



**HAL**  
open science

# Déterminisme de la production bactérienne dans les vasières intertidales du Bassin de Marennes-Oléron : rôle des exopolysaccharides

Margot de Crignis

► **To cite this version:**

Margot de Crignis. Déterminisme de la production bactérienne dans les vasières intertidales du Bassin de Marennes-Oléron : rôle des exopolysaccharides. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2010. Français. NNT : 2010LAROS320 . tel-00605659

**HAL Id: tel-00605659**

**<https://theses.hal.science/tel-00605659>**

Submitted on 3 Jul 2011

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

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



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE  
*Sciences pour l'Environnement*  
*Gay Lussac*

Laboratoire Littoral, ENvironnement et Sociétés – LIENSs  
UMR 6250 CRNS – Université de La Rochelle

THÈSE  
présentée par :  
Margot de Crignis

soutenue le 14 décembre 2010  
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle  
Discipline : Biologie Marine

**Déterminisme de la dynamique bactérienne dans les biofilms  
microphytobenthiques des vasières intertidales, rôle des substances  
polymériques extracellulaires**

---

JURY :

M. Bouvy, Directeur de recherche IRD, Université de Montpellier,  
M. Claquin, Maître de conférence - HDR, Université de Caen,  
M. Bustamante, Professeur, Université de La Rochelle,  
Mlle Dupuy, Professeur, Université de La Rochelle,

M. Orvain, Maître de conférences, Université de Caen

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directrice de thèse et  
responsable scientifique  
Responsable scientifique





## *REMERCIEMENTS*

---

Tout d'abord merci à Christine DUPUY, directrice de thèse et responsable scientifique pour avoir encadré ce travail. Merci à Francis ORVAIN, responsable scientifique, pour ses conseils, sa disponibilité, son soutien inconditionnel, son aide, les discussions et plus encore. Merci à Gérard Blanchard puis Sylvain Lamare de m'avoir accueillie au laboratoire LIENSs UMR 6250 CNRS-Université de La Rochelle, ainsi qu'à Michel Mathieu puis Pascal Sourdain pour m'avoir accueillie au laboratoire UMR 100 Ifremer-UCBN de Caen.

Merci à toute l'équipe VASIREMI pour le terrain et les analyses. Merci à l'ensemble du personnel de la station marine du CREC pour l'excellent accueil, les services divers et l'hébergement temporaire, qu'il s'agisse de ma personne ou du matériel parfois encombrant !

Un grand merci à Brigitte Hudelaine pour son infinie gentillesse et son aide dans les démarches tout au long du doctorat, merci également à Jennifer De La Corte Gomez et l'école doctorale de La Rochelle.

Merci à Guillaume Pierre mon partner, même si. Un gros merci à Caroline Nérot pour l'aide sur les mésocosmes (Murphy quand tu nous tiens) et aussi pour les bonnes rigolades et le soutien moral. Merci à Eri, à Pascale pour les discussions et leur aide. Merci aux gentils doctorants de la Rochelle, les vieux et les moins vieux, et surtout PACALINE ORY pour tout ce qu'elle m'a apporté en tant que collègue de bural et comme amie. Attention aux sgouis dans les ioutes, bi ? do. Hep, votre encyclopédie Larousse ! Bien évidemment, merci à Andréa, Tiphaine et Hélène, pas lâchées depuis le master 2. Pas doctorantes mais bien contente de vous avoir retrouvées : Marion Richard et Camille Fontaine. Un grand merci aussi à Beubeu pour tout ce qu'il apporte de positif et constructif, Johann les citadelles et les impros au piano, Pierrick et le régime vasière, Pierre pour les conseils divers... Merci à Nicolas Lachaussée, Philippe Pineau, Martine Bréret et Françoise Mornet pour leur gentillesse et leur aide précieuse. Merci à Pierre-Yves Pascal pour les gaufres et le ventriglisse et à Hélène Montanié pour les virus dans le sédiment. Lacouée et Elo pour les dissections. Benoit, Mathieu, Paula, Aurore, Camille, Camille, Marion, Aline, Thomas, Sébastien, Blanche, Stéphanie pour votre sympathique compagnie.

Merci aux gentils doctorants de Caen aussi, avec qui j'ai été très heureuse de finir cette thèse (bon même si vous ne m'avez plus trop vue sur la fin !) dont Laetitia BIGOT en tête parce que quand même ! mais bien sûr Jerem, Banban, Michael, Rached, Elmina, Hervé, Martin et Paupau, Georges, Thomas, Nadège, Christelle, Céline, Aude, Adrien, Charlotte et bien sûr LA BLONDE, qui se reconnaîtra, voilà tu es parti mais c'était bien sympa les covoiturages et les délires, bon courage pour ta suite. Merci aussi aux caennais(es) Seb (même si tu as migré, merci la discussion un jour dans un couloir), Karine et sa frite habituelle, Anne-So et les microscopes, Pascal et les recettes, Jean-Paul et son livre de conf, Juliette et la petite discussion sur l'après, Marie-Pierre pour les conseils, mises en garde, recommandations et formations diverses. Merci à Fabien pour m'avoir hébergée plusieurs semaines dans sa chouette maison de Bavent, j'ai beaucoup aimé ce séjour avec vous deux.

Merci à Minus et Cortex mes confrères de Chizé, partis post-doctorer un peu trop loin à mon goût mais je suis bien certaine qu'on va se revoir ! Ma nouille Jo que j'ai été bien contente de croiser au détour d'une mission.

Je voudrais remercier Bernard Elchinger et Agnès Germot pour le plaisir à suivre leurs enseignements au cours de ma formation universitaire, ainsi que Xavier Bonnet et Frédéric Lagarde pour leurs visions très instructives sur la science et de l'écologie.

Merci aux gens qui m'ont soutenue et ça n'a pas été facile : Cédric à qui je souhaite beaucoup de bonheur malgré tous les coups durs, ma pitite mamoune qui m'a soutenue et sponsorisée depuis toujours, mon grand frère, ma grande sœur et leurs moitiés, mes tantes Gaby et Maticlo, mes moutes uniques et mes amis Pierre, Julien et Cyril (même si personne ne vous appelle comme ça). Enfin merci à mon tipi Seb qui m'a sans cesse soutenue, qui a été ma nourrice et mon nuage. Rignée de dourte, poideau de poche, vue basse... merci à la famille Bourée qui m'a témoigné un grand soutien. Forcément j'en reviens à remercier infiniment Francis sans qui tout ça ne serait pas arrivé.

## AVANT PROPOS

---

Ce travail a été financé par le CNRS et la région Poitou-Charente sous la forme d'une bourse Docteur-Ingénieur, qui a alimenté le programme VASIREMI dans lequel cette thèse s'intègre.

Ce financement a impliqué un travail de vulgarisation auprès des élèves du lycée Jean Moulin de Montmorillon au sein de l'atelier scientifique mis en place par Marc Couturier. Cette activité s'est traduite par une sensibilisation au plan d'échantillonnage et qui a impliqué des sorties sur le terrain, des visites du laboratoire et une évaluation des élèves. J'ai vraiment apprécié de travailler aux côtés de Marc Couturier et Benoît Simon-Bouhet à cette occasion. Merci également à Julien Modéran et Christine Dupuy pour les conseils.

Le travail de thèse a conduit à trois articles dont l'état d'avancement au 5 mai 2011 est précisé :

- De Crignis M, Orvain F, Takahashi E, Dupuy C (en preparation) - Bacteria, diatoms and extracellular polymeric substances (EPS) dynamics during the low tide in natural microphytobenthic biofilms of an intertidal mudflat (Brouage, France) for a complete tidal cycle at two different seasons.
- Pierre G, Graber M, Rafiliposon BA, Dupuy C, Orvain F, De Crignis M, Maugard T (soumis) Biochemical composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced during microphytobenthic biofilm development on an intertidal mudflat of a macrotidal bay (Annexe 1)
- Montanié H, de Crignis M, Lavaud J (soumis) Viriobenthos and virus-induced bacterial mortality associated to microphytobenthic biofilm on a intertidal mudflat (Annexe 2)

Le chapitre 2 ainsi que le chapitre 3 font l'objet d'articles actuellement en préparation.

Ce travail a également fait l'objet de présentations orales et affichées :

- Effets de la marée sur les interactions EPS-diatomées-bactéries dans un biofilm reconstitué en mésocosme (communication orale) De Crignis M, Dupuy C, Orvain F, Agogué H. UOF 2009, La Rochelle, France (2009)
- Interactions EPS-diatomées-bactéries dans les biofilms des vasières intertidales de Marenne-Oléron (communication orale) De Crignis M. Colloque des doctorants de 2ème année, La Rochelle, France (2009)
- Relevance of exopolymer secretion to understand the dynamic behaviour of erodability in relation to microphytobenthos, bacteria and macrofauna activities (communication orale). Orvain F, De Crignis M, Guizien K, Lefebvre S, Dupuy C, ASLO 2011. San Juan Puerto Rico, USA. (2011).
- Interactions EPS-diatomées-bactéries dans les biofilms des vasières intertidales de Marenne-Oléron (poster) De Crignis Margot. Colloque des doctorants de 2ème année, La Rochelle, France (2009) (Annexe 3)
- Resuspension of sediment prokaryotic communities during physical erosion process: an experimental approach (poster) Mallet C, Agogué H, Bonnemoy F, De Crignis M, Guizien K, Orvain F, Dupuy C. UOF 2009, Piran, Slovénie (2009) (Annexe 4)
- Remise en suspension des communautés procaryotes du sédiment au cours d'un évènement d'érosion : approche expérimentale en érodimétrie (poster) Mallet C, Agogué H, Bonnemoy F, De Crignis M, Guizien K, Orvain F, Dupuy C. SFM, Marseille, France (2010) (Annexe 5)

Ce travail a été possible grâce à l'aide de nombreuses personnes :

- Les énumérations bactériennes en cytométrie de flux ont été réalisées en partenariat avec Clarisse Mallet (LMGE, Clermont-Ferrand). J'ai également pu travailler sur la diversité bactérienne à ses côtés (posters en annexe 4 et 5)
- Les analyses des EPS des échantillonnages sur le terrain en février 2008 ont été réalisées par Eri Takahashi (PE2M, Caen) et ceux de juillet 2008 par Pascale Moulin (PE2M, Caen), Camille Trottier, Apolline Clet et Georges Semedo-Cabral (stagiaires, PE2M Caen).
- Francis Orvain m'a formée à l'utilisation d'un érodimètre (posters en annexe 4 et 5)



- Caroline Nérot (LIENSs, La Rochelle) a aidé à la mise en place d'un premier suivi mésocosme non-concluant, dont quelques jours de tamisage de vase à deux...
- Les mesures des protéines du sédiment ont été réalisées par Frédérique Bonnemoy (LMGE, Université Blaise Pascal). Le dosage des sels nutritifs a été réalisé par Laëtitia Birée (LRPCB, Université de Caen Basse-Normandie).
- Les mesures d'activités bactériennes ont été réalisées avec l'aide d'Hélène Agogué (LIENSs, La Rochelle). La production bactérienne a été étudiée grâce à l'aide de Christine Dupuy (LIENSs, La Rochelle). D'une façon générale, j'ai reçu une aide précieuse d'Hélène et Christine pour l'expérimentation en mésocosme, sans oublier Françoise (AGSAE, La Rochelle) pour les heures de tamisage de vase et les coups de mains divers, Martine pour les filtrations, Marie-Laure Bégout (AGSAE, La Rochelle) pour l'accès à l'eau de mer, Pascal Claquin (PE2M, Caen) pour le prêt du système de filtration, Jean-Paul Lehodey (CREC, Caen) pour les adaptations, Didier Leguay et Michel Prineau (AGSAE, La Rochelle) pour tous les bricolages et coups de main.
- Sébastien Lefèvre (LOG, Wimereux) pour la formation PAM
- Katell Guizien (LOB, Banyuls) pour la granulométrie, les extrapolations de la lumière et température, et Mathieu Chatelain (LOB, Banyuls) pour le NH<sub>4</sub> en frais en juillet 2008
- L'expérimentation en microscopie confocale a reçu l'aide de Francis Orvain (PE2M, Caen) pour le plan expérimental et les changements de milieux, de Pascal Claquin pour les conseils et les recettes de milieu de culture, Bertrand Le Roy et Benoît Véron (Algobank, Caen) pour les souches algales, les produits et les conseils. La première partie de cette expérimentation a été réalisée au cours du post-doctorat de Pascale Moulin (PE2M, Caen) qui a bien rodé les acquisitions au microscope confocal. Merci à Didier Goux (CMABIO, Caen) pour l'aide précieuse au maniement du dit microscope, les mises au point et les idées pratiques de montages et supports de culture. Merci à Philippe Galera et Magali Demoor pour avoir fourni les pastilles de collagène qui n'auront malheureusement pas solutionné le problème de substrat de culture idéal pour les diatomées épipéliques et qui aurait permis d'observer les substances liées aux migrations.





## SOMMAIRE

---

INTRODUCTION GENERALE .....	1
CHAPITRE 1 Interactions entre bactéries et diatomées au sein d'un biofilm microphytobenthique développé à la surface d'une vasière intertidale (Baie de Marennes-Oléron, Charente maritime) à deux saisons et sur un cycle de marée : rôle des substances polymériques extracellulaires (EPS).....	25
CHAPITRE 2 Déterminisme de la production bactérienne dans un biofilm microphytobenthique reconstitué en mésocosme : rôle des EPS.....	49
CHAPITRE 3 Etude en microscopie confocale à balayage laser des EPS produits par des diatomées cultivées en microcosme et de leurs effets sur les bactéries.....	107
CHAPITRE 3-A Etude préliminaire en microscopie confocale à balayage laser des effets d'une carence en ammonium sur la quantité et la composition des sucres excrétés par des diatomées cultivées sur des lamelles de verre en conditions contrôlées : utilisation de lectines. ....	109
CHAPITRE 3-B Etude en microscopie confocale à balayage laser de la dynamique des bactéries en fonction des sucres sécrétés par des diatomées soumises ou non à une carence en ammonium : utilisation de lectines. ....	131
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES .....	143
ANNEXES.....	155
ANNEXE 1 Biochemical composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced during microphytobenthic biofilm development on an intertidal mudflat of a macrotidal bay.....	157
ANNEXE 2 First report on the interactions between viriobenthos activity, the bacterial mortality and the microalgal photosynthesis in a microphytobenthic biofilm of an intertidal mudflat (French Atlantic coast).....	193
ANNEXE 3 Facteurs contrôlant la production bactérienne dans les vasières intertidales du Bassin de Marennes-Oléron (Charente-maritime): rôles des substances exopolymériques.....	229
ANNEXE 4 Resuspension of sediment prokaryotic communities during physical erosion process: an experimental approach .....	233
ANNEXE 5 Remise en suspension des communautés prokaryotes du sédiment au cours d'un évènement d'érosion: approche expérimentale en érodimétrie .....	237
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	241



# **INTRODUCTION GENERALE**

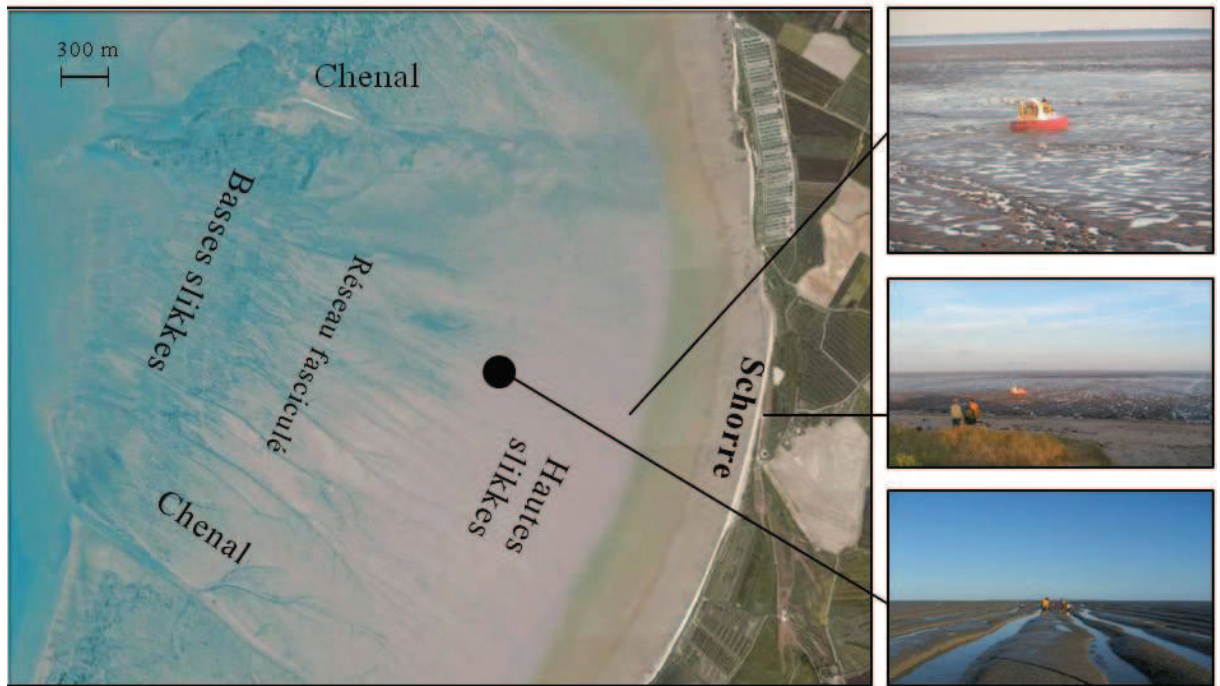
---



## INTRODUCTION GENERALE

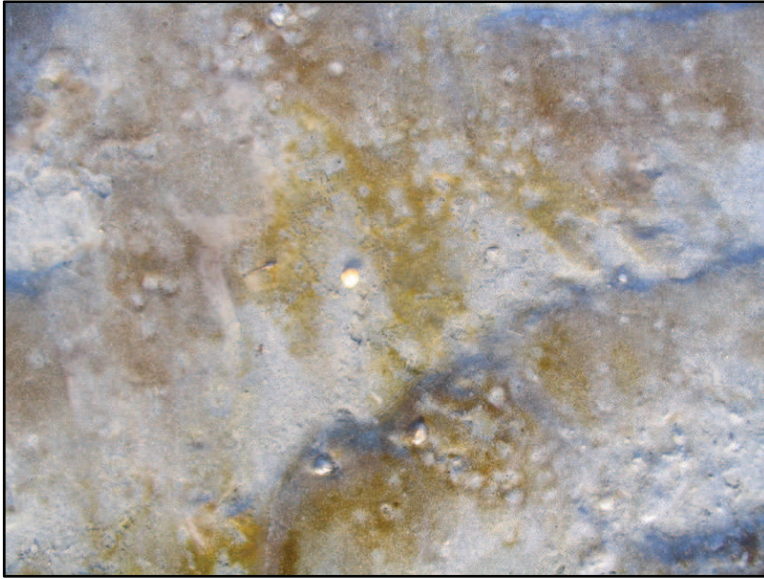
La zone côtière, qui couvre une aire de 26 106 km<sup>2</sup>, soit 7% de la surface globale des océans, est l'une des régions les plus biochimiquement actives de la biosphère (Gattuso et al. 1998). Cette zone englobe des profils variés, tels que les mangroves, plages de galets ou de sable fin, falaise, estrans rocheux, marais... parmi ces écosystèmes, les vasières intertidales (figure I.1) sont des écotones particulièrement complexes, puisque dynamiques et fortement variables dans le temps (avec des échelles allant du jour à la saison) mais aussi dans l'espace (du micron au kilomètre) (Heip et al. 1995). En effet, les saisons engendrent des conditions de température, vent et lumière variables et qui peuvent être très contrastées en un même point sur une année complète et présenter des variations d'une année sur l'autre. L'alternance de périodes diurnes et nocturnes conduisent elles-aussi à des variations de température et de lumière quotidiennes en un même point, ce à quoi peuvent s'ajouter les cycles de marées responsables de l'alternance de périodes d'émersions et d'immersions pluriquotidiennes. Ces vasières, vastes étendues de sédiments fins et cohésifs, sont loin d'être des surfaces planes et régulières sur leur ensemble. Au contraire, selon la latitude ou la longitude, on distingue des évolutions du faciès sédimentaire avec des systèmes de banquettes-seillons, des chenaux plus ou moins profonds et ramifiés, un sédiment dont le diamètre des particules varie de la vase très cohésive au sable plus ou moins grossier (figure I.1). La taille des particules de sédiment conditionne la capacité de ce dernier à maintenir un niveau d'hydratation à marée basse, ou la difficulté pour un organisme à évoluer à sa surface. En cas de conditions climatiques extrêmes, ces sédiments peuvent être remaniés. Ceci est bien connu dans le cas de baies touristiques où les passages empruntés par les guides doivent être régulièrement redessinés. A petite échelle, il n'y a pas non plus de régularité à la surface de la vasière. Ceci se traduit par et est probablement l'une des conséquences des occupations hétérogènes des organismes vivant, des oiseaux se nourrissant sur la vasière aux microalgues migrant dans le sédiment de surface, en passant pas les poissons, les nombreux invertébrés (gastéropodes, bivalves, vers) et les procaryotes...





**Figure I.1** : image satellite (® Google map 2009) de la vasière de Brouage (Charente maritime) sur laquelle sont reportées les principales structures de la vasière. Des photographies illustrent l'hétérogénéité de la surface, avec, de haut en bas : premiers reliefs dans la zone la plus côtière de la vasière ; vue de la plage et de la vasière depuis la dune de sable (présence de végétations) ; système de banquette-seillons au milieu de la vasière.

Malgré ces nombreuses variations des conditions à leur surface, les vasières intertidales sont le siège d'une forte production primaire, pouvant équivaloir celle d'une forêt tropicale (Dajoz 2000). Cette production est majoritairement réalisée par le biais d'algues microscopiques, les diatomées pennées épipéliques (Underwood & Paterson 2003). Ces diatomées, capables de se déplacer dans le sédiment, s'agrègent en surface lors des marées basses diurnes afin d'accéder à la lumière et effectuer leur activité de photosynthèse. Cela forme un **biofilm microphytobenthique** épais de quelques dizaines de microns, qui apparaît sous la forme de tâches vert sombre à la surface du sédiment (figure I.2). Au sein de ce biofilm, une forte quantité de matière est issue de la sécrétion de substances polymériques extracellulaires (EPS) par les diatomées et qui favorisent la création de ce film cohésif. Le biofilm abrite également de fortes abondances de bactéries hétérotrophes ainsi que d'autres eucaryotes (champignons, nanoflagellés, très minoritairement des ciliés (Sahan et al. 2007)) et virus.



**Figure I.2** : photographie d'un biofilm formé à la surface de la vase. Il correspond aux patches marron-vert irréguliers en surface.

Ces zones benthiques intertidales constituent des espaces primordiaux pour l'ensemble du réseau trophique benthique mais aussi pélagique, où les macro-, méio- et micro-faunes s'alimentent massivement, à marée basse comme à marée haute, directement à la surface du sédiment ou après remise en suspension (Heip et al. 1995, Middelburg et al. 2000, de Deckere et al. 2001). La forte productivité de ces zones ne serait cependant pas possible sans l'action clef des bactéries hétérotrophes, qui participent à recycler l'abondante matière organique des vasières (terrigène, exportée depuis les communautés adjacentes ou autochtone) (Cook et al. 2004) en sels nutritifs indispensables à la productivité biologique.

Le biofilm microphytobenthique est composé principalement de diatomées épipéliques (Admiraal et al. 1984, Underwood & Kromkamp 1999, Haubois et al. 2005b, Sahan et al. 2007) et de bactéries hétérotrophes, qui libèrent toutes deux de fortes quantités de substances polymériques extracellulaires (EPS).

## Intégration de la thèse dans le programme de recherche (ANR) VASIREMI

Jusqu'alors, il n'existait pas de connaissances intégrées du réseau trophique sur les vasières. La région Poitou-Charentes est une région riche en vasières, aussi au sein du laboratoire LIENSs (UMR 6250 Université de La Rochelle – CNRS), L'ANR VASIREMI (VASIères et REseaux MIcrobiens) a été créée dans le but d'identifier le rôle trophique des biofilms microbiens dans les vasières intertidales. Différents workpackages divisés en tasks ont été définis et sont représentés en figure I.3. Mon travail de thèse s'inscrit dans le programme VASIREMI au niveau des WP 1.1, en focalisant sur les interactions entre les diatomées, les bactéries et les substances polymériques extracellulaires (EPS) qui sont les principales composantes du biofilm microphytobenthique.

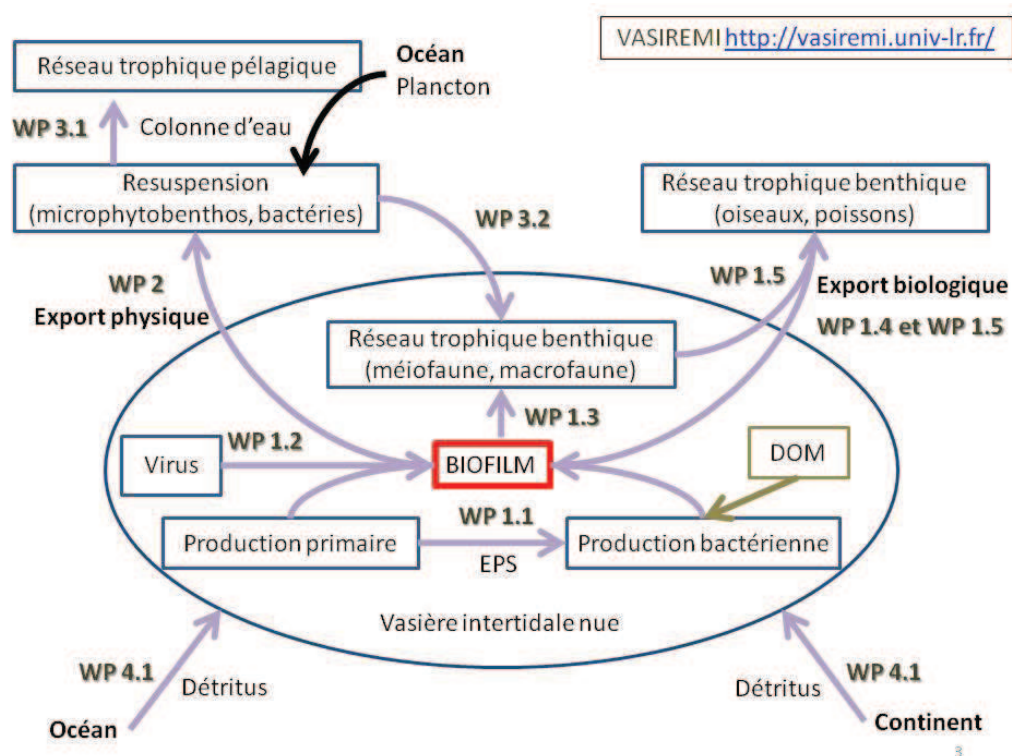
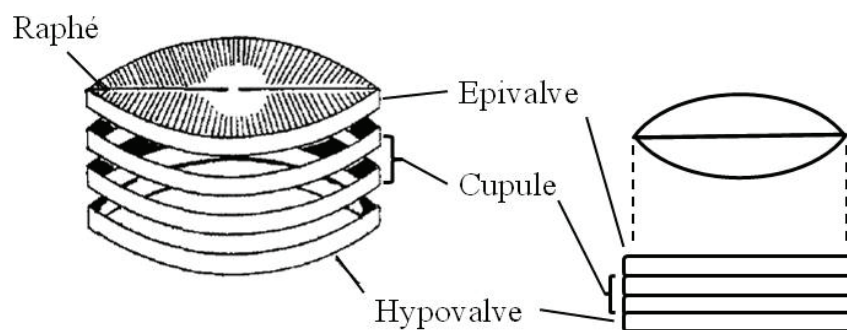


Figure I.3 : schéma des workpackages de l'ANR VASIREMI

## Les diatomées du biofilm

Les diatomées (Bacillariophyta) sont des algues unicellulaires caractérisées par une membrane à deux valves emboîtées (frustule) contenant de l'acide silicique et qui les rend très résistante du point de vue mécanique et chimique (fig. I.4). Les diatomées pennées ont la capacité de se déplacer (Consalvey et al. 2004) selon un mécanisme unique chez les unicellulaires et qui consiste en l'excrétion d'un mucilage par un canal et des pores situés sur le frustule (Edgar & Pickettheaps 1984). Avec plus de 20000 espèces (Mann & Droop 1996) les diatomées constituent le groupe d'algues avec la plus grande richesse spécifique (Mann 1999). Dans les vasières européennes, ce sont les espèces appartenant au genre *Navicula* qui sont les plus présentes (voir discussion dans Haubois et al 2005). La diversité et la proportion de chacune des espèces de diatomées dans les biofilms microphytobenthiques varie dans le temps (Thornton et al. 2002, Haubois et al. 2005b, Sahan et al. 2007) tandis que selon les auteurs, la biomasse microalgale peut être constante dans le temps ou bien suivre une dynamique saisonnière avec une augmentation au printemps et en été (Cf Sahan et al. 2007).



**Figure I.4 :** représentation schématique d'une diatomée naviculoïde, d'après Underwood & Paterson (2003). A : schéma du frustule siliceux d'une diatomée épipélique du genre *Navicula*, montrant l'épivalve supérieure et l'hypovalve inférieure, le raphé (canal longitudinal) et les bandes de silice (cupules) qui joignent les valves. B : en haut : vue de la valve ; en bas : vue de la ceinture d'une diatomée naviculoïde.

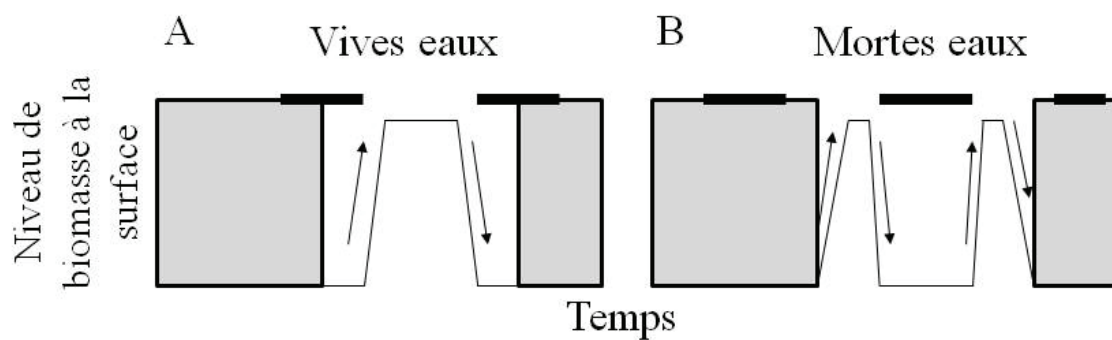
Les cellules migrent dans les sédiments vaseux selon des rythmes endogènes et en réponse à des signaux environnementaux comme les rythmes tidaux et le nycthémère (Serodio et al. 1997, Underwood & Kromkamp 1999, Consalvey et al. 2004, Herlory et al. 2004). Les deux situations extrêmes parmi les associations de phases entre le cycle tidal semi-diurne et le nycthémère sont représentées en figure I.5. Lorsque la marée basse coïncide avec le midi solaire (fig. I.5-A), il y a seulement une émergence diurne complète, tandis que lorsque c'est la marée haute qui coïncide avec le midi solaire (fig. I.5-B), il y a deux courtes émergences diurnes, tôt le matin et tard l'après-midi. Dans un tel cas, un minimum d'une heure d'exposition est requis pour pouvoir observer une migration vers la surface puis en profondeur. Au cours d'une marée basse diurne (figure I.6, tirée de Herlory et al. 2004) de 4h30, il a été montré que les diatomées migrent rapidement (15 min) vers la surface après l'exondation, puis commencent à diminuer progressivement en surface après 2h30 d'émergence.

De manière générale, à la surface des vasières, les biomasses augmentent lors des émergences (production de matière) puis diminuent pendant les immersions (Blanchard et al. 1998). Des régulations de la biomasse maintiennent les quantités de diatomées en deçà d'une valeur maximale (Blanchard et al. 2001) : il s'agit de régulations de type « top down », conséquences de la remise en suspension à marée haute ou du broutage du biofilm par les dépositivores, ainsi que d'une régulation de type « bottom-up » selon laquelle la production nette est d'autant plus faible que la biomasse en début d'émergence est forte.

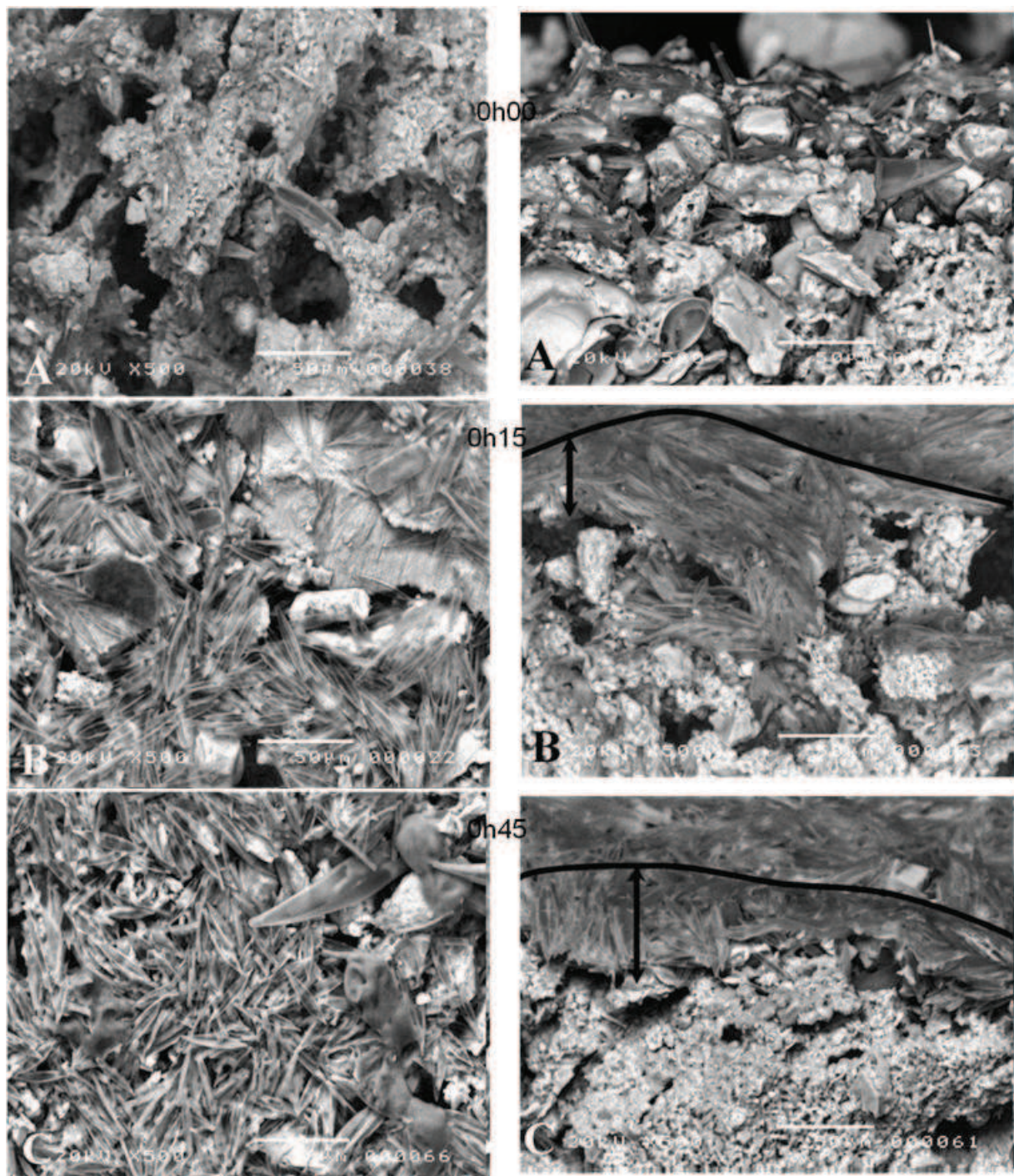
## **Les substances polymériques extracellulaires (EPS) du biofilm**

Potentiellement tous les microorganismes qui vivent à la surface de la vasière et qui s'associent aux biofilms peuvent sécréter des EPS (enzymes, déchets métaboliques, substances stabilisantes, etc). Cependant, en raison de leur plus forte abondance et biomasse au sein des biofilms, les diatomées y sont les producteurs majoritaires des EPS qui vont intervenir dans l'adhésion, la mobilité, les réponses physiologiques. Des photographies de ces EPS sont présentées en figure I.7 (Hoagland et al. 1993, Black et al. 2002), et un schéma des différentes formes sous lesquelles on les trouve est donné en figure I.8 (Hoagland et al. 1993). Les EPS sont principalement des polysaccharides (Hoagland et al. 1993, Underwood & Paterson 2003) et des glycoprotéines. Les bactéries participent significativement à la libération de substances polymériques dans le biofilm mais dans une moindre mesure (van Duyl et al. 1999, Mueller et al. 2006, Lundkvist et al. 2007).

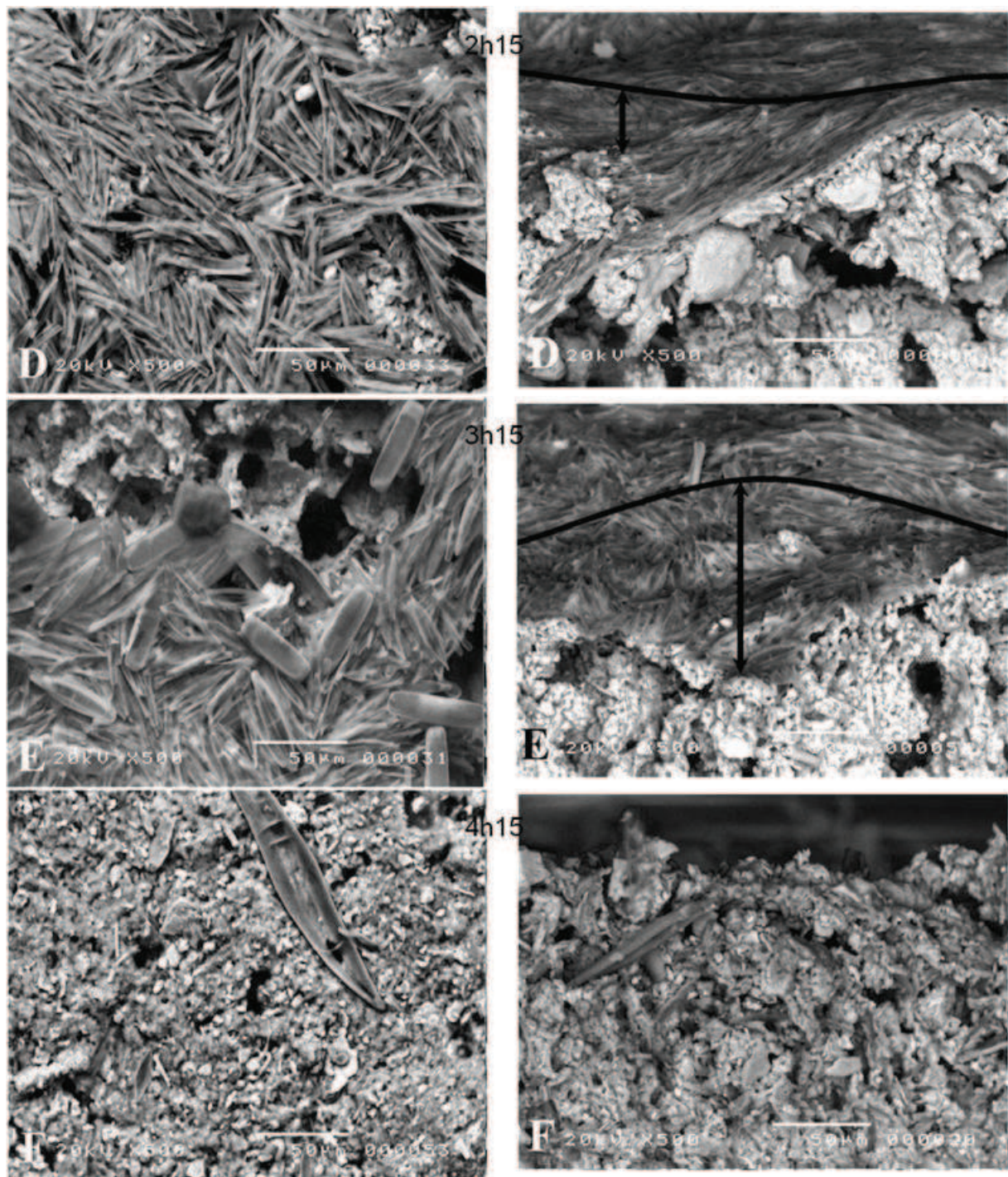
Des organismes tels que les gastéropodes, qui peuvent se trouver en fortes densités à certaines périodes, sont à l'origine de la sécrétion d'un mucus dont les composants peuvent potentiellement contaminer les mesures des EPS sécrétées par les microorganismes du biofilm.



**Figure I.5 :** (tirée de Guarini et al. 1999) résumé qualitatif des facteurs environnementaux influençant l'augmentation et la diminution de la biomasse microphytobenthique au sein de la couche supérieure des vasières intertidales de Marennes-Oléron. Les barres noires représentent les périodes nocturnes, tandis que les zones grisées représentent la marée haute. Les flèches indiquent la direction de la migration de toute la communauté, tandis que les lignes solides représentent la quantité de biomasse à la surface du sédiment. Les deux situations extrêmes parmi les associations de phases entre le cycle tidal semi-diurne et le nyctémère sont représentées. A : la marée basse coïncide avec le midi : il y a seulement une émergence diurne complète. B : quand la marée haute coïncide avec le midi solaire, il y a alors deux courtes émergences diurnes, tôt le matin et tard l'après-midi.



**Figure I.6 :** observation en microscopie électronique à balayage de la répartition des diatomées au cours d'une marée basse à la surface du sédiment (images de gauche) et en profondeur (images de droite). A : dès le début de l'émergence ; B : après 15 minutes ; C : après 45 minutes. La surface du sédiment est figurée par une ligne noire, les flèches représentent l'épaisseur du biofilm. Images de Herlory et al. 2004.

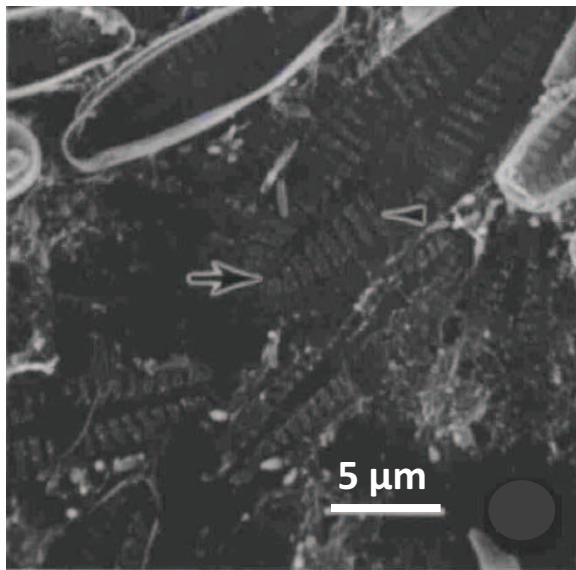


**Figure I.6** (suite): D : après 2h15 ; E : après 3h15 ; F : après 4h15. La surface du sédiment est figurée par une ligne noire, les flèches représentent l'épaisseur du biofilm. Images de Herlory et al. 2004.

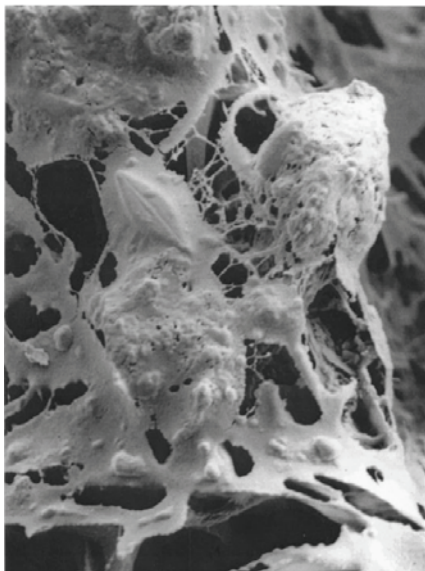


Classiquement, on distingue 4 fractions principales d'EPS :

- Les EPS colloïdales qui sont diffuses dans le milieu environnant la cellule
- Les EPS liées qui sont étroitement associées au frustule des diatomées
- Pour chacune de ces deux fractions, il existe des molécules de haut poids moléculaire (HMW pour High Molecular Weight) et de bas poids moléculaire (LMW, Low Molecular Weight).

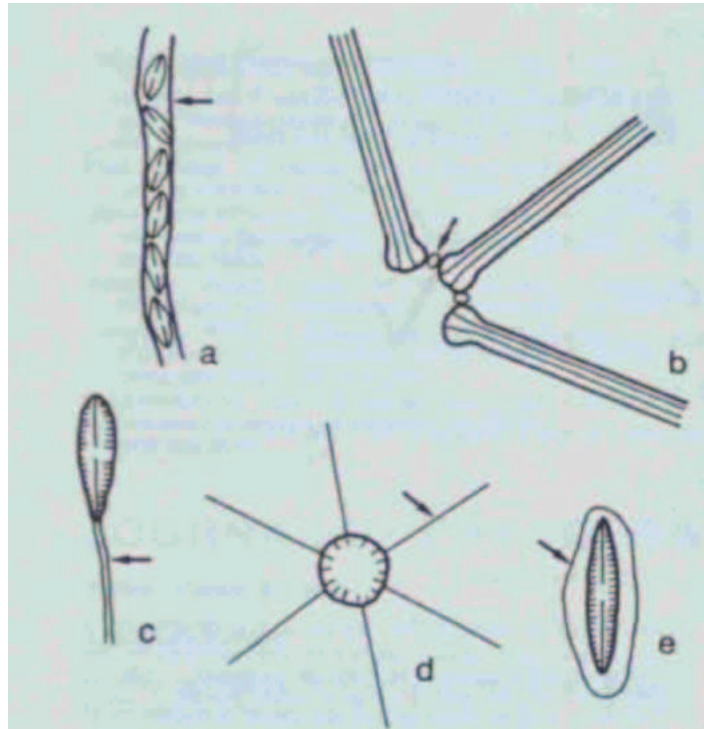


**Figure I.7-A :** Film adhérent de plusieurs cellules d'*Achnanthes lanceolata* sur une surface en verre après une expulsion mécanique naturelle par les valves adhérentes (Hoagland et al. 1993). Noter que les EPS sont originaires du raphé (large flèche) et des pores (tête de flèche).



**Figure I.7-B :** Photographie SEM de la couche de surface d'une vase estuarienne montrant des diatomées benthiques (en forme de losange) enlisées dans des couches et des filaments d'EPS. Les diatomées mesurent environ 20µm de long. (Black et al. 2002).

-



**Figure I.8** : différentes formes d'EPS de diatomées (Hoagland et al. 1993). a : tubes de *Navicula*, b : coussinets d'*Asterionella*, c : pédicule de *Gomphonema*, d : fibrilles de diatomées centriques et e : film adhérent de diatomées pennées.

La nomenclature utilisée dans la littérature pour désigner les EPS est hétérogène. Les différentes méthodologies d'extraction ont conduit à nommer de la même manière des extraits plus ou moins contaminés par d'autres substances, que ce soit par une fraction d'EPS différente ou par des substances internes à la cellule, telles que les réserves glucosidiques des vacuoles. Ainsi, la grande majorité des articles actuels traitant des EPS de diatomées intègrent des erreurs dans la désignation des fractions extraites (Chiovitti et al. 2004, Takahashi et al. 2009) et leurs résultats doivent être nuancés.

### *Extraction des EPS*

Avant toute chose, il convient de définir si les extractions sont réalisées sur du sédiment frais ou congelé, voire lyophilisé. Dans ces deux derniers cas, il faut prendre en compte le fait que le traitement a très certainement conduit à l'éclatement des cellules, permettant la libération de substances internes riches en glucose. La procédure d'extraction couramment utilisée pour fractionner les EPS consiste en une séquence de séparations de plus en plus astringentes. Dans un premier temps, la fraction colloïdale peut être obtenue par solubilisation des polymères dans l'eau de mer. Cette fraction contient du matériel polymérique et des sucres de plus faible poids moléculaire. Puis, afin d'extraire la fraction liée, l'utilisation de l'eau chaude est fréquente. Cependant, elle conduit à un déséquilibre osmotique qui provoque l'éclatement de la cellule. Ainsi, les modes opératoires utilisant l'eau chaude n'ont pas permis de mesurer la quantité d'EPS liées mais plutôt un mélange d'EPS liées et de substances internes, telles que les glucanes de réserve. La méthode a été affinée par l'utilisation d'une résine échangeuse d'ions (Takahashi et al. 2009) : la résine a une plus forte affinité au frustule avec lequel elle va s'associer, décrochant ainsi les EPS liées qui se retrouvent solubilisées dans le milieu d'extraction. Cette méthode a également une limite : les EPS les plus étroitement insérées dans le frustule peuvent y rester associées et alors les valeurs mesurées seront possiblement inférieures aux valeurs réelles de quantité d'EPS liées. Finalement, il est courant d'extraire une dernière fraction au bicarbonate chaud, avec l'objectif d'accéder aux EPS du frustule. De nombreux auteurs ont montré une forte proportion de glucose dans des fractions qui ont été très certainement contaminées, à leur insu, par les substances internes riches en glucose (Cf discussion dans Bellinger et al. 2005).

La séparation des composés HMW et LMW se réalise simplement dans l'alcool à 70%. La taille des molécules ainsi séparées est rarement clairement précisée. Bhaskar & Bhosle (2005) indiquent que les EPS HMW englobent les substances de 10 à 30 kDa (milieu planctonique) quand de Brouwer & Stal (2001) observent que les HMW sont des molécules de taille supérieure à 100 kDa, les LMW étant composées de toutes les autres; Chiovitti et al (2006) présentent des fractions de HMW liées de plus de 87 kDa, ainsi qu'une fraction soluble dans l'eau et insoluble dans une base qui comporte majoritairement des molécules de plus de 100 et de plus de 20000 kDa. Denkhau et al. (2007) indiquent que les exopolysaccharides, qui constituent une part importante des EPS, sont des composés de haut poids moléculaire allant de 500 kDa à 2000 kDa. Dworkin et al. (2006) utilisent LMW pour désigner les molécules de moins de 100 kDa. Globalement, la classification des EPS en LMW

ou HMW sur la limite de 1 kDa comme dans le cas d'EPS bactériennes (Amon & Benner 1996) ou comme cela est coutume pour les biogéochimistes (voir Thornton et al., 2010) ne semble pas être appropriée pour les EPS des biofilms marins. Une limite de 100 kDa semble davantage s'accorder aux travaux conduits jusqu'à présent. L'utilisation de filtres (de Brouwer & Stal 2001) permet d'effectuer une séparation des EPS en classes de taille mieux définies.

### *Sécrétion des EPS*

Les quantités et la composition chimique de ces EPS varient avec l'intensité des radiations solaires, les conditions en nutriments, le stade de croissance de la cellule et les rythmes de migration verticale liés à la photosynthèse et à la marée (Stal & de Brouwer 2003, Underwood & Paterson 2003, Abdullahi et al. 2006, Hanlon et al. 2006). Cela conduit à la sécrétion d'une large gamme d'EPS par les diatomées, avec une contribution relative non caractérisée, mais significative, des bactéries (Mueller et al. 2006).

La production naturelle d'EPS par les diatomées présente une rythmicité qui a bien été décrite dans la littérature (de Winder et al. 1999, Smith & Underwood 2000, de Brouwer & Stal 2001, Perkins et al. 2001, Orvain et al. 2003, Hanlon et al. 2006) et est associée aux migrations au travers du sédiment (Hoagland et al. 1993) liées aux rythmes tidaux et endogéniques (Smith & Underwood 1998), aux réponses physiologiques au stress (Staats et al. 2000b, Krembs et al. 2002, Orvain et al. 2003) et au métabolisme d'overflow (Staats et al. 2000b, Underwood & Paterson 2003). Il existe un consensus général à propos de la dynamique de sécrétion des différentes fractions d'EPS de diatomées. De nombreux auteurs ont montré que la sécrétion des EPS colloïdales, principalement les HMW, était associée à la production primaire (Underwood et Paterson 2003) et qu'elle pouvait correspondre à une réponse métabolique en cas de stress nutritif (Staats et al. 1999, Perkins et al. 2001, Orvain et al. 2003a). Le contenu en glucose des EPS des algues augmente pendant la production et la photosynthèse, particulièrement pour les fractions les plus facilement extractibles des biofilms, tandis que les EPS étroitement liées (extraites par des agents plus astringents) consistent en une distribution plus égale des groupes de monosaccharides (de Brouwer et al. 2002, Bellinger et al. 2005, Abdullahi et al. 2006, Hanlon et al. 2006). Même si la composition exacte des EPS des diatomées n'est pas connue, les différences de composition et de propriétés indiquent qu'une large gamme de différents polymères est sécrétée dans l'environnement (Higgins et al. 2003).

En termes d'impact sur les propriétés des sédiments, les EPS colloïdales HMW peuvent contribuer significativement à limiter la dessiccation en maintenant des niveaux élevés de teneur en eau (Orvain et al. 2003b). Les EPS liées participent à stabiliser les grains du sédiment et réduisent l'érodabilité (Yallop et al. 2000, de Brouwer et al. 2005) mais peuvent aussi servir comme protection contre les hydrolases des bactéries attachées (Smith et al. 1995).

Les produits de la photosynthèse sont pour plus de 70% excrétés sous forme de carbone organique (Smith & Underwood 1998, Goto et al. 1999, de Brouwer & Stal 2001), dont une large portion (plus de 50%) est du matériel polymérique (Underwood & Paterson 2003). Sur la vasière de Brouage, la contribution des EPS dans le carbone organique particulaire est de 18.2% (Galois et al. 2000). Les concentrations peuvent être élevées et atteindre 8,7 mg équivalent glucose par gramme de sédiment (poids sec) (Bellinger et al. 2005). Il y a donc un pool substantiel de carbone organique produit au sein de ses biofilms estuariens et il a été montré qu'il était sujet à la dégradation bactérienne (Decho 2000, Yallop et al. 2000, Covert & Moran 2001, Haynes et al. 2007, Lundkvist et al. 2007, Bellinger et al. 2009). Les EPS peuvent alors alimenter le réseau trophique notamment grâce aux bactéries, via la boucle microbienne (Azam 1998, Middelburg et al. 2000). Parce qu'à la fois la composition chimique et les structures des liaisons des EPS affectent les propriétés de la molécule, il est très probable que des voies spécifiques de la dégradation séquentielle de ces polymères aient été développées par la communauté microbienne (Hanlon et al. 2006).

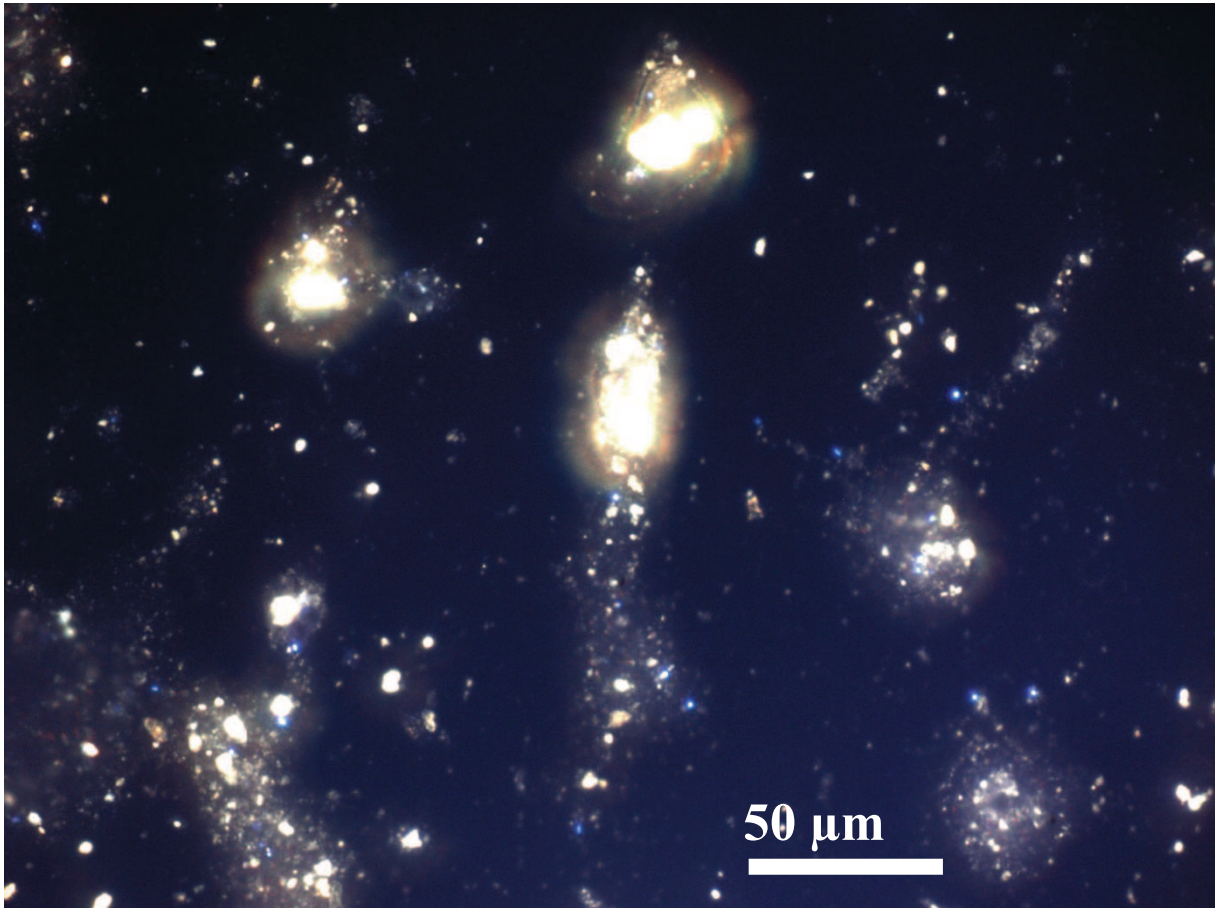
Les bactéries peuvent également produire différents types d'EPS : 1) les polymères encapsulés qui entourent étroitement la cellule et sont principalement produits pendant la phase logarithmique de croissance et 2) les polymères lâches qui sont faiblement associés aux cellules et sont produits pendant la phase stationnaire de croissance (Decho 1990, Decho & Lopez 1993). Les bactéries peuvent aussi excréter des protéines extracellulaires qui sont principalement des exoenzymes déployées pour solubiliser la matière organique externe (Gerbersdorf et al 2008). Le type et la composition des polymères qui sont sécrétés par les bactéries dépendent de l'état physiologique des cellules et des conditions de l'environnement local (Sutherland & Mackenzie 1977). En effet, les facteurs qui affectent la composition et la production d'exopolymères sont : 1) l'état physiologique ou le stade de croissance (logarithmique ou stationnaire), 2) la composition nutritive du milieu de culture et 3) les conditions physiques et ioniques du milieu (Decho 1990). En fonction de leur composition, les EPS sont retrouvées dans les sources trophiques labiles ou dans les barrières réfractaires contre la digestion des cellules microbiennes (Decho & Lopez 1993), ou dans la phagocytose

(Fernandez-Prada et al 2003). Les EPS sont excrétées en tant que capsules servent à répondre à différentes conditions stressantes (parmi lesquelles les stress hydriques) et à stabiliser le pH et l'environnement osmotique à proximité de la cellule microbienne (Costerton et al 1974). Les bactéries sécrètent moins d'EPS que les diatomées (van Duyl et al. 1999, Lundkvist et al. 2007) et leur production nette est constante dans le temps (Lundkvist et al. 2007). Les bactéries peuvent rapidement utiliser les EPS en tant que substrat pour leur nutrition hétérotrophe (Middelburg et al. 2000, Cook et al. 2007, Bellinger et al. 2009) alors qu'elles recyclent la matière organique via la reminéralisation des nutriments et de la matière organique (Hanlon et al 2006).

### **Les bactéries du biofilm**

Les bactéries constituent la forme de vie la plus efficace sur terre, en termes de biomasse totale et en termes de variétés et d'étendue des habitats colonisés, grâce à leur forte plasticité phénotypique (Brown & Williams 1985). Claude Zobell (1943) a montré que les bactéries marines préféraient se développer sur des surfaces, et les bactéries hétérotrophes représentent une part importante de la biomasse du biofilm dans un environnement riche en matière organique (Heip et al. 1995). Leur concentration équivaut à un milliard de cellules par mL de sédiment frais dans les vasières étudiées dans le monde et est relativement stable dans le temps (Schmidt et al. 1998). Dans ces systèmes côtiers qui font l'objet d'un fort apport en matière organique, ces bactéries sont le point critique du bon fonctionnement de l'écosystème. En effet, elles garantissent la reconstitution des stocks de sels minéraux, nécessaires à la photosynthèse, en décomposant et reminéralisant la matière organique. En leur absence, le système ne fonctionne plus (Lévêque 2008).

L'étude des bactéries est complexe dans les sédiments cohésifs : les bactéries peuvent être libres ou attachées aux particules sédimentaires, dans ce cas leur observation directe est limitée. La figure I.9 montre une photographie de bactéries observées en microscopie à épifluorescence après préparation d'une lame d'observation selon la méthode de Porter et Feig (1980). Les particules sédimentaires figurent en jaune, les bactéries en bleu (marquage au DAPI).



**Figure I.9 :** photographie prise en microscopie à épifluorescence montrant les bactéries de la vase. Les bactéries correspondent aux points bleutés, le sédiment apparaît en jaune.

Différents travaux réalisés sur les vasières ont montré que les taux de production bactérienne sont très élevés (Cammen 1991, Hamels et al. 2001, Pascal 2008) malgré une abondance qui reste constante (Schmidt et al. 1998). La production bactérienne est plus élevée en été et en automne tandis que la saison hivernale se caractérise par de plus faibles taux de production dans la vase de Brouage (Pascal 2008). Dans les vasières intertidales, il a été montré que ce sont des mécanismes « top-down » (disparition des cellules) (van Duyl et al. 1999, Pascal 2008) qui sont à l'origine du contrôle de la biomasse bactérienne. Cela implique qu'une forte partie de ces cellules quitte le système, soit en étant consommée directement à la surface du sédiment, à marée basse ou haute, en étant remise en suspension (et consommée dans le cadre de la boucle microbienne (Azam et al. 1983, Azam et al. 1993), ou bien en étant détruite suite à la mort cellulaire ou la lyse virale. Des travaux sur la consommation des bactéries par la méiofaune des vasières en Baie de Marennes-Oléron (Pascal 2008) ont montré qu'au maximum 6% de la production bactérienne était consommée sur la vase et suggèrent

que la lyse cellulaire soit la principale cause de perte de biomasse à la surface de la vase, tandis qu'une part substantielle de la production bactérienne est consommée dans le système pélagique (Azam et al. 1983, Sherr et al. 1987, Ducklow & Carlson 1992).

En dépit de forts niveaux de matière organique dans les sédiments vaseux, un couplage entre la production algale et les activités enzymatiques extracellulaires bactériennes dans les vasières a été mis en évidence lors d'études de terrain (van Duyl et al. 1999, Hanlon et al. 2006) et d'expérimentations sur du sédiment dilué (Goto et al. 2001, Haynes et al. 2007). L'utilisation par les bactéries des composés LMW peut être rapide, de l'ordre de l'heure de production. Le carbone fixé par photosynthèse par le microphytobenthos est transféré vers les bactéries et les métazoaires dépositivores en quelques heures, traduisant une utilisation rapide des sources de carbone labile, dont probablement les EPS (Middelburg et al. 2000, Goto et al. 2001, Underwood & Paterson 2003, Cook et al. 2007). Ces EPS des diatomées sont certainement dégradées séquentiellement, avec les monosaccharides particuliers préférentiellement utilisés par les hétérotrophes. Chez les diatomées planctoniques d'eaux fraîches comme *Thalassiosira* par exemple, le glucose est préférentiellement utilisé lors de la dégradation des EPS, ce qui produit au final un polymère enrichi en sucres plus réfractaires que sont le rhamnose et le fucose (Giroldo et al. 2003). Des expérimentations sur des sédiments dilués (Hofmann et al. 2009) ont montré que les concentrations en EPS LMW augmentaient rapidement (4h), suggérant la dégradation des composés HMW. Une diminution en glucose après 8h et une augmentation en mannose et xylose au sein de la fraction d'EPS après 24h suggère là encore une utilisation initiale des composés riches en glucose préférentiellement à des EPS plus complexes. Bellinger et al (2009) ont montré par marquage au  $^{13}\text{C}$  que le carbone assimilé photosynthétiquement par les microalgues des biofilms était d'abord intégré par les diatomées sous forme de glucanes, des sucres de réserves, puis rapidement utilisé pour produire des acides gras phospholipidiques et des EPS. En 4h, le carbone marqué des saccharides des EPS avait été utilisé par des bactéries hétérotrophes, Gram négatives (en moins de 12h) puis Gram positives (en plus de 24h). Cela suggère que des consortia de spécialistes existent. Dans les estuaires, les taxons bactériens dominants impliqués dans la dégradation d'une large gamme de composés de carbone organique appartiennent aux *Flavobacteria* et *Sphingobacteria* (précédemment *Cytophaga*-*Flexibacter*-*Bacteroides*) et aux  $\alpha$ -  $\gamma$ - protéobactéries. Une analyse ADN récente a montré que de petits sous groupes de bactéries hétérotrophes des sédiments répondaient aux changements en concentration en EPS (Hanlon et al. 2006) et que les sédiments dilués enrichis avec des EPS pouvaient conduire à la sélection de membres parmi les  $\gamma$ -protéobactéries, particulièrement

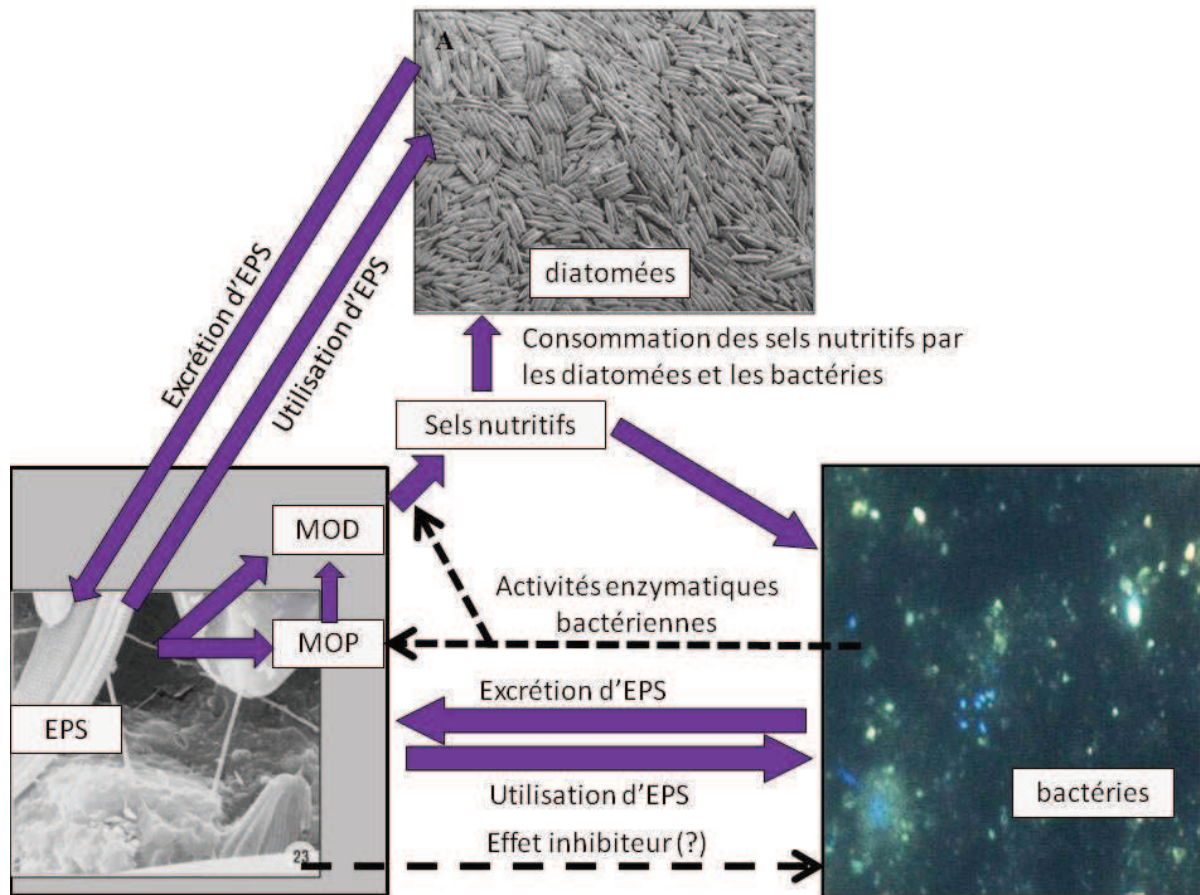


*Acinetobacter* sp. (Haynes et al. 2007). Ces expérimentations suggèrent que la dégradation des carbohydrates (sucres) extracellulaires dérivés des diatomées dépend de réponses taxon-spécifiques et substrat-spécifiques au sein de la communauté bactérienne.

### **Les bactéries, les diatomées et les EPS dans le biofilm**

Lorsqu'elles vivent en consortium, la présence des diatomées stimule la croissance des bactéries, même si ce n'est pas autant qu'en présence des EPS uniquement (Waksman & Butler 1937). En revanche, en cas de carence en nutriments, les diatomées entrent en compétition pour les nutriments avec les bactéries et la croissance bactérienne devient limitée (Waksman & Butler 1937). La croissance des bactéries hétérotrophes est également stimulée par la décomposition de diatomées mortes (Waksman & Butler 1937) en raison de la libération des sucres de réserves internes qui sont plus labiles que les EPS. L'absence de contamination bactérienne même avec de fortes densités microbiennes pourrait être due à un effet négatif de certaines substances produites par les diatomées sur les bactéries (Smith et al 1995). Bien que le terme EPS ait longtemps été utilisé pour désigner les exopolysaccharides, une part importante de protéines, sous la forme de glycoprotéines, compose les EPS. D'ailleurs les activités bactériennes protéolytiques peuvent être bien supérieures à celles des glucosidases (Smith et al 1992), suggérant que les protéines sont plus efficacement solubilisées que les polysaccharides.

Ainsi, trois composantes majeures interagissent dans le biofilm microphytobenthique (fig. I.10) : les diatomées d'une part, dont les déplacements sont à l'origine de la rythmicité de formation du biofilm, les EPS d'autre part, sécrétées principalement par les diatomées et dont la nature varie en réponse à de nombreux facteurs physiologiques et environnementaux, et enfin les bactéries hétérotrophes, élément clef du bon fonctionnement du système de par leur action de reminéralisation de la matière organique dont les EPS. La formation d'un consortium pourrait également avoir été rendue possible grâce à un effet inhibiteur de certaines EPS algales, qui inhiberait les contaminations bactériennes.



**Figure I.10** : schématisation des interactions entre les bactéries, les diatomées et les EPS dans un biofilm microphytobenthique. Les EPS, la matière organique dissoute (MOD) et particulaire (MOP) sont groupés dans un cadre figurant la matière organique en général.

### Objectifs de la thèse

La conservation d'un écosystème passe d'abord par sa compréhension, notamment sur le plan trophique. Il est essentiel de déterminer les flux de matière et de comprendre leur déterminisme au sein des vasières afin de pouvoir apporter des solutions de gestion adaptées, ainsi que d'anticiper les effets des changements climatiques et de l'activité humaine, grâce à la modélisation. Le biofilm microphytobenthique est un élément central de cet écosystème, représentant un maillon essentiel de l'ensemble du réseau trophique benthique et pélagique des vasières. Aussi, la dynamique bactérienne, moins étudiée que celle des microalgues, doit encore être définie, avec comme fil conducteur le rôle déterminant de la sécrétion des EPS (quantité, dynamique, nature) dans cette dynamique bactérienne.

