected to have group and species-specific effects, making it all but impossible to draw any general conclusions (Bardgett *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010). Rather than focusing on a given group, typically bacteria or fungi, we analyzed the entire microbial community, using a general morphological functional group approach (i.e. bacteria, fungi, microalgae, cyanobacteria, ciliates, testate amoebae, rotifers, and nematodes). We used open-top chambers (OTC) to simulate the climate expected for northern European regions in the coming decades (Solomon *et al.*, 2007). The OTCs significantly increased mean air temperature in spring and summer by up to about 1.3°C (Supplementary information, Tableau 4.7).

c) Results and Discussion

Plant communities and water chemistry were unaffected by warming (Supplementary information, Fig. 4.14), but microbial communities responded clearly negatively (Fig. 4.12a, b). The response of microbial assemblages was significant at the surface (0-3 cm; $P = 0.03$) but not in the deeper layer (3-6 cm; $P = 0.065$), in line with the lack of significant warming at the corresponding depth (Supplementary Information). Warming is likely to operate over long timescales at depth, as suggested by previous studies in subarctic peatlands that showed an increase of heterotrophic respiration rates in depth after eight years of warming (Dorrepaal *et al.*, 2009).

The detailed examination of the time-dependent warming effect on individual microbial groups at the surface revealed a significant positive effect of warming on bacteria, via a slight increase of their biomass, but a negative effect on testate amoebae (Fig. 4.12a; Supplementary Methods). After two years, testate amoeba biomass at the surface declined by over 70% ($P < 0.01$) in the warmed plots, which was due largely to an effect on the larger testate amoeba with a larger shell aperture – which is taken as an indication of higher trophic position (Fig. 4.12c, d). This indicates that climate warming induced an alteration of the microbial food web (Petchey *et al.*, 1999, 2008). This also emphasizes that changes in microbial food web have the potential to trigger complex shifts in interactions between microbial communities and plants and other abiotic factors (e.g. water chemistry) (ref Wardle *et al.*, 2004; Bardgett *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2010).

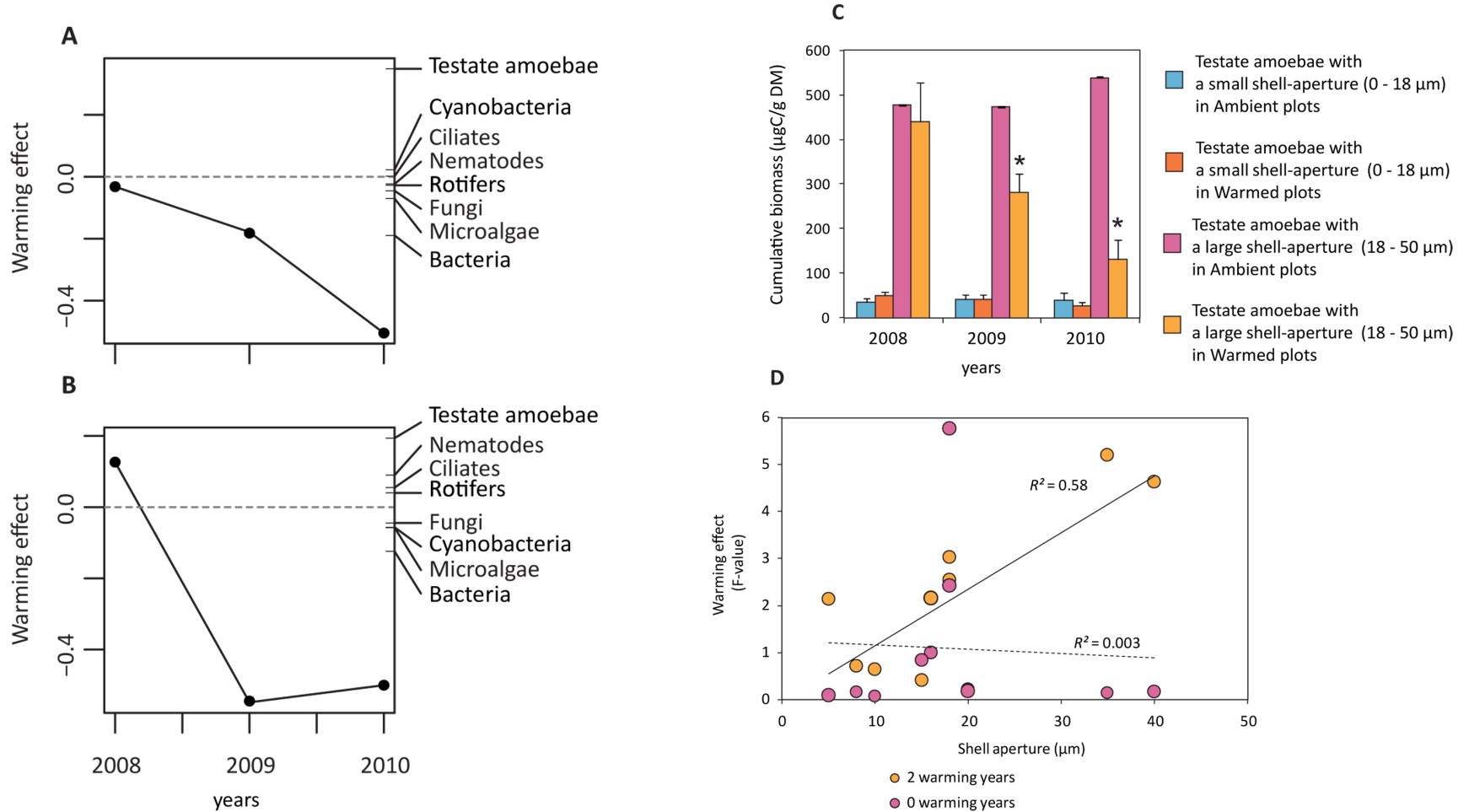


Figure 4.12: Microbial community response to climate warming in a *Sphagnum*-dominated peatland. First principal response curve (PRC) with scores for microbial groups living in the surface (a) ($P = 0.03$) and in the litter (b) ($P = 0.065$) layers of *Sphagnum* lawns. Negative values of the curve indicate a negative effect of warming. Species scores allow an interpretation at microbial group level. The higher the score, the more the actual response pattern of the group follows the pattern in the PRC. c, Cumulative biomass ($\mu\text{gC g}^{-1} \text{DM}$) of testate amoebae with a low and high trophic position (inferred from the small and large size of the shell aperture, respectively) in ambient and warmed plots. * $P < 0.01$, ANOVAR. d, Warming effect on testate amoeba species following the size of their shell-aperture. The warming effect was estimated using the F-value from ANOVAs. Species that occurred in less than 3% maximum biomass were removed from the data set to reduce the influence of rare taxa.

We assessed in ambient and warmed plots the degree to which biotic and abiotic descriptors were correlated using a multiple factor analysis (MFA). The MFA revealed that, in warmed plots, the correlation between microbial communities living at the surface and vascular plants, mosses and polyphenols became significant whereas it was not in the control plots (Supplementary information, Tableau 4.8). These results indicate that changes in microbial food web enhance plant-soil-microbe interactions, which ultimately alter decomposition as was shown recently in a mesocosm study for enchytraeids (Carrera *et al.*, 2009).

We also evaluated changes in the causal relationships among biotic communities and environmental variables using a path analysis. Results of this analysis showed that microtopography had a stronger impact on microbial communities living in surface horizon in the warmed plots than in the control, highlighting the effect of temperature increase on surface moisture reduction (Jassey *et al.*, 2011a) (Fig. 4.13). Warming also reduced the control of surface microbial communities on those living in the litter layer, reflecting a decoupling of surface and sub-surface microbial communities. The path analysis also revealed a significant shift of causal relationships from negative to positive between polyphenols and microorganisms in warmed plots. Polyphenols from *Sphagnum* have a potential inhibitory effect on microbial activities (Verhoeven & Toth, 1995; Jassey *et al.*, 2011a). Our results imply that the impact of warming on polyphenols contribute to the regulation of microbial communities (and hence likely of microbial processes) in a changing climate, with a potential reduction of their inhibitory effect (Jassey *et al.*, 2011a). Indeed, climate warming alters *Sphagnum*-phenolic released in peatlands, suggesting that the quantity and the quality of plant-derived organic matter will change with climate warming.

Furthermore, warming strongly increased the causal relationships between surface microbial communities and mosses ($P < 0.01$; Fig. 4.13), suggesting that interactions between these two factors increased in a warming climate. In this context, the net effect of climate warming on testate amoebae is of particular interest. Testate amoebae actually connect plants and microbial heterotrophic producers (i.e. fungi and bacteria) via the microbial loop, which allows a higher carbon and nutrient cycling from dead organic matter (Gilbert *et al.*, 1998; Ledeganck *et al.*, 2003). Although no testate amoeba species was lost from the community in warmed plots and the diversity was unchanged (Shannon's diversity = 4.0 ± 0.2 , irrespective of treatment and years, ANOVA $P = 0.78$), the modifications of community structure resulting from warming translate into modifications of ecosystems functioning via changes in the representation of testate amoebae functional traits (Chapin *et al.*, 2000; McGill *et al.*, 2006). The significant reduction of the biomass of testate amoebae with high trophic position in the microbial

food web (inferred from their larger shell aperture) (Fig. 1d) should greatly affect the ecosystem processes they control (Petchey *et al.*, 1999, 2008; Singh *et al.*, 2010; Wilkinson & Mitchell, 2010). Testate amoebae consume a wide range of prey (Wilkinson & Mitchell, 2010; Jassey *et al.*, 2011d), and their decrease diminished their predation pressure on lower trophic level, promoting the smallest consumers such as small testate amoebae that stimulate bacterial growth by their grazing activity (Gilbert *et al.*, 1998; Sarca *et al.*, 2009). Additionally, small protozoa also strongly release nutrients that exceed their metabolic needs into their surrounding, easily taken up by heterotrophic microorganisms (Dolan *et al.*, 1997). The increase of the reciprocal interactions between microbial communities and water chemistry in warmed plots (Supplementary Table S2) added to an enrichment of aliphatic and aromatic compounds at the surface resulting from a higher decomposition (Delarue *et al.*, 2011b) provide the first evidences of such interactions. The modification of the microbial food web induced by warming may thus lead to increase decomposition and nutrient cycling on long timescales, and affect peatland functioning through feedback effects on the vegetation composition.

Even if the unaltered aboveground vegetation composition did apparently not reflect the response of microbial community after two years of warming, such changes are likely to operate over long timescales (Bardgett *et al.*, 2005; Keuper *et al.*, 2011). The direction and magnitude of the moss-microorganisms interactions that result from the climate-driven changes in belowground microbial communities are likely to alter competition between mosses and vascular plants (Keuper *et al.*, 2011). First line of evidence, warming actually induced a decrease of the causal link between mosses and vascular plants (Fig. 2), suggesting a reduction of *Sphagnum* mosses control on vascular plant life (Heijmans *et al.*, 2002; Lang *et al.*, 2009). Second line of evidence, microtopography effect on the composition of vascular plants and mosses was also reversed in warmed plots (Fig. 2), probably resulting from the local hydrology change that is a strong determinant of vegetation life in peatlands (Keuper *et al.*, 2011).

Overall, our results reveal that changes in peatlands associated with warming translate by a direct effect on microbial food web that indirectly influences plant-soil-microbial interactions, further resulting in multiple feedbacks on carbon and nutrient cycling. Although the future trajectory of *Sphagnum* peatlands is yet unknown, this suggests that long-term global warming could lead peat-forming areas to one state to another (e.g. bog to fen) (ref. Dise, 2009).

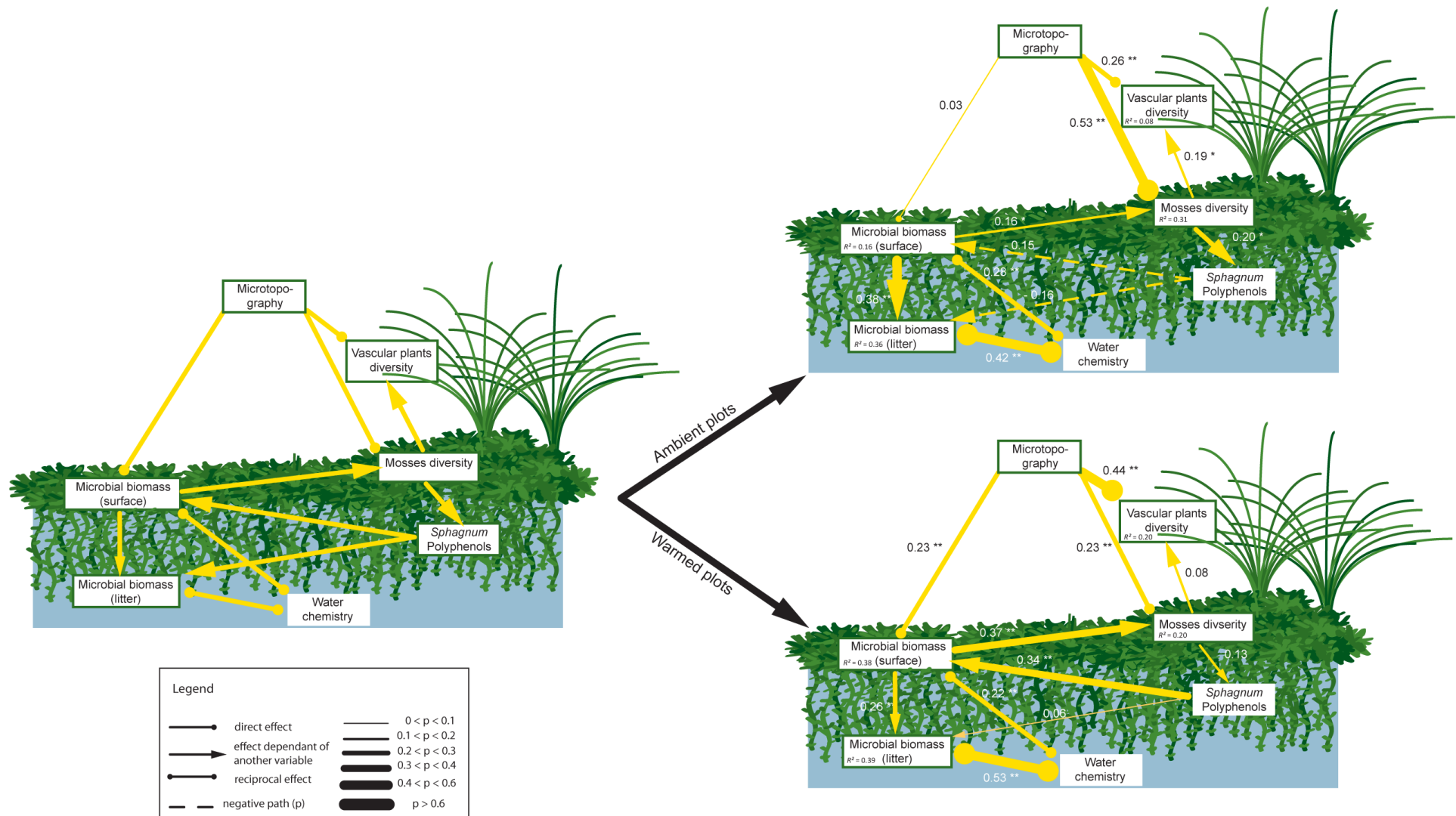


Figure 4.13: Causal relationships among biotic communities and environmental variables in a *Sphagnum*-dominated peatland subjected to experimental warming or ambient conditions. Explanatory path diagram (Supplementary method) and path diagram on 2008-2009-2010 coupled years in ambient and warmed plots among similarity environmental matrices: biomass of microbial communities living in surface and litter layers of *Sphagnum* lawns, percent cover of moss and vascular plant species, polyphenols produced and released by *Sphagnum*, water chemistry and microtopography. The width of arrows is proportional to the standardized path coefficient (see legend for scale). Numerals near each path indicate direct or partial Mantel's correlation. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

d) Method summary

We combined changes in ambient temperatures with a vegetation gradient corresponding to two micro-topographical situations using 6 control plots and 6 passively warmed plots (open top chambers placed on the vegetation, which passively increased air temperatures by approximately 1.3°C (Supplementary methods).

Biotic and abiotic descriptors were measured in each plot at each sampling campaign in July 2008, 2009 and 2010. Vegetation survey was performed by point-intercept method in a 50x50 cm subplot and described as the percentage cover of vascular and moss species. Densities of fungi, microalgae, cyanobacteria, ciliates, testate amoebae, rotifers, and nematodes were estimated by inverted microscopy, and bacterial density was determined by flow cytometry (FAC-SCalibur flow cytometer, Becton Dickinson). The biomass of each microbial group was calculated and expressed as $\mu\text{gC g}^{-1}$ dry mass (Gilbert *et al.*, 1998) (Supplementary Method).

Acknowledgements

This research is a contribution of the ANR PEATWARM project (Effect of moderate warming on the functioning of *Sphagnum* peatlands and their function as carbon sink). PEATWARM is supported by the French National Agency for Research under the "Vulnerability: Environment—Climate" Program (ANR-07-VUL-010). Further funding to VEJ.J by the Franche-Comté Region, to A.B by EPFL and WSL, and to EAD.M by WSL, EPFL and University of Neuchâtel are kindly acknowledged. The author would like to thank Telesphore Sime-Ngando and Jonathan Colombet (University of Clermont-Ferrand, FR) for their help with the flow cytometry, and Gregory Bernard for field assistance. They also thank Richard D. Bardgett (University of Lancaster, UK) for his fruitful comments on the manuscript and his English edits.

e) Supplementary information

Supplementary Table 4.7:

The presence of open top chambers (OTCs) increased daily mean air temperatures at +10 cm by 0.2 – 1.0°C in spring, by 0.8 – 1.3°C in summer and by 0.2 – 0.3°C in winter (Supplementary Table 1). This increase of daily mean temperatures was related to a significant increase of maximum daily air temperatures by 2.7 – 4.0°C in spring, by 2.7 – 4.0°C in summer and by 0.8 – 1.0°C in winter. These temperature increases are well within the range of changes in temperature observed during the past decades and projected for the next few decades in northern Europe¹⁵. Soil temperatures at -7 cm did not differ significantly (data not shown). We tentatively explain this result, as well as the so-called marginal effect of OTCs on soil temperatures at our latitudes (Dabros *et al.*, 2010), by an enhancement of evapotranspiration by OTCs which might have lowered soil temperature through heat loss towards atmosphere and reduced soil thermal conductivity. Nevertheless, temperature effect on soil was indirectly recorded via a significant decrease of *Sphagnum* moisture in OTCs during summer heat-waves (Jassey *et al.*, 2011a).

Tableau 4.7: Increases in air temperatures (°C) in response to the presence of open-top chambers during spring, summer and winter seasons, averaged over 3-years (n = 6 plots per treatments). *** P < 0.001, ** P < 0.01, * P < 0.05 (ANOVAR).

| Season | Spring | | Summer | | | | Autumn | Winter |
|-------------------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|-----------|
| | April | May | June | July | Aug | Sep | Oct-Nov | Dec-March |
| Daily mean temp (°C) | 1.0 | 0.9 | 1.3 * | 1.2 ** | 0.9 ** | 0.9 * | 0.2 | 0.2 |
| Maximum daily temp (°C) | 4.0 *** | 2.8 ** | 4.0 *** | 3.7 *** | 3.1 *** | 2.7 *** | 1.0 * | 0.8 * |
| Minimum daily temp (°C) | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.2 | 0.2 |

Supplementary Figures 4.14:

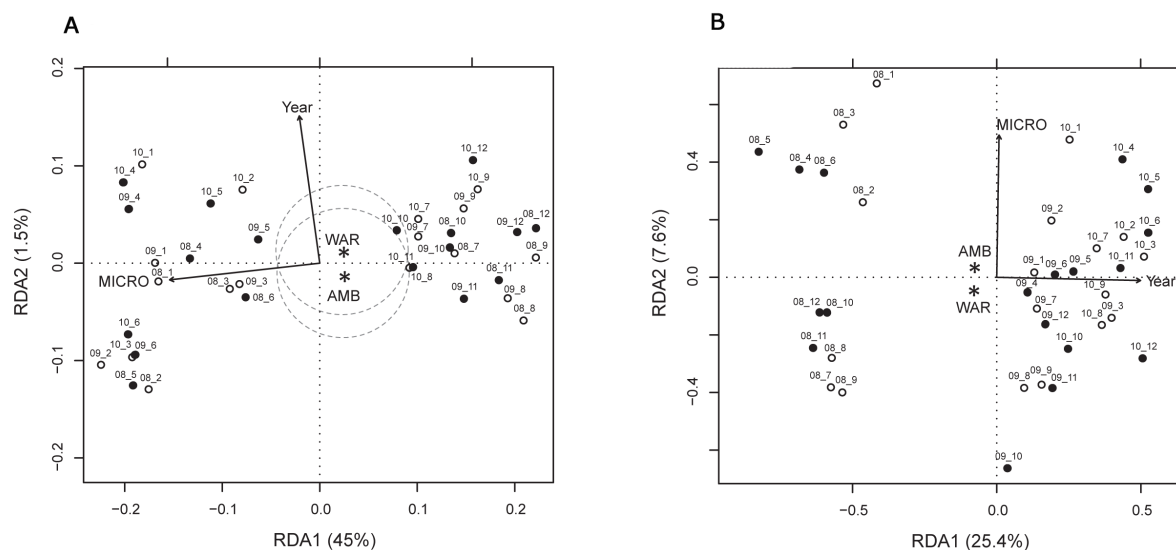


Figure 4.14: Biplots of redundancy analyses (RDA) of vegetation communities (a), and water chemistry (b). Climate treatments were coded with open symbols for ambient (AMB) plots and with filled symbols for warming (WAR) plots, and years with figures (08 = 2008, 09 = 2009, 10 = 2010). Numbers after years characterize the sampling plot (1-12 plots). Environmental variables are represented by vectors for quantitative factor – sampling years (Year) and microtopography (MICRO) – and by asterisks for qualitative factors, treatment (AMB/WAR). Grey ellipses represent the standard error of site scores around the centroid of each treatment level. The three variables treatment, year and microtopography explained 41%, and 28% (adjusted R^2) of the variations in vegetation and water chemistry ($P < 0.001$), respectively. After variation partitioning, with adjusted R^2 , microtopography alone explained 42% of the variations of vegetation and water chemistry, respectively. No warming effect was detected on these data-sets ($P = 0.99, 0.55$, respectively).

Supplementary Table 4.8:

The patterns of microbial-environment relationships illustrated by RV-coefficients revealed significant shifts between ambient and warming treatments. Significant links emerged between microbial communities in surface horizon and vascular plants, mosses and polyphenols, indicating that microbial interactions with their surrounding changed. An increased correlation between microbial communities (surface and litter layers) and water chemistry was also recorded in warmed plots, suggesting that the interactions between these two components increased.