Ainsi, dans un premier chapitre, une étude à grande échelle a été conduite pour suivre, in situ et à deux saisons (hiver et été) les **dynamiques des diatomées, des bactéries et des EPS** présentes dans le cm de vase de surface au cours d'une marée basse diurne. Les corrélations entre ces valeurs ont également été étudiées afin de **comprendre les interactions prenant place au sein du biofilm microphytobenthique**. Cette étude a couvert un cycle de marée complet depuis les mortes-eaux où le biofilm n'a que deux courtes périodes pour se développer jusqu'aux vives-eaux avec des marées basses diurnes centrées sur le midi solaire.

Ce suivi sur le terrain a inclus une part non contrôlée (bien que quantifiée) de paramètres externes au biofilm et qui influent sur son développement, tels que des événements de pluie ou la présence de consommateurs du biofilm tels que les hydrobies (*Hydrobia ulvae*).

Afin de valider les hypothèses émises lors de ce suivi sur le terrain, le deuxième chapitre décrit une étude conduite en conditions contrôlées dans un mésocosme tidal reproduisant la vasière et la marée en condition estivale. Ce suivi a permis d'éliminer la majeure partie des prédateurs bactériens mais aussi de suivre les activités enzymatiques et la production bactériennes, dont la logistique était trop difficile à mettre en œuvre lors du suivi sur le terrain.

Les études alors conduites ont permis de suivre les variations des bactéries, des diatomées et des EPS différenciées selon leur degré d'attachement à la cellule (liées ou colloïdales) et leur taille (haut ou bas poids moléculaire). Il est attendu que ces composés aient des compositions variables, notamment en terme de sucres, ce qui les rendrait donc plus ou moins labiles aux bactéries. La microscopie confocale à balayage laser associée à l'utilisation de lectines permet justement de visualiser et quantifier des monosaccharides précis dans un biofilm et cela de façon non destructive. Il a été observé que les conditions naturelles pouvaient soumettre le biofilm à une carence en sels nutritifs et notamment en ammonium. Un tel état provoque une modification de la composition des EPS facilitant ainsi la distinction entre EPS colloïdales et liées, via leur marquage ainsi que leurs effets sur la dynamique bactérienne.

Aussi, le troisième chapitre décrit l'évolution de monosaccharides sécrétés dans un biofilm en croissance normale ou soumis à une carence en ammonium et son effet sur les bactéries au sein de biofilms cultivés sur des lamelles de verre en microcosme. L'objectif de cette partie est de mettre en évidence les compositions caractéristiques des différentes EPS sécrétées et définir leurs affinités avec le compartiment bactérien.



## **CHAPITRE 1**

Interactions entre bactéries et diatomées au sein d'un biofilm microphytobenthique développé à la surface d'une vase intertidale (Baie de Marennes-Oléron, Charente maritime) à deux saisons et sur un cycle de marée : rôle des substances polymériques extracellulaires (EPS).

---



## Introduction

Les vasières intertidales représentent de vastes surfaces à marée basse dans les estuaires macrotidaux. Bien qu'elles aient été longtemps considérées comme des « espaces perdus », il apparaît désormais qu'elles comptent parmi les zones marines les plus productives du monde (Pomeroy & Wiegert 1981, Mann 1982). Cette forte productivité est en partie due à la formation périodique d'un biofilm microphytobenthique qui se développe à la surface du sédiment à chaque période d'émersion diurne (Blanchard et al. 2001, Underwood & Paterson 2003). Du fait que la biomasse du biofilm est concentrée à la surface a conduit au concept d'un compartiment de surface indépendant principalement responsable de la production primaire (Herlory et al. 2004). Ce biofilm se compose de 1) microphytobenthos, principalement des diatomées épipéliques (Admiraal et al. 1984, Underwood 1994, MacIntyre & Cullen 1996, Underwood & Kromkamp 1999), 2) de procaryotes, dont une part majoritaire de bactéries hétérotrophes (van Duyl et al. 1999) et 3) les substances polymériques extracellulaires (EPS) sécrétées à la fois par le microphytobenthos et par les procaryotes (Decho 1990, Heinzemann & Wallisch 1991, Decho 2000). Bien que le terme EPS ait longtemps été utilisé pour désigner les exopolysaccharides, les substances polymériques extracellulaires se composent de sucres mais aussi d'autres composants tels que les acides aminés, les sucres aminés, les phosphates, pyruvates, groupes acyls, acides uroniques et des glycoprotéines (Decho 1990, Flemming & Wingender 2002). La sécrétion de ces substances est majoritairement imputable aux diatomées, et constituerait une source de matière labile prise par les bactéries hétérotrophes. Ces dernières ont montré des taux de production (Cammen 1991, Hamels et al. 2001, Pascal 2008) et des abondances fortes sur les vasières (Schmidt et al. 1998) et qui pourraient être stimulés par cette ressource EPS. Les principales fractions d'EPS se distinguent par leur origine, par la taille des composés, mais aussi par leur composition (de Brouwer & Stal 2001, Underwood & Paterson 2003, Abdullahi et al. 2006,



Hanlon et al. 2006), ce qui rend leur assimilation par les bactéries plus ou moins complexe (Giroldo et al. 2003, Hanlon et al. 2006, Haynes et al. 2007, Bellinger et al. 2009). Ces fractions sont sécrétées différemment selon l'état de la cellule microalgale, son activité ou l'influence de paramètres extérieurs (réponse à un stress salin par exemple). Jusqu'à présent, ces fractions ont été isolées par une méthodologie inadaptée dans la plupart des travaux (Chiovitti et al. 2004, Takahashi et al. 2009). Une étude utilisant un isotope du carbone (Bellinger et al. 2009) ont cependant pu mettre en évidence un passage du carbone assimilé photosynthétiquement par les diatomées vers différentes communautés bactériennes, mais aucune étude n'a pas encore montré la nature du lien établi entre la sécrétion des fractions classiquement étudiées d'EPS (colloïdales, liées, de haut poids moléculaire HPM et de bas poids moléculaire BPM), les diatomées et les bactéries lors d'une marée basse diurne, sur un cycle de marée complet.

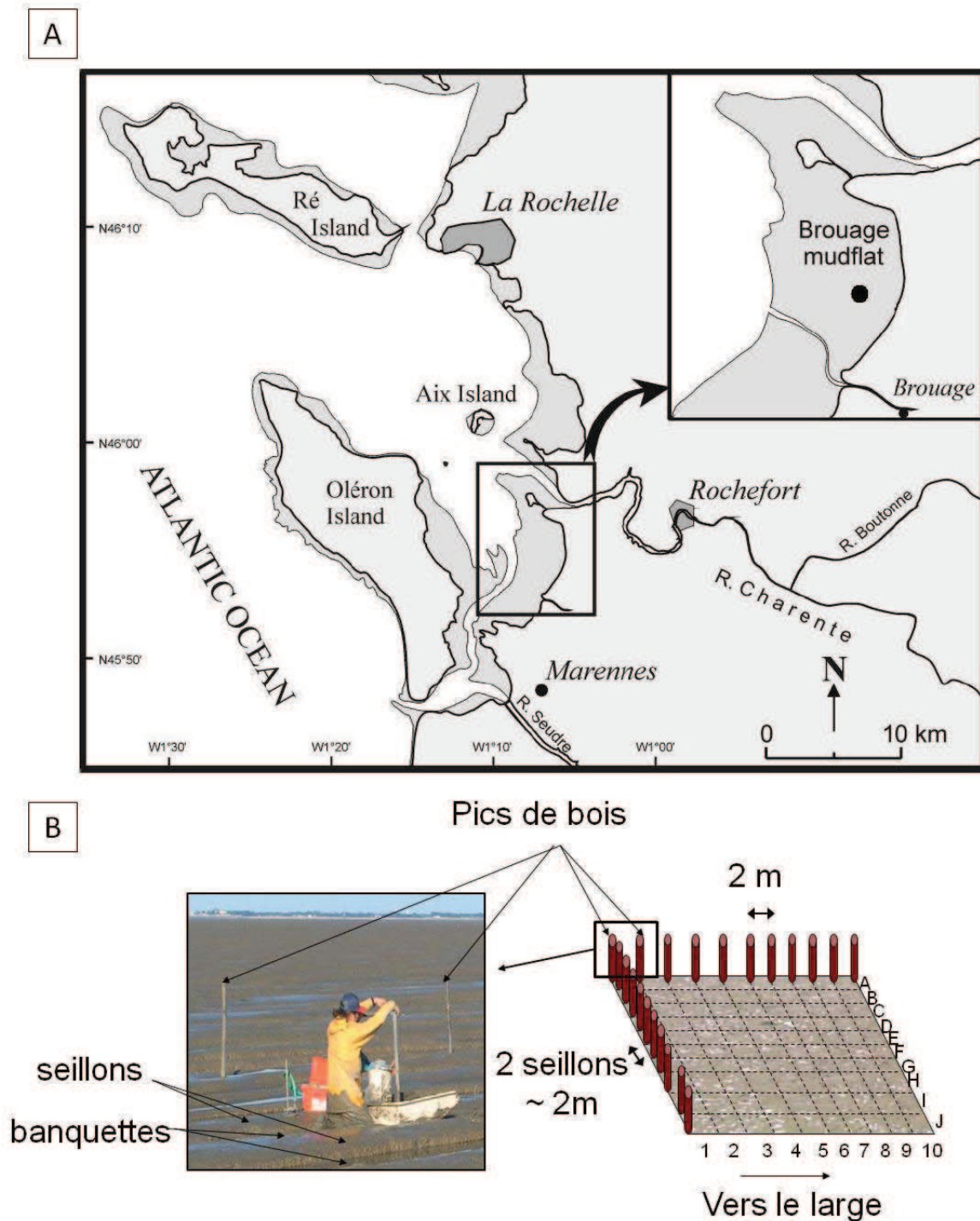
Puisque ces sécrétions varient selon les conditions environnementales, l'objectif de ce premier chapitre est de décrire à fine échelle les évolutions des diatomées, en utilisant les mesures de chlorophylle *a* (chl *a*) comme indice, des bactéries hétérotrophes et des différentes fractions d'EPS, en tentant de définir les interactions qui pourraient s'établir entre elles. Ainsi, le sédiment de surface (1<sup>er</sup> cm) a été analysé chaque heure de la marée basse diurne d'un cycle de marée complet (mortes-eaux – vives-eaux) à deux saisons contrastées : l'hiver (février 2008) et l'été (juillet 2008).

## Matériel et méthodes

### *Site d'étude et méthode d'échantillonnage*

L'étude a été conduite pendant deux saisons, en hiver du 16 au 24 février 2008, et en été du 13 au 26 juillet 2008, sur la vasière de Brouage, dans la baie de Marennes-Oléron, une vasière intertidale tempérée de Charente-Maritime sur la côte atlantique française (fig. 1.1-A). Cette baie est caractérisée par des marées semi-diurnes avec des fluctuations du marnage entre les vives-eaux et les mortes-eaux (environ 6 m pendant les vives-eaux) et un cycle de 15 jours d'émersion coïncidant avec le midi solaire. La marée basse survient à midi pendant les vives-eaux tandis que la marée haute survient à midi pendant les mortes eaux. En conséquence, pendant les marées de vives-eaux, le moment où la surface maximale est émergée correspond au moment où l'énergie solaire qui arrive sur la vasière est la plus forte.

Tous les échantillonnages ont eu lieu dans une aire d'étude expérimentale de 20 m × 20 m définie par deux séries perpendiculaires de 11 pics en bois espacés de 2 m. Après l'échantillonnage d'hiver, la zone a été déplacée de quelques mètres pour échantillonner en été sur une zone non impactée. Cette zone d'étude couvre un système de banquettes-seillons (fig. 1.1-B). Les pics de bois définissent les coordonnées de sous-unités (des quadrats de 2 m × 2 m, fig. 1.1-B). Chaque jour, trois quadrats choisis au hasard et utilisés comme répliqués sont échantillonnés chaque heure du début à la fin de la période d'émersion diurne. Ainsi il a été possible d'effectuer 4 prélèvements à marée basse dans la plupart des cas, t<sub>0</sub>, t<sub>1</sub>, t<sub>2</sub> et t<sub>3</sub> qui sont respectivement les échantillons prélevés à 0h, 1h, 2h et 3h après le début de la marée basse. L'utilisation d'un aéroglisseur a permis d'optimiser les déplacements sur la vasière et de rapporter rapidement à la plage les prélèvements effectués dans la zone d'étude.



**Figure 1.1** : site d'échantillonnage et définition des quadrats de la zone d'étude. A : localisation du point d'échantillonnage et de la vasière de Brouage. B : mise en place des pics de bois et système banquette-seillon de la zone étudiée.

Cinq carottes (15 cm de diamètre, environ 200 mL) sont prélevées sur chaque quadrat. Leur premier cm est coupé à l'aide d'une spatule et placé dans une boîte en plastique hermétique commune. Seules les banquettes ont été échantillonnées puisqu'il a été montré que les biofilms ne se trouvent normalement pas dans les seillons (Blanchard et al. 2000). Certaines difficultés techniques ont empêché l'échantillonnage de séries complètes à marée basse à certains jours.

Chaque jour, à t1, un prélèvement supplémentaire de 3 carottes (5 cm de diamètre) a été réalisé dans chaque quadrat pour estimer les densités du gastéropode *Hydrobia ulvae*. Les 2 premiers cm de chaque carotte ont été mélangés.

Tous les échantillons ont été ramenés à la plage où, pour chaque boîte, la vase est d'abord homogénéisée puis répartie entre différents flacons et conservée pour les analyses ultérieures. Les échantillons collectés pour *Hydrobia ulvae* ont été tamisés (500  $\mu\text{m}$  de maille) et congelés ( $-20^{\circ}\text{C}$ ).

L'intensité lumineuse mesurée à la surface de la vasière pendant l'étude ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a été estimée grâce à un capteur Licor et aux données Météo France.

### *Estimation de l'abondance de bactéries hétérotrophes*

Les abondances bactériennes ont été estimées à partir de 5 mL de vase homogénéisée fixée par 5 mL de formol filtré sur 0,2  $\mu\text{m}$  (concentration finale de 2%) et stockée à 4  $^{\circ}\text{C}$ . Afin de détacher les bactéries attachées aux particules de sédiment, 1 mL de sédiment fixé a été dilué successivement au demi, puis au dixième et enfin au centième avec du pyrophosphate filtré sur 0,2  $\mu\text{m}$  (concentration finale de 0,01 M). Les échantillons dilués ont été incubés à 4  $^{\circ}\text{C}$  pendant au moins 30 minutes puis soniqués (60 W, 30 s). Les bactéries ont été fixées avec du 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, concentration finale de 2500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pendant 15 minutes dans l'obscurité puis filtrées sur des membranes

Nucéopore noires (Porter & Feig 1980). Les cellules bactériennes sont été observées au microscope à épifluorescence ( $\times 1000$ , Axioskop 2 mot plus – Zeiss) équipé d'une caméra (AxioCam MRc5 – Zeiss) et leur nombre a été enregistré.

### *Mesure de la concentration en pigments*

Environ 80 mL de sédiment homogénéisé ont été conservés congelés ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) à l'obscurité avant d'être lyophilisés. Environ 100 mg de ce sédiment lyophilisé et la totalité du sédiment de chaque section de microprofils ont été mis dans de l'acétone (concentration initiale de 90%) sous agitation pendant 18h au noir. Après centrifugation ( $4^{\circ}\text{C}$ , 2000 g, 5 min), la fluorescence du surnageant a été mesurée avec un fluorimètre Fluorometer Turner TD-700 avant et après acidification (10  $\mu\text{L}$  HCl de concentration initiale 0,3 M pour 1 mL MeOH). La chl *a* et les phaeopigments ont alors été mesurés en utilisant la méthode fluorimétrique (Lorenzen 1966) et sont exprimés en  $\text{mg chl } a \mu\text{g}^{-1}$  de sédiment sec (PS).

### *Mesures de la quantité de sucre et protéines dans les substances polymériques extracellulaires (EPS).*

#### Extraction

Cinq mL de sédiment frais sont mélangés dans des tubes à centrifuger de 15 mL, à 5 mL d'eau de mer artificielle (artificial sea water ASW) filtrée sur 0,2  $\mu\text{m}$  (filtres VWR international) et autoclavée. Après avoir été vortexés, les tubes ont été centrifugés à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  et 3000 g pendant 10 minutes. Le surnageant, contenant la fraction colloïdale, a été collecté dans un nouveau tube à centrifuger de 15 mL et conservé congelé ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'aux analyses ultérieures. Les EPS liées ont été extraites du culot en ajoutant environ 1 g de résine échangeuse de cations (Dowex Marathon C,  $\text{Na}^{+}$ ; Sigma-Aldrich) et 5 mL d'ASW. Après resuspension, les tubes sont délicatement agités pendant 1h à  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis centrifugés ( $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 3000 g, 10 min). Le surnageant a été collecté et conservé congelé ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) jusqu'aux analyses

suivantes. Le culot, qui n'est pas considéré dans la présente étude, se compose alors de sédiment et les polymères résiduels, un mélange d'EPS liées qui ne se sont pas efficacement désolidarisés du frustule et de substances internes.

### Séparation des composés de HPM et BPM

Pour chaque fraction (colloïdale, liée), les substances HPM et BPM sont extraites en incubant les échantillons dans l'éthanol absolu (concentration finale de 70%) pendant 16 heures à -20 °C. Après centrifugation (10 °C, 4000 g, 30 min) les composés HPM sont dans le culot tandis que les composés BPM sont dans le surnageant. Le surnageant a été transvasé dans un nouveau tube puis le surnageant et le culot ont été placés dans un bain sec (60 °C) sous un flux d'air pendant 6 à 48 heures selon les fractions. Les extraits ainsi séchés sont alors remis en suspension dans 5 mL d'eau distillée et congelés à -20 °C jusqu'aux mesures de la teneur en sucres et en protéines.

### Mesure de la concentration en sucres et protéines

Pour chaque fraction, 1 mL d'aliquot a été utilisé pour mesurer la concentration en sucres par la méthode de Dubois (Dubois et al 1951) avec du D-glucose (Sigma-Aldrich) comme standard. Pour les échantillons d'hiver et pour les fractions BPM d'été, un autre mL a été utilisé pour mesurer la concentration en protéines avec la méthode de Lowry (Lowry et al 1951) en utilisant l'albumine de sérum bovin (bovine serum albumine BSA, Sigma-Aldrich) comme standard. Les échantillons et les standards ont été mis à bouillir pendant 15 minutes dans un bain marie (100 °C). L'absorbance a été lue par spectrophotométrie à 750 nm (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech). Pour les échantillons HPM d'été, la méthode de Bradford a été utilisée après qu'un test ait montré qu'elle était mieux adaptée à la mesures des composés protéiques HPM (Semedo Cabral & Orvain, communication personnelle), en utilisant un luminomètre (Mithras LB 940 Berthold Technologies).

### *Autres paramètres du sédiment de surface*

Des échantillons de 40 mL ont été congelés (-20 °C) pour les mesures de protéines. La méthode de Lowry (Lowry et al 1951) a été appliquée sur un mélange sédiment:ASW avec un ratio de 1:4. Brièvement, le mélange est incubé avec le premier réactif. Après 20 min d'incubation à température ambiante, le second réactif est ajouté au mélange. Après centrifugation (16 °C, 100 g, 2 min), l'absorbance du surnageant a été mesurée grâce à un spectrophotomètre (CECIL CE2021) à 700 nm et convertie en teneur en protéine avec la BSA comme standard.

Pour les sels nutritifs (phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$ , nitrate  $\text{NO}_3^-$ , silice Si), nitrites  $\text{NO}_2$  et la salinité, l'eau interstitielle a été extraite de 300 mL de sédiment frais par centrifugation (4 °C, 3000 g, 15 min). La salinité a été mesurée (réfractométrie) et l'eau interstitielle a été filtrée sur filtres GF/C et congelée (-20 °C) jusqu'à l'analyse des sels nutritifs par dosage en flux continu (Technicon III – Bran Luebbe). Pour certaines dates d'échantillonnage, le volume d'eau interstitielle a été insuffisant pour mesurer les concentrations en sels nutritifs.

La matière organique (OM) a été estimée à partir de 100 mL de sédiment congelé (-20 °C) dans des flacons prépesés. La matière minérale a été estimée en mesurant la différence entre les poids de sédiment frais puis séché dans un four 4 h à 450 °C (Thermolyne, type 30400 Fuma, numéro de série 412) et convertie en  $\text{g g}^{-1}$  PS. La MO est estimée en calculant la différence entre le PS et le poids de matière minérale, en  $\text{g g}^{-1}$  PS.

Quarante autres mL de sédiment ont été congelés (-20 °C) et lyophilisés pour une estimation ultérieure des teneurs en C et N en utilisant un analyseur à carbone et azote (1500 CARLO ERBA).

La granulométrie a été mesurée à partir de 20 mL de sédiment frais homogénéisé et fixé avec du formol (concentration finale de 1%) et conservé à température ambiante. Après homogénéisation, environ 5 mL de sédiment fixé ont été ajoutés à l'eau circulante dans le granulomètre analyseur laser des tailles de particules Malevern astersize 2000.

La teneur en eau du sédiment ( $\text{g d'eau g}^{-1} \text{ PS} \times 100$ ) a été calculée par différence de poids entre le sédiment frais et le sédiment séché 72 h à 60 °C.

### *Tests statistiques*

#### Différences entre les moyennes

Des tests Z ont été conduits afin de vérifier la significativité (avec  $\alpha < 0,05$ ) des différences entre les moyennes des différents paramètres entre les deux saisons, en utilisant ExcelStat.

#### Hétérogénéité spatiale : tests de Mantel

Le test de Mantel permet de définir une autocorrélation d'amplitude R qui vérifie si la distance géographique existant entre deux échantillons est corrélée à la différence entre leurs valeurs, *i.e.* s'il y a un effet spatial (gradient, patch) sur les variables mesurées. L'hypothèse du test de Mantel est que les différences observées entre deux variables auraient été les mêmes quelque soient leurs zones de prélèvement (proches ou non). En associant les échantillons à un grand nombre de coordonnées fictives aléatoires, il est possible de tester cette hypothèse et d'y associer une probabilité P. Ici, 10 000 itérations ont été effectuées, pour la chl *a* et les abondances bactériennes.

#### Corrélations

Afin de tester les liens potentiels entre les variables, les corrélations ont été calculées en utilisant Excel pour calculer le coefficient de corrélation *r* et la probabilité associée que les variables soient effectivement corrélées. Ces tests de corrélations ont été effectués sur les valeurs obtenues en hiver, puis en été et enfin pour l'ensemble des valeurs. Les mesures d'EPS ont été converties en  $\text{g g}^{-1} \text{ PS}$  par un calcul utilisant la teneur en eau du sédiment, aussi afin d'éviter des artefacts lors de l'étude des corrélations, elles seront exprimées en  $\text{g mL}^{-1}$  de sédiment frais.



## Analyse en composantes principales

Les analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées en utilisant ExcelStat. Les données sont automatiquement centrées réduites par le logiciel. Les valeurs manquantes ont été remplacées par la moyenne. Les teneurs en EPS utilisées sont exprimées en  $\text{g mL}^{-1}$  de sédiment frais (Cf. le paragraphe précédent : « Corrélations »).

## **Résultats**

Le tableau 1.1 résume, pour chaque jour et pour chacune des saisons, les valeurs moyennes et les écarts-type correspondant obtenus pour chacun des paramètres suivis sur la vasière.

Les tests de Mantel ont permis d'observer des effets spatiaux significatifs pour la chl  $a$  en hiver ( $R = 0,13$ ,  $P < 0,005$ ) mais aussi, bien que plus faibles, en été ( $R = -0,08$ ,  $P < 0,001$ ). Aucun effet spatial n'a été détecté pour les abondances bactériennes.

Afin de pouvoir comparer de façon pertinente les données récoltées en hiver et en été, les suivis ont été superposés de manière à ce que les coefficients de marée les plus forts correspondent (fig. 1.2-A). Le coefficient de marée le plus élevé en hiver a été enregistré le 22 février 2008 avec une valeur de 98, tandis qu'en été il a été enregistré le 21 juillet 2008 avec une valeur de 82. Ainsi, les données sont comparées de manière à ce que ces deux jours coïncident, ils correspondent alors au jour 9 de chacun des suivis. Comme il y a eu moins de mesures en hiver, le suivi d'hiver débute au jour 3 et s'achève au jour 11, tandis que le suivi d'été couvre la période du jour 1 au jour 14. Les périodes de vives-eaux (coefficient supérieur à 70) englobent donc les jours 6 à 12 inclus pour les deux suivis (jour 11 pour le suivi d'hiver).

La taille médiane des grains de sédiment a été comparable entre les deux saisons (fig. 1.2B) excepté au jour 8 du suivi d'hiver où le diamètre a augmenté brusquement. Cette augmentation a fait suite à un évènement pluvieux survenu le jour 7.

En été, la quantité de lumière reçue à la surface du sédiment (fig. 1.2C) a été significativement plus forte qu'en hiver ( $z = -23,46$ ,  $P < 0,0001$ ), avec une diminution enregistrée au jour 13, liée à un temps couvert. Les plus fortes valeurs ont été obtenues pour les plus forts coefficients, correspondant dans la vasière de Brouage aux périodes où le midi solaire est centré sur la plus longue période d'émersion. Globalement, les quantités de lumière reçues à la surface du sédiment augmentent au cours de la marée basse (fig. 1.2C). Ce résultat a été significativement et positivement corrélé à la salinité (tableau 1.2), qui a été significativement supérieure en été (fig. 2D,  $Z = -22,07$ ,  $P < 0,0001$ ). La salinité est négativement corrélée à la teneur en eau (tableau 1.2). L'augmentation de la salinité avec le temps pendant l'émersion est très nette sur la figure 1.2D, surtout en été jusqu'au début des mortes-eaux (jour 13).



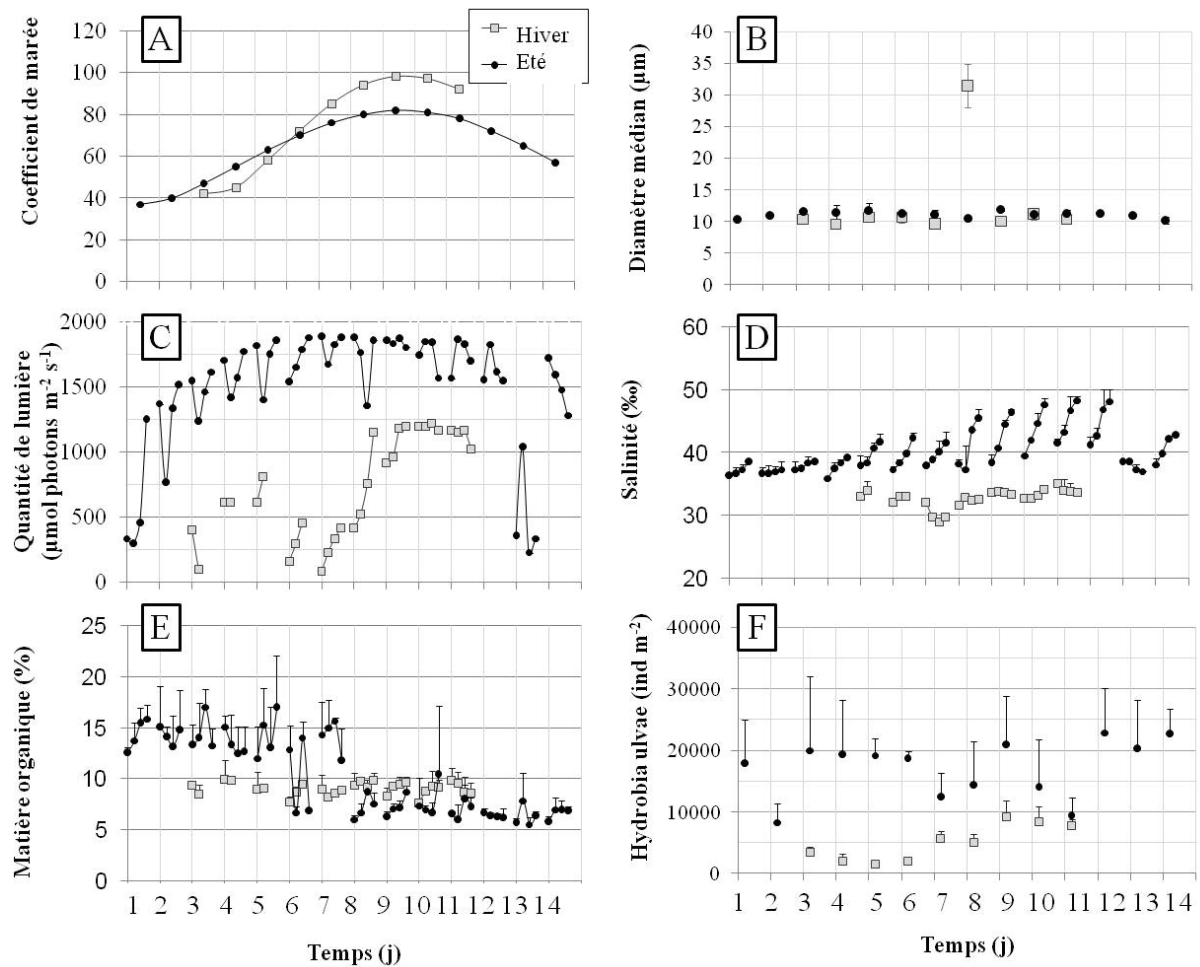
Tableau 1.1 (suite)

VARIABLES	total	jour 1	jour 2	jour 3	jour 4	jour 5	jour 6	jour 7	jour 8	jour 9	jour 10	jour 11	jour 12	jour 13	jour 14	
Abondances bactériennes (cellules mL <sup>-1</sup> sédiment frais)	n 9 1.79E+09 7.86E+08 e-t	12 9.22E+08 2.2E+08 9.25E+08	12 8.70E+08 3.33E+08	12 4.44E+08 1.92E+08	12 8.38E+08 3.58E+08	12 1.90E+09 1.20E+09	12 9.62E+08 3.33E+08	12 6.24E+08 1.30E+08	12 6.29E+08 1.64E+08	12 4.21E+08 1.28E+08	12 6.10E+08 3.39E+08	12 7.60E+08 2.86E+08	12 9.64E+08 4.31E+08	12 8.11E+08 2.04E+08	12 7.46E+08 1.89E+08	12 1.01E+09 3.74E+08
Abondances bactériennes (cellules g <sup>-1</sup> PS)	n 9 3.01E+09 1.14E+09 e-t	12 1.44E+09 1.57E+09	12 1.30E+09 5.07E+08	12 9.28E+08 3.69E+08	12 1.19E+09 4.68E+08	12 3.91E+09 2.51E+09	12 1.34E+09 5.09E+08	12 8.73E+08 2.32E+08	12 8.86E+08 2.41E+08	12 5.58E+08 1.81E+08	12 8.38E+08 7.06E+08	12 1.13E+09 4.43E+08	12 3.28E+09 8.67E+08	12 1.16E+09 3.77E+08	12 1.10E+09 3.13E+08	12 1.59E+09 7.34E+08
Chl <i>a</i> (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 9 20.63 8.50 e-t	12 9.34 1.09	12 9.94 1.23	12 20.94 1.41	12 8.84 1.01	12 20.73 1.08	12 7.31 0.93	12 7.71 1.16	12 7.79 2.28	12 20.66 1.65	12 7.20 0.98	12 21.47 3.91	12 9.39 1.43	12 9.15 1.86	12 7.83 0.95	12 9.19 0.68
CH carb (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 9 4.35 8.35 e-t	12 10.18 3.04	12 3.05 1.01	12 8.46 1.36	12 5.07 1.18	12 6.51 2.13	12 3.08 0.28	12 2.62 0.5	12 3.89 2.33	12 7.28 3.14	12 12.42 2.16	12 6.73 4.03	12 4.72 3.11	12 9.58 1.34	12 12.12 2.06	12 12.07 3.03
CB carb (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 9 21.82 5.52 e-t	12 6.91 3.73	12 16.80 1.85	12 20.52 5.73	12 3.83 2.25	12 21.22 3.67	12 4.16 0.41	12 3.13 2.36	12 3.23 8.28	12 2.71 9.96	12 2.16 0.9	12 3.44 2.09	12 7.21 1.04	12 3.52 1.13	12 8.12 1.01	12 5.58 1.16
LH carb (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 9 5.28 13.12 e-t	12 13.96 3.28	12 14.94 1.78	12 8.76 1.42	12 20.82 3.94	12 18.88 0.7	12 11.14 1.43	12 12.46 3.57	12 14.15 1.44	12 4.19 2.74	12 11.83 1.47	12 11.31 3.01	12 8.24 2.05	12 8.69 1.06	12 11.25 1.94	12 11.47 2.52
LB carb (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 9 23.28 6.20 e-t	12 4.44 1.52	12 7.73 1.94	12 28.37 10.96	12 6.44 1.09	12 21.80 5.81	12 6.51 1.16	12 6.14 1.28	12 4.29 2.47	12 25.06 4.66	12 4.41 1.15	12 8.29 10.51	12 25.75 5.27	12 7.58 0.99	12 8.72 1.02	12 8.23 0.69
CH prot (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 6 2.71 0.87 e-t	12 1.38 0.31	12 1.29 0.31	12 1.49 0.59	12 0.00 0	12 3.05 1.43	12 0.00 0.24	12 0.44 0.28	12 0.61 2.56	12 3.29 3.38	12 0.63 0.29	12 0.97 0.94	12 0.82 0.65	12 1.73 0.32	12 1.88 0.61	12 2.12 0.56
CB prot (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 5 64.05 0.11 e-t	12 0.32 0.62	12 0.07 0.22	12 11.468 19.63	12 0.00 0	12 76.34 102.88	12 0.89 0.81	12 0.00 0	12 45.44 81.33	12 0.00 0.01	12 0.06 0.2	12 0.00 0	12 0.06 0.22	12 0.00 0	12 0.00 0.33	12 0.15 0.33
LH prot (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 5 1.83 1.44 e-t	12 2.41 0.83	12 3.09 1.02	12 0.99 0.08	12 0.00 0	12 2.23 1.07	12 0.00 0.35	12 1.08 0.23	12 3.05 2.12	12 1.59 1.63	12 1.02 0.49	12 1.97 0.7	12 2.50 0.25	12 2.50 0.32	12 2.15 0.42	12 2.56 0.45
LB prot (µg g <sup>-1</sup> PS)	n 5 30.50 0.10 e-t	12 0.99 1.24	12 0.00 0	12 2.24 1.33	12 0.00 0	12 10.75 15.53	12 0.04 0.24	12 0.00 0	12 68.24 57.1	12 0.00 0.1	12 0.03 0.1	12 0.00 0	12 0.00 0	12 0.00 0	12 0.00 0.65	12 0.30 0.65
Abondance <i>Hydrobia</i> (ind m <sup>-2</sup> )	n 5003.28 17191.39 e-t	12 17966.50 5993.03	12 8247.23 2698.83	12 3434.77 807.6	12 19910.36 10390.36	12 19325.31 7521.24	12 19136.59 2432.92	12 18702.52 1032.55	12 12493.51 3212.32	12 14380.75 6053.15	12 9247.46 2202.76	12 2023.83 6673.63	12 9436.19 866.86	12 22816.70 6189.3	12 20325.55 6716.58	12 22778.96 3370.96
Biomasse <i>Hydrobia</i> (g PS / m <sup>2</sup> )	n 7 27.53 88.04 e-t	12 91.41 33.05	12 40.64 14.29	12 21.37 9.05	12 96.89 49.74	12 96.49 4.5	12 92.88 12.52	12 90.81 9.81	12 63.76 15.71	12 70.77 9.69	12 104.77 30.36	12 70.48 2.05	12 40.07 5.95	12 130.23 41.32	12 111.65 36.39	12 120.50 18.14
Irradiance photons m <sup>-2</sup> s <sup>-1</sup> )	n 9 689.31 1488.06 e-t	12 584.34 408.22	12 1247.57 297.14	12 250.00 164.32	12 1464.26 146.98	12 609.48 141.56	12 1706.72 189.18	12 1713.13 133.64	12 1816.34 131.33	12 708.85 294.89	12 1840.75 132.16	12 1194.05 19.55	12 1739.55 63.86	12 1635.44 117.32	12 487.95 335.57	12 1517.27 171.04

La quantité de matière organique (fig. 1.2E) a été globalement plus élevée en été ( $Z = -3,90$ ,  $P < 0,0001$ ) qu'en hiver. Cependant, les teneurs qui étaient autour de 15% les 7 premiers jours en été ont baissé de moitié du jour 8 jusqu'à la fin du suivi en été, devenant alors globalement inférieures à celles mesurées en hiver.

Un paramètre important dans le contrôle du biofilm est l'abondance d'hydrobies en surface (fig. 1.2F). Là encore, les valeurs mesurées en été sont significativement supérieures à celle d'hiver ( $Z = -11,78$ ,  $P < 0,0001$ ). En hiver, les abondances d'hydrobies ont augmenté en deux temps, une première fois au jour 7, puis au jour 9 pour atteindre environ 10 000 individus par  $m^2$ . Elles ont été significativement corrélées au coefficient de marée (tableau 1.2) en hiver. En été, les abondances ont été d'environ 20 000 individus par  $m^2$ , excepté pour quelques jours où des baisses jusqu'à 10 000 individus par  $m^2$  ont pu être observées.

La figure 1.3 montre les évolutions des concentrations en nitrite ( $NO_2$ ), nitrates ( $NO_3^-$ ), phosphates ( $PO_4^{3-}$ ) et silicates (Si) au cours des exondations diurnes pour chacun des jours suivis en hiver et en été. Les concentrations en nitrites (fig. 1.3A) ont été plus variables et significativement supérieures en hiver ( $Z = 8,39$ ,  $P < 0,0001$ ) avec une diminution nette lors des marées basses des jours 6, 7 et 8. En été, les concentrations ont été stables et leurs dynamiques ont été variables d'une émigration à l'autre. La concentration de nitrates (fig. 1.3B) en hiver a elle aussi été significativement supérieure à celle mesurée en été ( $Z = 5,75$ ,  $P < 0,0001$ ). En été, une diminution quotidienne a été observée du jour 1 au jour 6, puis les concentrations ont été variables avant d'atteindre des valeurs plus élevées les jours 12, 13 et 14. Les concentrations en phosphates (fig. 1.3C) et silicates (fig. 1.3D) ont été très supérieures en été (respectivement  $Z = -10,36$ ,  $P < 0,0001$  et  $Z = -43,96$ ,  $P < 0,0001$ ). En été, les concentrations en phosphates ont généralement diminué pendant la marée basse, alors que les

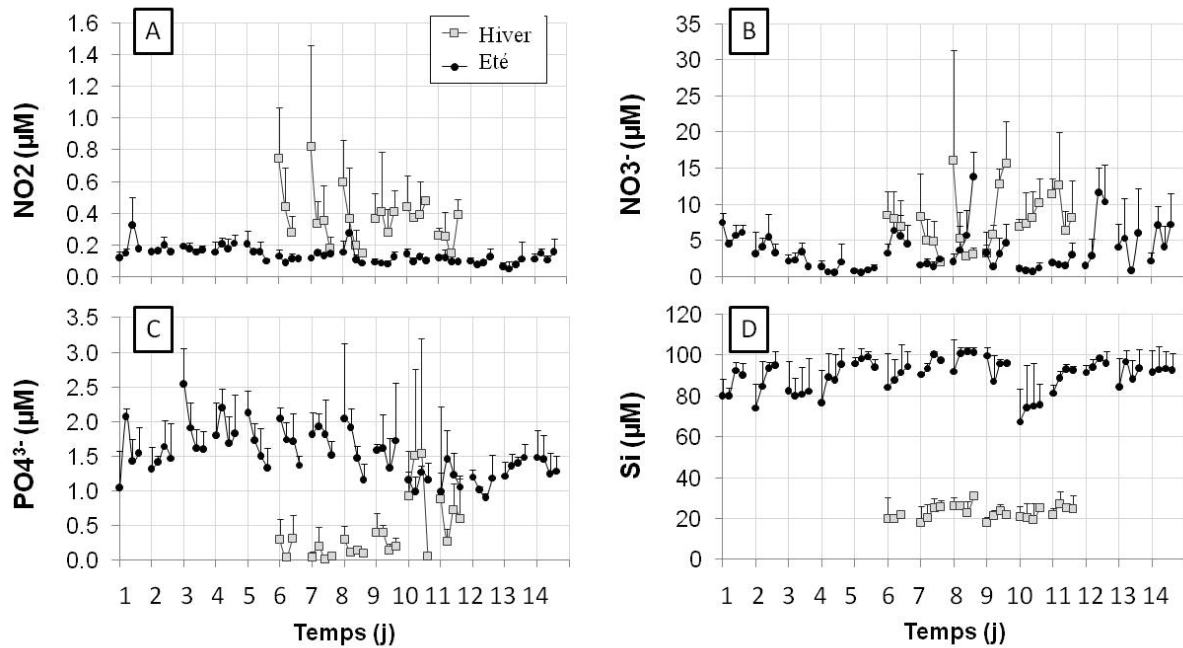


**Figure 1.2 :** principales caractéristiques de la vase lors des suivis d’hiver (carrés gris) et d’été (ronds noirs). A : coefficients de marée quotidiens ; afin de comparer les valeurs entre les deux suivis, les jours ont été superposés de manière à ce que les plus forts coefficients correspondent (9<sup>ème</sup> jour) ; B : diamètre quotidien médian des grains de sédiment ; les barres représentent les écart-types issus de l’ensemble des échantillons prélevés lors de la marée basse ; C : quantité de lumière ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) reçue à la surface du sédiment au moment de chaque prélèvement (dans l’ordre chronologique au cours de la marée basse) ; D : salinité (‰) à chaque prélèvement lors des marées basses, chaque jour (chronologiquement au cours de la marée basse) ; E : teneur en OM (%) à chaque prélèvement (chronologiquement au cours de la marée basse) chaque jour. F : densité d’hydrobies (individus  $\text{m}^{-2}$ ) moyenne mesurée au temps t1, les barres représentent les écart-types calculés entre les trois quadrats ; D et E : les barres représentent les écart-types mesurés entre les répliqués d’un même temps.

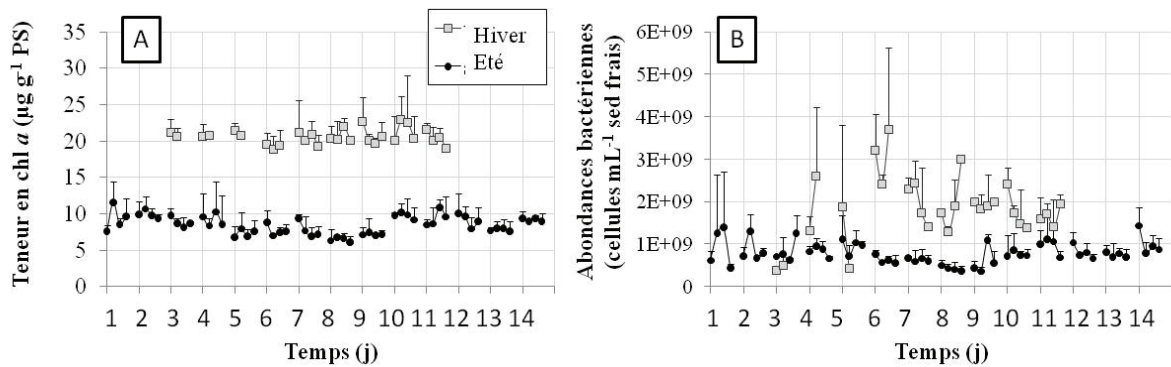
concentrations en silicates ont eu tendance à augmenter pendant la marée basse. En hiver, les concentrations de ces deux nutriments ont été plutôt stables, sans schéma répétable d'une marée basse à l'autre.

Les dynamiques chlorophylliennes et bactériennes (fig. 1.4) montrent que ces deux composantes majeures du biofilm étaient présentes à des niveaux plus élevés en hiver qu'en été (respectivement  $Z = 42,63$ ,  $P < 0,0001$  et  $Z = 10,18$ ,  $P < 0,0001$ ). Cette différence est très nette pour la chl *a* (fig. 1.4A), avec des valeurs qui ont été en moyenne de  $20,6 \pm 0,6 \mu\text{g g}^{-1}$  PS en hiver contre  $8,5 \pm 1,1 \mu\text{g g}^{-1}$  PS en été (tableau 1.1). Concernant les abondances bactériennes (fig. 1.4B), les écarts entre les valeurs d'été et d'hiver ont été plus importants pendant les vives-eaux (jours 6 à 12). Les abondances bactériennes et la chl *a* ont été significativement et positivement corrélées en été et lorsque toutes les données sont considérées, alors qu'aucune corrélation significative ne se dégage du suivi d'hiver (tableau 1.2).

Les teneurs en chl *a* ont été négativement corrélées aux abondances des hydrobies uniquement en été, saison pour laquelle les abondances des gastéropodes étaient particulièrement élevées (tableau 1.2).



**Figure 1.3 :** évolutions des A : nitrites (NO<sub>2</sub>) et des sels nutritifs : B : NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, C : PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> et D : Si, au cours des marées basses diurnes chaque jour des suivis d'hiver et d'été (μM). Les barres correspondent aux écarts-type mesurés entre les quadrats pour chaque prélèvement.



**Figure 1.4 :** évolution de A : la chl a (μg g<sup>-1</sup> PS) et B : des abondances bactériennes (nb cellules mL<sup>-1</sup> sédiment frais) au cours des marées basses des deux suivis. Les barres représentent les écarts-type mesurés entre les trois quadrats.



**Tableau 1.2** (double page) : corrélations significatives entre les différents paramètres suivis globalement et pour chacun des suivis. n : nombre de valeurs, r : coefficient de corrélation. \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$  ; \*\*\* :  $P < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $P < 0,001$ . ns : non significatif. S‰ : salinité (‰), W% : teneur en eau (%), MO% : matière organique (%), C/N : ratio carbone/azote, abondance bact : abondance bactérienne (nb de cellules mL<sup>-1</sup> sédiment frais), colloïd : colloïdal,

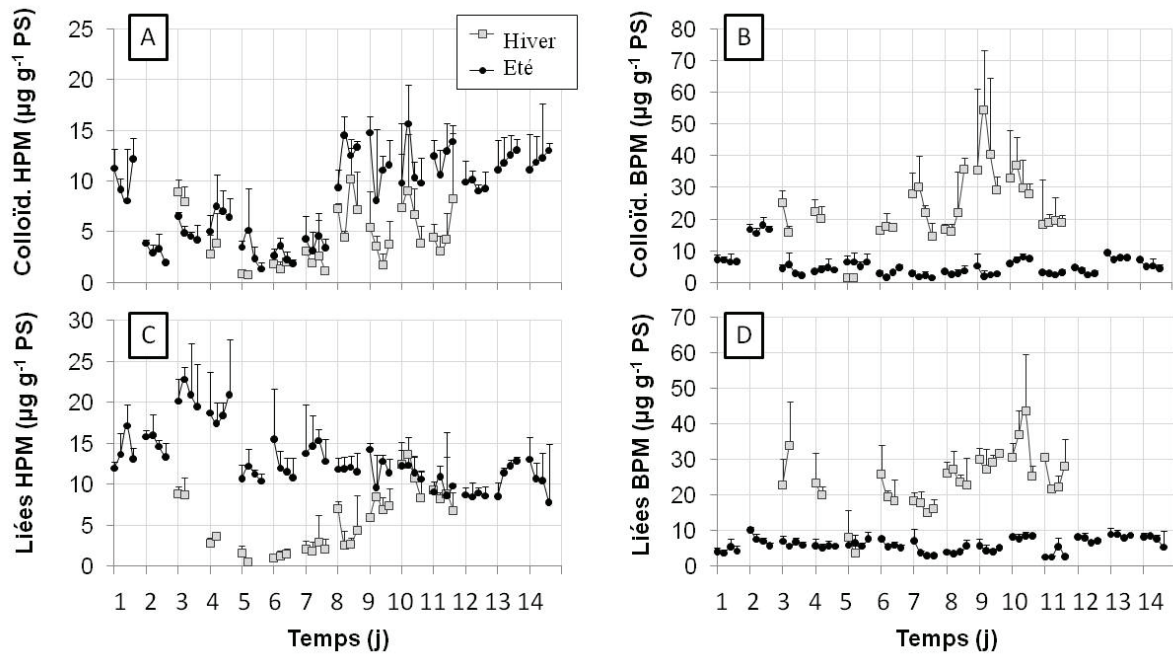
	diamètre médian		S‰		W%		irradiance		MO (%)		C/N		protéines (mg/gPS)		Abondance bact		Chl a (µg g <sup>-1</sup> PS)	
	total	hiver	été	total	hiver	été	total	hiver	été	total	hiver	été	total	hiver	été	total	hiver	été
coefficient de marée	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.28	0.27	0.58	0.29	-0.24	ns	0.57	0.55	-0.54	ns	0.29	ns	ns	0.30	0.39	0.28	0.28
diamètre médian des particules	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.18	0.18	0.18	0.13	-0.17	*	ns	0.30	0.18	ns	ns	ns	ns	0.18	0.21	ns	ns
S‰	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	-0.75	0.38	0.69	0.55	0.40	****	0.69	0.55	0.40	****	0.33	0.49	0.30	-0.52	0.73	ns	ns
W%	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.59	0.19	0.59	ns	0.19	*	0.59	ns	0.19	*	-0.43	0.65	ns	0.61	0.90	0.39	0.64
irradiance	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.59	0.19	0.59	ns	0.19	*	0.59	ns	0.19	*	0.21	0.45	0.47	ns	-0.44	ns	ns
MO (%)	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.59	0.19	0.59	ns	0.19	*	0.59	ns	0.19	*	0.21	0.45	0.47	ns	-0.44	ns	ns
C/N	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.59	0.19	0.59	ns	0.19	*	0.59	ns	0.19	*	0.21	0.45	0.47	ns	-0.44	ns	ns
Protéines (mg g <sup>-1</sup> PS)	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.59	0.19	0.59	ns	0.19	*	0.59	ns	0.19	*	0.21	0.45	0.47	ns	-0.44	ns	ns
Abondance bact	n	254	168	254	86	168	254	86	168	254	86	168	248	80	168	254	86	168
	r	0.59	0.19	0.59	ns	0.19	*	0.59	ns	0.19	*	0.21	0.45	0.47	ns	-0.44	ns	ns

Tableau 1.2 (suite)

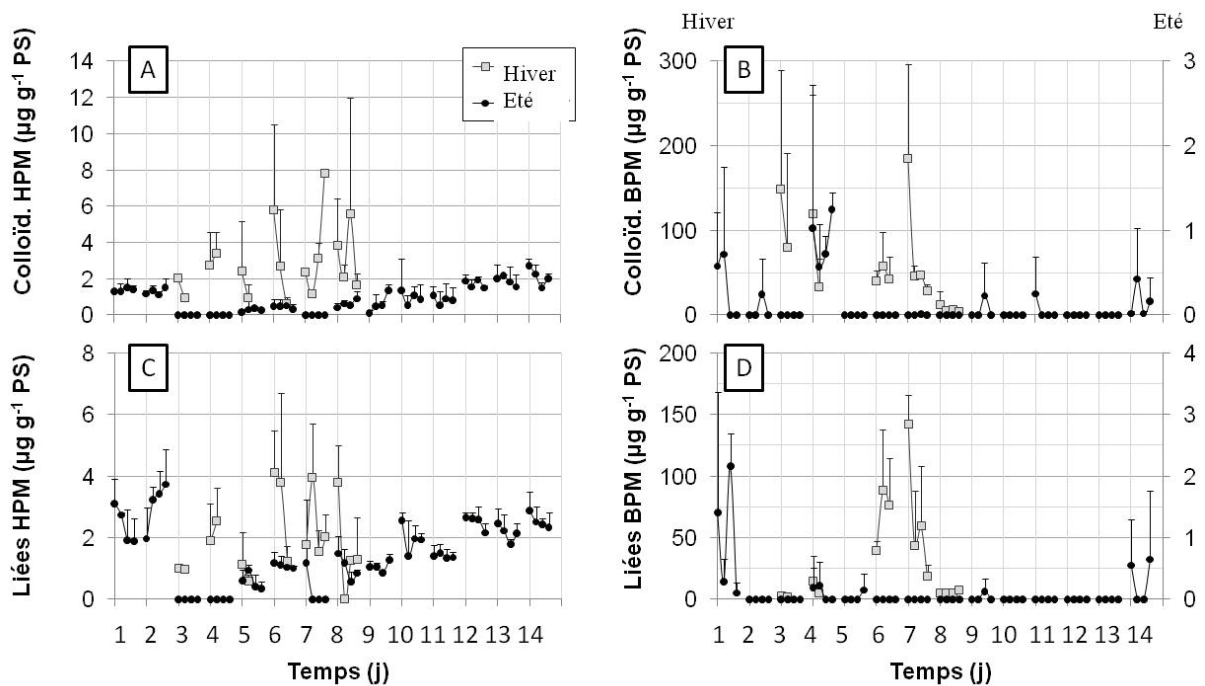
	Sucres colloïd. HPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Sucres colloïd. BPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Sucres liés HPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Sucres liés BPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Protéines colloïd. HPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Protéines colloïd. BPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Protéines liées HPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Protéines liées BPM ( $\mu\text{g g}^{-1}$ sed frais)		Hydrobia abnance (individus $\text{m}^{-2}$ )					
	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r	n	r		
coefficient de matée	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	0.36	0.36	0.38	-0.51	0.43	0.35	-0.38	0.48	0.39	ns	ns	ns	0.43	0.35	-0.32	0.43	0.35	-0.23	0.73	0.73	0.73
diamètre médian des particules	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	-0.24	-0.24	0.13*	ns	ns	ns	0.25	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0.16*	ns	ns
S <sub>90</sub>	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	0.58	0.38	-0.54	ns	0.48	0.33	-0.34	-0.60	0.29	ns	0.37	0.19*	0.40	ns	ns	-0.42	ns	ns	0.51	ns	ns
W%	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	0.43	ns	ns	0.22	-0.66	ns	ns	0.72	ns	0.17*	0.21	ns	0.54	0.43	ns	0.43	ns	ns	-0.59	ns	ns
irradiance	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	0.26	ns	ns	0.54	0.61	ns	-0.45	0.41	ns	-0.28	ns	ns	-0.46	-0.34	ns	-0.37	-0.35	0.44	0.64	0.64	0.64
MO (%)	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	-0.37	ns	ns	0.41	ns	ns	-0.17**	ns	ns	-0.28	ns	ns	0.28	ns	ns	ns	ns	ns	0.36	ns	ns
C/N	total	245	79	166	248	83	165	252	86	166	210	44	166	214	48	166	212	45	167	252	85	167
	été	0.20	ns	ns	0.36	ns	ns	-0.34	ns	ns	ns	ns	ns	0.25	0.16*	0.20	0.20	ns	0.36	ns	ns	
protéines	total	241	74	167	243	77	166	247	80	167	207	41	166	211	44	167	209	41	168	247	79	168
	été	0.24	0.33	ns	0.50	0.65	ns	-0.34	0.46	-0.16	-0.19	ns	ns	-0.35	ns	-0.18*	-0.40	ns	0.41	0.41	0.26*	
Abondance bact	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	-0.38	ns	ns	-0.54	-0.25	ns	0.50****	ns	ns	ns	ns	ns	0.28	ns	ns	0.67	0.58	-0.45	ns	ns	
chl a	total	246	79	167	249	83	166	253	86	167	210	44	166	215	48	167	213	45	168	253	85	168
	été	-0.48	ns	ns	-0.71	ns	ns	0.79	ns	0.16*	0.28	ns	ns	0.54	ns	0.21**	0.52	ns	-0.66	ns	-0.20	
Sucres colloïd. HPM	total	244	77	167	242	77	165	245	79	166	210	44	166	209	43	166	206	39	167	245	78	167
	été	-0.33	ns	*	0.26	0.39	-0.30	-0.36	0.41	ns	ns	0.19*	ns	-0.24	ns	0.23	-0.33	-0.54	ns	0.39	ns	
Sucres colloïd. BPM	total	247	82	165	247	82	165	250	84	166	209	43	166	213	47	166	211	44	167	250	83	167
	été	-0.43	0.35	ns	-0.43	0.35	ns	0.68	0.34	0.34	0.23	ns	0.18*	0.44	ns	0.53	0.43	ns	-0.41	0.46	-0.21	
Sucres liés HPM	total	249	83	166	249	83	166	249	83	166	207	43	164	208	42	166	209	43	166	248	82	166
	été	-0.55	0.59	ns	-0.55	0.59	ns	-0.55	0.59	ns	-0.37	ns	ns	-0.42	ns	-0.49	-0.48	-0.39	0.53	0.58	0.58	
Sucres liés BPM	total	209	44	165	212	45	167	212	45	167	209	44	165	215	48	167	212	45	167	252	85	167
	été	0.15*	ns	0.19*	0.43	ns	ns	0.43	ns	ns	0.15*	ns	ns	0.26	ns	0.26	0.35	-0.31	-0.47	0.53	0.20	
Protéines colloïd. HPM	total	204	38	166	204	38	166	204	38	166	204	38	166	208	43	165	205	39	166	209	43	166
	été	0.17*	ns	ns	0.17*	ns	ns	0.17*	ns	ns	0.14*	ns	ns	0.14*	ns	0.50	0.19	ns	-0.15*	ns	ns	
Protéines colloïd. BPM	total	209	42	167	212	44	168	212	44	168	209	42	167	215	44	168	212	44	168	213	45	168
	été	ns	ns	ns	0.31*	ns	ns	0.31*	ns	ns	ns	ns	ns	0.53	0.31*	-0.37	0.53	0.31*	-0.37	ns	ns	
Protéines liées HPM	total	210	43	167	210	43	167	210	43	167	210	43	167	210	43	167	210	43	167	210	43	167
	été	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	
Protéines liées BPM	total	213	45	168	213	45	168	213	45	168	213	45	168	213	45	168	213	45	168	213	45	168
	été	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

Les dynamiques des teneurs en sucre des EPS sont représentées en figure 1.5. Les teneurs en sucre des EPS colloïdales et liées de HPM (fig. 1.5A et 1.5C) ont été significativement supérieures en été ( $Z = -8,63$ ,  $P < 0,0001$  et  $Z = -11,88$ ,  $P < 0,0001$ , respectivement). Elles ont été très nettement supérieures en hiver pour les EPS colloïdales et liées de BPM (fig. 1.5B et 1.5D) ( $Z = 14,67$ ,  $P < 0,0001$  et  $Z = 19,43$ ,  $P < 0,0001$ , respectivement). En hiver, les dynamiques de ces 4 fractions ont été significativement et positivement corrélées entre elles (tableau 1.2) sauf entre les EPS colloïdales HPM (fig. 1.5A) et BPM (fig. 1.5B) (pas de corrélation significative). En effet, en hiver, leur dynamique (fig. 1.5) montre globalement une diminution jusqu'au jour 5, puis une augmentation jusqu'au jour 9 ou 10 suivie par un plateau ou une diminution. En été, les corrélations entre les teneurs en sucre des EPS sont variables. Les EPS liées HPM ont été négativement corrélées aux colloïdales HPM (tableau 1.2). La figure 1.5A montre que les dynamiques des EPS colloïdales HPM ont été superposables entre les deux saisons.

Concernant les dynamiques des teneurs en protéines des EPS (fig. 1.6), les différences entre été et hivers sont frappantes pour toutes les fractions. Les quatre fractions (colloïdales et liées HPM et BPM) étaient toutes plus élevées en hiver (respectivement  $Z = 5,94$ ,  $P < 0,0001$  ;  $Z = 4,88$ ,  $P < 0,0001$  ;  $Z = 5,66$ ,  $P < 0,0001$  ;  $Z = 5,06$ ,  $P < 0,0001$ ). Les dynamiques ont l'air assez similaires pour une même saison entre les fractions HPM et les fractions BPM et des corrélations significatives et positives ont été trouvées entre, en hiver, les protéines colloïdales (fig. 1.6B) et liées (fig. 1.6D) de BPM et en été, les protéines colloïdales (fig. 1.6A) et liées (fig. 1.6C) de HPM (tableau 1.2). En hiver, un pic a été observé pour toutes les fractions de protéines EPS au jour 2 ou 6 jusqu'au jour 9 environ. En été, les fractions de BPM ont été quasi indécélables, alors que les teneurs en fractions HPM ont chuté au jour 3,



**Figure 1.5 :** évolutions des teneurs en sucres des EPS ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PS) pendant les marées basses des deux suivis. A : fraction colloïdale HPM ; B : fraction colloïdale BPM ; C : fraction liée HPM ; D : fraction liée BPM. Les barres représentent les écarts-type entre quadrats.

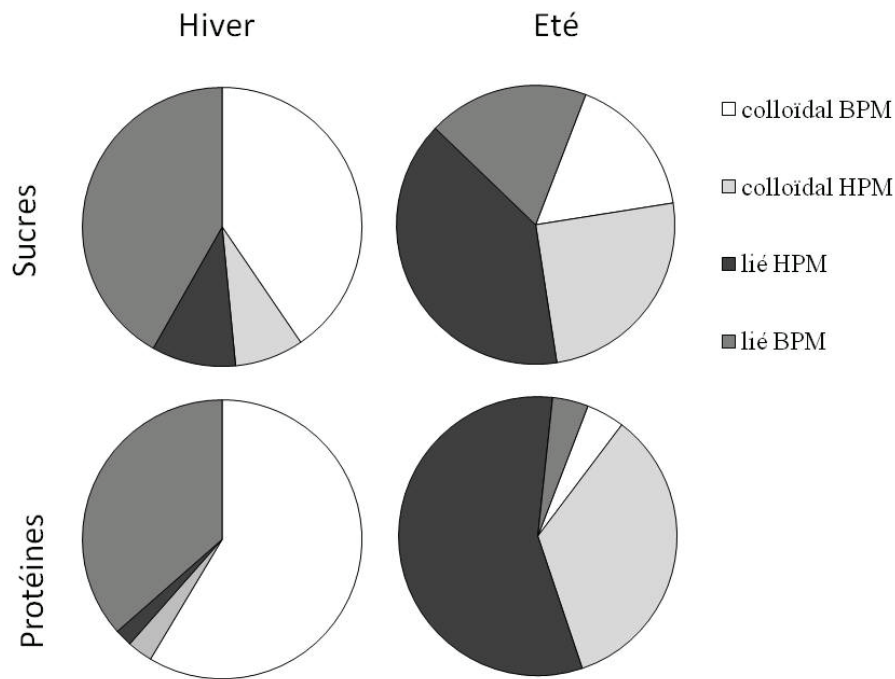


**Figure 1.6 :** évolutions des teneurs en protéines des EPS ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PS) pendant les marées basses des deux suivis. A : fraction colloïdale HPM ; B : fraction colloïdale BPM ; C : fraction liée HPM ; D : fraction liée BPM. Les barres représentent les écarts-type entre quadrats. Deux échelles d'ordonnées sont utilisées pour les graphes B et D.

suivi par 2 jours où elles ont été nulles avant d'augmenter progressivement jusqu'à la fin du suivi pour atteindre environ 3  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS (tableau 1.1).

La figure 1.7 permet de comparer les différentes proportions de chacune des fractions des EPS (sucres et protéines) au deux saisons. Il y apparaît clairement qu'en hiver, il y a eu autant de sucres colloïdaux que de sucres liés et un peu plus de protéines colloïdales que de protéines liées, avec des composés BPM très majoritaires pour les sucres et les protéines. En été, les composants HPM deviennent les plus abondants, avec une dominance des EPS liées sur les EPS colloïdales (sucres et protéines).

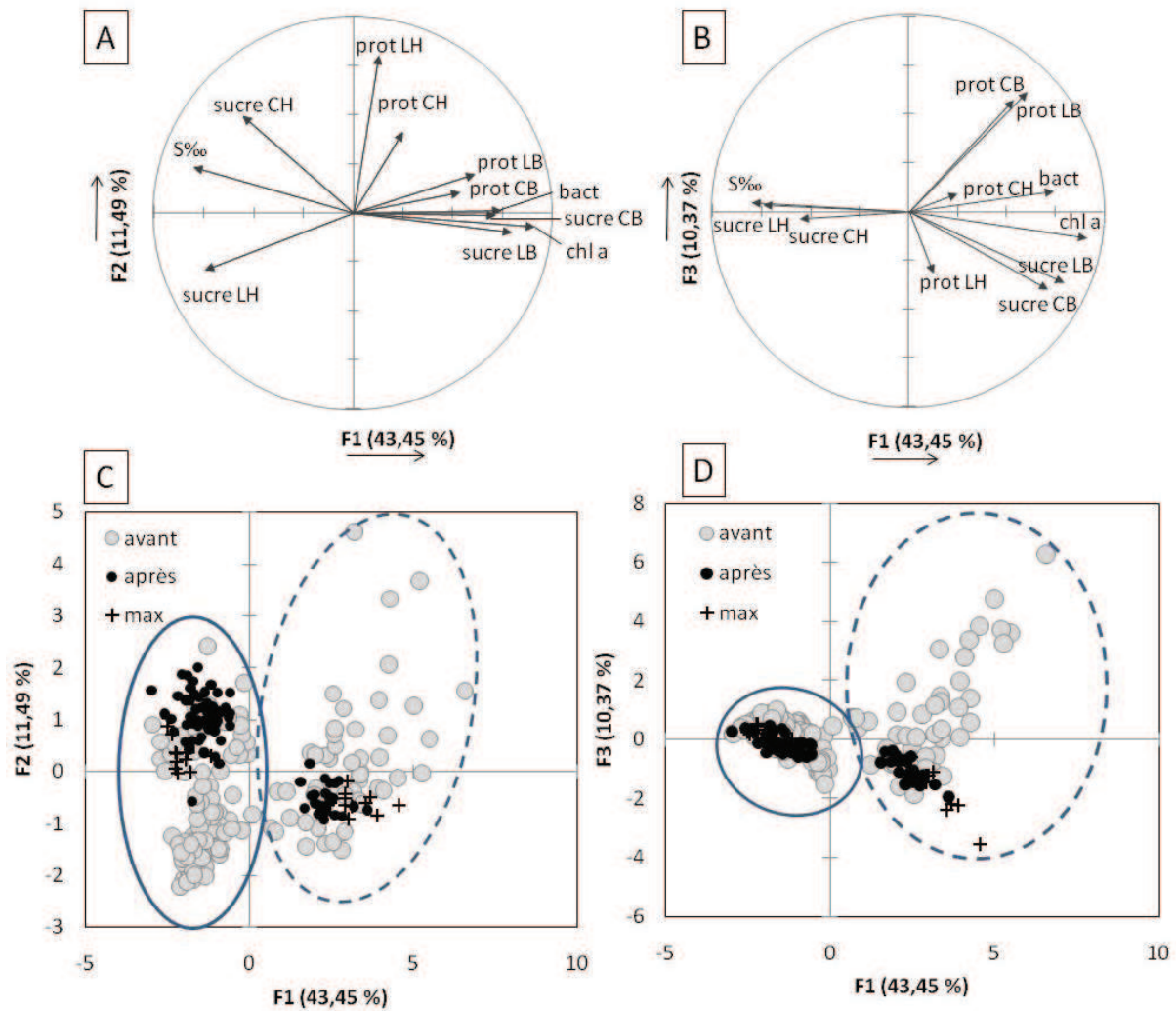
Pour mieux se figurer les interactions entre les principaux acteurs du biofilm, une ACP (fig. 1.8) a été conduite avec les variables suivantes : chl *a* ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PS), abondances bactériennes (nb cell  $\text{mL}^{-1}$  sed frais), les teneurs en sucre et protéines de chacune des 4 fractions d'EPS ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  sed frais). La salinité a également été incluse dans l'analyse. La valeur propre de l'axe 4 étant inférieure à 1, seuls les trois premiers axes ont été retenus. Les deux premiers axes expliquent 54,94 % de la variance (fig. 1.8A et 1.8C), l'axe 3 explique 10,37 % de la variance soit 53,8 % de la variance lorsqu'il est associé à l'axe 1 (fig. 1.8B et 1.8D). L'axe 1 oppose la salinité ( $\cos^2 = 0,65$ ) et les sucres des EPS colloïdales et liées HPM (respectivement  $\cos^2 = 0,31$  et  $\cos^2 = 0,56$ ) aux bactéries ( $\cos^2 = 0,55$ ), à la chl *a* ( $\cos^2 = 0,83$ ), ainsi qu'aux sucres des EPS colloïdales et liées de BPM (respectivement  $\cos^2 = 0,51$  et  $\cos^2 = 0,63$ ). Les protéines des EPS sont mieux représentées sur l'axe 2 pour la fraction liée HPM ( $\cos^2 = 0,64$ ) et sur l'axe 3 pour les fractions colloïdales et liées BPM (respectivement  $\cos^2 = 0,33$  et  $0,38$ ). Ces deux dernières fractions sont également assez bien représentées sur l'axe 1, avec respectivement des valeurs de  $\cos^2$  égales à 0,28 et 0,37. Les protéines de la fraction colloïdale HPM ont un  $\cos^2$  de 0,17 sur l'axe 2.



**Figure 1.7 :** diagrammes présentant les proportions de chacune des fractions (colloïdales et liées HPM et BPM) des sucres (en haut) et protéines (en bas) des EPS pour chacune des saisons : hiver à gauche et été à droite.

La salinité a été associée à de fortes teneur en sucres EPS HPM et opposée au développement des diatomées, des bactéries et aux protéines et sucres de BPM (fig. 1.8A et 1.8B, axe 1). L'axe 1 permet de séparer les mesures réalisées en été (à gauche, cercle plein, fig. 1.8C et 1.8D) de celles réalisées en hiver (à droite, cercle pointillé, fig. 1.8C et 1.8D). L'axe 2 permet de distinguer certains jours au sein des suivis, selon la teneur en protéines liées HPM. En hiver, les observations sont dans la partie inférieure de l'axe 2 excepté les jours 6 et 7 (2 jours après le début des vives-eaux) qui sont dans la partie supérieure, ainsi qu'une partie des observations des jours 4 et 8 (détail non représenté sur la figure).

Alors que l'axe 3 ne permet pas véritablement de différencier les observations du suivi d'été, il permet d'observer une distribution des jours du suivi d'hiver principalement selon les teneurs en protéines de BPM. Les observations correspondant aux jours 3 et 4 chevauchent l'axe 1 de part et d'autre, puis les observations des jours 5, 6 et 7 se répartissent dans la partie supérieure de l'axe 2, avec les jours 6 et 7 également répartis sur l'axe 1 (détail non représenté sur la figure). Ensuite, les jours 8, 9, 10 et 11 se superposent dans la partie inférieure, avec les observations du jour 9 très étalées sur des valeurs négatives de l'axe 2 et positives de l'axe 1 (détail non représenté sur la figure).



**Figure 1.8 :** ACP effectuée avec les variables chl  $a$  ( $\mu\text{g g}^{-1}$  PS), abondances bactériennes ( $\text{cell mL}^{-1}$  sed frais), la salinité ( $\text{‰}$ ) et les teneurs en sucres et protéines des 4 fractions d'EPS ( $\mu\text{g g}^{-1}$  sed frais). A et B : vecteurs des variables, le cercle de corrélation est dessiné, des axes F1 et F2 (A) et F1 et F3 (B). C et D : projections des individus sur les axes F1 et F2 (C) et F3 et F4 (D). Les ronds noirs représentent les mesures effectuées avant le jour 9 (coefficient de marée maximal), les croix noires correspondent aux valeurs enregistrées le jour 9, les ronds gris correspondent aux valeurs enregistrées après le jour 9. Le détail des dynamiques journalières est donné dans le texte. Les données entourées par le cercle plein correspondent aux valeurs du suivi d'été, alors que le cercle pointillé englobe les valeurs du suivi d'hiver. En été (fig. 1.8C) les jours 1, 2, 3, et du jour 8 au jour 14 sont concentrés dans la partie supérieure de l'axe 2, tandis que les jours 4 à 7 (2 jours avant et 2 jours après le début des vives-eaux) se superposent dans la partie inférieure de l'axe 2 (détail non représenté sur la figure). Les fractions des EPS sont identifiées par les lettres L : liée, C : colloïdale, H : HPM et B : BPM.



## Discussion

### *Dynamique des communautés microphytobenthiques et des caractéristiques du sédiment.*

De façon générale, les biofilms sont répartis de façon hétérogène à la surface des vasières (Paterson et al. 1999, Jesus et al. 2005). Les résultats issus des tests de Mantel s'accordent à ce constat, puisque des effets spatiaux significatifs ont été associés à la distribution de la chl *a* dans le cm superficiel de la vasière, pour les deux saisons étudiées. La distribution des bactéries n'a en revanche pas montré d'hétérogénéité spatiale significative à la surface de la vasière.

Convertie en  $\text{mg m}^{-2}$  grâce aux données de teneur en eau et à la concentration en sédiment à la surface de la vasière, la teneur en chl *a* a été en moyenne de  $106,64 \pm 11,29 \text{ mg m}^{-2}$  en hiver et de  $58,98 \pm 10,42 \text{ mg m}^{-2}$ . Ces valeurs sont supérieures au minimum requis pour la formation d'un biofilm ( $\sim 25 \text{ mg m}^{-2}$ , Guarini et al. 2000) et sont comparables à celles trouvées antérieurement sur la même zone d'étude et aux mêmes saisons (Pascal et al. 2008c).

La production nette de chl *a* au cours de l'émersion a été significativement corrélée à la teneur mesurée en début de marée basse en hiver (production nette =  $-0,65 \times \text{teneur initiale en } \mu\text{g g}^{-1} \text{ PS} + 12,82$ ;  $r^2 = 0,58$ ) et en été (production nette =  $-0,62 \times \text{teneur initiale en } \mu\text{g g}^{-1} \text{ PS} + 4,99$ ;  $r^2 = 0,30$ ). Ces équations permettent de définir une valeur de biomasse optimale (pour laquelle la production nette est nulle) qui avoisine les  $20 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$  en hiver et les  $8 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$  en été. Cette valeur s'accorde également aux résultats obtenus sur la même zone aux mêmes saisons (Pascal et al. 2008c).

La mesure de la chl *a* dans le premier cm ne permet pas de définir une dynamique de formation du biofilm mais plutôt les échanges de type apports – pertes au niveau de ce compartiment (Blanchard et al. 1998). Entre la fin d'une émersion diurne et le début de l'émersion diurne suivante (après deux immersions et une émersion nocturne), la teneur en chl *a* a augmenté (multiplication, dépôt à marée haute) ou diminué (remise en suspension,

broutage, mort cellulaire) pour chacune des deux saisons, sans que ces variations n'aient pu être associées de façon significative aux valeurs des différents paramètres mesurées en fin de première émergence diurne. Aussi, les conditions avant la marée haute ne semblent pas avoir eu d'influence sur la biomasse chlorophyllienne lors de la marée basse diurne suivante.

Les hydrobies s'alimentent sur le biofilm et peuvent avoir un impact sur les populations de diatomées (Haubois et al. 2005a, Pascal et al. 2008a, Pascal et al. 2008b, Bellinger et al. 2009) comme l'indique la corrélation négative existante entre les hydrobies et la teneur en chl *a* en été. En revanche, en hiver, il semblerait que les abondances des hydrobies soient trop faibles pour avoir un contrôle significatif du biofilm. En hiver, leurs densités étaient deux fois plus élevées que celles trouvées sur le même site d'étude pour une même saison (Bocher et al. 2007). En été, les densités d'hydrobies ont été quatre fois supérieures à celles mesurées en hiver.

Les hydrobies consomment également les bactéries avec des taux d'ingestion relativement élevés (Pascal et al. 2008b). L'augmentation de leurs abondances en deuxième partie du suivi d'hiver pourrait expliquer le maintien à des niveaux plus bas et stables des abondances bactériennes. Une corrélation négative significative existe entre les abondances des bactéries et des hydrobies si les résultats des deux saisons sont regroupés, alors qu'aucune corrélation significative n'existe lorsque chacune des saisons est considérée séparément.

Le diamètre moyen du sédiment a augmenté subitement au jour 8 en hiver, un jour après l'évènement de pluie. Cette augmentation peut s'expliquer par la mise à nue de couches de sédiment plus profondes par l'action combinée de la pluie (déstabilisation du sédiment de surface) et des marées (exportation du sédiment impacté). Le sédiment en profondeur a été plus compacté et de plus gros diamètre (plus lourd). D'autres études (Paterson et al. 1999, Tolhurst et al. 2008) ont montré que la pluie réduisait principalement les teneurs en chl *a* et en sucres colloïdaux EPS. L'étude actuelle montre également que les teneurs en sucres et

protéines BPM ont fortement diminué pendant la période d'émersion, quant à elles, les variations des teneurs en chl *a* ont été faibles.

### *Sécrétion de substances polymériques extracellulaires et chl a*

Les teneurs en sucres ont été plus faibles en été (1,8 fois moins qu'en hiver). En considérant chaque fraction, les sucres BPM ont été 4,3 (colloïdaux) et 4,0 (liés) fois moins concentrés en été, tandis que les sucres HPM ont été 1,8 (colloïdaux) et 2,3 (liés) fois plus concentrés en été. Wolfstein et al (2002) ont suggéré qu'un ensoleillement supérieur devait conduire à une augmentation des sécrétions en EPS, pourtant nos résultats ne le montrent que pour les EPS HPM, qui sont des EPS typiquement associés aux migrations (liés) et à l'overflow (colloïdaux). Cette accumulation de produits HPM en été traduirait une hydrolyse plus faible, en raison des teneurs en eau réduites en été. Les protéines des EPS ont été 31 fois moins importantes en été globalement. Les protéines colloïdales HPM, liées HPM, colloïdales BPM et liées BPM ont été respectivement 3,2, 1,4, 503,0 et 335,6 fois moins abondantes qu'en hiver. Les différentes fractions d'EPS, les bactéries et les diatomées n'ont pas changé dans les mêmes proportions entre l'hiver et l'été.

Il est généralement admis dans la littérature que l'activité de photosynthèse des diatomées produise principalement des EPS BPM (Smith & Underwood 1998, de Brouwer & Stal 2002, Hanlon et al. 2006, Orvain et al. 2007, Hofmann et al. 2009). Ainsi la plus forte proportion de molécules de petite taille dans le biofilm pourrait traduire un état physiologique relativement bon des diatomées en hiver. Ces résultats (hiver) sont en accord avec de nombreux auteurs qui ont également trouvé que les sucres BPM couvraient plus de 75 à 80 % de l'ensemble des sucres (Smith & Underwood 1998, de Brouwer & Stal 2002, Underwood et al. 2004). En cas de carence en nutriments, un métabolisme d'overflow peut être activé. Ce métabolisme produirait de fortes quantités de produits HPM (Staats et al. 2000b, Orvain et al.

2003, Underwood et al. 2004). Cette différenciation classique des EPS en petites unités de sucres (BPM) et en molécules polymériques plus longues (HPM) résulte de l'hypothèse qu'elles sont toutes deux issues de deux voies métaboliques différentes (Underwood et al. 2004). Selon cette théorie, la production de sucres BPM est constante à l'obscurité et sous la lumière, et ne dépend pas de la limitation en nutriments, tandis que la production de sucres HPM est considérée comme une voie de production très sensible aux variations des conditions du milieu (lumière, nutriments) (Smith & Underwood 2000, de Brouwer & Stal 2001, Underwood et al. 2004). Des cellules qui se développent sous des conditions nutritives optimales en culture produisent plus de sucres BPM que de sucres HPM (proportion de 80 : 20) tandis que les quantités de sucres HPM sont sécrétées quand les cellules deviennent limitées ou stressées par d'autres conditions extrêmes (80% des sucres extracellulaires) (Staats et al. 1999, Yallop et al. 2000, Orvain et al. 2003). La corrélation globale observée entre les productions de ces fractions en hiver pourrait être associée à l'absence d'une carence en nutriments. Cependant, une étude conjointe (Pierre *et al*, soumis, annexe 1) a révélé que les sucres HPM et BPM avaient exactement la même composition chimique au sein de chaque fraction (colloïdale et liée), tandis que les compositions chimiques des sucres colloïdaux et liés différaient foncièrement, avec par exemple des niveaux élevés de glucose dans la fraction colloïdale des EPS.

Aussi, plutôt que de séparer les sucres des EPS en HPM et BPM, il semble que l'extraction des EPS colloïdales (définies comme les substances extractibles dans l'eau de mer à partir de sédiment frais) et des EPS liées (définies comme la fraction extractible à l'aide d'une résine cationique à partir du sédiment frais) constitue une meilleure méthodologie pour décrire les voies métaboliques définies habituellement dans la littérature (Underwood et al. 2004) et éviter la contamination par les substances internes (Takahashi et al. 2009). Dans ce cas, les différences de sécrétions entre les EPS liées et colloïdales devraient mieux décrire les

effets des conditions environnementales ou physiologiques sur les diatomées que les différences entre HPM et BPM, notamment parce que les EPS BPM résultent de la dégradation des EPS HPM par hydrolyse, photolyse ou encore sous l'action des enzymes bactériennes.

De nombreux auteurs ont trouvé des corrélations positives entre la chl *a* et les teneurs en EPS (sucres certainement mêlés à des substances internes, Cf. Chiovitti et al. 2004) dans les biofilms (Blanchard et al. 2000, Yallop et al. 2000, Welker et al. 2002, Lucas et al. 2003, Underwood & Paterson 2003, Orvain et al. 2007). La méthode utilisée ici (résine) comporte également des biais car elle peut sous-estimer les EPS liées qui seraient restées étroitement attachées au frustule des diatomées lors de l'extraction (Takahashi et al. 2009). Les corrélations entre la teneur en chl *a* et les EPS ont été fonction de la taille des molécules et des saisons. Ainsi, en prenant l'ensemble des données sur les deux saisons, des corrélations positives ont été trouvées entre la teneur en chl *a* et l'ensemble des EPS BPM (liées et colloïdales, sucres et protéines), alors que ces corrélations sont négatives pour la majorité des composés de HPM, comme le souligne l'analyse en composantes principales. En hiver, aucune corrélation n'a été observée entre les teneurs en chl *a* et les différentes fractions d'EPS, tandis qu'en été, la corrélation a été positive avec les sucres BPM et les protéines liées HPM, suggérant que ces EPS ont été produits de façon régulière par les diatomées. Il se pourrait donc que ces composés interviennent dans la structure ou soient issus d'une activité métabolique routinière. L'absence de corrélation en hiver tiendrait du fait d'une hydrolyse de ces composés, conséquence de la plus forte hydratation du sédiment. Les teneurs en sucres des EPS colloïdales HPM ont été complètement superposables entre les deux saisons. Cela traduit un effet dominant du coefficient de marée donc de la durée d'exposition à la lumière sur leur sécrétion, et souligne le fait que leur production résulte d'une activité de

photosynthèse. Les plus fortes teneurs en sucres liés HPM au début du suivi pourraient s'associer à la mise en place du biofilm au cours du cycle de marée.

Certaines des EPS excrétées par les diatomées forment un mucilage visqueux qui entoure les cellules (Underwood & Paterson 2003) et assure probablement un rôle important dans la protection des cellules lorsque les conditions deviennent défavorables à leur survie. Ce phénomène a été décrit dans les neiges marines, où les microalgues se protègent des cristaux de glace et de la sursalure en créant un microenvironnement favorable par la sécrétion d'EPS (Krembs et al. 2002). En été, l'augmentation de la salinité au cours du suivi en été a provoqué une réaction de défense des diatomées, qui s'est traduite dans un premier temps par une augmentation de la sécrétion des sucres liés HPM, qui sont alors certainement impliqués dans la microprotection. Ensuite, la sécrétion des sucres liés et colloïdaux BPM s'interrompt, soit parce qu'ils sont alors plus vite consommés qu'il ne sont produits, cependant les abondances bactériennes sont restées à des niveaux faible, soit parce que les conditions de lumière associées au stress salin freinent les activités de photosynthèse des microalgues, dont les produits principaux sont des composés BPM (Staats et al. 2000a, de Brouwer & Stal 2001, Perkins et al. 2001, Hanlon et al. 2006). Enfin, en été, l'augmentation de la sécrétion des sucres colloïdaux HPM et des protéines HPM peut s'expliquer comme dernière étape dans la constitution d'une barrière protectrice autour de la cellule, permettant de retenir l'eau comme pourrait le signifier la bonne corrélation qui existe entre les EPS colloïdales et la teneur en eau, ainsi qu'entre la chl a et la teneur en eau. Une autre explication possible est que les conditions extrêmes rencontrées en juillet sur la vasière ont entraîné une forte mort cellulaire des diatomées mais aussi des bactéries et les composés retrouvés ici sont des substances intracellulaires (chrysolaminarine) et les composants de la paroi bactérienne (peptidoglycanes) libérés dans le milieu et extraits en même temps que les EPS.

Dans un même temps, il n'est pas possible de définir la contribution à la présence de substances polymériques d'autres organismes présents sur la vasière, telles que les hydrobies et autres mollusques marins.

### *Dynamiques bactériennes et interactions avec les EPS*

Les abondances bactériennes étaient d'environ  $10^9$  cellules par mL, ce qui est en accord avec les valeurs trouvées dans la littérature pour les sédiments de surface des vasières (Schmidt et al. 1998, van Duyl et al. 1999). Bien que des valeurs plus basses aient été mesurées en été, les abondances bactériennes sont stables dans ce type de sédiments (Schmidt et al. 1998). Elles ont été positivement corrélées aux EPS BPM et négativement corrélées aux composés HPM. Il est alors possible que soit la présence de bactéries ait favorisé la dégradation des HPM en BPM, soit la présence de HPM ait eu un effet négatif sur le développement bactérien. Il a été montré que les dynamiques bactériennes pouvaient suivre celle des EPS (van Duyl et al. 1999), ce qui est le cas ici en considérant les deux saisons simultanément et uniquement les EPS BPM (sucres et protéines). En observant les deux saisons séparément, ceci n'est plus vrai que pour les protéines liées BPM en été, ce qui incite à nuancer les observations issues de la littérature. La perte de cellules bactériennes qui maintiennent constantes les abondances alors que les taux de production sont généralement élevés pourrait être due au broutage (Pascal et al. 2008a, Pascal et al. 2008b, Pascal et al. 2008c, Pascal et al. 2008d, Pascal et al. 2009), la lyse virale (Glud et al. 2003, Montanié et al. soumis) la mort cellulaire programmée (Yarmolinsky 1995) ou la resuspension pendant les périodes d'immersion (Blanchard et al. 1997). Des études antérieures sur le même site ont prouvé que les hydrobies, qui sont les principales bactérivores à ce site, consomment autant de bactéries que de diatomées (Pascal et al. 2008a) et le broutage estimé représente de 6 à 28% de la production bactérienne (Pascal et al. 2009). Une étude conjointe

(Montanié et al. soumis) a montré pour la première fois que les virus benthiques avaient des effets négatifs sur les bactéries en été en étant à l'origine de 29 % des pertes nettes de bactéries dans le sédiment. Des mesures des taux de remise en suspension des bactéries ont été effectuées mais elles ne peuvent pas être exploitées sans connaissances précises sur les forces de cisaillement qui s'exercent sur le sédiment à marée haute. En hiver, l'absence de corrélation négative entre les abondances d'hydrobies et les abondances bactériennes laissent penser qu'un autre facteur pourrait intervenir dans le maintien à des niveaux stables des abondances bactériennes. Il pourrait s'agir des EPS liées des diatomées, qui ont déjà été impliquées dans des régulations bactériennes dans d'autres études (Smith et al. 1995).

Dans l'étude actuelle, les bactéries et les diatomées ont été positivement corrélées en été mais pas en hiver. En été, bactéries et diatomées ont été toutes deux soumises à une prédation élevée de la part des hydrobies, aussi la corrélation observée pourrait être un artefact.

Les bactéries peuvent dégrader les composés HPM en composés BPM par leur activité exoenzymatique (Haynes et al. 2007, Hofmann et al. 2009). Ceci conduit à l'augmentation de composés BPM. Le mur cellulaire des bactéries agit comme un tamis moléculaire qui permet le transfert de saccharides de moins de 500 à 600 Da (Nikaido & Vaara 1985). Dans les sédiments de surface, les substrats pour le développement des bactéries sont les nutriments, les EPS issues des diatomées ou d'autres espèces (eucaryotes ou procaryotes), et les substances internes provenant des décompositions de cellules mortes. Les différents groupes de bactéries n'accèdent pas de la même manière aux différentes fractions d'EPS, il y a donc une gamme de diverses bactéries hétérotrophes qui doivent être impliquées dans la dégradation des EPS (Bellinger et al. 2009, Hofmann et al. 2009).

Les bactéries peuvent discriminer entre les protéines et les protéines qui sont glycosylées (protéines « modifiées »), les premières étant plus rapidement utilisées



(Keil & Kirchman 1993), et entre différents sucres de compositions osidiques diverses (Giroldo et al. 2003, 2005). Une corrélation positive a été trouvée entre les bactéries et les protéines BPM des EPS, qui est également mise en évidence dans l'analyse en composantes principales. Les bactéries pourraient utiliser les protéines des EPS comme substrat préférentiel en cas de carence en azote dans le milieu. En effet, le ratio C:N était de 7, ce qui correspond à celui observé dans les sédiments tempérés ( $7 \pm 1$ ) (Ruttenberg & Goni 1997, Galois et al. 2000). Ce ratio est un peu élevé pour une croissance optimale bactérienne puisque le ratio optimal pour les bactéries est de 4 ou moins (Lancelot et al. 1985, Goldman et al. 1987). Les bactéries ont donc du sélectionner des microenvironnements riches en protéines, particulièrement en produits BPM qui sont plus facilement assimilables, ce qui a conduit à la corrélation positive observée ici. De plus, il a été montré que les protéines étaient plus responsables des fortes productions bactériennes que les sucres dans les rivières (Sinsabaugh & Shah 2010). Une autre explication possible pour cette corrélation est que les bactéries sécrètent des enzymes, donc des protéines, qui alimenteraient les réserves de protéines BPM présentes dans le milieu.

Les abondances bactériennes ont été négativement corrélées aux sucres liés et colloïdaux HPM. Pourtant, de nombreuses études ont montré que les bactéries étaient plus actives sur les composés HPM que BPM (Waksman & Butler 1937, Tranvik 1990, Amon & Benner 1996, Sinsabaugh & Shah 2010) et aussi plus actives sur la matière organique fraîche (EPS juste excrétés, plutôt des HPM) que sur de la matière plus ancienne (polymères transformés ou dégradés tels que les composés BPM) (Amon & Benner 1996). La corrélation négative pourrait alors s'expliquer par le fait que plus les bactéries ont été nombreuses dans le sédiment, plus ces composés de HPM ont été dégradés.

D'un autre côté, les diatomées peuvent produire des EPS qui freinent le développement bactérien, particulièrement les EPS liées (Smith et al. 1995). Dans cette étude

de terrain, des effets négatifs des EPS liées n'ont pas clairement été mis en évidence. Les diatomées marines *Phaeodactylum tricorutum* ont une activité antibactérienne efficace sur les bactéries Gram-négatives et Gram-positives au travers d'un acide gras qui contient plusieurs composés antibactériens (Desbois et al. 2009). Une étude conduite sur sept espèces de diatomées a montré que *Nitzschia longissima*, *Skeletonema costatum* et *Biddulphia sinensis* ont des effets antibactériens efficaces, *Hemidiscus hardmannianus*, *Coscinodiscus centralis* et *Asterionella japonica* ont des effets antibactériens modérés tandis que *Pleurosigma elongatum* n'a pas montré d'activité antibactérienne (Selvaraj et al. 1989). Parmi cette liste, seule la diatomée *Pleurosigma elongatum* est présente dans la baie de Marennes-Oléron (BMO) (Haubois et al. 2005b), c'est-à-dire celle qui ne présente pas d'effets antibactériens. Cependant, plusieurs espèces du genre *Nitzschia* sont présentes sur la vasière de BMO (Haubois et al. 2005b), lesquelles pourraient avoir un effet antibactérien. Cette dernière hypothèse mériterait d'être testée dans des études futures, pour chacune des espèces présentes dans la vasière étudiée.

### **Conclusion**

Cette étude a été conduite afin de mettre en valeur les liens qui s'établissent entre les bactéries, les diatomées et les substances polymériques extracellulaires. L'étude a couvert un cycle de marée complet pour intégrer les effets de la marée, sur deux saisons contrastées : l'hiver et l'été. La présence d'hydrobies a eu un impact significatif sur la structure du biofilm. Les principaux résultats de cette étude sont 1) les abondances de microorganismes ont été plus faibles en été qu'en hiver, certainement en raison de la présence massive d'un prédateur, 2) les EPS BPM résulteraient principalement de l'hydrolyse des EPS HPM, 3) les EPS colloïdales seraient de meilleurs indicateurs de l'activité photosynthétique que les EPS BPM, 4) la dynamique des EPS colloïdales HPM est définie par le cycle de marée, 5) les protéines

semblent favorables au développement bactérien et 6) il est possible que certaines EPS liées limitent le développement bactérien. La quantification des activités bactériennes ainsi que de la production bactérienne sont de meilleurs indicateurs du développement bactérien dans les biofilms mais ces techniques sont difficiles à mettre en place *in situ*. Pour compléter les résultats obtenus sur le terrain au cours de ce chapitre et valider nos hypothèses, une expérimentation en conditions contrôlées est un bon complément.





## CHAPITRE 2

Déterminisme de la production bactérienne dans un biofilm microphytobenthique reconstitué en mésocosme : rôle des EPS.

---



---

*CHAPITRE 2**Déterminisme de la production bactérienne dans un biofilm  
microphytobenthique reconstitué en mésocosme : rôle des EPS.*

---

**Introduction**

Les vasières intertidales sont des zones très productives de par la formation d'un biofilm microphytobenthique qui se développe à leur surface. Les diatomées, qui sont les principaux producteurs primaires du biofilm, sécrètent des substances polymériques dans le milieu, composées principalement de sucres et de peptides, et qui vont jouer un rôle selon leur nature dans la stabilisation hydrique, physique ou chimique du sédiment ainsi que dans la balance en carbone cellulaire (Cf chapitre 1). Ces substances alimentent le compartiment matière organique et des études ont mis en évidence leur utilisation rapide par les bactéries hétérotrophes (Haynes et al. 2007, Bellinger et al. 2009, Hofmann et al. 2009, Thornton et al. 2010). Cependant, les bactéries sont mécaniquement limitées dans leur accès à ces substances par le diamètre des porines de leur enveloppe cellulaire (Nikaido & Vaara 1985) aussi sont-elles amenées à exsuder des enzymes (Gerbersdorf et al. 2008) dans le milieu (exoenzymes) ou accrochées à la paroi cellulaire (ecto-enzymes) qui vont cliver les molécules de grande taille en composés plus facilement assimilables. Thornton et al. (2010) ont montré que la principale activité impliquée dans la dégradation des glycopolymères est l'activité  $\beta$ -glucosidase, suivie par l'activité  $\alpha$ -glucosidase, et dans une moindre mesure les activités  $\beta$ -xylosidase,  $\beta$ -galactosidase et  $\alpha$ -galactosidase. Afin d'accéder aux composés azotés des peptides, protéines ou hétéropolymères, les bactéries doivent libérer des peptidases ou protéases qui vont cliver les liaisons peptidiques. En effet, ces dernières sont très stables et une hydrolyse spontanée est rare. Parmi les protéases, les aminopeptidases agissent en brisant la première liaison peptidique, ne libérant ainsi que l'acide aminé terminal, le processus se répétant sur la chaîne amputée d'un acide aminé. L'ensemble de ces activités doit dépendre des substances sécrétées par les organismes présents dans le sédiment ainsi que d'autres facteurs abiotiques et régir la production bactérienne.



Au cours d'études menées *in situ* (vasière de Brouage, Charente-Maritime, chapitre 1), il a été observé que les variations des conditions sur la vasière modifiaient les composants du biofilm microphytobenthique, à savoir les bactéries, les diatomées et les substances polymériques extracellulaires (EPS) que chacune sécrète. L'été, les conditions à la surface de la vasière intertidale sont très différentes de celles décrites en hiver. L'abondance du gastéropode *Hydrobia ulvae*, responsable d'un broutage important du biofilm, maintient les teneurs en chl *a* ainsi que les abondances bactériennes à des niveaux plus bas que ceux mesurés en hiver (~ 40 % des valeurs mesurées en hiver). Les ratios des différentes fractions d'EPS ont également été très différents, puisque les sucres colloïdaux et liés de bas poids moléculaire (BPM) ont été entre 3 et 5 fois moins concentrés en été, tandis que les sucres liés et colloïdaux de haut poids moléculaire (HPM) ont été environ 2 fois plus présents. Les teneurs en protéines EPS BPM quant à elles étaient de 330 à 500 fois supérieures en hiver, en protéines EPS HPM de 1 à 4 fois supérieures. Ces différences et les corrélations trouvées au sein du biofilm ont fait l'objet d'hypothèses dans le chapitre précédent, cependant la contribution de facteurs externes, *e.g.* production de mucus par la méiofaune, variation de la température ou de la quantité de lumière, événement de pluie etc. n'a pas pu être quantifiée alors que son impact est très probablement non-négligeable. Les suivis *in situ* font donc intervenir de nombreux facteurs non contrôlés qui forcent à modérer les conclusions proposées sur les interactions au sein des biofilms microphytobenthiques développés à la surface des vasières intertidales à deux saisons.

L'utilisation d'un mésocosme permet de réduire ces biais. Il s'agit d'un environnement reconstitué à une échelle moyenne reproduisant des conditions abiotiques caractéristiques de celles observées *in situ* sans les aléas climatiques et en limitant fortement les contributions d'autres organismes vivant sur la vasière, tels que les prédateurs. Cela permet par exemple d'étudier les impacts d'une carence en sels nutritifs ou de l'âge du biofilm sur la composition des substances polymériques sécrétées par les microorganismes (Staats et al. 2000b, Orvain et al. 2003a), des irradiations UV (Belzile et al. 2006, Ogebebo & Ochs 2008) ou encore des polluants (Lee et al. 2004) sur les communautés microbiennes et qui seraient susceptibles de perturber les métabolismes à la base de la sécrétion d'EPS. Ce type d'étude permet également d'étendre l'étude des interactions au sein des biofilms à différentes phases comme l'émersion, où les diatomées sont engagées dans des processus associés à la photosynthèse et les bactéries certainement actives, ou l'immersion, où l'hydrolyse des exopolymères excrétés par les diatomées pourrait fournir des substrats de bas poids moléculaire susceptibles de profiter aux bactéries. Il est difficile d'éliminer toutes formes de vie dans un stock de vase sans en

modifier les caractéristiques, principalement la granulométrie et la teneur en eau, mais il est tout de même possible d'éliminer une grande partie de la macro-méiofaune par tamisages successifs. Afin de clarifier les liens supputés suite aux études *in situ*, une étude a donc été conduite en mésocosme tidal, reproduisant des conditions de lumière, température et marée semblables à celles rencontrées sur la vasière. Au cours de cette étude, les biomasses des bactéries et diatomées, la production bactérienne *via* l'incorporation de thymidine tritiée ( $^3\text{H}$ -thy), les activités enzymatiques ( $\alpha$ -glucosidase,  $\beta$ -glucosidase et aminopeptidase) ainsi que les teneurs en sucres et protéines de 6 fractions de substances polymériques extracellulaires (EPS) et intracellulaires (IPS) ont été mesurées à différents moments du cycle de marée et nyctémère reproduit : fin de marée haute nocturne, début et fin de marée basse diurne, début et fin de marée haute diurne. Il est attendu que 1) des augmentations des teneurs en composés propres aux migrations de diatomées soient observées entre la fin de marée haute et le début de marée basse, ainsi qu'entre la fin de la marée basse et le début de la marée haute suivante, 2) des composés propres à l'activité de photosynthèse prévalent au cours de la marée basse diurne, 3) les composés colloïdaux soient solubilisés à marée haute, 4) certaines molécules stimulent la production et les activités enzymatiques bactériennes et enfin 5) les dynamiques de production de substances polymériques évoluent selon l'âge du biofilm, *i.e.* le stade de croissance des diatomées (phase exponentielle ou stationnaire). Le mésocosme permet aussi de faciliter l'échantillonnage à marée haute en limitant l'impact à la surface du sédiment, période pour laquelle il est souvent supposé *in situ* que le biofilm est inactif, soit suite à sa remise en suspension, soit suite à la migration dans le sédiment des diatomées.

Les approches *in situ* basées sur la production nette d'EPS doivent à la fois surestimer les productions d'EPS à cause des processus de pertes tels que la minéralisation microbienne et l'adsorption sur les particules de sédiment qui doivent réduire les gains d'extraction, et aussi sous-estimer la production d'EPS en raison de la contamination par d'autres sources d'EPS dans le sédiment (Underwood & Paterson 2003)

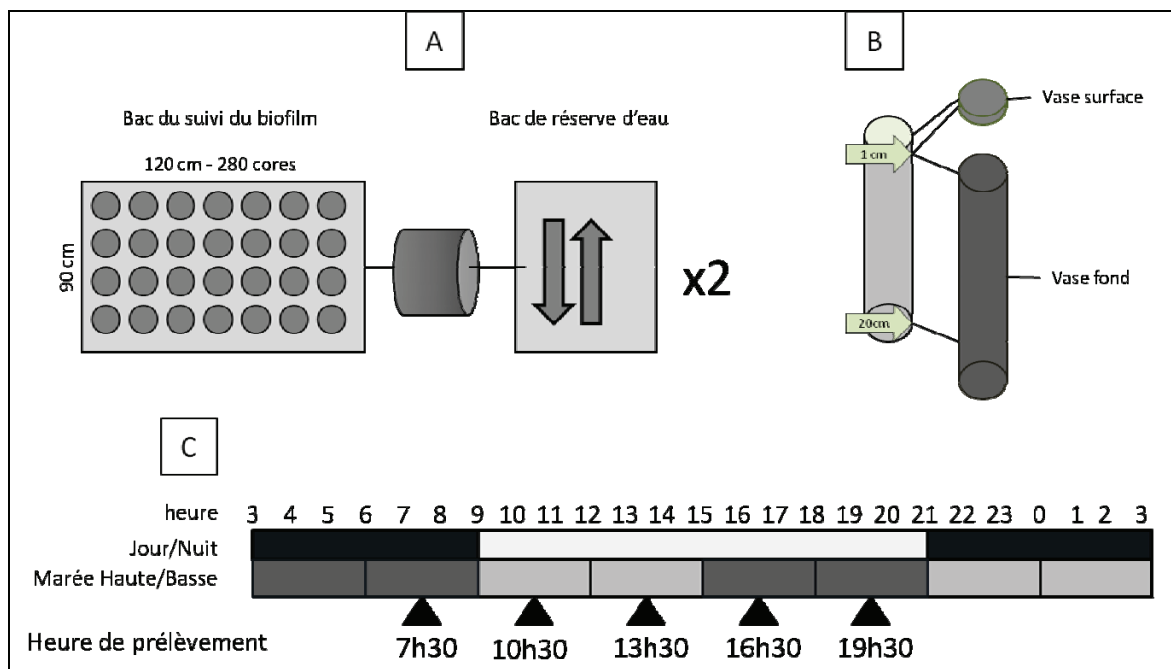
## Matériel et méthodes

Quatre bacs en plastique d'environ 1 m<sup>3</sup> chacun ont été utilisés pour créer deux mésocosmes indépendants permettant de reproduire la marée et le nyctémère soit 4 conditions de 6 heures chacune : une marée basse et une marée haute de jour, une marée basse et une marée haute de nuit.

Chaque mésocosme est composé de deux unités (fig.2.1-A), l'une servant de réserve d'eau de mer et l'autre étant dédiée au suivi du développement du biofilm avec des carottes de sédiment. A l'aide d'un système de pompes, l'eau est transvasée depuis la réserve dans l'unité du suivi pour y simuler une marée haute. Après 6 heures de marée haute, les pompes s'actionnent à nouveau (chronorupteurs) pour transvaser l'eau vers le réservoir et simuler une marée basse dans le bac du suivi. Au départ du suivi, l'eau de mer utilisée pour la réserve a préalablement été filtrée sur filtres 0.2 µm (Nucléopore) pour éviter le développement non contrôlé de micro-organismes qui pourrait entraîner une utilisation des sels nutritifs et une production/consommation de substances polymériques. La réserve est munie d'un toit pourvu de néons ultraviolets qui s'actionnent à marée basse (quand la réserve est pleine) pour stériliser l'eau de mer et ainsi éviter un développement microbien en dehors de la surface de la vase. L'unité dédiée au suivi du biofilm est recouverte d'un toit comportant des rangées de néons afin de reproduire le nyctémère. Le cycle de lumière imposé a été conçu pour mieux reproduire les conditions en milieu naturel. Sachant que l'eau qui recouvre la vase à marée haute est particulièrement turbide, la période de marée haute diurne a été simulée tout simplement en retirant le toit du mésocosme (donc en ôtant la source de lumière) ce qui permet de n'exposer le bac qu'à la faible luminosité de la pièce où ils étaient stockés. L'unité destinée au suivi du biofilm reproduit une vase artificielle dans laquelle les échantillons sont prélevés. Afin de limiter l'impact des prélèvements successifs, la vase a été directement mise en place dans des carottiers en PVC de 5 cm de diamètre et 15 cm de long qu'il suffisait de prélever aléatoirement à chaque mesure.

La vase utilisée provient de la vase d'Esnandes (Charente-Maritime) qui a été préférée à celle de Brouage (suivi *in situ*, Charente-Maritime) car elle possède les mêmes caractéristiques granulométriques, mais avec une quantité de diatomées benthiques beaucoup plus abondantes (Blanchard et al. 2002) et elle est beaucoup plus facile à prélever *in situ*. Ainsi les conditions initiales permettent un développement beaucoup plus rapide). Ceci peut être dû à une manipulation différente puisque dans l'étude de Orvain et al. (2003), puisque une vase maintenue en chambre froide pendant 3 mois avait été utilisée et enrichie avec un

inoculum de diatomées extraites d'un sédiment frais, alors qu'ici, le sédiment frais contenait déjà des diatomées qui ont gardé leur propre rythme de migration et les phases de réadaptation et de colonisation des diatomées entraînant une latence n'ont pas eu lieu. Elle a été tamisée sur 1 mm dans son ensemble. Une partie a servi de « vase de fond » (tout le carottier sauf le 1<sup>er</sup> cm de surface) tandis qu'une autre partie destinée à composer la « vase de surface » (1<sup>er</sup> cm) du mésocosme a été tamisée sur 300 puis 150 microns (fig. 2.1-B). Cette épaisseur de 1 cm a été choisie car elle représente une entité fonctionnelle du biofilm, contenant la biomasse photosynthétiquement active (Blanchard 1994); en outre, cette épaisseur est supérieure à la distance que peuvent parcourir les algues par migration pendant la durée d'une exondation (Hay et al. 1993), ce qui garantit que les variations de biomasse que nous mesurons ne sont pas dues à de tels déplacements mais bien aux processus de production ou de remise en suspension (Blanchard et al. 1998).



**Figure 2.1** : Schématisation du protocole expérimental. A : mésocosme avec une partie contenant les carottiers et une autre l'eau, reliées par une pompe. B : carottier de 5 cm de diamètre et composition en vase. C : planning de l'échantillonnage en fonction des marées et du nyctémère.

La durée du suivi a été pensée selon des travaux qui ont montré que trois à quatre jours étaient nécessaires aux diatomées pour reprendre les rythmes de migration et se mettre en phase avec le nyctémère imposé, puis quatre jours pendant lesquels le biofilm se développe avec une phase de croissance exponentielle des microalgues et enfin quatre jours de phase stationnaire où les algues ne se multiplient plus en raison d'une carence en ammonium dans le mésocosme et le biofilm vieillit (Orvain et al. 2003a), soit 12 jours de suivi. Cependant, elle aura été écourtée à 8 jours puisque le biofilm s'est développé dès le premier jour (pas de phase stationnaire).

Les échantillonnages ont eu lieu chaque jour dans le mésocosme A et un jour sur deux dans le mésocosme B. Les prélèvements ont été effectués au milieu des 4 périodes suivantes : fin de marée haute de nuit, début et fin de marée basse diurne, début de marée haute diurne (fig. 2.1-C). Ces prélèvements sont réalisés systématiquement dans le bac A et un jour sur deux dans le bac B. Un prélèvement supplémentaire à marée haute diurne a été réalisé les jours 3 et 7 pour le mésocosme A et les jours 4 et 8 pour le mésocosme B, afin d'avoir un point de comparaison entre la fin de marée haute diurne et la fin de marée haute nocturne.

Pour le suivi du développement du biofilm, à chaque temps, trois carottes ont été prélevées au hasard. Pour chacune, à l'aide d'un poussoir placé sous la carotte, le premier cm de vase a été poussé en dehors de la carotte et tranché. Ces trois échantillons ont été groupés dans une barquette en plastique préalablement pesée. Le fait de grouper les carottes prises au hasard a permis d'intégrer l'hétérogénéité spatiale potentielle dans les mesures. Le poids de sédiment prélevé a alors été mesuré. Le sédiment a été homogénéisé puis aliquoté pour les analyses d'abondance, d'activité ( $\alpha$ - et  $\beta$ - glucosidase,  $\gamma$  et de production bactériennes, de teneur en chlorophylle  $a$ , en ammonium frais, nitrates, nitrites, phosphates, matière organique et minérale, ainsi qu'en EPS et IPS (sucres et protéines). La quantité de lumière reçue à la surface du sédiment ainsi que la température ont été enregistrées toutes les minutes grâce à des capteurs (Licor pour la lumière et Hobo pour la température). La salinité a été régulièrement mesurée grâce à un salinomètre.

### *Mesures de l'abondance bactérienne*

Deux mL de sédiment sont fixés grâce à 2 mL de formol préalablement filtré sur 0,2  $\mu\text{m}$  (concentration finale de 2%) puis conservés à 4°C jusqu'aux analyses suivantes. Afin de détacher les bactéries des particules de sédiment, 1 mL d'échantillon (dilué de moitié dans le formol) a été successivement dilué au demi, au dixième puis au centième (dilution finale de

1:4000) dans du pyrophosphate de sodium préalablement filtré sur 0.2  $\mu\text{m}$ . les échantillons dilués ont ensuite été incubés pendant 30 minutes à 4°C puis choqués par ultrasons (60 W, 30 sec). Les bactéries ont été fixées au 4,6-diamidino-2-phénylindole dihydrochloride (DAPI, concentration finale de 2500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) pendant 15 minutes dans l'obscurité et filtrées sur une membrane noire Nucleopore de 0.2  $\mu\text{m}$  (Porter & Feig 1980). Les cellules bactériennes sont comptées par microscopie à épifluorescence (x1000, Axioskop 2 mot plus – Zeiss, 30 champs comptés en moyenne) couplée à une caméra (AxioCam MRc5 – Zeiss). Les biovolumes (V) sont estimés à partir de la longueur (L) et de la largeur (2r) selon la formule suivante :  $V = \pi r^2 \cdot (L - \frac{2}{3} r)$  (Fuhrman 1981). La biomasse (en carbone) a été calculée à partir des volumes cellulaires et des abondances en utilisant un contenu en carbone de 560 fg C  $\mu\text{m}^{-3}$  (Bratbak 1985).

### *Mesures de la production bactérienne*

La production bactérienne a été mesurée par le taux d'incorporation de thymidine tritiée ( $^3\text{H}$ -Thy) selon les méthodes de Garet (1996), Garet & Moriarty (1996) et Bettarel et al. (2006) modifiées par Dupuy. Le sédiment homogénéisé est dilué de moitié dans de l'eau de mer filtrée sur 0,22  $\mu\text{m}$ . Chaque mesure a comporté des triplicats ainsi qu'un témoin. Dans quatre tubes à centrifuger de 15 mL, 30  $\mu\text{L}$  de sédiment dilué ont été déposés soigneusement au fond. Pour le témoin, 200  $\mu\text{L}$  de formol à 4% ont été ajoutés immédiatement et le tube a été vortexé. Dans chaque tube, 25  $\mu\text{L}$  de thymidine  $^3\text{H}$  (0,925 MBq, 33000 nM) ont été ajoutés. Les tubes sont alors fermés hermétiquement, vortexés et incubés pendant 30 minutes à température de la vasière. L'incubation a été arrêtée par ajout de 200  $\mu\text{L}$  de formol 4% et agitation au vortex. Les tubes sont conservés à 4°C jusqu'à la mesure de radioactivité. Les tubes ont alors été centrifugés (4°C, 4500g, 15 min) et les surnageants rejetés. Un lavage a été répété en ajoutant 5 mL de formol 4% aux culots, puis deux lavages en ajoutant 5 mL d'éthanol 80% froid (élimination des lipides). Les culots ont été remis en suspension dans 2 mL de TCA 5% froid puis filtrés sur filtres en polycarbonate 0,22  $\mu\text{m}$ . Les tubes ainsi que les colonnes de filtration ont été rincées quatre fois avec 2 mL de TCA 5%. Les filtres ont alors été déposés dans des tubes en polypropylène et 2 mL de HCl 0,5M ont été ajoutés avant extraction pendant 16 heures dans une étuve à 95°C. Enfin, 500  $\mu\text{L}$  d'extrait ont été déposés dans une fiole à scintillation auxquels ont été ajoutés 5 mL de liquide scintillant. Les fioles ont alors été lues au compteur à scintillation. La production a été calculée selon formule suivante :

Production bactérienne ( $\mu\text{gC}/\text{mL}/\text{jour}$ ) =  $((\text{DPM} \times \text{Ftrans DPM} / \text{Curie} \times \text{FC}) / (\text{temps incubation} \times \text{volume de l'échantillon} \times \text{Activité spécifique})) \times \text{volume total passé au compteur à scintillation} \times \text{Conversion cellules} / \text{carbone}$

avec DPM : mesure au compteur à scintillation ; Utilisation du facteur Ftrans DPM/Curie :  $4,51 \times 10^{-13}$  ; Utilisation du facteur de conversion (FC) de Pollard et Moriarty (1984) (Pollard & Moriarty 1984) :  $5 \times 10^{17}$  cellules mole<sup>-1</sup> de thymidine ; Activité spécifique : 25000 Ci mol<sup>-1</sup> ; volume total passé au compteur à scintillation : 5,5 mL ; Conversion cellules/carbone : 22 fg C cellule<sup>-1</sup>.

### *Mesures de l'activité bactérienne*

Des analyses préliminaires ont été effectuées afin de déterminer la concentration saturante de chaque substrat et les différents temps d'incubation. La meilleure façon de conserver les échantillons du sédiment avant analyses a également été testée (mesure directe, congélation directe du sédiment, incubation puis mesure directe du surnageant et incubation puis congélation du surnageant).

Les concentrations finales des substrats utilisés dans 1,9 mL de sédiment dilué (1:1) ont été de 0,05 mM (solution fille à 1 mM) pour l'aminopeptidase, 1 mM (solution fille à 20 mM) pour l' $\alpha$ -glucosidase et 1 mM (solution fille à 20 mM) pour la  $\beta$ -glucosidase. La solution « stop » utilisée pour l'aminopeptidase était une solution de SDS 10% (1 g dans 10 ml), et pour les  $\alpha$ - et  $\beta$ - glucosidases un tampon ammonium-glycine à pH = 10,5-11 (à 0.05 M de glycine et 0.2 M de chlorure d'ammonium).

Cinq tubes Eppendorf de 2 mL sont utilisés par activité : un blanc, un T<sub>0</sub> contenant déjà la solution stop, et 3 temps d'incubations. Le sédiment homogénéisé est d'abord dilué de moitié dans de l'eau de mer filtrée sur 0,2  $\mu\text{m}$ , puis 1,9 mL de ce sédiment dilué a été déposé dans chacun des 15 tubes Eppendorf (3 activités  $\times$  5 tubes). Cent  $\mu\text{L}$  d'eau sont ajoutés au tube « blanc », 100  $\mu\text{L}$  de substrats sont ajoutés aux autres tubes, qui sont agités au vortex 5 s. L'incubation a été réalisée à température équivalente à celle des mésocosmes pour des temps d'incubation qui ont été, pour l'aminopeptidase, 10 min, 30 min et 1h, pour les  $\alpha$ - et  $\beta$ -glucosidases : 45 min, 1h15 et 2 h. A la fin des temps d'incubations (dès l'ajout des substrats pour les tubes T<sub>0</sub>), les tubes sont centrifugés (4°C, 10 000g, 2 min) puis 1 ml de surnageant est prélevé et l'ajout de 100  $\mu\text{l}$  solution stop va stopper l'incubation. Les tubes sont alors congelés (-20°C) jusqu'aux lectures de la fluorescence.

La lecture de la fluorescence est réalisée grâce à un spectrofluorimètre (SAFAS FLX-Xenius), en microplaque en triplicat de mesure aux longueurs d'ondes suivantes : aminopeptidase : excitation 340 nm, émission 410 nm, alpha- et bêta- glucosidase : excitation 365 nm, émission 460 nm. Les gammes étalon sont réalisées pour l'aminopeptidase à partir de 2 naphtylamine (de 0 à 12,5  $\mu\text{M}$ ) et pour les  $\alpha$ - et  $\beta$ - glucosidases à partir de 4 méthylumbelliférol (de 0 à 1  $\mu\text{M}$ ).

### *Mesure de la teneur en eau, en matières organique et minérale et en pigments dans le sédiment*

15 mL de sédiment homogénéisé ont été prélevés à l'aide de seringues et déposés dans un tube à centrifugation de 15 mL prépesé. Le poids du tube avec le sédiment a été mesuré. Après centrifugation (4°C, 2000 g, 10 min), l'eau interstitielle (surnageant) a été utilisée pour les mesures en  $\text{NH}_4$  et en matière organique dissoute. Le sédiment a été congelé et stocké à -20°C et à l'obscurité avant d'être lyophilisé. Après lyophilisation, le tube contenant le sédiment a été pesé pour estimer la teneur en eau du sédiment frais. A peu près 100 mg de sédiment lyophilisé ont été pesés et ont servi à l'extraction des pigments dans 8 mL d'acétone à 90% en agitant par rotation les échantillons pendant 18h dans l'obscurité. Après centrifugation (4°C, 2000 g, 5 min), la fluorescence du surnageant est mesurée grâce à un Fluorometer Turner TD-700 avant et après acidification (10  $\mu\text{L}$  HCl 0,3 M pour 1 mL MeOH). La chlorophylle *a* et les phaeopigments ont alors été mesurés par la méthode de fluorimétrie (Lorenzen 1966) et exprimés en  $\text{mg chl } a \mu\text{g}^{-1} \text{ PS}$  (poids sec de sédiment).

La teneur en matière organique (% du poids de sédiment sec PS) a été estimée par perte au feu.

### *Mesure des concentrations en phosphates et ammonium*

L'ammonium et les phosphates contenus dans l'eau interstitielle du sédiment ont été mesurés à partir de l'eau extraite suite à la centrifugation destinée à l'extraction des pigments. Pour l'estimation des phosphates, 250  $\mu\text{L}$  d'eau interstitielle ont été dilués dans 10 mL d'eau miliQ dans un flacon à scintillation et stockés à -20°C. Pour l'ammonium, de 100 à 250  $\mu\text{L}$  ont été dilués dans 10 mL d'eau miliQ (dilution finale entre 1 et 2.4%) dans un flacon en verre Schott préalablement brûlés à 450°C.

La mesure d'ammonium a été réalisée par la méthode colorimétrique (Koroleff 1969). Pour 10 mL d'échantillon dilué, 500  $\mu\text{L}$  de solution de phénol-nitroprussiate ont été ajoutés,



puis, après avoir bien mélangé, 500  $\mu\text{L}$  de solution alcaline complexante ont été ajoutés. L'échantillon a alors été agité et conservé à température ambiante et à l'obscurité pendant une nuit. Les concentrations ont été estimées par conversion des densités optiques lues en spectrophotométrie à 630 nm sur la base de la régression obtenue à partir d'une gamme étalon.

Les phosphates ont été mesurés de la même manière que pour les suivis *in situ*.

### *Mesure des teneurs en EPS*

Pour l'extraction des EPS, 3 mL de sédiment frais ont été placés dans un tube à centrifuger de 15 mL. Le même volume d'eau de mer artificielle préalablement filtrée sur 0,2  $\mu\text{m}$  et autoclavée a été ajouté. Suite à l'extraction des EPS colloïdales puis liées, les culots ont été remis en suspension dans 5 mL d'ASW puis ont été soniqués pendant 3 min à 100 W dans la glace. Les tubes ont alors été placés sur un agitateur rotatif vertical (Stuart SB2) pendant 1h à 30°C puis centrifugés (30°C, 3000 g, 10 min). Cette opération a permis d'extraire dans le surnageant les substances internes ainsi que de potentielles EPS liées qui ne se seraient pas efficacement désolidarisées du frustule à l'étape d'extraction précédente. La suite des extractions et séparations des composés de haut poids moléculaire (HPM) et de bas poids moléculaire (BPM) ainsi que la mesure des teneurs en sucre et en protéines des substances polymériques a été réalisée selon le protocole décrit au chapitre 1. Seules les substances internes des jours 6, 7 et 8 ont pu être analysées.

### *Analyses statistiques*

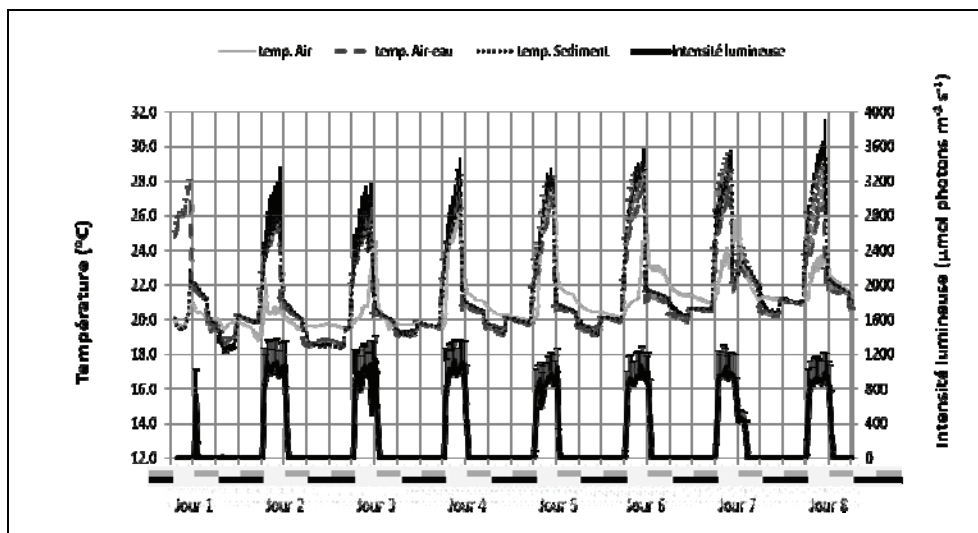
Afin de déterminer les patrons communs ou opposés parmi les dynamiques suivies, les corrélations entre toutes les variables ont été testées ainsi qu'entre les mesures des variations des variables entre deux échantillonnages, ce qui permettait alors d'identifier les variables subissant les mêmes effets au cours d'un changement d'état à la surface du sédiment.

Deux analyses en composantes principales ont été faites en intégrant les bactéries, la chl *a*, et les 6 fractions de sucres et protéines des substances polymériques, afin de mieux visualiser ces corrélations. La première a englobé l'ensemble des temps d'échantillonnages en ajoutant les facteurs abiotiques suivant : la teneur en eau, en ammonium, en phosphates et en matière organique. La seconde a focalisé sur l'émersion diurne afin de comparer les résultats obtenus en mésocosme à ceux obtenus *in situ*. Les ACP ont été réalisées grâce à ExcelStat.

## Résultats

### Conditions dans les mésocosmes

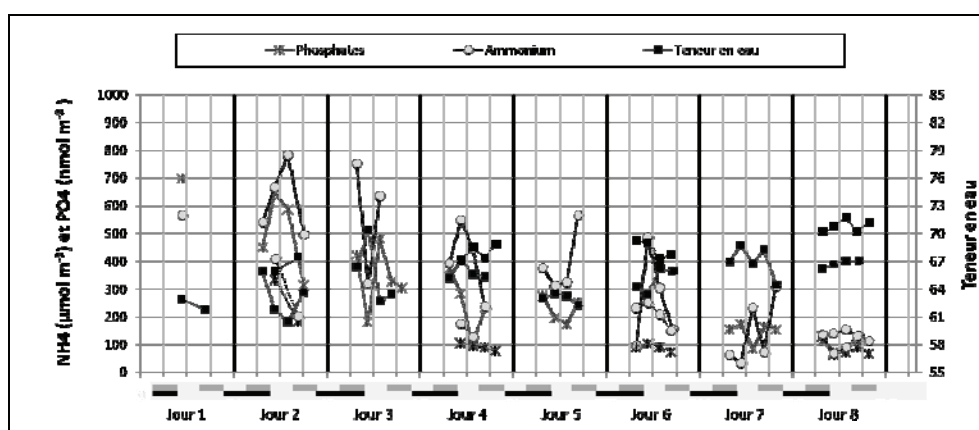
La quantité de lumière reçue à la surface du sédiment lors des marées basse diurnes reproduit assez bien les valeurs mesurées sur le terrain en juillet 2008 (Cf chapitre 1) qui variaient entre 1200 et 2000  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (fig. 2.2). La température mesurée dans les différents compartiments a augmenté quotidiennement au cours du suivi (fig. 2.2). La température mesurée dans le sédiment et la température mesurée juste au dessus du sédiment (air à marée basse et eau à marée haute) étaient assez similaires et toutes deux augmentent lors des marées basses diurnes sous l'action des néons, variant d'environ 24 °C au début de la marée basse diurne jusqu'à 30°C à la fin de cette phase, pour redescendre entre 20 et 24°C à marée haute diurne. La nuit, ces températures étaient plus basses, entre 18 et 22°C avec, sauf pour le deuxième jour, un degré de plus à marée haute qu'à marée basse. Les températures moyennes ont été comparables à celles mesurées sur le terrain en juillet avec une moindre amplitude.



**Figure 2.2** : températures (°C) et quantité de lumière à la surface du sédiment ( $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). temp Air : température de l'air ; temp Air-eau : température à la surface du sédiment (eau à marée haute et air à marée basse) ; temp. Sediment : température dans le sédiment. Sur le graphique, la résolution temporelle est de 30 minutes. L'intensité lumineuse correspond à la moyenne de lumière reçue depuis 30 minutes. Les températures sont la moyenne des deux

valeurs enregistrées simultanément toutes les 30 minutes. Les barres verticales représentent les écarts-types.

La teneur moyenne par jour en eau du sédiment a augmenté progressivement de 62% le 1<sup>er</sup> jour à 67% le 4<sup>ème</sup> jour, puis de 63% le 5<sup>ème</sup> jour à 69% le 8<sup>ème</sup> jour (fig. 2.3). Elle était plus élevée dans le bac B. Ces valeurs sont supérieures à celle de  $52.24 \pm 2.67$  % mesurée *in situ* en juillet, le sédiment a donc été plus hydraté lors de ce suivi, cependant elles incluent des prélèvements lors d'émersion avec le sédiment recouvert d'eau donc certainement très hydraté. En ne tenant compte que de l'émersion, les valeurs de la teneur en eau sont restées élevées ( $66,23 \pm 3,03$  % en moyenne) mais plus proches de celles rencontrées *in situ* en février 2008 ( $61,58 \pm 2,75$  %). La teneur en ammonium dans le bac A a diminué de  $600 \mu\text{mol m}^{-2}$  à  $100 \mu\text{mol m}^{-2}$ , et de 300 à  $100 \mu\text{mol m}^{-2}$  dans le bac B (fig. 2.3). Cette valeur équivaut en moyenne à  $149,63 \pm 92,55 \mu\text{M}$ , ce qui est environ 6 fois supérieur aux concentrations mesurées en juillet sur le terrain (en moyenne  $22,13 \pm 10,88 \mu\text{M}$ ). la teneur en phosphates a varié entre 50 et  $700 \text{ ng m}^{-2}$  La teneur en matière organique moyenne par jour a varié entre  $10,7 \pm 0,2$  % et  $11,9 \pm 0,5$  %, les valeurs diminuant globalement au cours du suivi (données non présentées).



**Figure 2.3 :** évolution de la teneur en eau (%) et des concentrations en phosphate ( $\text{nmol m}^{-2}$ ) et en ammonium ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ) en fonction de l'âge du biofilm (en jours) dans les deux mésocosmes (les observations du mésocosme B sont reliées en pointillés) au cours du suivi. En bas du graphique, les barres noires indiquent les périodes nocturnes, les barres grises les immersions.

Pour les activités, la production bactérienne, les bactéries, la chl *a* ainsi que toutes les fractions de substances polymériques, les mesures ont été centrées-réduites et les différences entre la fin de marée haute nocturne et la fin de marée haute diurne précédente ont été

calculées (données non présentées). Globalement, les différences ne dépassent pas les  $\pm 2$  écarts types, excepté pour les sucres colloïdaux où elles varient de -4 à +6 écarts type. Il existe donc des différences entre une fin de marée haute diurne et nocturne.

### *Evolution de la chlorophylle a*

Les concentrations en chlorophylle *a* dans les deux bacs sont assez semblables ( $109,46 \pm 14,55 \text{ mg m}^{-2}$  pour le bac A et  $114,57 \pm 12,65 \text{ mg m}^{-2}$  pour le bac B) (fig. 2.4-A). En moyenne sur l'ensemble du suivi, les concentrations ont été de  $111,09 \pm 14,04 \text{ mg m}^{-2}$  soit  $30,44 \pm 5,14 \mu\text{g g}^{-1}$  PS. Globalement, elles ont été stables autour de  $100 \text{ mg m}^{-2}$  les 3 premiers jours puis ont augmenté à  $120 \text{ mg m}^{-2}$  le jour 4 (phase de croissance) pour rester stables autour de  $110 \text{ mg m}^{-2}$  les 4 derniers jours (phase stationnaire). La dynamique chlorophyllienne était associée de façon significative à une diminution des teneurs en ammonium (fig. 2.3) des eaux interstitielles des sédiments ( $r = -0,36$ ,  $P < 0,05$ ). La concentration en chl *a* a augmenté pendant la marée basse diurne (sauf le jour 4 dans le mésocosme B) et diminué lors du passage à la marée haute suivante (sauf le jour 4) (fig. 2.4-C). Elle a augmenté du passage de marée haute de nuit à marée basse de jour (sauf les jours 2 et 3). Enfin, les concentrations ont systématiquement diminué au cours de la marée haute de jour.

Les variations en chl *a* au cours de la marée basse diurne étaient significativement et négativement corrélées à la teneur initiale ( $y = -0,839 + 117,05x$ ,  $r^2 = 0,69$ ).

### *Dynamiques bactériennes : abondances, production brute et activités enzymatiques*

En moyenne sur le suivi, la biomasse bactérienne était de  $653,60 \pm 189,61 \text{ mg m}^{-2}$ , pour une abondance d'en moyenne  $1,76 \cdot 10^9 \pm 4,39 \cdot 10^8 \text{ cellules mL}^{-1}$  (fig. 2.4-A). Cette valeur d'abondance est plus proche des valeurs mesurées *in situ* en hiver (0,94 fois la valeur moyenne de février) que celles mesurées en été (2,24 fois la valeur moyenne de juillet 2008). Les bactéries ont globalement diminué dans le sédiment du jour 1 ( $800 \text{ mg C m}^{-2}$ ) au jour 3 ( $600 \text{ mg C m}^{-2}$ ) et du jour 6 ( $700 \text{ mg C m}^{-2}$ ) au jour 8 ( $600 \text{ mg C m}^{-2}$ ). Les biomasses enregistrées aux jours 4 et 5 ont été respectivement de 730 et 600  $\text{mg C m}^{-2}$ . Les biomasses des deux mésocosmes étaient assez semblables. En revanche, les dynamiques ont été assez opposées entre les premiers jours de suivi et les derniers (fig. 2.4-B). En effet, une diminution des biomasses bactériennes a été enregistrée lors du passage de la marée haute nocturne à la marée basse diurne les jours 3, 4 (bac A), 5, 6 (bac B), et une augmentation a été enregistrée les jours 2, 6 (bac A), 7 et 8 (bac A). Lors du passage de la marée basse à la marée haute, le

phénomène inverse est plutôt observé, avec une augmentation des biomasses les jours 3, 4, 5, 6 (bac A) et 8 (bac A) et une diminution les jours 2, 6 (bac B), 7 et 8 (bac B). Au cours de la marée basse diurne, une diminution a été globalement enregistrée, excepté pour les jours 3, 5 et 8 (bac B), tandis qu'au cours de la marée haute, les biomasses ont augmenté (jours 4 et 8), diminué (jour 3) ou n'ont pas varié (jour 7).

Le taux de production bactérienne moyen sur l'ensemble du suivi a été de  $163,55 \pm 49,59 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ , variant entre  $48,81$  et  $259,05 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  (fig. 2.5-A). Les taux moyens quotidiens ont augmenté du jour 1 ( $153,37 \pm 25,89 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ ) au jour 4 ( $201,12 \pm 43,72 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ ) puis ont diminué jusqu'à  $106,89 \pm 47,38 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  le jour 7, et augmenté jusqu'à  $144,00 \pm 45,70 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  le jour 8. Dans le mésocosme B, le taux de production bactérienne a été positivement corrélé à la concentration en chl *a*, selon la régression suivante :  $\text{taux de production (mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}) = 1,945 \times \text{concentration en chl } a \text{ (mg C m}^{-2}) - 26,276$  ( $r^2 = 0,29$ ), tandis que dans le mésocosme A, la corrélation a été négative et définie comme suit :  $\text{taux de production (mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}) = -1,101 \times \text{concentration en chl } a \text{ (mg C m}^{-2}) + 268,61$  ( $r^2 = 0,13$ ) (fig. 2.10A). Le passage de la marée haute à la marée basse a eu un effet positif sur les taux de production à la fin du suivi (fig. 2.5-C), avec des augmentations enregistrées les jours 6, 7 et 8. Le passage à marée haute a été bénéfique au début du suivi, avec des diminutions enregistrées seulement pour les jours 4 (bac A), 7 et 8. Au cours de la marée basse, la production a diminué, sauf les jours 2 et 8 (bac A), ainsi qu'au cours de la marée haute (sauf le jour 7).

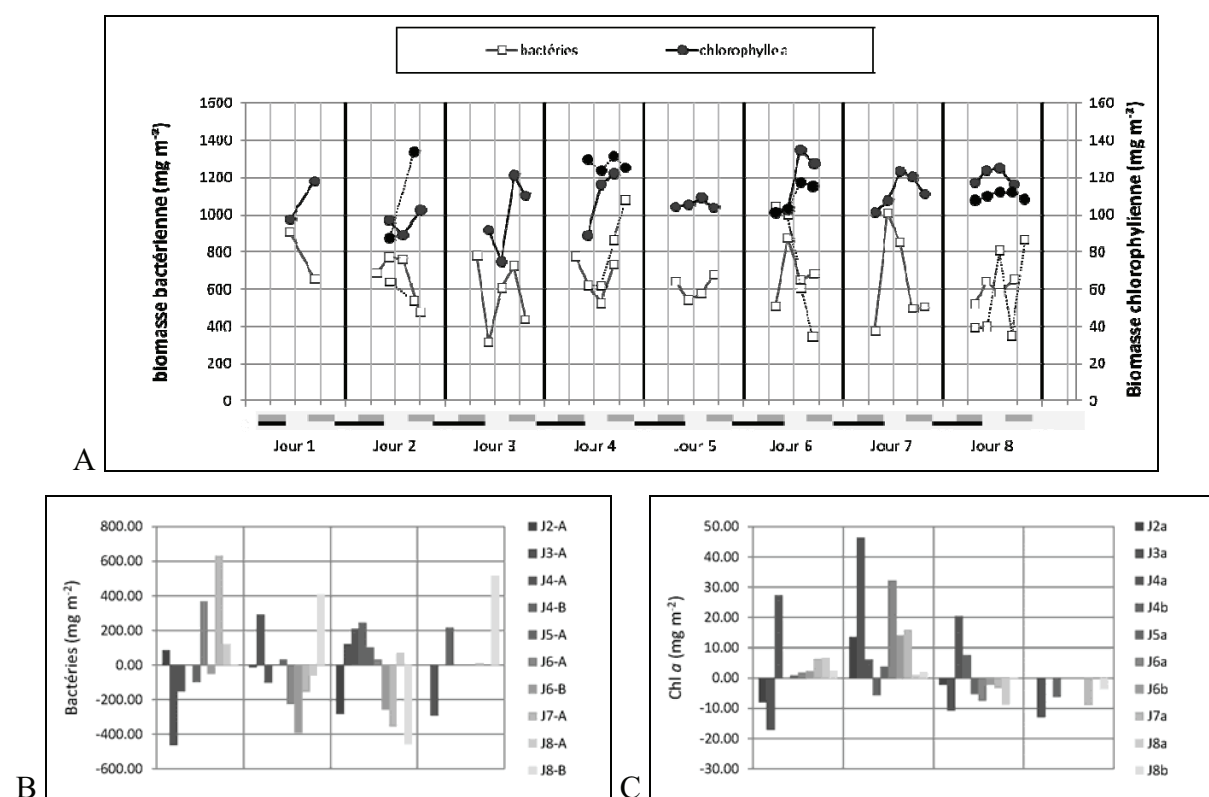
Les activités  $\alpha$ - et  $\beta$ - glucosidase ont été respectivement en moyenne de  $0,75 \pm 0,27 \mu\text{M g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  et  $1,51 \pm 0,57 \mu\text{M g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  dans le bac A et  $0,93 \pm 0,39 \mu\text{M g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  et  $2,29 \pm 0,72 \mu\text{M g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  dans le bac B (fig. 2.5-B), soit  $226,40 \pm 80,46$  et  $458,19 \pm 165,98 \text{ mM m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  dans le bac A et de  $267,83 \pm 111,09$  et  $659,54 \pm 191,40 \text{ mM m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  dans le bac B. L'activité aminopeptidase a été supérieure avec une moyenne au cours du suivi de  $16,12 \pm 9,37$  et  $25,07 \pm 13,91 \mu\text{M g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  respectivement dans les bacs A et B (fig. 2.5-B), soit  $5,01 \pm 2,68$  et  $7,26 \pm 4,06 \text{ M m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  respectivement. Globalement, les activités ont eu tendance à augmenter au cours du suivi.

L'activité  $\alpha$ -glucosidase a tendance à augmenter lors du passage de marée haute à marée basse (sauf les jours 2,3 et 7) (fig. 2.5-D), à diminuer lors de l'émersion (sauf les jours 2, 6A et 7) et lors du passage de marée basse à marée haute (sauf les jours 3, 5 et 7). Lors de la marée haute, elle a augmenté (jours 4 et 8) ou diminué (jours 3 et 7).

L'activité  $\beta$ -glucosidase a augmenté lors du passage de marée haute à marée basse (sauf les jours 3 bac B et 8 bac A) (fig. 2.5-E) et lors du passage de marée basse à marée haute

(sauf les jours 2, 4 bac A et 6). Au cours de la marée basse, les valeurs ont diminué dans le biofilm jusqu'au jour 7 à partir duquel elles ont montré des augmentations et au cours de la marée haute (sauf le jour 4).

Lors du passage de la marée haute à la marée basse, l'activité aminopeptidase a eu tendance à augmenter (sauf les jours 2, 3 et 7 où elle a diminué) (fig. 2.5-F). Au cours de la marée basse diurne, les valeurs ont augmenté pour le jour 2, le jour 4 dans le bac B, le jour 6, le jour 7 ou diminué pour le jour 3, le jour 4 dans le bac A et le jour 8 dans le bac B. Le passage à la marée haute suivante s'est accompagné d'une baisse de l'activité (sauf les jours 3 et 8 bac B), qui s'est poursuivie à marée haute (sauf le jour 4).

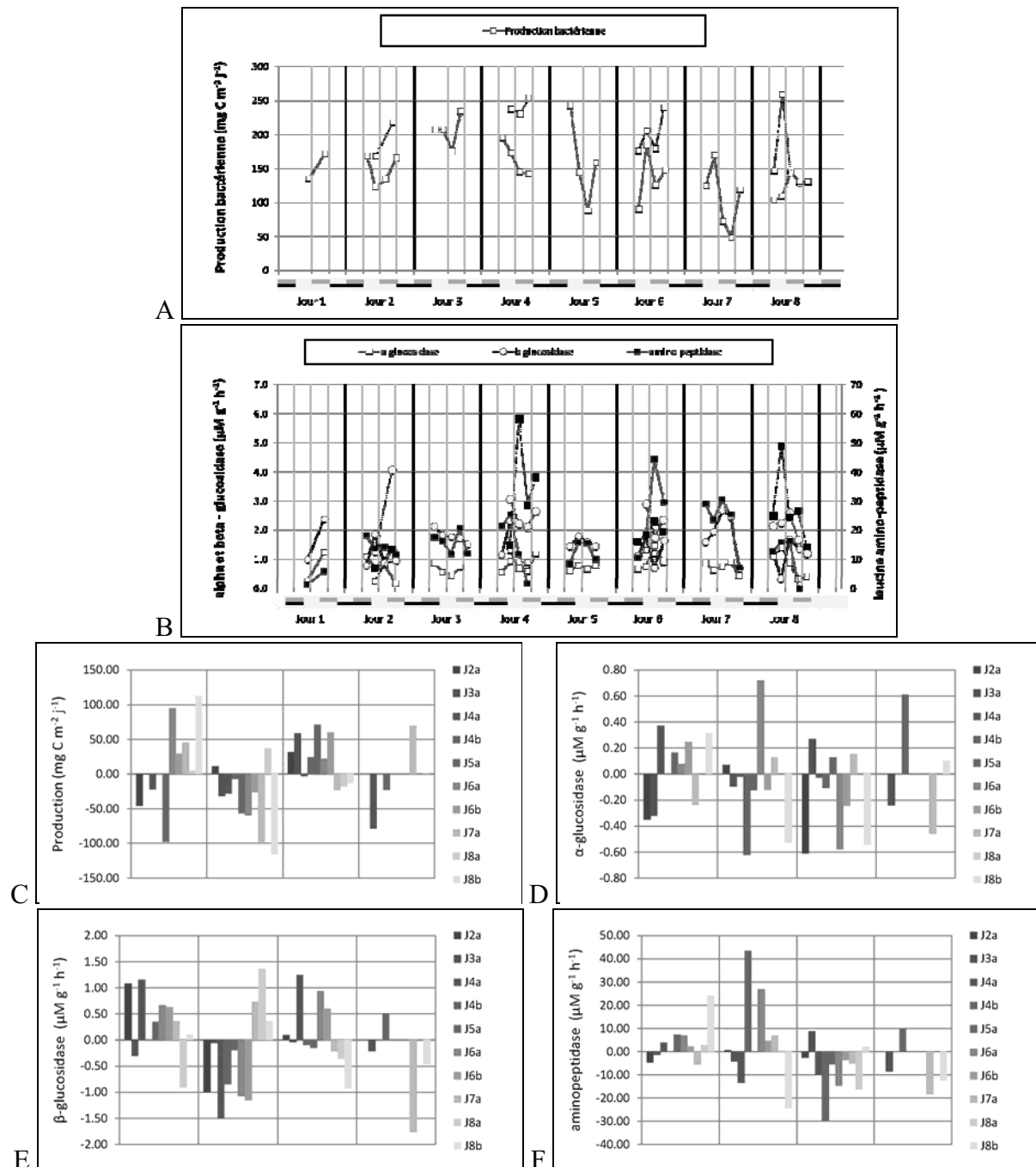


**Figure 2.4 :** évolution des biomasses bactériennes (mg m<sup>-2</sup>) et chlorophylliennes (mg m<sup>-2</sup>) en fonction de l'âge du biofilm (en jours) dans les deux mésocosmes. A : valeur mesurée à chaque prélèvement (les observations du mésocosme B sont reliées en pointillés) au cours du suivi. En bas du graphique, les barres noires indiquent les périodes nocturnes, les barres grises les immersions. B et C : différences mesurées entre deux mesures pour chacune des 4 phases (séparées par une ligne verticale, de gauche à droite : marée haute nocturne – marée basse diurne ; marée basse diurne ; marée basse diurne à marée haute diurne ; marée haute diurne). B : biomasses bactériennes (mg C m<sup>-2</sup>). C : biomasse chlorophyllienne (mg C m<sup>-2</sup>).