Tableau 4.8: RV coefficients (Pearson’s correlation) among the six groups of environmental descriptors used in multiple factor analysis (MFA) – microbial communities in surface and litter layers of *Sphagnum* lawns, vascular plant communities, moss communities, polyphenols produced and released by *Sphagnum* and water chemistry – in ambient (AMB) and warming (WAR) plots in 2008, 2009 and 2010. Significant coefficients are shown in bold ($P < 0.05$).

| | Microbial (surface) | | Microbial (litter) | | Vascular plants | | Mosses | | Polyphenols | |
|---------------------|------------------------|-------------|-----------------------|-------------|--------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| | AMB | WAR | AMB | WAR | AMB | WAR | AMB | WAR | AMB | WAR |
| Microbial (surface) | 1.00 | 1.00 | | | | | | | | |
| Microbial (litter) | 0.47 | 0.54 | 1.00 | 1.00 | | | | | | |
| Vascular plants | 0.22 | 0.32 | 0.15 | 0.12 | 1.00 | 1.00 | | | | |
| Mosses | 0.24 | 0.47 | 0.06 | 0.10 | 0.32 | 0.28 | 1.00 | 1.00 | | |
| Polyphenols | 0.13 | 0.36 | 0.12 | 0.32 | 0.12 | 0.08 | 0.34 | 0.30 | 1.00 | 1.00 |
| Water chemistry | 0.35 | 0.45 | 0.46 | 0.63 | 0.26 | 0.23 | 0.28 | 0.17 | 0.27 | 0.27 |

Supplementary Methods

Field site. The experimental site was a *Sphagnum*-dominated mire situated in the Jura Mountains (The Forbonnet peatland, France, 46°49’35’’N, 6°10’20’’E). Biotic and abiotic descriptors were collected and analyzed across a narrow microtopographic gradient of a transitional fen-bog area comprising a mosaic of flat and homogeneous wet lawns dominated by *S. fallax*, and drier hummocks with *S. magellanicum*, *V. oxycoccus*, *E. vaginatum* in addition to *S. fallax*.

Twelve plots were selected in representative surfaces of each microtopographic situation. Six of these plots were randomly assigned as ambient treatment (3 in lawns and 3 in hummocks), and 6 plots as warming (OTC) treatment (3 in lawns and 3 in hummocks). Increase of air temperature was passively achieved by placing hexagonal ITEX-type open-top chambers (hereafter “OTC”) over the vegetation (Marion *et al.*, 1997). In each plot, air temperature (10 cm above the *Sphagnum* carpet) and soil temperature (at 7 cm depth) were recorded continuously every 30 minutes using thermocouple probes and a datalogger. Moreover, in each plot, pH, conductivity, water chemistry (major elements, DOC, DN, NO₃⁻, NH₄⁺, total phosphorus and PO₄³⁻) were measured at each sampling campaign in July 2008, 2009, and 2010. Additionally, samples of *S. fallax* (a pooled sample of 10 randomly selected shoots) were collected in each plot for the study of phenolic compounds and microbial communities.

Microbial communities and biomass. Microbial organisms were extracted from surface (0-3 cm) and litter (3-6 cm) layers of *Sphagnum* shoots using the standard method described in Jassey *et al.* (2011a). Primary producers, fungi and unicellular predators were analyzed at x 400 magnification using an inverted microscope (OLYMPUS IX71) following Uthermöhl's method (Uthermöhl, 1958). The whole slide was analyzed and the different groups of cyanobacteria, microalgae, unicellular predators (testate amoebae, ciliates, rotifers and nematodes) and fungal hyphae and spores were counted and measured. Bacterial counts were performed using flow cytometry (FAC-SCalibur flow cytometer, Becton Dickinson). The biovolume of each community was estimated by assuming geometrical shapes and converted to carbon using conversion factors (Jassey *et al.*, 2011b). The data were expressed as micrograms of Carbon per gram of *Sphagnum* dry mass ($\mu\text{g C g}^{-1}\text{ DM}$).

The trophic position of testate amoebae was estimated by measuring their shell-aperture using image analysis. Testate amoebae with a small shell-aperture ($< 18 \mu\text{m}$) were considered as having a low trophic position. Conversely, testate amoebae with a large shell-aperture ($> 18 \mu\text{m}$) were considered as having a high trophic position in the microbial food web (Yeates & Foissner, 1995; Jassey *et al.*, 2011d).

Phenolic compounds. Polyphenols were extracted using ethanol / distilled water solution (80/20 v/v) and distilled water to obtain polyphenols produced and released by *Sphagnum* moss¹⁸ in the top (0-3 cm) and litter (3-6 cm) layers of *Sphagnum* shoots. Total phenolic content was quantified with the Folin-Ciocalteu reagent and expressed in mg equivalent gallic acid (A_{760}) per gram of *Sphagnum* dry mass ($\text{mg g}^{-1}\text{ DM}$).

Vegetation abundance. At each sampling campaign in July 2008, 2009 and 2010, vegetation was surveyed by means of point-intercept method. We used a 50x50 cm Plexiglas frame, which was placed above a permanently marked quadrat by means of 4 adjustable poles. A ruler with 20 holes was moved along 20 different positions to obtain 400 measuring points. A metal pin with a 1 mm diameter tip was lowered through each hole in the ruler and each contact of the pin with green living vegetation was recorded by species until the pin reached the moss substrate. Early studies have shown that point-intercept measurements are a good estimator of plant biomass (Buttler, 1992).

Statistical analyses. All statistical analyses were performed with R 2.10.1 (R development Core Team, 2010). The effects of long-term climate manipulations by OTCs on air and soil temperatures were analyzed using repeated measures ANOVA (ANOVAR) with time as repeated measure (time = 12: January - December). Each dataset was thereafter split by month to get one response matrix per month for each biological factor using one-way ANOVA. The assumptions of parametric tests were also visualized and tested. The same procedure was used on testate amoebae pseudostome size with time as repeated measure (time = 3: June 2008-2010).

Redundancy analyses (RDA) were applied to environmental descriptors (vegetation and water chemistry) using climatic treatment (a binary variable with two levels: ambient and warming), Year and microtopography (quantitative variable) as explanatory variables. The significance of the model and of each explanatory variable included in the model was tested using 1,000 permutations. Additionally, variation partitioning using RDA's and adjusted R^2 was applied to compare the respective effect of each explanatory variable alone³⁷. Hellinger transformation was applied vegetation data sets to avoid considering double absence of a species or group as a resemblance between observations¹⁹.

The principal response curve (PRC) method (Gillet *et al.*, 2010) was used to focus on the time-dependent treatment effect and applied on the Hellinger-transformed microbial assemblages, including the response of individual microbial groups. Permutation tests with 1,000 permutations, stratified by year, were performed for every canonical axis and a PRC was plotted. The negative values of the curve in the diagrams of PRC indicate a negative effect of warming on microbial communities. The species scores allow an interpretation at the species level, respectively at microbial group level. The higher the score, the more the actual response pattern of the species is likely to follow the pattern in the PRC. For instance, microbial groups with high positive scores are inferred to show the opposite pattern, whereas groups with near zero scores either show no response or a response unrelated to the pattern shown in PRC.

Multiple factor analysis (MFA) was used to symmetrically link groups of environmental descriptors split in six sub-matrices: the two microbial matrices (surface and litter layers), vascular plants and mosses, water chemistry, and polyphenols data-sets. MFA was chosen because it allows the simultaneous coupling of several groups or subsets of variables defined on the same objects and to assess the general structure of the data. RV-coefficients (Pearson correlation coefficient, ranging from 0 to 1) were used to measure the similarities between two data matrices and were tested by permutations.

Path analysis was used to evaluate the causal relationships between the biotic and abiotic descriptors assembled in a composite path model based on 2008, 2009 and 2010 sampling years. Unlike standard statistical techniques such as canonical correlations in which variables are either dependant or independent, path analysis allows estimating the direct effects of an independent variable on the dependent variable as well as its indirect effect which is mediated through intermediary variables. Specifically in our path model, the microtopography was specified as direct potential cause of microbial and vegetation compositions. Microbial communities in the living *Sphagnum* layer were considered as dependent of microtopography and responsible for direct effects on mosses composition and microbial composition in the litter, and responsible of indirect effects on vascular plants via moss communities. In addition, polyphenols were considered as mediators of microbial composition which in turn can affect their community stability. Seven variables were retained by stepwise selection to build the microbial-water chemistry regression models used in path analysis: Si, Fe and Ca, DOC, NH_4^+ , PO_4^{3-} and pH.

We applied Mantel test and partial Mantel test approach to calculate path coefficients, using the Euclidean distance to construct our distance matrices³⁸. The response matrices were the four Hellinger-transformed biotic community matrices (microbes from surface and litter *Sphagnum* layers, vascular plants and mosses communities), the two standardized explanatory matrices of chemical factors (water chemistry and polyphenols) and the microtopography. Partial and bivariate Mantel statistics were obtained with R using the ECODIST package. Indirect, and total effects of variables, and R^2 of biotic descriptors were calculated according to Legendre & Legendre (1998).

Chapitre 5

Discussion générale

1. Relations sphaignes – microorganismes : de la bryosphère à la sphagnosphère

Au cours de ce travail de recherche, une grande partie des études menées se sont attachées aux variations spatiales – verticales (le long de la sphaigne) et horizontales (transition écologique « haut-bas » marais) – des communautés microbiennes, ainsi qu'à leurs relations avec d'autres composants de l'écosystème, tel que les sphaignes via les composés phénoliques. Ainsi, les différentes études liées à ces variations spatiales ont mis en évidence (i) des différences de structure spatiales des communautés microbiennes, (ii) le rôle (potentiel) des composés phénoliques dans cette structure.

1 Structure spatiale des communautés microbiennes associées aux sphaignes

Les communautés microbiennes ont été caractérisées par leur biomasse et leur importance relative lors des différents travaux réalisés dans cette thèse. La structure spatiale de l'ensemble des communautés microbiennes n'avait jamais été étudiée chez la sphaigne, même si quelques études se sont déjà attachées à ce type de variations pour des groupes microbiens isolés (algues, amibes à thèque) (Meisterfeld, 1977 ; Howell & South, 1981; Mitchell *et al.* 2001 ; Mitchell & Gilbert, 2004). Ainsi, la figure 5.1 présente une synthèse des groupes microbiens et autres paramètres environnementaux influencés par les variations spatiales (horizontales et verticales).

Pour des raisons évidentes, la structure des communautés microbiennes évolue avec la profondeur. La lumière présente en surface représente en effet un facteur important pour la photosynthèse des microalgues, expliquant que leurs biomasses soient plus importantes en surface qu'en profondeur. Les microalgues dominent par exemple les communautés microbiennes en surface avec 33% de la biomasse totale dans le « haut » marais (Figs 5.1 et 5.2). Au niveau des tiges (vivantes → mortes), la biomasse des bactéries et des champignons prend plus d'importance avec environ 40% de la biomasse totale microbienne, « haut/bas » marais confondus. Avec la profondeur, il a été démontré sur le même site expérimental, que la matière organique avait tendance à augmenter jusqu'à 10 cm de profondeur (Delarue *et al.*, 2011a). Or, la matière organique est un facteur clé de l'activité des décomposeurs, expliquant pourquoi leur

biomasse augmente avec la profondeur (Berg *et al.*, 1998). Enfin, la description des biomasses microbiennes confirme que les amibes à thèque représentent un groupe microbien important dans la structure des communautés microbiennes (environ 30% de la biomasse totale), quelle que soit la profondeur et le type de milieu pris en compte, renforçant l'intérêt d'étudier ce groupe en particulier.

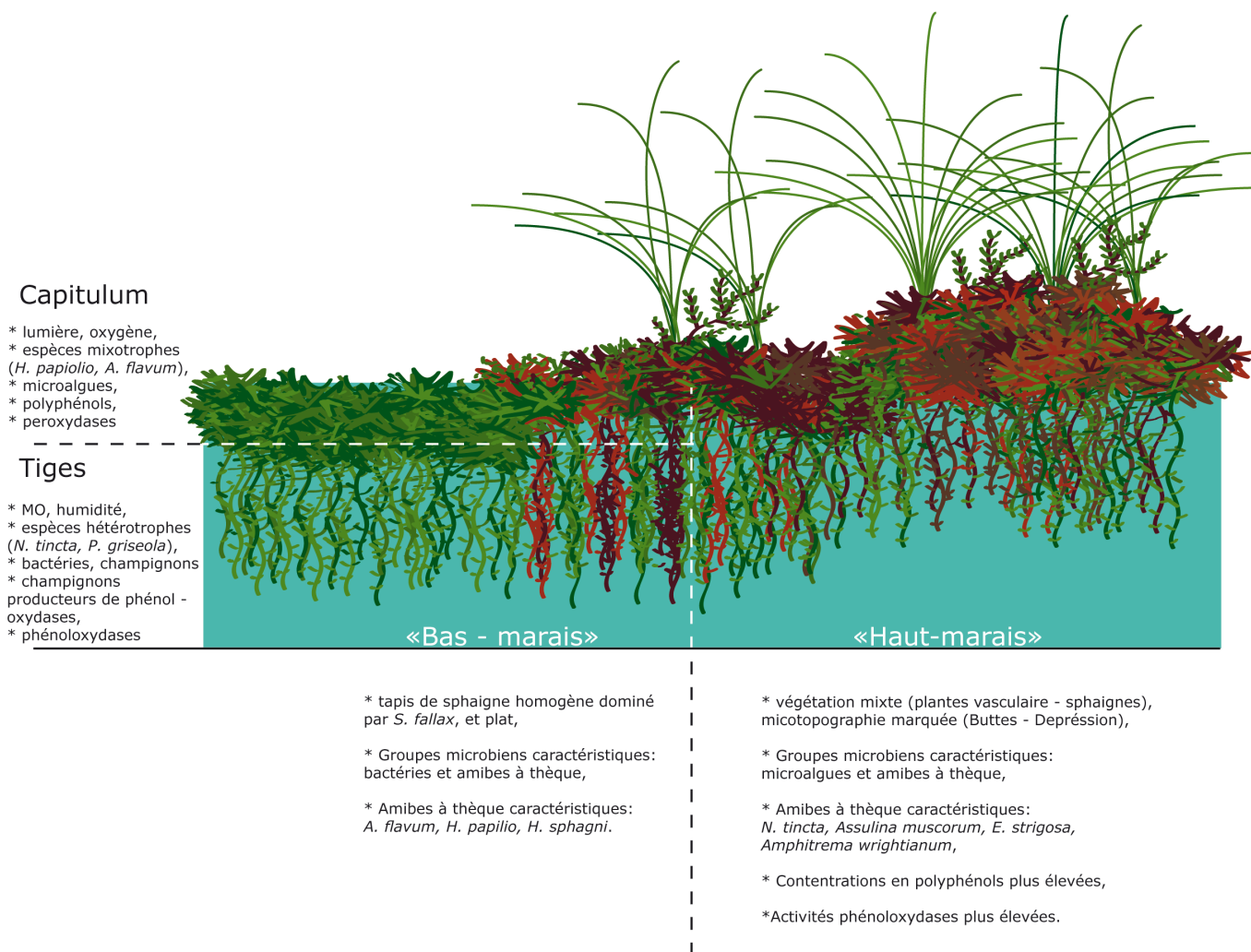


Figure 5.1: Facteurs biotiques (végétation, microorganismes) et abiotiques caractéristiques du capitulum et de la tige des sphaignes. Facteurs biotiques (végétation, microorganismes) et abiotiques caractéristiques des conditions écologiques « haut » et « bas » marais.

La communauté d'amibes à thèque a été caractérisée par des indicateurs utilisés classiquement en écologie microbienne, à savoir la biomasse, l'abondance totale et la diversité. En complément à ces indicateurs, les relations trophiques entre les amibes à thèque et les autres groupes microbiens le long du gradient ont aussi été pris en compte grâce à l'étude du régime alimentaire de deux espèces de thécamoebiens dominantes.

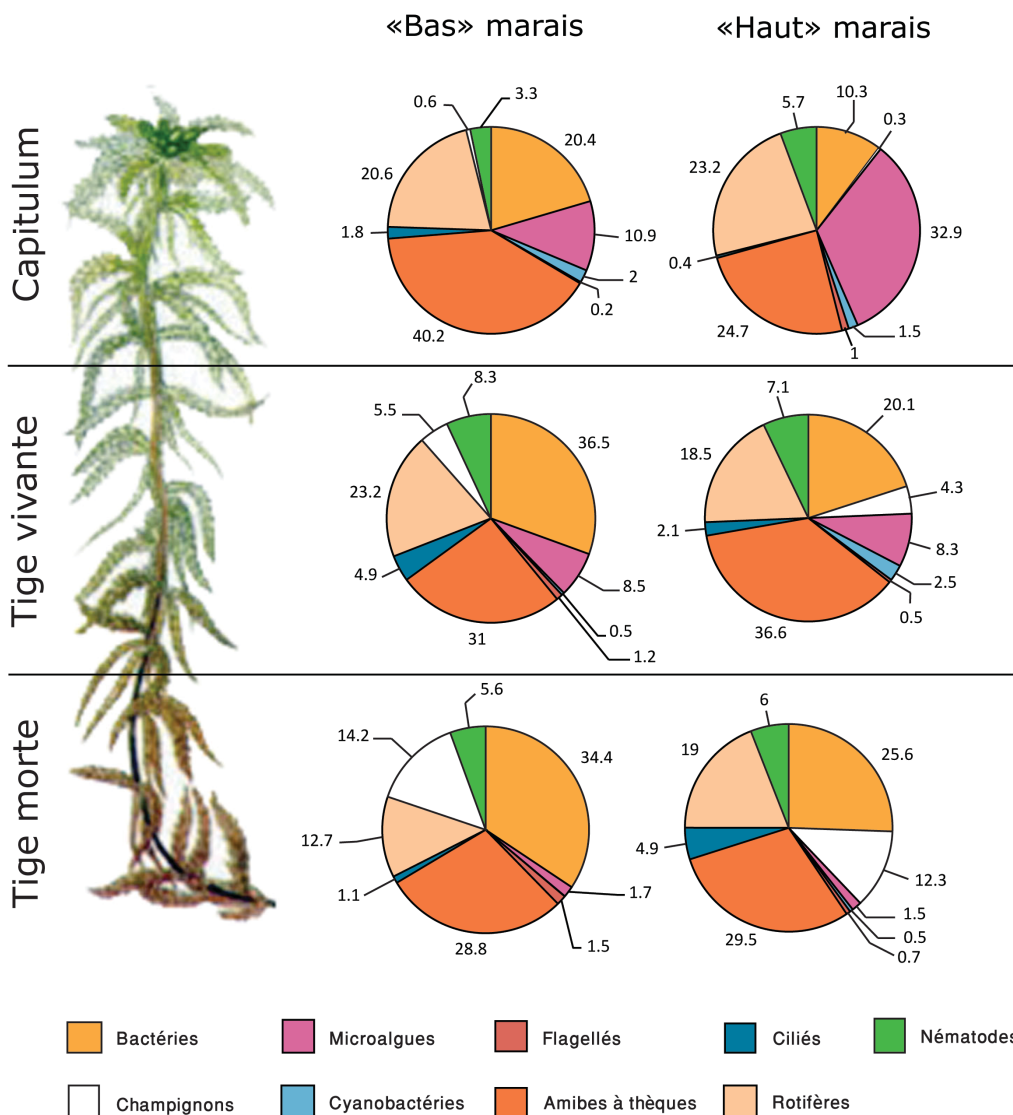


Figure 5.2: Proportion relative moyenne (%) des groupes microbiens présents le long de la sphaigne et dans le « haut » et le « bas » marais de la tourbière de Frasné.

Au total, 41 taxons ont été identifiés le long du gradient « haut-bas » marais, avec une moyenne de 15 espèces différentes par échantillons. Ce nombre d'espèces correspond à celui retrouvé en moyenne en tourbières (entre 10 et 30 espèces en moyenne) (e.g. Heal, 1961, 1964 ; Mitchell *et al.*, 1999, 2000a ; Booth, 2001 ; Warner *et al.*, 2007 ; Booth *et al.*, 2008), même si le nombre de taxons rencontré dans les mousses est fortement dépendant des conditions environnementales rencontrées, notamment l'humidité du milieu (Bobrov *et al.*, 1999 ; Booth *et al.*, 2008 ; Mitchell *et al.*, 2008). La composition de la communauté des amibes à thèque s'est révélée similaire à

celle retrouvée habituellement dans les hauts et bas marais d'Europe (Heal, 1961, 1964) (Fig. 5.3).

Les similitudes retrouvées entre ces études n'est toutefois pas surprenante, et corrobore les résultats d'autres études illustrant la distribution cosmopolite de la plupart des morphotypes d'amibes à thèque retrouvées dans le même type d'habitat (Mitchell *et al.*, 2008 ; Yang *et al.*, 2009). Cependant, il est possible qu'un morphotype d'espèce donné puisse cacher plusieurs espèces génétiquement différentes, qui différeraient par rapport à leur distribution géographique et/ou leurs exigences écologiques, comme cela a été récemment suggéré (Heger *et al.*, 2009). Une approche combinant des études morphologiques, écologiques et moléculaires, tel que le séquençage ribosomiale de l'ARN, serait idéale pour tenter de répondre à une telle question (Michell *et al.*, 2008 ; Wilkinson, 2008 ; Heger *et al.*, 2009, 2011 ; Lara *et al.*, 2011a, b).

L'étude de la distribution spatiale (verticale et horizontale) des amibes à thèque a montré une séparation très nette entre les parties supérieures et inférieures de la sphaigne (Figs 5.1, 5.2, 5.4). Premièrement, les espèces mixotrophes (*Hyalosphenia papilio* et *Archerella flavum*) ont plutôt été enregistrées en surface, là où la lumière est la plus importante ce qui favorise la photosynthèse de leurs algues symbiotiques (Fig. 5.4 ; Annexe 3) (Chacharonis, 1956 ; Heal, 1962 ; Schönborn, 1965). Deuxièmement, le matériel disponible pour la construction des théques est aussi apparu comme un facteur important pour certaines espèces, même mixotrophes, telle que *Amphitrema wrightianum* qui a été retrouvée en profondeur afin d'utiliser les débris organiques pour construire sa thèque, contrairement à *Archerella flavum* qui sécrète directement sa thèque et qui se développe en surface (Mitchell *et al.*, 2008).