*Evolution des substances polymériques*

Les concentrations moyennes des teneurs en sucre des EPS colloïdaux HPM et BPM et liées HPM et BPM ont été respectivement de  $81,40 \pm 17,06$ ,  $24,98 \pm 25,52$ ,  $188,03 \pm 48,49$  et  $71,33 \pm 20,79$  mg m<sup>-2</sup>, soit respectivement  $7,46 \pm 1,61$ ,  $2,28 \pm 2,3$ ,  $17,21 \pm 4,51$  et  $6,53 \pm 1,93$  µg g<sup>-1</sup> PS (fig. 2.6-A). Les teneurs en sucres internes étaient en moyenne de  $4,81 \pm 1,06$  g m<sup>-2</sup> soit  $1,39 \pm 0,36$  mg g<sup>-1</sup> PS pour les HPM et  $4,48 \pm 1,48$  g m<sup>-2</sup> soit  $1,26 \pm 0,37$  mg g<sup>-1</sup> PS pour les BPM (fig. 2.7-A). Les molécules HPM ont donc été plus abondantes dans le 1<sup>er</sup> cm que les molécules de BPM.

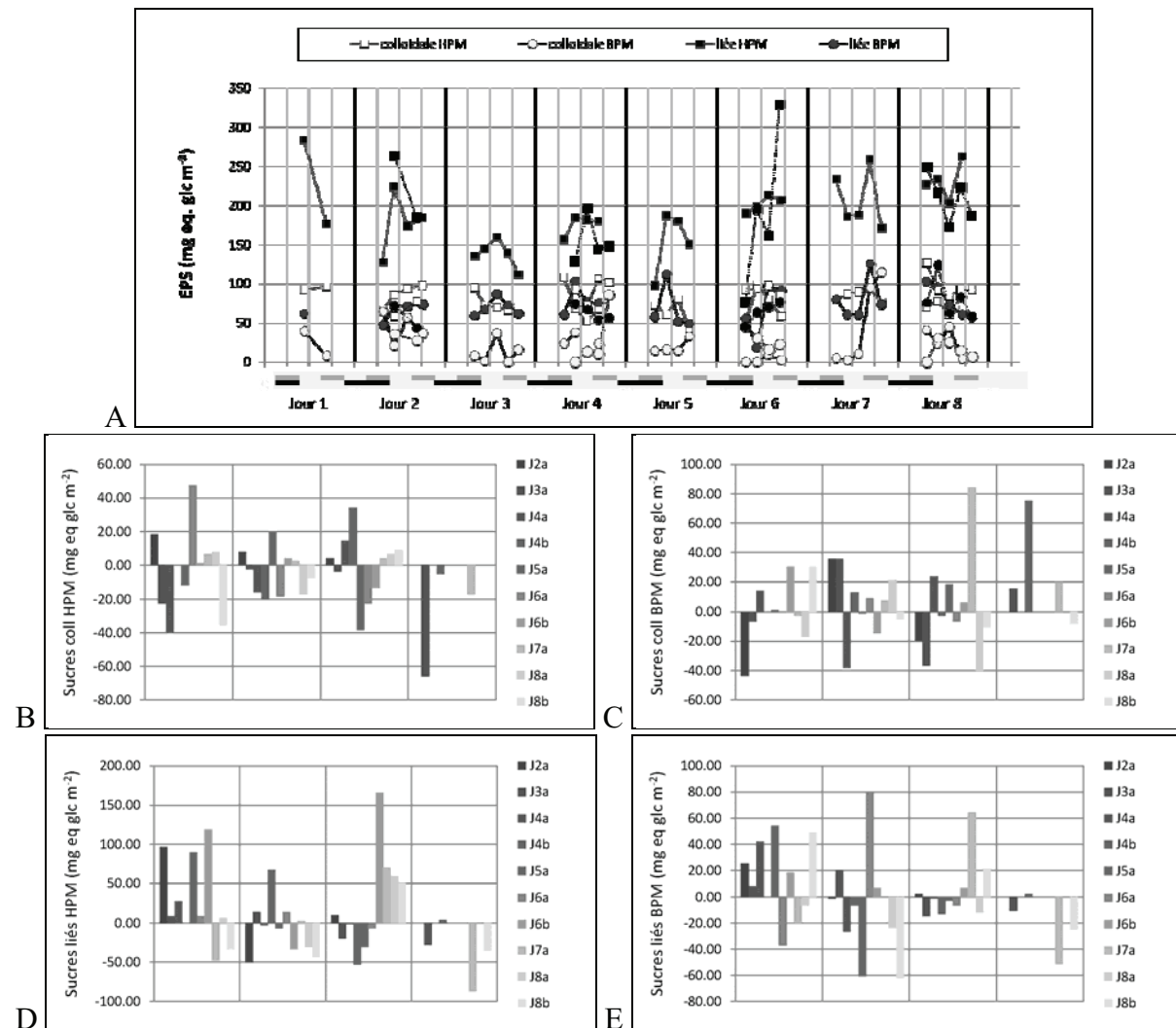
Globalement les **sucres colloïdaux HPM** (fig. 2.6-B) ont diminué (jour 3, jour 4 dans le bac A et jour 8 dans le bac B) ou augmenté (jour 2, jour 6, jour 7 et jour 8 dans le bac A) de la marée haute à la marée basse. Ils ont diminué (sauf le jour 2, le jour 5, le jour 6 dans le bac B et le jour 7) pendant la marée basse et augmenté en début et fin de suivi (sauf le jour 3, le jour 5 et le jour 6) de la marée basse à la marée haute, et diminué pendant la marée haute. Concernant les **sucres colloïdaux BPM** (fig. 2.6-C), les teneurs ont augmenté dans (jour 4 dans le bac A, jour 5, jour 6 dans le bac B et jour 8 dans le bac B) ou diminué (jour 2, jour 3, jour 7 et jour 8 dans le bac A) de la marée haute à la marée basse, puis augmenté (jour 2, jour 3, jour 4 dans le bac B, jour 6 dans le bac A, jour 7 et jour 8 dans le bac A) ou diminué (jour 4, jour 5, jour 6 dans le bac A et jour 8 dans le bac B) pendant la marée basse, puis augmenté (jour 4 dans le bac A, jour 5, jour 6 dans le bac B et jour 7) ou diminué (jour 2, jour 3, jour 4 dans le bac B, jour 6 dans le bac A, jour 8) de la marée basse à la marée haute, enfin les teneurs ont augmenté à marée haute sauf le jour 8. Pour les **sucres liés HPM** (fig. 2.6-D), les teneurs ont augmenté de la marée haute à la marée basse dans le biofilm jeune (sauf le jour 7 et le jour 8 dans le bac B), puis diminué au cours de la marée basse surtout dans le biofilm âgé (sauf le jour 3, le jour 4 dans le bac B, le jour 6 dans le bac A et le jour 7), puis augmenté lors du passage à marée haute dans le biofilm âgé (sauf le jour 3, le jour 4, le jour 5 et le jour 6 dans le bac A) pour diminuer pendant la marée haute (sauf le jour 4). Les teneurs en **sucres liés BPM** (fig. 2.6-E) ont augmenté de la marée haute à la marée basse (sauf le jour 6 dans le bac A, le jour 7 et le jour 8 dans le bac A) puis diminué au cours de la marée basse (sauf le jour 3 et le jour 6), lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 2, le jour 6 dans le bac B, le jour 7 et le jour 8 dans le bac B) et au cours de la marée haute (sauf le jour 4). Les **sucres internes HPM** (fig. 2.7-B) ont augmenté de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 8 dans le bac B) ainsi qu'au cours de la marée basse (sauf le jour 6 et le jour 7). Ils ont diminué lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 8 dans



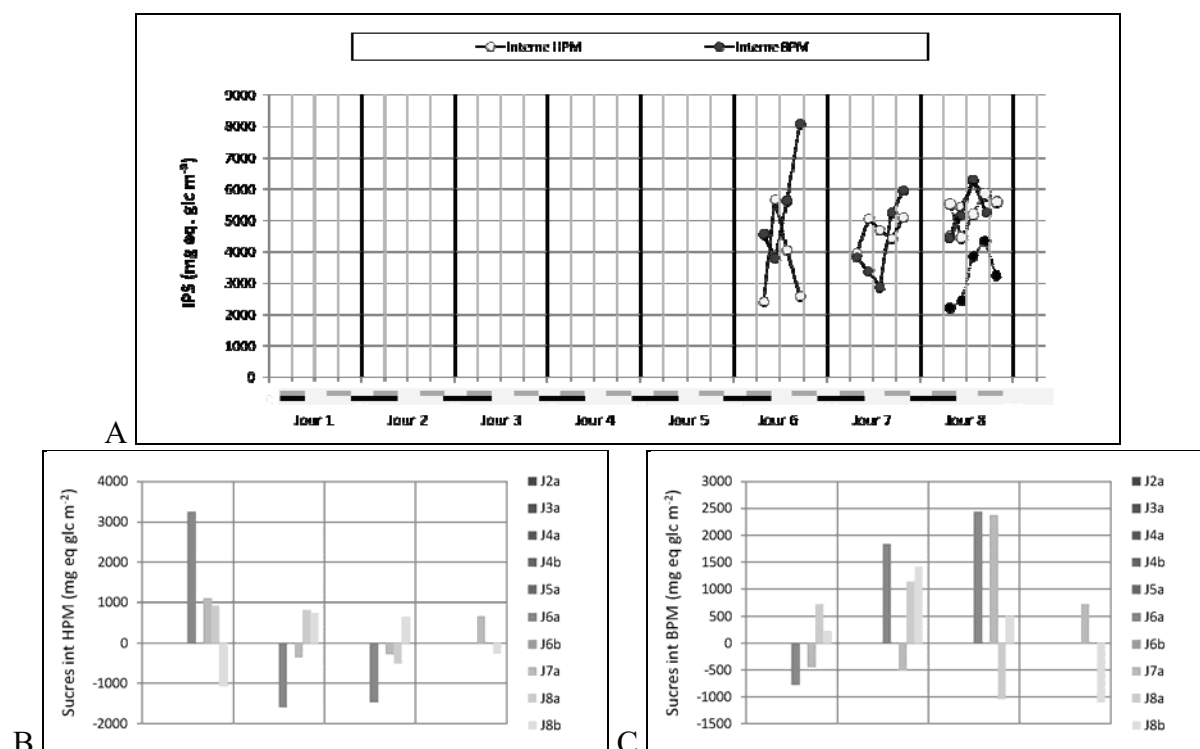
**Figure 2.5 :** évolution de A : la production bactérienne ( $\text{mg C m}^{-2} \text{j}^{-1}$ ) et des B : activités enzymatiques ( $\mu\text{M g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) selon l'âge du biofilm (en jours) dans les deux mésocosmes (les observations du mésocosme B sont reliées en pointillés) au cours du suivi. En bas du graphique, les barres noires indiquent les périodes nocturnes, les barres grises les immersions. C à F : différences mesurées entre deux mesures pour chacune des 4 phases (séparées par une ligne verticale, de gauche à droite : marée haute nocturne – marée basse diurne ; marée basse diurne ; marée basse diurne à marée haute diurne ; marée haute diurne). C : production bactérienne ( $\text{mg C m}^{-2} \text{j}^{-1}$ ) ; D : activité  $\alpha$ -glucosidase ( $\mu\text{M g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ; E : activité  $\beta$ -glucosidase ( $\mu\text{M g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ) ; F : activité aminopeptidase ( $\mu\text{M g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).



le bac B). Au cours de la marée haute, les teneurs ont augmenté le jour 7 et diminué le jour 8. **Les sucres internes BPM** (fig. 2.7-C) ont augmenté de la marée haute à la marée basse (sauf le jour 6 et le jour 7), pendant la marée basse (sauf le jour 7), lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 8 dans le bac A) et pendant la marée haute (sauf le jour 8). Il en ressort que les variations ont été positives ou négatives avec une tendance globale à s'inverser pour un biofilm âgé.



**Figure 2.6 :** évolution des sucres EPS (mg équivalent glucose m<sup>-2</sup>) selon l'âge du biofilm (en jours) dans les deux mésocosmes (les observations du mésocosme B sont reliées en pointillés) au cours du suivi. En bas du graphique, les barres noires indiquent les périodes nocturnes, les barres grises les immersions. B à E : différences mesurées entre deux mesures pour chacune des 4 phases (séparées par une ligne verticale, de gauche à droite : marée haute nocturne – marée basse diurne ; marée basse diurne ; marée basse diurne à marée haute diurne ; marée haute diurne). B : sucres colloïdaux HPM (mg eq glc m<sup>-2</sup>) ; C : sucres colloïdaux BPM (mg eq glc m<sup>-2</sup>) ; D : sucres liés HPM (mg eq glc m<sup>-2</sup>) ; E : sucres liés BPM (mg eq glc m<sup>-2</sup>).



**Figure 2.7 :** évolution des sucres IPS (mg équivalent glucose m<sup>-2</sup>) selon l'âge du biofilm (en jours) dans les deux mésocosmes (les observations du mésocosme B sont reliées en pointillés) au cours du suivi. En bas du graphique, les barres noires indiquent les périodes nocturnes, les barres grises les immersions. B et C : différences mesurées entre deux mesures pour chacune des 4 phases (séparées par une ligne verticale, de gauche à droite : marée haute nocturne – marée basse diurne ; marée basse diurne ; marée basse diurne à marée haute diurne ; marée haute diurne). B : sucres internes HPM (mg eq glc m<sup>-2</sup>) ; C : sucres internes BPM (mg eq glc m<sup>-2</sup>).

Les concentrations moyennes des teneurs en protéine des EPS colloïdaux HPM et BPM et liées HPM et BPM ont été respectivement de  $91,43 \pm 77,31$ ,  $251,33 \pm 102,80$ ,  $246,89 \pm 98,37$  et  $174,36 \pm 57,36$  mg m<sup>-2</sup>, soit  $25,02 \pm 21,88$ ,  $68,39 \pm 28,18$ ,  $67,31 \pm 26,53$  et  $47,09 \pm 15,08$  µg g<sup>-1</sup> PS respectivement (fig. 2.8-A). Les teneurs en protéines internes étaient en moyenne de  $320,71 \pm 162,53$  mg m<sup>-2</sup> soit  $93,18 \pm 48,84$  µg g<sup>-1</sup> PS pour les HPM et  $333,57 \pm 194,47$  mg m<sup>-2</sup> soit  $94,93 \pm 55,95$  µg g<sup>-1</sup> PS pour les BPM (fig. 2.9-A).

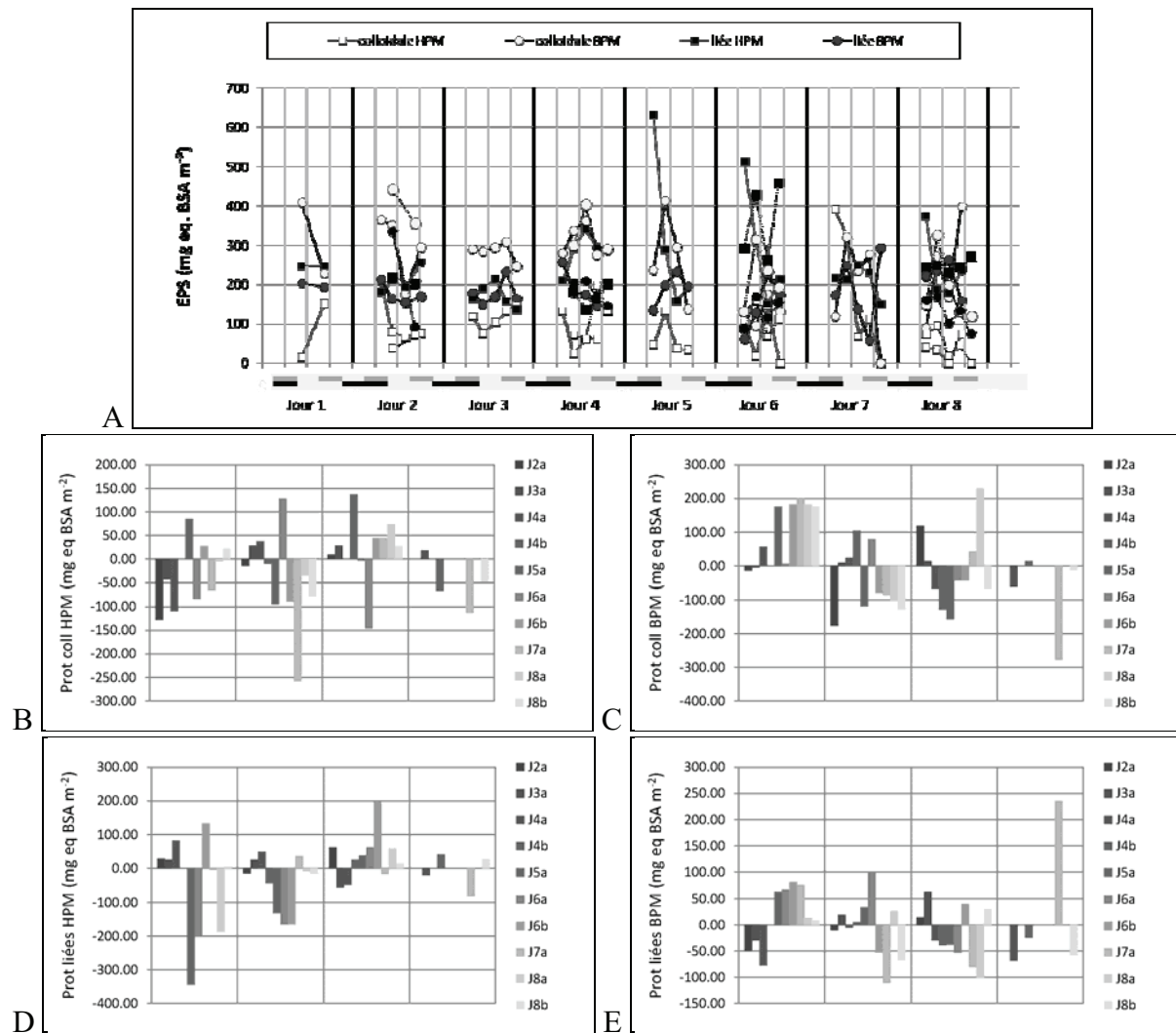
Les teneurs en **protéines colloïdales HPM** (fig. 2.8-B) ont diminué de la marée haute à la marée basse (sauf le jour 5, le jour 6 dans le bac B et le jour 8 dans le bac B), au cours de la marée basse surtout le biofilm âgé (sauf le jour 3, le jour 4 dans le bac A et le jour 6 dans le bac A), puis ont augmenté lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 6 dans le bac A). Elles ont diminué au cours de la marée haute (sauf le jour 3). Les teneurs en

**protéines colloïdales BPM** (fig. 2.8-C) ont augmenté lors du passage de la marée haute à la marée basse (sauf les jours 2 et 3), puis diminué au cours de la marée basse (sauf le jour 3, le jour 4 et le jour 6 dans le bac A), lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 2, le jour 3, le jour 7 et le jour 8 dans le bac A) et au cours de la marée haute (sauf le jour 4). Les teneurs en **protéines liées HPM** (fig. 2.8-D) ont augmenté (sauf le jour 5, le jour 6 dans le bac A et le jour 8 dans le bac A) et diminué au cours de la marée basse (sauf le jour 3, le jour 4 dans le bac A et le jour 7). Elles ont ensuite augmenté lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 3, le jour 4 dans le bac B et le jour 7). A marée haute, elles ont augmenté (jours 4 et 8) ou diminué (jours 3 et 7). Les **protéines liées BPM** (fig. 2.8-E) ont augmenté au passage de la marée haute à la marée basse (sauf le jour 2, le jour 3 et le jour 4), au cours de la marée basse (sauf le jour 2, le jour 4 dans le bac A, le jour 6 dans le bac B, le jour 7 et le jour 8 dans le bac B). Elles ont diminué de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 2, le jour 3, le jour 6 dans le bac B et le jour 8 dans le bac B) et au cours de la marée haute (sauf le jour 7). Les **protéines internes HPM** (fig. 2.9-B) ont diminué du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 7 et le jour 8 dans le bac B), au cours de la marée haute, alors qu'elles ont augmenté lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 6) et au cours de la marée haute. Les **protéines internes BPM** (fig. 2.9-C) ont augmenté du passage de la marée haute à la marée basse (le jour 6 et le jour 8 dans le bac A) ou diminué (le jour 7 et le jour 8 dans le bac B), puis diminué au cours de la marée basse (sauf le jour 8 dans le bac B), pour augmenter lors du passage de la marée basse à la marée haute (sauf le jour 8 dans le bac B) et à marée haute. Il en ressort que les variations ont été positives ou négatives avec une tendance globale à s'inverser pour un biofilm âgé.

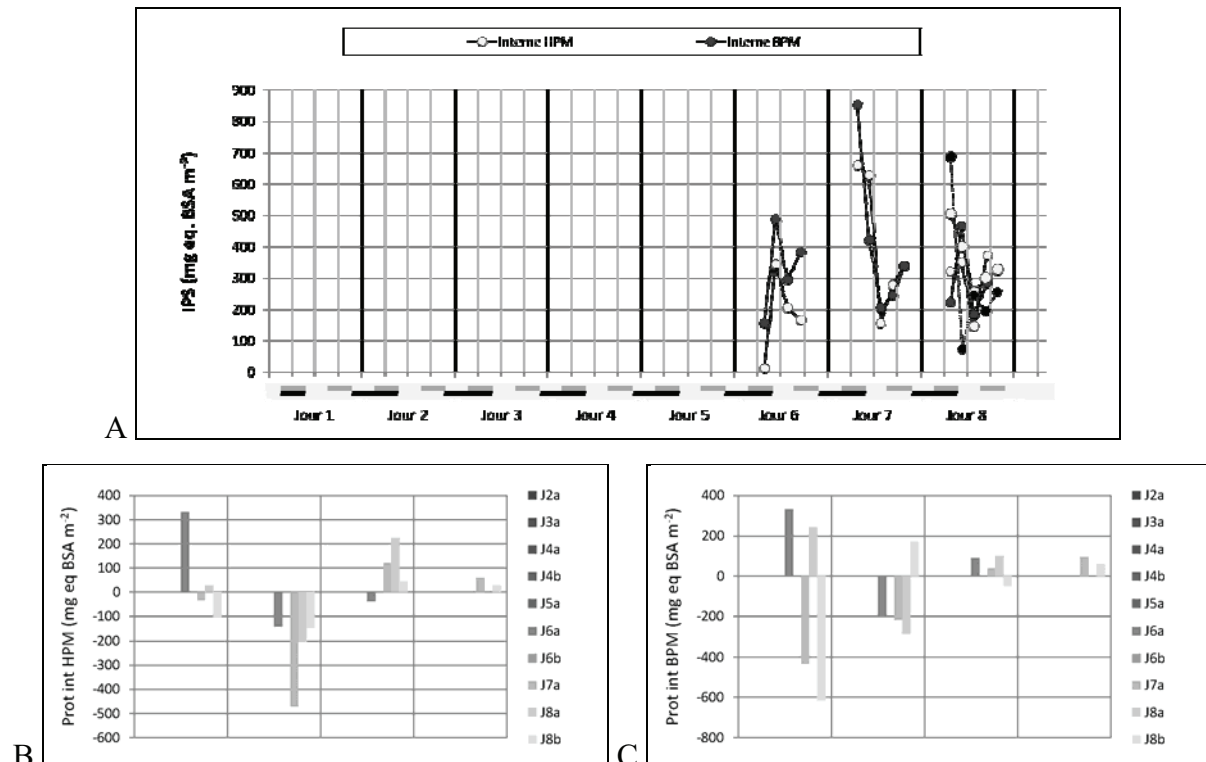
La dynamique de ces substances a été fortement variable aussi les hypothèses seront émises à partir de leurs corrélations (notamment en analyse à composantes principales) avec les autres variables. Il n'existait pas de corrélations significatives entre les sucres et les protéines pour des fractions similaires.

La moyenne du rapport protéines/sucres pour les fractions colloïdales HPM et BPM, liées HPM et BPM et internes HPM et BPM a été respectivement de  $1,11 \pm 0,95$ ,  $24,19 \pm 39,05$ ,  $1,42 \pm 0,92$ ,  $2,63 \pm 1,16$ ,  $0,07 \pm 0,04$  et  $0,09 \pm 0,07$ . Excepté pour les IPS, les protéines ont globalement été plus abondantes que les sucres, surtout les molécules BPM.

Les sucres liés de HPM et liés de BPM étaient positivement corrélés ( $r = 0,36$ ,  $P < 0,05$  pour le bac A ;  $r = 0,38$ ,  $P < 0,01$  globalement). Les sucres colloïdaux de HPM et les sucres internes de BPM étaient négativement corrélés ( $r = -0,57$ ,  $P < 0,05$  pour le bac A ;  $r = -0,70$ ,  $P < 0,005$  globalement). Les protéines colloïdales de HPM étaient positivement



**Figure 2.8 :** évolution des protéines EPS (mg équivalent BSA m<sup>-2</sup>) selon l'âge du biofilm (en jours) dans les deux mésocosmes (les observations du mésocosme B sont reliées en pointillés) au cours du suivi. En bas du graphique, les barres noires indiquent les périodes nocturnes, les barres grises les immersions. B à E : différences mesurées entre deux mesures pour chacune des 4 phases (séparées par une ligne verticale, de gauche à droite : marée haute nocturne – marée basse diurne ; marée basse diurne ; marée basse diurne à marée haute diurne ; marée haute diurne). B : protéines colloïdales HPM (mg eq BSA m<sup>-2</sup>) ; C : protéines colloïdales BPM (mg eq BSA m<sup>-2</sup>) ; D : protéines liées HPM (mg eq BSA m<sup>-2</sup>) ; E : protéines liées BPM (mg eq BSA m<sup>-2</sup>).



**Figure 2.9 :** évolution des protéines IPS (mg équivalent BSA m<sup>-2</sup>) selon l'âge du biofilm (en jours) dans les deux mésocosmes (les observations du mésocosme B sont reliées en pointillés) au cours du suivi. En bas du graphique, les barres noires indiquent les périodes nocturnes, les barres grises les immersions. B et C : différences mesurées entre deux mesures pour chacune des 4 phases (séparées par une ligne verticale, de gauche à droite : marée haute nocturne – marée basse diurne ; marée basse diurne ; marée basse diurne à marée haute diurne ; marée haute diurne). B : protéines internes HPM (mg eq BSA m<sup>-2</sup>) ; C : protéines internes BPM (mg eq BSA m<sup>-2</sup>).

corrélées aux protéines internes de HPM ( $r = 0,71$ ,  $P < 0,01$  dans le bac A ;  $r = 0,64$ ,  $P < 0,005$  globalement) ainsi qu'aux protéines internes de BPM ( $r = 0,61$ ,  $P < 0,05$  dans le bac A ;  $r = 0,51$ ,  $P < 0,05$  globalement). Les protéines liées de BPM étaient négativement corrélées aux protéines liées de HPM ( $r = -0,49$ ,  $P < 0,005$  bac A ;  $r = -0,38$ ,  $P < 0,01$  globalement) et positivement corrélées aux protéines colloïdales BPM (uniquement dans le bac B :  $r = 0,69$ ,  $P < 0,005$ ). Les protéines internes de HPM étaient positivement corrélées aux internes de BPM ( $r = 0,77$ ,  $P < 0,005$  pour le bac A ;  $r = 0,68$ ,  $P < 0,005$  globalement).

*Corrélations significatives entre les variables suivies*

L'ensemble des corrélations décrites ci-après sont résumées dans la figure 2.10B.

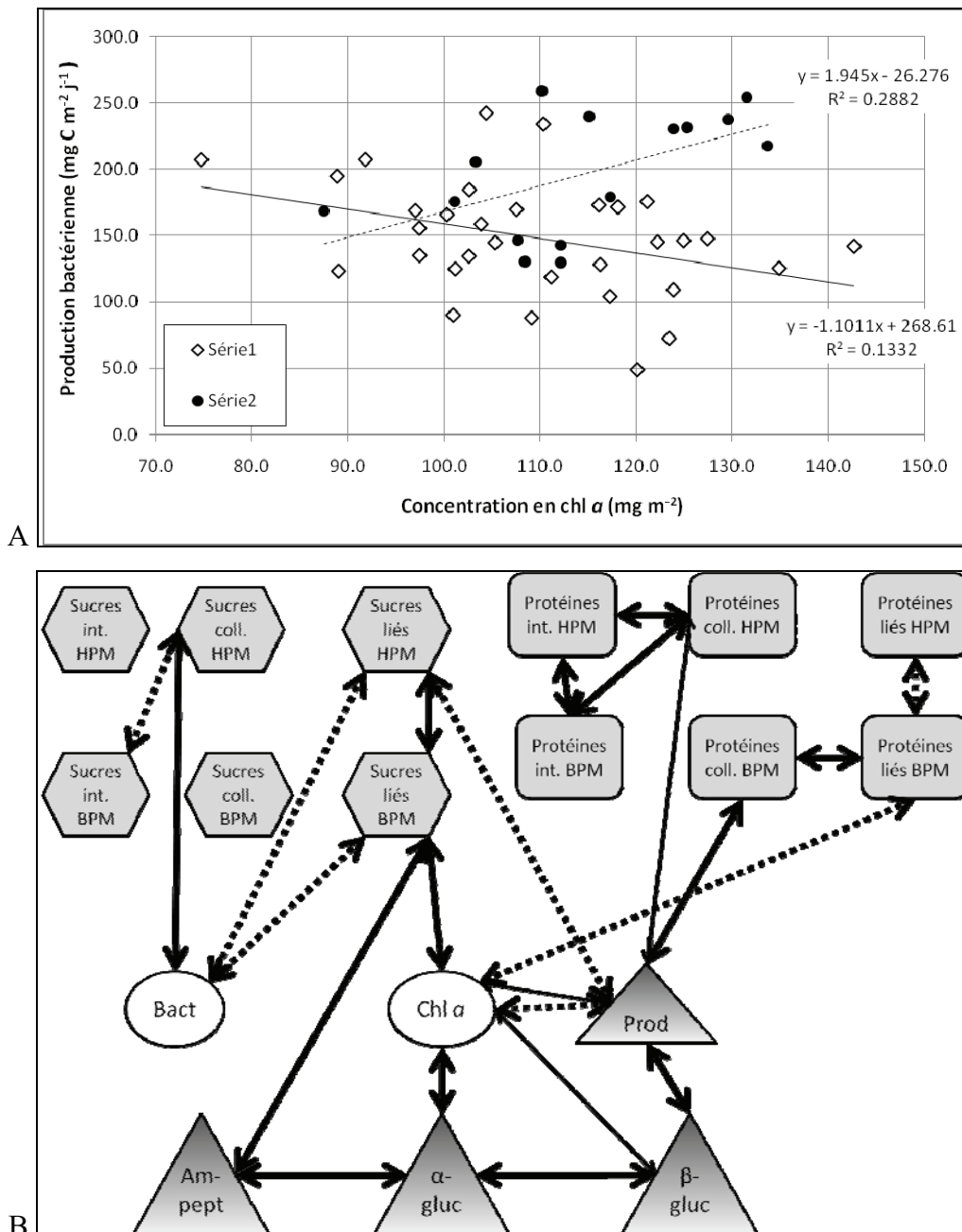
Des corrélations positives ont été trouvées entre la production bactérienne et l'activité  $\beta$ -glucosidase ( $r = 0,39$ ,  $P < 0,01$  globalement), entre les activités  $\alpha$ -glucosidase et aminopeptidase ( $r = 0,49$ ,  $P < 0,01$  dans le bac A ;  $r = 0,36$ ,  $P < 0,05$  globalement) et entre les activités  $\alpha$ -glucosidase et  $\beta$ -glucosidase ( $r = 0,72$ ,  $P < 0,005$  dans le bac B ;  $r = 0,50$ ,  $P < 0,001$  globalement).

L'activité  $\alpha$ -glucosidase était positivement corrélée à la chl *a* dans le bac A ( $r = 0,46$ ,  $P < 0,05$ ) et l'activité  $\beta$ -glucosidase était positivement corrélée à la chl *a* dans le bac B ( $r = 0,58$ ,  $P < 0,05$ ). L'activité aminopeptidase était corrélée aux sucres liés BPM ( $r = 0,33$ ,  $P < 0,05$  globalement).

La production bactérienne était négativement corrélée à la concentration en chl *a* dans le bac A ( $r = -0,37$ ,  $P < 0,05$ ) mais positivement dans le bac B ( $r = 0,54$ ,  $P < 0,05$ ). Elle était positivement corrélée aux protéines colloïdales BPM ( $r = 0,56$ ,  $P < 0,05$  pour le bac B ;  $r = 0,29$ ,  $P = 0,05$  globalement) et HPM ( $r = 0,65$ ,  $P < 0,01$  dans le bac B) et négativement corrélée aux sucres liés HPM ( $r = -0,65$ ,  $P < 0,001$  dans le bac A ;  $r = -0,34$ ,  $P < 0,05$  globalement).

La biomasse bactérienne a été positivement corrélée aux sucres colloïdaux de HPM ( $r = 0,38$ ,  $P < 0,05$ ) et négativement corrélée aux sucres liés de BPM et HPM (BPM :  $r = -0,375$ ,  $P < 0,05$  pour le bac A ;  $r = -0,63$ ,  $P < 0,05$  pour le bac B ;  $r = -0,46$ ,  $P < 0,005$  globalement ; HPM :  $r = -0,68$ ,  $P < 0,01$  pour le bac B ;  $r = -0,30$ ,  $P < 0,05$  globalement).

La biomasse chlorophyllienne a été positivement corrélée aux sucres liés de BPM ( $r = 0,43$ ,  $P < 0,05$  dans le bac A) et négativement aux protéines liées de BPM ( $r = -0,60$ ,  $P < 0,05$  dans le bac B).



**Figure 2.10** : A : corrélation entre production bactérienne ( $\text{mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ ) et concentration chlorophyllienne ( $\text{mg C m}^{-2}$ ) dans chacun des deux bacs. B : Schéma synthétique des corrélations globales entre les variables. Les flèches pleines figurent les corrélations positives tandis que les flèches pointillées les corrélations négatives. Les flèches fines indiquent que la corrélation n'a été trouvée que pour le bac B (moins d'observations). Seules les corrélations significatives sont représentées. coll. : fraction colloïdale ; int. : fraction interne ;  $\alpha$ -gluc : activité  $\alpha$ -glucosidase ;  $\beta$ -gluc : activité  $\beta$ -glucosidase ; am-pept : activité aminopeptidase ; Prod : taux de production bactérienne ; Bact : biomasses bactériennes ; BPM : bas poids moléculaire ; HPM : haut poids moléculaire.

*Analyse en composantes principales des interactions entre les diatomées, les bactéries et les EPS*

Les deux premiers axes expliquent 32,40 % de la variance totale (fig. 2.11). Cette valeur est faible mais correcte compte tenu du nombre de variables entrant en jeu (18). L'axe 1 (18,87 % de la variance totale) est bien corrélé à la chl *a* ( $\cos^2 = 0,66$ ), la teneur en eau ( $\cos^2 = 0,63$ ) dans la partie positive et à l'ammonium ( $\cos^2 = 0,31$ ) et aux phosphates ( $\cos^2 = 0,15$ ) dans la partie négative (fig. 2.11-A). Cet axe décrit bien le développement des diatomées dans le biofilm. Il est positivement corrélé aux activités des bactéries (aminopeptidase,  $\cos^2 = 0,48$  ;  $\alpha$ -glucosidase,  $\cos^2 = 0,27$  ;  $\beta$ -glucosidase,  $\cos^2 = 0,33$ ) et aux sucres colloïdaux de haut poids moléculaire ( $\cos^2 = 0,11$ ) et négativement aux protéines liées de bas poids moléculaire ( $\cos^2 = 0,15$ ). Le 2<sup>ème</sup> axe est positivement corrélé aux abondances bactériennes ( $\cos^2 = 0,23$ ) ainsi qu'à la production bactérienne ( $\cos^2 = 0,43$ ) et à l'activité  $\beta$ -glucosidase ( $\cos^2 = 0,23$ ) et négativement aux teneurs en ammonium ( $\cos^2 = 0,20$ ). Il décrit donc plutôt bien le développement du compartiment bactérien à la surface du sédiment. Il est également positivement corrélé à la matière organique ( $\cos^2 = 0,23$ ) et aux protéines colloïdales de bas poids moléculaire ( $\cos^2 = 0,24$ ), et négativement corrélé aux sucres liés de haut et bas poids moléculaires ( $\cos^2 = 0,27$  et  $\cos^2 = 0,23$  respectivement).

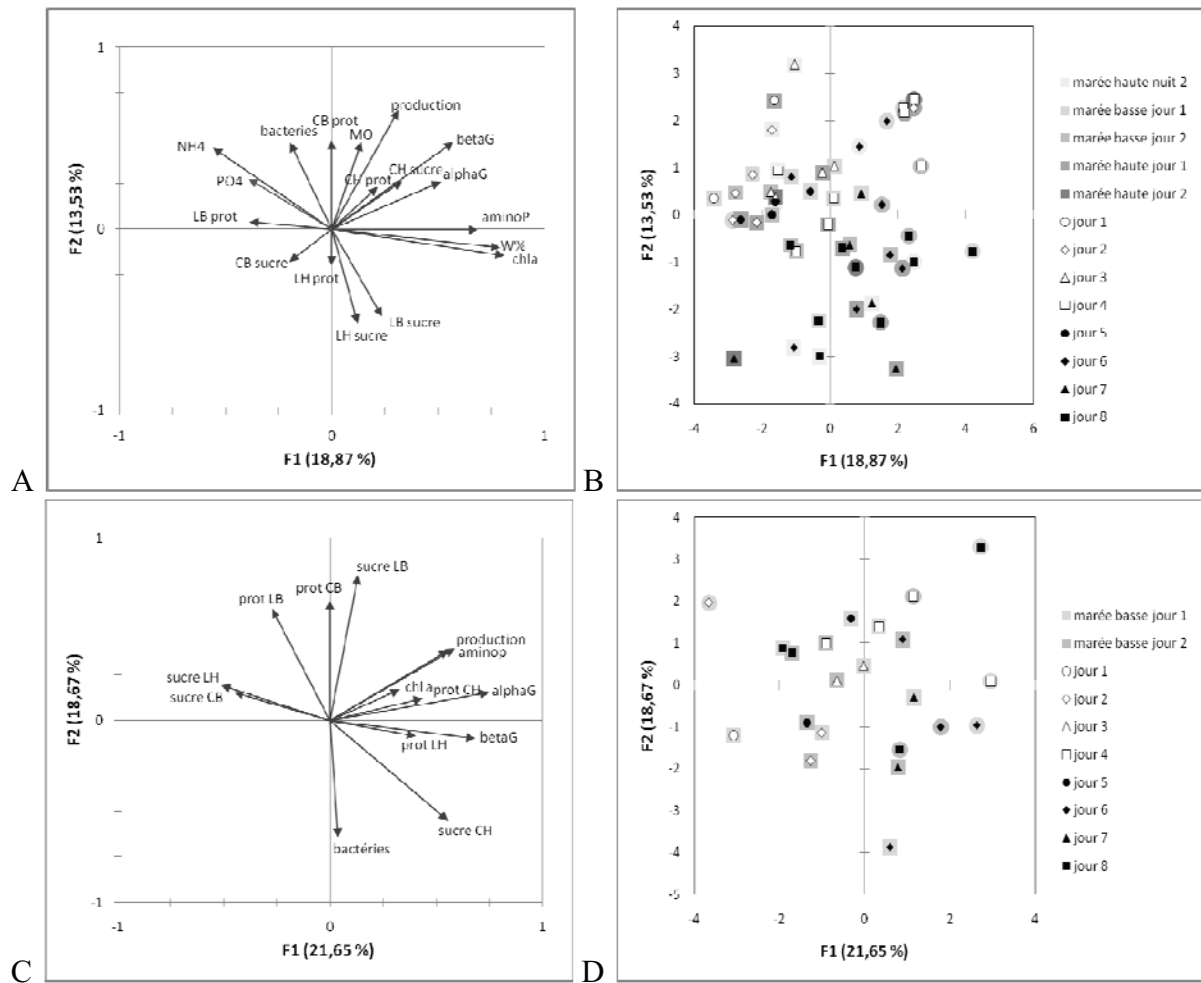
Les observations (fig. 2.11-B) du mésocosme A sont dans la partie gauche du graphique tandis que celles du mésocosme B sont dans la partie droite, traduisant le fait que le biofilm s'est très rapidement établi dans ce dernier. Les observations des 4 premiers jours des deux mésocosmes montrent une grande variabilité le long de la partie supérieure de l'axe F2 avec une légère tendance à la chute de la fin de la marée haute nocturne à la fin de marée basse diurne, traduisant plutôt une baisse d'activité des communautés bactériennes. Cette variation se poursuit sur la deuxième moitié du suivi, mais plutôt le long de la partie négative de l'axe F2, avec une légère augmentation sur l'axe F1 surtout pour le mésocosme A.

Les 2 premiers axes de la seconde ACP qui a focalisé sur les mesures effectuées à marée basse diurne (fig. 2.11-C et D) représentent 40,32 % de la variance totale. L'axe F1 est bien corrélé, dans la partie positive, à la production bactérienne ( $\cos^2 = 0,31$ ), l'activité  $\alpha$ -glucosidase ( $\cos^2 = 0,57$ ), l'activité  $\beta$ -glucosidase ( $\cos^2 = 0,47$ ) et l'activité leucine-aminopeptidase ( $\cos^2 = 0,34$ ), aux sucres colloïdaux HPM ( $\cos^2 = 0,31$ ), aux protéines colloïdales et liées HPM ( $\cos^2 = 0,19$  et  $0,17$  respectivement). L'axe F1 est corrélé négativement aux sucres colloïdaux BPM ( $\cos^2 = 0,21$ ) et aux sucres liés HPM ( $\cos^2 = 0,26$ ). La chlorophylle *a* est faiblement positivement corrélé à l'axe F1 ( $\cos^2 = 0,11$ ). Ainsi, l'axe F1



représente plutôt dans sa partie positive la production bactérienne et les activités stimulées par la production de polymères par les diatomées (surtout les composés colloïdaux HPM). L'axe F2 est positivement corrélé aux protéines liées, colloïdales et sucres liés de bas poids moléculaire (respectivement  $\cos^2 = 0,38$ ,  $0,43$  et  $0,64$ ). Il est négativement corrélé aux bactéries ( $\cos^2 = 0,41$ ) et aux sucres colloïdaux HPM ( $\cos^2 = 0,30$ ). Cet axe décrit plutôt la consommation des composés BPM (sauf les sucres colloïdaux) par les bactéries.

La projection des différents jours (fig. 2.11-D) montre une évolution croissante des jours 1 à 4 de la partie inférieure gauche vers la partie supérieure droite, ce qui correspond à une augmentation de la production, des activités et des composés de bas poids moléculaire, puis les observations des jours sont assez dispersées sur le graphique sans montrer de tendance commune les derniers jours.



**Figure 2.11** : analyse en composante principale des interactions entre bactéries, production et activité bactériennes, chlorophylle *a*, et toutes les fractions d'EPS (sucres et protéines), sur l'ensemble de la période (cadres A et B) ou pour les mesures réalisées à marée basse uniquement (cadres C et D). Cadre A : représentation des variables selon les deux premiers axes. Cadre B : Projection des observations sur ces deux axes, chaque jour étant figuré par un symbole différent. Les périodes sont indiquées par une nuance de gris en fond des observations, de forme carrée pour le mésocosme A et ronde pour le mésocosme B avec, du plus clair au plus foncé : marée haute nuit 2 : la 2<sup>ème</sup> moitié de la marée haute de nuit ; marée basse jour 1 : la 1<sup>ère</sup> moitié de marée basse de jour ; marée basse jour 2 : la 2<sup>ème</sup> moitié de marée basse de jour ; marée haute jour 1 : la 1<sup>ère</sup> moitié de la marée haute de jour ; marée haute jour 2 : la 2<sup>ème</sup> moitié de la marée haute de jour. W% : teneur en eau ; NH<sub>4</sub> : ammonium ; PO<sub>4</sub> : phosphate ; MO : matière organique ; chl *a* : chl *a* ; alphaG : activité  $\alpha$ -glucosidase ; betaG : activité  $\beta$ -glucosidase ; aminoP : activité aminopeptidase ; production : production bactérienne ; prot : protéines ; C : colloïdal ; L : lié ; H : haut poids moléculaire ; B : bas poids moléculaire. Cadre C : projection des variables pour les points de marée basse diurne seulement. Cadre D : projection des observations, se référer à la légende de la figure B pour plus de détail.

### *Décomposition des corrélations selon la période du cycle de marée et du nyctémère*

Les effets de la marée et de la lumière sont estimés en mesurant les variations entre des prélèvements successifs pour les biomasses bactériennes et chlorophylliennes, les concentrations en sucres et protéines des substances polymériques, ainsi que pour la production bactérienne et les activités enzymatiques. Pour la production ainsi que les activités, deux valeurs supplémentaires ont été prises en compte : la valeur au début de la phase considérée (valeur initiale) et la valeur à la fin de la phase considérée (valeur finale).

Les mesures en substances internes étant peu nombreuses, les corrélations sont ignorées dans les descriptions par phases.

### Corrélations établies lors du passage de la marée haute nocturne à la marée basse diurne

Lors de l'émersion, la surface du sédiment devient exposée à l'air et à la lumière. La chl  $\alpha$ , qui a augmenté au cours de cette période (sauf les jours 2 et 3), a été positivement corrélée à l'activité  $\alpha$ -glucosidase ( $r = 0,69$ ,  $P = 0,06$ ), ce qui laisse penser que cette première activité enzymatique bactérienne est stimulée par les diatomées. Les activités  $\alpha$ -glucosidase et aminopeptidase ont été positivement corrélées ( $r = 0,70$ ,  $P = 0,05$ ) ce qui indique que lors de la transition de l'immersion à l'émersion, les bactéries déploient simultanément des activités qui vont leur permettre de dégrader des sucres et des protéines. Enfin, la dégradation de molécules HPM par les bactéries s'est traduite par une corrélation positive entre l'activité  $\alpha$ -glucosidase et la teneur en sucres colloïdaux BPM ( $r = 0,82$ ,  $P < 0,05$ ). Cette augmentation en sucres colloïdaux BPM a stimulé la production bactérienne en début de marée basse ( $r = 0,77$ ,  $P < 0,05$ ). L'activité  $\beta$ -glucosidase initiale a été positivement corrélée aux sucres colloïdaux BPM ( $r = 0,70$ ,  $P < 0,05$ ) confirmant l'activité de dégradation des bactéries. La production bactérienne initiale a été négativement corrélée aux variations de biomasse bactérienne ( $r = -0,73$ ,  $P < 0,05$ ) et aux variations des protéines internes BPM ( $r = -0,96$ ,  $p < 0,05$ ), qui ne sont pas corrélées entre elles. La production bactérienne initiale a été positivement corrélée aux variations en teneur en sucres liés BPM ( $r = 0,76$ ,  $P < 0,05$ ), qui pourrait refléter la sécrétion par les diatomées de sucres liés aux potentielles propriétés antibactériennes afin de limiter le développement bactérien. Les variations des teneurs en sucres colloïdaux HPM ont été négativement corrélées à celles des sucres liés BPM ( $r = -0,76$ ,  $P < 0,05$ ). Il se pourrait que la sécrétion de ces sucres caractérise des états physiologiques opposés des diatomées, *i.e.* les colloïdaux HPM servant à expulser les excès de carbone intracellulaire et les ESP liés BPM destinés à améliorer la qualité du microenvironnement de la diatomée. Les sucres colloïdaux

BPM ont augmenté (jours 4, 5, 6 et 8 bac B) ou diminué (jours 2, 3, 7 et 8 bac A) au cours de cette période et cela a conditionné le niveau d'activité  $\alpha$ -glucosidase en début de marée basse ( $r = 0,75$ ,  $P < 0,05$ ). Les protéines colloïdales HPM ont été positivement corrélées aux protéines colloïdales BPM ( $r = 0,70$ ,  $P < 0,05$ ) ce qui laisse à penser que ces substances sont sécrétées en même temps et donc issues de voies métaboliques similaires.

### Corrélations significatives entre les variables pendant la marée basse

Les variations en chl  $a$  et en activité  $\alpha$ -glucosidase ont été positivement corrélées aux variations en sucres liés BPM (respectivement  $r = 0,69$ ,  $P < 0,05$  et  $r = 0,72$ ,  $P < 0,05$ ), ce qui peut appuyer l'idée que ces sucres liés sont excrétés par les diatomées dans le but de limiter l'impact des activités bactériennes sur les cellules algales. Les variations de l'activité aminopeptidase (augmentation sauf les jours 3, 4 bac A et 8 bac B) ont été positivement corrélées aux variations en sucres liés HPM ( $r = 0,74$ ,  $P < 0,05$ ) et en protéines colloïdales BPM ( $r = 0,63$ ,  $P = 0,05$ ), positivement corrélées entre elles ( $r = 0,86$ ,  $P < 0,005$ ). Ce phénomène peut s'expliquer par une interaction forte entre les bactéries et les diatomées, les premières sécrétant des enzymes (protéines colloïdales BPM) pour dégrader les substances HPM excrétées par les diatomées, principalement les colloïdales qui sont plus accessibles, les secondes en empêchant les enzymes bactériennes de s'attaquer à leur enveloppe cellulaire en la protégeant avec des substances liées HPM aux propriétés inhibitrices pour les activités bactériennes. Les protéines colloïdales BPM ont en effet été négativement corrélées aux sucres colloïdaux HPM ( $r = -0,67$ ,  $P < 0,05$ ) témoignant de l'hydrolyse des HPM en BPM par l'activité aminopeptidase.

### Corrélations significatives de la marée basse de jour à la marée haute de jour

Appuyant l'idée d'effets négatifs des sucres liés des diatomées sur les bactéries, les variations des biomasses bactériennes lors du passage de la marée basse à la marée haute (augmentations les jours 3, 4, 5, 6 bac A, 8 bac A ou diminution les jours 2, 6 bac B, 7 et 8 bac B) ont été négativement corrélées aux variations en sucres liés HPM ( $r = -0,64$ ,  $P < 0,05$ ) et BPM ( $r = -0,72$ ,  $P < 0,05$ ). De plus, les diminutions en sucres liés BPM (augmentation les jours 2, 6 bac B, 7 et 8 bac B) ont stimulé la production bactérienne en début de marée haute ( $r = -0,70$ ,  $P < 0,05$ ). Les variations des sucres liés HPM ont été positivement corrélées aux variations en protéines liées HPM ( $r = 0,63$ ,  $P < 0,05$ ), et leur augmentation s'observe surtout pour un biofilm âgé. Ces substances seraient produites en même temps et pourraient être

celles qui caractérisent les déplacements des diatomées. Les variations en sucres colloïdaux BPM ont été corrélées aux variations en sucres liés BPM ( $r = 0,81$ ,  $P < 0,005$ ), suggérant que l'émersion a favorisé la formation de composés BPM par hydrolyse, et ont stimulé l'activité  $\beta$ -glucosidase ( $r = 0,65$ ,  $P < 0,05$ ). Les variations en protéines colloïdales HPM (diminutions sauf le jour 6 bac A) ont été positivement corrélées aux variations en sucres colloïdaux HPM ( $r = 0,65$ ,  $P < 0,05$ ) et négativement corrélées à la valeur initiale de l'activité  $\alpha$ -glucosidase ( $r = -0,64$ ,  $P = 0,06$ ). Cela signifie que l'émersion a provoqué une hydrolyse des composés colloïdaux HPM, associée à un clivage moléculaire résultant de l'activité  $\alpha$ -glucosidase.

### Corrélations significatives au cours de la marée haute diurne

Pour les observations concernant la marée haute diurne, le nombre d'observations a été égal à 4 aussi les corrélations, même significatives, ne sont utilisées que comme des indices sur les phénomènes possibles à marée haute.

Les variations en bactéries ont été positivement corrélées aux variations en chl *a* ( $r = 0,99$ ,  $P < 0,014$ ) et en sucres colloïdaux HPM ( $r = 0,94$ ,  $P = 0,06$ ), qui ont diminué au cours de la marée haute, par remise en suspension pour les algues et certainement dissolution des sucres colloïdaux. Les variations des sucres liés HPM et BPM ont été positivement corrélées entre elles ( $r = 0,99$ ,  $P < 0,05$ ) ainsi qu'aux variations de l'activité  $\beta$ -glucosidase (respectivement  $r = 1,00$ ,  $P < 0,001$  et  $r = 1,00$ ,  $P < 0,05$ ). La diminution des algues dans le sédiment a conduit à une baisse de la présence de ces sucres qui de plus seraient moins produits à cette période, et l'action d'hydrolyse de l'eau de mer a pu limiter la nécessité d'une activité glucosidase. La valeur initiale de la production bactérienne a été positivement corrélée aux variations en sucres liés BPM ( $r = 0,98$ ,  $P < 0,05$ ) ce qui souligne encore le rôle de contrôle du développement bactérien ou la protection des microalgues de ces sucres. L'activité aminopeptidase initiale a été positivement corrélée aux variations en sucres colloïdaux HPM ( $r = 0,95$ ,  $P < 0,05$ ), à partir desquels les bactéries pourraient extraire des acides aminés terminaux. Les variations en protéines colloïdales BPM ont été corrélées aux variations en protéines liées HPM ( $r = 0,97$ ,  $P < 0,05$ ), peut-être parce que les bactéries ont sécrété plus d'enzymes (protéines colloïdales BPM) destinées à rompre les protéines (liées HPM) dont l'hydrolyse spontanée est rare.

## Discussion

Les conditions nécessaires au développement du biofilm microphytobenthique ont été correctement reproduites dans les mésocosmes. Les conditions de lumière et températures reproduisent les gammes mesurées *in situ* en été et la quantité de chl *a* est suffisante pour la formation d'un biofilm, puisque le minimum requis de  $25 \text{ mg m}^{-2}$  a été atteint (Guarini et al. 2000). Les teneurs en chl *a* étaient comparables à celles observées dans d'autres études conduites en mésocosmes (Yallop et al. 2000, Orvain et al. 2003a). Avec  $30,44 \pm 5,14 \mu\text{g g}^{-1}$  PS, elles sont environ 3.5 fois supérieures aux  $8,50 \pm 1,84 \mu\text{g g}^{-1}$  PS mesurés *in situ* en été. Ces différences pourraient souligner l'importance des effets de broutage par les gastéropodes à la surface de la vase en conditions *in situ*. La concentration en ammonium a été en effet largement supérieure à celle mesurée *in situ* bien qu'inférieure à celle trouvée pour d'autres suivis du biofilm en mésocosme (Orvain et al. 2003a). La teneur en eau a elle aussi été supérieure à celle mesurée *in situ*. L'utilisation d'un mésocosme tidal a donc bien permis de recréer les conditions estivales en excluant les variations météorologiques ainsi que la prédation, permettant ainsi de mieux mettre en évidence les dynamiques intrinsèques du biofilm.

L'analyse en fonction des différentes phases a mis en évidence l'influence des conditions extérieures (lumière, immersion) sur les interactions dans le biofilm, mais aussi les effets du vieillissement du biofilm. En effet, pour la plupart des variables suivies (surtout les bactéries, la chl *a* et les composés HPM), les tendances s'inversent autour du 5<sup>ème</sup> jour, date pour laquelle il semblerait que les diatomées étaient entrées en phase stationnaire.

Les abondances bactériennes ont été comparables à celles trouvées dans les sédiments intertidaux (Schmidt et al. 1998), avec une moyenne de  $1,76 \pm 0,60 10^9$  cellules  $\text{mL}^{-1}$ , soit  $653,50 \pm 189,61 \text{ mg C m}^{-2}$ . Cette valeur de biomasse est supérieure à celle de  $\sim 200 \text{ mg m}^{-2}$  mesurée en juillet *in situ* (chapitre 1) mais inférieure à celles décrites pour les sédiments de la vase de Brouage en février 2008 *i.e.*  $\sim 1000$  (chapitre 1) ou en juillet 2006 *i.e.*  $\sim 1500 \text{ mg m}^{-2}$  (Pascal *et al.* 2009), et  $\sim 850 \text{ mg m}^{-2}$  en été et hiver (Garet 1996 dans Leguerrier et al. 2003).

La production bactérienne, avec une valeur moyenne de  $6,81 \pm 2,07 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  soit  $163,55 \pm 49,59 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ , a une valeur légèrement supérieure au maximum de  $108 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  estimés par Cook et al (2007) en mésocosme mais comprise dans la gamme de  $0,33$  à  $6,68 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$  définie par Yallop et al (2000) au cours d'une étude en mésocosme et comprise dans la gamme de  $30$  à  $650 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$  (Cammen 1991, Hamels

et al. 2001) mesurée *in situ* dans d'autres sédiments intertidaux, mais est inférieure à celle mesurée *in situ* en été dans la vasière de Brouage ( $\sim 1100 \text{ mg C m}^{-2} \text{ j}^{-1}$ , Pascal et al. 2009).

Pour décrire la zone proche du contour des cellules microalgales, dans lesquelles les substances excrétées se trouvent et devraient favoriser les activités et la production bactérienne, Bell et Mitchell (1972) ont utilisé le terme de « phycosphère » en référence au terme de rhizosphère utilisé en écologie terrestre. Il est en effet connu que les bactéries utilisent le carbone excrété par les microalgues (Cole et al. 1982, Hanlon et al. 2006, Haynes et al. 2007, Bellinger et al. 2009, Hofmann et al. 2009). Dans la littérature, des corrélations positives existent entre la production bactérienne et les concentrations en chl *a*, par exemple Hamels et al (2001) ont indiqué que «  $\log_{10} \text{ production bactérienne} = 0,49 + 1,09 \log_{10} \text{ chl } a$  », alors que Yallop et al (2000) ont défini la relation suivante : «  $\text{taux de production bactérienne} = 0,029 \times \text{chl } a + 0,743$  ». Dans le mésocosme B, la corrélation trouvée suit la régression «  $\text{taux de production bactérienne} = 0,081 \times \text{chl } a + 1,095$  ( $r^2 = 0,29$ ) », tandis que dans le mésocosme A, elle est négative et définie comme suit : «  $\text{taux de production bactérienne} = -0,046 \times \text{chl } a + 11,19$  ( $r^2 = 0,13$ ) » (fig. 10-A). Il semble qu'il n'existe pas de relation absolue qui puisse établir un lien entre les taux de production bactérienne et la concentration en chl *a*, mais plutôt des relations qui vont varier au sein de la phycosphère selon l'âge du biofilm (sécrétions de substances différentes selon la phase de croissance, lyses cellulaires, teneurs en nutriments) ou les effets environnementaux (lumière, température, présence de prédateurs). Par exemple, il a été montré que les bactéries pouvaient entrer en compétition avec les diatomées pour l'accès aux nutriments (Cook et al. 2004, Cook et al. 2007), ce qui devrait inverser la relation entre la production et la concentration en chl *a*. Certains auteurs ont proposé qu'en dehors d'une compétition pour les nutriments, les bactéries dépendaient du carbone produit par les diatomées mais qu'en cas de carence, les croissances bactériennes se découpleraient plutôt que d'entrer en compétition avec les microalgues (Thingstad et al. 1997, Thingstad 2000), bien que le rapport surface:volume des bactéries en fasse de meilleurs compétiteurs (Lewis 1979 dans Rier & Stevenson 2002). Ces rapports paradoxaux quant à l'utilisation des nutriments ont déjà été soulignés (Bratbak & Thingstad 1985). Des études sur les relations entre les algues, le carbone organique dissout qu'elles excrètent et les bactéries dans différents ruisseaux ont aussi montré que les bactéries et les algues pouvaient interagir positivement ou négativement (Rier & Stevenson 2001, 2002, Ricart et al. 2009), et qu'en deçà d'une concentration en chl *a* équivalente à  $5 \mu\text{g cm}^{-2}$ , il n'y avait pas de corrélation entre ces deux composantes. Rier et Stevenson (2002) ont suggéré que la relation positive qui unit les bactéries à la chl *a* s'expliquerait par l'utilisation des algues par les bactéries non pas

comme source de carbone mais comme support tridimensionnel pour leur développement, favorisé par la matrice de substances extracellulaires sécrétées par les algues. Des expériences variées ont démontré les effets positifs des EPS sur les bactéries et leur assimilation rapide, qu'il s'agisse des composés BPM (les composés colloïdaux BPM provenant a priori des autres composés HPM suite à la dégradation par les enzymes) rapidement assimilés (Bellinger et al. 2009, Hofmann et al. 2009) ou des composés HPM qui stimulent la croissance bactérienne (Waksman & Butler 1937, Tranvik 1990, Amon & Benner 1996, Sinsabaugh & Shah 2010) comme le montre l'ACP sur la marée basse dans la présente étude. D'un autre côté, des effets réduisant les activités ou la production bactériennes ont également été attribués aux EPS (Selvaraj et al. 1989, Smith et al. 1995, Desbois et al. 2009, et voir revue par Ionara & Miralto 2010), de même que des effets inhibiteurs des EPS bactériens. Dans un système de type mare par exemple, Toerien et al (1984) ont trouvé que les principaux groupes bactériens présents pouvaient réduire la croissance algale de 5 à 79 %. Inversement, les bactéries peuvent transformer des composés initialement néfastes aux diatomées en produits qui vont finalement favoriser leur croissance (Bauer et al. 2010). Au cours des suivis réalisés *in situ*, les EPS liées HPM avaient été identifiées comme étant les plus potentiellement responsables d'une activité antibactérienne, mais leur possible sécrétion par les hydrobies présentes à ce moment là laissait penser que la corrélation négative entre leurs teneurs et les bactéries pouvaient indirectement résulter des effets du broutage par ces gastéropodes. Dans le mésocosme, les hydrobies n'étaient pas présentes et les corrélations globales (fig. 2.10-B) reflètent tout de même un effet négatif des sucres liés HPM sur les bactéries. Il semblerait donc que ces sucres abritent des molécules aux effets antibactériens, ce qui est en accord avec les travaux de Ianora et Miralto (2010). L'étude en mésocosme a également montré un effet négatif des sucres liés BPM sur les bactéries. Ainsi les conditions dans la phycosphère sont d'autant plus défavorables aux bactéries que la distance au frustule est courte.

Lors de la présente étude, les concentrations en chl *a* et en bactéries étaient respectivement approximativement 3,5 et 2,5 fois supérieures à celles mesurées *in situ* en été. L'accroissement des concentrations en chl *a* n'a pas entraîné une augmentation proportionnelle des abondances bactériennes. Comme observé *in situ* en juillet, les sucres liés HPM ont constitué la fraction d'EPS dominante dans le mésocosme, avec 17,21  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS contre 13,15  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS *in situ*. En revanche les sucres colloïdaux BPM étaient moins abondants dans le mésocosme (2,28  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS) que sur la vasière (5,53  $\mu\text{g g}^{-1}$  PS). Les teneurs des autres fractions de sucres EPS étaient équivalentes entre les mesures effectuées en mésocosme et sur le terrain. Aussi le facteur de 2,5 et 3,5 qui s'est appliqué aux



microorganismes ne s'est pas répercuté sur les sucres des EPS. Concernant les protéines, elles ont été plus concentrées dans le mésocosme qu'à la surface de la vasière *in situ*. Les ratios des teneurs mesurées dans le mésocosme sur celles mesurées *in situ* sont respectivement, pour les protéines colloïdales HPM et BPM et les liées HPM et BPM, d'environ 30, 600, 50 et 450 pour juillet (2,5 fois plus de bactéries et 3,5 fois plus de chl *a* dans le mésocosme), contre 9, 1,2, 35 et 1,3 pour février (autant de bactéries et 1,5 fois plus de chl *a* dans le mésocosme). Les augmentations des teneurs en protéines ne sont donc visiblement pas proportionnelles à celles des micro-organismes étudiés (diatomées et bactéries) sauf pour les protéines BPM entre février et le mésocosme où l'augmentation a été du même ordre de grandeur que celle de la chl *a*. Le cruel déficit en protéines (liées et colloïdales) BPM qui a été observé *in situ* en juillet par rapport aux observations *in situ* en hiver ou dans le mésocosme doit être lié à un facteur spécifique à la vasière en été, probablement un stress lié à la sursalure, une carence en sels nutritifs ou encore une plus faible sécrétion d'enzymes bactériennes (les enzymes ainsi que leurs produits de dégradation alimenteraient le compartiment des protéines BPM). Dans le mésocosme, les protéines HPM ont été largement plus abondantes que les teneurs mesurées *in situ* en hiver comme en été (facteur de 9 à 50). Ces protéines constituent une réserve d'azote dans le sédiment.

Les bactéries hétérotrophes peuvent utiliser une large gamme de sources organiques ou inorganiques d'azote pour la croissance (Keil & Kirchman 1991), incluant les acides aminés libres dissouts (Crawford et al. 1974), les protéines dissoutes et les acides aminés combinés, les acides nucléiques dissouts (Paul et al. 1989) et l'ammonium (Wheeler & Kirchman 1986). La source d'azote préférentiellement utilisée par des bactéries planctoniques serait les acides aminés libres dissouts (Jorgensen et al. 1999), suivie par les acides aminés combinés dissouts, l'ammonium et les nitrates. Ces auteurs ont également montré que des bactéries provenant de milieux eutrophiques avaient de plus forts taux d'assimilation des acides aminés libres dissouts ainsi qu'une plus forte activité aminopeptidase (activité enzymatique impliquée dans l'assimilation de l'azote) comparées à des bactéries provenant de milieux oligotrophiques et proposent que la disponibilité en azote plutôt qu'en carbone contrôle l'activité bactérienne. Dans la présente étude, les protéines colloïdales ont été positivement corrélées à la production bactérienne. Ces protéines dissociées du frustule doivent en effet constituer un bon substrat azoté pour les bactéries, et la corrélation plus forte avec les BPM reflète certainement la sécrétion active d'enzymes (des protéines BPM) par les bactéries. De plus, des corrélations entre l'activité aminopeptidase et les protéines EPS ont été mises en évidence lors de la décomposition par phases des corrélations. La corrélation

négative globale entre les protéines liées EPS et la chl *a* pourrait confirmer le rôle précurseur de ces composés au développement d'un biofilm, lorsque la quantité de chl *a* est plus faible et qu'ils pourraient alors contribuer à la stabilisation du sédiment et le maintien de l'hydratation autour des cellules algales.

Les sucres sont les premiers produits de la photosynthèse chez les algues (cycle de Calvin) et constituent des précurseurs pour l'ensemble des composants cellulaires. Le principal produit de réserve issu de la fixation du CO<sub>2</sub> lors de la photosynthèse chez les diatomées est un  $\beta$ -1,3-glucane aussi appelé chrysolaminarine ou leucosine. Les deux autres principaux groupes des polysaccharides dans les diatomées sont les hétéroglycanes du mur cellulaire et les mucilages extracellulaires (Granum & Mykkestad 2001). La chrysolaminarine est un oligosaccharide de la classe des  $\beta$ -glucanes, constitué de l'enchaînement d'un nombre variable de molécules de glucose liées par des liaisons C 1,3 et pouvant porter des ramifications en  $\beta$ -1,6 et dont le poids moléculaire est de 3500 à 8500 Da (Beattie et al. 1961, Lateur et al. 2002, Storseth et al. 2006, Kusaikin et al. 2010), qui pourraient donc correspondre aux sucres internes HPM. Chez *Skeletonema costatum*, il a été montré qu'il constituait un précurseur aux acides aminés et aux protéines par la réaction anaplérotique de  $\beta$ -carboxylation (Granum & Mykkestad 2001) et qu'il était principalement consommé lors de périodes d'obscurité (Varum & Mykkestad 1984) vraisemblablement pour soutenir la respiration cellulaire la nuit. Ces synthèses créent donc une consommation d'ammonium et à une fixation du carbone la nuit (Granum & Mykkestad 1999). En cas de carence en nutriments, une rapide accumulation de sucres internes se produit (Borsheim et al. 2005). Dans la présente étude, une très forte concentration de substances internes est observée et elle pourrait être associée à une carence en ammonium. En effet, les concentrations au départ élevées dans le mésocosme ont chuté jusqu'à des valeurs de 20 et 55  $\mu$ M dans les mésocosmes A et B respectivement, ce qui traduit leur forte consommation et l'état de carence lors des derniers jours de suivi. Une précédente étude en mésocosme avait mesuré des concentrations d'ammonium carentielles proche des valeurs observées ici (Orvain et al. 2003a) et une étude conduite sur les effets de carence en nutriments sur les diatomées avait utilisé des concentrations d'ammonium carentielles égales à 95,5  $\mu$ M NH<sub>4</sub>Cl (Staats et al. 2000b), ce qui confirme la déplétion en ammonium dans les mésocosmes les derniers jours. Les phosphates ont également chuté dans les mésocosmes. Leur concentration moyenne dans l'eau interstitielle ( $0,13 \pm 0,15 \mu$ M) a de plus été inférieure à celle mesurée *in situ* en février ( $0,41 \pm 0,64 \mu$ M) et en juillet ( $1,52 \pm 0,45 \mu$ M) (Cf. chapitre 1). Le phosphore est un nutriment essentiel aux organismes phototrophes et son rôle limitant a été montré pour des

diatomées benthiques issues d'un système lacustre (Van der Grinten et al. 2004). Les faibles teneurs en nutriments mesurées dans les mésocosmes associées aux fortes radiations appliquées ont certainement été à l'origine d'un stress important qui a conduit à l'accumulation de fortes quantités de sucres internes. Il a été pensé que les internes diminuaient dans l'obscurité en réponse à leur catabolisme (ils ne peuvent pas augmenter) (Smith & Underwood 1998). Cependant la mise en évidence de la consommation d'ammonium la nuit associée à une fixation de carbone pour la synthèse des acides aminés et des protéines (Granum & Mykkestad 1999) montre que l'augmentation de l'assimilation de carbone dans l'obscurité est possible, suite à une carence en ammonium. En fonction des équilibres C:N:P, l'un ou l'autre de ces schémas devrait prédominer. Comme les teneurs en ammonium dans le mésocosmes ont diminué continuellement, le scénario d'utilisation des réserves internes au moment des émergences – immersions était plus attendu. Les 3 jours analysés au cours du présent suivi s'accordent avec ces observations. En effet, les sucres internes HPM augmentent globalement de la marée haute à la marée basse. Ceci pourrait aussi être dû à une forte et rapide assimilation de carbone photosynthétique dès le début de l'émergence. Il en est de même pour les sucres internes BPM. Au cours de la marée basse, l'assimilation de carbone en réserves internes a été plus nette pour les BPM et concerne plutôt la phase stationnaire. Lors du passage à marée haute, les réponses ont été variées selon le poids moléculaire, avec globalement une diminution des HPM (métabolisés pour produire des sucres de migration) et plutôt une augmentation des BPM. Ceci pourrait s'associer à la poursuite d'une assimilation de carbone par la photosynthèse pendant la période émergée qui aura été plus importante que l'utilisation pour les migrations au moment de la partie immergée. Ainsi le carbone serait dans un premier temps acquis sous forme de BPM puis converti en HPM et ces derniers participent aux phénomènes de migration des diatomées. Une production de substances internes a été observée au cours de la marée haute le jour 7, qui ne s'accorde pas avec la démonstration que le carbone assimilé provient de mécanisme purement photosynthétique. Cependant, ce jour, l'un des néons du toit du mésocosme était resté allumé et le sédiment a reçu davantage de lumière que lors des marées haute habituelles (fig. 2.2). Ceci expliquerait l'augmentation observée. Il est également possible que la consommation d'ammonium décrite par Granum et Mykkestad (1999) se soit produite, puisque les protéines EPS BPM (liées et colloïdales) ont été fortement sécrétées de l'immersion à l'émergence et les protéines HPM (liées et colloïdales) ont fortement augmenté de l'émergence à l'immersion. Il est possible que les périodes de marée haute de ces deux phases aient suffisamment pourvu aux besoins en ammonium pour entraîner une production d'acides aminés libres et de

protéines. Pour conforter cette idée, des prélèvements supplémentaires pendant la marée haute ainsi que la marée basse nocturne seraient utiles.