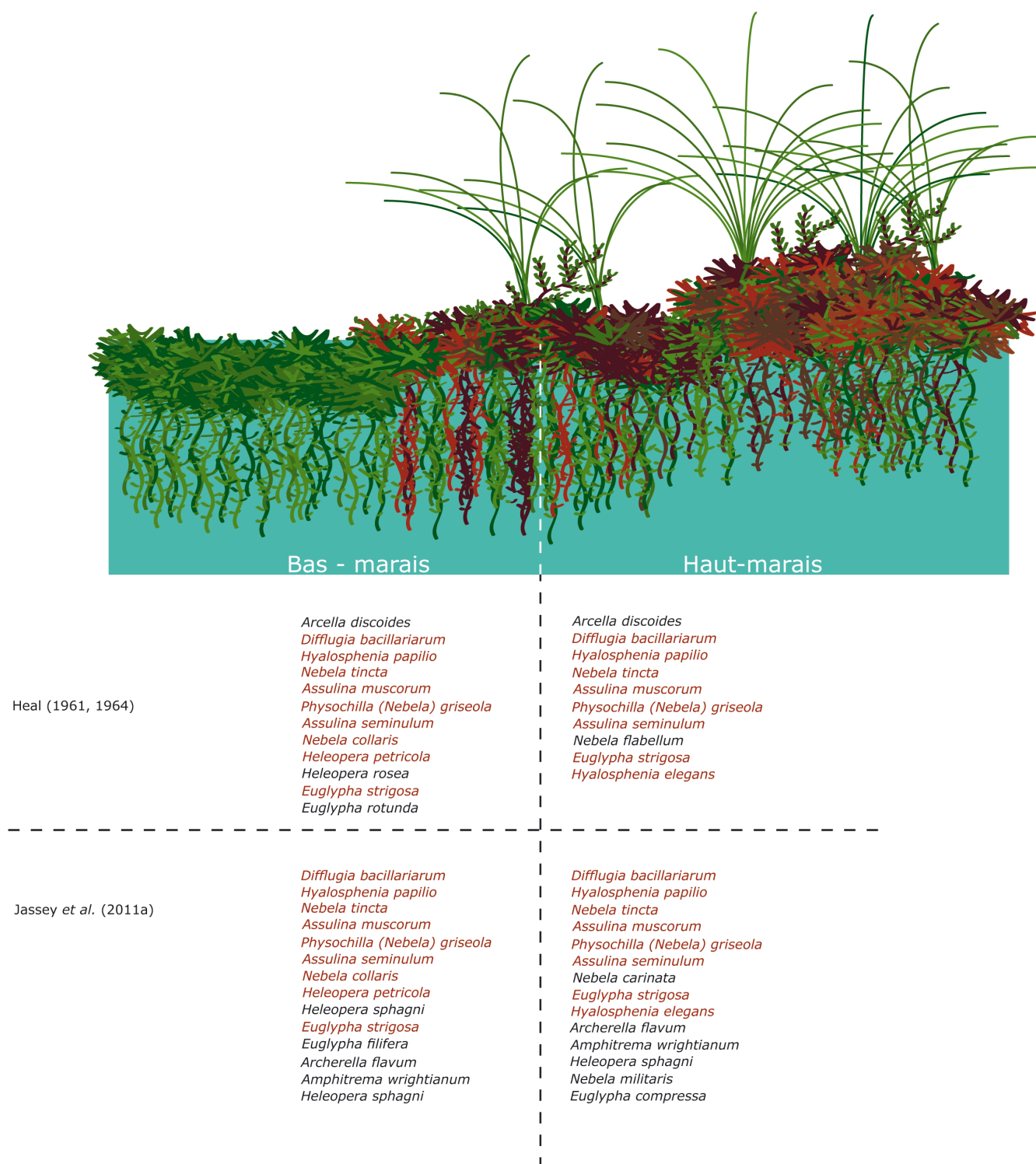


Figure 5.3: Comparaison entre les espèces d'amibes à thèque retrouvées habituellement dans un haut et un bas marais (Heal, 1961, 1964) et celles retrouvées le long de la transition écologique « haut-bas » marais de la tourbière de Frasne (Jassey *et al.*, 2011c). Les espèces communes apparaissent en rouge. Les espèces principales sont présentées en annexe 3.

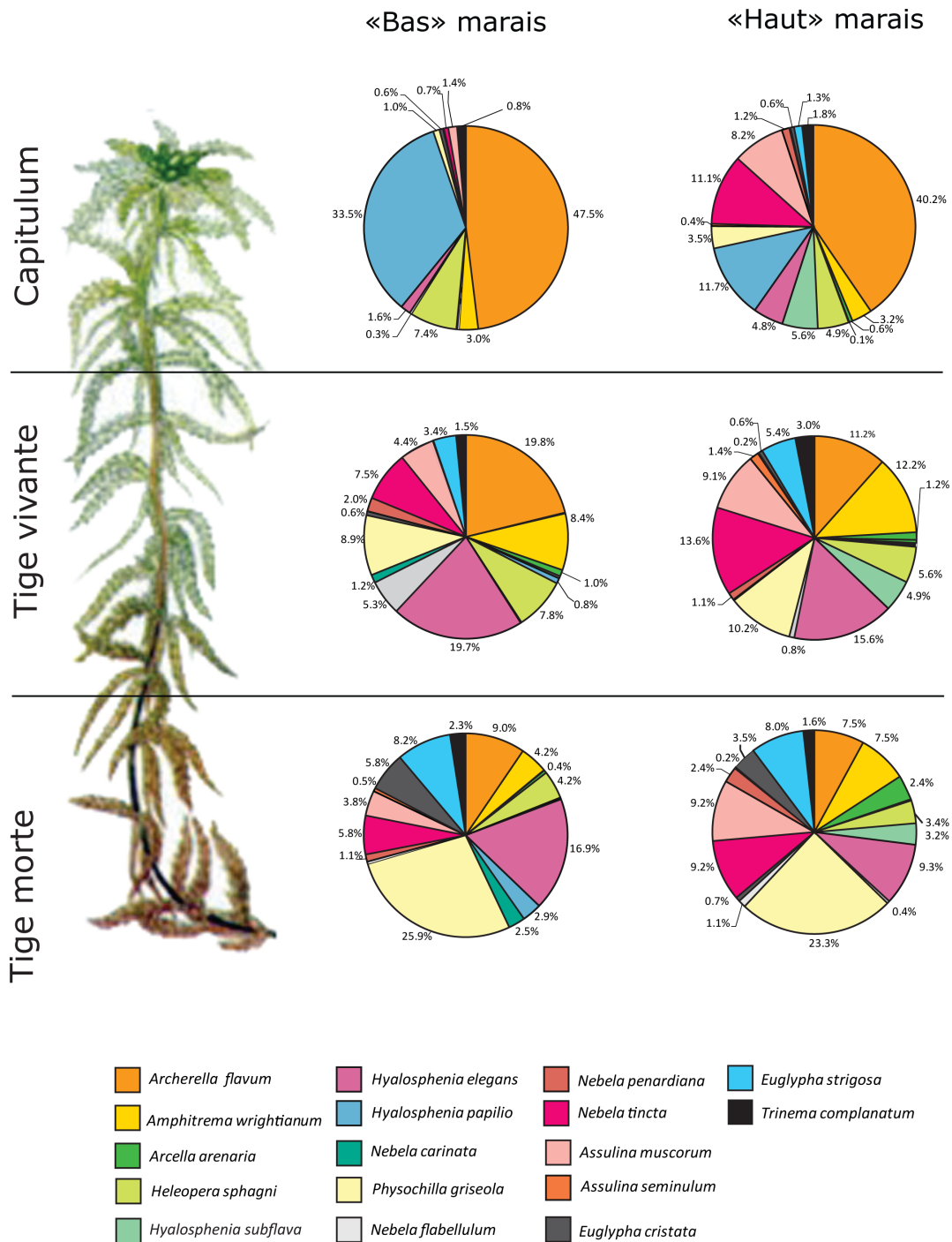


Figure 5.4: Proportion relative moyenne (%) des espèces d'amibes à thèque retrouvées dans le « haut » et le « bas » marais et le long de la tige de la sphaigne sur la tourbière de Frasne.

Troisièmement, l'importance de la disponibilité des proies dans la répartition verticale des amibes à thèque le long de la sphaigne est aussi apparue comme un facteur déterminant. Nous avons montré que *H. papilio* et *Nebela tinctoria* n'avait pas la même distribution verticale le long de la sphaigne et que leur régime alimentaire différait. Les résultats obtenus ont effectivement montré que ces deux espèces n'avaient pas la même

position trophique et que cette différence découlait probablement de leur différence de régime alimentaire. Ainsi, l'abondance de *N. tincta* a été corrélée à celle des champignons, dont l'abondance était plus élevée en profondeur qu'en surface, tandis que l'abondance de *H. papilio* était plutôt corrélée à celle des ciliés mixotrophes, présents en surface. Bien qu'il soit actuellement difficile de hiérarchiser l'importance des paramètres écologiques et trophiques sur la distribution des amibes à thèque en raison de la faible disponibilité des données de régime alimentaire dans la littérature, ces travaux ont mis en évidence des relations étroites entre les paramètres écologiques et trophiques dans la distribution verticale des amibes à thèques.

Comme pour la distribution verticale, l'étude de la distribution horizontale de la communauté d'amibes à thèque a montré (i) des différences de structure entre le « haut » et le « bas » marais, et (ii) des interactions mutuelles entre les paramètres écologiques et trophiques sur cette distribution. Dans un premier temps, nos travaux ont démontré l'importance des micro-variations physico-chimiques sur la répartition des amibes à thèque le long du gradient. L'étude du gradient écologique a montré, grâce aux différentes analyses multi-variées effectuées, que la chimie de l'eau (pH, potentiel redox, conductivité), la microtopographie et les concentrations en polyphénols solubles avaient la même importance dans la répartition des amibes à thèque, soit environ 7% chacun de la variance totale. Ces résultats mettent ainsi en évidence la faible importance de la hauteur de la nappe d'eau sur de faibles variations spatiales, et pour la première fois, l'importance des polyphénols dans l'écologie des amibes à thèque. Dans un second temps, l'analyse spatiale du régime alimentaire de *H. papilio* et *N. tincta* a montré des différences de régime alimentaire entre le « haut » et le « bas » marais pour *H. papilio*. En effet, l'ingestion des ciliés par *H. papilio* est fortement corrélée à l'abondance des ciliés, dont la répartition est fortement liée aux conditions écologiques qui caractérisent le « haut » et le « bas » marais. De ce fait, il semble que les conditions écologiques enregistrées dans le « haut » et le « bas » marais influencent directement (ex. physiologiquement) et indirectement (relations trophiques) la distribution de *H. papilio*. En revanche, contrairement à la distribution verticale où la hiérarchisation des facteurs trophiques et écologiques paraît difficile, il semblerait que pour la répartition horizontale, les paramètres écologiques aient plus d'importance que les paramètres trophiques, comme nous l'a démontré l'étude du régime alimentaire de *N. tincta*. Ces résultats doivent cependant être considérés avec précaution, car des travaux prenant en compte d'autres espèces sont nécessaires pour approfondir ces connaissances.

Tableau 5.1: Contribution des différents facteurs abiotiques et biotiques enregistrés sur la tourbière de Frasne (%) à la variance des communautés microbiennes.

| Variables incluses dans les RDAs | Capitulum | | Tiges vivantes | | Tiges mortes | |
|--|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|
| | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value | % ^a | <i>p</i> value |
| Chimie de l'eau (éléments majeurs, Ptot, PO ₄ , NH ₄ , NO ₃) | 14.9 | 0.03 | 39.8 | 0.02 | 37.9 | 0.001 |
| Facteurs physiques (Microtopography, vegetation) | 21.3 | 0.002 | 1.0 | 0.41 | 2.0 | 0.56 |
| Composés phénoliques | 9.7 | 0.001 | 21.1 | 0.001 | 16.9 | 0.001 |

^a Pourcentage de variance expliqué (R^2 ajusté)

Par ailleurs, l'étude globale de l'écologie des communautés microbiennes a confirmé les résultats obtenus pour les amibes à thèque puisque le gradient écologique – végétation et microtopographie – englobe 21% de la variation totale des communautés (Tableau 5.1). L'influence de ces paramètres diminue évidemment avec la profondeur (1-2% de la variation totale), à l'inverse de la chimie de l'eau et des concentrations en polyphénols solubles dont l'importance dans la répartition des communautés microbiennes augmente en fonction de la profondeur (respectivement 40% et 18% de la variance totale) (Tableau 5.1). Ainsi, ces résultats corroborent ceux mis en évidence dans d'autres études (Mitchell *et al.*, 2001, 2003 ; Opravilova & Hajek, 2006 ; Bojková *et al.*, 2011 ; Hajková *et al.*, 2011), qui ont souligné l'importance des paramètres physico-chimique de l'eau sur la répartition des communautés microbiennes des sphaignes dans différentes tourbières d'Europe. Autre fait intéressant souligné par ces résultats, les polyphénols semblent avoir une influence dans la répartition spatiale de l'ensemble des communautés microbiennes. De ce fait, les variations à la fois verticales et horizontales des concentrations en phénols semblent jouer un rôle non négligeable dans l'écologie des communautés microbiennes des tourbières, comme l'a suggéré l'étude des relations spécifiques polyphénols – activités enzymatiques.

2 Relations spécifiques « polyphénols – microorganismes »

L'étude détaillée des relations polyphénols – activités enzymatiques a mis en évidence des interactions spécifiques entre les polyphénols libérés par les sphaignes, les champignons producteurs de phénoloxydase et les activités enzymatiques phénoloxydases et peroxydases, précisant un peu plus le rôle potentiel des phénols dans l'écosystème.

Une diminution des concentrations en phénols a été observée avec la profondeur. Ce phénomène s'explique simplement par un métabolisme phénolique plus important au niveau du capitulum que dans les tiges, les capitulum constituant les parties vivantes de la sphaigne (Clymo & Hayward, 1982). En parallèle à cette diminution, plusieurs facteurs liés aux phénols ont également varié (Figs 5.1 et 5.5). L'étude des enzymes oxydatives présentes en tourbière a révélé que les activités peroxydases étaient plus importantes en surface qu'en profondeur, contrairement aux activités phénoloxydases dont l'activité augmente avec la profondeur. Cette augmentation s'explique en partie par la hausse de la densité des champignons producteurs de phénoloxydase.

D'autre part, ces résultats ont démontré que les peroxydases constituaient le pool oxydatif majeur en tourbière avec des activités 1000 fois plus élevées que celles des phénoloxydase. Ces fortes activités peroxydases suggèrent que leur origine est plutôt végétale que fongique, en l'occurrence issue des sphaignes, et ce pour plusieurs raisons. Premièrement, le substrat utilisé pour doser les peroxydases (DAF-H₂O₂) est reconnu comme très sensible pour la détection des peroxydases d'origine végétale (Criquet *et al.*, 2000b, 2001). Deuxièmement, aucune activité Ln-peroxydase fongique n'a été observée dans les différents travaux mis en place. En outre, parmi les différents taxons fongiques généralement identifiés en tourbières, relativement peu (24%), ont été identifiés comme producteurs de phénoloxydase (Thormann *et al.*, 2001). De plus, les conditions environnementales retrouvées en tourbières (pH acides, forte humidité, anaérobie quasi-constante) ont largement été reconnues pour limiter les activités phénoloxydases (Williams *et al.*, 2000 ; Toberman *et al.*, 2008, 2010).

Ainsi, cette étude détaillée des activités enzymatiques a souligné des relations positives entre les phénols et les peroxydases, et négatives entre les phénols et les phénoloxydases, révélant (i) une possible auto-régulation des polyphénols de surface par la sphaigne elle-même, et (ii) un effet inhibiteur potentiel des polyphénols sur les activités phénoloxydases fongiques (Fig. 5.5). Il s'est également avéré que l'influence des composés phénoliques libérés par la sphaigne sur les activités phénoloxydases était plus élevée dans le « bas » marais que dans le « haut » marais, suggérant une différence

qualitative de composés phénoliques entre le « haut » et le « bas » marais (Opelt *et al.*, 2007). Toutefois, la méthode de Folin utilisée dans ces travaux de recherche pour quantifier les composés phénoliques est une méthode globale qui ne met en évidence que les variations de phénols globales entre deux zones écologiques. D'autres travaux sont nécessaires afin de déterminer plus précisément la nature des composés pouvant influencer les activités microbiennes, telles que les activités phénoloxydases.

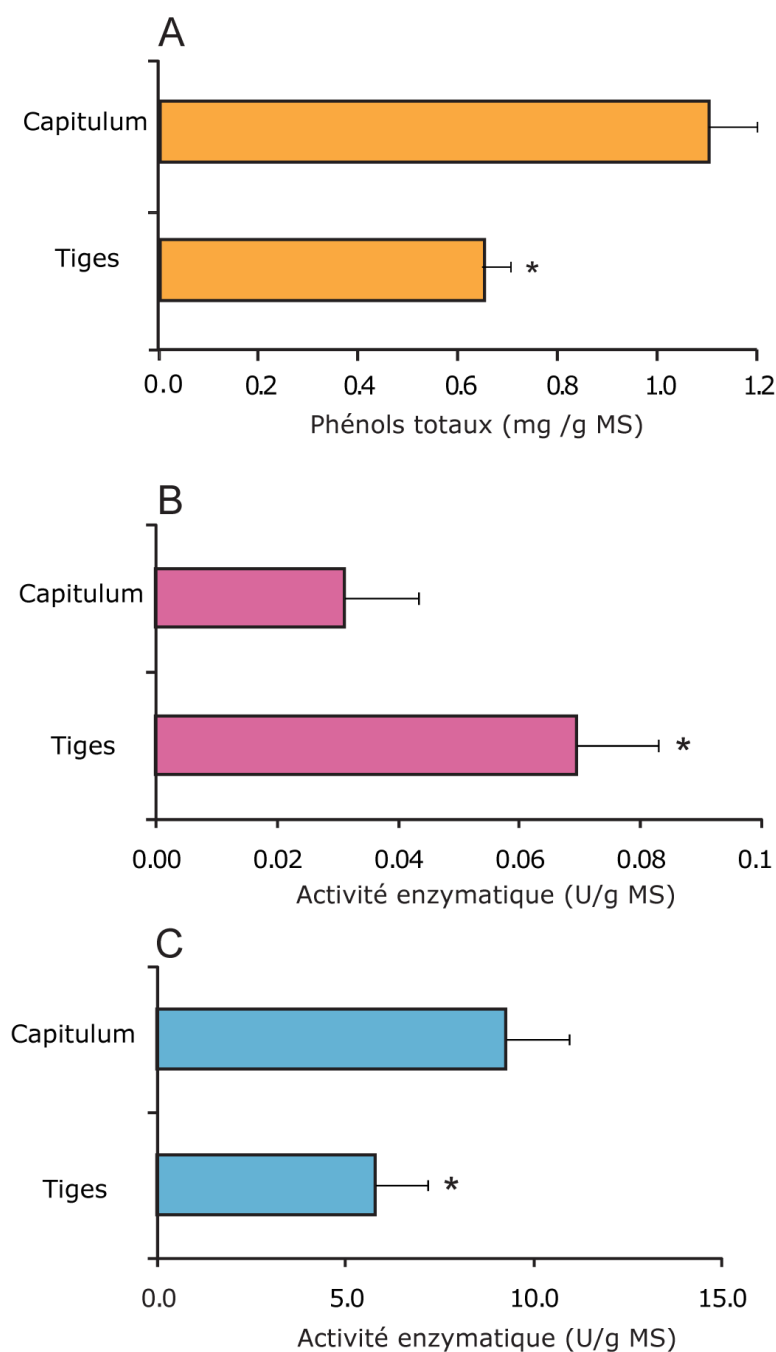


Figure 5.5: (a) Concentrations moyennes en polyphénols dans le capitulum et les tiges des sphaignes. Activités phénoloxydases (b) et peroxydases (c) moyennes enregistrées dans le capitulum et les tiges des sphaignes (d'après Chiapusio *et al.*, soumis).

En dehors des relations très étroites entre les polyphénols et les activités enzymatiques oxydatives, d'autres relations spécifiques « polyphénols - microorganismes » ont aussi été soulignées dans ces travaux de recherche. Une corrélation positive entre la densité de l'amibe à thèque *Euglypha strigosa* et les concentrations en polyphénols solubles a ainsi été observée (Figure 5.6), ce qui permet d'envisager l'existence d'un effet stimulant des polyphénols sur *E. strigosa*. De plus, une corrélation négative a aussi été trouvée entre l'intensité de mycorhization chez *Andromeda polifolia* et les concentrations en phénols dans le « haut » et le « bas » marais ($r = -0.60$, $P < 0.05$). En effet, l'intensité de mycorhization est systématiquement plus élevée dans le « bas » marais que dans le « haut » marais, contrairement aux composés phénoliques. Ce résultat suggère que les polyphénols ont un effet inhibiteur sur la mycorhization en tourbière. Bien que ces relations ne signifient pas forcément qu'une relation de causalité directe existe entre les phénols et *E. strigosa* et (ou) les champignons mycorhiziens, ces travaux soulèvent la question du rôle possible de ces composés au sein de la dynamique des communautés microbiennes, et par conséquent de l'écosystème.

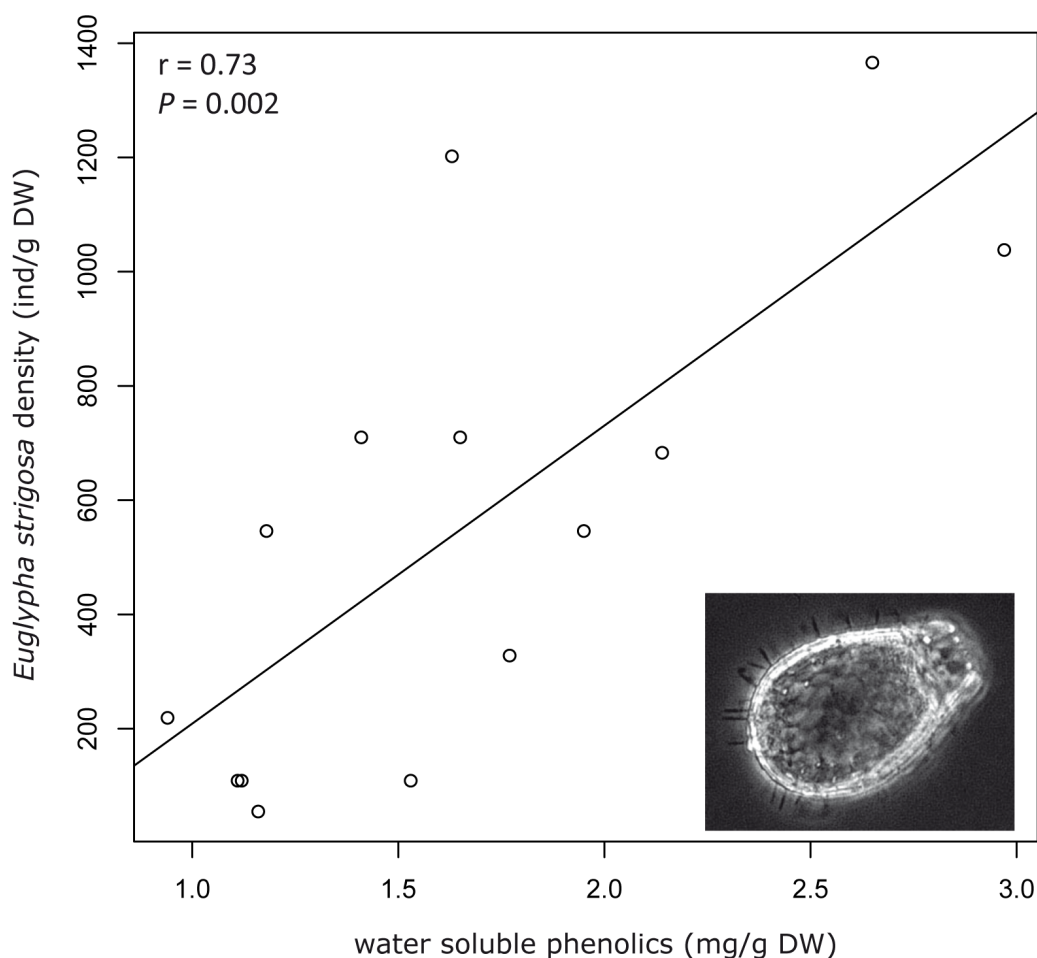


Figure 5.6: Mise en relation entre les concentrations en composés phénoliques et la densité de *Euglypha strigosa* chez *Sphagnum fallax* (d'après Chiapusio *et al.*, soumis)

3 De la bryosphère à la sphagnosphère

Pour la première fois en tourbières et de façon plus générale chez des bryophytes, des relations écologiques ont été soulignées entre les composés phénoliques produits et libérés par les sphaignes et les communautés microbiennes (Figure 5.7). Considérant l'ensemble de ces résultats, il semble tout à fait pertinent d'intégrer les composés phénoliques dans la bryosphère initialement décrite par Lindo & Gonzalez (2010). Par ailleurs, étant donné que (i) les sphaignes possèdent des particularités morphologiques, physiologiques et écologiques (ex. ennoyage permanent) différentes de celles des bryophytes terrestres, et (ii) que la boucle microbienne est légèrement différente de celle retrouvée chez d'autres bryophytes terrestres (notamment en termes de diversité, d'abondance et de biomasse ; Meyer, 2010), il apparaît tout à fait cohérent de pouvoir utiliser le terme sphagnosphère pour décrire l'association « sphaignes – communautés microbiennes » en tourbières, et marquer ainsi une différence écologique par rapport aux bryophytes terrestres (Figure 5.8).