Les études sur les effets des carences conduites sur un biofilm microphytobenthique avaient révélé que la réponse à la carence en ammonium des microalgues au moment de la phase stationnaire se traduisait par une excrétion très forte de sucres EPS, principalement les HPM (Staats et al. 2000b, Orvain et al. 2003a), qui n'a pas été observée dans la présente étude. Lors de ces études, les méthodes d'extraction des EPS ont provoqué des lyses cellulaires (Chiovitti et al. 2004, Takahashi et al. 2009). Aux vues des fortes concentrations en sucre des substances internes mesurées les jours 6, 7 et 8 dans la présente étude, et il se pourrait que les fortes teneurs en sucre enregistrées lors de ces précédentes expérimentations résultent de contaminations par les substances internes. En l'absence des valeurs de concentrations des IPS des jours précédents, il reste cependant délicat de l'affirmer, bien que ce résultat s'accorde avec les observations des effets des carences sur l'accumulation de carbone interne (Granum & Mykkestad 1999).

Une carence en azote conduit à l'augmentation de l'activité aminopeptidase pour permettre aux bactéries d'accéder aux composés azotés des protéines (Obernosterer & Herndl 1995). Au cours de l'étude, l'activité aminopeptidase a en effet augmenté à mesure que l'ammonium s'épuisait. De même, des augmentations en activités enzymatiques pourraient traduire que la matière organique directement accessible ( $< 600$  kDa) n'est plus disponible dans le milieu. L'activité  $\beta$ -glucosidase a été supérieure à l'activité  $\alpha$ -glucosidase, en moyenne  $2,51 \pm 1,04$  fois supérieure (minimum de 0,48 et maximum de 5,20) ce qui est en accord avec la valeur de  $2,35 \pm 1,01$  mesurée par Thornton (2010). Cette relation entre les deux activités est illustrée dans l'ACP générale. L'activité aminopeptidase a été très supérieure à celles des glucosidases (en moyenne  $12,79 \pm 10,78$  fois supérieure à l'activité  $\beta$ -glucosidase et  $26,74 \pm 17,28$  fois supérieure à l'activité  $\alpha$ -glucosidase). Le fait que l'activité des protéases bactériennes puisse être très supérieure à celle des glucosidases est connu (Smith et al. 1992, Romani et al. 2008) et suggère que les protéines sont plus efficacement solubilisées que les polysaccharides. Les valeurs d'activité aminopeptidase et  $\beta$ -glucosidase, respectivement de  $23,96 \mu\text{M mL}^{-1} \text{h}^{-1}$  et  $2,18 \mu\text{M mL}^{-1} \text{h}^{-1}$  ont été en revanche très fortement supérieures à celles estimées par Hofmann et al. (2009) dans des sédiments estuariens (Hofmann et al. 2009), respectivement de 0,01 et  $0,15 \text{ nM AMC mL}^{-1} \text{h}^{-1}$  et de 0 à  $0,6 \text{ nM MUF mL}^{-1} \text{h}^{-1}$ . Les activités  $\alpha$ - et  $\beta$ - glucosidases ont été environ 6,5 fois supérieures à celles mesurées par Thornton et al. (2010) dans des sédiments intertidaux. Cependant le protocole utilisé par Hofmann et al. (2009) était basé sur une forte dilution (1g de sédiment frais

dans 9 mL de tampon), puis une série de trois sonications d'une minute séparées par une minute de refroidissement dans la glace, avant une nouvelle série de dilutions. Ces différentes manipulations qui facilitent l'étude de sédiments cohésifs comme la vase doit cependant avoir quelques conséquences sur les activités potentielles des bactéries. L'étude conduite par Thornton et al. (2010) a impliqué un transport puis une dilution du sédiment, ce qui a peut-être aussi conduit à une plus faible activité bactérienne. Une autre possibilité est que la présence de ciliés ou flagellés ait limité la population bactérienne ainsi que leurs activités. Quoiqu'il en soit, l'augmentation de l'activité aminopeptidase au cours du suivi corrobore le postulat que cette activité se développe en réponse à une carence en azote minéral (Obernosterer & Herndl 1995). Elle a plus particulièrement augmenté au cours des marées basses diurnes. L'augmentation au cours du suivi des activités glucosidases a été moins marquée.

Les effets des cycles de marée et du nyctémère ont montré que les dynamiques des bactéries, diatomées et EPS ont varié selon l'âge du biofilm, allant jusqu'à s'inverser. Il ressort globalement que la chl *a* augmente dès le début de la marée basse ce qui stimule les bactéries. Ces dernières augmentent leurs activités enzymatiques pour dégrader les substances HPM qu'elles ne peuvent assimiler en l'état. La sécrétion de sucres liés contribuerait à ce moment à garantir un microenvironnement favorable à l'établissement d'un biofilm. Ensuite, au cours de la marée basse, la chl *a* et les sucres liés HPM ont augmenté, de façon corrélée aux sécrétions de protéines colloïdales BPM (potentiellement des enzymes bactériennes) et activité aminopeptidase. La multiplication des microalgues s'associe à l'augmentation des EPS liées ce qui confirme leur rôle dans la structuration du biofilm. Le passage à marée haute a été plutôt favorable à la production bactérienne qui bénéficie certainement de l'hydrolyse des molécules résiduelles en surface suite à la migration des diatomées en profondeur dans le sédiment.

Pour reprendre Cole et al. (1982), les substances mesurées peuvent provenir de l'autolyse, de la lyse par des parasites intra ou extra cellulaires, un éclatement mécanique, ou d'une excrétion active. Ainsi, les substances mesurées au cours de l'étude peuvent résulter de tous ces phénomènes, qu'il s'agisse des microalgues ou des bactéries. Les composés HPM étaient majoritaires au cours du suivi, alors que des études précédentes avaient décrit une proportion de 20 à 25% de HPM (Smith & Underwood 1998, de Brouwer & Stal 2002, Underwood et al. 2004) qui s'associait à un biofilm en bonne santé (Cf. chapitre 1). La forte présence de composés HPM est généralement associée à un mécanisme de déstockage intense du carbone en excès dans la cellule (Staats et al. 2000b, Orvain et al. 2003a, Underwood et al.

2004). Les sucres liés sont certainement sécrétés de façon équivalente entre les HPM et BPM (corrélation positive) et de façon continue pour entretenir le pool d'hétéroglycane protégeant la cellule. L'intérêt de cette sécrétion de substances hétéropolymériques liées a été associé au maintien de l'hydratation de l'environnement de la cellule, aux mécanismes d'adhésion et de mouvement, mais aussi à la protection contre les polluants ou les enzymes bactériennes. C'est ce dernier rôle qui semblerait se confirmer au travers des relations globales mises en évidence au long du suivi.



## **CHAPITRE 3**

Etude en microscopie confocale à balayage laser des EPS  
produits par des diatomées cultivées en microcosme et de leurs  
effets sur les bactéries

---





*CHAPITRE 3-A*

*Etude préliminaire en microscopie confocale à balayage laser des effets d'une carence en ammonium sur la quantité et la composition des sucres excrétés par des diatomées cultivées sur des lamelles de verre en conditions contrôlées : utilisation de lectines.*

---

**INTRODUCTION**

Suite aux suivis *in situ* et en mésocosme (Cf. chapitres précédents), six fractions de sucres et protéines majoritairement sécrétées par les diatomées dans le biofilm ont été suivies. Ces fractions sont définies selon leur attachement à la diatomée (diffuses dans le milieu, liées au frustule ou intracellulaires) ainsi que leur poids moléculaire. Les précédents chapitres ont permis d'attribuer des fonctions à ces substances : les sucres colloïdaux par exemple sont issus du métabolisme des substances internes qui s'accumulent lors des phases de carence en ammonium. Ils sont sécrétés en routine et pour réguler la balance C:N:P des cellules algales. Les substances liées, qui sont étroitement attachées au frustule, sont sécrétées de façon continue. Elles seraient plutôt associées à la régulation du développement bactérien en contrôlant leurs activités enzymatiques. Cependant, leur composition n'a pas été identifiée et les hypothèses se sont basées sur la caractérisation de 6 fractions regroupant des sucres et protéines de compositions diverses. Certaines molécules sont prédominantes dans ces fractions, comme par exemple les substances internes sucrées qui sont principalement des  $\beta$ -1,3-glucanes, des polymères de glucose (Beattie et al. 1961, Hoagland et al. 1993, Granum & Mykkestad 2001, Underwood & Paterson 2003, Chiovitti et al. 2004, Storseth et al. 2005, Bellinger et al. 2009), et les sucres colloïdaux sont principalement composés de glucose puisqu'ils résultent de l'excrétion des substances internes (Bellinger et al. 2009). En cas de carence en ammonium, de nombreux auteurs ont noté une augmentation de cette sécrétion. Cependant, la méthodologie utilisée dans ces études a provoqué une lyse cellulaire et donc une contamination par les substances internes de la cellule (Chiovitti et al. 2004, Takahashi et al. 2009). En utilisant une technique d'extraction basée sur l'utilisation d'une résine,

échangeuse d'ions, Pierre et al. (soumis, annexe 1) ont observé que les EPS liées contenaient moins de glucose que ce qui avait été décrit dans d'autres études, confortant la contamination par les substances internes avec la méthode d'extraction classique à l'eau chaude. Par l'utilisation d'un isotope du carbone, d'autres auteurs ont montré qu'en cas de carence en nutriments, les cellules stockaient le carbone en plus forte quantité dans les vacuoles intracellulaire (Borsheim et al. 2005) plutôt que de l'excréter. Si le métabolisme des diatomées change en cas de déplétion en ammonium, alors les rapports avec les bactéries devraient certainement se modifier également. Si les diatomées sécrètent plus de composés riches en glucose, il est probable que la croissance bactérienne augmente puisque cette ressource est très labile. En revanche, si les diatomées fixent le carbone en accumulant des réserves plutôt qu'en excréant des substances, alors les bactéries hétérotrophes qui dépendaient du flux d'EPS seraient amenées à rechercher une nouvelle source de carbone pour leur développement, peut-être un autre type d'EPS moins labile.

Pour répondre à ces questions, la microscopie confocale à balayage laser (ou CLSM pour « confocal laser scanning microscopy ») est un bon outil, puisqu'elle permet d'étudier un biofilm de manière non-intrusive et non destructive (Lawrence & Neu 1999). Grâce à l'utilisation de lectines, des marqueurs fluorescents spécifiques, et/ou en utilisant la fluorescence naturelle de la chlorophylle, la CLSM permet d'obtenir une image en trois dimensions du biofilm en y identifiant les différents composés. De plus, lorsque les spectres d'émission des sources de fluorescence sont suffisamment différents, la CLSM permet d'obtenir une image en 3 dimensions des composés étudiés en même temps. De telles approches ont déjà révélé la complexité de la composition et des arrangements des EPS dans des biofilms naturels ou reconstitués expérimentalement (Lawrence et al. 1991, Neu & Lawrence 1997, Decho & Kawaguchi 1999, Lawrence & Neu 1999, Jin et al. 2005, Neu et al. 2005, Bahulikar 2006, Mueller et al. 2006, Garny et al. 2008). Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines d'origine non-immunitaire, qui se lient de façon spécifique et réversible aux sucres. Lorsque les lectines sont couplées à des fluorochromes, leur affinité spécifique des devient un outil très pratique pour détecter la présence de monosaccharides dans les EPS et étudier les biofilms (Cf. références citées ci-dessus).

Afin de mieux comprendre les interactions entre les cellules algales et bactériennes dans le biofilm, il convient tout d'abord de bien définir les évolutions (quantités et compositions) des sucres au cours du développement d'un biofilm. Une étude a donc été conduite sur des biofilms de diatomées reconstitués sur des lamelles afin de mettre en évidence les quantités et les compositions des sucres sécrétés par les diatomées d'un biofilm

reconstitué sur des lamelles en verre. Sachant que les teneurs en ammonium peuvent être limitantes (Staats et al. 2000b, Orvain et al. 2003a), ce qui a été observé en mésocosme (Cf. chapitre 2), et qu'une carence entraîne des modifications physiologiques chez les microalgues, la présente étude a inclus une phase carencielle en ammonium afin de déterminer quels types et quelles quantités de sucres s'associaient à la réponse microalgale. Cette étude a été conduite en CLSM en utilisant l'autofluorescence naturelle des microalgues et huit lectines différentes.

## MATERIEL ET METHODES

### *Protocole de culture des biofilms*

Un biofilm a été cultivé à partir de prélèvements effectués en vasière intertidale (Ouireham, Calvados) dont les diatomées ont été isolées grâce à la méthode du tissu (Eaton & Moss 1966). Les diatomées épipéliques ayant migré dans le tissu sont cultivées dans des boîtes stériles de 6 puits (Nalgène) du 1<sup>er</sup> au 26 novembre 2008 afin de suivre les évolutions des teneurs en chlorophylle *a* (chl *a*), des substances polymériques extracellulaires (EPS) et des teneurs en ammonium au cours du développement du biofilm. Des lamelles couvre-objets en verre de 20 × 20 mm (Assistent, Germany) ont été utilisées comme support pour le développement des biofilms. Chaque lamelle a été nettoyée à l'éthanol à 70% puis déposée dans chacun des 6 puits (3,5 cm de diamètre) des 33 boîtes (12,5 × 8,5 cm). Une goutte de culture d'algues est déposée sur les lamelles. Après un temps de latence sous la hotte afin de favoriser l'adhésion des microalgues, 3 mL de milieu de culture complet (F/2) stérile ont été ajoutés dans chacun des puits. Ce milieu est composé d'eau de mer artificielle autoclavée dans laquelle sont ajoutées une solution de métaux (1‰) et une solution de vitamines (1‰) stériles. Le milieu de culture est renouvelé chaque jour à partir du deuxième jour avec du milieu complet tout au long de l'étude pour la moitié des boîtes et seulement pendant les 15 premiers jours pour l'autre moitié. Le milieu de culture de ces dernières sera ensuite renouvelé avec du milieu de culture carencé en ammonium jusqu'à la fin du suivi. Le milieu carencé est préparé de la même manière que le milieu complet sans les sources d'azote et en équilibrant les autres nutriments pour conserve un ratio C:P équivalent. La durée d'acquisition d'images au CLSM étant importante, les prélèvements ont eu lieu sur deux jours successifs, aussi la moitié des

cultures ont été lancées avec un jour de décalage pour qu'à chaque prélèvement, les biofilms aient le même âge.

Les boîtes de culture sont placées dans la structure reproduisant le nyctémère. Cette structure est constituée d'une armature métallique ( $L \times l \times h$  :  $180 \times 80 \times 80$  cm) isolée par des panneaux occultant dont les deux sur la façade avant sont amovibles (fig. 3.1) et installée dans une salle thermostatée à 17°C. Le nyctémère est reproduit à l'aide 4 racks de 2 néons fixés au dessus des boîtes et couplés à des chronorupteurs permettant d'appliquer un régime 12:12 jour:nuit. La lumière reçue au niveau des lamelles est suffisante pour développer un biofilm ( $>200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Les prélèvements ont été effectués sur des biofilms âgés de 6, 12, 19 et 25 jours.

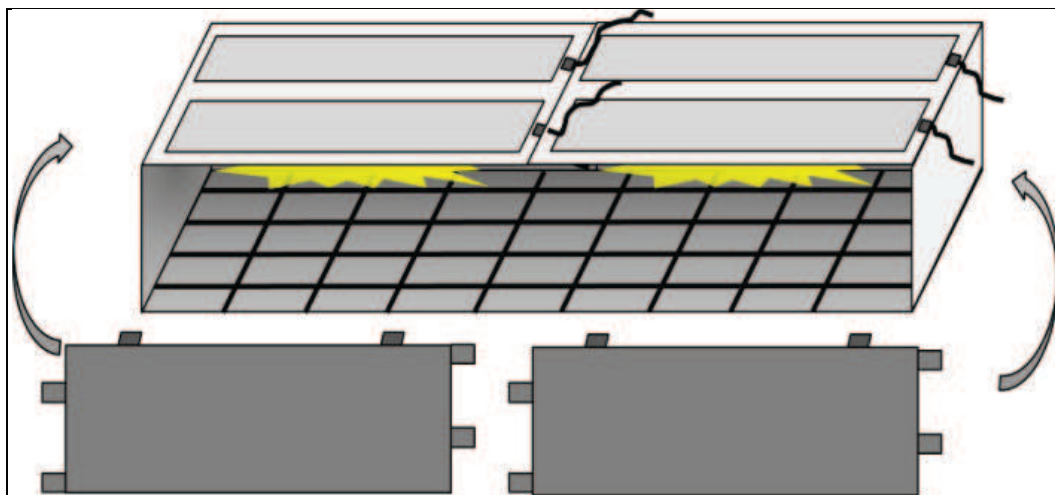
### *Etude des diatomées et des EPS au CLSM*

Huit lectines (Biovalley) ont été choisies (tableau 3.1) et ciblent les sucres les plus décrits dans la littérature. Les conjugués fluorescents utilisés sont le tétraméthylrhodamine isothiocyanate (TRITC), la fluorescéine isothiocyanate (FITC) et le Texas Red (TR) qui est le dérivé chlorure de sulfonyle de la sulforhodamine. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission des conjugués sont présentées en tableau 3.2. La durée d'acquisition d'images au CLSM étant importante, les prélèvements ont eu lieu sur deux jours successifs (en accord avec la date d'inoculation des biofilms), en étudiant 4 lectines par jour.

Deux boîtes, soit 12 lamelles, sont utilisées par échantillonnage, et 8 de ces 12 lamelles seront marquées par les lectines. Après mesure de la fluorescence au PAM (protocole décrit dans le paragraphe précédent), les lames sont retirées des boîtes à 6 puits grâce à une pince fine et individualisées dans des boîtes de Pétri de 60 mm de diamètre (VWR) chacune contenant 2 mL d'une solution de lectine différente (une lectine par marquage, concentration finale de 100  $\mu\text{g/mL}$ ). L'incubation des lamelles avec la lectine se fait à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante. Les biofilms sont ensuite rincés par deux bains successifs dans 2 mL de tampon PBS puis deux bains dans 2 mL de tampon TRIS. Les lamelles sont conservées dans le dernier bain de tampon TRIS jusqu'au montage sur lame. Chaque lamelle est déposée à l'aide d'une pince fine sur une lame à microscopie propre ( $76 \times 26$  mm, Assistent, Allemagne) et annotée après que le dessous de la lamelle ait été séché à l'aide d'un filtre GF/F (VWR). Quelques gouttes de tampon TRIS sont prélevées à l'aide d'une micropipette et déposées délicatement sur le biofilm avant de recouvrir le biofilm d'une

lamelle couvre-objet (24 × 32 mm, Assistant, Allemagne). Le tout est scellé avec du vernis à ongle et conservé à l'obscurité à 4°C jusqu'à l'analyse au microscope confocal.

Le microscope confocal à balayage laser Olympus FV1000 utilisé au Centre de Microscopie Appliquée à la BIOlogie de l'Université de Caen (CMAbio <http://www.unicaen.fr/services/cmabio/microscopie-confocale.php>) est composé d'un microscope inversé (objectifs ×10 à ×60), la tête confocale est équipée de 4 détecteurs dont un détecteur spectral, un module de scan permettant les « F-techniques » et reçoit 5 raies laser (458, 488, 515, 543, 633 nm) et une diode UV (405 nm). Il est relié à un ordinateur et les images sont acquises par le logiciel FV1000 viewer version ASW 1.7b (Olympus). Pour chaque lamelle de biofilm, 3 champs optiques sont choisis au hasard et analysés. Ce nombre a été défini suite à une étude préliminaire de la répétabilité des échantillonnages. Pour chaque champ, deux séries d'images focalisant à différentes profondeurs du biofilm ou « stacks » sont simultanément enregistrées à l'objectif ×40 à huile à immersion. La première enregistre l'autofluorescence des microalgues tandis que la deuxième enregistrera la fluorescence du conjugué pour chaque lectine. Les lasers appliqués à l'échantillon sont fonction du spectre d'excitation du conjugué fluorescent et sont indiqués en tableau 3.2.



**Figure 3.1 :** Illustration de la structure de culture. Schéma de l'installation accueillant les boîtes de culture. Le plafond est muni de deux rampes de deux néons chacune. Le sol est délimité par des bandes pour l'emplacement des boîtes. Une partie amovible opaque permet de refermer la structure en dehors des manipulations.

Les séries d'images acquises ont été quantitativement analysées grâce au logiciel libre PHLIP (PHobia Laser scanning microscopy Imaging Processor) qui permet l'analyse de données CLSM multi-canaux (Mueller et al. 2006). Ce logiciel fonctionne en association avec le logiciel Matlab (Matlab R2009). Selon la distance entre chaque plan focal et la résolution de chaque pixel, le logiciel analyse l'ensemble des images d'un stack pour estimer le biovolume du marquage, après avoir défini les seuils d'intensité de détection du signal. A partir de ces informations, il calcule les biovolumes des sucres (marquages par les lectines) ou de chl *a* (autofluorescence), en  $\mu\text{m}^3$ . Les biovolumes de sucre sont rapportés au biovolume de l'autofluorescence.

### *Mesures des concentrations en ammonium, en sucres EPS et de la chl a*

Trois autres boîtes sont prélevées pour suivre l'évolution des teneurs en ammonium, des sucres et de la chl *a* dans les cultures. Les lamelles sont raclées ainsi que l'intérieur des puits avec une raclette stérile (Cell-Scraper, VWR). Pour chacune des boîtes, le milieu de culture et le biofilm resuspendu sont pipetés à l'aide d'une pipette 10 mL stérile munie d'une poire, puis placés dans un tube à centrifuger de 50 mL. Trois mL d'eau de mer artificielle (sans ammonium) stérile sont ajoutés dans chacun des puits. Les puits et lamelles sont encore une fois raclées et le tout ajouté au premier prélèvement dans le tube à centrifuger. Le contenu du tube est pesé et homogénéisé par agitation au Vortex pendant 15 secondes et 2 mL sont transférés dans un tube à hémolyse de 5 mL et congelés pour l'analyse de la concentration en chl *a*. Le tube de 50 mL est alors centrifugé (20°C, 3500 g, 10 minutes). Dix mL sont prélevés et placés dans un tube en verre avec bouchon Téflon pour les mesures d'ammonium. Le reste du surnageant est versé dans un tube à centrifuger de 50 mL et congelé (-20°C) jusqu'aux mesures des EPS colloïdaux. Le culot est remis en suspension avec 5 mL d'eau de mer artificielle. Environ 1 mg de résine échangeuse d'ions (Dowex, Marathon C) est ajouté puis le tube est placé sur un agitateur orbital à 4°C pendant une heure. Après centrifugation (20°C, 3500g, 10 min), le surnageant contenant les EPS liées est conservé à -20°C jusqu'aux analyses suivantes. Les culots sont conservés à -20°C et contiennent les cellules, les substances internes, la résine et les débris. Les mesures des teneurs en sucres ont été effectuées selon la méthode de Dubois telle qu'elle est décrite dans les chapitres précédents.

**Tableau 3.1** : références, unités ciblées et conjugués fluorescents des différentes lectines utilisées

Référence	Nom complet	Unité(s) ciblée(s)	Conjugué fluorescent
conA	<i>Canavalia ensiformis</i> (Jackbean)	$\alpha$ -mannose $\alpha$ -glucose $\alpha$ -glucose-N-acétyl	Texas Red
GSII	<i>Griffonia simplicifolia</i>	$\alpha$ -glucose-N-acétyl $\beta$ -glucose-N-acétyl	Texas Red
GNA	<i>Galanthus nivalis</i> (bulbe de perce-neige)	$\alpha$ -mannose	FITC
PNA	<i>Arachis hypogaea</i> (cacahuète)	$\beta$ -galactose	TRITC
AAA	<i>Anguilla anguilla</i> (anguille d'eau douce)	$\alpha$ -fucose	FITC
DBA	<i>Dolichos biflorus</i> (kulthi)	$\alpha$ -fucose-N-acétyl	FITC
SJA	<i>Sophora japonica</i> (sophora du japon)	$\beta$ -galactose-N-acétyl	TRITC
VRA	<i>Vigna radiata</i> (haricot mungo)	$\alpha$ -galactose-N-acétyl	FITC

**Tableau 3.2** : longueurs d'onde d'excitation et d'émission (nm) des conjugués fluorescents.

Conjugué fluorescent	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Laser (nm)
FITC	490	520	488
TRITC	541	572	543
Texas Red	595	615	543
Autofluorescence	647	665	633



La mesure des teneurs en ammonium a été réalisée selon la méthode Koroleff (Koroleff 1966). Une nouvelle gamme étalon (de 0 à 10  $\mu\text{M}$ ) ainsi que le second réactif (0,2 g de DCI dans 25 mL de solution complexante) étaient refaits pour chaque mesure. Aux 10 mL d'échantillon est ajouté 0,5 mL de réactif 1, puis après agitation de 5 secondes au vortex, 0,5 mL de réactif 2. Après une nouvelle agitation de 5 secondes au vortex, le tube est enroulé dans l'aluminium et conservé à l'obscurité et à température ambiante pour une nuit. Les lectures sont effectuées en spectrophotométrie à 630 nm le lendemain matin.

### Statistiques

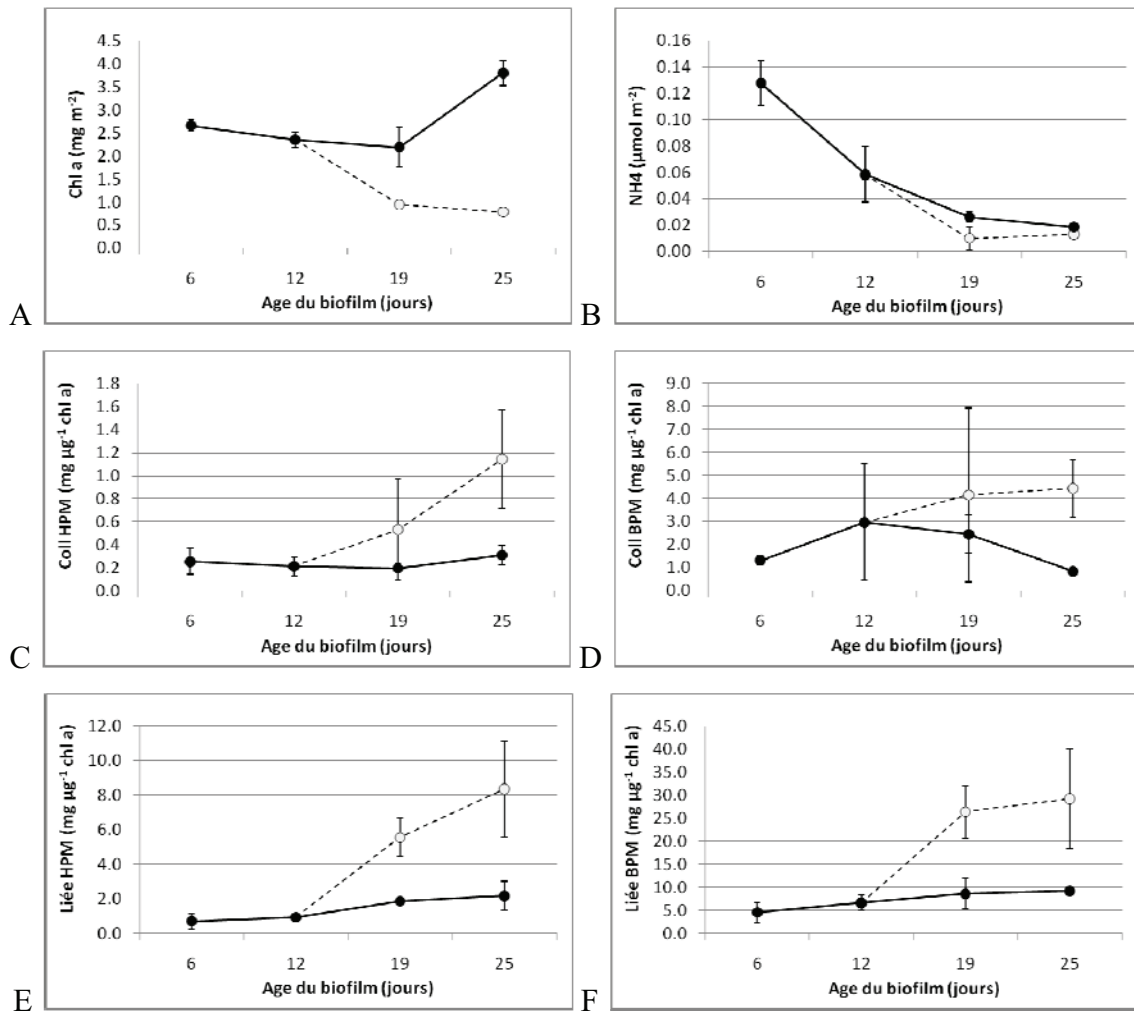
Les effets de l'âge et de la carence en ammonium (jours 19 et 25) ont été testés pour chacune des variables étudiées par des ANOVA à 2 facteurs complétées par des tests post-hoc de Tukey. Les effets de l'âge (lot témoin) ont également été estimés suite à des ANOVA à un facteur. Ces tests ont été réalisés avec le logiciel Minitab. Une étude préliminaire a été conduite afin de définir le nombre de lamelles et de champs par lamelle nécessaires pour obtenir une bonne répétabilité des résultats.

## RESULTATS

### *Dynamique de la chl a, de l'ammonium et des EPS au cours du suivi*

La teneur en chl *a* a été d'environ 2,5 mg chl *a*  $\text{m}^{-2}$  à 6, 12 et 19 jours dans le lot sans carences puis a augmenté à 3,75 mg  $\text{m}^{-2}$  au 25<sup>ème</sup> jour (fig. 3.2-A). Dans le lot carencé, les valeurs étaient inférieures à celles du lot témoin aux 19 et 25<sup>ème</sup> jours, avec  $\sim 1$  mg  $\text{m}^{-2}$  à ces deux dates. Il est probable qu'à ce moment la plupart des diatomées des cultures carencées étaient mortes. Des effets significatifs (tableau 3.3) de l'âge du biofilm ( $F_{1,8} = 237,56$ ,  $P < 0,001$ ), du traitement de carence ( $F_{1,8} = 5,91$ ,  $P < 0,05$ ) et de ces deux effets simultanés ( $F_{1,8} = 22,83$ ,  $P < 0,005$ ) ont été observés (données des jours 19 et 25). L'effet de l'âge a également été estimé à partir du suivi témoin (tableau 3.4) et a indiqué que des différences significatives ont été trouvées entre tous les jours sauf entre le jour 6 et 12.

Les teneurs en ammonium (fig. 3.2-B) ont diminué au long de l'expérimentation dans les deux traitements, avec  $\sim 0,13$   $\mu\text{mol m}^{-2}$  au 6<sup>ème</sup> jour de suivi, puis 0,06  $\mu\text{mol m}^{-2}$  au 12<sup>ème</sup> jour, et enfin autour de 0,02  $\mu\text{mol m}^{-2}$  aux 19<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> jours. L'augmentation de la



**Figure 3.2 :** évolution des teneurs en A : chl a ( $\text{mg m}^{-2}$ ), B : ammonium ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ ), C : sucres de la fraction colloïdale HPM, D : sucres colloïdaux BPM, E : sucres liés HPM, F : sucres liés BPM au cours du suivi, de C à F : mg équivalent glucose  $\mu\text{g}^{-1}$  chl a. Les mesures sont effectuées sur les échantillons témoins (ronds noirs, ligne pleine) et carencés (ronds blancs, ligne pointillée). Les barres représentent les écarts-type.

biomasse algale a conduit à une utilisation très rapide de l'ammonium dans les milieux non carencés, qui ont donc été limités (mais non carencés) en ammonium malgré le renouvellement quotidien du milieu de culture. Le traitement de carence (tableau 3.3) a eu un effet significatif sur la teneur en ammonium ( $F_{1,8} = 14,02$ ,  $P < 0,01$ ). Des différences significatives ont été détectées entre le jour 6 et tous les autres jours, ainsi qu'entre les jours 12 et 25 dans le lot sans carence (tableau 3.4).

Les teneurs en sucres colloïdaux HPM (fig. 3.2-C) étaient d'environ  $0,2 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  les jours 6, 12 et 19 dans le lot témoin puis ont augmenté légèrement à  $0,3 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  au jour 25. Le lot carencé a montré des valeurs plus fortes avec en moyenne  $0,6 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  et  $1,2 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  respectivement aux jours 19 et 25.

Les teneurs en sucres colloïdaux BPM (fig. 3.2-D) étaient plus élevées avec autour de  $1 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  les jours 6 et 25 et entre 2 et  $3 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  les jours 12 et 19 dans le lot témoin. Là encore le lot carencé a montré de plus fortes valeurs que le lot témoin avec des moyennes comprises entre 4 et  $5 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  les jours 19 et 25.

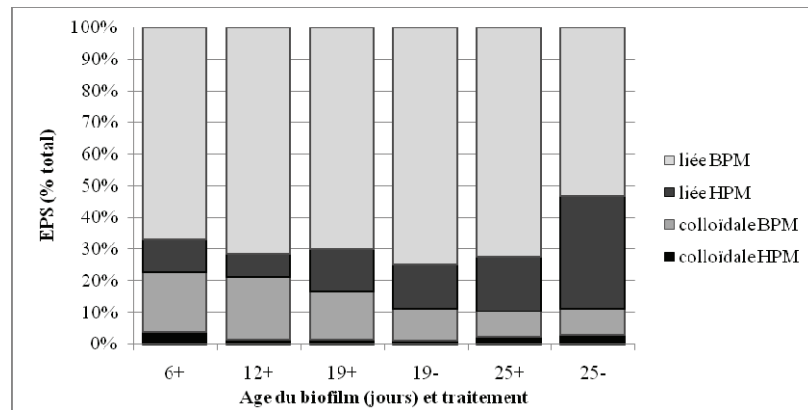
Les sucres de la fraction liée HPM (fig. 3.2-E) ont été d'environ  $1 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  au 6<sup>ème</sup> et 12<sup>ème</sup> jour de suivi et  $2 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  aux 19<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> jours pour le lot témoin. Dans le cas de la carence en ammonium, ces valeurs ont augmenté à  $\sim 6 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  le 19<sup>ème</sup> jour et  $\sim 8 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  le 25<sup>ème</sup> jour de suivi.

Enfin, les sucres liés BPM (fig. 3.2-F) ont continuellement augmenté de  $5 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  au jour 6 à  $10 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  au jour 25 dans le lot témoin, mais ont été sécrétés de façon plus forte lors de la carence avec des moyennes de 25 et  $30 \text{ mg } \mu\text{g}^{-1} \text{ chl } a$  respectivement pour les jours 19 et 25.

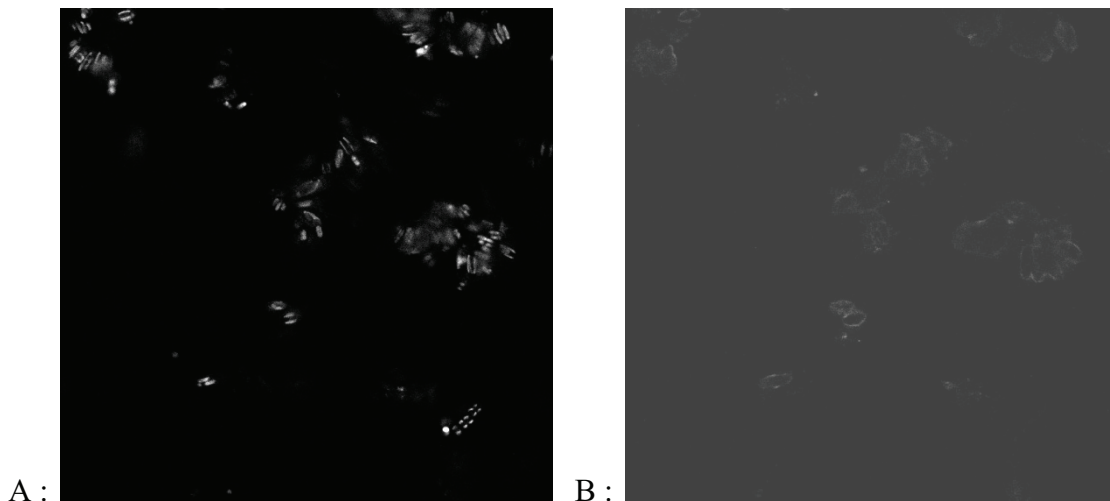
Les sucres liés ont été majoritaires au long du suivi (fig. 3.3), représentant entre 75 et 90 % des EPS totales. Leur contribution la plus faible a été enregistrée pour le premier prélèvement (jour 6). Quelque soit la fraction considérée, les composés BPM étaient majoritaires. Les EPS liées BPM ont représenté de 65 à 75% des sucres totaux, sauf au 25<sup>ème</sup> jour du suivi carencé où elles ont représenté environ 50% des sucres totaux. La contribution des sucres colloïdaux BPM (entre 10 et 20%) a plutôt diminué avec l'âge avec peut-être un effet de la carence le 19<sup>ème</sup> jour. La proportion de sucres colloïdaux HPM a été inférieure à 5% des EPS totales et était la plus forte aux 6<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> (avec et sans carence) jours. Les EPS liées HPM ont eu tendance à être de plus en plus présentes dans les EPS totales avec le vieillissement du biofilm avec entre 8 et 35% des EPS totales. La plus forte proportion a été mesurée au 25<sup>ème</sup> jour en état de carence.

#### *Dynamique de la composition des EPS définie au CLSM au cours du suivi*

L'allure des images acquises au CLSM après un marquage par les lectines est illustré en figure 3.4, qui permet de voir pour une même profondeur dans le biofilm deux signaux



**Figure 3.3** : proportions de chaque fraction d'EPS pondérée par la chl *a* (% total) selon l'âge (en jours) et le traitement (+ : sans carence et - : avec carence en ammonium).



**Figure 3.4** : exemple de deux images du même plan focal d'un biofilm avec A : l'autofluorescence des chloroplastes et B : le signal de la sonde Texas Red associée à la conA, qui définit nettement le contour du frustule. La largeur de chaque photo mesure environ 200  $\mu\text{m}$ .

distincts : à gauche (fig. 3.4-A) l'autofluorescence des chloroplastes des diatomées prend la forme de points lumineux appariés, tandis qu'à droite (fig. 3.4-B), la conA s'est fixée sur le frustule des diatomées et permet d'en visualiser très nettement les contours.

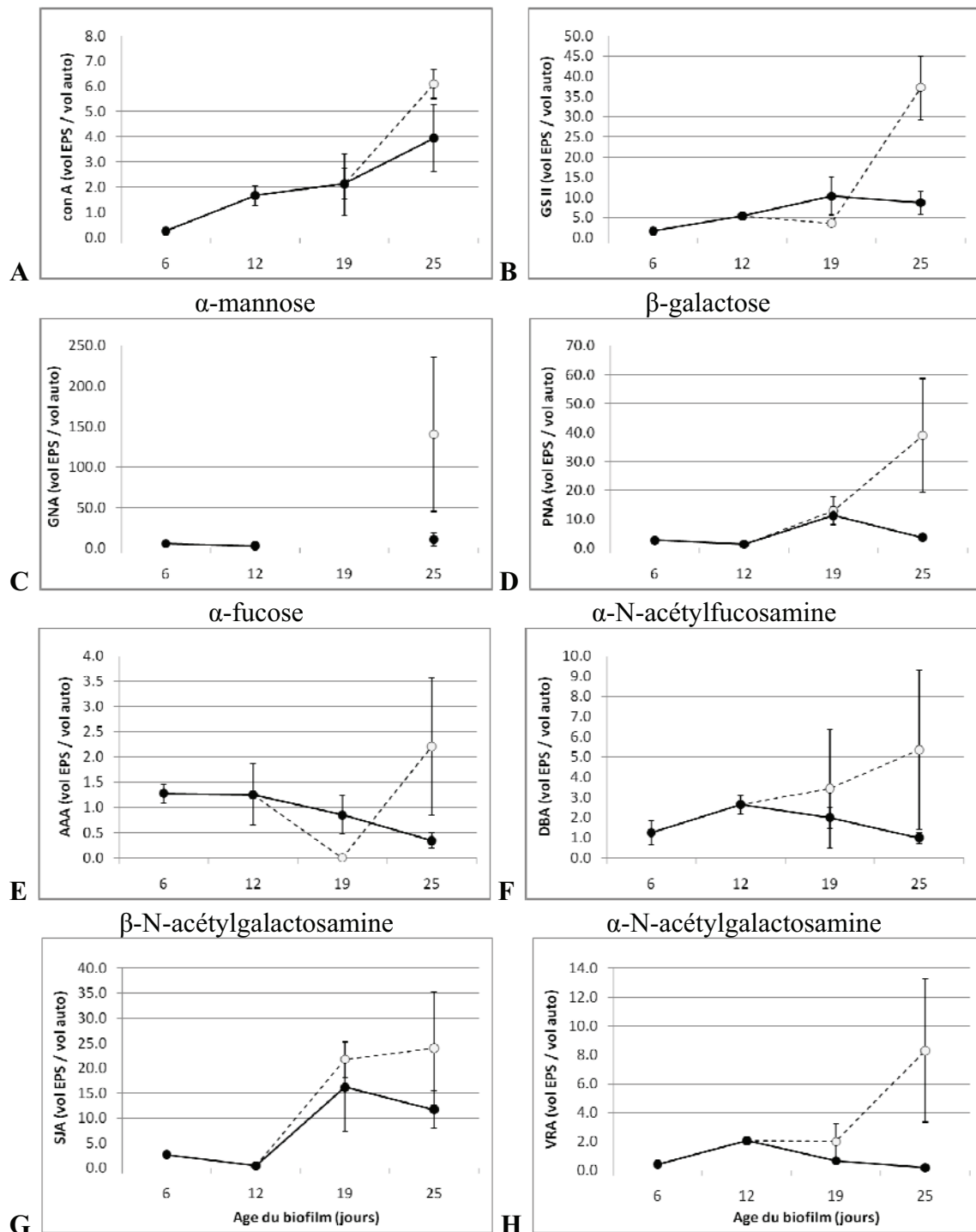
La mesure de l'autofluorescence a été corrélée bien que non significativement à la teneur en chl *a* ( $r^2 = 0,57$ ,  $P < 0,1$ ). La somme des lectines a été significativement corrélée aux EPS liées HPM ( $r = 0,88$ ,  $P < 0,05$ ).

Pour les biofilms âgés de 25 jours, la carence a systématiquement généré une sécrétion plus importante de sucres (fig. 3.5). Les effets de l'âge, de la carence et des deux simultanément sur la sécrétion de sucre sont présentés en tableau 3.3. Les cinétiques ont été différentes selon les lectines : 1) une augmentation continue au cours du suivi avec un effet visible de la carence (conA et GSII), 2) une diminution en général dans le lot témoin mais une augmentation en cas de carence (AAA), 3) une augmentation dans la première phase puis diminution lors de la limitation en ammonium (19<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> jours du lot témoin) ou une augmentation lors de la carence (19<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> jour du lot carencé) (DBA, VRA), 4) une augmentation causée par la limitation en ammonium qui est plus prononcée pour la carence (SJA) et enfin 5) une augmentation légère en début de limitation suivie d'une libération de sucres en cas de carence (PNA). L'âge a significativement influencé les sécrétions des sucres marqués par la conA, la GSII et la AAA, marquant les sous-unités  $\alpha$ -mannose,  $\alpha$ -glucose,  $\alpha$ -N-acétylglucosamine,  $\beta$ -N-acétylglucosamine qui augmentent avec l'âge et l' $\alpha$ -fucose qui diminue avec le vieillissement du biofilm. La carence en ammonium a eu des effets significatifs sur les monosaccharides marqués par la PNA, la AAA et la VRA, c'est-à-dire le  $\beta$ -galactose, l' $\alpha$ -fucose et l' $\alpha$ -N-acétylgalactosamine. Elle a également affecté les fractions liées des EPS. Le vieillissement du biofilm associé à la carence en ammonium ont significativement impacté la production de  $\alpha$ -N-acétylglucosamine,  $\beta$ -N-acétylglucosamine,  $\beta$ -galactose, l' $\alpha$ -fucose et l' $\alpha$ -N-acétylgalactosamine (lectines GSII, PNA, AAA et VRA). Aucun effet significatif n'a été observé pour les monosaccharides  $\alpha$ -N-acétylfucosamine et  $\beta$ -N-acétylgalactosamine.

Les proportions en sucre des EPS rapportés à l'autofluorescence sont variables au long du suivi (fig. 3.6). Les augmentations en GNA (marqueur de l' $\alpha$ -mannose seul) ont été systématiquement supérieures à celles de la conA (marqueur de l' $\alpha$ -mannose,  $\alpha$ -glucose et N-acétyl- $\alpha$ -glucosamine). Ceci signifie que la conA est moins efficace pour la détection de l' $\alpha$ -mannose que la GNA. En considérant que la GSII et la conA détectent avec la même efficacité les monosaccharides communs à ces deux lectines, alors une augmentation non proportionnelle des volumes de la GSII (marqueur des glucoses  $\alpha$ - et  $\beta$ -N-acétylés) et de la conA devrait plutôt traduire une augmentation de sécrétion de  $\beta$ -N-acétylglucosamine.

$\alpha$ -mannose,  $\alpha$ -glucose,  $\alpha$ -N-acétylglucosamine

$\alpha$ - et  $\beta$ -N-acétylglucosamine



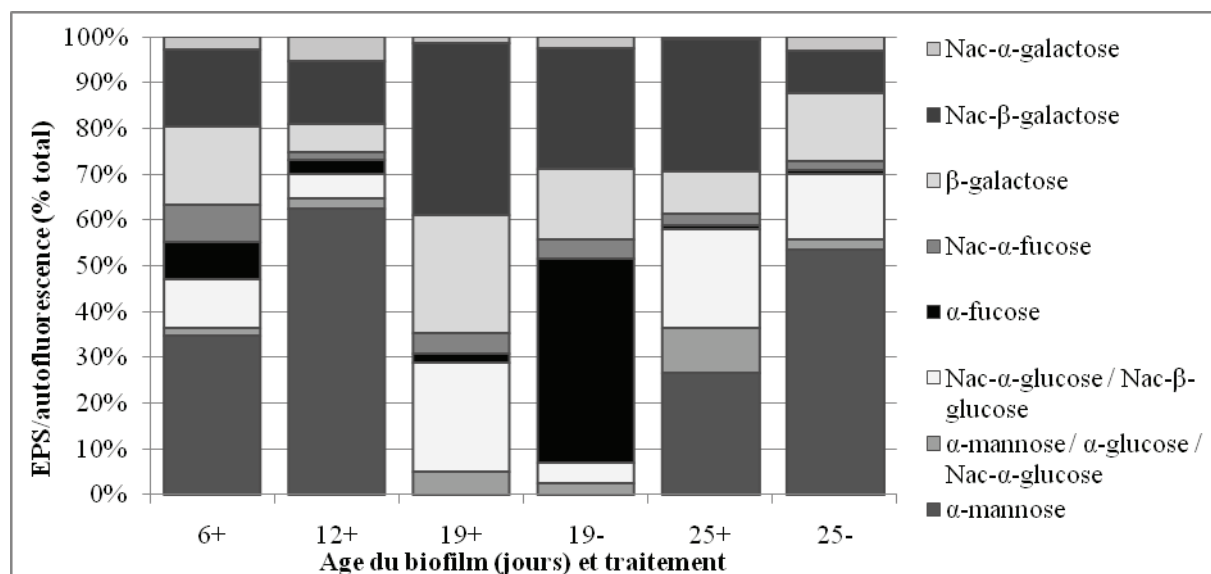
**Figure 3.5 :** évolution du rapport du volume de sucres marqués pour chaque lectine sur le volume d'autofluorescence mesuré par microscopie confocale des échantillons témoins (ronds noirs lignes pleines) et carencés (ronds blancs, ligne pointillée) au cours du suivi. Les barres représentent les écarts-type. A : conA ; B : GSII ; C : GNA (il n'y a pas eu de mesures le 19<sup>ème</sup> jour) ; D : PNA ; E : AAA ; F ; DBA ; G : SIA ; H : VRA. Les unités saccharidiques marquées sont indiquées au dessus des figures.

En revanche, si la conA augmente plus que la GSII, cela signifierait davantage une augmentation de la concentration en  $\alpha$ -glucose.

Dans le lot témoin, au 6<sup>ème</sup> jour l' $\alpha$ -mannose est dominant (environ 35% des monosaccharides totaux), suivi par le  $\beta$ -galactose et le N-acétyl- $\beta$ -galactosamine (chacun environ 20% du total). Au 12<sup>ème</sup> jour, l' $\alpha$ -mannose contribue à plus de 60% de la composition en monosaccharide des EPS, au détriment principalement du N-acétyl- $\beta$ -galactosamine et du N-acétyl- $\alpha$ -fucosamine. Le jour 19, l' $\alpha$ -fucose n'a pas pu être étudié en raison d'un défaut de marquage. Les proportions des autres monosaccharides sont restées constantes. En revanche, le 25<sup>ème</sup> jour est marqué par une augmentation des glucoses  $\alpha$ - et  $\beta$ -N-acétylés et une plus forte contribution de l' $\alpha$ -mannose, de l' $\alpha$ -glucose et du N-acétyl- $\alpha$ -glucosamine. L' $\alpha$ -mannose n'ayant pas augmenté de manière substantielle, il semblerait que les  $\alpha$ -glucose et les  $\alpha$  et  $\beta$ -glucoses N-acétylés aient augmenté dans le biofilm. Le N-acétyl- $\alpha$ -galactosamine était absent du biofilm à cette période.

Les effets de la carence s'associent à une plus forte contribution du N-acétyl- $\alpha$ -galactosamine les 19<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> jours et une diminution de la N-acétyl- $\beta$ -galactosamine, du marquage des  $\alpha$ - et  $\beta$ -glucoses N-acétylés et du marquage des  $\alpha$ -mannose,  $\alpha$ -glucose et N-acétyl- $\alpha$ -glucosamine (fig. 3.6). Le 19<sup>ème</sup> jour, l'application de la carence a conduit à une très forte sécrétion d' $\alpha$ -fucose qui représente alors plus de 40% du total des EPS (sans mesures de la GNA) et une diminution de la proportion de  $\beta$ -galactose. Le 25<sup>ème</sup> jour, l' $\alpha$ -mannose et le  $\beta$ -galactose sont fortement stimulés par la carence en ammonium, tandis que la proportion de N-acétyl- $\beta$ -galactosamine a diminué.

Les effets du vieillissement du biofilm ont été mesurés à partir des résultats obtenus pour le lot témoin (tableau 3.4). La DBA a été la seule lectine pour laquelle aucun effet de l'âge n'a été détecté, tandis que la fraction liée HPM des EPS est la seule à avoir montré des variations significatives au cours du temps. Des effets isolés (entre deux prélèvements non-consécutifs) ont été détectés pour les lectines AAA, conA, GSII, GNA, VRA et SJA. Pour la GNA et la VRA, des différences significatives sont également observées entre le premier et le deuxième prélèvement (jours 6 et 12). De plus, pour la VRA, les volumes mesurés au 3<sup>ème</sup> prélèvement (jour 19) ont été significativement différents de ceux du 2<sup>ème</sup> (jour 12).



**Figure 3.6 :** Evolution du rapport du volume de sucres marqués par les lectines sur le volume d'autofluorescence (% sucres/autofluorescence total) mesuré par microscopie confocale à différents âges du biofilm (en jours) pour les deux traitements (+ : sans carence en ammonium. - : avec carence en ammonium).

**Tableau 3.3 :** valeurs des F statistiques obtenus suite à l'analyse par ANOVA pour 2 facteurs pour chacune des variables (ammonium, chl a, les quatre fractions d'EPS et chacune des lectines excepté la GNA pour laquelle le nombre de valeurs était insuffisant). Ns : Non significatif ; \* :  $P \leq 0,05$  ; \*\* :  $P \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $P \leq 0,005$  ; \*\*\*\* :  $P \leq 0,001$ .

variable	dl	Age	Carence	Age * Carence
NH4	1	ns	14,02 **	Ns
chl a	1	237,56 ****	5,91 *	22,83 ***
conA	1	14,61 **	ns	Ns
GSII	1	29,23 ***	ns	36,03 ****
PNA	1	ns	28,96 ***	23,21 ***
AAA	1	31,25 ***	69,19 ****	8,48 *
DBA	1	ns	ns	Ns
SJA	1	ns	ns	Ns
VRA	1	ns	47,84 ****	17,17 ***
colloïdale HPM	1	ns	ns	Ns
colloïdale BPM	1	ns	ns	Ns
liée HPM	1	ns	29,58 ***	Ns
liée BPM	1	ns	26,91 ***	Ns



**Tableau 3.4 :** valeurs des F statistiques des effets de l'âge sur le biofilm (ANOVA à 1 facteur) pour chacune des variables (chl *a*, ammonium, les 4 fractions d'EPS et chacune des lectines) et degré de significativité des t de Student obtenus suite aux tests appariés entre chaque âge (en jour). Ns : Non significatif ; \* :  $P \leq 0,05$  ; \*\* :  $P \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $P \leq 0,005$  ; \*\*\*\* :  $P \leq 0,001$ . La valeur du F est indiquée sous le nom de la variable, les degrés de significativité des t de Student sont indiqués dans la diagonale inférieure du tableau.

<b>Chl a</b>				<b>NH4</b>			
146,99 ****	6	12	19	39,55 ****	6	12	19
12	ns	-	-	12	***	-	-
19	****	****	-	19	****	ns	-
25	****	****	****	25	****	*	ns
<b>ConA</b>				<b>GSII</b>			
12,03 ***	6	12	19	4,80 *	6	12	19
12	ns	-	-	12	ns	-	-
19	ns	ns	-	19	*	ns	-
25	***	ns	ns	25	ns	ns	ns
<b>GNA</b>				<b>PNA</b>			
60,45 ****	6	12	19	8,27 *	6	12	19
12	****	-	-	12	ns	-	-
19	-	-	-	19	**	ns	-
25	ns	****	-	25	ns	ns	*
<b>AAA</b>				<b>DBA</b>			
9,47 **	6	12	19	ns	6	12	19
12	ns	-	-	12	ns	-	-
19	ns	ns	-	19	ns	ns	-
25	ns	**	ns	25	ns	ns	ns
<b>SJA</b>				<b>VRA</b>			
4,27 *	6	12	19	12,62 ***	6	12	19
12	ns	-	-	12	*	-	-
19	*	ns	-	19	ns	*	-
25	ns	ns	ns	25	ns	***	ns

Les EPS totales estimées par fluorimétrie (rapportées à la mesure de chl *a*) et celles estimées à partir des lectines (rapportées à l'autofluorescence) ont été fortement corrélées ( $r^2 = 0,99$ ,  $P < 0,005$ , tableau 3.5). Les degrés de corrélation mesurés entre les EPS et les substances marquées par les lectines permettent de rattacher des compositions en monosaccharides aux différentes fractions d'EPS (tableau 3.5). La DBA qui cible les  $\alpha$ -N-acétylfucosamines a été corrélée à toutes les fractions d'EPS, et a été la seule sonde à être significativement corrélée aux EPS colloïdales BPM. La GNA et la PNA ont été significativement corrélées à toutes les autres fractions d'EPS en marquant l' $\alpha$ -mannose et le  $\beta$ -galactose. La SJA n'a été significativement corrélée qu'aux EPS liées. La conA et la GSII en revanche ont caractérisé les EPS colloïdales HPM.

**Tableau 3.5** : corrélations entre les moyennes des différentes fractions d'EPS et les moyennes des marquages des lectines au cours du suivi (rapportées respectivement à la chl *a* et à l'autofluorescence). Les valeurs des  $r^2$  sont indiquées lorsque les corrélations étaient significatives. Les degrés de probabilité sont : ns : Non significatif ; \* :  $P \leq 0,05$  ; \*\* :  $P \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $P \leq 0,005$  ; \*\*\*\* :  $P \leq 0,001$ .

	lectines totales	cona	GSII	GNA	PNA	AAA	DBA	SJA	VRA
EPS totales	0,99 ***	ns	ns	0,98 **	0,74 *	ns	0,81 *	0,74 *	ns
EPS liées HPM	0,99 ***	ns	ns	0,98 **	0,85 ***	ns	0,79 *	0,76 *	0,73 *
EPS liées BPM	0,99 ***	ns	ns	0,98 **	0,69 *	ns	0,75 *	0,75 *	ns
EPS colloïdales HPM	1,00 ***	0,65*	0,78 *	1,00 ***	0,90 ***	ns	0,78 *	ns	0,89 ***
EPS colloïdales BPM	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0,87 **	ns	ns
n	4	6	6	4	6	5	6	6	6

## DISCUSSION

### *Sécrétion d'EPS par les diatomées lors du vieillissement du biofilm et de la carence*

Les conditions reproduites lors de l'expérimentation ont permis le développement d'un biofilm sur lamelles puisque le lot témoin a montré une augmentation significative de la teneur en chl *a* avec l'âge avec des différences significatives entre toutes les dates sauf les deux premières, période au cours de laquelle les diatomées étaient potentiellement en phase de latence. L'augmentation en chl *a* s'est associée à une utilisation importante de l'ammonium avec des teneurs qui ont chuté significativement au cours du suivi et qui étaient proches de celles appliquées au lot carencé. L'ammonium contenu dans le milieu complet a donc été utilisé très rapidement par les diatomées en développement, puisque celui-ci était épuisé au moment des deux dernières mesures malgré un renouvellement quotidien du milieu de culture. Les effets de la carence en ammonium ont été négatifs sur le développement du biofilm puisque la teneur en chl *a* s'est fortement réduite au 19<sup>ème</sup> puis 25<sup>ème</sup> jour. Bien que les teneurs en ammonium du suivi témoin aient été proches de celles du suivi carencé, les mesures de la chl *a* montrent bien que dans le premier cas il y a eu une utilisation rapide de l'ammonium liée aux fortes densités algales, tandis que dans le second cas l'absence d'ammonium a plutôt conduit à la mort cellulaire dans le biofilm.

La carence en ammonium a systématiquement entraîné une augmentation des teneurs en EPS. Cet effet n'a pourtant été significatif que pour les EPS liées. La sécrétion d'EPS colloïdales HPM en réponse à une carence en ammonium qui a été observée au cours de précédents chapitres aurait donc été principalement associée à une migration des diatomées afin de gagner des couches de sédiment plus profondes et favorables. Il a été montré dans d'autres études que le mécanisme dit d'overflow, en réponse à une carence en nutriments, s'associait à une excrétion de composés colloïdaux HPM (Staats et al. 2000b, Orvain et al. 2003a, Underwood et al. 2004). L'incapacité des diatomées à migrer sur les lamelles expliquerait qu'il n'y ait pas eu d'augmentation conséquente des sucres colloïdaux HPM en cas de carence. De plus les biofilms ont été bien exposés à la lumière et non-soumis aux cycles de marée ; ainsi les diatomées n'ont pas eu de stimuli particuliers associés aux migrations. En revanche les diatomées ont certainement sécrété les sucres liés HPM afin d'améliorer l'adhésion à la lamelle et épaissir la couche protectrice d'EPS, ce qui confirmerait leur rôle constitutif dans le biofilm. La sécrétion d'EPS dans le but de créer un environnement protecteur a déjà été observée dans d'autres études (Krembs et al. 2002, Underwood et al. 2010) ainsi que leur rôle dans l'adhésion des cellules au substrat (Lind et al. 1997). Les EPS

liées ont constitué la fraction la plus importante des EPS totales mesurées dans le milieu de culture et ont significativement augmenté tout au long du suivi (lot témoin). L'augmentation de la proportion en EPS liées HPM en réponse à la carence en ammonium dans le biofilm âgé de 25 jours confirme le rôle de cette fraction dans les mécanismes de réponse au stress nutritif. Les sucres BPM étaient dominants, représentant de 90 à 60% des sucres totaux, comme ceci a été observé pour un biofilm en bonne santé et photosynthétiquement actif (Smith & Underwood 1998, de Brouwer & Stal 2002, Underwood et al. 2004). D'après les observations *in situ* (Cf. chapitre 1), ceci traduirait d'avantage l'hydrolyse des composés HPM puisque les biofilms sont constamment immergés. La limitation et la carence en ammonium se sont associées à une diminution de la proportion des sucres colloïdaux BPM dans la composition totale des EPS. Les hypothèses étaient que soit 1) les sucres s'accumulaient dans la cellule en cas de carence, et que les fortes valeurs enregistrées dans des études précédentes résultaient en réalité d'une contamination par les substances internes, suite à la lyse cellulaire provoquée par les méthodes d'extraction, soit 2) les cellules rejettent effectivement le carbone intracellulaire en excès sous forme d'EPS HPM dans le milieu. L'étude en CLSM ne compromet pas l'intégrité cellulaire, cependant le stress généré par les carences le peut. Aussi, la diminution des teneurs en chl *a* s'associerait à la mort des diatomées et leur dégradation dans le biofilm au 25<sup>ème</sup> jour dans le lot carencé, et les mesures plus importantes d'EPS HPM résulteraient de la dispersion des substances internes dans le milieu, tandis que les augmentations de sucres en début de carence (19<sup>ème</sup> jour) ou lors de la limitation (lot témoin, 19<sup>ème</sup> et 25<sup>ème</sup> jours) correspondraient aux sucres effectivement sécrétés en réponse à un stress.

### *Composition en monosaccharides.*

Le fait que les cinétiques aient été variables selon les lectines utilisées illustre le fait que les substances liées ou colloïdales ont des compositions en monosaccharides différentes, comme les substances internes qui ont pu diffuser dans le biofilm suite à une lyse cellulaire. D'autres études ont montré que les compositions étaient variables selon la fraction d'EPS considérée (Pierre et al. soumis, annexe 1, Staats et al. 1999, Taylor et al. 1999, Takahashi et al. 2009), avec une correspondance des compositions entre les EPS HPM et BPM, soutenant l'idée que les composés BPM dérivent de l'hydrolyse des composés HPM (Pierre et al. sous presse).

Selon les corrélations établies en tableau 3.5, il ressort que le N-acétylfucosamine a été ubiquiste dans les EPS extraites du biofilm et du milieu de culture. La bonne corrélation entre les EPS liées et l' $\alpha$ -mannose et le  $\beta$ -galactose est surprenante car une étude a montré que ces sucres étaient principalement retrouvés dans les substances internes des diatomées benthiques (Pierre et al. sous presse). Il se pourrait que ces EPS liées proviennent de cellules en mauvaise santé et dont le frustule serait devenu perméable, ou alors elles seraient d'origine bactérienne. Les substances HPM ont été celles qui ont été corrélées significativement au plus grand nombre de lectines. Elles l'ont été spécifiquement avec l' $\alpha$ -N-acétylgalactosamine qui est un constituant important de nombreux composés biologiques, en participant notamment à l'édification des molécules de lipo et glycoprotéines (Neuman et al. 1975). Les EPS liées ont été corrélées au  $\beta$ -N-acétylglucosamine. L'acétylglucosamine pourrait intervenir dans la composition du frustule et dans la reconnaissance entre cellules. Une association  $\alpha$ - et  $\beta$ - acétylgalactosamine pourrait être responsable de la limitation du développement bactérien qui a été attribué aux EPS liées HPM au cours des différents chapitres de ce travail. Les EPS colloïdales HPM ont aussi contenu de l' $\alpha$ -mannose et du  $\beta$ -galactose, ce qui appuie l'idée que ces sucres soient excrétés à partir des réserves sans être trop modifiés. Elles ont été spécifiquement corrélées aux diverses formes de glucose :  $\alpha$ -glucose,  $\alpha$ - et  $\beta$ - N-acétylglucosamine. L'idée que ces EPS soient labiles et stimulent fortement les activités enzymatiques bactériennes est confortée ici. Les EPS colloïdales HPM sont donc associées soit à une plus grande part de glucose, soit à une plus forte fréquentation bactérienne (augmentation des marqueurs du mur cellulaire).

Le fucose est sécrété plus fortement en réponse à la carence et correspondrait ainsi aux EPS liées qui constitueraient une couche protectrice autour de la diatomée, ce qui s'accorde avec d'autres études conduites sur les diatomées benthiques (Takahashi et al. 2009, Pierre et al. sous presse, Pierre et al. soumis, annexe 1). La présence de fucose dans les EPS augmente la souplesse et la compressibilité du mucilage enrobant les diatomées (Chiovitti et al. 2003). La forte augmentation du mannose au dernier jour de carence (de moins de 10 à 140 environ) s'expliquerait par la lyse cellulaire et la libération de substances internes dans le milieu. Il a également été montré dans des études sur les diatomées que le mannose était principalement retrouvé dans les substances internes (Pierre et al. sous presse, Pierre et al. soumis, annexe 1). Cependant, un exopolysaccharide riche en galactose et en mannose (Psl) a été décrit chez la bactérie pathogène *Pseudomonas aeruginosa*. Cette EPS est essentielle à l'initiation et le maintien des biofilm en permettant les interactions cellules-cellules et cellules-surface (Ma et al. 2007). Les N-acétylglucosamines se retrouvent notamment dans la couche de

peptidoglycanes des parois bactériennes. Utilisant les mesures de colocalisation au CLSM, Lawrence et al. (2007) ont montré que les compositions des EPS changeaient également avec leur position par rapport à la cellule dans des microcolonies de bactéries : les lectines les plus associées à la cellule ont des spécificités pour le galactose, le mannose, le N-acétylglucosamine et les glycoprotéines, les lectines qui enrobent les cellules ont des affinités pour le fucose, le mannose et le glucose. Ces compositions soutiennent les hypothèses d'une caractérisation des bactéries par la conA et la GSII (composants du mur cellulaire) et que la lectine AAA marque d'avantage des EPS liées impliquées dans l'adhésion et le maintien de l'hydratation dans le biofilm bactérien et microalgal. Aussi, les augmentations des N-acétylglucosamines, du mannose et du galactose au 25<sup>ème</sup> jour dans le lot carencé pourraient également traduire la mise en place d'un biofilm bactérien. Ce dernier serait stimulé par l'augmentation d'un substrat labile, le glucose, libéré dans le milieu après la lyse des diatomées. Les EPS BPM n'ont pas augmenté au 25<sup>ème</sup> jour dans le lot carencé et leur proportion parmi les sucres totaux a même diminué. Hofmann et al (2009) ont mis en évidence une diminution rapide des EPS BPM suite à une rapide utilisation de ces composés par les bactéries. Il est donc très probable qu'un biofilm bactérien se développe activement après la mort des cellules algales.



## CHAPITRE 3-B

*Etude en microscopie confocale à balayage laser de la dynamique des bactéries en fonction des sucres sécrétés par des diatomées soumises ou non à une carence en ammonium : utilisation de lectines.*

---

**INTRODUCTION**

Lors de la première partie de ce chapitre, il a été mis en évidence que les diatomées sécrétaient de plus fortes quantités de sucres extracellulaires en cas de carence en ammonium et que leur composition changeait. L'étroite relation qui unit les diatomées aux bactéries *via* les EPS devrait alors être modifiée. La microscopie confocale a permis de suivre l'évolution de ces sucres parallèlement à celle de la chlorophylle lors d'une carence en ammonium. Cependant cet outil permet également, grâce à l'utilisation de marqueurs de l'ADN bactérien tels que les sondes Syto (Mueller et al. 2006) d'observer l'évolution du volume bactérien. Aussi une nouvelle étude a été conduite en intégrant les bactéries. Le nombre de lectines utilisées a été réduit à 2 : la conA et la AAA. Ces lectines ont été choisies car leurs dynamiques décrivaient bien les effets de l'âge (ConA) et d'une carence (AAA) sur les sécrétions de sucres par les diatomées. La sécrétion d'EPS lors des phases nocturnes est sujet à controverse. Il a été observé d'un côté une sécrétion d'EPS ralentie la nuit comparée au jour (de Brouwer & Stal 2001) et de l'autre une diminution des quantités EPS en phase nocturne (Orvain et al. 2003a). Aussi des observations en CLSM de biofilms prélevés en phase claire et en phase sombre devraient apporter de nouvelles informations en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses. Ce nouveau suivi de 23 jours a été réalisé sur des biofilms développés à partir de cultures xéniques de la diatomée *Phaeodactylum tricorutum* et a inclus des mesures de jour et de nuit et à nouveau un effet d'une carence en ammonium.



### MATERIEL ET METHODES

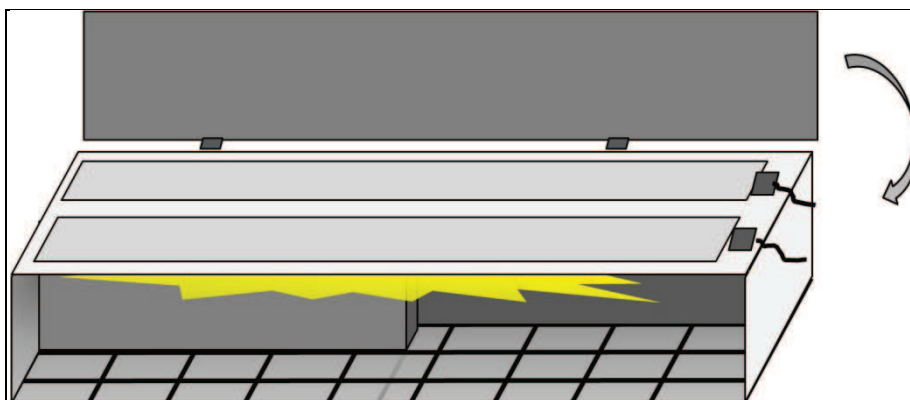
Le protocole expérimental a été proche de celui présenté en première partie du chapitre 3. La souche de diatomées *Phaeodactylum tricornutum* provenant de cultures (ALGOBANK, Caen) a été utilisée pour inoculer les lamelles couvre-objets placées dans les puits de boîtes 6 puits. La diatomée *Phaeodactylum tricornutum* fait partie des principaux groupes trouvés dans les études sur les communautés microphytobenthiques (Serodio et al. 1997) et est facilement cultivable. Le risque de présence de protozoaires bactérivores tels que les ciliés était trop important avec l'utilisation de diatomées provenant de prélèvements naturels, c'est pourquoi il a été préféré une espèce issue de culture. Les inoculations (départs des cultures) ont là encore été effectuées en deux fois pour répartir les analyses au CLSM. La zone expérimentale a été séparée en deux par de la bâche noire afin de pouvoir conduire deux régimes jour-nuit (12h-12h) opposés en même temps (fig. 3.7). La structure est également placée dans une salle thermostatée à 17°C. Les solutions (milieu de culture, tampons, etc.) utilisés ont été identiques à celle décrites en première partie de ce chapitre. La carence en ammonium est appliquée à la moitié des boîtes des deux compartiments après 7 jours de traitement normal (renouvellement quotidien du milieu avec du milieu complet).

Douze prélèvements de 3 boîtes ont été réalisés : 4 prélèvements sans carence et 2 avec carence en ammonium, une heure avant la fin de la phase de lumière (échantillons « jour ») dans l'une des parties de la structure et une heure avant la fin de la phase d'obscurité (échantillons « de nuit ») de l'autre côté. Pour chacune de ces trois boîtes, une lamelle (un puits) est tirée au hasard et deux des trois lamelles ainsi choisies seront marquées avec les différentes sondes. La troisième lamelle n'est pas prise en compte. Pour chaque boîte, la totalité des 5 puits restants sont raclés et leur contenu est recueilli dans un tube à centrifuger de 50 mL prépesé. Trois mL d'eau de mer artificielle sont ajoutés dans chacun des 5 puits et après un nouveau raclage, le contenu de chaque boîte est ajouté dans les tubes à centrifuger correspondants. Le biofilm ainsi resuspendu est agité au vortex pendant 10 secondes et 1 mL est prélevé et placé dans un tube à hémolyse de 5 mL contenant 1 mL de formol 4% pour les mesures des abondances bactériennes. Le reste a servi à mesurer les EPS selon la méthode utilisée en première partie de ce chapitre. Cependant, aucune EPS n'a été détectée par la méthode de Dubois aussi elles ne seront pas traitées dans les résultats.

Les abondances bactériennes ont été estimées par cytométrie en flux en utilisant un cytomètre en flux FACScalibur (Becton Dickinson (BD) Biosciences, San José, CA, USA)

équipé avec un laser argon climatisé (488 nm, 15 mV). Les échantillons ont été marqués au SYBR Green (concentration finale  $10 \mu\text{l ml}^{-1}$ ) (Molecular Probes, utilisé au 1:100 de la solution stock) pendant 10mn et analysés à faible vitesse de passage. Les cellules ont été discriminées à l'aide des paramètres de diffusion (propriétés de dispersion à angle droit de la lumière; taille approximative des cellules (SSC) et d'intensité de fluorescence verte émise (FL1). Tous les paramètres ont été collectés en signaux logarithmiques. L'acquisition et l'analyse des résultats ont été réalisées avec le logiciel CellQuest (BD). Cet appareil a été mis à disposition par l'Université Blaise Pascal (Clermont-Ferrand) lors d'un accueil au sein de l'équipe « Ecotoxicologie Microbienne ».

L'une des deux lamelles servant au marquage du biofilm intact a été marquée par la lectine AAA décrite dans la première partie de ce chapitre et par un marqueur d'ADN bactérien Syto 64 (Invitrogen, dilué à la concentration finale de  $50 \mu\text{M}$  dans du tampon TRIS), l'autre est marquée avec la lectine conA décrite en première partie de ce chapitre et un marqueur d'ADN bactérien Syto 9 (Invitrogen, dilué à la concentration finale de  $50 \mu\text{M}$  dans du tampon TRIS), selon la méthodologie décrite dans l'étude de Mueller (2006). Les caractéristiques des spectres de ces sondes sont présentées en tableau 3.6. L'acquisition d'images au microscope confocal a été réalisée avec le même microscope et le même logiciel que lors de la partie A de ce chapitre, cependant l'objectif du microscope utilisé a été différent. En effet, pour mieux adapter les observations à la taille des bactéries, un objectif  $\times 60$  à eau a été choisi. De plus, un zoom numérique  $\times 2,0$  a été appliqué via le logiciel du microscope.



**Figure 3.7 :** Schéma de l'installation pour les cultures. La structure utilisée est celle décrite au chapitre 1 avec quelques modifications, notamment la séparation en deux parties, deux accès (la bâche en façade n'est pas représentée par soucis de clarté) et l'utilisation de deux rampes de deux néons.

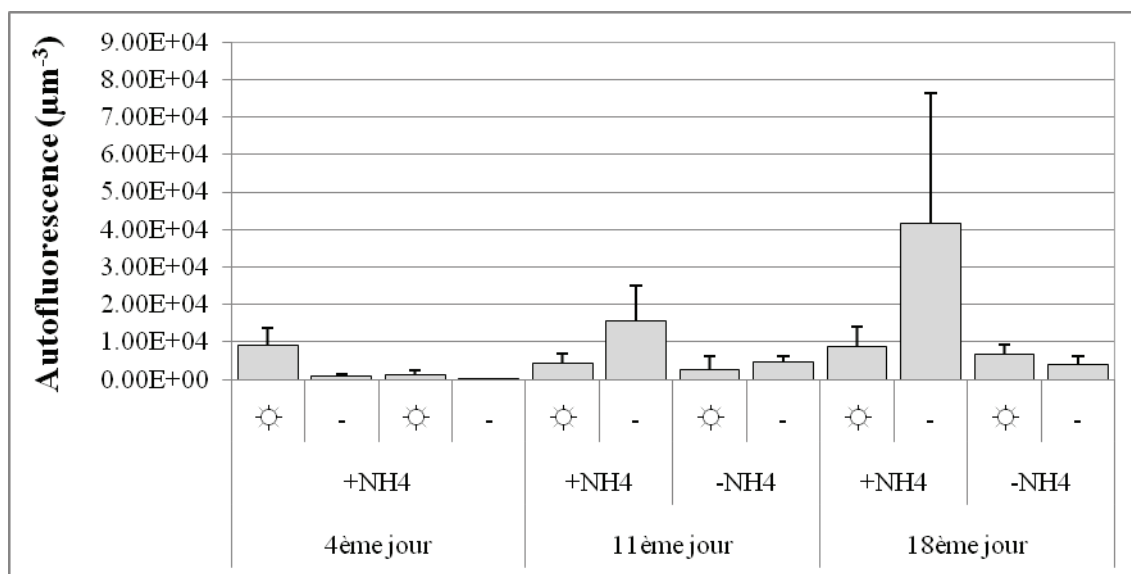
**Tableau 3.6** : longueurs d'onde d'excitation et d'émission (nm) des sondes fluorescentes.

sonde	Marqueur	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Longueur d'onde d'émission (nm)	Laser (nm)
Lectine AAA	FITC	488	530	488
Lectine ConA	TR	541	572	543
Syto 9	FITC	485	498	543
Syto 64	TR	599	619	543
Autofluorescence	-	647	665	633

## RESULTATS

Les biofilms étaient plutôt hétérogènes et ne se sont pas développés aussi rapidement que ce qui était attendu. Malgré les précautions prises lors de l'inoculation et des renouvellements de milieu de culture, il semblerait qu'une portion des diatomées ait été sortie du système au début du suivi lors des renouvellements de milieu. Les diatomées utilisées ici sont retrouvées naturellement dans les compartiments benthiques comme pélagiques, ceci pourrait expliquer qu'elles n'aient pas efficacement adhéré les premiers jours. Cependant, les biovolumes de chl *a* mesurés via l'autofluorescence des chloroplastes au CLSM (fig. 3.8) montrent une augmentation globale de la biomasse autotrophe du biofilm au cours du suivi, qui a été beaucoup plus faible en cas de carence. En considérant les 2 derniers prélèvements (tableau 3.7), des effets significatifs de la carence ( $F_{1,15} = 10,61$ ,  $P < 0,005$ ) et de la phase lumineuse ( $F_{1,15} = 5,56$ ,  $P < 0,05$ ) ainsi qu'un effet proche de la significativité de l'âge ( $F_{1,15} = 4,18$ ,  $P = 0,06$ ) ont été détectés. Les statistiques appliquées à l'ensemble des prélèvements du lot témoin mettent en évidence un effet de l'âge ( $F_{2,17} = 17,84$ ,  $P < 0,001$ ).

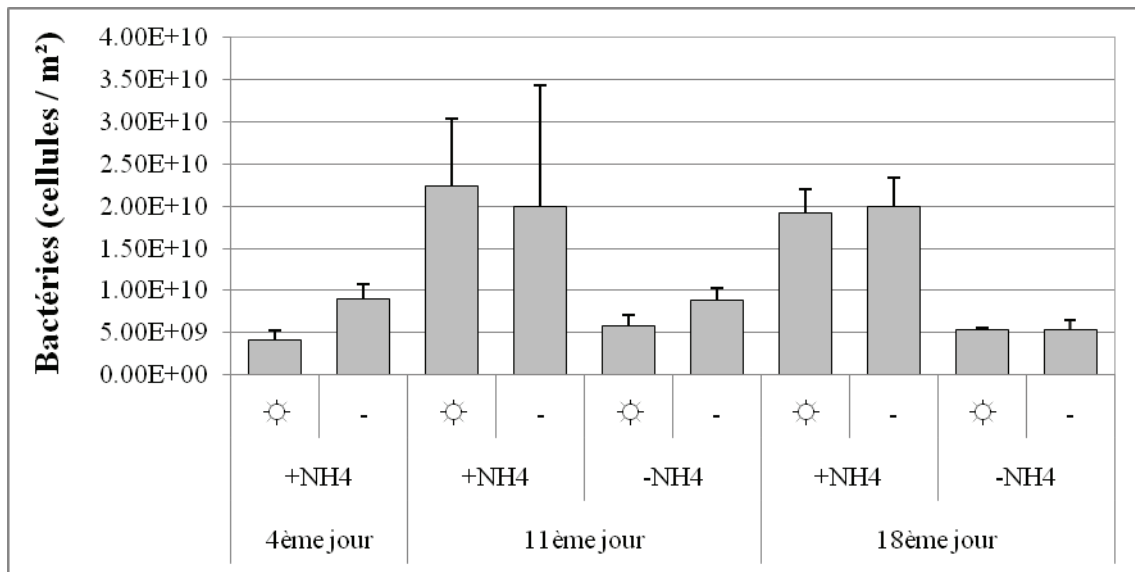
Les bactéries se sont bien développées dans les biofilms au cours du suivi (fig. 3.9) et les effets de l'âge ont été significatifs ( $F_{2,12} = 7,93$ ,  $P < 0,01$ ) (tableau 3.7). Il n'y a pas eu de différences significatives selon que le prélèvement était effectué en fin de jour ou en fin de nuit. En revanche, la carence en ammonium a été significativement défavorable au développement bactérien ( $F_{1,17} = 73,17$ ,  $P < 0,001$ ). Ainsi les abondances bactériennes ont augmenté au cours du suivi et de manière plus importante dans le lot non carencé.



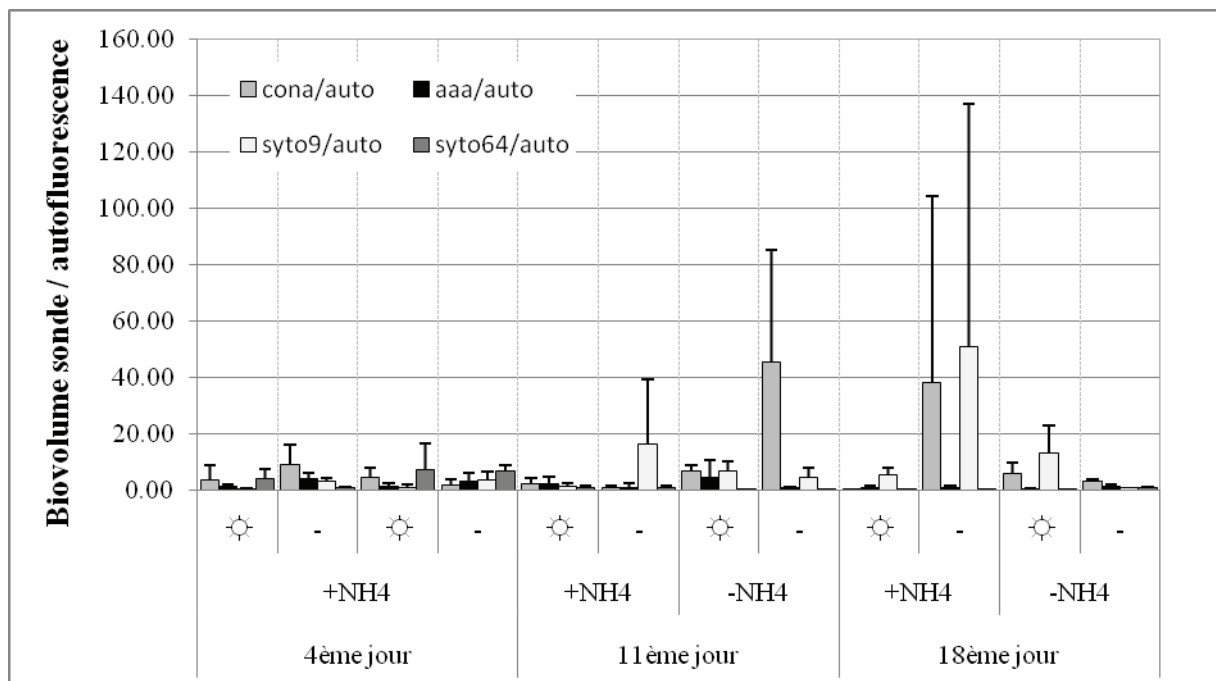
**Figure 3.8** : dynamique de l'autofluorescence ( $\mu\text{m}^3$ ) mesurée au CLSM selon l'âge (indiqué en jours), la phase lumineuse (jour : ☀ ; nuit : -) et le traitement de carence du biofilm (sans carence : +NH4 ; avec carence : - NH4). Les barres représentent les écart-types.

**Tableau 3.7** : valeurs des F statistiques obtenus après les analyses de variance sur l'ensemble du suivi témoin (lot « Témoin », effets de l'âge et de la phase lumineuse) et sur les deux derniers prélèvements (lot « NH4 », effets de la carence principalement, mais aussi de l'âge et de la phase). Les effets combinés ne présentant pas de valeurs significatives n'ont pas été indiqués dans le tableau. dl : degrés de liberté ; auto : autofluorescence ( $\mu\text{m}^3$ ) ; Bactéries : abondances mesurées en cytométrie en flux. Ns : Non significatif ; \* :  $P < 0,05$  ; \*\* :  $P < 0,01$  ; \*\*\* :  $P < 0,005$  ; \*\*\*\* :  $P < 0,001$ .

variable	Age		Phase		Phase * Age	Carence		Age * Carence
	Témoin	NH4	Témoin	NH4	Témoin	NH4	NH4	
lot	Témoin	NH4	Témoin	NH4	Témoin	NH4	NH4	
dl	2	1	1	1	2	1	1	
Auto	17,84****	ns	ns	5,56 *	8,11 ***	10,61 ***	ns	
ConA	ns	ns	ns	ns	ns	13,05 ***	ns	
AAA	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	
Syto9	ns	ns	ns	ns	ns	Ns	ns	
Syto64	6,54**	ns	ns	ns	ns	Ns	5,81 *	
Bactéries	7,93 **	ns	ns	ns	ns	73,17 ****	ns	



**Figure 3.9 :** dynamique des abondances bactériennes (cellules m<sup>-2</sup>) mesurées en cytométrie de flux selon l'âge (indiqué en jours), la phase lumineuse (jour : ☀ ; nuit : -) et le traitement de carence du biofilm (sans carence : +NH4 ; avec carence : - NH4). Les barres représentent les écart-types.



**Figure 3.10 :** dynamique des sondes (rapportées sur l'autofluorescence) mesurées au CLSM selon l'âge (indiqué en jours), la phase lumineuse (jour : ☀ ; nuit : -) et le traitement de carence du biofilm (sans carence : +NH4 ; avec carence : - NH4). Les barres représentent les écart-types.

Les évolutions du rapport (sans unités) des biovolumes ( $\mu\text{m}^3$ ) enregistrés au CLSM pour les différentes sondes sur les biovolume ( $\mu\text{m}^3$ ) d'autofluorescence sont présentées en figure 3.10. Il ressort que la sonde Syto9 n'a pas montré la même dynamique que la Syto64. Les corrélations entre les abondances bactériennes mesurées en cytométrie de flux et les biovolumes des sondes Syto mesurés au CLSM étaient plus fortes pour la Syto 9 ( $r^2 = 0,19$ ,  $P = 0,21$ ) qu'avec la Syto64 ( $r^2 = 0,02$ ,  $P = 0,70$ ) bien que non significatives. Le CLSM utilisé ne disposait pas du filtre permettant une détection optimale de la Syto64. Les réglages du laser avaient été adaptés afin d'optimiser le signal mais aux vues de ces résultats, la détection des bactéries par ce marqueur n'a pas été efficace. En revanche, la sonde Syto9 a été un indicateur correct du développement bactérien. Les dynamiques de la Syto9 (fig. 3.10) soulignent également un effet négatif de la carence sur la croissance bactérienne, bien que les statistiques n'aient pas montré d'effets significatifs.

Parmi les lectines, seule les sécrétions de ConA ont été significativement affectées par la carence en ammonium ( $F_{1,23} = 13,05$ ,  $P < 0,005$ ). Aucun effet significatif ni de l'âge ni de la phase lumineuse n'a été détecté par les statistiques. Des effets de la carence en ammonium ont été observés principalement au 11<sup>ème</sup> jour avec une augmentation des deux lectines et des bactéries en phase diurne en comparaison avec le 11<sup>ème</sup> jour sans carence en phase diurne, et plutôt une augmentation de la conA en phase nocturne dans le lot carencé. Le 18<sup>ème</sup> jour, en phase diurne, la carence a encore conduit à une augmentation de la conA et des bactéries, mais il n'y a pas eu d'augmentations nettes de la AAA. En phase nocturne, le lot non carencé montre de fortes quantités de conA et de bactéries, tandis que l'ensemble des sondes est peu représenté dans le lot carencé. Il semblerait qu'il y ait un décalage, le lot carencé provoquant les excréments de sucres plus tôt que le lot non carencé, et principalement la nuit. Les plus fortes valeurs de AAA sont enregistrées au 4<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jour, le fucose serait alors moins présent dans un biofilm âgé.

### DISCUSSION

Le biofilm s'est développé sur les lamelles bien que de façon limitée. Les biomasses microalgales ont augmenté au cours du suivi sauf en cas de carence en ammonium, comme observé lors du suivi présenté en première partie de ce chapitre.

De façon surprenante, les biovolumes associés à l'autofluorescence étaient les plus forts en fin de période nocturne. Ce résultat conduirait à penser que les microalgues se développent plus activement la nuit. Cependant, une autre explication est qu'en fin de phase lumineuse, les photosystèmes des algues soient saturés ce qui limiterait la capacité à émettre de la fluorescence lors de la stimulation par le laser du CLSM.

Les plus fortes valeurs obtenues pour la Syto9 et la conA sont obtenues la nuit. Les bactéries seraient plus actives pendant la période nocturne pour les lots non carencés. Ceci pourrait s'expliquer par une inhibition du développement bactérien par les activités de photosynthèse des diatomées le jour, soit par la sécrétion de substances défavorables aux bactéries (EPS liées), soit en raison d'une compétition pour l'utilisation des nutriments. Il se pourrait également que lors de la manipulation des lamelles pour effectuer les marquages, la lumière reçue à la surface des biofilms ait conduit à une stimulation des sécrétions d'EPS et une réponse des bactéries, cependant cette hypothèse ne paraît pas pertinente vue la courte durée d'exposition à la lumière. Il semblerait davantage que les activités des diatomées exposées à la lumière freinent le développement des bactéries *via* une sécrétion d'EPS liées, et que la nuit les diatomées ne sécrètent plus de substances ou alors des substances colloïdales riches en glucose (augmentation du marquage à la conA) qui favorisent le développement des bactéries (augmentation du signal de la syto64).

Une association plus forte entre les bactéries et la conA est observée. La conA est un marqueur du glucose mais également des N-acétylglucosamines qui sont, comme décrit en première partie de ce chapitre, des composants intervenant dans la structure des parois bactériennes. La relation entre la conA et les bactéries peut alors s'expliquer soit par l'aspect labile du substrat (glucose), soit par le fait que la conA marque un composant des bactéries (N-acétylglucosamine). Mueller et al. (2006) ont également décrit que les bactéries étaient très associées à la conA et ont alors proposé que la conA marquait des substances d'origine bactérienne. Ici, seuls les biovolumes ont été mesurés. Il est également possible d'observer la co-localisation des sondes à partir d'une série d'images, cependant Neu et al. (2001) ont montré qu'il était délicat d'interpréter précisément l'origine des résidus auxquels les lectines s'associent dans des systèmes complexes comme les biofilms sur cette base.

L'hypothèse stipulant que la carence en ammonium provoque l'excrétion de substances riches en glucose par les diatomées n'est pas exclue puisque des effets significatifs de la carence ont été détectés sur la conA. L'utilisation de la AAA n'a pas permis de déceler d'effets ni de l'âge, ni de la carence, ni de la phase lumineuse, en opposition avec le postulat initial. La ConA aura finalement été un meilleur indicateur du stress lié à la carence que la AAA. La AAA qui cible spécifiquement le fucose devait indiquer une mise en place d'un microenvironnement favorable en conditionnant l'adhésion et la protection des cellules. En effet le fucose intervient dans la souplesse et l'élasticité du mucilage (Chiovitti et al. 2003, Abdullahi et al. 2006). En cas d'exposition à des salinités plus élevées, il a été montré que *Phaeodactylum tricornutum* pouvait augmenter la sécrétion d'acide uronique, de rhamnose, xylose, arabinose et contenu sulfaté (tous les composants qui interviennent dans la structure des polymères) (Abdullahi et al. 2006). Une augmentation légère du fucose a été observée en cas de carence au 11<sup>ème</sup> jour en phase diurne, mais les effets de la carence n'ont pas été significatifs. Il était pourtant attendu que les cellules sécrètent un tel mucilage en cas de carence. Le fait que cette sécrétion ne se soit pas produite confirme l'hypothèse d'une mort des diatomées dans le lot carencé en ammonium, à laquelle se sont associés un fort développement bactérien et l'augmentation de substances qui pourraient être d'origine bactérienne.

Une principale limitation au cours de cette étude a été la nature du substrat utilisé. Plusieurs tests ont été effectués en amont de l'étude afin de valoriser un substrat permettant aux diatomées de migrer de la même manière que dans les sédiments fins des vasières, mais qui aurait en plus une structure stable de sorte à pouvoir être manipulé aisément sans compromettre l'intégrité du biofilm. Ce substrat devait également être neutre d'autofluorescence et ne pas absorber les sondes lors des incubations. L'objectif dans l'utilisation d'un tel substrat était de pouvoir étudier les substances associées à la migration des diatomées en appliquant une marée artificielle, de quantifier leur volume et de les localiser verticalement dans le sédiment. Malheureusement, aucune des matières testées n'a validé l'ensemble des critères énumérés ci-dessus. Les EPS étant largement reliées à des fonctions écologiques telles que la mobilité des microalgues, il semble important de pouvoir définir un substrat pour les cultures de microalgues qui ne compromettrait pas cette sécrétion.









**DISCUSSION GENERALE**  
**&**  
**PERSPECTIVES**

---



### *DISCUSSION GENERALE*

---

Les interactions entre cellules sont à la base de tous les organismes, de la constitution d'une communauté archaïque à la formation d'un organisme complexe. Les cellules qui composent les biofilms microphytobenthiques, principalement des diatomées et des bactéries, ont dû développer des mécanismes leur permettant de vivre dans des conditions extrêmement variables, certainement en tirant bénéfice les unes des autres. La compréhension du développement de ce biofilm, donc des interactions entre ses différents composants cellulaires et moléculaires, est essentielle car il représente la ressource trophique principale des vasières nues intertidales, comme celle de Brouage étudiée au chapitre 1. Des modèles de flux de carbone et d'azote sont en cours de développement. Ce sont des outils importants en termes de prédictions à long terme (effets d'un réchauffement climatique ou de la disparition d'un maillon du réseau alimentaire par exemple) donc en gestion environnementale. Ces modèles ont besoin de données fiables sur la production primaire, que seule une bonne compréhension des mécanismes au sein des biofilms microphytobenthiques peut apporter.

L'étude des interactions au sein des biofilms est complexe car la plupart des méthodes comportent un biais. Un suivi des corrélations entre bactéries, diatomées et EPS *in situ* à l'échelle de la vasière nécessite de mesurer de nombreux paramètres supplémentaires qui influent sur l'un ou l'autre des composants du biofilm, comme par exemple la température, la présence de prédateurs, les teneurs en sels nutritifs, en eau, en sel... tout ceci génère une augmentation substantielle de la quantité de matière nécessaire à l'étude de tous ces paramètres. Dans le cas de suivis comme ceux réalisés dans le premier chapitre, la surface échantillonnée ne pouvait pas être trop étendue en raison de l'hétérogénéité spatiale des biofilms et des vasières. Afin d'obtenir suffisamment de matériel, le biofilm a été étudié dans le 1<sup>er</sup> cm de vase, bien qu'il soit connu que l'épaisseur d'un biofilm n'excède pas le millimètre, avec 75% de la biomasse chlorophyllienne concentrée dans les 200 premiers microns (Herlory et al. 2004). Ce besoin de fortes quantités de matériel peut être problématique puisqu'il force à diluer le contenu du biofilm dans un volume de sédiment très supérieur au sien et dont la composition est inconnue. Cependant, comme ces couches plus profondes sont moins productives (Orvain et al. 2003a), il est tout de même possible que les mesures soient en effet en rapport avec les activités liées au biofilm. Un deuxième point est la

présence d'organismes tels que les hydrobie, qui d'une part vont consommer le biofilm (Haubois et al. 2005a, Pascal et al. 2008b) et d'autre part vont excréter de la matière organique qui ne peut être quantifiée *in situ*. D'autres facteurs comme la pluie, le vent ou une température anormalement basse ou élevée interagissent avec le biofilm dans une mesure qui n'est pas connue (Blanchard et al. 2002). Cependant cette approche est la plus réaliste puisque le biofilm est naturellement formé à la surface d'un sédiment particulier.

Le suivi en mésocosme présenté dans le deuxième chapitre a offert de nombreux avantages, comme un meilleur contrôle des facteurs pouvant interférer avec le biofilm (météorologie, prédation) ainsi qu'une logistique extrêmement facilitée. En effet, les déplacements sur la vasière sont difficiles, la distance au laboratoire peut être élevée et l'utilisation de substances radioactives en milieu naturel n'est pas possible en raison des risques de persistance et de contaminations. Aussi, les mesures d'activités enzymatiques ou de production bactériennes pouvaient perdre de leur sens. En effet, la marée basse durant environ 4 heures, le suivi de l'évolution à chaque heure d'une activité enzymatique n'est pas pertinente si le temps nécessaire pour débiter la mesure dépasse le pas de temps défini pour l'étude de la dynamique de cette variable. L'utilisation de mésocosmes permet de se trouver à bonne proximité des salles et du matériel nécessaire à ces observations. La durée de prélèvements étant raccourcie, il a été possible de faire des prélèvements à marée basse mais également à marée haute, ces derniers étant également beaucoup plus complexes à opérer *in situ*. Le tamisage du sédiment en amont de l'expérimentation a permis de réduire la quantité de sédiment nécessaire à chaque prélèvement (pas d'estimations de la présence de détritivores par exemple), cependant l'espace limité offert par le mésocosme a contraint à prélever le premier cm de vase. Ceci présente l'avantage d'une meilleure comparabilité entre les valeurs obtenues pour ces deux premiers chapitres.

Enfin l'étude en microscopie confocale à balayage laser (CLSM) présentée en chapitre 3 a permis de travailler sur un biofilm intact. Les précédentes expérimentations (chapitres 1 et 2) ont nécessité une homogénéisation du sédiment par mélange du premier centimètre de vase. Ici il a été possible de marquer directement certaines sous-unités osidiques dans un biofilm intact et de détecter dans le même temps les diatomées grâce à l'autofluorescence de leurs chloroplastes et les bactéries grâce à des marqueurs d'ADN bactériens. La principale limite à l'utilisation du CLSM qui est discutée en chapitre 3-B est qu'aucun des substrats connus ne permet aux microalgues de migrer tout en étant compatible avec les étapes de marquage par les sondes et l'acquisition d'images au CLSM. Ainsi

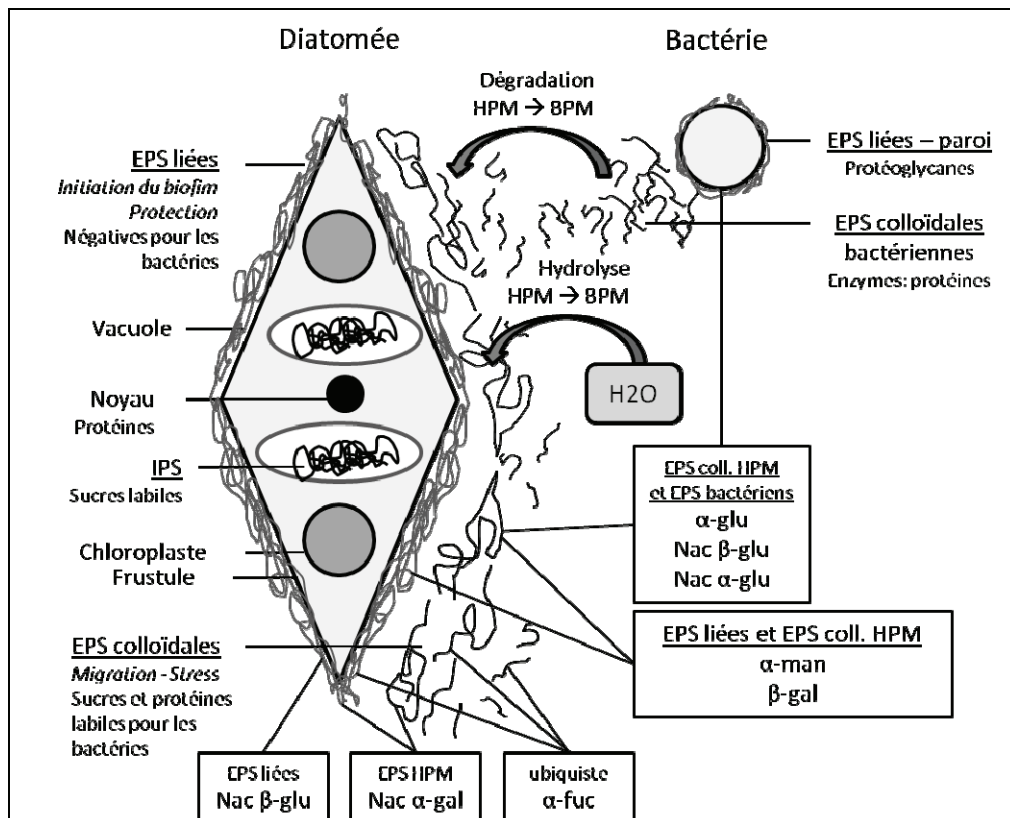
l'ensemble des EPS en lien avec la migration des diatomées n'ont certainement pas été exsudées lors de cette expérimentation.

Cependant, en recoupant l'ensemble des informations recueillies et les hypothèses émises au cours de ce travail, il est possible d'établir des représentations schématiques des cellules et de leurs EPS (fig. D.1) et des phases de sécrétions (fig. D.2) qui devraient fournir une représentation réaliste des interactions entre les diatomées et les bactéries, *via* les EPS, dans les biofilms microphytobenthiques. De plus, l'utilisation d'une méthode d'extraction des EPS ne provoquant pas la lyse cellulaire apporte de nouveaux éléments par rapport aux études antérieures.

Les biofilms microphytobenthiques sont distribués de façon hétérogène sur la vase, ce qui a été également observé lors des suivis *in situ*. En hiver, le biofilm était plus développé qu'en été, avec environ deux fois plus de bactéries et de diatomées dans le cm de surface. Les fortes densités d'hydrobies mesurées en été sont certainement à l'origine de cette observation, puisqu'elles sont des consommatrices du biofilm (Haubois et al. 2005a, Pascal et al. 2008b). Les substances HPM étaient plus importantes en été dans la vase. Les plus faibles quantités d'eau interstitielle dans le sédiment en été n'ont pas permis l'hydrolyse de ces composés, qui ont certainement été sécrétés de façon plus importante par les diatomées pour se protéger du stress lié à la sursalure et à la déplétion en sels nutritifs à la surface du sédiment. Cette sécrétion ayant également été observée en mésocosme et en culture sur lamelles, elle ne peut pas être attribuée au seul mucus des hydrobies.

Les diatomées vont préférentiellement sécréter des EPS colloïdales HPM en cas de stress, liées à la migration de la cellule vers les couches plus profondes du sédiment. Si la migration n'est pas possible, alors il semblerait que les diatomées sécrètent alors davantage d'EPS liées HPM, qui ont été décrites comme participant à la constitution d'une barrière protectrice autour de la cellule (Krembs et al. 2002, Nichols et al. 2005). Les EPS liées servent également à la mise en place du biofilm et leur sécrétion peut précéder l'augmentation des teneurs en chl *a* (Rince et al. 1999). Les protéines de ces EPS joueraient un rôle de structuration dans cette fraction, et pourraient être dégradées par les bactéries, notamment en cas de besoin en azote. En revanche, les sucres HPM de la fraction des EPS liées ont été systématiquement négativement corrélés avec les bactéries. Lors d'une carence en nutriments, les bactéries et les diatomées entrent en compétition pour cette ressource. En limitant l'abondance bactérienne autour du frustule, les diatomées pourraient se garantir un accès aux nutriments.





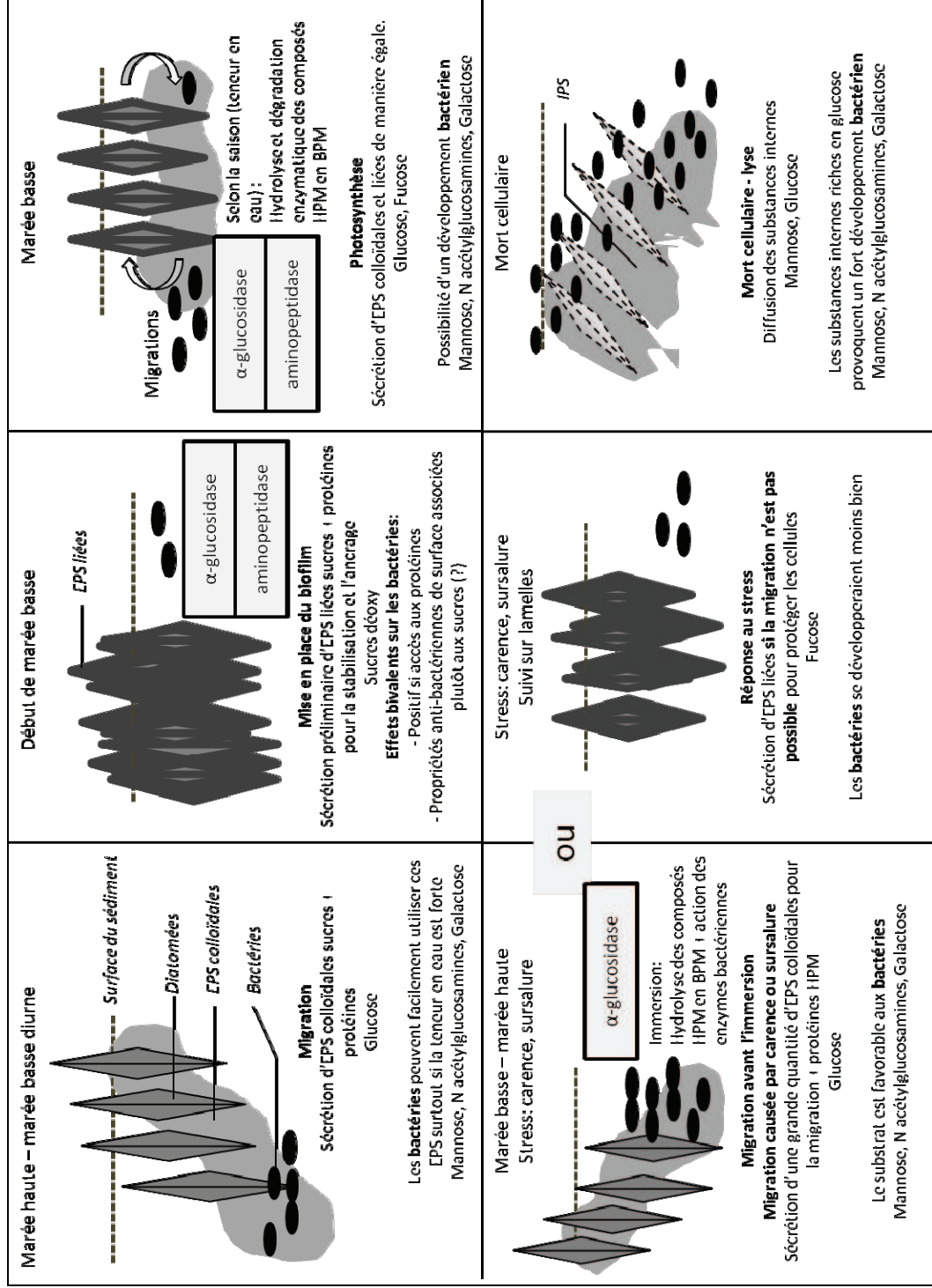
**Figure D.1 :** substances étudiées dans le biofilm microphytobenthique : localisation, rôle et composition. Nac : N-acétyl, gal : galactose, fuc : fucose, glu : glucose, man : mannose.

L'activité de photosynthèse s'associe à la libération d'EPS colloïdales qui constituent une ressource labile pour les bactéries (Haynes et al. 2007, Hofmann et al. 2009), et l'augmentation de la part protéiques des EPS colloïdales illustrerait la sécrétions d'enzymes par les bactéries. En effet, la paroi bactérienne ne permet pas l'assimilation de molécules dont la taille excède 600 kDa et les bactéries doivent décomposer les molécules HPM en BPM lorsque ces dernières deviennent insuffisantes dans le milieu. Cela concerne plutôt les protéines car les sucres sont plus facilement hydrolysés par l'eau interstitielle. Lors de conditions extrêmes, la mort des diatomées conduit à la libération du contenu interne de la cellule, dont les substances de réserves riches en glucose. Etant majoritairement constituées de substances HPM, elles stimulent probablement les activités bactériennes.

La proportion selon laquelle les diatomées et les bactéries contribuent chacune à l'excrétion des substances dans le biofilm varie donc en interaction et en réponse aux conditions du milieu. Le marquage par les lectines aide pour définir l'origine des EPS même si il faut rester prudent avec ces résultats (Neu et al. 2001). Les EPS bactériens semblent plutôt caractérisées par la présence de glucose et de N-acétylglucosamine, tandis que les

substances de haut poids moléculaire (colloïdales ou liées) se caractérisent par la présence de N-acétyl- $\alpha$ -galactosamine. La fraction protéique ici justifierait le rôle de ces substances dans la structuration du biofilm (liées) et du maintien de l'hydratation (colloïdales). Les EPS liées sont de plus caractérisées par les N-acétyl- $\beta$ -glucosamines qui correspondraient à un réenforcement du rôle de structuration. Le fucose a été corrélé avec toutes les fractions et intervient préférentiellement dans la protection de la cellule, d'après ce qui a été observé au chapitre 3-B.

Selon les phases observées lors du développement d'un biofilm, les sécrétions d'EPS vont varier ainsi que les interactions entre diatomées et bactéries (fig.D.2). Dès le début de la marée basse, les diatomées rejoignent la surface du sédiment afin d'accéder à la ressource photique nécessaire à la photosynthèse. Ces migrations sont accompagnées d'une sécrétion de sucres colloïdaux HPM. L'hydratation du sédiment intervient dans la nature des sucres s'accumulant dans le biofilm. En été, la consolidation du sédiment au cours de la marée basse provoquée par la diminution des teneurs en eau a gêné la migration des diatomées et créer un environnement stressant (sursalure). Ainsi plutôt que des migrations, la sécrétion d'EPS liées HPM servirait à protéger la cellule en enrobant le frustule d'une substance tampon, comme il l'a également été observé en CLSM. Pendant la migration vers la surface du sédiment, ou juste après, un milieu conditionnant est créé *via* l'exsudation de substances liées. Ces EPS jouent un rôle dans l'adhésion des cellules et la souplesse du mucilage. La photosynthèse génère la synthèse de sucres colloïdaux comme liés de façon continue. L'augmentation de l'une ou l'autre de ces fractions résulte d'une réponse cellulaire à un stress environnemental, soit par la migration soit par l'enrobage de la cellule. Lors de la marée haute, il semble que les bactéries soient plus actives, peut-être parce que l'accès aux sels nutritifs est favorisé et/ou l'hydrolyse des substances HPM leur apporte une nouvelle ressource trophique et/ou enfin une substance sécrétée par les diatomées pendant la photosynthèse inhibait leur développement.



**Figure D.2** : schéma général des relations entre diatomées et bactéries pour différentes phase dans le biofilm, déduites à partir des résultats des différents suivis. Les monosaccharides précisés sont ceux définis par l'expérimentation en microscopie confocale à balayage laser et ne sont en aucun cas exclusifs. Les EPS sont constituées de nombreux oses variés comme il a pu l'être observé au cours d'études en GC-MS (Cf Annexe 1).

En conclusion, les interactions entre les diatomées et les bactéries *via* les EPS sont complexes et dépendent de nombreux facteurs. L'étude à différentes échelles apporte des éléments complémentaires qui permettent d'affiner les hypothèses. Il ressort qu'en conditions naturelles, l'impact des facteurs environnementaux est important, notamment la présence de prédateurs (top-down), ainsi que la limitation en sels nutritifs (bottom-up). Le couplage des diatomées et des bactéries évolue selon le cycle de la marée et l'âge du biofilm, certaines substances reflétant davantage un mauvais état des cellules algales (réserves internes notamment). L'utilisation de traceurs isotopiques pourrait être un bon complément aux études conduites ici, de même que la mise au point d'un substrat permettant l'analyse en microscopie confocale et la migration des diatomées. Ceci pourrait guider les études futures.

### *PERSPECTIVES*

---

Les différentes études menées au cours de ce travail de thèse se sont heurtées à de nombreuses difficultés techniques. La principale limite est de parvenir à quantifier les acteurs du biofilm et leurs activités en minimisant le plus possible les modifications du biofilm (structure et chimie).

Concernant les suivis *in situ* (chapitre I) les choix ont été faits avec comme objectifs de couvrir de façon fine une grande période de temps : un suivi horaire sur chacune des marées basses diurnes d'un cycle de marée complet, pour deux saisons. Cette résolution associée au grand nombre de paramètres mesurés ne permet pas de mettre en œuvre des mesures d'activité enzymatique ou de production bactérienne brute, dont la logistique est compliquée sur ce type de sédiment. L'utilisation d'isotopes stables (Bellinger et al. 2009) et des marqueurs des pigments et des lipides (Cook et al. 2004) sur les sédiments permettrait de voir à fine échelle la manière dont les EPS sont sécrétées par les diatomées puis assimilées par les bactéries en conservant la même échelle temporelle mais en réduisant le nombre de facteurs suivis.

Par ailleurs, il serait intéressant de comparer les données issues de ces suivis terrain avec des données provenant d'une expérimentation similaire, mais qui aurait été conduite sur une vasière ou les midis solaires seraient centrés sur les mortes eaux.

Lors du suivi en mésocosme, afin de simplifier la méthodologie, les triplicats ont été mélangés plutôt que traités séparément. En effet, la surface de vase nécessaire aurait alors été

trois fois supérieure, sur deux mésocosmes. Une étude à plus grande échelle et qui ciblerait des paramètres choisis, tels que les EPS, les abondances bactériennes, la production bactérienne et les activités enzymatiques, ainsi que la teneur en chl *a* permettrait de réduire la quantité de vase nécessaire à chaque prélèvement et de faire des réplicats. Il est possible là aussi d'utiliser des isotopes stables pour mieux identifier les compartiments concernés par l'assimilation de carbone tout au long de la marée basse.

Le suivi en microcosme a été compliqué par l'incapacité à trouver un substrat permettant à la fois de reproduire un cycle de marée (substrat qui resterait humide à marée basse), de reproduire la possibilité de migrer des microalgues (substrat poreux) et d'utiliser la microscopie confocale laser (absence de réflexion des lasers mais bonne pénétrance). Aussi, les EPS associées aux activités de migration des diatomées n'ont potentiellement pas été sécrétées de façon représentative des conditions *in situ*. Il est possible d'espérer que des développements futurs donnent naissance à des pastilles de type « pastilles de collagène » résistantes, et qui permettraient de reproduire la marée et les cycles internes de migration des diatomées. Il est alors possible d'imaginer étudier les sécrétions routinières d'EPS, mais aussi de valider quelles fractions sont davantage excrétées en cas de stress salin, thermique, ou lors d'une contamination bactérienne plus forte.

Afin d'affiner les connaissances sur les liens entre les bactéries et les diatomées, des expérimentations en cupules ont été imaginées pendant la thèse. Elles consisteraient à amender un milieu de culture avec chacune des quatre fractions d'EPS séparément, ou mélangées dans des proportions caractéristiques de certaines périodes du développement du biofilm (mise en place, croissance exponentielle, stress), en gardant un témoin avec un milieu de culture non amendé, et d'observer la manière dont les bactéries s'y développent par des mesures d'abondances et de production. Il est également possible de suivre l'évolution des compositions en EPS dans chacune des cupules, notamment pour valider l'appartenance de molécules BPM à mesure que les teneurs en molécules HPM diminuent. Ces fractions d'EPS seraient extraites de cultures de diatomées isolées à partir du sédiment. Ainsi, il sera possible de déceler si les EPS des différentes souches de diatomées ont les mêmes effets sur le compartiment bactérien.

En complément de cette dernière expérience, il est possible d'analyser la co-localisation des EPS (unités saccharidiques) et des bactéries à partir des expériences conduites en microscopie confocale et grâce au logiciel Phlip. Ceci semblerait également pertinent dans le cas où un substrat idéal aurait été créé pour réaliser une étude réaliste en microscopie confocale.





## **ANNEXES**

---





## ANNEXE 1

*Biochemical composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS)  
produced during microphytobenthic biofilm development on an intertidal  
mudflat of a macrotidal bay.*

Guillaume Pierre <sup>1</sup>, Marianne Graber <sup>1</sup>, Beby Alibay Rafiliposon<sup>1</sup>, Christine Dupuy <sup>1</sup>, Francis Orvain <sup>2</sup>, Margot De Crignis <sup>1,2</sup>, Thierry Maugard <sup>1,\*</sup>

(1) UMR 6250 CNRS - ULR LIENSs. Université de La Rochelle, UFR Sciences, Batiment Marie Curie, avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

(2) UMR 100 IFREMER - UCBN LBBM. Université de Caen Basse-Normandie, esplanade de la Paix, 14032 Caen, France.

\* Tel: (33) 5 46 45 82 77      Fax: (33) 5 46 45 82 65      E-mail: thierry.maugard@univ-lr.fr

**Abstract**

The main goal of this work was to study biotic and abiotic parameters and their interactions in the production and biochemical composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) excreted in a European intertidal mudflat (Marennes-Oléron Bay, France). Microphytobenthic biomass and bacteria abundance were surveyed during three consecutive emersion periods to characterize EPS production and explain the variability in their compositions during the development of a microphytobenthic biofilm. Experiments were performed to evaluate *in situ* the relevance and the effectiveness of a recent extraction procedure using a cation exchange resin to separate precisely different fractions of EPS and especially pure bound EPS, without contamination by residual and intracellular polymers.

Various colorimetric assays, coupled to biochemical chromatographic analysis were used to characterize the three main fractions of EPS extracted: colloidal, bound and residual. The monosaccharide distribution of the fractions highlighted the role of colloidal EPS as a carbon source for the microorganisms present on the surface of the sediment (>50% of

glucose). Bound EPS were composed of specific carbohydrates (20 to 30% rhamnose, 25% xylose) which are known to be involved in many physico-chemical processes like the stabilization of the sediment. Residual fractions, containing refractory bound EPS and other internal polymeric substances, were composed of various carbohydrates. The high ratio of glucose in these fractions is interesting as it was once attributed to colloidal sugars due to poor extraction procedures. Avoiding the contamination of each step extraction, the resin-method allowed determining more accurately and properly the biochemical composition of all *in situ* fractions. Thus, it has been observed that the tidal exposure periods had an influence on the type of carbohydrates produced (rhamnose, uronic acids) and their amounts. The quantity of rhamnose in the bound fractions increased during the emerged periods (21 to 37%). The glucose content in residual fractions also increased between one and four hours of emersion (18 to 59%). Finally, the presence of inositol (*-myo*) is significant since no author has highlighted it, knowing that inositol is a major growth factor for heterotrophic bacteria.

**Key words:** extracellular compounds, EPS, biochemical characterization, biofilm, benthic ecology, intertidal mudflat, microphytobenthos, diatoms, dowex, in situ quantification

## INTRODUCTION

Tidal flats are an essential system within the trophic network and contribute greatly to the productivity of coastal ecosystems. The high primary and secondary productivity of mudflats is linked to physical and biological processes involving unicellular micro-organisms. The development of conceptual models for these highlighted the role of (i) diatoms (Guarini *et al.* 2000) and (ii) bacteria in the sediment mudflats (Bellinger *et al.* 2009, Hofmann *et al.* 2009). More generally, regarding biomass and production, it is known, that microphytobenthos is a major component of these intertidal sediment communities (Admiraal 1984, Underwood *et al.* 1995, Underwood & Kromkamp 1999, Thornton *et al.* 2002).

(i) Diatoms have been described in several recent studies which showed that they were closely involved in the formation of biofilms (Falciatore *et al.* 2000, Stoodley *et al.* 2002, Patil & Anil 2005) and more generally in the marine ecosystem (Decho 2000, de Brouwer & Stal 2003, Bellinger *et al.* 2005). Indeed, most organic matter in the sea is generated by marine diatoms (Armbrust 2009) and they are essential for the health of the marine environment through the excretion of large quantities of Extracellular Polymeric Substances (EPS), which are involved in particular in the mobility system of photosynthetic organisms. In intertidal ecosystems, this mobility is essential to enable diatoms to migrate into the photic

zone of the sediment during the time of emersion (Underwood *et al.* 2004). In addition, previous research has shown that EPS can be used as a carbon source by the bacterial community and the macrofauna (van Duyl *et al.* 1999, Hanlon *et al.* 2006, Bellinger *et al.* 2009). EPS also affect the microenvironment of biofilms by varying physico-chemical parameters like porosity, density, sorption properties, hydrophobicity and mechanical stability (Flemming & Wingender 2002, Flemming *et al.* 2007). Thus, the composition of EPS is clearly linked to the erosion of sediments, either increasing their stability (Paterson & Black 1999) or decreasing stability in case of nutrient stress during stationary phase (Orvain *et al.* 2003).

(ii) On the other hand, the role of bacteria involved in the formation of marine biofilms and associated with the production of bacterial EPS is less well known (O'Toole *et al.* 2000, Tolker-Nielsen & Moblin 2000, Stoodley *et al.* 2002, Hall-Stoodley *et al.* 2004). Still, recent works have tried to gather information from the last few decades on microbial community structure and its functional implications, including behavior patterns in the formation of biofilms (Sutherland 2001, Fuhrman 2009). According to Joualt *et al.* (2001), many novel structures of bacterial EPS are produced by specific marine microorganisms in different types of extreme habitat (Sutherland 1996). Flemming *et al.* (2007), who suggested that biofilms can be called “the city of microbes”, explain that bacterial EPS are an integral part of the EPS matrix, like microalgae EPS. This “house of the biofilm cells” is produced by the microphytobenthic community, mostly composed of epipellic diatoms (Cariou-Le Gall *et al.* 1995), bacteria (Decho 2000) and eukaryotic microbes (Flemming 2007). Consequently, understanding EPS production in marine biofilms in general would be a significant step toward an understanding of the trophic web and the physical environment affected by this complex matrix (Underwood & Paterson 2003).

According to Wingender *et al.* (1999), the EPS matrix is composed of a wide variety of proteins, polysaccharides, lipids and other more surprising compounds such as nucleic acids. This very specific composition makes biochemical analysis particularly difficult due to the diversity in sugar monomers, linkages, low concentrations and the interactions of compounds during assays. Besides, the extraction of EPS is another challenge partly because of the location of EPS in biofilms. Indeed, the main components of a biofilm are water, diatoms and bacteria, EPS and inorganic particles (Denkhaus *et al.* 2007). Thus, extraction and separation methods have to be selected in term of the compounds to be extracted while controlling what happens to other compounds; minimal cell lysis and no disruption or alteration of the EPS are basic requirements (Denkhaus *et al.* 2007). In this way, Takahashi *et*

*al.* (2009) clearly demonstrated that extraction of colloidal and bound EPS with a cation exchange resin was the best method to obtain high yield of carbohydrates and a proper extraction without causing cell disruption or contamination by internal storages.

Benthic biofilms produce various types of EPS, which vary in composition and structure (Staats *et al.* 1999, de Brouwer & Stal 2001, Underwood *et al.* 2004). It has been demonstrated that the EPS can be separated into two major types: Low Molecular Weight (LMW) and High Molecular Weight (HMW). Moreover, extraction protocols can distinguish a range of other types, depending on the nature of the extraction and the location of the EPS in the sediment (Azerado *et al.* 2003, Comte *et al.* 2006) such as: (i) colloidal fractions corresponding to the polymeric substances excreted in the medium, (ii) bound fractions which are the compounds surrounding the cells (that should be associated to cell adhesion and/or protection) and (iii) residual fractions, corresponding to the internal polymers and refractory bound EPS (Takahashi *et al.* 2009).

The aim of the present investigation was to use for a first time *in situ* an improved extraction method involving a cation exchange resin to better characterize the EPS secreted by a benthic biofilm and especially those linked to diatoms. The three fractions of EPS were extracted from intertidal sediments (Marennes-Oléron Bay, France), diatom-dominated (Orvain *et al.* 2003, Haubois 2005, Herlory 2005), during three consecutive diurnal emersion periods. The main goal of the study was to understand, through biochemical analysis of these fractions (composition, ratio and structure), the effect of EPS (type, concentration) on the properties of biofilms and their interactions with micro-community of biofilms in an intertidal mudflat ecosystem, depending on biotic and abiotic parameters.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *Intertidal mudflat samples*

The mudflat samples used in this study were collected from Marennes-Oléron Bay (Atlantic Coast of France), during one week in February 2008 (winter) at low tide (Fig. 1). The field sampling was organized as a chessboard where we defined square sampling units (2m-side) separated by alleys (2m in width). Every day, 3 squares were randomly taken to account for spatial heterogeneity. Three cores were sampled within each square every hour during the emersion period, for 3 consecutive days. Sediment samples from each square were collected by using core diameter of 20 cm. For each core, the top 1cm was collected three times and pooled. After each sampling, sediment was brought back on from the field by using

a watercraft for an immediate EPS extraction on fresh sediments on the upper shore. Biochemical analyses were performed in triplicate on the colloidal, bound and residual fractions (216 fractions).

#### *Environmental parameters*

Light was measured using a Li-Cor sensor which was recorded every minute during sampling days. Enumeration of bacteria: to separate bacteria from sediment particles, incubation in pyrophosphate (0.01 M for at least 30 min) and sonication (60 W) were performed. Bacteria from both sediment were labeled using 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) ( $2500 \mu\text{g l}^{-1}$ ), filtered onto 0.2  $\mu\text{m}$  Nucleopore black filter (Porter & Feig 1980) and then counted by microscopy (x 1000, Axioskop, Zeiss). The chlorophyll *a* concentration in the sediment was measured using fluorometry method (Lorenzen 1966).

#### *Materials*

Dowex Marathon C, BicinChoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit, Azure A, N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide: trimethylchlorosilane (BSTFA: TMCS) (99: 1) were obtained from Sigma-Aldrich. Standard carbohydrates (dextran, dextran sulfate, heparin, fucoidan, glucose, galactose, rhamnose, fucose, fructose, xylose, arabinose, mannose, myo-inositol, glucuronic and galacturonic acid) and a protein standard (Bovine Serum Albumin, BSA) were obtained from Sigma-Aldrich. The DB-1701 J&W Scientific column (30m, 0.32mm, 1 $\mu\text{m}$ ) for Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis (GC/MS) was obtained from Agilent.

#### *EPS Extraction in situ*

The extraction was done immediately after sampling and sediment mixing (Takahashi *et al.* 2009). 20 mL of fresh mudflat was mixed with 20mL of Artificial Sea Water (ASW 30 Practical Salinity Units) during 1 hour in darkness at 4°C and then centrifuged at 3500g and 4°C for 10 minutes. The supernatant (a) containing colloidal EPS was collected and stored at 4°C. 20 mL of ASW and 1g of activated Dowex (Marathon C, activated in Phosphate Buffer Saline for 1 hour in the dark) was added to the cap (b). The samples were mixed gently at 4°C for 1 hour in the dark and then centrifuged at 3500g and 4°C for 10 minutes. A supernatant containing the bound EPS (c) and a cap containing intracellular and residual polymers (d) were obtained. The cap was then frozen. The residual polymers were extracted from the frozen samples, by sonication at 100W for 3 minutes on ice after resuspension in 20 mL in ASW.

For each fraction (colloidal, bound and residual polymers), absolute ethanol at  $-20^{\circ}\text{C}$  was added to the sample (a) to obtain a final ethanol concentration of 75% (v/v). The solution was gently mixed and stored overnight at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The solution was then centrifuged at 3500g and  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 minutes to obtain a supernatant (Low Molecular Weight, LMW fraction) and a cap (High Molecular Weight, HMW fraction). Finally, the fractions were dried under air flow and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### *Biochemical analysis of EPS and carbohydrate fractions*

Total sugar content was determined using the phenol-sulfuric acid assay, developed by Dubois, using glucose as a standard (Dubois *et al.* 1956). Briefly, 1mL of 5% phenol and 5mL sulfuric acid were added to 1mL EPS solution, previously resuspended in ultra-pure water, and vortexed. Measurements were read after 30min with a spectrophotometer at 485nm.

Protein content was determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay, using bovine serum albumin (BSA) as a standard (Smith *et al.* 1985). Briefly, 0.2mL EPS, previously resuspended in ultra-pure water, were added to 2mL BCA active reagent, and gently vortexed. Measurements were read after 15min of heating at  $60^{\circ}\text{C}$ , with a spectrophotometer at 562nm.

Uronic acid content was determined using the meta-hydroxydiphenyl method (MHDP), using galacturonic and glucuronic acids as standards (Blumenkrantz & Asboe-Hansen 1973, Filisetti-Cozzi & Carpita 1991). Briefly, 40 $\mu\text{L}$  of 4M sulfamic acid and 2.4mL of 0.075M sodium tetraborate were added to 400 $\mu\text{L}$  of EPS, previously resuspended in ultra-pure water, and gently vortexed. 80 $\mu\text{L}$  of 0.15% MHDP were added to the solution after 20 min of heating at  $80^{\circ}\text{C}$ . Sample was strongly vortexed and allowed to rest 10 minutes. Measurements were read with a spectrophotometer at 525nm.

The sulfate content was measured by the Azure A (Jaques *et al.* 1968) and the Ba/Cl<sub>2</sub> gelation method (Craigie *et al.* 1984), using Dextran sulfate as a standard. Concerning the Azure A assay, 2mL of 10mg/L Azure A were added to 200 $\mu\text{L}$  EPS, previously resuspended in ultra-pure water, and gently vortexed. Measurements were read with a spectrophotometer at 535nm. Concerning the Ba/Cl<sub>2</sub> gelation assay, 10mg EPS were hydrolyzed in 0.5mL of 2M HCl, during 2h at  $100^{\circ}\text{C}$ . Ultra-pure water was added (qsp 10mL) then the sample was centrifuged during 10min at 5000g. For the turbidimetric assay, 1mL supernatant, 9mL ultra-pure water, 1mL of 0.5N HCl and 0.5mL of Ba/Cl<sub>2</sub> – gelatin reagent were added in a glass tube. After 30min resting at room temperature, measurements were read with a spectrophotometer at 500nm.

---

*Characterization of carbohydrate fractions by GC/MS*

Prior to carbohydrate characterization by GC/MS, EPS fractions were solubilized in 5 mL of ultra-pure water, dialyzed (6-8KDa) and freeze-dried (Bellinger *et al.* 2005). EPS were then dissolved in 2M HCl at 50mg/mL and heated at 90°C for 4 hours. The preparation (which contained mostly carbohydrates monomers) was then freeze-dried and stored at -20°C. Analysis of the carbohydrate fractions were carried out by GC/MS using a Varian CP-3800 GC/Varian Saturn 2000 (Fig. 2). 400µL of pyridine and 400µL of BSTFA: TMCS (99:1) was added to 2mg of purified polysaccharides. The solution was mixed for 2 hours at room temperature, then injected into a DB-1701 J&W Scientific column (30m, 0.32mm, 1µm) at a flow of 1mL/min. The helium pressure was 8.8psi. The temperature of the injector was set at 250°C. The rise in temperature in the oven was programmed for a first step at 150°C for 0min, then an increment of 10°C/min up to 200°C with a final step at 200°C for 35min. The ionization was performed by Electronic Impact (EI, 70eV), the trap temperature was set at 150°C and the target ion was fixed at 40-650 m/z.

*Statistical analysis*

One-way analysis of variance (ANOVA) was used to test for variation in carbohydrates and uronic acids productions among abiotic parameters (sampling location, sampling day, emersion time). The Levenne test was used for post hoc comparisons. Pearson correlations were performed to investigate the relationships between the different EPS fractions with biotic parameters (bacterial density, luminosity). To compare mean of variables, the t tests were performed. Statistical analyses were run using the statistical software XLStat (Addinsoft).

**RESULTS***Environmental parameters*

Measures of chlorophyll *a* remained constant during the sampling period, with values around 23µg/g of dw sediment (Fig. 2E). Profile micro-scales and Pulse Amplitude Modulated (PAM) Fluorimetry experiments showed a resumption of photosynthetic activity and a strong biomass increase at the surface, confirming the presence of a biofilm and the beginning of its formation (data not shown). The sediment was more rich in bacteria during the day 2/19/08 (around  $5e^{+9}$  cells/g dw sediment). The day 2/18/08 showed the lowest



quantities of bacteria ( $1e^{+9}$  cells/g dw sediment) and a large decrease in the amount of bacteria was observed during the 2/20/08 ( $5e^{+9}$  to  $2.5e^{+9}$  cells/g dw sediment). Light measurements showed the higher brightness during the first day of sampling ( $1000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) (Fig. 2D). The most important brightness peaks were obtained for the other days around 12-14h ( $600$  to  $800 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ).

### *Colloidal fractions*

#### Carbohydrate content

Total sugar amounts for the LMW and HMW colloidal fractions were measured and normalized to Chlorophyll *a* (Chl *a*). This normalization classically used in the literature, overestimates diatom EPS production, regardless the contamination from other sediment EPS sources. Besides, this approach is close to the environmental conditions since the Marennes-Oléron mudflat is mainly composed of microphytobenthos and especially epipellic diatoms (Haubois *et al.* 2004). The results obtained are presented in Figure 2A. The fractions have relatively similar profiles: the quantities of total carbohydrates (LMW and HMW), on average, were close to  $6.5 \mu\text{g sugar}.\mu\text{g chlo } a^{-1}$ . However, some significant differences in quantities related to the sampling site were found (standard deviations, Fig. 2A). The results show that the amounts of LMW total sugars remained constant around  $3.5 \mu\text{g sugar}.\mu\text{g chlo } a^{-1}$  during the sampling campaign (except for 2/20/08-4h, with a concentration close to  $5.5 \mu\text{g sugar}.\mu\text{g chlo } a^{-1}$ ). HMW total sugar quantities were slightly lower ( $3 \mu\text{g sugar}.\mu\text{g chlo } a^{-1}$  on average, with an increase for 2/20/08-4h to  $5 \mu\text{g sugar}.\mu\text{g chlo } a^{-1}$ ). In addition, the amount of carbohydrates measured in the colloidal fractions was seven times lower than those measured in the residual fractions (Fig. 2C).

Uronic acid amounts were measured for the LMW and HMW colloidal fractions and were normalized to Chl *a*. The results were compared to the total carbohydrate quantities measured in these fractions (Fig. 3A). In view of the results obtained, uronic acid quantities appear to be proportionally higher in LMW carbohydrates ( $\pm 21\%$ ) than in HMW carbohydrates ( $\pm 10.5\%$ ). On the whole, the levels of LMW uronic acids did not change during the emerged periods ( $\pm 22\%$  to  $\pm 20\%$ ). In contrast, HMW uronic acid levels decreased slightly between 1h and 4h of emersion time ( $\pm 12\%$  to  $\pm 7.5\%$ ).

The results of GC/MS analysis are shown in Figure 4A. The LMW fractions contained about  $\pm 23\%$  uronic acids (80% galacturonic acid and 20% glucuronic acid). These levels confirm the results obtained and described above by colorimetric assays. The LMW colloidal fractions contained more than 50% glucose but also 5% rhamnose, 10% xylose and 7%

inositol (as myo-inositol). Some specific patterns can be highlighted for certain monosaccharides. The percentage of rhamnose increased during the emerged periods (0 to 6.75%), like glucose (50% to 57%). In contrast, the percentage of mannose and xylose decreased slightly during the four hours of emersion (12% to 8.25% and 5% to 1% respectively). For the HMW fractions, the percentage of uronic acids was lower than in the LMW fractions and decreased during the emerged periods (12% to 7.7%). The percentage of glucose also decreased in the LWM fractions (57.7% to 49.9%). The quantity of inositol, xylose and mannose increased slightly throughout the emersion. The HMW colloidal fractions did not contain rhamnose.

LMW and HMW carbohydrates seem to have been produced in the same proportion during the emerged periods (Fig. 6A). The LMW carbohydrates were slightly more abundant than the HMW carbohydrates. Furthermore, it seems that LMW uronic acids were more abundant ( $\pm 75\%$ ) than HMW uronic acids ( $\pm 25\%$ ) in the colloidal fractions. It is interesting to note that uronic acids seem to be produced in the same quantities throughout the sampling campaign, if one takes proper account of standard deviations.

#### Sulfate & Protein contents.

No sulfated groups were detected in the LMW and HMW colloidal fractions. Very low quantities of proteins were found in the LMW and HMW colloidal fractions. The BCA method used for the analysis was not accurate enough, thus considering these concentrations close to zero.

#### *Bound fractions*

##### Carbohydrate content

The total carbohydrate amounts for the LMW and HMW bound fractions were measured and normalized to Chl *a* (Fig. 2B). For the LMW fractions, a test of the repeatability between each sampling site revealed some differences between them. The LMW total sugar quantities tended to increase during the emerged phase. This trend was especially pronounced for the period 2/20/08 1h-4h when the quantity nearly doubled (6  $\mu\text{g}$  to 13  $\mu\text{g}$  sugar. $\mu\text{g}$  chlo  $a^{-1}$ ). For the HMW fractions, the repeatability between the sampling sites was relatively good. It is interesting to note that HMW carbohydrate amounts remained constant at small quantities throughout the emerged phase (0.8-1  $\mu\text{g}$  sugar. $\mu\text{g}$  chlo  $a^{-1}$ ). The bound carbohydrates quantities were low compared to that of residual carbohydrates (Fig. 2C).

Uronic acid amounts for the LMW and HMW bound fractions were measured and normalized to Chl *a* (Fig. 3B). These quantities were compared to the total amount of carbohydrates in these fractions. At first sight, it appeared that uronic acid quantities in the bound fractions were a bit different to that found in colloidal fractions. The LMW and HMW fractions contained about  $\pm 15\%$  and  $16\%$  of uronic acids respectively. The LMW uronic acid levels for 2/20/08 fell from  $15\%$  to  $6\%$  after four hours of emersion. However, the percentage of uronic acids for day 2/19/08 did not show the same trend. For the HMW fractions, uronic acid levels remained constant throughout the emerged periods ( $\pm 18\%$ ).

The monosaccharide composition of the LMW and HMW bound fractions was measured and is shown in Figure 4B. One example of a spectrum analysis is presented in Figure 5. First, a totally different distribution was found compared to colloidal fractions. The LMW bound fractions were rich in rhamnose ( $20.8\%$  to  $32.9\%$  during the emerged periods), xylose ( $\pm 24\%$ ), glucose ( $\pm 21\%$ ) and galacturonic acid. Small amounts of arabinose and mannose were also detected in the LMW bound fractions. Concerning rhamnose and galacturonic acid, we can see that the level of rhamnose greatly increased during the emerged periods. In contrast, the percentage of galacturonic acid ratios decreased significantly between the first and last hour of emersion ( $16\%$  to  $6.5\%$ ). For the HMW fractions, rhamnose represented about  $35\%$  of the total carbohydrates. The percentage of xylose was similar to that of xylose found in the LMW bound fractions ( $\pm 25\%$ ). However, the percentage of glucose was lower, with some values close to  $12\text{-}13\%$ . Finally, the percentage of galacturonic acid remained constant at around  $16\%$  during the emersion.

The change in distribution of total carbohydrates and uronic acid between LMW and HMW in the bound fractions is presented in Figure 6. On the whole, the first observation to be made concerns the significant difference in profile between the colloidal and bound fractions. For the bound fractions, the carbohydrates were produced in very precise quantities as indicated by the low standard deviation between the different sampling sites. The bound carbohydrates seem to be produced at a constant ratio of  $90/10$ : LMW/HMW, compared with  $55/45$  for the colloidal fractions. The results for LMW/HMW uronic acids showed that  $85\%$  of the total uronic acids were found in the LMW fractions and  $25\%$  in the HMW fractions. This ratio was relatively close (slightly higher) to the ratio obtained for uronic acids found in the colloidal fractions.

#### Sulfate & Protein contents

No sulfated groups were detected in the LMW and HMW colloidal fractions. Very low concentrations of proteins were found in the LMW and HMW colloidal fractions. The BCA method used for analysis was not accurate enough, thus considering these concentrations close to zero.

### **Residual fractions**

#### Carbohydrate content

The total neutral sugar amounts for the LMW and HMW residual fractions were measured and normalized to Chl *a* (Fig. 2C). Firstly, there was a good level of repeatability for the LMW fractions between the sampling sites. It is difficult to highlight a particular trend, except a stagnation of LMW carbohydrate amounts (around 20  $\mu\text{g sugar} \cdot \mu\text{g chlo } a^{-1}$ ). Nevertheless, based on this Figure, it would appear that the quantities seem to increase during the emerged periods (but to a limited extent). On the other hand, the pattern for HMW carbohydrate quantities in the residual fractions was different, at higher concentrations (30 to 75  $\mu\text{g sugar} \cdot \mu\text{g chlo } a^{-1}$ ). The amounts were found to increase significantly during the emersion of the sediment. Although the disparities between sampling sites are significant, the same profiles were observed for the 3 days. Overall, the carbohydrate amounts measured in the residual fractions contrast markedly with the carbohydrate quantities of the colloidal or bound fractions presented in Figures 2A and 2B.

Uronic acid amounts for the LMW and HMW residual fractions were measured and normalized to Chl *a* (Fig. 3C). These quantities were compared to the total carbohydrate amounts found in the LMW and HMW fractions. So, the total carbohydrate levels found in the LMW fractions were composed of approximately 15% uronic acids. This did not appear to change during the analysis period. However, some samples had higher levels of uronic acids, of up to 20% (2/19/08-1h). For the total carbohydrate levels found in the HMW fractions, the samples contained more uronic acids, reaching 33% in some cases (day 2/19/08 is the most representative of this observation). More generally, uronic acid levels in these fractions varied between 21% and 27%.

The monosaccharide composition of the LMW and HMW residual fractions was measured and the results are shown in Figure 4C. As we previously observed, the monosaccharide composition of these fractions is totally original and specific compared to those observed in the two other fractions. The concentration of each monosaccharide varied widely during the emerged periods, making it difficult to define a typical composition. For the LMW fractions, the amount of rhamnose was relatively constant during the first hours of

emersion ( $\pm 10\%$ ) and decreased drastically to 1% during the last hour. A similar observation can be made for the percentage of xylose in these fractions (10% to 0.7%). Conversely, the percentage of mannose, inositol and galacturonic acid remained constant during the emersion (27%, 7% and 18% respectively). In addition, the percentage of glucose followed an amazing trend during the emerged periods, decreasing slightly during the first three hours of emersion (18% to 12%) and dramatically increasing during the last hour to a level close to 43% or almost half of the total monosaccharides. Similar observations were made for the HMW fractions, particularly regarding the changing levels of rhamnose (11 to 5%) and glucose (31 to 13% during the first three hours then an increase to 59% during the 4<sup>th</sup>). Xylose levels slowly increased (4 to 6.5%), whereas mannose was not detected in these fractions and galactose and inositol levels were relatively constant (4.5 and 8% respectively). Furthermore, galacturonic acid levels decreased significantly during the emerged periods and dropped from 32% to 14%. Finally, the increase in the levels of unknown peaks suggests that the LMW and HMW residual fractions are really complex.

The trends in term of total carbohydrates and uronic acids in the residual LMW/HMW fractions are presented in Figure 6C. The first observations show that the residual fractions were essentially composed of HMW compounds (60-70% for total carbohydrates, 60-80% for uronic acids). On the whole, total carbohydrates levels in LMW/HMW did not follow any particular trend. Uronic acids levels slowly decreased during the emerged periods: 82 to 78% during 2/18/09, 72 to 68% during 2/19/08 and 85 to 60% during 2/20/08.

#### Sulfate & Protein contents

Sulfated components were detected in the HMW residual fractions (Fig. 7A). These amounts were relatively constant during days 2/18/08-2/19/08 and slowly increased during 2/20/08 (8 to 14  $\mu\text{g sugar} \cdot \mu\text{g chl } a^{-1}$ ). However, these data should be interpreted with precaution in view of the significant deviations obtained between the different sampling sites. Protein concentrations were measured in the LMW and HMW residual fractions and the results normalized to Chl *a* (Fig. 7B). Concerning the LMW fractions, the quantities of proteins remained constant around 8  $\mu\text{g}$  throughout the emersion. Some samples showed specific amounts patterns, especially for day 2/20/08, which highlighted a slight decrease during the four hours of emersion though the significant deviations (11 to 6  $\mu\text{g}$ ). For the HMW protein quantities tended to increase during the emersion of the sediment (9 to 14  $\mu\text{g}$  for 2/18/08 and 9 to 22  $\mu\text{g}$  for 2/20/08). This trend was less evident for 2/19/08, in part because of point 2/19/08-1h (significant deviation). On the whole, the protein amounts increased slightly

during 2/18/08, remained constant during 2/19/08 and decreased slightly or increased significantly during 2/20/08, both for the LMW and HMW fractions respectively.