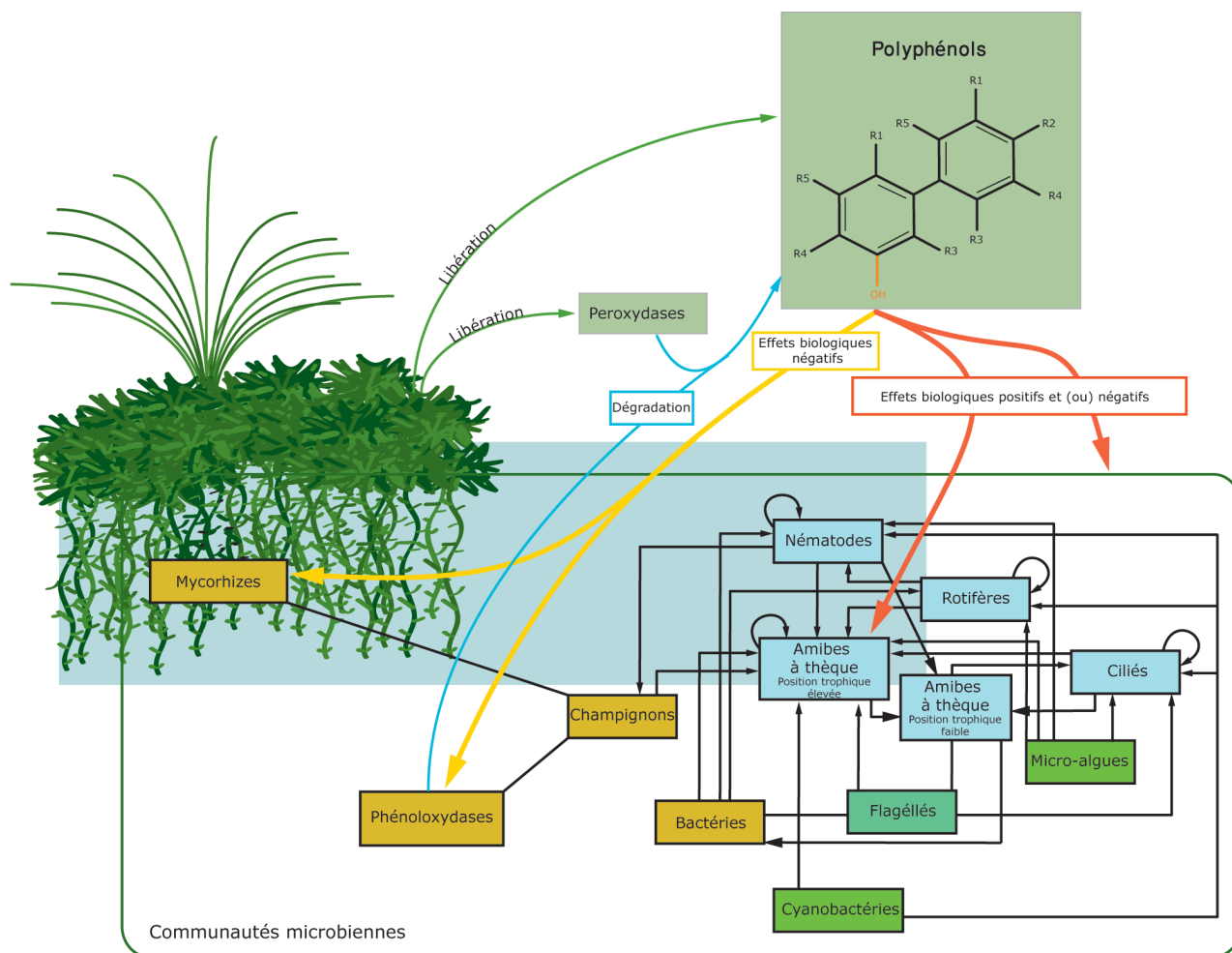


Figure 5.7: Schéma regroupant les différents effets biologiques induits par les polyphénols mis en évidence ou suggérés dans ces travaux de thèse sur les microorganismes associés à la sphagnosphère.

2. Impact d'une hausse de la température sur l'association sphaignes - microorganismes

L'étude la sphagnosphère a permis d'évaluer l'impact du réchauffement climatique sur les tourbières de façon globale, tout en tenant compte de la complexité de ce système et de son évolution au cours du temps. En effet, la prise en considération de l'ensemble des communautés microbiennes a permis d'accéder à la réponse des organismes et des populations dans leur ensemble (Meyer *et al.*, 2010a, b, Meyer, 2010), tout en considérant les interactions de compétitions, de prédateurs et l'effet des conditions du milieu (Carlson *et al.*, 2010 ; Lamentowicz *et al.*, 2010 ; Lindo & Gonzales, 2010 ; Meyer, 2010 ; Wilkinson & Mitchell, 2010) sur ces communautés (Fig. 5.9).

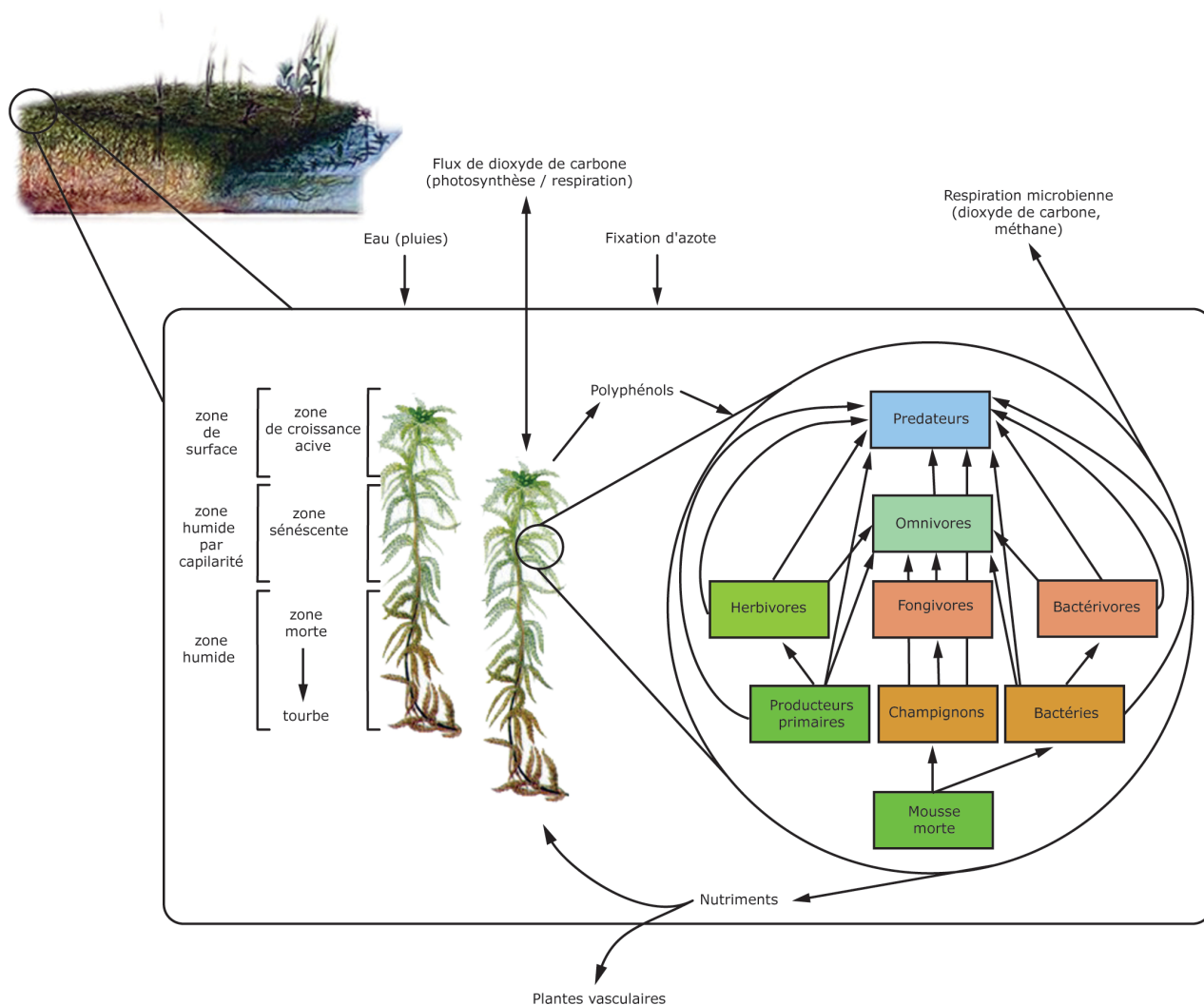


Figure 5.8: Schéma de la sphagnosphère.

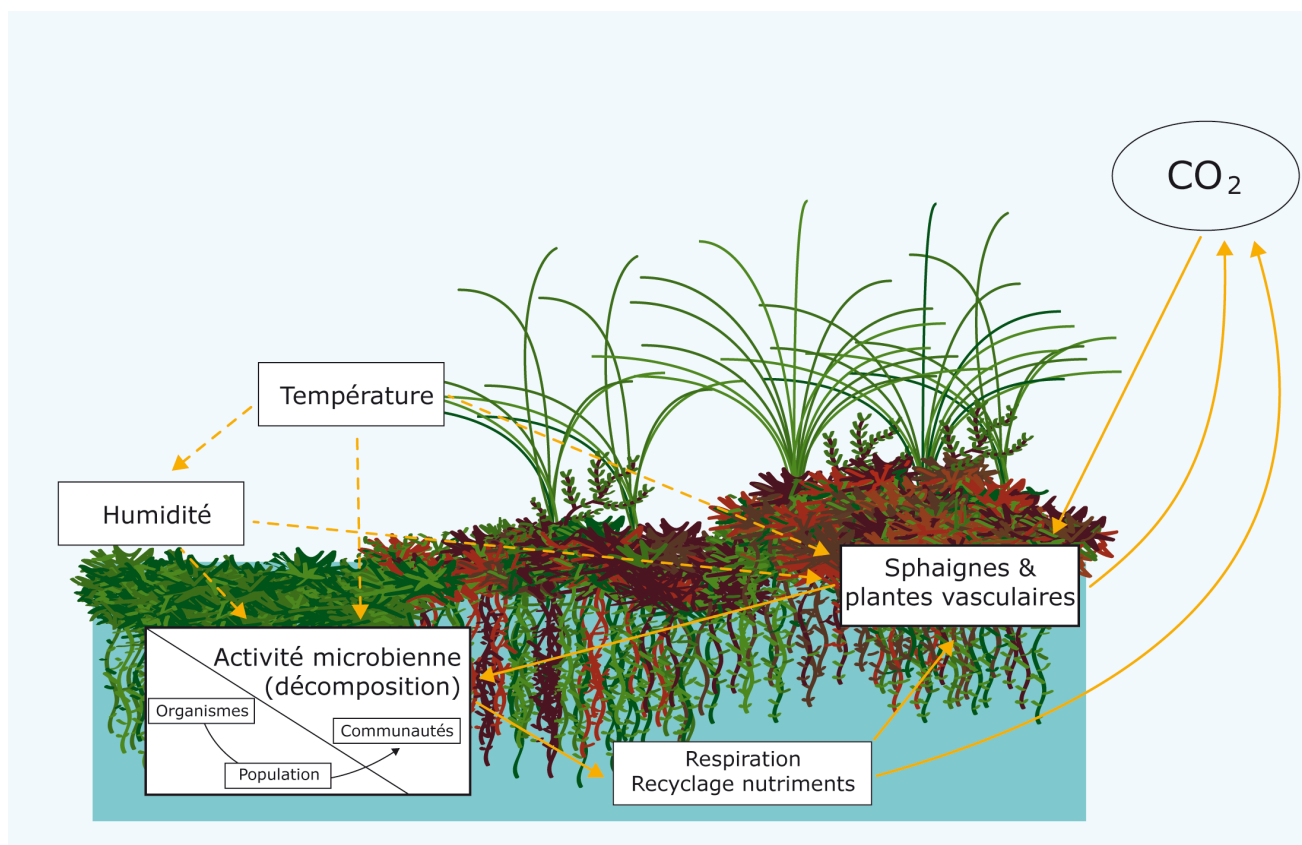


Figure 5.9: Représentation schématique des notions de bio-intégrations des communautés microbiennes des sphaignes et de leurs influences potentielles sur l'environnement dans un contexte de réchauffement climatique.

1 Effet de la hausse des températures moyennes sur la sphagnosphère

Au cours de cette thèse, l'étude de l'impact du réchauffement climatique sur la sphagnosphère a montré que le réchauffement influençait la bryosphère sous différents aspects (Fig. 5.10) :

* **Les communautés microbiennes** : les travaux réalisés sur les communautés microbiennes ont montré que (i) la structure des communautés microbiennes était sensible à l'augmentation des températures, et (ii) les bactéries et les amibes à thèque étaient les groupes les plus sensibles à ces changements. Toutefois, des effets inverses ont été observés pour les amibes à thèque entre les conditions contrôlées et les conditions *in situ*, avec dans un cas une augmentation de leur biomasse et dans l'autre une diminution. Ces effets inverses peuvent être liés à l'humidité du milieu car les amibes à thèque sont reconnues pour être très sensibles à la variation de la nappe d'eau

(e.g. Bobrov *et al.*, 1999 ; Booth *et al.*, 2008 ; Mitchell *et al.*, 2008). Néanmoins, dans les deux cas, une modification du réseau alimentaire par le biais de changements de communauté chez les amibes à thèque a été observée. Ainsi, en conditions contrôlées, la hausse de la biomasse des bactéries s'est traduite par une hausse de la biomasse des thécamoebiens bactérivores, tel que *Euglypha strigosa*, dont la biomasse a augmenté significativement avec la hausse des températures. Des résultats similaires ont été observés en milieu polaire, où l'augmentation de la densité des bactéries a induit une augmentation de la densité des thécamoebiens bactérivores (Beyens *et al.*, 2009). *In situ*, de telles relations spécifiques n'ont pas encore été observées (résultats non traités), mais une diminution très significative de la biomasse des top-prédateurs (- 70% ; amibes à thèque avec un pseudostome de grande taille) a été enregistrée, avec pour conséquence une modification importante du réseau trophique microbien. La raréfaction des top-prédateurs dans le réseau trophique microbien semble avoir pour conséquence une pression de prédation moindre sur les niveaux trophiques inférieurs, ce qui favorise les plus petits prédateurs, généralement bactérivores (Gilbert *et al.*, 2000, 2003 ; Wilkinson & Mitchell, 2010).

* **Les composés phénoliques** : la température a eu un effet significatif sur la production de phénols. Toutefois, une différence a été observée entre les conditions contrôlées et les conditions *in situ*. Dans le premier cas, la production de phénol augmente significativement (+ 1.2 mg.g⁻¹ MS en moyenne pour les composés libérés par la sphaigne), tandis que dans l'autre cas elle diminue (- 0.6 mg.g⁻¹ MS en moyenne pour les composés produits et libérés par la sphaigne) (Fig. 5.10). Cette différence peut s'expliquer par des variations de l'humidité du milieu entre ces deux études. En effet, dans l'étude en microcosme la nappe d'eau ne faisait pas partie des facteurs limitant pour la survie des sphaignes, contrairement aux conditions *in situ*, où une relation significative a été trouvée entre les variations d'humidité des sphaignes et la production et libération de phénols ($P < 0.05$). Or, plusieurs travaux ont démontré que le niveau de la nappe d'eau et/ou l'humidité du milieu étaient des facteurs importants pour la sphaigne (e.g. McNeil & Waddington, 2003 ; Bragazza, 2008). La diminution de l'humidité du milieu affecte notamment l'assimilation du carbone par la sphaigne (Hajek & Beckett, 2008 ; Strack *et al.*, 2009). De ce fait, il est envisageable que lorsque l'humidité du milieu devient limitée, les sphaignes privilégient les fonctions vitales primaires comme la photosynthèse et la croissance plutôt que les fonctions secondaires comme la production de composés phénoliques.

* **Les activités enzymatiques oxydatives** : les travaux *in situ* ont montré que la hausse des températures favorisait les activités enzymatiques phénoloxydases et peroxydases. Des effets moins constants et plus contrastés que pour les concentrations

en phénols ont toutefois été observés sur les activités phénoloxydases, avec parfois des diminutions, par exemple en septembre dans le « bas-marais ». Plusieurs raisons peuvent expliquer ces effets. Comme souligné plusieurs fois auparavant dans ce manuscrit, l'ennoyage quasi-constant et les pH acides présents en tourbière sont reconnus pour inhiber les activités phénoloxydases (Pind *et al.*, 1994 ; Williams *et al.*, 2000 ; Toberman *et al.*, 2008, 2010 ; Sinsabaugh, 2010). Or, l'augmentation supposée de l'apport en oxygène par le biais de la diminution de l'humidité du milieu ne semble pas compenser ces effets inhibiteurs, comme l'ont suggéré auparavant Freeman *et al.* (2001a). Apparemment, un changement de pH significatif est avant tout nécessaire pour influencer les activités phénoloxydases (Toberman *et al.*, 2010). Enfin, les peroxydases semblent plus sensibles que les phénoloxydases aux changements de températures, même si leur activité a uniquement augmenté dans le « bas-marais ».

*** Effet sur les variations spatiales et temporelles :** Le premier constat que l'on peut faire sur l'impact du réchauffement climatique sur la tourbière de Frasne, est que l'augmentation des températures ne modifie pas les variations spatiales (horizontales ou verticales) et temporelles (saisonnnières ou annuelles) que l'on retrouve dans un climat ambiant, mais les accentuent. L'étude des variations temporelles a montré que, par exemple, les variations saisonnières de polyphénols et (ou) de peroxydases n'étaient pas modifiées avec le réchauffement climatique, mais au contraire, que ces variations étaient plus prononcées. La différence entre le « haut » et le « bas » marais semble également plus marquée avec le réchauffement. Ainsi, la diminution de composés phénoliques libérés par la sphaigne a été essentiellement observée au niveau du « bas- marais ». Les activités peroxydases ont aussi augmenté face à la hausse des températures dans le « bas-marais », contrairement au phénoloxydases qui ont plutôt varié dans le « haut-marais ». Ces résultats démontrent que le réchauffement climatique n'a pas le même impact le long de la transition écologique « haut-bas » marais, corroborant les résultats trouvés par Weltzin *et al.* (2003) sur la végétation qui a montré que les communautés végétales répondaient différemment au réchauffement climatique entre un haut et un bas-marais. Ainsi, les différences que l'on observe entre le « haut » et le « bas » marais suggèrent que le réchauffement climatique pourrait initier des changements – différents et (ou) d'une intensité différente – le long de cette transition écologique. Le réchauffement climatique semble donc avoir un effet différencié selon le type de tourbières considérées.

Finalement, l'ensemble des paramètres liés à la sphagnosphère a été influencé par le réchauffement climatique, ce qui suggère qu'à long terme, des changements importants dans le fonctionnement écologique des tourbières pourront être observés.

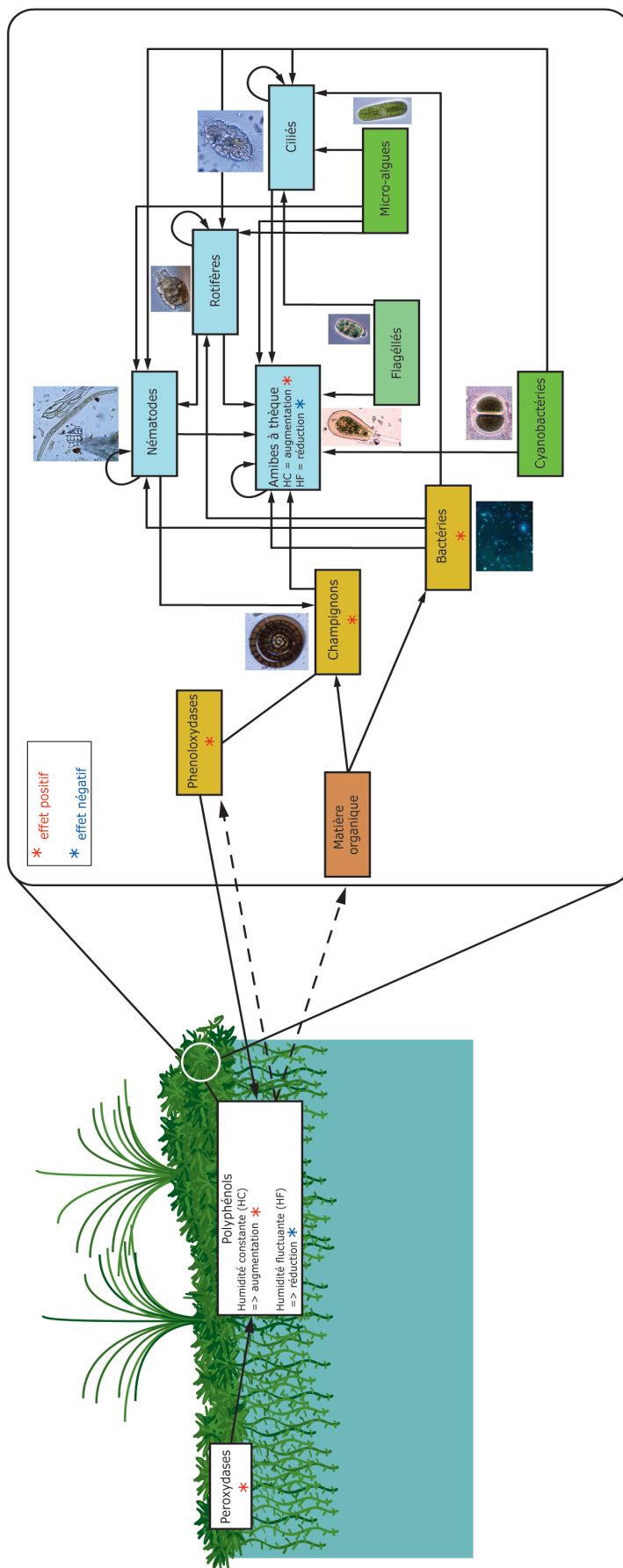


Figure 5.10: Schéma bilan des effets positifs (étoile rouge) et (ou) négatifs (étoile bleue) du réchauffement climatique sur l'ensemble des facteurs formant la sphagnosphère.