## DISCUSSION

The present investigation focused on EPS and other carbohydrate-rich exudates produced in the sediment of Marennes-Oléron, particularly in relation to the environmental and ecological conditions of the system studied. Indeed, a wide variety of roles have been attributed to EPS: trophic carbon sources for bacteria, meio- and macro- fauna (van Duyl *et al.* 1999, Goto *et al.* 2001); formation of cohesive and chemical bonds (solutes transport); role in sediment dynamics (Paterson and Black 1999, Herlory 2005); role of buffer against changes in environmental conditions or selective pressure, thanks to the formation of a complex matrix (Roger 2002). EPS are produced by the micro consortia occupying the benthic niche: bacteria and microphytobenthos. Overall, many studies have shown that microphytobenthos and especially diatoms are responsible for 40 to 60% of the total global primary production in marine systems (Smith & Underwood 2000). So, bacterial and photo-assimilated carbon is released in different quantities into the environment, according to the needs of diatoms in terms of their endogenous rhythms of migration. Thus, EPS production is dependent on the physiological status of the different communities and their metabolic needs, all governed by the environmental conditions (light, temperature, humidity and weather).

### *EPS Production*

Overall, regardless of the sampling location (no significant correlation was found by the Levene test), 1g of dry sediment was composed of about 1600 to 1900  $\mu\text{g}$  of total carbohydrates and about 300 to 600  $\mu\text{g}$  of total proteins, without normalization to Chl *a* (Fig. 2, 3, 7). Although a large portion was unknown, authors have considered that natural mudflats samples may contain large quantities of impurities (de Brouwer *et al.* 2001, Underwood & Paterson 2003) and it has been proved that the phenol sulfuric acid assay was not 100% efficient at measuring complex polysaccharides, causing an underestimation of the total quantities of EPS (Hofmann *et al.* 2009). Considering anterior results obtained at the same station in 1998 with a different extraction procedure, approximately 700 to 1100 $\mu\text{g}$  of carbohydrates for 1 gram of sediment (Stal & Défarge 2005), our results were relatively close. This was especially true since the authors have worked on the first 5mm of sediment, which represent more accurately the microphytobenthos biofilm. Our approach (first 10mm) could overestimate diatom EPS production due to the contamination from other sediment EPS

sources (Perkins *et al.* 2003). Given this context, an increasing density of the gastropod *Hydrobia ulvae* (2000 individual.m<sup>-2</sup> to >10000 ind.m<sup>-2</sup>), a biofilm consumer and a mucus producer was observed during the sampling campaign (data not shown). Studying a possible impact of this gastropod on the production of other EPS sources, a negative extraction control was performed on burned sediment (4h at 450°C) without microphytobenthos where these aquatic gastropod mollusks (at increasing density) had bioturbated during 24h. The results showed a significant increase of carbohydrates in the HMW bound fractions (data not shown). Thus, differences in carbohydrates amounts could come from this gastropod, also involving a probable difference in the biochemical compositions of HMW bound carbohydrates, comparing to previous studies (Bellinger *et al.* 2009).

Colloidal carbohydrates were consistently produced during the three days of analysis (Fig. 2A) and no significant correlation was found between HMW and LMW colloidal carbohydrates production and the sampling day (p values [5%] = 0.447 and 0.471 reciprocally). The variations in HMW (p values for days 2/18-19-20/08 [5%] = 0.425, 0.196 and 0.409 reciprocally) and LMW (p values for days 2/18-19-20/08 [5%] = 0.281, 0.345 and 0.0138 reciprocally) colloidal concentrations did not follow a particular trend during the emerged periods, in contrast to the results obtained by Taylor *et al.* (1999). Indeed, these authors observed an increase in colloidal carbohydrate levels towards the end of the emerged periods, when epipelagic diatoms begin to migrate again into the sediment. It is important to note that the authors had worked on colloidal EPS fractions which in fact contained EPS and internal polymers cause of the extraction procedure they employed through the use of frozen and lyophilized sediment. However, a slight increase was observed during 2/20/08 and would appear to confirm these results. In contrast, recent studies have highlighted the decrease of LMW colloidal carbohydrates during emerged periods, in general related to their consumption by heterotrophic bacteria (Hofmann *et al.* 2009). Sometimes, an increase of LMW colloidal carbohydrates was observed and was related to the degradation of HMW polymers by extracellular enzymes from bacteria, resulting in a drop of HMW carbohydrate amounts (Hanlon *et al.* 2006, Bellinger *et al.* 2009, Hofmann *et al.* 2009). LMW and HMW colloidal carbohydrates production have been found to be significantly different (p value [5%] = 0.003) and the ratio between LMW and HMW colloidal EPS was constant during the short-term sampling campaign (Fig. 2A, 6A). The same observations were made for uronic acids production since a significant difference was found between LMW and HMW uronic acids production (p value [5%] < 0.0001). Uronic acids composing the colloidal fractions were mainly of LMW (>70%) (Fig. 3A, 6A); the result not being surprising since various authors

have shown that uronic acids were a significant component of EPS fractions and LMW colloidal fractions (Underwood *et al.* 1995, Hanlon *et al.* 2006).

In contrast to previous studies which not correlated bound EPS content with chl *a* and explained the need to understand the biochemistry and physical nature of these fractions, the present investigation allowed for a first time to study properly *in situ* bound EPS, in particular to link carbohydrate composition and the ability of bound EPS to become an integral part of biofilm matrix thanks to their physico-chemical properties (Chiovitti *et al.* 2003a, Abdullahi *et al.* 2006, Bellinger *et al.* 2009). LMW carbohydrate amounts strongly increased towards the end of the emerged period (p value for day 2/20/08 [5%] = 0.028) (Fig. 2B). In contrast, this pattern was not observed for the HMW carbohydrates (p value for day 2/18/08 [5%] = 0.033). These trends were more marked for day 2/20/08 and significant differences in bound LMW and HMW carbohydrates amounts (p value [5%] = 0.001 and 0.023 reciprocally) were found depending on the sampling day. These results are consistent with those obtained by a number of authors, who noted an increase in colloidal and bound carbohydrate amounts on the surface of intertidal sediments during the tidal exposure period (Smith & Underwood 1998, Taylor *et al.* 1999, Hanlon *et al.* 2006, Bellinger *et al.* 2009). LMW carbohydrates made up 90% of the bound fractions (p value [5%] < 0.0001) and this percentage was extremely constant throughout the sampling period (Fig. 6B). This high ratio of LMW carbohydrates could be attributed to the acidic properties of the Dowex which could hydrolyze HMW EPS during the extraction procedure, thus producing a superabundance of LMW carbohydrates. Cell-cell and cell-substratum interactions are facilitated by the production of tightly bound carbohydrates (Wustman *et al.* 1997, Chiovitti *et al.* 2003a), through the presence of specific sugars and uronic acids (Fig. 3B, 6B). Indeed, the anionic properties of EPS, conferred by uronic acids, allow association of divalent cations, providing greater binding forces in a developed biofilm (Sutherland 2001) and also increasing biostabilisation processes (Bellinger *et al.* 2009).

Residual fractions, composed of refractory bound EPS and mainly internal polymers, which contained EPS fractions of numerous authors, were rich in carbohydrates, exceeding six or seven times the colloidal and bound carbohydrate quantities (Fig. 2), with a higher percentage of HMW carbohydrates (60-70%). In contrast with previous works, the abundance in HMW (values for days 2/18-19-20/08 [5%] = 0.576, 0.976 and 0.057 reciprocally) and LMW (values for days 2/18-19-20/08 [5%] = 0.087, 0.722 and 0.206 reciprocally) carbohydrates did not increase during the daytime emersion period. We would have expected to find increasing carbohydrates amounts in these fractions, probably due to an increase of glucose content, a glucosyl unit forming the storage polymer of diatoms (glucans,



chrysolaminaran). Chrysolaminaran storage is a precursor of EPS synthesis (Underwood *et al.* 2004). Indeed, during light phases, the photoassimilated carbon could be stored in diatoms to provide energy during periods of darkness. Otherwise, the presence of proteins in large quantities (Fig. 7B) and sulfated groups (Fig. 7A) revealed the complex composition of residual fractions. This result was not really surprising considering previous results which showed the presence of proteins for additional C-stores or for structuring microalgae cells (glycoproteins) (Chiovitti *et al.* 2003b, Becker 2007, Bellinger *et al.* 2009; Takahashi *et al.* 2009). It is noteworthy that HMW protein concentrations tended to increase during the emerged periods, as HMW carbohydrate concentrations could do. Periodic tidal exposure is associated with rapid changes in the physical and chemical properties of the surface sediments (Christie *et al.* 2000). This overproduction of HMW proteins, linked to HMW carbohydrate concentrations, could be a response to prevent the end of the emerged period. The increase in HMW polymers (C-stores) could be a metabolic answer to provide the night phase and/or the immersion phase.

Generally, the rate of EPS production by diatom biofilms during tidal exposure periods is affected by endogenous rhythms, light levels and nutrient status (Underwood & Paterson 2003, Hanlon *et al.* 2006). Luminosity conditions (Fig. 2D) influence the production and build-up of carbohydrate fractions on the sediment surface (Underwood & Paterson 2003). However, the comparison between ambient light climate and carbohydrate concentrations did not reveal an impact of light on EPS production except for bound HMW carbohydrates ( $r = -0.444$ ,  $R^2 = 0.197$ ). In contrast, the amount of bacteria measured on the surface of the sediment seemed to provide evidence for a special relationship with this carbohydrate production (Fig. 2E). Bacteria abundance during day 2/20/08 decreased during the emerged period, a period during which there was a strong increase in bound LMW carbohydrates in the sediment. The results seemed to highlight a potential negative effect of bound EPS on bacterial division. Nevertheless, no significant correlation was found between bacteria and bound LMW carbohydrates ( $r = -0.21$ ,  $R^2 = 0.044$ ), bound HMW carbohydrates ( $r = 0.186$ ,  $R^2 = 0.035$ ) or more generally bound carbohydrates ( $r = -0.17$ ,  $R^2 = 0.029$ ). Considering the capacity of bacteria to consume LMW carbohydrates and especially hexose-rich polymers (Haynes *et al.* 2007, Hofmann *et al.* 2009, Bellinger *et al.* 2009), this increase of bound LMW carbohydrates could be due to a underconsumption of this potential carbon source by diverse assemblage of heterotrophic bacteria.

#### *Monosaccharide distribution of EPS*

Current literature concerning EPS and their involvement in aquatic systems clearly explained the need to better understand the dynamics of EPS production, especially in response to environmental conditions. The present investigation was designed to characterize the monosaccharides distribution of the different fractions extracted from the Marennes-Oléron mudflat. Based on the difficulties described by different authors concerning the chromatographic analysis of uronic acids (Li *et al.* 2007), detection by GC/MS was coupled to colorimetric assays (Fig. 3, 4). In general, uronic acid amounts always seemed to fell down during the emerged period, except for the LMW residual fractions (Fig. 3, 4). This decrease, depending on the emerged periods, could be linked to the physiological state of the biofilm and/or the extracellular matrix. Indeed, the biofilm at the surface of the sediment must be formed during the first phases of the emerged periods. This formation involves a lot of complex physiological, chemical and physical mechanisms where bacteria, diatoms and EPS interact. Uronic acids could participate in some of these phenomena through their abilities: to indirectly increase binding forces in a developed biofilm, to give a strong acidic character to the polymers or to vary the EPS solubility or to enhance the incorporation of water through the creation of specific hydrogen bounds (Sutherland 2001). Unfortunately, statistic tests failed to demonstrate a significant effect of the emersion time on uronic acids production and for each of the fractions. Only significant difference was observed between colloidal and bound uronic acids production (p value [5%] = 0.018).

Considering the low standard deviations found between our true replicates (>5%), it can be considered that the type of monosaccharides, their turn over and their amounts were controlled during short-term emerged periods by complex systems involving environmental conditions, sediment erosion or the transport and deposition cycle (Underwood & Paterson 2003). As it was already shown by Staats *et al.* (1999), the monosaccharide composition was heterogeneous between the different EPS fractions. Colloidal EPS were mainly composed of glucose, galacturonic acid, xylose and inositol. Bound EPS had a more balanced distribution of monosaccharide components: rhamnose, xylose, glucose and galacturonic acid. This observation contrasted with previous results which showed that attached EPS were mainly composed of glucose and allowed being optimistic on the relevance and effectiveness of the extraction procedure to properly separate colloidal and bound EPS, without contamination by residual polymers. Finally, residual fractions had a more heterogeneous composition which was, more difficult to analyze due to the presence of significant unknown peaks. They were composed of glucose, mannose, rhamnose, galactose and galacturonic acid. At this point, it is noteworthy to declare that it was surprising that fucose, a recurrent deoxy sugar found in the

literature, has not been highlighted although the GC-MS method allowed its detection. It was possible that the lack of fucose was linked to the environmental conditions, the physiological state of the microphytobenthic biofilm and the period of the sampling campaign (winter).

Given this context and previous results concerning monosaccharide composition, we proposed to compare our results to previous works which classically extracted different EPS: (colloidal EPS, colloidal extract (cEPS), EPS from hot water extraction (HW) and EPS from hot bicarbonate extraction (HB). Finally, we tried to adapt our results (Fig. 8) to the conceptual model of Underwood & Paterson (2003).

LMW colloidal fractions (Fig. 4, 6) could be compared to the low molecular weight exudates of Underwood & Paterson (2003), the colloidal fractions of Bellinger *et al.* (2009) or Hofmann *et al.* (2009). In the intertidal mudflat of Marennes-Oléron, these exudates were composed of 53% glucose, 16% galacturonic acid, 11% xylose and 8% inositol. These percentages were relatively close to those previously obtained even if a decrease in glucose content was not observed during the emerged periods, synonymous to an important consumption by heterotrophic bacteria. It was interesting to note that the percentages of other hexoses (xylose, mannose) decreased during the emerged periods, suggesting that they were may be more easily assimilated. Nonetheless, the levels of xylose and mannose could also be due to other physiological processes like the role of glycosidically bound mannose to enhance the assimilation of specific proteins or molecules in cells (Hieber *et al.* 1976).

The HMW colloidal fractions (Fig. 4, 6) could be compared to the category of colloidal EPS (Underwood & Paterson 2003) or cEPS of Abdullahi *et al.* (2006) and Hofmann *et al.* (2009). Carbohydrate content was mainly composed of glucose (55%), inositol (15%), xylose (11%) and galacturonic acid (12%). The percentage of glucose slowly decreased throughout the period, possibly due to a strong degradation of the HMW glucose polymers into more easily consumable LMW polymers by extracellular enzymes from diatoms and bacteria present in the matrix (Bellinger *et al.* 2009, Hofmann *et al.* 2009). The decrease in the percentage of galacturonic acid, which was generally visible in almost all fractions, showed their role in the process of the formation and maintenance of the biofilm through ion sequestration, negative charge and hydrophobicity. In contrast to Abdullahi *et al.* (2006), the level of mannose measured was substantially lower (3%).

The LMW bound fractions (Fig. 4, 6) were obtained for a first time properly, without contamination by residual polymers since less glucose was found in these fractions, comparing to HW fractions of Abdullahi *et al.* (2006) or Hanlon *et al.* (2006). Rhamnose (22%), xylose (22%), glucose (20%) and galacturonic acid (13%) were the main

carbohydrates. The Dowex-method allowed highlighting the presence of important levels of deoxy sugars in the fractions. Indeed, the percentage of rhamnose strongly increased during the emerged period, in contrast to the percentage of galacturonic acid, which decreased, and both xylose and glucose, which remained constant. In general, deoxy sugars can promote biostabilisation of sediments (Zhou *et al.* 1998, Giroldo *et al.* 2003) thanks to their surface active properties. They can also influence the hydrophobic character of EPS, by enhancing their adhesion to the sediment or by regulating salinity and desiccation phenomena through different retention rate of water at the surficial sediments (Spears *et al.* 2008). Rhamnose is also a component of the outer cell membrane of certain bacteria and can be specifically recognized by lectins, transmitting signals to the cell- interior and conferring specific properties. Given some of these properties, the increase in the percentage of rhamnose in this fraction could be linked to the role of these EPS, for example improving cell-cell interactions between bacteria, diatoms and thus involving them closely into the formation of the extracellular matrix and its biochemical short-term modifications in response to environmental conditions. Alternatively, rhamnose can play a role as a biochemical sensor to control this biological entity.

In the same way, the HMW bound fractions (Fig. 4, 6) were mainly composed of rhamnose (30%), xylose (28%), galacturonic acid (18%) and glucose (13%), which was very similar to that of the LMW bound fractions. Insoluble in ethanol, the monosaccharide composition was relatively stable even if a slight decrease in the percentage of xylose and uronic acids was observed.

The LMW and HMW residual fractions may correspond to intracellular and cell wall associated polymers but also consist of a mixture of different refractory EPS not totally extracted by the Dowex-method. Fractions could be compared to a part of HW and all HB fractions of Abdullahi *et al.* (2006) or Hanlon *et al.* (2006). The carbohydrate content was composed of glucose (18 to 43%), galacturonic acid (19%), mannose (18%), xylose (10%) and rhamnose (10%). The observations of many authors indicated that, these fractions were very complex, due to the presence of proteins and sulfated groups, and the different monosaccharides detected could be involved in the formation of structural polymers, glycolipids or proteoglycans (Mulloy 2005, Becker 2007). The important point to highlight was the slight decrease in the percentage of glucose during the first hours of emersion. However, towards the end of the emerged periods, the quantity of glucose doubled or tripled. This observation could be correlated to the capacity of the different organisms, in particular diatoms, to sense the end of emersion. This increase in glucose content could be a

physiological response of the organisms at the end of the emerged periods, storing a maximum amount of carbon for their metabolism (in a photoassimilated carbon store for diatoms) to survive during periods of darkness. This result was partly consistent with those obtained by previous authors who have shown that the relative abundance of glucose increased during a daytime emersion period (Hanlon *et al.* 2006). Overall, it was considered that the majority of the glucosyl units were components of the storage polymers chrysolaminaran, composed of (1→3)  $\beta$ -glucan chains (Underwood & Paterson 2003, Bellinger *et al.* 2009). Concerning the other sugars detected and their levels, the results were fairly close to those already observed in the literature. Nevertheless, the presence of inositol, which is usually found in cereals and fruits, was also interesting, given that no author has highlighted it. This molecule plays different and important roles as structural basis for a number of secondary messengers in eukaryotic cells, as a member of the vitamin B complex and mostly as a major growth factor for heterotrophic bacteria, implying that this sugar could be produced in the sediment, may be by diatoms, to promote the symbiotic phenomenon led to the formation of this particular benthic biofilm.

## CONCLUSION

The aim of this work was to study the effects of different environmental parameters on the production and composition of EPS produced on the intertidal mudflat of Marennes-Oléron Bay (France). This study used to show the complexity involved in collecting and separating the different types of EPS present and precisely located in the sediment. The results show that the production of EPS and their structures depends on the ecological, physical and chemical dynamics of the natural system studied. The biochemical nature of the three fractions collected confirmed certain results in this context. The quantities of EPS excreted in the Marennes-Oléron mudflat correspond to the quantities generally excreted in European mudflats. Differences in sugar composition, size and structure are the result of many complex mechanisms, particularly environmental changes such as emerged periods and light. Finally, this study only focused on one sampling campaign during winter. However, it was shown that the greatest variations in sediment dynamics resulted from seasonal changes, modifying the concentration, type and structure of EPS accordingly. So, it should be interesting to check if these variations could be observed in the Marennes-Oléron mudflat during another sampling campaign, in different environmental conditions (summer).

*Acknowledgements.* This study was supported by the Conseil Général of Charentes-Maritime and the Centre National de la Recherche Scientifique. The field sampling was supported by the French ANR (National Research Agency) through the VASIREMI project “Trophic significance of microbial biofilms in tidal flats” (contract ANR-06-BLAN-0393-01).

## LITERATURE CITED

- Abdullahi AS, Underwood GJC, Gretz MR (2006) Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). V. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricorutum*. J Phycol 42:363-378
- Admiraal W (1984) The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. Prog Phycol Res 3:269-322
- Armbrust EV (2009) The life of diatoms in the world’s oceans. Nature 459:185-192
- Azerado J, Henriques M, Sillankorva S, Oliveira R (2003) Extraction of exopolymers from biofilm: the protective effect of glutaraldehyde. Water Sci Technol 47:175-179
- Becker EW (2007) Micro-algae as a source of protein. Biotech Adv 25:207-210
- Bellinger BJ, Abdullahi AS, Gretz MR, Underwood GJC (2005) Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. Aquat Microb Ecol 38:169-180
- Bellinger BJ, Underwood GJC, Ziegler SE, Gretz MR (2009) Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms determined through isotopic enrichment. Aquat Microb Ecol 55:169-187
- Blumenkrantz N, Asboe-Hansen G (1973) New method for quantitative determination of uronic acids. Anal Biochem 54:484-489
- Cariou-Le Gall V, Blanchard GF (1995) Monthly HPLC measurements of pigment concentration from an intertidal muddy sediment of Marennes-Oléron Bay, France. Mar Ecol Prog Ser 121:171-179
- Chiovitti A, Higgins MJ, Harper RE, Wetherbee R (2003a) The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). J Phycol 39:543-554
- Chiovitti A, Bacic A, Burke J, Wetherbee R (2003b) Heterogeneous xylose-rich glycans are associated with extracellular glycoproteins from the biofouling diatom *Craspedostauros australis* (bacillariophyceae). Eur J Phycol 38:351-360
- Christie MC, Dyer KR, Blanchard G, Cramp A, Mitchener HJ, Paterson DM (2000) Temporal and spatial distributions of moisture and organic contents across a macro-tidal mudflat. Contin Shelf Res 20:1219-1242

- Comte S, Guibaud G, Baudu M (2006) Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties. Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enz Microb Tech* 38:237-245
- Craigies JS, Wen ZC, van der Meer JP (1984) Interspecific, intraspecific and nutritionally-determined variations in the composition of agars from *Gracilaria spp.* *Bot Marin* 27:55-61
- de Brouwer JFC, Stal LJ (2001) Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Mar Ecol Prog Ser* 218:33-44
- Decho AW (1990) Microbial exopolymères secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* 28:73-153
- Decho AW (2000) Microbial biofilms intertidal systems: an overview. *Continent Shelf Res* 20:1257-1274
- Denkhaus E, Meisen S, Telgheder U, Wingender J (2007) Chemical and physical methods for characterization of biofilms. *Microchim Acta* 158:1-27
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356
- Falciatore A, D'Alcala MR, Croot P, Bowler C (2000) Perception of environmental signals by a marine diatoms. *Science* 288:2363-2366
- Filisetti-Cozzi TM, Carpita NC (1991) Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. *Anal Biochem* 197:157-162
- Flemming HC, Wingender J (2002) Extracellular polymeric substances: structure, ecological functions, technical relevance. In: Bitton G (eds) *Encyclopedia of environmental microbiology*. Wiley, New York, p 1223-1231
- Flemming HC, Neu TR, Wozniak DJ (2007) The EPS matrix : the “house of biofilm cells”. *J Bact* 189:7945-7947
- Fuhrman JA (2009) Microbial community structure and its functional implications. *Nature* 459:193-199
- Giroldo D, Vieira AAH, Paulsen BS (2003) Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira sp.* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 39:1109-1115
- Goto N, Mitamura O, Terai H (2001) Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae. *J Exp Biol Ecol* 257:73-86

- Guarini JM, Blanchard GF, Gros P, Gouleau D, Bacher C (2000) Dynamic model of the short-term variability of microphytobenthic biomass on temperate intertidal mudflats. *Mar Ecol Prog Ser* 195:291-303
- Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P (2004) Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature rev Microbiol* 2:95-108
- Hanlon ARM, Bellinger B, Haynes K, Xiao G, Hofmann TA, Gretz MR, Ball AS, Osborn M, Underwood GJC (2006) Dynamics of extracellular polymeric substances (EPS) production and loss in an estuarine, diatom-dominated, microbial biofilm over a tidal emersion-immersion period. *Limnol Oceanogr* 51:79-93
- Haubois AG, Sylvestre F, Guarini JM, Richard P, Blanchard GF (2005) Spatio-temporal structure of the epipellic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France. *Estuarine Coastal Shelf Sci* 64:385-394
- Haynes K, Hofmann TA, Smith CJ, Ball AS, Underwood GJC, Osborn AM (2007) Diatom-derived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments. *Appl environ Microbiol* 73:6112-6124
- Herlory O (2005) Etude du biofilm microalgal des vasières intertidales : dynamique spatio-temporelle à micro-échelle et performances photosynthétiques. PhD thesis, Univ La Rochelle.
- Hieber V, Distler J, Myerowitz R, Schmickel RD, Jourdian GW (1976) The role of glycosidically bound mannose in the assimilation of  $\beta$ -galactosidase by generalized gangliosidosis fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 73:710-717
- Hofmann T, Hanlon ARM, Taylor JD, Ball AS, Osborn AM, Underwood GJC (2009) Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Mar Ecol Prog Ser* 379:45-58.
- Jaques LB, Ballieux RE, Dietrich CP, Kavanagh LW (1968) A microelectrophoresis method for heparin. *Can J Physiol Pharmacol* 46:351-360
- Jouault SC, Checolot L, Helley D, Ratiskol J, Bros A, Sinquin C, Roger O, Fisher AM (2001) Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharides produced by *Alteromonas infernus*. *Biochim et Biophys Acta* 25224:1-11
- Li J, Kisara K, Danielsson S, Lindstrom ME, Gellerstedt G (2007) An improved methodology for the quantification of uronic acid units and other polysaccharides. *Carb Res* 342:1442-1449



- Lorenzen S (1966) A method for the continuous measurement of in vivo chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res* 13:223–227
- Mulloy B (2005) The specificity of interactions between proteins and sulfated polysaccharides. *An Acad Bras Cienc* 77:651-664
- Orvain F, Galois R, Barnard C, Sylvestre A, Blanchard G, Sauriau PG (2003) Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microb Ecol* 45:237-251
- O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R (2000) Review: biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microb* 54:49-79
- Paterson DM, Black KS (1999) Water flow, sediment dynamics and benthic biology. *Adv Ecol Res* 29:155-193
- Patil JS, Anil AC (2005) Biofilm diatom community structure: influence of temporal substratum variability. *Biofouling* 21:189-206
- Perkins RG, Honeywill C, Consalvey M, Austin HA, Tolhurst TJ, Paterson DM (2003) Changes in microphytobenthic chlorophyll *a* and EPS resulting from sediment compaction due to de-watering: opposing patterns in concentration and content. *Cont Shelf Res* 23:575-586
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25:943–948
- Roger O (2002) Etude d'oligosaccharides bioactifs issus d'exopolysaccharides bactériens : obtention, caractérisation et relation structure/fonction. PhD thesis, Univ Paris 13
- Smith DJ, Underwood GJC (1998) Exopolymers production by intertidal epipellic diatoms. *Limnol Oceanogr* 43:1578-1591
- Spears BM, Saunders JE, Davidson I, Paterson DM (2008) Microalgal sediment biostabilisation along a salinity gradient in the Eden Estuary, Scotland: unraveling a paradox. *Mar Freshwater Res* 59:313-321
- Staats N, de Winder B, Stal LJ, Mur LR (1999) Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca clostrerium* and *Navicula salinarum*. *Eur J Phycol* 34:161-169
- Stal LJ, Défarge C (2005) Structure and dynamics of exopolymers in an intertidal diatom biofilm. *Geomicrobiol J* 22:341-352
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56:187-209

- Sutherland IW (1996) Extracellular polysaccharides. In: Rehm HJ, Reed G, Puhler A, Stadler P (eds) *Biotechnology*, (vol. 6) *Products of Primary Metabolism*. New York, VCH, p 613-657
- Sutherland IW (2001) Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology* 147:3-9
- Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2009) Optimizing extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar Freshwater Res* 60:1201-1210
- Taylor IS (1998) Fine-scale distribution of carbohydrates on intertidal sediments in relation to diatom biomass and sediment properties. PhD thesis, Univ St Andrews
- Taylor IS, Paterson DM, Mehlert A (1999) The quantitative variability and monosaccharide composition of sediment carbohydrates associated with intertidal diatom assemblages. *Biogeochem* 45:303-327
- Thornton DCO, Dong LF, Underwood GJC, Nedwell DB (2002) Factors affecting microphytobenthic biomass, species composition and production in the Colne Estuary (UK). *Aquat Microb Ecol* 27:285-300
- Tolker-Nielsen T, Moblin S (2000) Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microb Ecol* 40:75-84
- Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: dynamics, changes in composition, and pathways of production. *J Phycol* 40:293-304
- Underwood GJC, Kromkamp J (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Adv Ecol Res* 29:93-153
- Underwood GJC, Paterson DM (2003) The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Adv Bot Res* 40:184-240
- Underwood GJC, Paterson DM, Parkes RJ (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnol Oceanogr* 40:1243-1253
- van Duyl FC, de Winder B, Kop AJ, Wollenzien U (1999) Tidal coupling between carbohydrate concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats. *Mar Ecol Prog Ser* 191:19-32
- Wingender J, Neu TR, Flemming HC (1999) What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender J, Neu TR, Stadler P (eds) *Microbial extracellular polymeric substances: characterization, structure and function*. Springer-Verlag, Berlin, p 1-15

- Wustman BA, Gretz MR, Hoagland KD (1997) Extracellular matrix assembly in diatoms (Bacillariophyceae). I. A model of adhesives based on chemical characterization and localization of polysaccharides from the marine diatom *Achnanthes longipes* and other diatoms. *Plant Physiol* 113:1059-1069
- Zhou J, Mopper K, Passow U (1998) The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnol Oceanogr* 43:1860-1871

---

## Figure list

Figure 1. Station where samples of surficial intertidal sediment were collected.

Figure 2. Carbohydrate production ( $\mu\text{g glc equivs.}\mu\text{g chl } a^{-1}$ ) for colloidal (A), bound (B) and intracellular (C) fractions depending on the emerged period. Light climate (D) measured each minute throughout the sampling, cell density associated with Chl *a* (E) are also presented.

Figure 3. Uronic acid production ( $\mu\text{g glc equivs.}\mu\text{g chl } a^{-1}$ ) compared to the total amount of carbohydrate measured in colloidal (A), bound (B) and intracellular (C) fractions related to the emerged periods.

Figure 4. Monosaccharide composition (average for the 3 sampling sites) of the different fractions extracted from the Marennes-Oléron mudflat. The variability within true sample replicates was less than 5%. Unknown: indicates peaks which were not determined.

Figure 5. GC-MS chromatogram of carbohydrates detected in an HMW bound fraction. Ionization: Electronic Impact (EI, 70eV). Target ion: 40-650 m/z.

Figure 6. Distribution of total carbohydrates and uronic acids in LMW/HMW for colloidal (A), bound (B) and intracellular (C) fractions depending on the emerged period.

Figure 7. Complexity of intracellular fractions: production of HMW sulfated groups (A) and proteins (B) related to the emerged periods.

Figure 8. EPS types and location in the Marennes-Oléron mudflat, based on Underwood's conceptual model for benthic diatom exopolymers. Composition in sugars (%) was averaged over the emersion period.

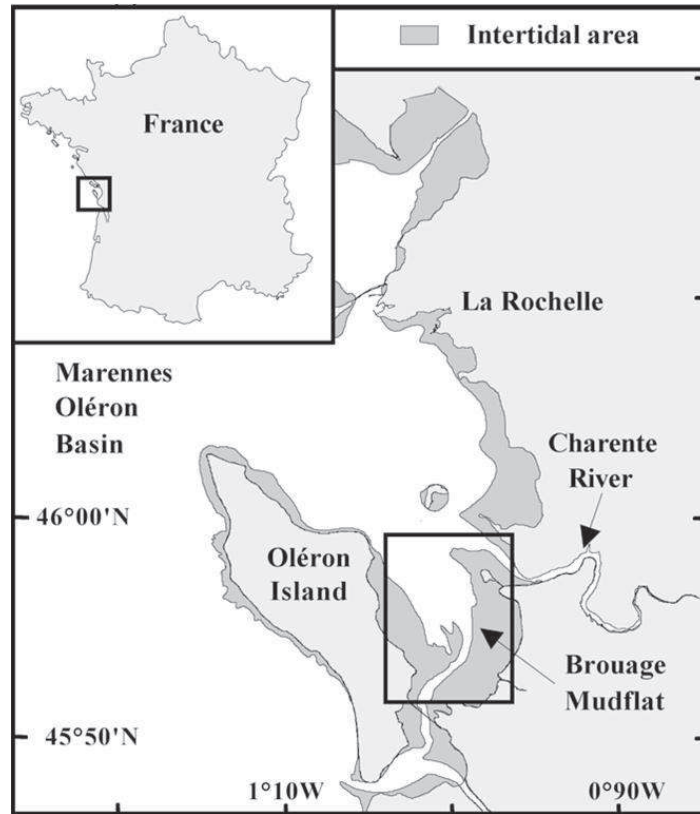


FIGURE 1

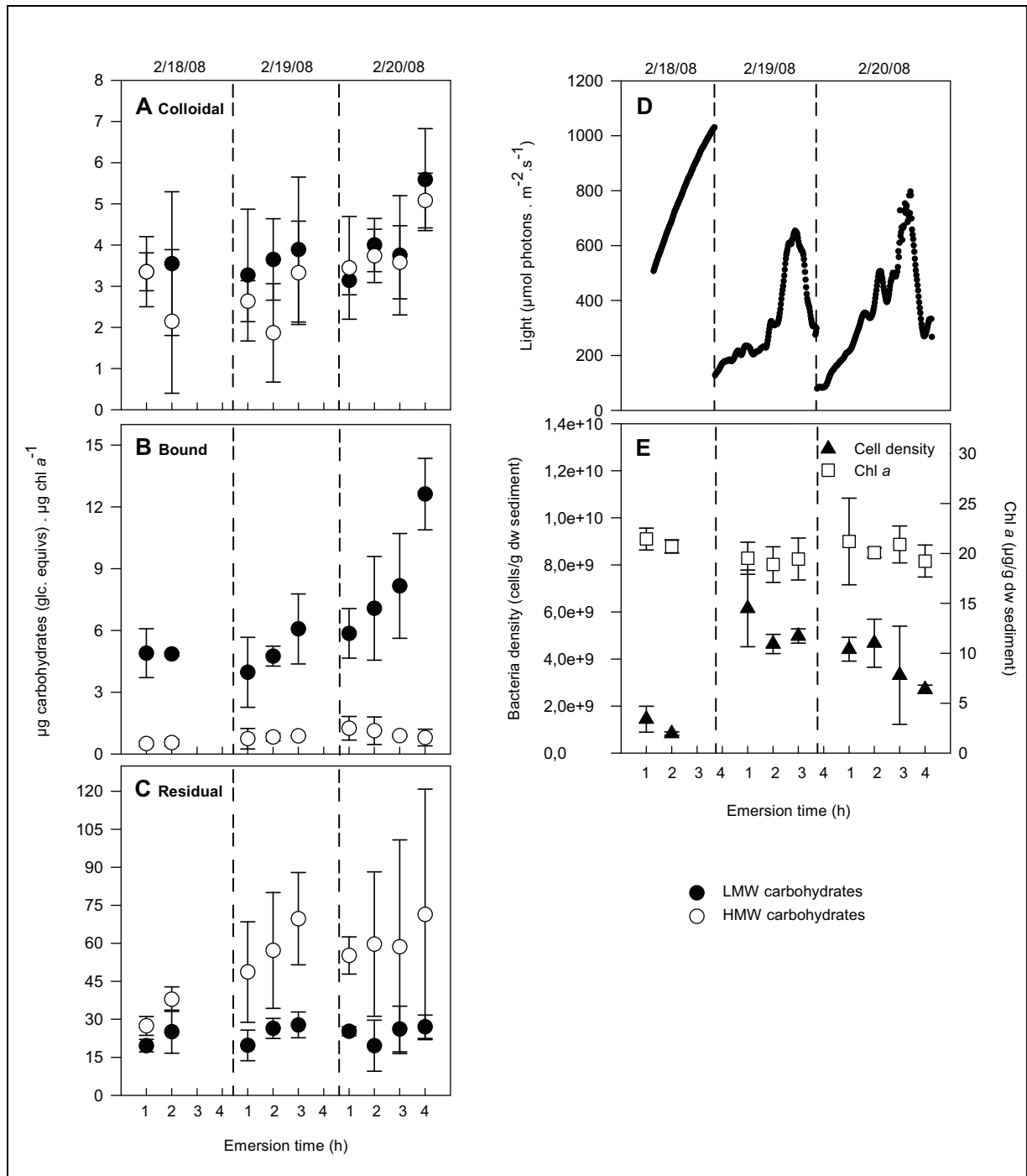


FIGURE 2

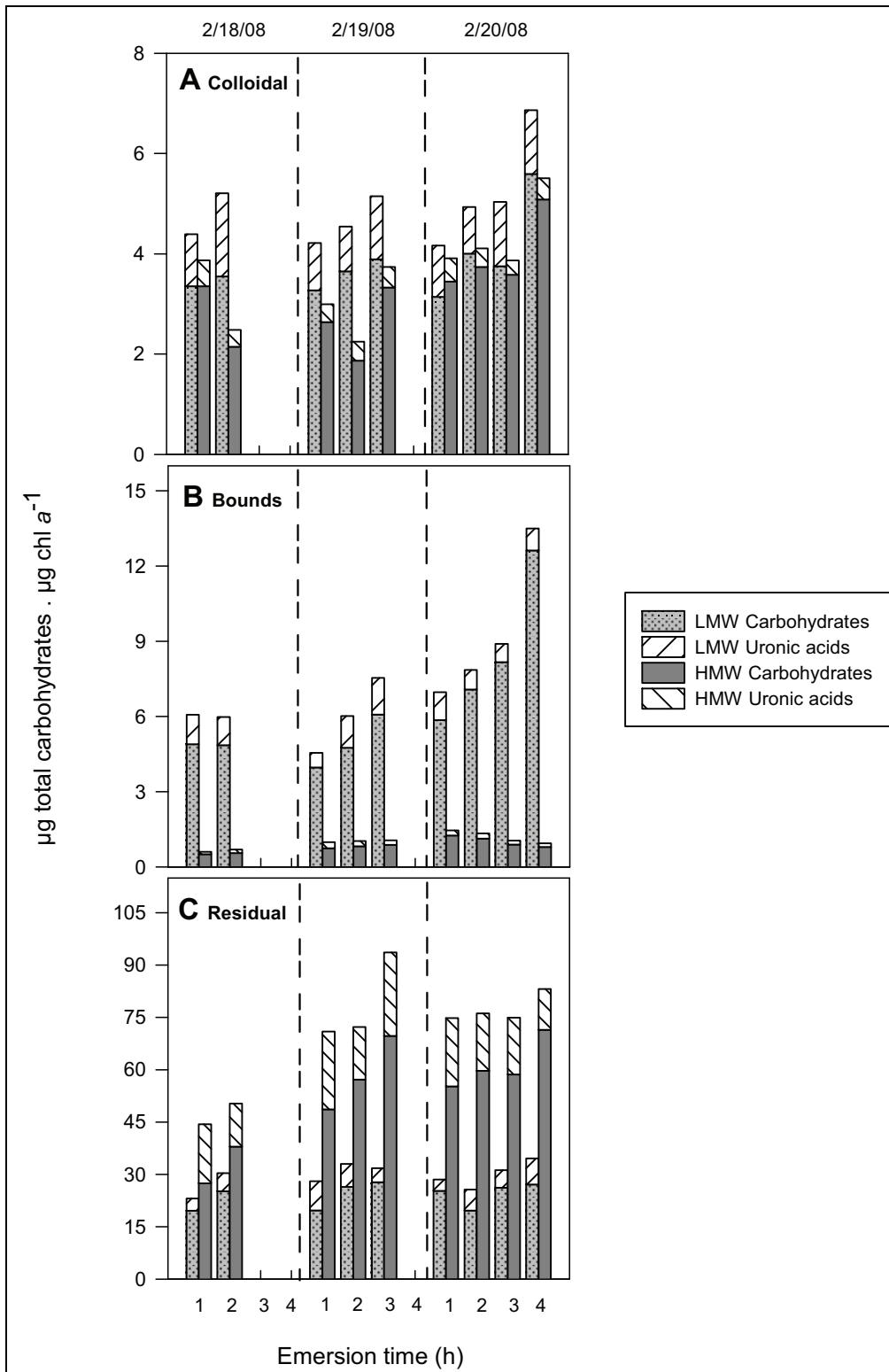


FIGURE 3

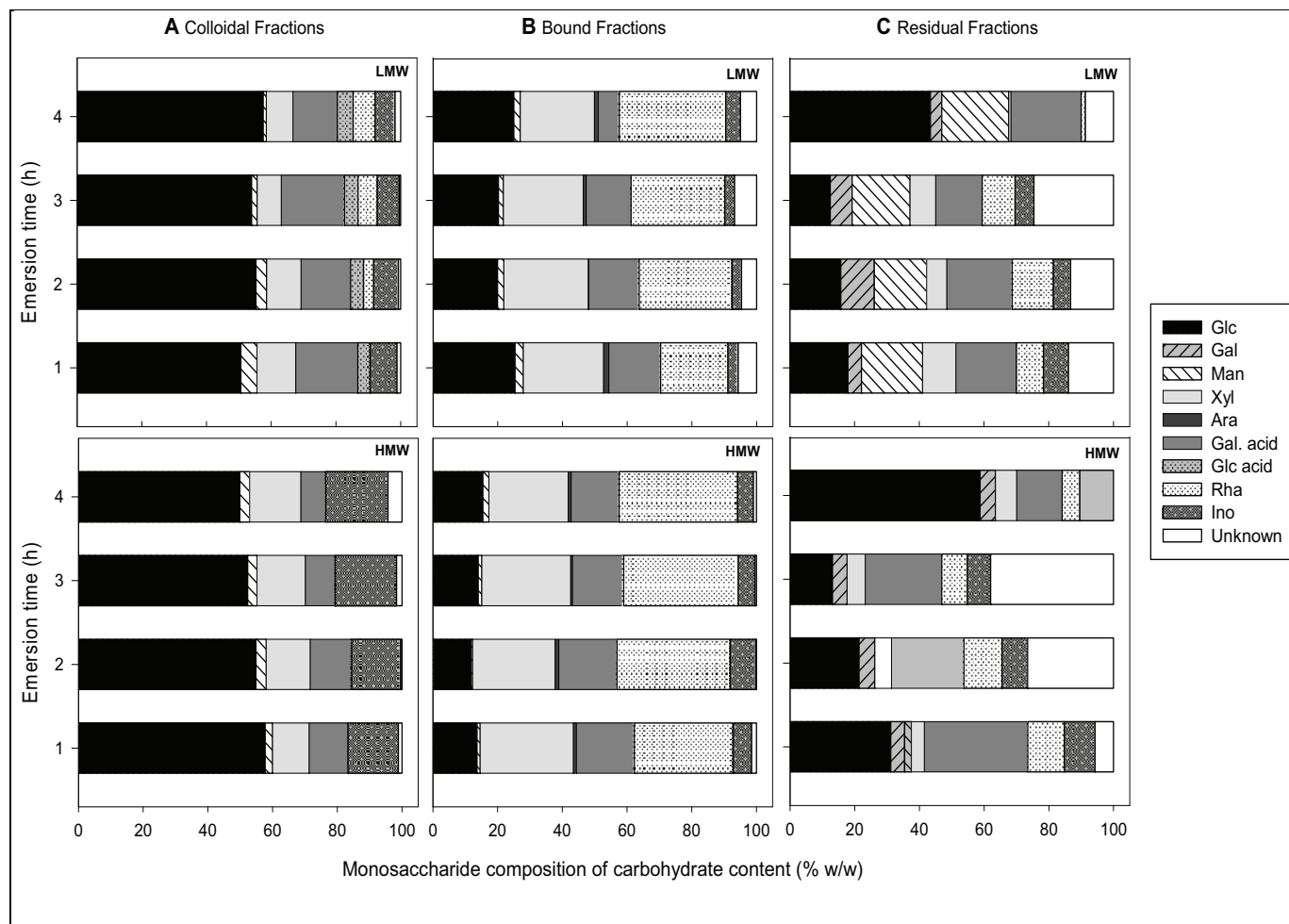


FIGURE 4



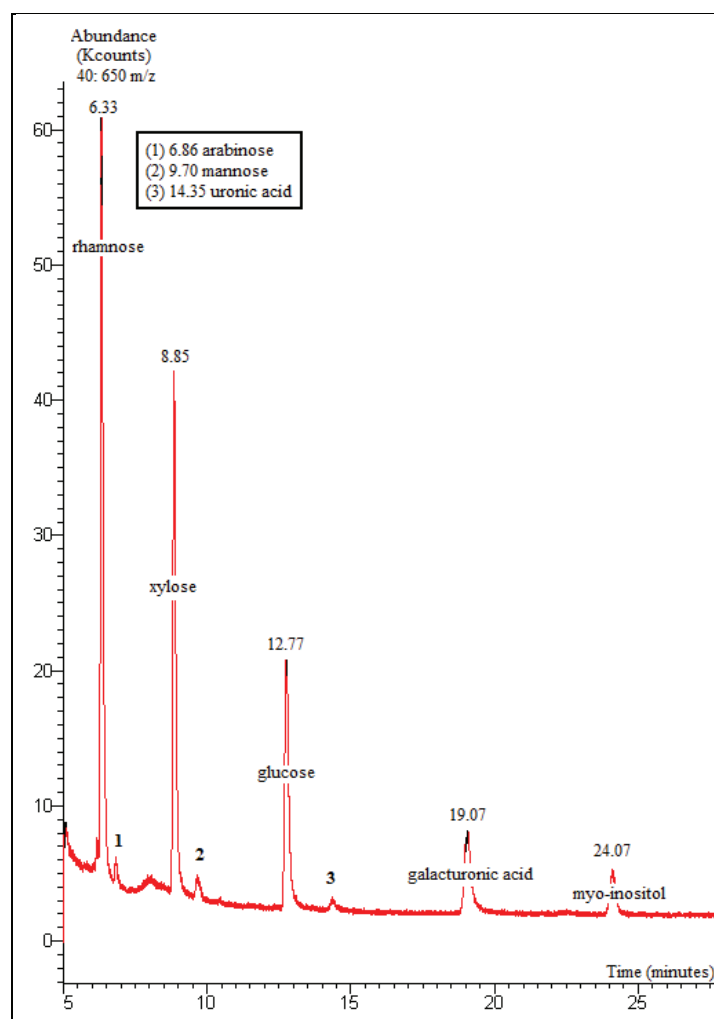


FIGURE 5

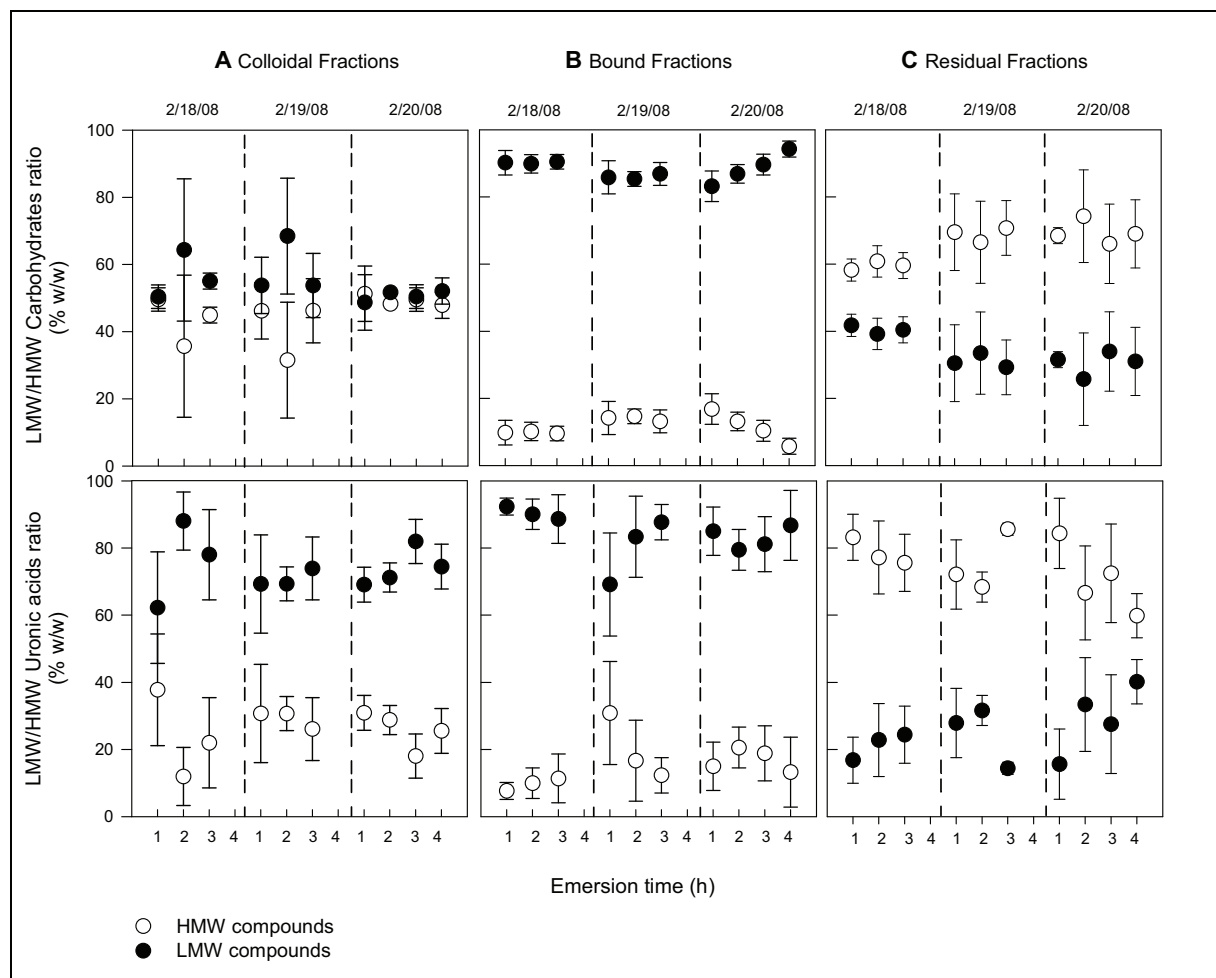


FIGURE 6

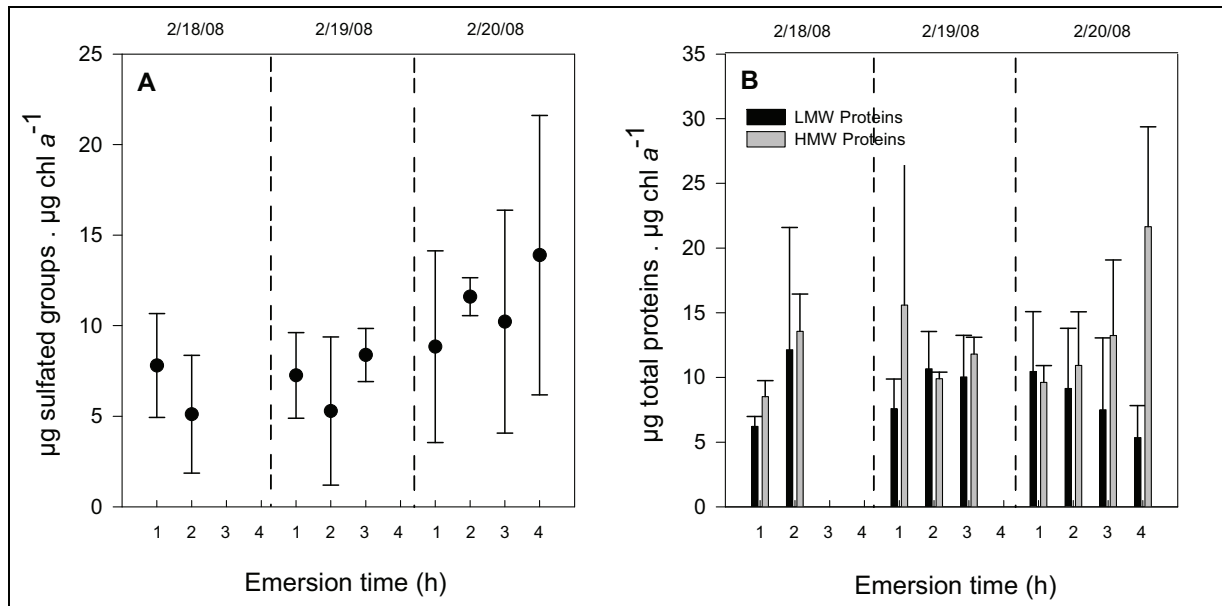


FIGURE 7

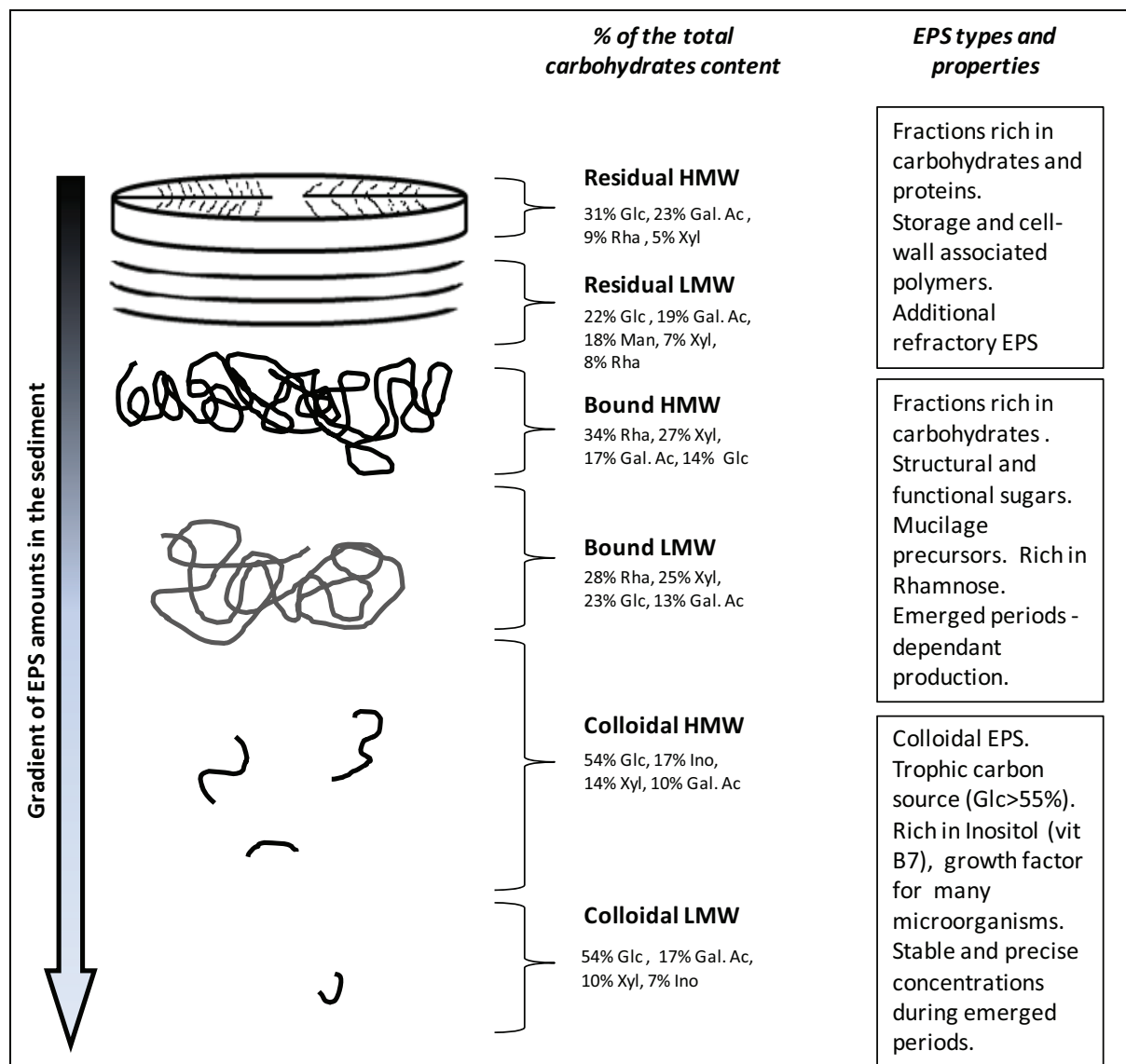


FIGURE 8



*ANNEXE 2*

*First report on the interactions between viriobenthos activity, the bacterial mortality and the microalgal photosynthesis in a microphytobenthic biofilm of an intertidal mudflat (French Atlantic coast)*

Hélène Montanié <sup>1\*</sup>, Margot de Crignis <sup>1,2</sup>, Johann Lavaud <sup>1</sup>

(1) UMR 6250 CNRS - ULR LIENSs. Université de La Rochelle, , Institut du Littoral et de l'Environnement, 2 rue Olympe de Gouges, 17042 La Rochelle cedex. France.

(2) UMR 100 IFREMER - UCBN LBBM. Université de Caen Basse-Normandie, esplanade de la Paix, 14032 Caen, France.

\* Corresponding author:

Hélène Montanié, helene.montanie@univ-lr.fr

Running title: Viriobenthos in a microphytobenthic biofilm

**Abstract**

First report on the interactions between viriobenthos activity, the bacterial mortality and the microalgal photosynthesis in a microphytobenthic biofilm of an intertidal mudflat (French Atlantic coast)

Keywords: Virus. Bacteria. Microphytobenthos. Photosynthesis. Sediment. Mudflat

## Summary

This is the first report on the virobenthos activity within the microbial biofilm of an intertidal mudflat (Marennes Oléron Bay, France). We specifically studied its impact on the bacteria and the microphytobenthos (MPB) during emersion. Capsid-sizing by transmission electronic microscopy tended to confirm the endogenous origin of viruses. By combining in situ and in vitro approaches the viral production rate (VPR) has been linked to the dynamics of bacteria and MPB. VPR averaged  $2-4 \times 10^8$  viruses ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> during the emersion and, in July, it induced 29% of the net bacterial losses while in February bacterial growth occurred. The harvesting and maintenance of top-surface sediments allowed to monitor the dynamics of viruses, bacteria and MPB after viral inoculation of benthic and planktonic origins. In contrast to planktonic viruses, pore-water viruses modified both the bacterial and MPB dynamics and decreased the MPB photosynthesis efficiency. VPR changes explained 79% of bacterial changes even though they were delayed compared to the increase of viruses. This observation tends to corroborate a simultaneous release of viruses of microalgal (MPB) origin. VPR correlated positively to the Virus to Bacteria Ratio and both correlated negatively to the water content.

## Introduction

Viruses represent the most common biological entities worldwide (at least 10<sup>31</sup>; Rohwer and Edwards, 2002), among which half are marine viruses (10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> viruses ml<sup>-1</sup> seawater and 10<sup>6</sup>-10<sup>10</sup> viruses ml<sup>-1</sup> sediments; (Weinbauer, 2004; Breitbart et al., 2008). Now considered as an integral component of the microbial food-web, they play a major role in the regulation of carbon and nutrient recycling and in the dynamics of microbial entities (Fuhrman, 1999; Wilhelm and Suttle, 1999; Weinbauer, 2004; Suttle, 2007; Weinbauer et al., 2009). In the water column, up to 25% of the bacterial community (Weinbauer, 2004) and 10 to 50% of microalgae (Gastrich et al., 2004) may be infected. Viruses are assumed for accounting for 20 to 40% of the daily mortality of the standing stock of planktonic bacteria (Suttle, 2007) and for 10 to 30% of the daily loss of bacterial production (Fuhrman, 1999). They affect both the biomass and the photosynthesis of phytoplankton and reduce its primary productivity (Suttle et al., 1990; Juneau et al., 2003) especially at the end of a bloom (Gastrich et al., 2004). Virus-induced mortality could represent from 2 to 60 % of the benthic bacterial production, and even more in Chilean coastal ecosystems (Danovaro et al., 2008). Because of selective infection, populations and communities of microbes are structured by viruses, directly by the process of virus-mediated cell lysis and/or indirectly by the relapse of pressure of nutrient competition and the availability of significant amount of viral lysates (Suttle, 2007). Indeed, viriolysis (as defined as viral shunt, (Wilhelm and Suttle, 1999) tends (i) to reduce the transfer of organic carbon to higher trophic levels, (ii) to promote the recycling of carbon and nutrients by bacterial remineralizers and (iii) overall to lubricate the microbial food-web at short-time scale (Weinbauer et al., 2009).

The biogeochemical and ecological role of viruses was mathematically formalized via the concept of “the phage killing the winner of nutrient competition” (KtW) to allow the less competitive populations to develop (Thingstad and Lignell, 1997). The KtW hypothesis was recently tested on a panel of planktonic and benthic data sets to identify the relevance between the theoretical aspects compared to the experimental work and the in situ observations (Winter et al., 2010). The KtW analysis concluded on a paradox in freshwater benthos relative to the apparent low infectivity of viruses albeit high abundances of bacterial hosts and viruses (Bettarel et al., 2006; Filippini et al., 2006). However, to question the universality of this paradox, the panel of environments considered needs to be enlarged; especially information on viriobenthos remains too scarce. Although viriobenthos has been analysed from a variety



of sediments (reviewed by Danovaro et al., 2008) including surface layer in subtidal estuaries (Drake et al., 1998; Hewson et al., 2001a; Middelboe and Glud, 2003; Helton et al., 2006), coastal area (Glud and Middelboe, 2004; Mei and Danovaro, 2004), continental lakes (Bettarel et al., 2006) and deep-ocean sediment (Danovaro et al., 2002), it has never been investigated in the sediments of intertidal mudflats.

In Western European estuaries and semi-enclosed bays, the primary productivity of intertidal mudflats is supported by motile microalgae (epipellic microphytobenthos, MPB) which form the major part of a dense biofilm at the surface of the sediment during emersion. The MPB biofilm also includes microalgae-associated bacteria (Hewson and Fuhrman, 2003; Bruckner et al., 2008) and its physical structure is stabilized by the exudation of Extracellular Polymeric Substances (EPS) by both microalgae and bacteria depending on their respective production/growth phases (Yallop et al., 2000; Gerbersdorf et al., 2009; Bruckner et al., 2011). Bacteria can also be free in pore-water or attached to sediment particles (Bruckner et al., 2008). MPB, which is generally dominated by diatoms, can migrate vertically through the fine muddy sediment particles as a function of the tidal cycle and of the light environment in order to perform photosynthesis at the surface of the sediment during emersion (Blanchard et al., 1997; Perkins et al., 2010b). Together with vertical migration, several physiological processes, including the non-photochemical quenching of fluorescence (NPQ), were shown to be essential for protecting the diatom cells from photooxidative stress when exposed to an excess of light (Lavaud et al., 2007; Brunet and Lavaud, 2010; Perkins et al., 2010b). On the mudflat of Marennes-Oleron Bay (France), epipellic diatoms rapidly cover between 80 and 90% of the top-surface of the sediment during the first half of the emersion (3 h), a period which is then followed by a non-uniform downward migration (Herlory et al., 2004). During emersion, diatoms were shown to be highly resistant to light stress especially thanks to NPQ (Blanchard et al., 1997; Herlory et al., 2007).

MPB biofilm is a unique transient biogeomorphological structure which constitutes a particular case study to perform in situ analyses of biological processes in a surface biofilm (Herlory et al., 2004; Haynes et al., 2007; Perkins et al., 2010a). We investigated the dynamic and the activity of the viriobenthos associated with the microphytobenthic biofilm of the mudflat of Marennes-Oléron bay. In a first step, we evaluated the temporal dynamics of viruses at the macro-(monthly) and at the micro-scale (hourly, during emersion) and their horizontal distribution, and we estimated the rate of viral production and the virus-induced bacterial mortality. In a second step, we confronted in situ data to in vitro experimental values obtained on the sediment surface layer containing migrating MPB and inoculated with

viruses, benthic and planktonic. The impact of the virus infection on the photosynthetic productivity of MPB was measured.

## Results

### *Efficient protocol for the viruses and bacteria extraction and counting*

The use of ultrasonication in addition to pyrophosphate treatment led to the emulsion of the mud samples and the sediment was disrupted into smaller particles that decrease the accuracy of the microscopic observation of viruses. Vortexing and/or addition of EDTA (Helton et al., 2006) were also not conclusive for the same reason (data not shown). After having tested our new protocol (see the Material and methods section) on several extractions, its efficiency appeared satisfying. The first two steps of pyrophosphate-shaking treatments allowed to detect up to 99.6% of extractable viruses, a third step removing only 0.4% of the total cumulative number. The first and the second steps extracted  $64 \pm 1 \%$  and  $36 \pm 1 \%$  ( $n=34$ , in situ data) of the extractable viruses, respectively. Consequently, only one step was performed for in vitro counts for samples of 2009-2010 and, after a preliminary confirmation of the percentage of extractability, a correction factor has been applied to initial extractable viruses following the 64/36% ratio. The accuracy of the protocol used was illustrated by a coefficient of variation (CV) of 33% for viruses.

A significant fraction of the bacteria was not eluted after the extraction procedure for viruses, albeit the three sequentially repeated extractions. The efficiency of the initial extraction fluctuated around  $60 \pm 17 \%$  ( $n=15$ , in situ data) and the third extraction could count for 5% of extractable bacteria. Bacteria were thus counted independently from viruses with a protocol currently used in our laboratory for benthic bacteria (Pascal et al., 2009) and validated by comparison with those of Lucas et al. (1996) and Lunau et al. (2005). It consists in applying ultrasounds to highly diluted sediment followed by DAPI staining. Thereby the extractability of bacteria was optimized by a factor of  $11.76 \pm 1.01$  and the counting procedure was not disturbed by the accumulation of sediment particles inappropriately masking the microscopic slides. The CV of bacterial counts was  $35 \pm 8\%$ , closed to the one obtained with the methanol extraction method ( $32 \pm 7$ ) and less than the one of the resin method ( $47 \pm 7\%$ ). Most importantly, the improved protocol we have used here to enumerate bacteria has a much higher efficiency ( $\times 7.31 \pm 3.79$ ) as compared to the methanol method,

both being quite significantly related ( $r^2= 0.359$ ;  $p=0.08$ ;  $n=9$ ) and able to distinguish samples. Additionally, it showed a higher CV as compared to the resin recovery method that favoured the extraction of bacteria ( $x 1.89 \pm 1.44$ ) only for two types of sediments out of the three tested without discriminating between the three types of sediments.

*Monthly survey of the virus and bacteria abundances over a year*

On a monthly average, the abundance of viriobenthos was 60-fold higher than that of the virioplankton ( $60.3 \pm 20.3$ ,  $n=7$ ). The abundance of benthic bacteria was from  $244 \pm 13$  (May 2009-July 2008) to 1945 time higher (February 2008) than those in the water column.

In 2003-2004, at all stations along the transect, viral abundance peaked in September ( $2.43 \pm 0.46 \times 10^9$  viruses ml<sup>-1</sup>; Fig. 1A) with a significant predominance of 65-105 nm size-class particles ( $p<0.05$ , Fig. 1B). Throughout the whole year, the size class  $< 65$ nm remained stable below 50% of the total viriobenthos. The sampling date accounted for 70% of the total variance of viral abundance; the monthly difference of viral size-classes distribution was significant (two-way ANOVA,  $p= 0.0203$ ) while no spatial heterogeneity between the three stations was significantly observed along the transect ( $p= 0.2664$ , Fig. 1A). Viral abundance dropped down to c.  $0.9-1 \times 10^9$  ml<sup>-1</sup> in winter.

A large morphological diversity in virus like particles (VLPs) was observed via transmission electron microscopy. The capsid size was on average  $77.4 \pm 34.9$  nm. Tailed viruses were in average  $96.4 \pm 25.7$  nm in size. Some filamentous forms of 0.6-1.2  $\mu$ m were also observed. VLPs smaller than 65 nm in size, made up to 36-49% of the total particles. The highest size-class ( $> 105$  nm) represented 12-32%. The intermediate size-class (65-104 nm) varied between 32 to 51% of the total VLPs. Tailed viruses accounted for 9-33% of the VLPs. Noticeably in February 2004, 22% of the VLPs were higher than 105 nm, 38% of which were tailed viruses.

*In situ hourly survey of the virus and bacteria abundances during an emersion period in winter and summer*

During the emersion period, the pore-water salinity changed according to the meteorological conditions: in February the salinity stabilised around 32-33 PSU (with a drop-down to 30 PSU due to rainy conditions the 20th) while in July it increased from 37 to 41-42 PSU within 3 h emersion. In parallel, the water evaporation decreased the water content of the

sediments in the range 2.7% in February (mean  $61.74 \pm 0.67$ ,  $n=26$ ) and 5.3-11.4% in July (mean  $51.26 \pm 0.36$ ,  $n=36$ ). The sediment organic matter was  $0.079 \pm 0.001$  g g<sup>-1</sup> and  $0.129 \pm 0.007$  g g<sup>-1</sup> dry sediment in February and July, respectively.

In the top-surface sediment of the mudflat, the viral abundance at the beginning of the emersion was c.  $1.91 \pm 0.22 \times 10^9$  mL<sup>-1</sup> and c.  $6.30 \pm 0.47 \times 10^9$  ml<sup>-1</sup> in February and July 2008, respectively. Bacteria were  $3.19 \pm 0.45 \times 10^9$  cells mL<sup>-1</sup> and  $8.48 \pm 1.37 \times 10^8$  cells ml<sup>-1</sup>, respectively. Consequently, the Virus to Bacteria Ratio (VBR) was on average 0.59 and 7.43 in February and July, respectively. The algal biomass (as evaluated by the amount of chlorophyll a) remained relatively stable during the emersion within the period studied with higher values in February ( $20.01 \pm 0.45$  µg g<sup>-1</sup> dry sediment,  $n=21$ ) than in July ( $7.61 \pm 0.23$  µg g<sup>-1</sup>,  $n=36$ ).

The viral abundance tended to increase within the 3 h of diurnal emersion on 19 and 20 February 2008 (+47% and 9%, respectively; Fig. 2A) with no clear tendency for bacteria which resulted in an insignificant relationship between virus and bacteria ( $p>0.05$ ). On average, the viral production was  $2.23 \times 10^8$  viruses h<sup>-1</sup>, and it was responsible for 0.22% of bacterial loss (in terms of bacterial standing stock, BSS). In summer, viral replication occurred significantly on 17, 18 and 19 July 2008 (t test,  $p = 0.0037$ ;  $+22.41 \pm 4.74$  %) while bacterial abundance concomitantly decreased ( $-5.44 \pm 1.97$  % h<sup>-1</sup>; Fig. 2B). Viruses explained 84% of the variation of bacterial abundance ( $\log \text{Bacteria} = -1.63 \log \text{Viruses} + 24.90$ ,  $r^2=0.84$ ,  $n=6$ ,  $p=0.01$ ). In July 2008, the hourly viral production rate (VPR) was of  $4.39 \pm 1.42 \times 10^8$  viruses ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> representing a bacterial loss of  $1.52 \pm 0.56$  % of BSS. Virus-mediated bacteriolysis accounted for  $28.99 \pm 5.61$ % of observed bacterial cell loss (i.e. the net bacterial production). Moreover, considering that the gross bacterial production in July 2006 accounted for 3.3% of the standing stock per hour (Pascal et al, 2009) and given the -5.44 % decrease of net bacterial production observed in July 2008, virus-mediated mortality could explain about 17% of the bacterial mortality [ $1.52 / (3.3 + 5.44)$ ].

Interestingly, by using all the data (February 2008, July 2008, May 2009 and 2010), a significant relationship was observed between VBR and the water content of sediment ( $p<0.0001$ ; Fig. 3A). A higher bacterial abundance was observed when the water content exceeded 58.6%, founding expression in fine in lower VBR ( $<2$ , February 2008 and May 2010 versus 4.3 in July 2008 and May 2009). Whatever the season, the magnitude of change in VBR were significantly related to the viral production at the end of the emersion period ( $r = +0.88$ ;  $p=0.01$ ). When the net positive bacterial growth represented more than 24% of the BSS, VBR tended to decline during emersion (Fig. 3B).