2 Impact du réchauffement climatique sur le fonctionnement de l'écosystème

Après deux années complètes de réchauffement, les facteurs biotiques et abiotiques ont montré les premiers signes de changements (Fig. 5.11). Les premiers résultats indiquent que les modifications en tourbières associés à un réchauffement climatique se traduisent par un effet direct sur les communautés microbiennes, et indirect via des modifications de leurs relations avec les autres compartiments clés du système, à savoir la végétation et la chimie de l'eau/dynamique de la matière organique, provoquant par ailleurs de nombreux effets rétroactifs sur le fonctionnement de l'écosystème. La modification du réseau alimentaire microbien suggère une dégradation de la matière organique plus importante. En effet, la raréfaction des top-prédateurs dans le réseau microbien implique une pression de prédation moindre sur les niveaux trophiques inférieurs, favorisant par conséquent les plus petits prédateurs, généralement bactériovores (Gilbert *et al.*, 2000, 2003 ; Wilkinson & Mitchell, 2010). Or, une pression de prédation accrue sur les bactéries est connue pour accentuer leur croissance, et leur activité (Gilbert *et al.*, 1998 ; Glucksman *et al.*, 2010). Ainsi, l'augmentation des températures en tourbières pourrait conduire à une décomposition plus importante, comme souligné dans les tourbières subarctiques où la respiration hétérotrophe est plus élevée lorsque les températures augmentent (Dorrepaal *et al.*, 2009). Bien évidemment ces conclusions sont à nuancer, car des incertitudes demeurent sur la similitude possible de la réponse des tourbières en zone tempérée de celles observées en zone subarctique. Toutefois, l'effet du réchauffement sur la dynamique de la matière organique extraite à l'eau semble confirmer cette hypothèse (Delarue *et al.*, 2011b). En effet, cette fraction organique est plus réactive que l'analyse de la matière organique globale, et répond donc aux perturbations environnementales plus rapidement. L'analyse de cette fraction dans les dix premiers centimètres de tourbe a montré que le réchauffement induisait une diminution significative des teneurs en carbone organique et un enrichissement en composés aliphatiques et aromatiques. Ceci peut-être la conséquence soit d'un changement de composition des plantes et donc de la qualité chimique de nouvelles litières, soit d'une décomposition plus importante (Delarue *et al.*, 2011b).

L'analyse par redondance des relevés de végétation effectués en 2008, 2009 et 2010, ne montre pas d'effet significatif du réchauffement sur la composition des communautés végétales ($P = 0.99$). En revanche, le suivi mensuel des teneurs des polyphénols libérés par la sphaigne aux mêmes profondeurs montre un effet négatif du réchauffement sur ces concentrations. Or, une diminution des teneurs en polyphénols diminue leur effet inhibiteur sur les enzymes impliqués dans la dégradation de la matière

organique, tels que les phénoloxydases et (ou) les hydrolases (Wetzel, 1992 ; Freeman *et al.*, 2001a, b ; Fenner *et al.*, 2005 , 2007). L'augmentation des activités peroxydases semblent aussi confirmer l'hypothèse d'une décomposition de la matière organique plus élevée sous l'effet du réchauffement.

Réponse des compartiments clés de l'écosystème après deux années de réchauffement

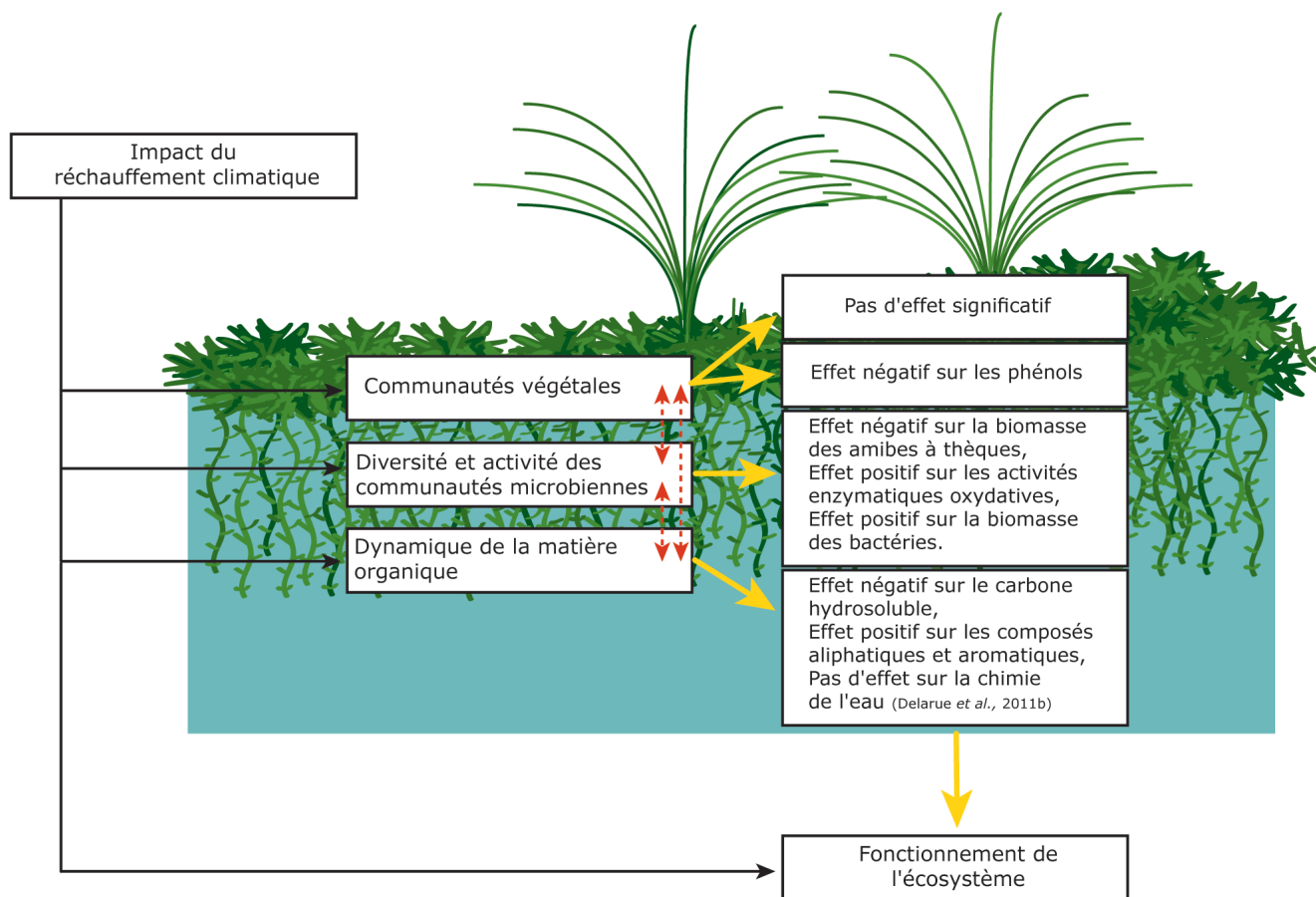


Figure 5.11: Réponse des compartiments clés de la tourbière après deux années de réchauffement.

La modification du réseau alimentaire microbien, notamment la forte baisse de la biomasse des amibes à thèque pourrait aussi avoir un impact sur le recyclage des nutriments, et ainsi affecter les relations sphaignes – microorganismes – plantes vasculaires. Des relations fortes ont en effet été mises en évidence entre les sphaignes et les communautés microbiennes lorsque la température augmentait. Or, les amibes à thèque, de par leur position élevée dans le réseau trophique alimentaire en tourbières ont un rôle clé dans le fonctionnement des tourbières. En effet, elles connectent les plantes et les microorganismes hétérotrophes au travers de la boucle microbienne, permettant le recyclage du carbone et des nutriments (Gilbert *et al.*, 1998 ; Carlson *et al.*, 2010 ; Wilkinson & Mitchell, 2010). Ainsi, la disparition des top-prédateurs (amibes à thèque) réduirait la taille de la boucle microbienne (Fig. 5.12) par un raccourcissement des chaînes alimentaires, permettant un recyclage plus rapide de ses éléments, comme souligné précédemment avec une décomposition de la matière organique plus intense.

Ainsi, ces relations pourraient par exemple affecter les interactions sphaignes – plantes vasculaires, qui sont en compétition pour les nutriments, par exemple (Heijmans *et al.*, 2002). Même si les analyses de la composition de la végétation ne mettent pas en évidence de changements significatifs, d'autres effets non mesurés dans le cadre de ces recherches peuvent cependant exister (ex. physiologiques) (Dorrepaal *et al.*, 2004 ; Breeuwer *et al.*, 2008 ; Keuper *et al.*, 2011). Des effets significatifs sur la diversité végétale pourraient certainement aussi être observés sur des échelles de temps plus longues (Bardgett *et al.*, 2005 ; Keuper *et al.*, 2011). Ainsi, le fait que nous ayons montré que les relations causales entre les sphaignes et les plantes vasculaires diminuaient avec le réchauffement, suggérant une diminution du contrôle des sphaignes sur la survie des plantes vasculaires, renforce l'idée d'un changement à long terme de la diversité végétale (Heijmans *et al.*, 2002 ; Cornelissen *et al.*, 2003 ; Keuper *et al.*, 2011). Autre exemple, nos travaux indiquent que l'effet de la microtopographie sur les plantes vasculaires et les sphaignes s'inverse avec le réchauffement, devenant plus important sur les plantes vasculaires. Ceci montre que la hausse des température et la baisse de l'humidité pourraient favoriser les plantes vasculaires par rapport aux bryophytes (ex. Weltzin *et al.*, 2003). Finalement, le réchauffement climatique à long-terme pourrait amener les tourbières à évoluer vers un nouveau stade de leur évolution, telle qu'une accélération de la transition tourbières minérotrophes → tourbières ombrotrophes (ou inversement) (Dise, 2009). Il est cependant aussi possible d'imaginer qu'il existe des effets contraires permettant au milieu de s'adapter à ces nouvelles contraintes et de retrouver un équilibre différent de celui que nous envisageons (Keuper *et al.*, 2011).

Conclusion & Perspectives

Les travaux présentés dans cette thèse ont contribué à une meilleure compréhension et description des interactions biologiques au sein de la bryosphère présente en tourbière. La comparaison des communautés microbiennes dans deux zones écologiques de niveau trophique différent a permis d'élaborer différentes hypothèses quant aux facteurs majeurs influençant le développement de ces microorganismes dans les tourbières. Tout d'abord, la microtopographie et la diversité végétale sont apparues comme des facteurs majeurs de la répartition et de l'activité des communautés microbiennes, contrairement à la hauteur de la nappe d'eau généralement déterminante en tourbière. Puis, la chimie de l'eau (pH, conductivité, éléments majeurs) est apparue comme un facteur déterminant pour la répartition à la fois verticale et horizontale de ces microorganismes. Ainsi, les changements des conditions environnementales avec la profondeur et la distance de prélèvement (gradient « haut-bas » marais, oxygène, éléments nutritifs, présence de nourriture) entraînent un zonage prononcé, à la fois vertical et horizontal, des communautés microbiennes des tourbières. Par ailleurs et pour la première fois en, tourbières, des relations spécifiques et globales ont été enregistrées entre les polyphénols des sphaignes et les microorganismes (amibes à thèque, champignons, activités enzymatiques) associés à celles-ci. Des effets potentiels positifs et (ou) négatifs ont été montrés, soulignant l'importance écologique des composés phénoliques dans la dynamique et l'écologie des tourbières. Cependant, l'utilisation de la méthode de Folin-Ciocalteu n'a pas permis l'identification précise des composés phénoliques impliqués dans ces relations biologiques. Dans le but de compléter les résultats obtenus lors de ce travail de thèse, il conviendra d'identifier les variations qualitatives de polyphénols à la fois verticales et horizontales, afin de caractériser au mieux les composés phénoliques impliqués dans ces relations biologiques.

Il a également été présenté dans cette thèse la première étude du régime alimentaire des thécamoebiens associant l'observation de la vacuole digestive à des mesures d'isotopes ^{15}N et ^{13}C . Ces travaux ont démontré que le régime alimentaire des amibes à thèque pouvait varier en fonction des conditions écologiques (gradient de végétations, microtopographie), au travers des changements d'abondance des proies

disponibles. Les analyses isotopiques ont également suggéré que les amibes à thèque n'avaient pas toutes la même position trophique dans le réseau alimentaire microbien, résultant probablement des différentes stratégies alimentaires mises en évidence. Afin de compléter nos connaissances sur les relations trophiques au sein du réseau alimentaire microbien en tourbières, il serait intéressant de mesurer les valeurs isotopiques de chaque niveau trophique (microalgues, bactéries, ciliés, thécamoebiens, rotifères, nématodes, etc). Ce type de travaux améliorerait notre compréhension des transferts et des flux d'énergie au sein du réseau trophique microbien, et nous permettrait peut-être d'identifier des liens clés au sein de ce réseau. En effet, il serait judicieux dans de futures études d'axer les recherches sur les interactions entre les microorganismes : relations prédateurs-proies, taux d'ingestion, compétition entre espèces,... De même, il semble important dans de futures travaux portant sur les communautés microbiennes des sphagnes d'intégrer certains groupes microbiens parasites (ex. virus, chytrids), du fait de leur importance fonctionnelle (bactériolyse, lysogénie, transfert de gènes, régulation de la diversité des procaryotes) dans le contexte de la chaîne alimentaire en écologie microbienne et des cycles biogéochimiques associés (carbone, nutriments). Il est probable que, à l'instar des écosystèmes aquatiques et terrestres (Sime-Ngando & Colombet, 2009), le parasitisme soit un facteur important de la régulation de l'abondance des différentes espèces microbiennes associées aux sphagnes.

L'étude de l'impact d'une hausse de la température modérée en tourbières a montré que l'association « sphagnes – microorganismes » représentait un compartiment biologique clé dans la dynamique et le fonctionnement des tourbières dans un tel contexte. En effet, les polyphénols et les communautés microbiennes (amibes à thèque, activités enzymatiques oxydatives) ont été les premiers à répondre à la hausse des températures au fil des saisons, contrairement à la végétation et la chimie de l'eau. L'étude des variations saisonnières et annuelles des différents facteurs a montré que le réchauffement accentuait les variations temporelles déjà existantes, et parfois aggravait ces variations, telles que celles liées à la sécheresse. Ainsi, les travaux réalisés au cours de cette thèse montrent que les changements au sein des tourbières présentes en zones tempérées pourraient résulter en partie de changements au sein des communautés microbiennes, et de leur relations avec leur environnement proche. De ce fait, le niveau trophique de l'écosystème (« haut » *versus* « bas » marais) et le réchauffement climatique affectent directement et indirectement les communautés microbiennes par leurs effets sur les conditions générales de la tourbière. Ces effets se font ressentir à la fois au niveau des communautés et des populations, reflétant le potentiel bio-indicateur et bio-intégrateur de ce réseau microbien, adaptable à d'autre type de perturbations comme la pollution atmosphérique. L'utilisation répétée d'un tel système dans le cadre d'un suivi sur le long terme nécessiterait toutefois une simplification du dénombrement

des microorganismes et de l'interprétation des résultats obtenus. La modélisation des interactions entre les groupes microbiens, intégrant les différents paramètres étudiés dans cette thèse (niveau trophique, habitudes alimentaires, conditions environnementales, polyphénols) pourrait également constituer une autre approche pour étudier l'impact du réchauffement climatique, ou autre perturbation, sur la boucle microbienne, et donc du recyclage des nutriments et du carbone dans la sphagnosphère.

Par ailleurs, l'effet du réchauffement climatique sur le système biologique des tourbières n'a été abordé qu'au travers d'un seul facteur, la hausse des températures, même si indirectement l'impact sur l'humidité a été pris en compte. Le réchauffement climatique est induit par une multitude de facteurs, tels que la hausse des concentrations en CO₂, la hausse des températures, la sécheresse, ou encore une déposition atmosphérique en azote plus importante. Or, ces différents facteurs sont susceptibles d'interagir entre eux, et donc de conduire à des effets additifs voir antagonistes, comme cela a déjà été suggéré dans certains travaux (ex. Mattson *et al.*, 2005 ; Veteli *et al.*, 2007). Très peu d'études se sont focalisées sur ces interactions multiples, du fait de la complexité déjà existante à comprendre l'impact d'un seul type de facteur sur les compartiments biologiques. L'utilisation de microsystème, tel que celui constitué par la sphagnosphère, semble être une approche particulièrement pertinente pour aborder ce genre de problématique dans de futurs travaux.

Bibliographie

A

- Aerts R (2006) The freezer defrosting: global warming and litter decomposition rates in cold biomes. *J. Ecol* 94(4): 713-724.
- Aerts R, Cornelissen JHC, Dorrepaal E, van Logtestijn RSP, Callaghan TV (2004) Effects of experimentally imposed climate scenarios on flowering phenology and flower production of subarctic bog species. *Glob Change Biol* 10(9): 1599-1609.
- Alarcón-Gutiérrez E, Couchaud B, Augur C, Calvert V, Criquet S (2008) Effects of nitrogen availability on microbial activities, densities and functional diversities involved in the degradation of a Mediterranean evergreen oak litter (*Quercus ilex* L.). *Soil Biol Biochem* 40(7): 1654-1661.
- Alarcón-Gutiérrez E, Floch C, Augur C, Le Petit J, Ziarelli F, Criquet S (2009) Spatial variations of chemical composition, microbial functional diversity, and enzyme activities in a Mediterranean litter (*Quercus ilex* L.) profile. *Pedobiol* 52, 387-399.
- Anderson C, Cabana G (2005) delta N-15 in riverine food webs: effects of N inputs from agricultural watersheds. *Can J Fish Aquat Sci* 62: 333-340
- Anderson C, Cabana G (2009) Anthropogenic alterations of lotic food web structure: evidence from the use of nitrogen isotopes. *Oikos* 118: 1929-1939
- Andersson S, Schoning K (2010) Surface wetness and mire development during the late Holocene in central Sweden. *Boreas* 39: 749-760
- Andrus RE (1986) Some aspects of *Sphagnum* ecology. Some aspects of *Sphagnum* ecology. *Can J Bot* 64: 416-426
- Appel HM, Govenor HL, D'Ascenzo M, Siska E, Schultz JC (2001) Limitations of Folin assays of foliar phenolics in ecological studies. *J Chem Ecol* 27(4): 761-778.
- Artz REE, Anderson IC, Chapman SJ, Hagn A, Schloter M, Potts JM, Campbell CD (2007) Changes in fungal community composition in response to vegetational succession during the natural regeneration of cutover peatlands. *Microb Ecol* 54(3): 508:522.
- Asada T, Warner BG, Aravena R (2005) Nitrogen isotope signature variability in plant species from open peatland. *Aquat Bot* 82: 297-307

B

- Bailly G (2005) Suivi floristique de la tourbière vivante de Frasne. Internal report from the Regional Natural Reserve of Le Forbonnet peatland.
- Baldrian P (2006) Fungal laccases - occurrence and properties. *Fems Microbiol Review* 30(2): 215-242.
- Banerjee RD, Sen SP (1979) Antibiotic-activity of bryophytes. *Bryologist* 82(2): 141-153.
- Bardgett RD, Bowman WD, Kaufmann R, Schmidt SK (2005) A temporal approach to linking aboveground and belowground ecology. *TREE* 20(11): 634-641.
- Bardgett RD, Freeman C, Ostle NJ (2008) Microbial contributions to climate change through carbon cycle feedbacks. *Isme Journal* 2(8): 805-814.
- Berg MP, Kniese JP, Verhoef HA (1998) Dynamics and stratification of bacteria and fungi in the organic layers of a Scots pine forest soil. *Biol Fertil Soils* 26(4): 313-322.
- Beyens L, Ledeganck P, Graae BJ, Nijs I (2009) Are soil biota buffered against climatic extremes? An experimental test on testate amoebae in arctic tundra (Qeqertarsuaq, West Greenland). *Polar Biol* 32: 453-62
- Bialonska D, Zobel AM, Kuras M, Tykarska T, Sawicka-Kapusta K (2007) Phenolic compounds and cell structure in bilberry leaves affected by emissions from a Zn-Pb smelter. *Wat Air Soil Pol* 181(1-4): 123-133.
- Bobrov AA, Charman DJ, Warner BG (1999) Ecology of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) on peatlands in western Russia with special attention to niche separation in closely related taxa. *Protist* 150: 125-136
- Bojkova J, Schenkova J, Horsak M, Hajek M (2011) Species richness and composition patterns of clitellate (Annelida) assemblages in the treeless spring fens: the effect of water chemistry and substrate. *Hydrobiol* 667(1): 159-171.
- Bonnett SAF, Ostle N, Freeman C (2006) Seasonal variations in decomposition processes in a valley-bottom riparian peatland. *Sci Tot Environ* 370: 561-573.
- Booth RK (2001) Ecology of testate amoebae (Protozoa) in two lake superior coastal wetlands: Implications for paleoecology and environmental monitoring. *Wetlands* 21: 564-576
- Booth RK (2002) Testate amoebae as paleoindicators of surface-moisture changes on Michigan peatlands: modern ecology and hydrological calibration. *J. Paleolimnol* 28: 329-348
- Booth RK, Notaro M, Jackson ST, Kutzbach JE (2006) Widespread drought episodes in the western Great Lakes region during the past 2000 years: Geographic extent and potential mechanisms. *Earth Plan Sc Let* 242: 415-427
- Booth RK, Sullivan ME, Sousa VA (2008) Ecology of testate amoebae in a North Carolina pocosin and their potential use as environmental and paleoenvironmental indicators. *Ecoscience* 15: 277-289
- Borcard D, Gillet F, Legendre P (2011) Numerical Ecology with R. Use R! Series, Springer, New York NY, USA.X. ISBN: 978-1-4419-7975-9.
- Borsheim KY, Bratbak G (1987) Cell-volume to cell carbon conversion factors for a bacterivorous *Monas* sp enriched from sea water. *Mar Ecol* 36(2): 171-175.

- Bragazza L (2008) A climatic threshold triggers the die-off of peat mosses during an extreme heat wave. *Glob Change Biol* 14(11): 2688-2695.
- Bragazza L, Iacumin P, Siffi C, Gerdol R (2010) Seasonal variation in nitrogen isotopic composition of bog plant litter during 3 years of field decomposition. *Biol Fertil Soils* 46: 877-881
- Bragazza L, Limpens J, Gerdol R, Grosvernier P, Hajek M, Hajek T, Hajkova P, Hansen I, Iacumin P, Kutnar L, Rydin H, Tahvanainen T (2005) Nitrogen concentration and delta N-15 signature of ombrotrophic Sphagnum mosses at different N deposition levels in Europe. *Glob Change Biol* 11: 106-114
- Bratbak G (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Appl Env Microb* 49(6): 1488-1493.
- Brathen KA, Fodstad CH, Gallet C (2010) Ecosystem disturbance reduces the allelopathic effects of *Empetrum hermaphroditum* humus on tundra plants. *J. Veg Sci* 21(4): 786-795.
- Breeuwer A, Heijmans M, Gleichman M, Robroek BJM, Berendse F (2009) Response of *Sphagnum* species mixtures to increased temperature and nitrogen availability. *Plant Ecol* 204: 97-111
- Breeuwer A, Heijmans M, Robroek BJM, Berendse F (2008) The effect of temperature on growth and competition between *Sphagnum* species. *Oecologia* 156(1): 155-167.
- Bridgman SD, Updegraff K, Pastor J (1998) Carbon, nitrogen, and phosphorus mineralization in northern wetlands. *Ecology* 79(7): 2571-2571.
- Bridgman SD, Updegraff K, Pastor J (2001) A comparison of nutrient availability indices along an ombrotrophic-minerotrophic gradient in Minnesota wetlands. *Soil Sci Soc Am J* 65(1): 259-269.
- Bu Z, Hans J, Li H, Zheng X, Ma J, Zeng J (2011) The response of peatlands to climate warming: A review. *Acta Ecol Sin* 31 : 157-162.
- Buttler A (1992) Permanent plots in wet meadows and cutting experiment. *Vegetatio* 103: 113-124.
- Buttler A (2008) Rapport semestriel ANR Peatwarm (2/8).

C

- Cabana G, Rasmussen JB (1994) Modeling food-chain structure and contaminant bioaccumulation using stable nitrogen isotopes. *Nature* 372: 255-257.
- Carlson ML, Flagstad LA, Gillet F, Mitchell EAD (2010) Community development along a proglacial chronosequence: are above-ground and below-ground community structure controlled more by biotic than abiotic factors? *J. Ecol* 98(5): 1084-1095.
- Carrias JF, Amblard C, Bourdier G (1998) Seasonal dynamics and vertical distribution of planktonic ciliates and their relationship to microbial food resources in the oligomesotrophic Lake Pavin. *Archiv Fur Hydrobiol* 143(2): 227-255.
- Chacharonis P (1956) Observations on the ecology of protozoa associated with *Sphagnum*. *J Prot* 11.
- Charman D (2002) Peatlands and Environmental Change. In: John Wiley & Sons Ltd, Baffins Lane, Chichester, West Sussex PO19 1UD, England.

- Charman DJ (2001) Biostratigraphic and palaeoenvironmental applications of testate amoebae. *Quat Sc Rev* 20: 1753-1764
- Charman DJ, Blundell A, Chiverrell RC, Hendon D, Langdon PG (2006) Compilation of non-annually resolved Holocene proxy climate records: stacked Holocene peatland palaeo-water table reconstructions from northern Britain. *Quat Sc Rev* 25: 336-350
- Charman DJ, Blundell A, Members A (2007) A new European testate amoebae transfer function for palaeohydrological reconstruction on ombrotrophic peatlands. *J Quat Sc* 22: 209-221
- Charman DJ, Warner BG (1992) Relationship between Testate amoebae (Protozoa, Rhizopoda) and microenvironmental parameters on a forested peatland in Northeastern Ontario. *Can J Zool* 70: 2474-2482
- Chiapusio G, Gallet C, Dobremez F, Pellissier F (2005) Allelochemicals : tomorrow's herbicides ? In Biopesticides of plant origin. Intercept Ltd. Lavoisier Publ. Inc., Hampshire, UK. pp 149-155.
- Chiapusio G, Jassej VEJ, Hussain MI, Binet P (2011) Evidences of bryophyte chemical interactions: the case of *Sphagnum*. In Cheema ZA, Farooq M, Wahid A (eds), Allelopathy: Current trends and future applications. Springer (soumis).
- Chiapusio G, Sanchez AM, Reigosa MJ, Gonzalez L, Pellissier F (1997) Do germination indices adequately reflect allelochemical effects on the germination process? *J. Chem Ecol* 23(11): 2445-2453.
- Clymo RS (1973) Growth of *Sphagnum* - some effects of environment. *J Ecol* 61: 849-869
- Clymo RS, Hayward PM (1982) The ecology of *Sphagnum*. In: Bryophyte Ecology. AEJ Smith. Chapman & Hall, New York. pp. 229-289.
- Cornelissen JHC, van Bodegom PM, Aerts R, Callaghan TV, van Logtestijn RSP, Alatalo J, Chapin FS, Gerdol R, Gudmundsson J, Gwynn-Jones D, Hartley AE, Hik DS, Hofgaard A, Jonsdottir IS, Karlsson S, Klein JA, Laundre J, Magnusson B, Michelsen A, Molau U, Onipchenko VG, Quedstedt HM, Sandvik SM, Schmidt IK, Shaver GR, Solheim B, Soudzilovskaia NA, Stenstrom A, Tolvanen A, Totland O, Wada N, Welker JM, Zhao XQ, Team MOL (2007) Global negative vegetation feedback to climate warming responses of leaf litter decomposition rates in cold biomes. *Ecol Let* 10(7): 619-627.
- Coûteaux MM (1985) Relationships between testate amebas and fungi in humus microcosms. *Soil Biol Biochem* 17: 339-345.
- Coûteaux MM, Dévaux J (1983) Effect of the enrichment by fungi on the dynamic of testate community in humus. *Revue Ecol Biol Sol* 20: 519-545.
- Coûteaux MM, Ogden CG (1988) The growth of *Tracheleuglypha dentata* (Rhizopoda: Testacea) in clonal cultures under different trophic conditions. *Microb Ecol* 15: 81-93
- Coûteaux MM, Pussard M (1983) Nature du régime alimentaire des protozoaires du sol. New trends in Soil Biology. In Lebrun Ph, André HM, Demedts A, Wibo CG, Wauthy G (eds), Proceedings of the VIIIth. Int. colloquium of Soil Biology. Université catholique de Louvain, Louvain-la-Neuve (Belgium)
- Criquet S, Farnet AM, Tagger S, Le Petit J (2000a) Annual variations of phenoloxidase activities in an evergreen oak litter: influence of certain biotic and abiotic factors. *Soil Biol Biochem* 32(11-12): 1505-1513.
- Criquet S, Joner E, Leglise P, Leyval C (2000b) Anthracene and mycorrhiza affect the activity of oxidoreductases in the roots and the rhizosphere of lucerne (*Medicago sativa* L.). *Biotech Let*

22(21): 1733-1737.

Criquet S, Joner EJ, Leyval C (2001) 2,7-Diaminofluorene is a sensitive substrate for detection and characterization of plant root peroxidase activities. *Plant Sci* 161(6): 1063-1066.

Criquet S, Tagger S, Vogt G, Iacazio G, Le Petit J (1999) Laccase activity of forest litter. *Soil Biol Biochem* 31(9): 1239-1244.

Czapeck F 1899. Zur chemie der Zellmembranen bei den Laub-, und Lebermoosen. *Flora* 1: 361-381.

D

Dabros A, Fyles JW (2010) Effects of open-top chambers and substrate type on biogeochemical processes at disturbed boreal forest sites in northwestern Quebec. *Plant and Soil* 327(1-2): 465-479.

Dabros A, Fyles JW, Strachan IB. 2010. Effects of open-top chambers on physical properties of air and soil at post-disturbance sites in northwestern Quebec. *Plant and Soil* 333(1-2): 203-218.

Danevcic T, Mandic-Mulec I, Stres B, Stopar D, Hacin J (2010) Emissions of CO₂, CH₄ and N₂O from Southern European peatlands. *Soil Biol Biochem* 42(9): 1437-1446.

Davidson EA, Janssens IA (2006) Temperature sensitivity of soil carbon decomposition and feedbacks to climate change. *Nature* 440(7081): 165-173.

Dawley RM, Flurkey WH (1993) Differentiation of tyrosinase and laccase using 4-hexyl-resorcinol, a tyrosinase inhibitor. *Phytochem* 33(2): 281-284.

De Deyn GB, Cornelissen JHC, Bardgett RD (2008) Plant functional traits and soil carbon sequestration in contrasting biomes. *Ecol Lett* 11(5): 516-531.

Decker KLM, Wang D, Waite C, Scherbatskoy T (2003) Snow removal and ambient air temperature effects of forest soil temperatures in northern Vermont. *Soil Sci Soc Am J* 67(5): 1629-1629.

Delarue F, Laggoun-Défarge F, Buttler A, Gogo S, Jassey VEJ, Disnar J-R (2011b) Effects of short-term ecosystem experimental warming on water-extractable organic matter in an ombrotrophic *Sphagnum* peatland (Le Forbonnet, France). (*In press*).

Delarue F, Laggoun-Défarge F, Disnar JR, Lottier N, Gogo S (2011a) Organic matter sources and decay assessment in a *Sphagnum*-dominated peatland (Le Forbonnet, Jura Mountains, France): impact of moisture conditions. *Biogeochem*. (*In press*).

Dijkstra P, Ishizu A, Doucett R, Hart SC, Schwartz E, Menyailo OV, Hungate BA (2006) C-13 and N-15 natural abundance of the soil microbial biomass. *Soil Biol Biochem* 38: 3257-3266.

Dise NB (2009) Peatland Response to Global Change. *Science* 326(5954): 810-811.

Dixon RA, Paiva NL (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* 7(7): 1085-1097.

Djurdjevic L, Dinic A, Mitrovic M, Pavlovic P, Tesevic V (2003) Phenolic acids distribution in a peat of the relict community with Serbian spruce in the Tara Mt. forest reserve (Serbia). *Eur J Soil Biol* 39: 97-103

Dorrepaal E, Aerts R, Cornelissen JHC, Callaghan TV, van Logtestijn RSP (2004) Summer warming and increased winter snow cover affect *Sphagnum fuscum* growth, structure and production in a

sub-arctic bog. *Glob Change Biol* 10(1): 93-104.

Dorrepaal E, Toet S, van Logtestijn RSP, Swart E, van de Weg MJ, Callaghan TV, Aerts R (2009) Carbon respiration from subsurface peat accelerated by climate warming in the subarctic. *Nature* 460(7255): 616-U679.

du Chatelet EA, Guillot F, Recourt P, Ventalon S, Tribouvillard N (2010) Influence of sediment grain size and mineralogy on testate amoebae test construction. *Comptes Rendus Geoscience* 342(9): 710-717.

Duran N, Esposito E (2000) Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. *App Catal B-Environ* 28(2): 83-99.

E - F

Ellis T, Hill PW, Fenner N, Williams GG, Godbold D, Freeman C (2009) The interactive effects of elevated carbon dioxide and water table draw-down on carbon cycling in a Welsh ombrotrophic bog. *Ecol Eng* 35(6): 978-986.

Escofier B, Pages J (1994) Multiple factor-analysis (afmult package). *Comp Stat Dat Anal* 18: 121-140

Farnet AM, Gil G, Ferre E. 2008. Effects of pollutants on laccase activities of *Marasmius quercophilus*, a white-rot fungus isolated from a Mediterranean sclerophyllous litter. *Chemosphere* 70(5): 895-900.

Faucompré E (2003) Comportement dendro-écologique des pins des tourbières et impacts de l'homme dans la tourbière vivante du Forbonnet. Mémoire de DEA, Université de Franche-Comté.

Fenner N, Freeman C, Reynolds B (2005) Hydrological effects on the diversity of phenolic degrading bacteria in a peatland: implications for carbon cycling. *Soil Biol Biochem* 37(7): 1277-1287.

Fenner N, Ostle NJ, McNamara N, Sparks T, Harmens H, Reynolds B, Freeman C (2007) Elevated CO₂ effects on peatland plant community carbon dynamics and DOC production. *Ecosystems* 10(4): 635-647.

Fisher MM, Graham JM, Graham LE (1998) Bacterial abundance and activity across sites within two northern Wisconsin *Sphagnum* bogs. *Microb Ecol* 36 : 259-269.

Floch C, Alarcon-Gutierrez E, Criquet S (2007) ABTS assay of phenol oxidase activity in soil. *J. Microb Methods* 71(3): 319-324.

Francez AJ (2000) La dynamique du carbone dans les tourbières à *Sphagnum*, de la sphaigne à l'effet de serre. *Ann Biol* 39:205-270

Francez AJ, Loiseau P (1999) The fate of mineral nitrogen in a fen with *Sphagnum fallax* klinggr. and *Carex rostrata* stokes (Massif-central, France). *Can J Bot* 77: 1136-1143

Freeman C, Evans CD, Monteith DT, Reynolds B, Fenner N (2001a) Export of organic carbon from peat soils. *Nature* 412(6849): 785-785.

Freeman C, Lock MA, Reynolds B (1993) Fluxes of CO₂, CH₄ and N₂O from a welsh peatland following simulation of water-table draw-down - potential feedback to climatic-change. *Biogeochem* 19(1): 51-60.

Freeman C, Ostle N, Kang H (2001b) An enzymic 'latch' on a global carbon store - A shortage of oxygen locks up carbon in peatlands by restraining a single enzyme. *Nature* 409: 149-149

Freeman C, Ostle NJ, Fenner N, Kang H (2004) A regulatory role for phenol oxidase during decomposition in peatlands. *Soil Biol Biochem* 36(10): 1663-1667.

G

Galis I, Kakiuchi Y, Simek P, Wabiko H (2004) *Agrobacterium tumefaciens* AK-6b gene modulates phenolic compound metabolism in tobacco. *Phytochem* 65(2): 169-179.

Gallet C, Keller C (1999) Phenolic composition of soil solutions: comparative study of lysimeter and centrifuge waters. *Soil Biol Biochem* 31(8): 1151-1160.

Gallet C, Lebreton P (1995) Evolution of phenolic patterns in plants and associated litters and humus of a mountain forest ecosystem. *Soil Biol Biochem* 27: 157-165

Gaucel S (2005) Analyses mathématiques et simulations d'un modèle prédateur-proie en milieu insulaire hétérogène. PhD thesis, Laboratoire de mathématiques appliquées de Bordeaux, Université de Bordeaux I

Gilbert D (1998) Les communautés microbiennes à la surface des tourbières à sphaignes: structure, fonctionnement et impact des apports de fertilisants. PhD thesis Laboratoire de Biologie Comparée des Protistes. Université Blaise Pascal (Clermont 1).

Gilbert D, Amblard C, Bourdier G, Francez A-J, Mitchell EAD (2000) Le régime alimentaire des thécamoebiens (Protista, Sarcodina). *Ann Biol* 3: 57-68

Gilbert D, Amblard C, Bourdier G, Francez AJ (1998) The microbial loop at the surface of a peatland: Structure, function, and impact of nutrient input. *Microb Ecol* 35: 83-93.

Gilbert D, Mitchell EAD (2006) Microbial diversity in *Sphagnum* peatlands. In : Martini IP, Martinez Cortizas A, Chesworth W (eds) Peatlands : basin evolution and depository of records on global environmental and climatic changes. pp 287-318

Gilbert D, Mitchell EAD, Amblard C, Bourdier G, Francez AJ (2003) Population dynamics and food preferences of the testate amoeba *Nebela tinctoria* major-bohemica-collaris complex (Protozoa) in a *Sphagnum* peatland. *Acta Protozoo* 42: 99-104

Gillet F, Peter M, Ayer F, Butler R, Egli S (2010) Long-term dynamics of aboveground fungal communities in a subalpine Norway spruce forest under elevated nitrogen input. *Oecologia* 164(2): 499-510.

Glucksman E, Bell T, Griffiths RI, Bass D (2010) Closely related protist strains have different grazing impacts on natural bacterial communities. *Environ Microb* 12(12): 3105-3113.

Gobat J-M, Aragno M, Matthey W 2010. Le sol vivant. 820p.

Gorham E (1991) Northern peatlands: role in the carbon cycle and probable responses to climatic warming. *Ecol App* 1(2): 181-195.

Groffman PM, Driscoll CT, Fahey TJ, Hardy JP, Fitzhugh RD, Tierney GL (2001) Colder soils in a warmer world: A snow manipulation study in a northern hardwood forest ecosystem. *Biogeochem* 56(2):

135-150.

Grosvernier P (2005) Expertise hydrogéologique de la tourbière du Forbonnet (Commune de Frasne). Rapport interne (Communauté de Communes du Plateau de Frasne - Val du Drugeon; Conseil Régional de Franche-Comté; Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse.

Gunnarsson U (2005) Global patterns of Sphagnum productivity. *J. Bryol* 27: 269-279.

H

Hajek T, Beckett RP (2008) Effect of water content components on desiccation and recovery in *Sphagnum* mosses. *Ann Bot* 101: 165-173

Hajkova P, Bojkova J, Frankova M, Opravilova V, Hajek M, Kintrova K, Horsak M (2011) Disentangling the effects of water chemistry and substratum structure on moss-dwelling unicellular and multicellular micro-organisms in spring-fens. *J. Limnol* 70: 54-64.

Hajkova P, Hajek M (2004) Bryophyte and vascular plant responses to base-richness and water level gradients in Western Carpathian Sphagnum-rich mires. *Folia Geobot* 39: 335-351

Han B-P, Wang T, Lin Q-Q, Dumont HJ (2008) Carnivory and active hunting by the planktonic testate amoebae *Diffugia tuberspinifera*. *Hydrobiol* 596: 197-201.

Hättenschwiler S, Vitousek PM (2000) The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *TREE* 15: 238-243

Hayward PM, Clymo RS (1983) The growth of Sphagnum: Experiments on, and stimulation of, some effects of light flux and water-table depth. *J. Ecol* 71: 845-863

Heal OW (1961) The Distribution of Testate Amoebae (Rhizopoda: Testacea) in Some Fens and Bogs in Northern England. *Zoo J Lin Soc* 44: 369-382

Heal OW (1962) Abundance and microdistribution of testate amoebae (Protozoa: Rhizopoda) in *Sphagnum*. *Oikos* 13: 35-47

Heal OW (1964) Observations on the seasonal and spatial-distribution of Testacea (Protozoa, Rhizopoda) in *Sphagnum*. *J Anim Ecol* 33: 395-412

Heger TJ, Mitchell EAD, Ledeganck P, Vincke S, Van de Vijver B, Beyens L (2009) The curse of taxonomic uncertainty in biogeographical studies of free-living terrestrial protists: a case study of testate amoebae from Amsterdam Island. *J. Biogeo* 36(8): 1551-1560.

Heger TJ, Pawlowski J, Lara E, Leander BS, Todorov M, Golemansky V, Mitchell EAD (2011) Comparing Potential COI and SSU rDNA Barcodes for Assessing the Diversity and Phylogenetic Relationships of Cyphoderiid Testate Amoebae (Rhizaria: Euglyphida). *Protist* 162(1): 131-141.

Heijmans M, Klees H, Berendse F (2002) Competition between *Sphagnum magellanicum* and *Eriophorum angustifolium* as affected by raised CO₂ and increased N deposition. *Oikos* 97(3): 415-425.

Heimann M, Reichstein M (2008) Terrestrial ecosystem carbon dynamics and climate feedbacks. *Nature* 451(7176): 289-292.

- Hermes DA, Mattson WJ (1992) The dilemma of plants - to grow or defend. *Quart Rev Biol* 67(3): 283-335.
- Hobbie EA, Colpaert JV (2004) Nitrogen availability and mycorrhizal colonization influence water use efficiency and carbon isotope patterns in *Pinus sylvestris*. *New Phytol* 164: 515-525
- Hooper CA (1981) Microcommunities of algae on a *Sphagnum* mat. *Holarctic Ecol* 4(3): 201-07.
- Howell ET, South GR (1981) Population dynamics of Tetmemorus (Chlorophyta, Desmidiaceae) in relation to a minerotrophic gradient on a Newfoundland fen. *Brit Phycol J* 16(3): 297-312.
- Husson F, Josse J, Lê S, Mazet J (2009) FactoMineR: Factor Analysis and Data Mining with R. R package, version 1.12 <http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR>, City
- Hyodo F, Kohzu A, Tayasu I (2010) Linking aboveground and belowground food webs through carbon and nitrogen stable isotope analyses. *Ecol Research* 25: 745-756

I - J

- Ibanez S, Dötterl S, Anstett MC, Baudino S, Caissard JC, Gallet C, Després L (2010) The role of volatile organic compounds emitted by globe-flowers in the attraction of their specific pollinating flies. *New Phytol* 188:451-463.
- Iken K, Brey T, Wand U, Voigt J, Junghans P (2001) Food web structure of the benthic community at the Porcupine Abyssal Plain (NE Atlantic) : A stable isotopic analysis. *Progr Oceanogr* 50 : 383-405.
- Inderjit (1996) Plant phenolics in allelopathy. *Bot Rev* 62(2): 186-202.
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Gilbert D, Buttler A, Toussaint ML, Binet P (2011c) Experimental climate effect on seasonal variability of polyphenol/phenoloxidase interplay along a narrow fen-bog ecological gradient in *Sphagnum fallax*. *Glob Change Biol* 17(9): 2945-2957.
- Jassey VEJ, Chiapusio G, Mitchell EAD, Binet P, Toussaint ML, Gilbert D (2011a) Fine-scale horizontal and vertical micro-distribution patterns of testate amoebae along a narrow fen/bog gradient. *Microb Ecol* 61: 374-385
- Jassey VEJ, Gilbert D, Binet P, Toussaint M-L, Chiapusio G (2011b) Effect of a temperature gradient on *Sphagnum fallax* and its associated microbial communities: a study under controlled conditions. *Can J Microbiol* 57: 226-235
- Jassey VEJ, Shimano S, Dupuy C, Toussaint ML, Gilbert D (2011d) Characterizing the feeding habit of the testate amoebae *Hyalosphenia papilio* and *Nebela tinctoria* using vacuole digestive content and ¹³C and ¹⁵N isotopic analyses. *Protist (In press)*.
- Jimenez-Mercado A, Cajal-Medrano R, Maske H (2007) Marine heterotrophic bacteria in continuous culture, the bacterial carbon growth efficiency, and mineralization at excess substrate and different temperatures. *Microb Ecol* 54(1): 56-64.
- Josse J, Pages J, Husson F (2008) Testing the significance of the RV coefficient. *Comp Stat Data Anal* 53: 82-91

K - L

- Kaiser C, Koranda M, Kitzler B, Fuchslueger L, Schnecker J, Schweiger P, Rasche F, Zechmeister-Boltenstern S, Sessitch A, Richter A (2010) Belowground carbon allocation by trees drives seasonal patterns of extracellular enzyme activities by altering microbial community composition in a beech forest soil. *New Phytol* 187: 843-858.
- Katase T (1981) The different forms in which para-hydroxybenzoic, vanillic, and ferulic acids exist in a peat soil. *Soil Science* 132(6): 436-443.
- Katase T. 1983. The presence of cis-4-hydroxycinnamic acid in peat soils. *Soil Science* 135(5): 296-300.
- Keuper F, Dorrepaal E, Van Bodegom PM, Aerts R, Van Logtestijn RSP, Callaghan TV, Cornelissen JHC (2011) A Race for Space? How Sphagnum fuscum stabilizes vegetation composition during long-term climate manipulations. *Glob Change Biol* 17(6): 2162-2171.
- Kohzu A, Iwata T, Kato M, Nishikawa J, Wada E, Amartuvshin N, Namkhaidorj B, Fujita N (2009a) Food webs in Mongolian grasslands: The analysis of C-13 and N-15 natural abundances. *Isot Environ Health Stud* 45: 208-219
- Kohzu A, Tayasu I, Yoshimizu C, Maruyama A, Kohmatsu Y, Hyodo F, Onoda Y, Igeta A, Matsui K, Nakano T, Wada E, Nagata T, Takemon Y (2009b) Nitrogen-stable isotopic signatures of basal food items, primary consumers and omnivores in rivers with different levels of human impact. *Ecol Research* 24: 127-136
- Laiho R (2006) Decomposition in peatlands: Reconciling seemingly contrasting results on the impacts of lowered water levels. *Soil Biol Biochem* 38(8): 2011-2024.
- Lamentowicz M, Lamentowicz L, van der Knaap WO, Gabka M, Mitchell EAD (2010a) Contrasting Species-Environment Relationships in Communities of Testate Amoebae, Bryophytes and Vascular Plants Along the Fen-Bog Gradient. *Microbial Ecology* 59(3): 499-510.
- Lamentowicz M, Mitchell EAD (2007) Testate amoebae as ecological and palaeohydrological indicators in peatlands - The Polish experience. In: Okruszko, T, Maltby, E, Szatyłowicz, J, Swiatek, D, Kotowski, W (eds.) *Wetlands: Monitoring, Modelling and Management*, pp. 85-90
- Lamentowicz M, Van der Knaap W, Lamentowicz L, Van Leeuwen JFN, Mitchell EAD, Goslar T, Kamenik C (2010b) A near-annual palaeohydrological study based on testate amoebae from a sub-alpine mire: surface wetness and the role of climate during the instrumental period. *J Quat Sc* 25: 190-202
- Lang SI, Cornelissen JHC, Holzer A, ter Braak CJF, Ahrens M, Callaghan TV, Aerts R. 2009. Determinants of cryptogam composition and diversity in Sphagnum-dominated peatlands: the importance of temporal, spatial and functional scales. *J. Ecol* 97(2): 299-310.
- Lara E, Heger TJ, Scheihing R, Mitchell EAD (2011a) COI gene and ecological data suggest size-dependent high dispersal and low intra-specific diversity in free-living terrestrial protists (Euglyphida: Assulina). *J. Biogeo* 38(4): 640-650.
- Lara E, Mitchell EAD, Moreira D, Garcia PL (2011b) Highly Diverse and Seasonally Dynamic Protist Community in a Pristine Peat Bog. *Protist* 162(1): 14-32.
- Larcher W 2003. *Physiological plant ecology*, 4th edition. In: Berlin, Springer. 513p
- Lashof DA, DeAngelo BJ, Saleska SR, Harte J (1997) Terrestrial ecosystem feedbacks to global climate

- change. *An Rev Energy Environ* 22: 75-118.
- Lavoie I, Dillon PJ, Campeau S (2009) The effect of excluding diatom taxa and reducing taxonomic resolution on multivariate analyses and stream bioassessment. *Ecol Ind* 9: 213-225
- Ledeganck P, Nijs I, Beyens L (2003) Plant functional group diversity promotes soil protist diversity. *Protist* 154(2): 239-249.
- Legendre P, Gallagher ED (2001) Ecologically meaningful transformations for ordination of species data. *Oecologia* 129: 271-280
- Legendre P, Legendre L (1998) *Numerical Ecology* 2nd Edition.
- Leitner M, Boland W, Mithofer A (2005) Direct and indirect defences induced by piercing-sucking and chewing herbivores in *Medicago truncatula*. *New Phytol* 167(2): 597-606.
- Leonowicz A, Cho NS, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, Hofrichter M, Wesenberg D, Rogalski J. 2001. Fungal laccase: properties and activity on lignin. *J. Basic Microb* 41(3-4): 185-227.
- Limpens J, Berendse F, Blodau C, Canadell JG, Freeman C, Holden J, Roulet N, Rydin H, Schaepman-Strub G (2008) Peatlands and the carbon cycle: from local processes to global implications - a synthesis. *Biogeosciences* 5(5): 1475-1491.
- Lindahl BD, Ihrmark K, Boberg J, Trumbore SE, Hogberg P, Stenlid J, Finlay RD (2007) Spatial separation of litter decomposition and mycorrhizal nitrogen uptake in a boreal forest. *New Phytol* 173: 611-620
- Lindo Z, Gonzalez A (2010) The Bryosphere: An Integral and Influential Component of the Earth's Biosphere. *Ecosystems* 13(4): 612-627.
- Loader NJ, McCarroll D, Van der Knaap WO, Robertson I, Gagen M (2007) Characterizing carbon isotopic variability in *Sphagnum*. *Holocene* 17: 403-410

M

- Macheix, J-J., Fleuriet, A. and Jay-Allemand, C (2005) Les composés phénoliques des végétaux. Un exemple de métabolites secondaires d'importance économique. *Edited by Presses Internationales Polytechnique, Montréal, Que., Can.*
- Mack MC, Bret-Harte MS, Hollingsworth TN, Jandt RR, Schuur EAG, Shaver GR, Verbyla DL (2011) Carbon loss from an unprecedented Arctic tundra wildfire. *Nature* 475(7357): 489-492.
- Magnon G, Terraz L (2002) Documents d'objectifs Natura 2000 - Bassin du Dugeon. Syndicat mixte de la vallée du Dugeon et du plateau de Frasne.
- Manneville O, Vergne V, Villepoux O, Groupe Relais Tourbières (1999) Le monde des tourbières et des marais, France, Suisse, Belgique et Luxembourg. In: Delachaux & Nestlé S.A. - Paris, Lausanne. 320p.
- Marion GM, Henry GHR, Freckman DW, Johnstone J, Jones G, Jones MH, Levesque E, Molau U, Molgaard P, Parsons AN, Svoboda J, Virginia RA (1997) Open-top designs for manipulating field temperature in high-latitude ecosystems. *Glob Change Biol* 3: 20-32.

- Markel ER, Booth RK, Qin YM (2010) Testate amoebae and delta C-13 of *Sphagnum* as surface-moisture proxies in Alaskan peatlands. *Holocene* 20: 463-475
- Mason HS (1948) The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol Chem* 172: 83-99.
- Mattson WJ, Julkunen-Tiitto R, Herms DA (2005) CO₂ enrichment and carbon partitioning to phenolics: do plant responses accord better with the protein competition or the growth differentiation balance models? *Oikos* 111(2): 337-347.
- Mayor JR, Schuur EAG, Henkel TW (2009) Elucidating the nutritional dynamics of fungi using stable isotopes. *Ecol Lett* 12: 171-183
- Mazei YA, Tsyganov AN, Bubnova OA (2007) Structure of a community of testate amoebae in a *Sphagnum* dominated bog in upper sura flow (Middle Volga Territory). *Biol Bul* 34: 382-394
- McNeil P, Waddington JM (2003) Moisture controls on *Sphagnum* growth and CO₂ exchange on a cutover bog. *J. Appl Ecol* 40(2): 354-367.
- Meehl GA, Tebaldi C (2004) More intense, more frequent, and longer lasting heat waves in the 21st century. *Science* 305(5686): 994-997.
- Meisterfeld R (1977) Horizontal and Vertical distribution of Testacea (Rhizopoda-Testacea) in *Sphagnum*. *Archiv Hydrobiol* 79: 319-356
- Meisterfeld R (2000a) Order Arcellinidae, Kent, 1880. In Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds) The illustrated guide to the protozoa. In: Society of Protozoologists, Lawrence. pp 827-860.
- Meisterfeld R (2000b) Testate amoebae with filopodia. In : Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds) The illustrated guide to the protozoa. In: Society of Protozoologists, Lawrence. pp 1054-1084.
- Meisterfeld R, Mitchell EAD (2008) The Tree of Life Web Project <http://tolweb.org>
- Melillo JM, Steudler PA, Aber JD, Newkirk K, Lux H, Bowles FP, Catricala C, Magill A, Ahrens T, Morrisseau S (2002) Soil warming and carbon-cycle feedbacks to the climate system. *Science* 298(5601): 2173-2176.
- Mellegard H, Stalheim T, Hormazabal V, Granum PE, Hardy SP (2009) Antibacterial activity of sphagnum acid and other phenolic compounds found in *Sphagnum papillosum* against food-borne bacteria. *Let Appl Microb* 49: 85-90
- Meyer C (2010) Utilisation des communautés microbiennes de bryophytes comme bioindicateur et biointégrateur de différent types de polluants atmospheriques. Thèse - Université de Franche-Comté. 211p.
- Meyer C, Bernard N, Moskura M, Toussaint ML, Denayer F, Gilbert D (2010) Effects of urban particulate deposition on microbial communities living in bryophytes: An experimental study. *Ecotox Environ Safe* 73(7): 1776-1784.
- Meyer C, Gilbert D, Gaudry A, Franchi M, Nguyen-Viet H, Fabure J, Bernard N (2010) Relationship of Atmospheric Pollution Characterized by Gas (NO₂) and Particles (PM₁₀) to Microbial Communities Living in Bryophytes at Three Differently Polluted Sites (Rural, Urban, and Industrial). *Microb Ecol* 59(2): 324-334.
- Michel P, Burritt DJ, Lee WG (2011) Bryophytes display allelopathic interactions with tree species in native forest ecosystems. *Oikos* 120: 1272 - 1280.
- Mieczan T (2007a) Epiphytic protozoa (testate amoebae and ciliates) associated with *Sphagnum* in peatbogs: Relationship to chemical parameters. *Polish J Ecol* 55: 79-90

- Mieczan T (2007b) Seasonal patterns of testate amoebae and ciliates in three peatbogs: relationship to bacteria and flagellates (Poleski National Park, Eastern Poland). *Ecohyd Hydrobiol* 7: 296-305
- Mieczan T (2009a) Ciliates in *Sphagnum* peatlands: vertical micro-distribution, and relationships of species assemblages with environmental parameters. *Zool Stud* 48: 33-48
- Mieczan T (2009b) Ecology of testate amoebae (Protists) in *Sphagnum* peatlands of eastern Poland: Vertical micro-distribution and species assemblages in relation to environmental parameters. *J Limnol* 45: 41-49
- Mieczan T (2010) Effect of vegetation patchiness and site factors on distribution of testate amoebae and ciliates in peatbogs. *Polish J Ecol* 58: 135-144
- Mitchell EAD, Borcard D, Buttler AJ, Grosvernier P, Gilbert D, Gobat JM (2000a) Horizontal distribution patterns of testate amoebae (Protozoa) in a *Sphagnum magellanicum* carpet. *Microb Ecol* 39: 290-300
- Mitchell EAD, Buttler A, Grosvernier P, Rydin H, Albinsson C, Greenup AL, Heijmans M, Hoosbeek MR, Saarinen T (2000b) Relationships among testate amoebae (Protozoa), vegetation and water chemistry in five *Sphagnum*-dominated peatlands in Europe. *New Phytol* 145: 95-106
- Mitchell EAD, Buttler AJ, Warner BG, Gobat JM (1999) Ecology of testate amoebae (Protozoa : Rhizopoda) in *Sphagnum* peatlands in the Jura mountains, Switzerland and France. *Ecoscience* 6: 565-576
- Mitchell EAD, Charman DJ, Warner BG (2008) Testate amoebae analysis in ecological and paleoecological studies of wetlands: past, present and future. *Biodiv Conserv* 17: 2115-2137
- Mitchell EAD, Gilbert D (2004) Vertical micro-distribution and response to nitrogen deposition of testate amoebae in *Sphagnum*. *J Euk Microb* 51: 480-490
- Mitchell EAD, Gilbert D, Buttler A, Amblard C, Grosvernier P, Gobat JM (2003) Structure of microbial communities in *Sphagnum* peatlands and effect of atmospheric carbon dioxide enrichment. *Microb Ecol* 46: 187-199
- Moore PD (2002) The future of cool temperate bogs. *Environ Conserv* 29(1): 3-20.

N - O

- Nguyen-Viet H, Bernard N, Mitchell EAD, Badot PM, Gilbert D (2008) Effect of lead pollution on testate amoebae communities living in *Sphagnum fallax*: An experimental study. *Ecotoxi Env Safe* 69: 130-138
- Nguyen-Viet H, Gilbert D, Bernard N, Mitchell EAD, Badot PM (2004) Relationship between atmospheric pollution characterized by NO₂ concentrations and testate amoebae density and diversity. *Acta Protozool* 43(3): 233-239.
- Nguyen-Viet H, Gilbert D, Mitchell EAD, Badot PM, Bernard N (2007) Effects of experimental lead pollution on the microbial communities associated with *Sphagnum fallax* (Bryophyta). *Microb Ecol* 54(2): 232-241.
- Nimz HH, Tutschek R (1977) C-13 nmr-spectra of lignins .7. on question of lignin content of mosses (*Sphagnum magellanicum* BRID). *Holzforschung* 31(4): 101-106.
- Ogden CG (1984) Shell structure of some testate amoebas from Britain (Protozoa, Rhizopoda). *J Nat*

Hist 18: 341-361

- Ogden CG, Coûteaux MM (1988) The effect of predation on the morphology of *Tracheleuglypha Dentata* (Protozoa, Rhizopoda). *Arch Protistenkd* 136: 107-115
- Ogden CG, Coûteaux MM (1989) Interstitial marine rhizopods (Protozoa) from littoral sands on the east coast of England. *Eur J Protistol* 24: 281-290
- Ogden CG, Hedley RH (1980) An Atlas of freshwater Testate amoebae. Oxford: Oxford University Press
- Ogden CG, Pitta P (1990) Biology and ultrastructure of the mycophagous, soil testate ameba, *Phryganella acropodia* (Rhizopoda, Protozoa). *Biol Fertil Soils* 9: 101-109
- Oksanen J, Blanchet G, Kindt R, Legendre P, O'Hara RG, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H (2010) vegan: Community Ecology Package. R package version 1.17-1. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Opelt K, Chobot V, Hadacek F, Schonmann S, Eberl L, Berg G (2007) Investigations of the structure and function of bacterial communities associated with *Sphagnum* mosses. *Environ Microb* 9(11): 2795-2809.
- Opravilova V, Hajek M (2006) The variation of testacean assemblages (Rhizopoda) along the complete base-richness gradient in fens: A case study from the Western Carpathians. *Acta Protozoo* 45: 191-204

P - R

- Payette S, Rocheford L (2001) *Écologie des tourbières du Québec-Labrador*. Les presses de l'Université Laval. 621p.
- Peres-Neto PR, Legendre P, Dray S, Borcard D (2006) Variation partitioning of species data matrices: Estimation and comparison of fractions. *Ecology* 87: 2614-2625
- Perucci P, Casucci C, Dumontet S. 2000. An improved method to evaluate the o-diphenol oxidase activity of soil. *Soil Biol Biochem* 32(13): 1927-1933.
- Petchey OL, Beckerman AP, Riede JO, Warren PH (2008) Size, foraging and food web structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 4191-4196
- Petchey OL, McPhearson PT, Casey TM, Morin PJ (1999) Environmental warming alters food-web structure and ecosystem function. *Nature* 402(6757): 69-72.
- Pind A, Freeman C, Lock MA (1994) Enzymatic degradation of phenolic materials in peatlands- measurement of phenol oxidase activity. *Plant and Soil* 159(2): 227-231.
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Ocean* 25(5): 943-48.
- Porter SM, Knoll AH (2000) Testate amoebae in the Neoproterozoic Era: Evidence from vase- shaped microfossils in the Chuar Group, Grand Canyon. *Paleobiol* 26 : 360-385.
- Post DM (2002) The long and short of food-chain length. *TREE* 17: 269-277.
- Price GD, McKenzie JE, Pilcher JR, Hoper ST (1997) Carbon-isotope variation in *Sphagnum* from hummock-hollow complexes: Implications for Holocene climate reconstruction. *Holocene* 7:

229-233

- R Development Core Team (2010) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, <http://CRAN.R-project.org>
- Rasmussen S, Peters G, Rudolph H (1995a) Regulation of phenylpropanoid metabolism by exogenous precursors in axenic cultures of *Sphagnum fallax*. *Physiol Planta* 95(1): 83-90.
- Rasmussen S, Wolff C, Rudolph H (1995b) Compartmentalization of phenolic constituents in *Sphagnum*. *Phytochem* 38(1): 35-39.
- Rasmussen S, Wolff C, Rudolph H (1996) 4'-O-B-d-glucosyl -cis-p-coumaric acid - a natural constituent of *Sphagnum fallax* cultivated in bioreactors. *Phytochem* 42(1) : 81-87.
- Read DJ, Leake JR, Perez-Moreno J. 2005. Mycorrhizal fungi as drivers of ecosystem processes in heathland and boreal forest biomes (vol 82, pg 1243, 20074). *Can J Bot* 83(8): 1073-1073.
- Robert P, Escoufier Y (1976) Unifying tool for linear multivariate statistical-methods - rv-coefficient. *J Royal Stat Soc Series C-Applied Statistics* 25: 257-265
- Rudolph H, Samland J (1985) Occurrence and metabolism of sphagnum acid in the cell-wall of Bryophytes. *Phytochem* 24(4): 745-749.
- Rydin H, Jeglum JK (2006) The Biology of peatlands. In: The Biology of peatlands, Oxford University Press, pp. 354
- Rydin H. 1997. Competition between Sphagnum species under controlled conditions. *Bryologist* 100(3): 302-307.

S

- Schar C, Vidale PL, Luthi D, Frei C, Haberli C, Liniger MA, Appenzeller C (2004) The role of increasing temperature variability in European summer heatwaves. *Nature* 427(6972): 332-336.
- Schmitz OJ. 2006. Predators have large effects on ecosystem properties by changing plant diversity, not plant biomass. *Ecology* 87(6): 1432-1437.
- Schönborn W (1963) Die Stratigraphie lebender Testaceen im *Sphagnetum* der Hochmoore. *Limnol* 1: 315-321
- Schönborn W (1965) Untersuchungen über die Zoochlorellen-Symbiose der Hochmoor-Testaceen. *Limnol* 3: 173-176
- Schönborn W (1982) Estimates of annual production of Testacea (Protozoa) in mull and moder (II). *Pedobiol* 23: 383-393
- Schönborn W (1986) Population dynamics and production biology of testate amoebae (Rhizopoda, Testacea) in raw humus of two coniferous forest soils. *Archiv für Protistenkunde* 39: 325-342.
- Schonborn W, Dorfelt H, Foissner W, Krienitz L, Schafer U (1999) A fossilized microcenosis in Triassic amber. *J. Eukar Microb* 46(6): 571-584.
- Schroeter D (2001) Structure and function of the decomposer food webs of forests along a European North-South-transect with special focus on testate amoebae (Protozoa). PhD-thesis, Department of Animal Ecology, Universität Giessen.

- Shaw AJ, Cox CJ, Boles SB (2003) Global patterns in peat moss biodiversity. *Mol Ecol* 12: 2553-2570.
- Sime-Ngando T, Colombet J (2009) Viruses and prophages in aquatic ecosystems. *Can J Microb* 55(2): 95-109.
- Singh BK, Bardgett RD, Smith P, Reay DS (2010) Microorganisms and climate change: terrestrial feedbacks and mitigation options. *Nature Rev Microb* 8(11): 779-790.
- Sinsabaugh RL (2010) Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biol Biochem* 42(3): 391-404.
- Sinsabaugh RL, Gallo ME, Lauber C, Waldrop MP, Zak DR. 2005. Extracellular enzyme activities and soil organic matter dynamics for northern hardwood forests receiving simulated nitrogen deposition. *Biogeochem* 75(2): 201-215.
- Sinsabaugh RL, Saiya-Corka K, Long T, Osgood MP, Neher DA, Zak DR, Norby RJ (2003) Soil microbial activity in a Liquidambar plantation unresponsive to CO₂-driven increases in primary production. *App Soil Ecol* 24(3): 263-271.
- Sinsabaugh RL, Shah JJF (2011) Ecoenzymatic stoichiometry of recalcitrant organic matter decomposition: the growth rate hypothesis in reverse. *Biogeochem* 102(1-3): 31-43.
- Sjörs H (1952) On the relation between vegetation and electrolytes in north Swedish mire waters. *Oikos* 2:241-258
- Smith LC, MacDonald GM, Velichko AA, Beilman DW, Borisova OK, Frey KE, Kremenetski KV, Sheng Y (2004) Siberian peatlands a net carbon sink and global methane source since the early Holocene. *Science* 303(5656): 353-356.
- Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M, Miller HL (2007) *Climate change 2007: the Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Cambridge, UK and New York, NY, USA, p 996
- Souto XC, Bolano JC, Gonzalez L, Reigosa MJ (2001) Allelopathic effects of tree species on some soil microbial populations and herbaceous plants. *Biol Planta* 44: 269-275
- Souto XC, Chiapusio G, Pellissier F (2000) Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: Significance for natural regeneration. *J Chem Ecol* 26: 2025-2034
- Spitaler R, Winkler A, Lins I, Yanar S, Stuppner H, Zidorn C (2008) Altitudinal variations of phenolic content in flowering heads of *Arnica Montana* cv. ARBO: a 3-year comparison. *J. Chem Ecol* 34: 369-375.
- Stephens DW, Krebs JR (1986) *Foraging Theory*. Princeton: Princeton University Press. ISBN 0691084424
- Strack M (2008) Peatlands and Climate Change. In: International Peat Society, Vapaudenkatu 12, 40100 Jyväskylä, Finland. 235p.
- Strack M, Price JS (2009) Moisture controls on carbon dioxide dynamics of peat-Sphagnum monoliths. *Ecohydrol* 2(1): 34-41.
- Sullivan ME, Booth RK (2011) The Potential Influence of Short-term Environmental Variability on the Composition of Testate Amoeba Communities in *Sphagnum* Peatlands. *Microb Ecol* 62(1):80-93.

T

- Ter Braak C, Simlauer P (1998) Canoco reference manual and user's guide to canoco for windows, software for canoco community ordination (version 4). In: Canoco reference manual and user's guide to canoco for windows, software for canoco community ordination (version 4), pp. 31–145
- Theuerl S, Buscot F (2010) Laccases: toward disentangling their diversity and functions in relation to soil organic matter cycling. *Biol Fertil Soils* 46(3): 215-225.
- Theuerl S, Dorr N, Guggenberger G, Langer U, Kaiser K, Lamersdorf N, Buscot F (2010) Response of recalcitrant soil substances to reduced N deposition in a spruce forest soil: integrating laccase-encoding genes and lignin decomposition. *Fems Microb Ecol* 73(1): 166-177.
- Thormann MN (2006) Diversity and function of fungi in peatlands: A carbon cycling perspective. *Can J Soil Sci* 86(2): 281-293.
- Thormann MN, Bayley SE, Currah RS (2004a) Microcosm tests of the effects of temperature and microbial species number on the decomposition of *Carex aquatilis* and *Sphagnum fuscum* litter from southern boreal peatlands. *Can J Microb* 50(10): 793-802.
- Thormann MN, Currah RS, Bayley SE (2001) Microfungi isolated from *Sphagnum fuscum* from a southern boreal bog in Alberta, Canada. *Bryologist* 104(4): 548-559.
- Thormann MN, Currah RS, Bayley SE (2002) The relative ability of fungi from *Sphagnum fuscum* to decompose selected carbon substrates. *Can J Microb* 48(3): 204-211.
- Thormann MN, Currah RS, Bayley SE (2004b) Patterns of distribution of microfungi in decomposing bog and fen plants. *Can J Bot* 82(5): 710-720.
- Tien, M, Kirk TK (1984) Lignin-degrading enzyme from phanerochaete-chrysosporium - purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA Biol Sci* 81, 2280-2284.
- Toberman H, Evans CD, Freeman C, Fenner N, Whiten M, Emmett BA, Artz REE, (2008) Summer drought effect upon soil and litter extracellular phenol oxidase activity and soluble carbon release in an upland *Calluna* heathland. *Soil Biol Biochem* 40, 1519-1532.
- Toberman H, Freeman C, Evans C, Fenner N, Artz RRE (2008) Summer drought decreases soil fungal diversity and associated phenol oxidase activity in upland *Calluna* heathland soil. *Fems Microb Ecol* 66(2): 426-436.
- Toberman H, Laiho R, Evans CD, Artz RRE, Fenner N, Strakova P, Freeman C (2010) Long-term drainage for forestry inhibits extracellular phenol oxidase activity in Finnish boreal mire peat. *Eur J Soil Sci* 61(6): 950-957.
- Tolonen K, Warner BG, Vasander H (1992) Ecology of Testaceans (Protozoa, Rhizopoda) in mires in Southern Finland. 1. Autoecology. *Archiv Protist* 142: 119-138
- Tsuneda A, Thormann MN, Currah RS (2001) Modes of cell-wall degradation of *Sphagnum fuscum* by *Acremonium* cf. *curvulum* and *Oidiodendron maius*. *Can J Bot* 79(1): 93-100.
- Tsyganov AN, Aerts R, Nijs I, Cornelissen JHC, Beyens L (2011b) *Sphagnum*-dwelling Testate Amoebae in Subarctic Bogs are More Sensitive to Soil Warming in the Growing Season than in Winter: the Results of Eight-year Field Climate Manipulations. *Protist* (In press).
- Tsyganov AN, Nijs I, Beyens L (2011a) Does climate warming stimulate or inhibit soil protist communities? A test on testate amoebae in high-arctic tundra with free-air temperature

increase. *Protist* 162: 237-248

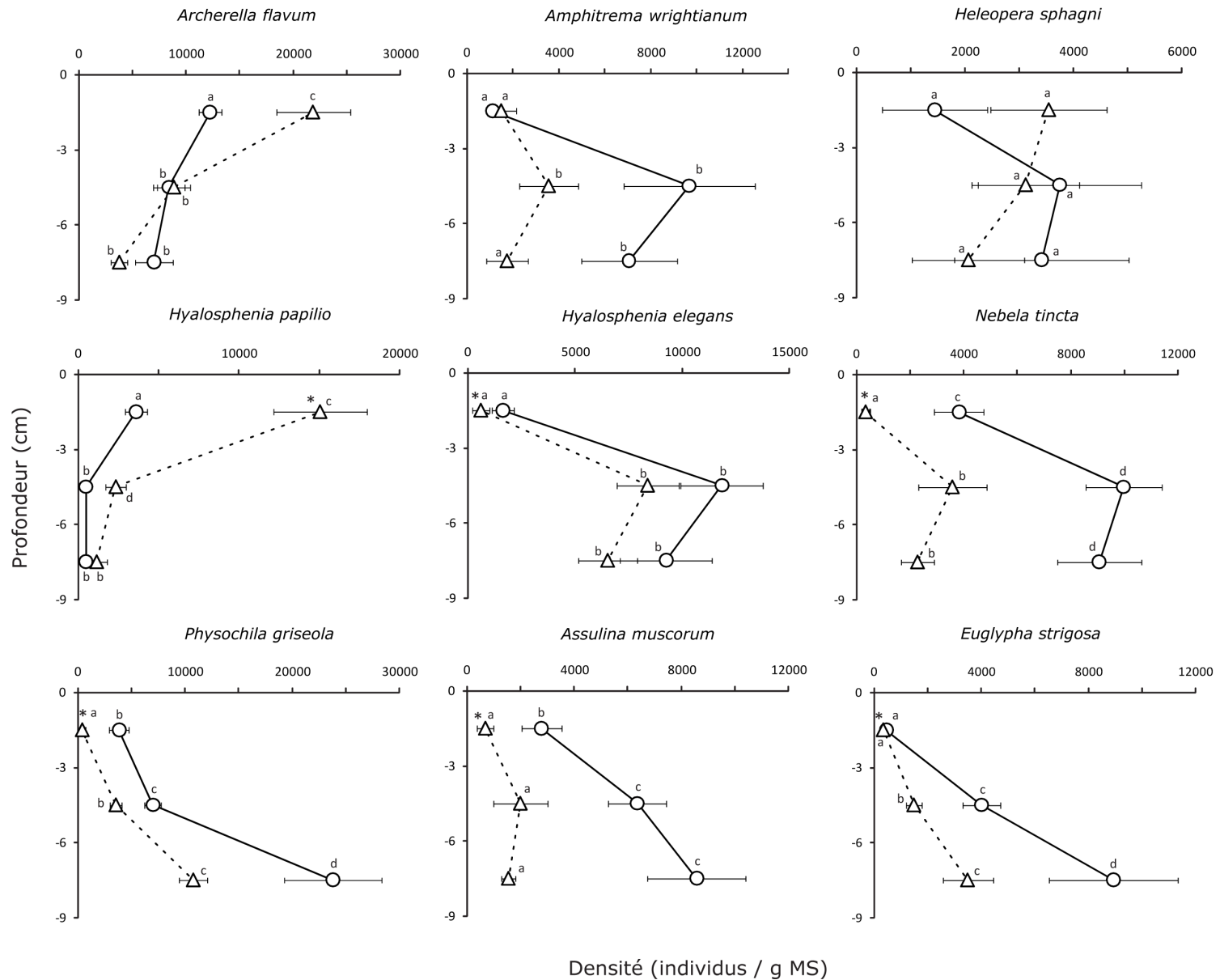
- Turetsky MR (2003) The role of bryophytes in carbon and nitrogen cycling. *Bryologist* 106(3): 395-409.
- Tutschek R, Rudolph H. 1971. Isolation of crystal phenol from cell-wall of *Sphagnum magellanicum*. *Berichte Der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 84(6): 309-&.
- Tutschek R. 1979. Characterization of a peroxidase from *Sphagnum magellanicum*. *Phytochem* 18(9): 1437-1439.

u - z

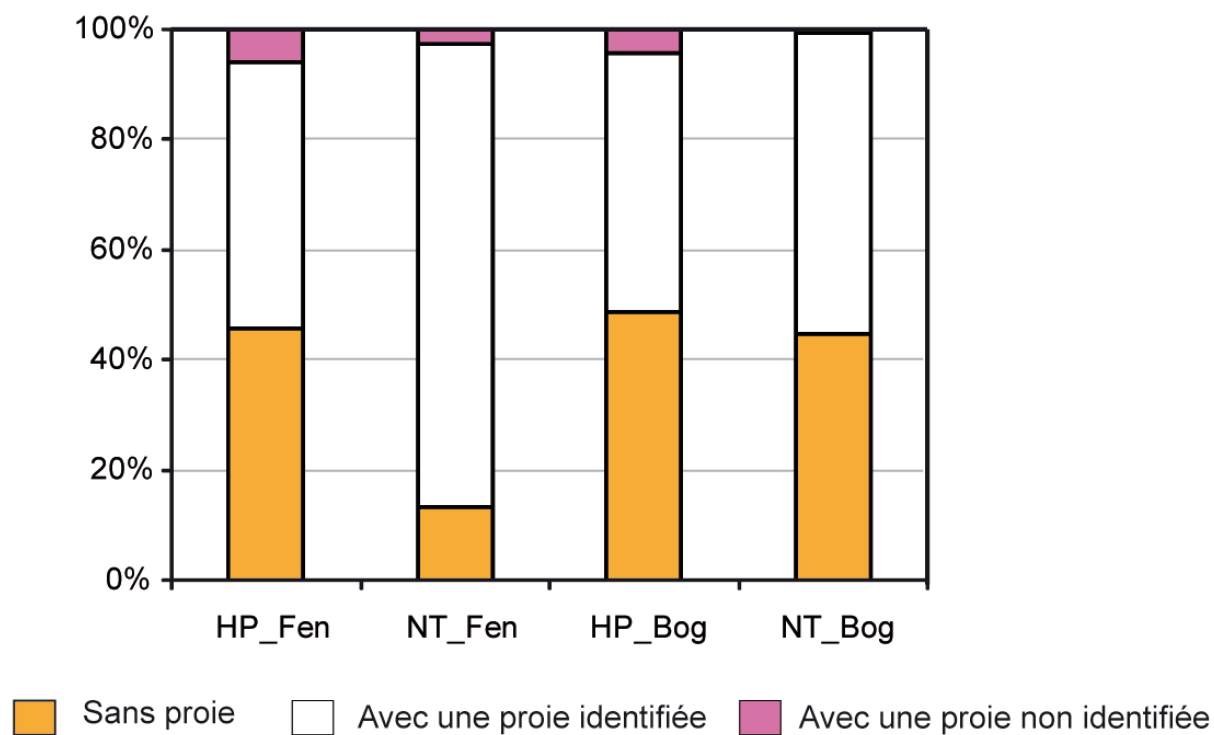
- Updegraff K, Bridgham SD, Pastor J, Weishampel P, Harth C (2001) Response of CO₂ and CH₄ emissions from peatlands to warming and water table manipulation. *Ecol Appl* 11(2): 311-326.
- Utermöhl H (1958) Zur vervollkommnung der quantitative phytoplankton-methodik. *Mitt Inst Verhein Limnol* 9: 1-38
- van Breemen N (1995) How *Sphagnum* Bogs Down Other Plants. *TREE* 10: 270-275.
- Vander Zanden MJ, Rasmussen JB (1999) Primary consumer delta C-13 and delta N-15 and the trophic position of aquatic consumers. *Ecology* 80: 1395-1404
- Velbel MA (1993) Influence of temperature and mineral surface characteristics on feldspar weathering rates in natural and artificial systems - a 1st approximation. *Water Resour Res* 26(12): 3049-3053.
- Verhoeven JTA, Liefveld WM (1997) The ecological significance of organochemical compounds in *Sphagnum*. *Acta Bot Neerl* 46: 117-130
- Verhoeven JTA, Toth E (1995) Decomposition of *Carex* and *Sphagnum* litter in fens - effect of litter quality and inhibition by living tissue-homogenates. *Soil Biol Biochem* 27(3): 271-275.
- Veteli TO, Mattson WJ, Niemela P, Julkunen-Tiitto R, Kellomaki S, Kuokkanen K, Lavola A (2007) Do elevated temperature and CO₂ generally have counteracting effects on phenolic phytochemistry of boreal trees? *J. Chem Ecol* 33(2): 287-296.
- Vohnik M, Burdikova Z, Vyhnaal A, Koukol O (2011) Interactions between testate amoebae and saprotrophic microfungi in a scots pine litter microcosm. *Microb Ecol* 61: 660-668.
- Vohnik M, Burdiová Z, Albrechtová J, Vosatka M (2009) Testate amoebae (Arcellinida and Euglyphida) vs. ericoid mycorrhizal and DSE fungi: A possible novel interaction in the mycorrhizosphere of ericaceous plants? *Microb Ecol* 57: 203-214
- Wall AAJ, Gilbert D, Magny M, Mitchell EAD (2010a) Testate amoeba analysis of lake sediments: impact of filter size and total count on estimates of density, species richness and assemblage structure. *J. Paleolimnol* 43(4): 689-704.
- Wall AAJ, Magny M, Mitchell EAD, Vanniere B, Gilbert D (2010b) Response of testate amoeba assemblages to environmental and climatic changes during the Lateglacial-Holocene transition at Lake Lautrey (Jura Mountains, eastern France). *J. Quat Sci* 25(6): 945-956.
- Wallstedt A, Coughlan A, Munson AD, Nilsson MC, Margolis HA (2002) Mechanisms of interaction between *Kalmia angustifolia* cover and *Picea mariana* seedlings. *Can J Forest Res* 32(11): 2022-2031.

- Wallstedt A, Gallet C, Nilsson MC (2005) Behaviour and recovery of the secondary metabolite batatasin-III from boreal forest humus: influence of temperature, humus type and microbial community. *Biochem Sys Ecol* 33(4): 385-407.
- Wardle DA, Walker LR, Bardgett RD (2004) Ecosystem properties and forest decline in contrasting long-term chronosequences. *Science* 305(5683): 509-513.
- Warner BG (1987) Abundance and diversity of Testate Amoebae (Rhizopoda, Testacea) in *Sphagnum* peatlands in Southwestern Ontario, Canada. *Archiv Protist* 133: 173-189
- Warner BG, Asada T, Quinn NP (2007) Seasonal influences on the ecology of testate Amoebae (Protozoa) in a small *Sphagnum* peatland in Southern Ontario, Canada. *Microb Ecol* 54: 91-100
- Waterman, P.G., Mole, S. and Molw, S (1994) Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Science Inc., Walden, Mass. USA.
- Weisse T, Muller H, Pintocoelho RM, Schweizer A, Springmann D, Baldringer G (1990) Response of the microbial loop to the phytoplankton spring bloom in a large prealpine lake. *Limnol Oceano* 35(4): 781-794.
- Weltzin JF, Bridgham SD, Pastor J, Chen JQ, Harth C (2003) Potential effects of warming and drying on peatland plant community composition. *Glob Change Biol* 9(2): 141-151.
- Weltzin JF, Harth C, Bridgham SD, Pastor J, Vonderharr M (2001) Production and microtopography of bog bryophytes: response to warming and water-table manipulations. *Oecologia* 128(4): 557-565.
- Weltzin JF, Pastor J, Harth C, Bridgham SD, Updegraff K, Chapin CT (2000) Response of bog and fen plant communities to warming and water-table manipulations. *Ecology* 81(12): 3464-3478.
- Wetzel RG (1992) Gradient-dominated ecosystems - sources and regulatory functions of dissolved organic-matter in fresh-water ecosystems. *Hydrobiologia* 229: 181-198.
- Wheeler BD, Proctor MCF (2000) Ecological gradients, subdivisions and terminology of north-west European mires. *J Ecol* 88(2): 187-203.
- Wilkinson DM (2008) Testate amoebae and nutrient cycling: peering into the black box of soil ecology. *TREE* 23(11): 596-599.
- Wilkinson DM, Mitchell EAD (2010) Testate amoebae and nutrient cycling with particular reference to soils. *Geomicrobiol J* 27(6-7): 520-533
- Williams CJ, Shingara EA, Yavitt JB (2000) Phenol oxidase activity in peatlands in New York State: Response to summer drought and peat type. *Wetlands* 20(2): 416-421
- Wilschke J, Sprengel B, Wolff C, Rudolph H. 1989. A hydroxybutenolide from sphagnum species. *Phytochem* 28(6): 1725-1727.
- Woodwell GM, Mackenzie FT, Houghton RA, Apps M, Gorham E, Davidson E (1998). Biotic feedbacks in the warming of the earth. *Climatic Change* 40(3-4): 495-518.
- Yang J, Zhang WJ, Shen YF (2009) Relationships between Testate Amoebae Assemblages (Protozoa) and Geographic Factors in Yunnan Plateau Lakes, China. *J Fresh Ecol* 24: 437-443
- Yeates GW, Foissner W (1995) Testate amoebae as predators of nematodes. *Biol Fertil Soils* 20:17.
- Zinsmeister HD & Mues R (1990) Bryophytes: Their chemistry and chemical taxonomy. Oxford Science Publications 470p.

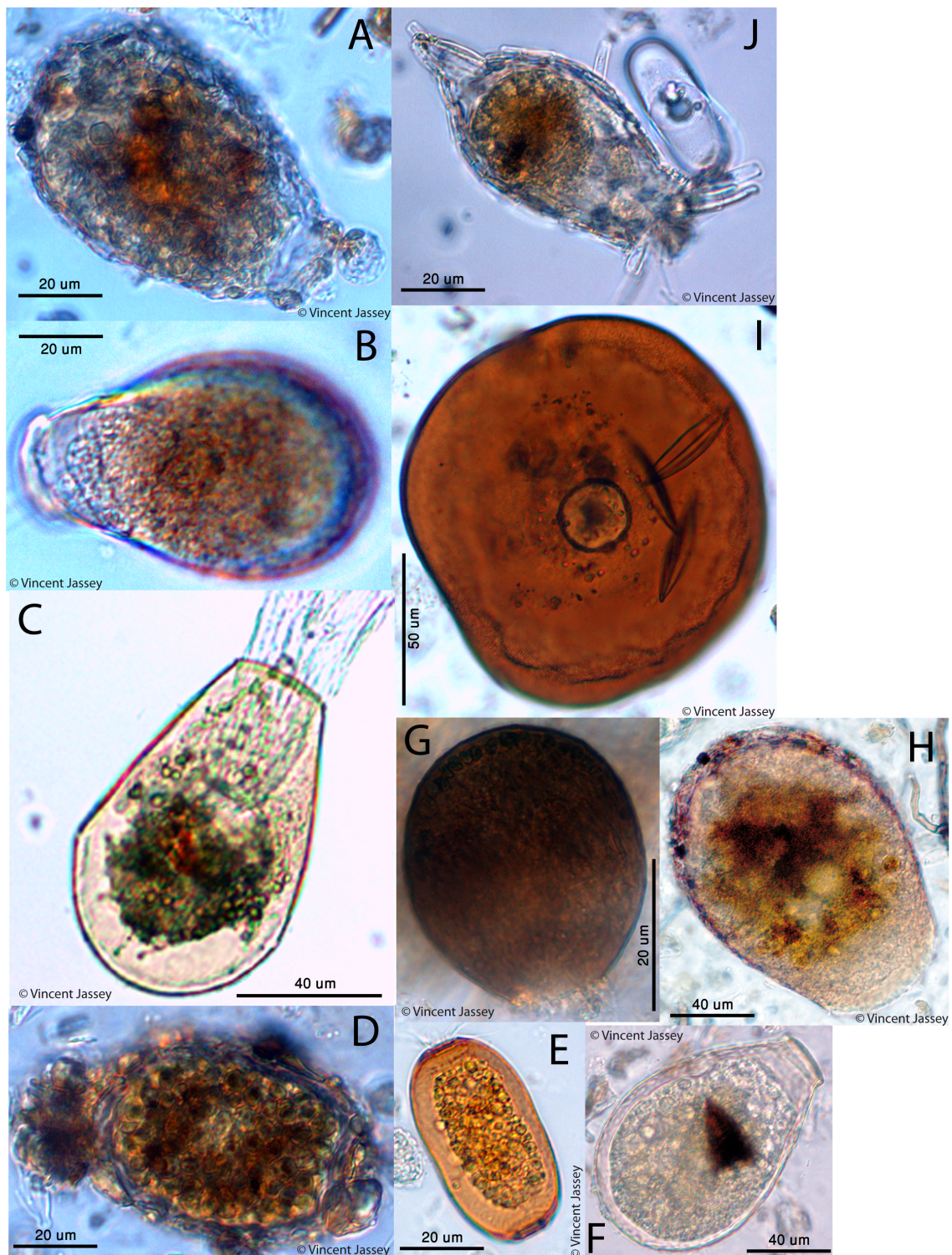
Annexes



Annexe 4: Densité des amibes à thèque les plus fréquentes dans les zones de « haut-marais » (ronds) et de « bas-marais » (triangles) en fonction de de la profondeur.



Annexe 5: Variations spatiales de la proportion relative (%) des spécimens de *H. papilio* (HP) et *N. tincta* (NT) associée avec une proie le long du gradient « haut-bas » marais (Fen = Bas marais ; Bog = Haut marais).



Annexe 6: Photos par microscopie inversée des principales espèces d'amibes à thèque observées sur la tourbière du Forbonnet; (a) *Physochilla griseola*, (b) *Nebela militaris*, (c) *Hyalosphenia papilio*, (d) *Amphitrema wrightianum*, (e) *Archerella flavum*, (f) *Nebela tincta*, (g) *Assulina muscorum*, (h) *Heleopera rosea*, (i) *Arcella arenaria*, (j) *Diffugia elegans*.

Résumé long

Impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement de la sphagnosphère : relations polyphénols – communautés microbiennes

Les tourbières représentent 1/3 du carbone total contenu dans les sols mondiaux (390-455 Pg). Cette fonction puits de carbone résulte d'un déséquilibre entre la production de matière organique et sa dégradation. Les sphaignes occupent un rôle dominant dans cette fonction puits de carbone, car elles produisent des polyphénols potentiellement inhibiteurs des activités microbiennes responsables de leur dégradation. L'objectif de cette thèse a été d'identifier les interactions entre les polyphénols des sphaignes et les communautés microbiennes et d'évaluer l'impact du réchauffement climatique sur ces relations "sphaignes - microorganismes".

Un dispositif expérimental (Open Top Chambers) simulant *in situ* une hausse modérée des températures (+1°C) a été installé sur la tourbière de Frasne (25). Les résultats des placettes témoins ont montré que les polyphénols jouaient un rôle important dans la structure et la dynamique spatiale des communautés microbiennes, notamment celle des amibes à thèque, et qu'ils avaient un effet inhibiteur sur les activités phénoloxydases, enzymes extracellulaires impliquées dans le recyclage du carbone des composés récalcitrants (ex. polyphénols). La hausse des températures a provoqué une modification du réseau alimentaire microbien avec l'augmentation de la biomasse des bactéries et la baisse importante (- 70%) de la biomasse des prédateurs (amibes à thèque). Le réchauffement climatique a également induit une baisse de la production de polyphénols, diminuant ainsi leur effet sur les microorganismes. En parallèle à cette baisse, une hausse des activités phénoloxydases a également été enregistrée. Le réchauffement a ainsi modifié les relations polyphénols – phénoloxydases, et par conséquent des éléments essentiels du cycle du carbone des tourbières.

Les différents changements induits par le réchauffement climatique (polyphénols, phénoloxydases, réseau trophique microbien) ont aussi conduit à une modification des relations "sphaignes – microorganismes" *via* une accélération potentielle du recyclage des nutriments, ce qui pourrait influencer sur le long terme le fonctionnement de l'écosystème tourbière.

L'ensemble des résultats confirme que la sphagnosphère ("association sphaignes – microorganismes") est un élément clé pour permettre d'anticiper les modifications liées à un réchauffement climatique.

Mots clés : Amibes à thèque, Communautés microbiennes, Open-Top-Chambers, Phénoloxydases, Polyphénols, Réchauffement climatique, Tourbières, Sphaignes

Résumés

Impact d'un réchauffement climatique sur le fonctionnement de la sphagnosphère : relations polyphénols – communautés microbiennes

Dans un contexte de réchauffement climatique, la fonction puits de carbone des tourbières à sphaignes est susceptible d'être altérée en raison d'une modification des interactions sphaignes-microorganismes, responsables de l'accumulation de carbone. L'objectif de cette thèse a été (1) d'identifier les interactions chimiques entre les polyphénols des sphaignes et les communautés microbiennes des sphaignes et (2) d'évaluer l'impact du réchauffement climatique sur ces relations.

Un dispositif expérimental (Open Top Chambers) simulant *in situ* une hausse modérée des températures (+1°C) a été installé sur la tourbière de Frasne (25). La hausse des températures a provoqué une modification du réseau alimentaire microbien avec l'augmentation de la biomasse des bactéries et une baisse importante (- 70%) de la biomasse des prédateurs (amibes à thèque). Le réchauffement climatique a également induit une baisse de la production de polyphénols, diminuant ainsi leur effet inhibiteur sur les microorganismes. En parallèle à cette baisse, une hausse des activités enzymatiques phénoloxydases a également été enregistrée. Le réchauffement a ainsi modifié les relations polyphénols – phénoloxydases, deux éléments essentiels du cycle du carbone des tourbières.

Les différents changements induits par le réchauffement climatique (polyphénols, phénoloxydases, réseau trophique microbien) ont aussi conduit à une modification des relations "sphaignes – microorganismes" *via* une accélération potentielle du recyclage des nutriments, ce qui pourrait influencer sur le long terme le fonctionnement de l'écosystème tourbière.

Mots clés : Amibes à thèque, Communautés microbiennes, Open-Top-Chambers, Phénoloxydases, Polyphénols, Réchauffement climatique, Tourbières, Sphaignes

Effect of climate warming on the functioning of the sphagnosphere: polyphenols – microbial communities relationships

Carbon stocks of *Sphagnum*-peatlands are likely to be altered by climate warming due to important changes in « *Sphagnum*-microorganisms » relationships which are responsible for carbon sequestration. The objectives of this thesis are (1) to identify the chemical interactions between *Sphagnum*-polyphenols and *Sphagnum* associated microbial communities and (2) to understand the impact of warming on these relationships.

An experimental design using Open-Top-Chambers (OTC) was used to simulate an increase of air temperatures (+1°C) on a peatland situated in Jura Mountains (Frasne, 25). Temperature increase induced a modification of the microbial food web with an increase of the biomass of bacteria and a strong decrease of the biomass of top-predators (-70%), i.e. testate amoebae. Warming also induced a decrease of *Sphagnum*-polyphenols, diminishing their inhibitory effect on microbial communities. In parallel, an increase of phenoloxidase enzymatic activities was recorded in OTC. Climate warming thus modified polyphenol-phenoloxidase interplay, two crucial components of carbon cycle in peatlands.

Warming effects on the different components – i.e. polyphenols, phenoloxidases, microbial food web – induced a modification of *Sphagnum*-microbial communities interplay, favoring carbon and nutrient recycling, which could alter peatland functioning in long-term.

Keywords: Testate amoebae, microbial communities, Open-Top-Chambers, phenoloxidases, polyphenols, climate change, *Sphagnum*-peatlands