*Daily monitoring of in vitro maintained top-surface sediments in spring: viral inoculation and virus-mediated bacteriolysis*

In May 2009, in the top-surface mud layer, viruses and bacteria were c.  $2.81 \pm 0.32 \times 10^9$  ml<sup>-1</sup> and c.  $6.58 \pm 0.08 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup> corresponding to c.  $5.30 \pm 0.61 \times 10^9$  and c.  $1.29 \pm 0.01 \times 10^9$  g<sup>-1</sup> dry sediment, respectively. The VBR was on average 4.27. In May 2010, the viral abundance represented only 1.94 times the abundance of bacteria (c.  $4.31 \pm 0.19 \times 10^9$  versus c.  $2.22 \pm 0.07 \times 10^9$  ml<sup>-1</sup> or c.  $8.13 \pm 0.35 \times 10^9$  versus c.  $4.18 \pm 0.14 \times 10^9$  g<sup>-1</sup> dry sediment). The water content was  $52.6 \pm 0.5$  % and  $58.6 \pm 1.5$  in 2009 and 2010, respectively.

In response to the addition of pore-water viruses (Vb) (+7.87% in 2009 and +3.84% in 2010), a daily increase in BSS loss was observed: +7.11 % in 2009 and +11.69% in 2010. In 2009 (Fig. 4A), the viral abundance decreased during the first day, notably in control wells. A net viral production occurred during the second day while the bacterial abundance was still decreasing. By day 3, both viral and bacterial dynamics diverged between the control wells and virus-treated wells. In the two cases, viruses retrieved their initial titers, while bacteria were nearly the double in control than in virus treatment (Fig. 4A, B). During the 3 days of incubation, the amplitude of variation of viral abundance was more pronounced in the control than in virus-treated wells and thus characterized by a higher VPR:  $4.73 \times 10^8$  versus  $3.93 \times 10^8$  viruses ml<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>. However, during the first two days, viral abundance was significantly higher in virus-treated wells leading to an increase of 1.07% of the virus-mediated loss of BSS. Virus-mediated bacteriolysis accounted for 15.05% of the difference observed for the bacterial cell loss. Otherwise, no significant relationship could be observed between virus and bacteria abundances ( $r=0.32$ ;  $p=0.45$ ).

In contrast, in May 2010 (Fig. 5), bacterial abundance decreased significantly with increasing viral abundance ( $\log \text{Bacteria} = -1.46 \log \text{Virus} + 23.43$ ,  $r^2=0.89$ ,  $n= 8$ ,  $p<0.001$ ) whatever the treatment (Fig. S1). After one day post inoculation, bacterial abundance was significantly reduced in Vb treatment compared to control (t test,  $p<0.05$ ) while an input of inactivated Vb has been inefficient (t test,  $p=0.5$ ). The daily viral production, calculated over the first two days in control wells, was  $6.48 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> of fresh sediment. In virus-treated wells, an additional viral production occurred, c.  $8.09 \times 10^8$  ml<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>, which was responsible for the lysis of 1.01% of BSS. Virus-mediated bacteriolysis accounted for 8.64% of the difference of the bacterial cell loss observed. By combining the data from May 2009 and May 2010 with the in situ data from July 2008, a significant positive power relationship between

the bacterial abundance loss and the VPR was estimated as: bacterial loss =  $-0.759 \times \text{VPR} - 1.088$  ( $r^2 = 0.79$ ,  $n=5$ ,  $p=0.04$ ).

In May 2009, the influence of Vp was also tested (Fig. 4A, B). Only 6% of BSS was lost per day instead of 7.5% in the control treatment. However, daily VPR reached 3 10<sup>9</sup> particles ml<sup>-1</sup> representing 106% of the viral standing stock, a percentage ten-fold higher than the one observed in the control (+17%) or as result of Vb addition (+13%).

*Daily monitoring of in vitro maintained top-surface sediments in spring: MPB dynamics and photosynthesis as a function of viral inoculation*

The analysis of the microphytobenthos (MPB) was conducted only in May 2009 (Fig. 4). MPB biomass evolved not differently in the control and in the virus Vb-treated wells (two ways ANOVA,  $p = 0.363$ ). Among the  $6.15 \pm 0.11 \times 10^5$  cells ml<sup>-1</sup> in the top-surface sediment, pennate diatoms largely dominated over centric species (of planktonic origin, stable around 12-13% whatever the treatment), among which 59.6 % belonged to the Pleurosigma-Gyrosigma taxon (P-G taxon) and 40.3 % to Navicula sp.. In control, a slight decline (3% per day) was noticeable until T=5 d which afterwards was followed by a sharp decrease since only 57% of the original assemblage persisted at T=7 d (Fig. 4). Within the first 3 days, the P-G taxon (Fig. 6A) decreased a little more (-9.8%) in the Vb-treated wells than in the control wells while the growth of Navicula sp. (Fig. 6B) was significantly enhanced (+42.9 %, ANOVA,  $p=0.045$ ). From T3 to T5 days, the P-G taxon biomass grew up to its level at T=0 and, although a net increase was observed whatever the treatment, its biomass was significantly higher in the control wells than in the Vb-treated wells (+12.9%; ANOVA,  $p=0.017$ ). Abundance of Navicula sp. decrease by 30%, but cells were still significantly higher in Vb-treated wells than in the controls wells (+ 18.7%, ANOVA,  $p=0,04$ ). At T=7 d, no differences could be observed between the P-G taxon and Navicula sp. abundances whatever the treatment (ANOVA,  $p=0.81$  and 0.16 for the P-G taxon and Navicula sp., respectively). At that time, the sharp loss of MPB biomass was largely inferred to Navicula sp. (63%) while only 28% was inferred to the P-G taxon.

The addition of Vp significantly changed the MPB dynamic (two way ANOVA,  $p<0.001$ ) by doubling the decay rate to 6.9% d<sup>-1</sup> versus 3.1 and 3.6% for control and Vb-treatment, respectively (Fig. 4). The abundance of P-G taxon was significantly lower than the one in the control wells over the 5 days ( $p<0.008$ ). In contrast, the number of Navicula sp. cells was only significantly lower at T=3 d (ANOVA,  $p=0.04$ ).

After 5 days of viral infection, the photosynthetic activity of the MPB biofilm was measured with a Maxi-Imaging-PAM fluorometer. The basic fluorescence emission of the MPB ( $F_t$ ), which illustrates the photosynthetic biomass, was similar between the control wells and virus-treated wells (Fig. S2). It confirms the cell counting (Fig. 4C). Nevertheless, the maximum photosynthetic efficiency ( $F_v/F_m$ ) was clearly reduced in all virus treated-wells (Vb and Vp) compared to the control sediment (Table 1). Noticeably, NPQ, the non-photochemical quenching of fluorescence, which is an index of light stress photoprotection, decreased in Vb-treated sediment but not in Vp-treated one compared to the control (Table 1). Measurement of the NPQ development kinetics showed that not only the extent of NPQ is reduced but its kinetic is slowed down by Vb infection (Fig. 7). After 10 days of viral infection, the photosynthetic efficiency strongly decreased in all samples illustrating the senescence of the MPB biofilm; no difference could be observed anymore between control and virus-treated sediments (data not shown).

## Discussion

*New methodological approaches for the improvement of the viral abundance and production, and its effect on the photosynthesis of the microphytobenthos in intertidal mudflat sediments*

The majority of the extractable viruses (ca. 64%) were dislodged during the initial step of the extraction. This is similar to values reported for estuarine sediments from other sites: 70% using multiple extractions without a sonication step (Helton et al., 2006) and 60% after the first step of a pyrophosphate-ultrasound treatment (Danovaro and Middelboe, 2010). The higher content of fine silt and clay particles in our sediments (up to 98%; Blanchard et al, 1997) could explain the better efficiency of the protocol proposed here compared to other sites (Helton et al, 2006). Indeed, sorptive properties increase with the content in clay and the electrostatic forces between charged clayed sediment and charged viral particles according to the ionic environment (Gerba, 1984; Helton et al., 2006). Because of such physical properties of the sediment, an ultrasound treatment was recommended by Danovaro and Middelboe (2010). Nevertheless, in our case, very small silt-clayed particles prevented from using accurately any physical treatment (ultrasound and vortex). Although the new extraction protocol we propose here for highly clayed sediments can be considered as conservative for

viral extraction, it cannot be validated for the extraction of bacteria due to its non-reproducible efficiency.

Another methodology we improved, according to the specificities of the Marennes-Oléron sediment, is the determination of the viral production (VP). Determination of VP by estimates of viral increase over time is classical for marine sediment using either incubation of undiluted and homogenized sediment in Würgler-bag, or incubation of diluted slurry as for pelagic analysis (Glud and Middelboe, 2004; Corinaldesi et al., 2010). VP as estimated by the dilution-based method was considered as about one order magnitude higher than that obtained with undiluted sediment (Danovaro et al., 2008). However, comparison of these two direct approaches suffers from methodological biases. The dilution method as compared to the Würgler-bag technique (i) enhances the heterotrophy activity but (ii) reduces the host-viruses contacts and thereby the progeny of new infections, (iii) makes the effect of predators negligible and (iv) reduces the potential loss of viruses by exoproteases (Dell'Anno et al., 2009). Nevertheless, homogenization could also alter microbial activity (Danovaro et al., 2008). Even if dilution-based technique is recommended by Dell-Anno et al (2009) as the most suitable methodology to estimate VP in marine systems, we chose to mimic the mudflat in a situation of low-tide using undiluted sediment. The 6-well microplate approach we used to process the sediment is quite similar to the Würgler-bag method. Indeed, it includes a homogenisation step without dilution of the mud and it reposes upon the same assumptions in terms of bacterial activity, biocide activity and competition with predators.

A third methodological advance is the use of fluorescence imaging for assessing the effect of viral infection on the microphytobenthos photosynthetic productivity. The Imaging-PAM technique has become exponentially used for imaging of photosynthesis (Oxborough, 2004; Baker, 2008). However, to our knowledge, this is the first time this technique has been applied to the measurement of photosynthetic production of mudflat MPB assemblages. The Imaging-PAM (I-PAM) technique brings the same essential advantage than other PAM systems: it is non-destructive which largely facilitate measurements on complex samples collected in situ. The I-PAM additionally allows to cover a rather large surface (10 x 13 cm) corresponding to the size of a micro well-plate which allows at once, to measure several wells including different treatments (control, Vb and Vp in our conditions) and in triplicates (Fig. S2). Finally, the measurement is fast (220 s in our conditions) which supports the assessment of the kinetics of photosynthesis regulation (Fig. 7).



*Viriobenthos and bacteriobenthos*

Viral abundance in the sediment of the Marennes-Oléron mudflat is within the range reported for marine sediments (from 107 to 1011 ml<sup>-1</sup>; Helton et al, 2006) and is even closer to the data reported for freshwater and shallow marine ecosystems (9x10<sup>9</sup> viruses g<sup>-1</sup>; Danovaro et al, 2008). In the bay of Marennes-Oléron, the viral abundance of mudflat sediments was 60-fold higher than the one of the overlying water column. A possible relationship between the viral abundance and the trophic status of an ecosystem has been recently suggested (Danovaro et al, 2008). Smaller ratios have been reported for eutrophic stations of other bays: x22 for the Moreton bay (Hewson et al., 2001a), x14 for the Niva bay (Middelboe and Glud, 2003) and x10 for the Chesapeake bay (Helton et al, 2006). Nevertheless, in general the abundance of benthic viruses exceeds the one of pelagic viruses by 10 to 1000 times; the highest values (from 100 to 1000) being observed in oligotrophic sites (Hewson et al., 2001a). Because of a much higher abundance of bacteria in the sediment, the VBR (Virus to Bacteria Ratio), with a range of 0.6-7.4, was lower than previous observations in the water column at the same site,  $11.6 \pm 3.7$  in 2002-2003 (Auguet et al., 2005) and  $11.2 \pm 5.4$  in 2007 (Ory et al., 2010). This general trend (except across the mouth of the Chesapeake Bay; Drake et al., 1998) suggests a low viral production from bacteria in the sediments even though the high densities of bacteria and viruses probably foster host-virus encounter (Filippini et al., 2006). Such situation is even more striking that the higher availability of nutrients and organic matters in sediment allows for a higher activity of the benthic bacteria (Danovaro and Serresi, 2000). This discrepancy could be explained by several factors inferring the virus-bacteria interaction: (i) a different viral decay due to the nuclease and/or protease concentrations (Middelboe and Glud, 2003; Filippini et al., 2006); (ii) a possible sorption on mineral matters or embedding in the EPS (Exocellular Polymers Substances) matrix limiting the movements of bacteria and viruses, and/or masking the viral receptors of bacterial cells (Danovaro and Serresi, 2000; Filippini et al., 2006), although any polysaccharide depolymerase carried on viral capsid are known to degrade the EPS matrix (Sutherland et al., 2004); (iii) an hypothetical prevalence of the lysogeny, the polylysogeny or the chronic multiplication (Middelboe and Glud, 2003; Danovaro et al., 2008), and (iv) an import of viruses from the water column directly by settling of viral particles or indirectly by settling of lysogen bacteria and/or visibly infected cells by lytic viruses (Hewson and Fuhrman, 2003; Taylor et al., 2003; Danovaro et al., 2008; Pradeep Ram et al., 2009).

*Viral production and bacterial mortality*

The virus-mediated bacterial mortality (or Virus-Induced Mortality, VIM) ranged between 0.2% and 1.5% of the BSS (Bacterial Standing Stock) per hour (in situ data from February and July 2008, respectively). Globally, we estimated that in Marennes-Oleron mudflat, viral lysis may account for about 17% of the total mortality of the bacteria, the main mortality being generated by the grazing from meiofauna (Pascal et al., 2009). Although the involvement of viruses in the bacterial mortality was apparently weak, the net bacterial loss, so-called bacterial net production, was positively related to the viral production rate during the emersion period. The 107-108 viruses produced ml<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> were responsible for an average of 29% of the net bacterial losses. A similar situation has been reported for the deep-sea sediments of the Sagami bay (Middelboe et al., 2006). Unfortunately, no bacterial production was estimated during our surveys so that we cannot test the positive correlation between viral and bacterial productions previously reported (Glud and Middelboe, 2004; Mei and Danovaro, 2004). In marine sediments, the estimates of VPR average between 106-109 viruses g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Corinaldesi et al., 2010) and the VIM is on average five-fold higher in coastal than in freshwater sediments (Danovaro et al., 2008). For instance, in the coastal sediments of the Adriatic Sea, the viral production which varied between 1.3x10<sup>7</sup> mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> and 1.6x10<sup>8</sup> mL<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> generated a VIM from 12 to 57% of the bacterial production, respectively (in average 0.3% of the BSS) (Mei and Danovaro, 2004). These data are similar to the one obtained in the sediments of the Marennes-Oléron mudflat. Similar low values were reported in Southern California (4-14% of the BSS; Hewson and Fuhrman, 2003) and in Central Øresund, Denmark (1.0-2.5% of the BSS; Glud and Middelboe, 2004); the lowest values (less than 1%) being mentioned for lakes and freshwater marshes (Bettarel et al., 2006; Filippini et al., 2006), and deep-sea sediments (Middelboe et al., 2006).

*Autochthonous versus allochthonous origin of benthoviruses*

The autochthonous or allochthonous origin of benthic viruses is still a question of debate. Some evidences support an endogenous origin without excluding import of pelagic viruses. When capsids are more than 60 nm in diameter, both the chance of sorption on clay- and silt-particles and the binding links may increase with the capsid size because of the increase of the number of surface charges (Dowd et al., 1998; Chattopadhyay and Puls, 1999). This feature could explain the higher mean size of viral capsids in the Marennes-Oleron

mudflat with only 50% of viruses with a capsid size of less than 65 nm compared to 71% in the overlying water (Auguet et al., 2006). In contrast, in more sandy sediments (30-98 % of sand) the fraction of small viruses (< 65 nm) is similar in the benthic and pelagic environment (around 60 and 68 %, respectively), although the abundance of larger VLP (> 90 nm) was two times higher in the benthos (Bettarel et al, 2006) probably due to a less reversible adsorption to mineral particles (Gerba and Schaiberger, 1975). In the sediment of intertidal mudflat, the higher counteraction of high size virus particles against the forces of desorption can very well be explained by the increase of organic matter during the emersion and the decrease of ionic strength at rising tide.

Morphological analysis alone is not sufficient to conclude on the origin of benthic viruses and must be completed with genomic diversity and life strategies data. The viral community is more diverse in benthos than in pelagos attesting of a benthic origin (Hewson and Fuhrman, 2007; Helton and Wommack, 2009). The most abundant phage was estimated to 0.01-0.1% of viral benthic assemblage instead of 2-3% in the water column (Hambly and Suttle, 2005; Filippini et al., 2006). Paradoxically albeit an apparent preservation of viruses entrapped in the sediment, and a high bacterial diversity (Torsvik et al., 2002), sediment would limit viral proliferation through bacteria (Pradeep Ram et al., 2009) for two main reasons: (i) high encounter rates may enhance bacterial resistance (Weinbauer et al., 2009) and (ii) both high viral and bacterial diversities may reduce the probability of virus-sensitive host encountering. Additionally, the siphoviruses which are mainly temperate phages (Suttle, 2005), amount for 45% of the annotated bacteriophages in the sediment virome (Breitbart et al., 2004). This proportion is high but the fraction of inducible lysogen bacteria (0-14%, Danovaro et al, 2008) argues against the prevalence of lysogeny in the sediments while the very few visibly infected bacteria (Bettarel et al., 2006; Filippini et al., 2006; Pradeep Ram et al., 2009) did not agree with the lytic strategy any more. Several methodological biases have been identified (Mei and Danovaro, 2004; Danovaro et al., 2008) which could explain this discrepancy between the prevalence of either viral life cycle: (i) burst of infected cells due to sonication use, (ii) ineffectiveness of mitomycin C as inductor and (iii) continuous induction of the lytic cycle by pollutants from lysogen bacteria. The high abundance of viruses in the sediment without any sign of intensive viral infection of bacteria (low VBR and low infected cells) may originate in the sorption of large particles from the water column and/or in the replication through microalgae. Our results support the latest scenario since the addition of Vp only slightly increased the daily loss of benthic bacteria while the enhanced viral production

at the expense of the MPB diatoms may suggest fluxes of viruses at the water-sediment interface via the MPB biofilm.

### *Impact of viruses on the microphytobenthos*

Microalgae and especially diatoms have already been described as potential hosts for viral multiplication in estuarine benthos and phytoplankton (Hewson et al., 2001b) and in monospecific cultures of planktonic diatoms (Nagasaki, 2008; Eissler et al., 2009) and of the benthic diatom *Navicula* sp. (Suttle et al., 1990). In the Chesapeake bay, 11% of benthic metavirome with viral best hit were assigned to the family Phycodnaviridae (Helton and Wommack, 2009). More specifically in the bay of Marennes-Oléron, there is a strong relationship between Vp and the phytoplankton (Ory et al., 2010). The impact of viruses on the MPB biofilm was complex with different effects of Vp and Vb on the diversity and the photosynthetic activity of the diatom cells. During the first days of infection, Vb modified the abundance of MPB diatoms by promoting the growth of *Navicula* sp. while inhibiting the one of the P-G taxon, the two dominant taxa. In contrast, Vp decreased the abundance of both taxa with a higher impact on the P-G taxon. It appeared thus more sensitive to viral infection (by both Vb and Vp) than *Navicula* sp.. This observation is congruent with the cell-specificity of viruses towards one diatom species (Nagasaki et al., 2004; Nagasaki et al., 2005) and may infer to a selective growth-inhibition of a subset of the microalgal community (Castberg et al., 2001; Hewson et al., 2001b; Larsen et al., 2004). Some species may then benefit from the subsequent lower competition for nutrients and from the higher availability of lysis products.

The selective decline of the community or of a population is likely due to the negative effect of viral infection on the photosynthetic activity of cells as reported before for phytoplankton (Suttle, 1992; Hewson et al., 2001b; Juneau et al., 2003). Indeed, Vb as well as Vp infection of Marennes-Oléron MPB revealed the same feature: a decrease of the photosynthetic efficiency (Fv/Fm). Additionally, Vb infection specifically induced a decrease and slow down of the development of the photoprotective NPQ; this is in contrast to the effect of Vp infection in the bloom-forming raphidophyte *Heterosigma akashiwo* (Juneau et al., 2003). The decrease of NPQ could render the cells more sensitive to environmental stresses, and especially to high light stress (Lavaud et al., 2007). This way, the probability for over-reducing the photosynthetic chain is increased which generates a damaging of the PSII and a decrease of the photosynthetic efficiency. Interestingly, the light intensity and UVB radiations

are important factors controlling algal host-virus interactions (Jacquet and Bratbak, 2003; Baudoux and Brussaard, 2008). This is even more significant that the diatoms and MPB communities are well-known to show a powerful NPQ (Lavaud et al., 2007; Brunet and Lavaud, 2010; Perkins et al., 2010b) Recently it has been demonstrated how in reaction to the inhibition of NPQ, MPB photosynthesis and behaviour are negatively disturbed (Perkins et al., 2010b). Vp generated the highest VP together with the highest impact on MPB biomass and photosynthesis but with no effect on NPQ. Albeit the reduction of the photosynthetic potential, the maintenance of photoprotection may support the permissiveness of cells (or subset) by offering a sufficient energy level to viral replication (Juneau et al., 2003; Baudoux and Brussaard, 2008). In contrast, the viral yield during Vb infection may be limited by the decrease of photoprotection capacity of MPB. These observations support the hypothesis of Baudoux and Brussaard (2008) that diatom species-specific photo-acclimation/-protection capacity (defined according to their habitat of origin, Lavaud et al., 2007) may determine the differential effect of irradiance on viral propagation by influencing the burst-size and/or the latent period.

#### *Microbial interactions within the top-surface of intertidal mudflat sediments*

The functioning of the MPB biofilm of intertidal mudflats is based on complex interactions between the microalgal primary producers and the bacteria (Bruckner et al., 2008; Bruckner et al., 2011). The specific algal-bacterial coupling, as well as the structure of the bacterial community and its remineralisation activity (Glud and Middelboe, 2004; Haynes et al., 2007; Danovaro et al., 2008) has been related to (i) the availability of labile organic matter originated from the detrital matters (Galois et al., 2000), the cellular-derived EPS produced by both microalgae and bacteria (Haynes et al., 2007; Sahan et al., 2007; Bruckner et al., 2008; Bruckner et al., 2011), and the virus-mediated production of DOM (Wilhelm and Suttle, 1999) . The viral abundance itself is influenced by the quality, the size and the age of the aggregates (Weinbauer et al, 2009), here the MPB biofilm. Since the nature of the organic matter may modulate the VPR and the structure of the viral community, the higher the amount of DOM, the higher the viral production in intertidal mudflats. This was confirmed by the level of VPR in February and July 2008 which were contrasted periods in terms of (i) the amount of DOM which was higher in July, (ii) the algal biomass which was more abundant in February, and (iii) the bacterial abundance which was four-fold higher in February.

The VBR has been used as a metric for the magnitude of viral influence within a given microbial ecosystem in relation to the water content (Srinivasiah et al, 2008). The water content has been hypothesised to be one of the main factors determining the encounter rate between viruses and hosts (Weinbauer et al, 2009). In MPB biofilm, the water content relates to the MPB biomass and the amount and composition of the EPS in accordance with the maturation of MPB (Yallop et al, 2000). For the Marennes-Oléron mudflat, like in the soil, VBR was inversely correlated with the water content. At a monthly scale, VPR correlated with VBR but, whatever the season, a net viral production occurred during the emersion concomitantly with the decrease of the water content. Based on water column studies, such positive link between VBR and the viral-mediated lysis has been suggested to be related to the virus-host encounter rate (Winget and Wommack, 2009). In Marennes-Oléron, the VBR fluctuated always inversely to the net bacterial growth, negative or positive. When the net positive growth, probably favoured by EPS, represented more than 24% of the BSS, the VBR tended to decline during the emersion. Based on these results VBR can be validated as a good integrative proxy for the microbial food-web within a complex biofilm. It reflects both the interactions between the different microbial entities, and their respective and joined relationships with the water content and the quality and the quantity of the organic matter. However, not only the amount of but also the nature of the organic matter has to be taken into account for understanding the structure of the biofilm and the interactions between the microbial entities (Bruckner et al, 2008; 2011). Additionally, certain viruses may be able to depolymerise specific EPS enhancing bacterial metabolism and releasing the bacterial receptors sites for viral attack (Sutherland et al, 2004). Nevertheless, we clearly demonstrated the negative impact of viruses onto bacteria since changes in VPR explained 79% of the changes in net bacterial production even though it was delayed compared to VP (power slope = 0.75). This delay sustains the idea of a viral replication through MPB hosts.

## **Experimental procedures**

### *Study site and sampling stations*

Sampling was conducted at low tide at the Brouage mudflat site located at the south end plume of the Charente estuary within the Marennes-Oléron Bay (French Atlantic coast). Intertidal mudflats represent 60% of the bay at low tide (Fig. S3). Particles less than 15  $\mu\text{m}$ ,

clay and fine silt, characterize its mineral composition (Allard et al., 2008). Firstly, a 4 km cross-shore transect was surveyed at three stations (1, 2 and 4, Fig. S1) during the diurnal low tide at different seasons (5 March 2003, 18 June 2003, 30 September 2003 and 1 February 2004). Secondly, five hourly surveys were performed during the diurnal emersion period at the station 2 in 2008. Three cores were taken per each 4-m<sup>2</sup> quadra, randomly chosen in triplicate at each time-point within 320 m<sup>2</sup> of study space in February (19 and 20 February) and 360 m<sup>2</sup> in July (17, 18 and 19 July). Samples were also harvested for in vitro experiment (15 May 2009 and 3 May 2010). In each case, the 1 cm top surface sediment was collected using 150 mm manual coring device. Immediately after sampling, three independent cores were pooled by station (or by quadra) and homogenized before the sub-sampling in triplicate using 5 ml syringe corers; they were then fixed with 4%-formaldehyde (2% final concentration) and freezed (-20°C) one hour later. Water column samples were taken at the sub-surface at high tide at the same day, either on the vertical of station 2 (2003-2004 survey) either at the station E (mouth of the Charente estuary; Auguet et al., 2005) and fixed on board (36%-formaldehyde, 1% final concentration). Samples stored at 4°C were analyzed within the 12 h. In May 2009, the correspondence Weigh/Volume was estimated to  $1.29 \pm 0.02$  g per ml of fresh sediment (n=30), when the water content was  $58.63\% \pm 1.55$  (mean  $\pm$  SD, n=10; range 52-65). Given this water content, 1 ml of fresh sediment weighed after desiccation 0.53 g.

#### *Titration of viruses*

Benthic viruses were extracted, in triplicate, using a protocol adapted from Danovaro et al. (2001) and Hewson et al. (2003). Briefly, 1.0 ml of tetrasodium pyrophosphate (10 mM final) and 4.0 ml of Milli-Q water were added to 400  $\mu$ l of fixed samples defrost at 37°C, followed by 30 min of gentle shaking at 4°C on rocking table and by one centrifugation for 30 min at 1000 g. This procedure (so-called the surfactant treatment) can be occasionally applied two or three more times on the pellet of the remaining settled sediment to test the efficiency of the extractability of the viruses. The successive supernatants were separately quantified, immediately after the recovery. Briefly, 2 ml of final dilution of 400, 200, 20 times in MilliQ-water (from the first to the third supernatant, respectively) were filtered onto an 0.02  $\mu$ m pore-size Anodisc 25 membranes (Whatman) and stained with Sybr-green I (Hennes and Suttle, 1995). Slides were immediately screened for viruses counts (15 fields) under blue illumination.

### *Virus size and morphology*

Viruses were first extracted, in triplicate, using pyrophosphate, rocking shaker and centrifugation like for epifluorescence counts. Supernatants were pooled and ultracentrifuged for 3.5 h at 150000 g (LE 70 Beckman ultracentrifuge, SW 28 rotor) and the pellet resuspended in 100  $\mu$ L of TN buffer (0.02 M Tris-HCl, 0.4 M NaCl, pH 7.4). The shape and size diversity were analysed by TEM. Two grids were prepared per sample by negative staining using 2% phosphotungstate (Montanié et al., 2002). Observations were performed with a Jeol 2011 transmission electron microscope operating at 200kV and calibrated with graphite grids.

### *Bacterial numeration*

Triplicate samples, 5 ml defrost at 37°C, were diluted 2000 times with 10 mM tetrasodium pyrophosphate (serial dilution of 0.5, 10<sup>-1</sup> and 10<sup>-2</sup>) adapted from Blanchard et al (1997). An ultrasonicated subsample (30 s at 60 W, Annemasse sonicator) was filtered onto a 0.2  $\mu$ m black polycarbonate membrane and bacterial cells stained with DAPI (Porter and Feig, 1980) were counted under UV illumination on a Zeiss Axioskop 2 Mot Plus epifluorescence microscope. The accuracy of this method was tested from three samples of sediments in triplicate against two other extraction methods using either cation-exchange resin (Lucas et al., 1996) or methanol (Lunau et al., 2005). In the text, bacteria were meant as prokaryotes (bacterial and archaeal cells).

### *Microphytobenthos (MPB) counts*

Homogenised mud (1 ml) was ten-fold diluted with ultrafiltered seawater, then 0.5 ml were diluted and fixed within 5 ml of alkaline lugol (1% final concentration). Algal cells were counted using a Nageotte chamber counter at x40 magnification on Zeiss Axioskop microscope. MPB diatoms were defined following two groups (Haubois et al., 2005): ‘small cells’ as mainly *Navicula* sp. and ‘large cells’ as mainly *Pleurosigma* and *Gyrosigma* spp., so-called P-G taxon.



*In situ viral production and virus-mediated mortality of bacteria*

In situ viral production was measured during the emersion period by sampling, in triplicate (three independent cores), three randomly chosen quadrats and by evaluating the change of the viral abundance after 3 h. The lytic viral production rate (VPR) was calculated in accordance to Luef et al (2009) as the maximum minus the minimum viral abundance divided by the time elapsed. The virus-mediated mortality of bacteria (as % of bacterial abundance per time unit; Weinbauer et al., 2010) was deduced by dividing the VPR by the burst size (BS) and the bacterial abundance at  $T=0$ , assuming a constant burst-size of 36 (mean value in Corinaldesi et al., 2010).

*In vitro experiment: viral lysis*

Pore-water viruses (so-called ‘benthic viruses’, Vb) were harvested by centrifugation of fresh sediment (1 cm top-surface sediment), followed by filtration through 0.2  $\mu\text{m}$  to eliminate all other microbes. Virus-free pore-water was obtained by ultrafiltration of the virus-rich filtrate using a centrifugation filter device (Centricon Plus-70 Ultracel PL-30, Millipore). Additionally, viruses of the water column (so-called ‘planktonic viruses’, Vp) were isolated from others organisms by filtration of the overlaying seawater through 0.2 $\mu\text{m}$ . Sub-samples of fresh sediment (6 x 2 ml) were incubated in 6-well microplates (Falcon), humidified top-down either by 250  $\mu\text{l}$  of virus-free pore-water (‘Control’) or by 250  $\mu\text{l}$  of benthic viruses or planktonic viruses (‘Vb or Vp treatment’). In May 2010, heat-inactivated Vb (3 times boiled and cooled) has also been tested. The 6-well-microplates were exposed to natural light at ambient temperature in order to maintain the in situ migratory behaviour of MPB cells. Time-series sampling were daily performed in triplicate at the corresponding time of mid low tide in the field (using a 1 ml syringe corers after the homogenization of the well, with a coefficient of variation of 13.41%). The impact of pore-water viruses was estimated on the bacterial compartment during three consecutive days in May 2009 and 2010. Daily viral production and virus-mediated mortality of bacteria was calculated on the concomitant period of bacterial decrease and viral increase (Luef et al., 2009). Total bacterial loss was estimated as the net decrease of abundance (i.e the net bacterial production; Middelboe et al., 2006).

In May 2009, viral lysis activity of Vb was also evaluated on MPB during seven days and compared to the one of Vp. To counteract the possible evaporation of water from the sediment, 250  $\mu\text{l}$  of virus-free pore water was added over each well at  $T=3$  days.

---

*Photosynthetic activity of the MPB in vitro: Maxi-Imaging-PAM chlorophyll fluorescence measurements*

Chlorophyll fluorescence measurements were performed with the Maxi-version of an Imaging-PAM chlorophyll fluorometer (I-PAM, Walz, Effeltrich, Germany) on a 6-well microplate which occupies the total surface of the fluorescence image (10×13 cm; Fig. S2). Three wells (one horizontal row) dedicated to one kind of treatment (control or Vb- or Vp-treatments) allowed for instantaneous triplicate measurements. The photosynthetic activity of the MPB was assessed by rapid light curve (RLC) measurements (Perkins et al., 2010a). RLCs were obtained through the application of a series of 11 sequential short light exposures (20 s) with increasing irradiance from 0 to 1250  $\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . At each irradiance,  $F_m'$  and  $F_t$  were recorded.  $F_m'$ , the maximum fluorescence yield was measured by the application of a saturation pulse (800 ms, 2800  $\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ );  $F_t$ , the steady-state fluorescence was continuously monitored throughout each 20 s light step.  $F_0'$ , the minimum fluorescence yield, was measured at irradiance 0  $\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  by the measuring non-actinic light solely.

Two main parameters were computed from the RLCs: (i)  $\Phi_{\text{PSII}}$ , the effective quantum yield of photosystem II (PSII) was calculated for the 0  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  irradiance as  $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t) / F_m'$ . As no dark-adaptation was performed before the measurement in order to avoid vertical migration of the epipelagic community,  $F_t$  (or  $F_0'$ ) and  $F_m'$  were close to their respective dark-adapted values  $F_0$  and  $F_m$  so that  $\Phi_{\text{PSII}}$  at this irradiance is close to the well-know fluorescence index  $F_v / F_m$ , i.e. the maximum photosynthetic efficiency of PSII (Ralph et al., 2010) and (ii) NPQ, the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence as  $\text{NPQ} = F_m - F_m' / F_m'$  (Ralph et al., 2010). The NPQ kinetics were further measured during a short (5 min) light exposure of 280  $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , which was close to the intensity necessary to saturate photosynthesis ( $249 \pm 50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) for the control MPB biofilm as measured from the RLCs.

*Statistical analysis*

All statistics were performed with Excell software. Bacterial abundance and bacterial loss were regressed against viral abundance and VPR, respectively, using log-transformed data.

## Acknowledgments

This work was partly supported by the French National Research Program PEVS (2000-2006) and is part of the project VASIREMI (2007-2011) funded by the French National Research Agency (ANR-06-BLAN-0393-01). MdC was supported by a Ph.D. fellowship from the National French Institute for Scientific Research (CNRS) and the Region 'Poitou-Charentes'. JL was supported by the CNRS and the French national consortium CPER 'Littoral' (2007-2013) including European FEDER funds. We thank Christine Dupuy for her coordination of the VASIREMI program, M. Bréret for chlorophyll a and DOM analysis, C. Fontaine and four undergraduate students (A. Tchechenko, G. Chereau, E. Goutanier and J. Meilland) for their help in microbial counting. This paper is a contribution to the 'biofilm' work-package of the LIENSs research unit.

## References

- Allard, J., Chaumillon, E., Poirier, C., Sauriau, P.G., and Weber, O. (2008) Evidence of former Holocene sea level in the Marennes-Oléron Bay (French Atlantic coast). *C. R. Geoscience* 340: 306-314.
- Auguet, J.C., Montanié, H., and Lebaron, P. (2006) Structure of Virioplankton in the Charente Estuary (France): transmission electron microscopy versus pulsed field gel electrophoresis. *Microb Ecol* 51: 197-208.
- Auguet, J.C., Montanié, H., Delmas, D., Hartmann, H.J., and Huet, V. (2005) Dynamic of virioplankton abundance and its environmental control in the Charente Estuary (France). *Microb Ecol* 50: 337-349.
- Baker, N. (2008) Chlorophyll Fluorescence: A probe of photosynthesis in vivo. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89-113.
- Baudoux, A.-C., and Brussaard, C.P. (2008) Influence of irradiance on virus-algal host interactions. *J Phycol* 44: 902-908.
- Bettarel, Y., Bouvy, M., Dumont, C., and Sime-NGando, T. (2006) Virus-bacterium Interactions in Water and Sediment of West African Inland Aquatic Systems. *Appl Environ Microbiol* 72: 5274-5282.

Blanchard, G.F., Sauriau, P.G., Cariou-Le Gall, V., Gouleau, D., Garet, M.J., and Olivier, F. (1997) Kinetics of tidal resuspension of microbiota: testing the effects of sediment cohesiveness and bioturbation using flume experiments. *Mar Ecol Progr Ser* 151: 17-25.

Breitbart, M., Middelboe, M., and Rohwer, F. (2008) Marine viruses: community dynamics, diversity and impact on microbial processes. In: *Microbiology Ecology of the Oceans*. Kirchman DL (ed). Wiley-Liss: New-York, : pp. 443-479.

Breitbart, M., Felts, B., Kelley, S., Mahaffy, J., Nulton, J., Salamon, P., and Rohwer, F. (2004) Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. *Proc. R.Soc.Lond.B* 271: 565-574.

Bruckner, C.G., Rehm, C., Grossart, H.-P., and Kroth, P.G. (2011) Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria. *Environ Microbiol* doi 10.1111/j.1462-2920.2010.02411.x.

Bruckner, C.G., Bahulikar, R., Rahalkar, M., Schink, B., and Kroth, P.G. (2008) Bacteria Associated with Benthic Diatoms from Lake Constance: Phylogeny and Influences on Diatom Growth and Secretion of Extracellular Polymeric Substances. *Appl Environ Microbiol* 74: 7740-7749.

Brunet, C., and Lavaud, J. (2010) Can the xanthophyll cycle help extract the essence of the microalgal functional response to a variable light environment? *Journal of plankton research* 32: 1609-1617.

Castberg, T., Larsen, A., Sandaa, R.A., Brussaard, C.P.D., Egge, J.K., Heldal, M. et al. (2001) Microbial population dynamics and diversity during a bloom of the marine coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Haptophyta). *Mar Ecol Prog Ser* 221: 39-46.

Chattopadhyay, S., and Puls, R. (1999) Adsorption of bacteriophages on clay minerals. *Environmental Science and Technology* 33: 3609-3614.

Corinaldesi, C., Dell'Anno, A., Magagnini, M., and Danovaro, R. (2010) Viral decay and viral production rates in continental-shelf and deep-sea sediments of the Mediterranean Sea. *FEMS Microbiol Ecol* 72: 208-218.

Danovaro, R., and Serresi, M. (2000) Viral density and Virus-to-Bacterium Ratio in Deep-Sea Sediments of the Eastern Mediterranean. *Appl Environ Microbiol* 66: 1857-1861.

Danovaro, R., and Middelboe, M. (2010) Separation of free particles from sediments in aquatic systems. In S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer and C.A. Suttle [eds], *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO: 74-81.

Danovaro, R., Manini, E., and Dell'Anno, A. (2002) Higher Abundance of Bacteria than Viruses in Deep Mediterranean Sediments. *Appl Environ Microbiol* 68: 1468-1472.

Danovaro, R., Dell'Anno, A., Serresi, M., and Vanucci, S. (2001) Determination of Virus Abundance in Marine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 67: 1384-1387.

Danovaro, R., Corinaldesi, C., Filippini, M., Fischer, U.R., Gessner, M.O., Jacquet, S. et al. (2008) Viriobenthos in freshwater and marine sediments: a review. *Freshwater Biology* 53: 1186-1213.

Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Magagnini, M., and Danovaro, R. (2009) Determination of viral production in aquatic sediments using the dilution-based approach. *Nature protocols* 4: 1013-1022.

Dowd, S.E., Pillai, S.D., Wang, S., and Corapcioglu, M.Y. (1998) Delineating the Specific Influence of Virus Isoelectric Point and Size on Virus Adsorption and Transport through Sandy Soils. *Appl Environ Microbiol* 64: 405-410.

Drake, L.A., Choi, K.-H., Haskell, A.G.E., and Dobbs, F.C. (1998) Vertical profiles of virus-like particles and bacteria in the water column and sediments of Chesapeake Bay, USA. *Aquat Microbial Ecol* 16: 17-25.

Eissler, Y., Wang, K., Chen, F., Wommack, K., and Coats, D. (2009) Ultrastructural characterization of the lytic cycle of an intranuclear virus infecting the diatom *Chaetoceros cf. wighamii* (Bacillariophyceae) from Chesapeake bay, USA. *J Phycol* 45: 787-797.

Filippini, M., Buesing, N., Bettarel, Y., Sime-Ngando, T., and Gessner, M.O. (2006) Infection Paradox: High Abundance but low Impact of Freshwater Benthic Viruses. *Appl Environ Microbiol* 72: 4893-4898.

Fuhrman, J.A. (1999) Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects. *Nature* 399: 541-548.

Galois, R., Blanchard, G.F., Seguignes, M., Huet, V., and Joassard, L. (2000) Spatial distribution of sediment particulate organic matter on two estuarine intertidal mudflats: a comparison between Marenns-Oléron Bay (France) and the Humber Estuary (UK). *Continental Shelf Research* 20: 1199-1217.

Gastrich, M.D., Leigh-Bell, J.A., Gobler, C.J., Anderson, O.R., Wilhelm, S.W., and Bryan, M. (2004) Viruses as potential regulators of regional brown tide blooms caused by the alga, *Aureococcus anophagefferens*. *Estuaries* 27: 112-119.

Gerba, C.P. (1984) Applied and Theoretical Aspects of Virus Adsorption to Surfaces. *Advances in Applied Microbiology* 30: 133-168.

Gerba, C.P., and Schaiberger, G. (1975) Effect of particulates on virus survival in seawater. *Journal Of Water pollution control federation* 47: 93-103.

Gerbersdorf, S.U., Westrich, B., and Paterson, D.P. (2009) Microbial Extracellular Polymeric Substances (EPS) in Fresh Water Sediments. *Microb Ecol* 58: 334-349.

Glud, R., and Middelboe, M. (2004) Virus and bacteria dynamics of a costal sediment: Implication for benthic carbon cycling. *Limnol Oceanogr* 49: 2073-2081.

Hambly, E., and Suttle, C.A. (2005) The virosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. *Current Opinion in Microbiology* 8: 444-450.

Haubois, A.-G., Sylvestre, F., Guarini, J.-M., Richard, P., and Blanchard, G.F. (2005) Spatiotemporal structure of the epipelagic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France

*Est Coast Shelf Sci* 64: 385-394.

Haynes, K., Hofmann, T., Smith, C., Ball, A., Underwood, G., and Osborn, A. (2007) Diatom-Derived Carbohydrates as factors Affecting Bacterial Community Composition in Estuarine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 73: 6112-6124.

Helton, R., and Wommack, K. (2009) Seasonal Dynamics and Metagenomic Characterization of Estuarine Viriobenthos Assemblages by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR. *Appl Environ Microbiol* 75: 2259-2265.

Helton, R., Liu, L., and Wommack, K. (2006) Assessment of Factors Influencing Direct Enumeration of Viruses within Estuarine Sediments. *Appl Environ Microbiol* 72: 4767-4774.

Hennes, K., and Suttle, C.A. (1995) Direct counts of viruses in natural waters and laboratory cultures by epifluorescence microscopy. *Limnol Oceanogr* 40: 1050-1055.

Herlory, O., Richard, P., and Blanchard, G.F. (2007) Methodology of light response curves: application of chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms

*Marine biology* 153: 91-101.

Herlory, O., Guarini, J.-M., Richard, P., and Blanchard, G.F. (2004) Microstructure of microphytobenthic biofilm and its spatio-temporal dynamics in an intertidal mudflat (Aiguillon Bay, France). *Mar Ecol Progr Ser* 282: 33-44.

Hewson, I., and Fuhrman, J.A. (2003) Viriobenthos Production and Virioplankton Sorptive Scavenging by Suspended Sediment Particles in Coastal and Pelagic Waters. *Microbial Ecology* 46: 337-347.

Hewson, I., and Fuhrman, J.A. (2007) Covariation of viral parameters with bacterial assemblage richness and diversity in the water column and sediments. *Deep Sea Research I* 54: 811-830.

Hewson, I., Vargo, G.A., and Furhman, J.A. (2003) Bacterial diversity in shallow oligotrophic marine benthos and overlying waters : effects of virus infection, containment, and nutrient enrichment. *Microb Ecol* 46: 322-336.

Hewson, I., O'Neil, J.M., Fuhrman, J.A., and Dennison, W.C. (2001a) Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries. *Limnol Oceanogr* 46: 1734-1746.

Hewson, I., JM, O.N., Heil, C.A., Bratbak, G., and Dennison, W.C. (2001b) Effects of concentrated viral communities on photosynthesis and community composition of co-occurring benthic microalgae and phytoplankton. *Aquat Microb Ecol* 25: 1-10.

Jacquet, S., and Bratbak, G. (2003) Ultraviolet radiation on marine virus-phytoplankton interactions. *FEMS Microbial Ecol* 44: 279-289.

Juneau, P., Lawrence, J., Suttle, C.A., and PJ, H. (2003) Effets of viral infection on photosynthetic processes in the bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. *Aquatic Microbial Ecology* 31: 9-17.

Larsen, A., Fonnes, G.A., Sandaa, R.A., Castberg, T., Thyrrhaug, R., Erga, S. et al. (2004) Spring phytoplankton bloom dynamics in Norwegian coastal waters: Microbial community succession and diversity. *Limnol Oceanogr* 49: 180-190.

Lavaud, J., Strzepek, R., and Kroth, P. (2007) Photoprotection capacity differs among diatoms: possible consequences on the spatial distribution of diatoms related to fluctuations in the underwater light climate. *Limnology and Oceanography* 52: 1188-1194.

Lucas, F., Meziane, T., Bertru, G., and Retière, C. (1996) Bacteria of sediments : Extraction and distribution in a macrotidal mudflat (Bay of Saint-Michel). *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series III* 319: 537-542.

Luef, B., Luef, F., and Peduzzi, P. (2009) Online program "Vipcal" for calculating lytic viral production and lysogenic cells based on a viral reduction approach. *Environ Microbiol Reports* 1: 78-85.

Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., Martens-Habbena, W., and Simon, M. (2005) An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environ Microbiol* 7: 961-968.

Mei, M.L., and Danovaro, R. (2004) Virus production and life strategies in aquatic sediments. *Limnol Oceanogr* 49: 459-470.

Middelboe, M., and Glud, R. (2003) Distribution of viruses and bacteria in relation to diagenetic activity in an estuarine sediment. *Limnol Oceanogr* 48: 1447-1446.

Middelboe, M., Glud, R., Wenzhöfer, F., Oguri, K., and Kitazato, H. (2006) Spatial distribution and activity of viruses in the deep-sea sediments of Sagami Bay, Japan. *Deep Sea Research I* 53: 1-13.

Montanié, H., Hartmann, H.J., Crottereau, C., and Trichet, C. (2002) Virus Like Particle analysis in a seston-rich coastal pond using Transmission Electron Microscopy. *Aquat Microb Ecol* 28: 105-115.

Nagasaki, K. (2008) Dinoflagellates, Diatoms, and their Viruses. *The Journal of Microbiology* 46: 235-243.

Nagasaki, K., Tomaru, Y., Katanozaka, Y., Shirai, Y., Nishida, K., Itakura, S., and Yamaguchi, M. (2004) Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia setigera*. *Appl Environ Microbiol* 70: 704-711.

Nagasaki, K., Tomaru, Y., Takao, Y., Nishida, K., Shirai, Y., Suzuki, H., and Nagumo, T. (2005) Previously unknown virus infects marine diatoms. *Appl Environ Microbiol* 71: 3528-3535.

Ory, P., Hartmann, H.J., Jude, F., Dupuy, C., Del Amo, Y., Catala, P. et al. (2010) Pelagic food web patterns: Do they modulate virus and nanoflagellate effects on picoplankton during the phytoplankton spring bloom? *Environ Microbiol* 12: 2755-2772.

Oxborough, K. (2004) Imaging of chlorophyll a fluorescence: Theoretical and practical aspects of an emerging technique for the monitoring of photosynthetic performance. *Journal of experimental Botany* 55: 1195-1205.

Pascal, P.-Y., Dupuy, C., Richard, P., Mallet, C., Armynot du Châtelet, E., and Niquil, N. (2009) Seasonal variation in consumption of benthic bacteria by meio- and macrofauna in an intertidal mudflat. *Limnol Oceanogr* 54: 1048-1059.

Perkins, R., Kromkamp, J., Serôdio, J., Lavaud, J., Jesus, B., Mouget, J. et al. (2010a) The application of variable chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. In *Chlorophyll a fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications. Developments in Applied Phycology* 4. Suggett DJ, Prasil O, Borowitzka, MA (eds). Springer Science pp. 237-275.

Perkins, R., Lavaud, J., Serôdio, J., Mouquet, J., Cartaxana, P., Rosa, P. et al. (2010b) Vertical cell movement is a primary response of intertidal benthic biofilms to increasing light dose. *Marine Ecology Progress Series* 416: 93-103.

Porter, K., and Feig, Y. (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol Oceanogr* 25: 943-948.



Pradeep Ram, A., Sabart, M., Latour, D., and Sime-Ngando, T. (2009) Low effect of viruses on bacteria in deep anoxic water and sediment of a productive freshwater reservoir. *Aquat Microb Ecol* 55: 255-265.

Ralph, P., Wilhelm, C., Lavaud, J., Jakob, T., Petrou, K., and Kranz, S. (2010) Fluorescence as an assay to understand aspects of the physiology of light regulation. Fluorescence as an assay to understand aspects of the physiology of light regulation. In Sugget D, Prasil O, Borowitzka MA (eds) *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*, Series: *Developments in Applied Phycology* Vol. 4-Chapter 4, Springer.

Rohwer, F., and Edwards, R. (2002) The Phage Proteomic Tree: a Genome-Based Taxonomy for Phage *Journal Of Bacteriology* 184: 4529-4535.

Sahan, E., Sabbe, K., Creach, V., Hernandez-Raquet, G., Vyverman, W., Stal, L., and Muyser, G. (2007) Community structure and seasonal dynamics of diatom biofilms associated grazers in intertidal mudflats. *Aquat Microb Ecol* 47: 253-266.

Sutherland, I., Hughes, K., Skillman, L., and Tait, K. (2004) The interactions of phage and biofilms. *FEMS Microbial Letters* 232: 1-6.

Suttle, C. (1992) Inhibition of photosynthesis in phytoplankton by the submicron size fraction concentrated from seawater. *Mar Ecol Prog Ser* 87: 105-112.

Suttle, C., Chan, A., and Cotrell, M. (1990) Infection of Phytoplankton by viruses and reduction of primary productivity. *Nature (London)* 347: 467-469.

Suttle, C.A. (2005) Viruses in the sea. *Nature* 437: 356-361.

Suttle, C.A. (2007) Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nature Reviews, Microbiology* 5: 801-812.

Taylor, G.T., Hein, C., and Iabichella, M. (2003) Temporal variations in viral distributions in the anoxic Cariaco Basin. *Aquat Microb Ecol* 30: 103-116.

Thingstad, F., and Lignell (1997) A theoretical approach to the question of how trophic interactions control carbon demand, growth rate, abundance, and diversity. *Aquat Mar Ecol* 13: 19-27.

Torsvik, V., Ovreas, L., and Thingstad, T.F. (2002) Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296: 1064-1066.

Weinbauer, M. (2004) Ecology of prokaryotic viruses. *FEMS Microbiology Reviews* 28: 127-181.

Weinbauer, M., Rowe, J., and Wilhelm, S.W. (2010) Determining rates of virus production in aquatic systems by the virus reduction approach. In S.W. Wilhelm, M.G. Weinbauer and C.A. Suttle [eds], *Manual of Aquatic Viral Ecology*. ASLO: 1-8.

Weinbauer, M., Bettarel, Y., Cattaneo, R., Luef, B., Maier, C., and Motegi, C. (2009) Viral ecology of organic and inorganic particles in aquatic systems: avenues for further research. *Aquatic Microbial Ecology* 57: 321-341.

Wilhelm, S.W., and Suttle, C.A. (1999) Viruses and Nutrient Cycles in the Sea. *Bioscience* 49: 781-788.

Winget, D., and Wommack, K. (2009) Diel and daily fluctuations in virioplankton production in coastal ecosystems. *Environ Microbiol* 11: 2904-2914.

Winter, C., Bouvier, T., Weinbauer, M., and Thingstad, F. (2010) Trade-offs between Competition and Defense Specialists among Unicellular Planktonic Organisms: the "Killing the Winner" Hypothesis Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74: 42-57.

Yallop, M., Paterson, D.M., and Wellsbury, P. (2000) Interrelationship between Rates of Microbial Production, Exopolymer Production, Microbial Biomass, and Sediment Stability in Biofilms of Intertidal Sediments. *Microb Ecol* 39: 116-127.

Legends:

	Control	Virus-treated Vb	Virus-treated Vp
$F_v/F_m$	$0.71 \pm 0.01$	$0.65 \pm 0.01$	$0.63 \pm 0.01$
NPQ	$1.35 \pm 0.01$	$1.15 \pm 0.04$	$1.30 \pm 0.03$

Table 1: Photosynthetic parameters of control (not treated) and virus-treated microphytobenthic biofilm after five day infection.  $F_v/F_m$  = the maximum photosynthetic efficiency of PSII. NPQ = the non-photochemical fluorescence quenching measured at a light intensity of  $280 \mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  known to saturate the photosynthetic electron transport rate (rETR) for the control biofilm (the light intensity for reaching rETR<sub>max</sub>,  $E_m = 249 \pm 50 \mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Values are mean  $\pm$  SD of three measurements.

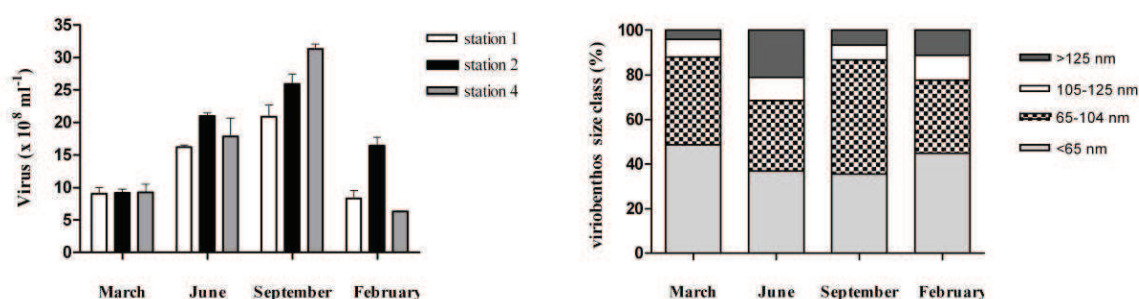


Fig. 1. Monthly survey of Viriobenthos at the diurnal emersion period of the Brouage mudflat: A: abundance along a 4 km cross-shore transect (stations 1 to 4); mean  $\pm$  SE. B: Distribution of viruses by size classes of capsids; mean of the three stations surveyed.

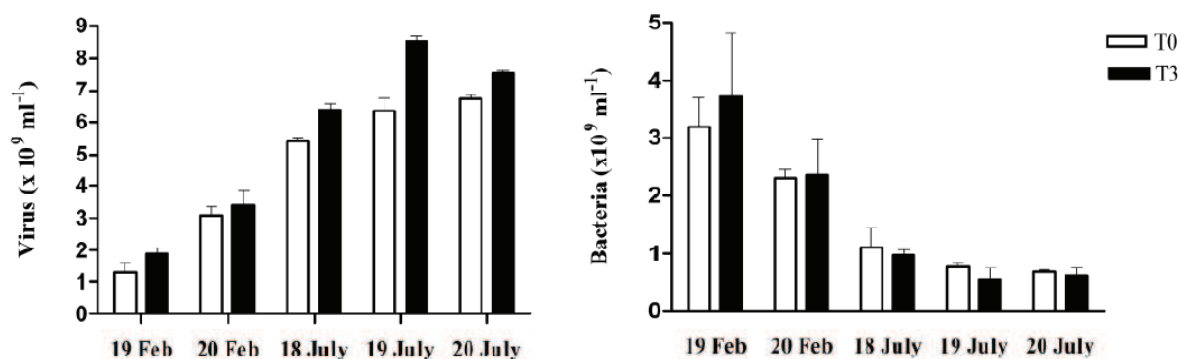


Fig. 2. Hourly survey of viriobenthos and bacteriobenthos during the diurnal emersion period in February and July 2008. Abundance at the beginning of the emersion and 3 hours later at the station 2 of the transect; mean of triplicated samples of three randomly chosen quadrats  $\pm$  SE.

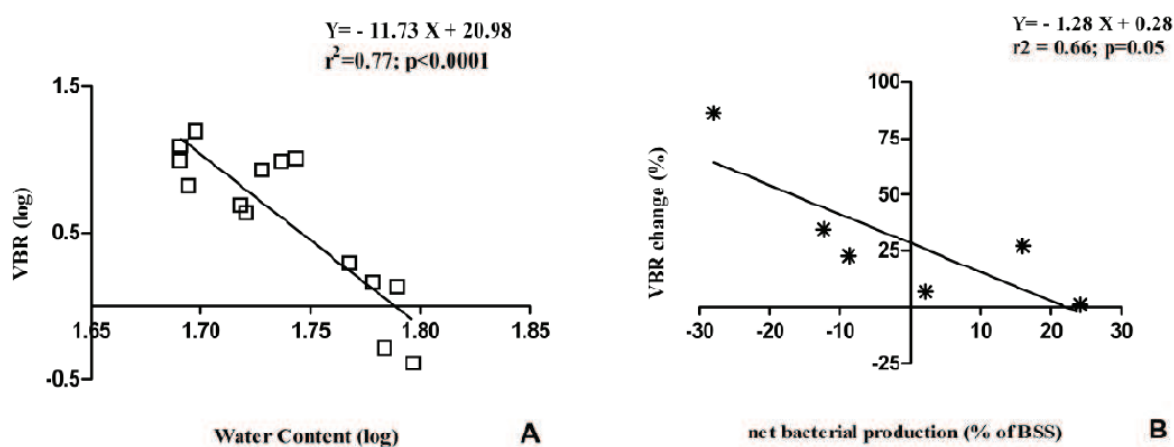


Fig. 3. In situ Virus to Bacteria ratio (VBR) in top-surface sediment: (A) Log/log relationship between VBR and the water content of the sediment, established with data averaged from triplicates samples of February and July 2008, (B) Relationship between the variation of VBR within the 3 hours of emersion and the net bacterial production (% of bacterial stock standing).

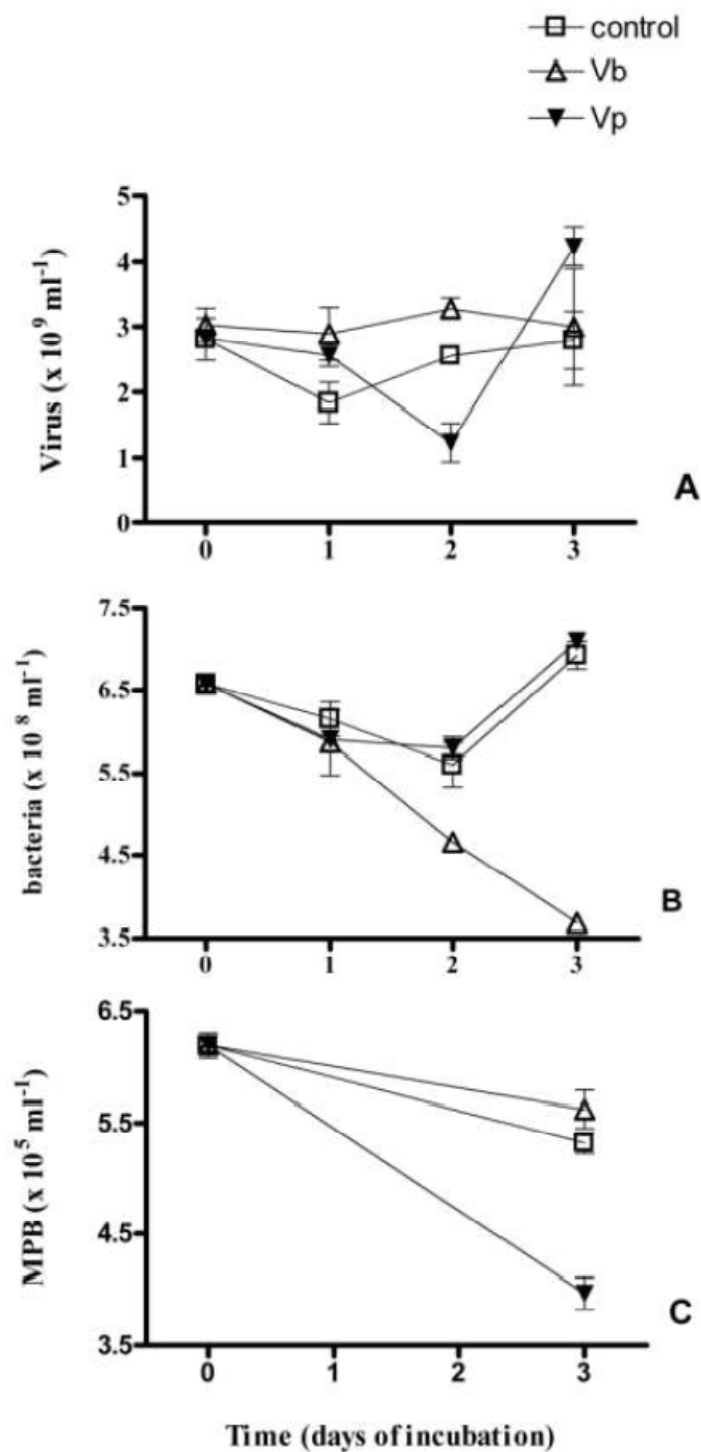


Fig. 4. Viral inoculation of a top-surface sediment in microplates, in May 2009. Virioplankton (Vp) and Viriobenthos (Vb) has been tested and the two treatments were compared to the control one. Time series over 3 days of abundance of (A)Virus, (B) Bacteria and (C) Microphytobenthos. Mean  $\pm$  SE of three well-samplings.

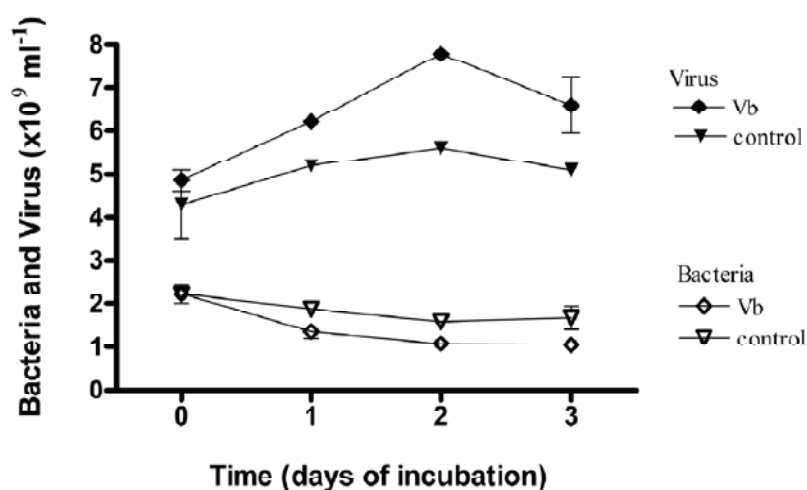


Fig. 5. Viriobenthos inoculation of a top-surface sediment in microplates, in May 2010. Viriobenthos (Vb) treatment has been tested in comparison with the non-amended control one. Time series over 3 days of abundance of Virus and Bacteria; mean  $\pm$  SE of three well-samplings.

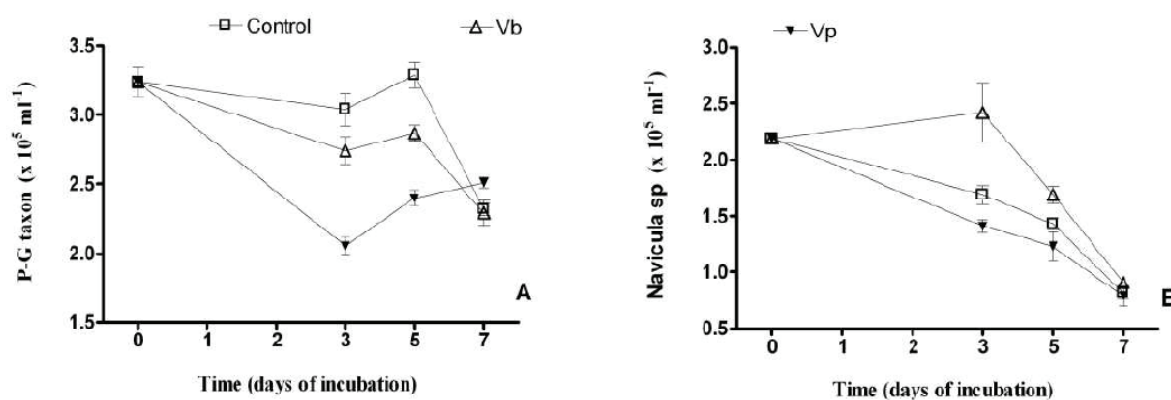


Fig. 6. Viral inoculation of a top-surface sediment maintained in microplates, in May 2009. Virioplankton (Vp) and Viriobenthos (Vb) has been tested and the two treatments were compared to the control one. Time series over 7 days of abundance of the dominant taxa of Microphytobenthos, (A) *Navicula* sp and (B) *Gyrosigma-Pleurosigma* taxon. Mean  $\pm$  SE of three well-samplings.

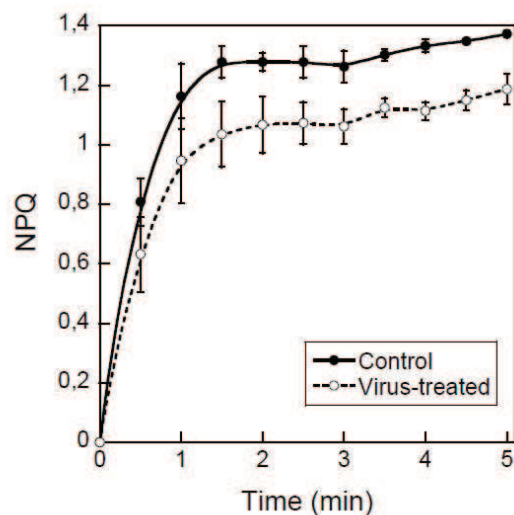


Fig. 7. Kinetics of non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) development at a light intensity of  $280 \mu\text{mol}\cdot\text{photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  of control (not treated) and viriobenthos (Vb)-treated microphytobenthic biofilm at five days post inoculation. Bioassays performed in microwells with maintained top-surface sediment, in May 2009.

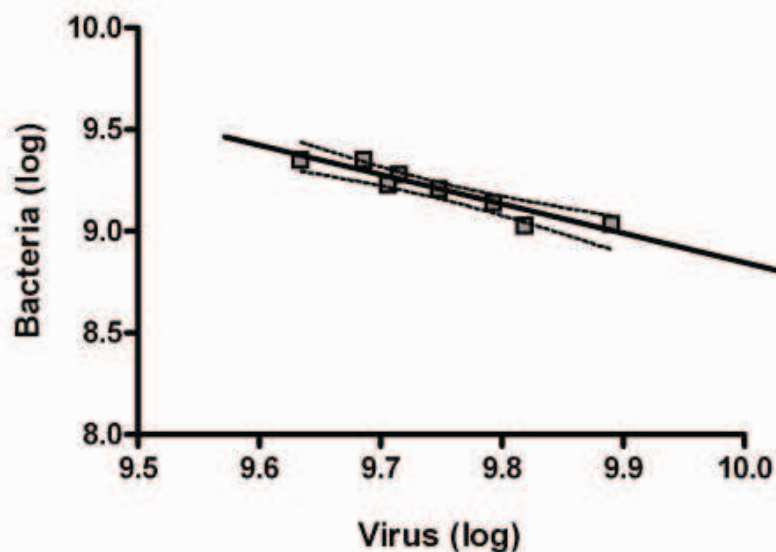


Fig. S1. In vitro (log-log) relationship between the bacteriobenthos and the viriobenthos along the 3 days of incubation of the viral-treated and non-treated wells, in May 2010. Data are averaged from triplicated wells, independently sampled for virus and bacteria.

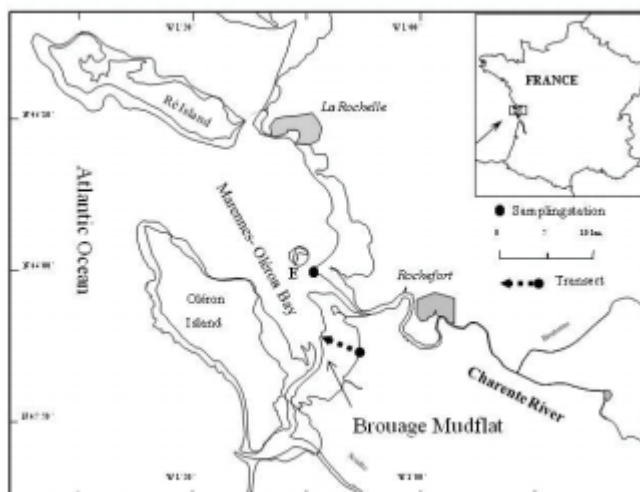


Fig. S2. Map of the cross-shore transect onto the Brouage mudflat in the Marennes-Oléron Bay.

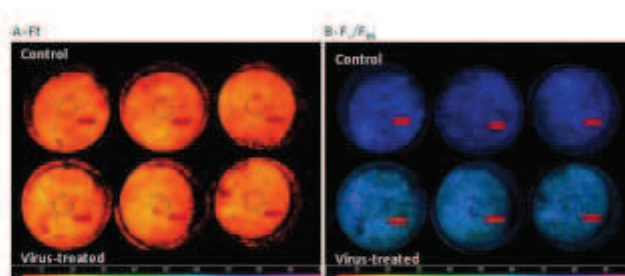


Fig. S3. False colour images of chlorophyll fluorescence and photosynthetic parameters obtained with a Maxi-Imaging-PAM fluorometer of non-treated ('control') and virus-treated (with Vb, five day infection) microphytobenthic biofilm in a 6-well microplate. Ft is the basal chlorophyll fluorescence which illustrates the microphytobenthic biomass, Fv/Fm is the maximum photosynthetic efficiency of photosystem II (PSII). Although Ft was similar in non-treated and virus-treated sediments, the Fv/Fm was clearly lower in the virus-treated sediments as illustrated by a blue light colouring compared to the strong light colouring of 'control' wheels.





*ANNEXE 3*

*Facteurs contrôlant la production bactérienne dans les vasières intertidales du Bassin de Marennes-Oléron (Charente-maritime): rôles des substances exopolymériques*

De Crignis Margot. Colloque des doctorants de 2ème année, La Rochelle, France (2009)





de CRIGNIS  
Margot

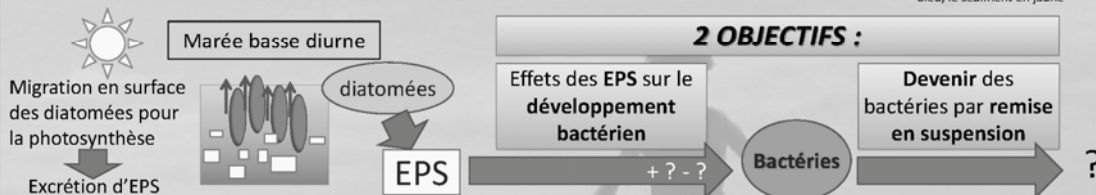
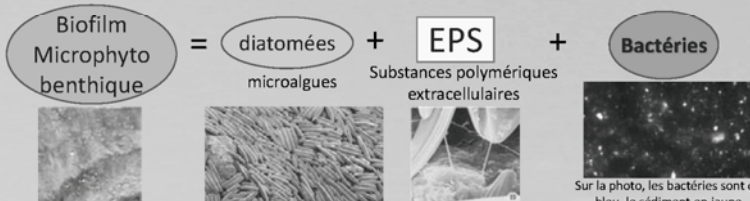
Laboratoire LIENSs  
Directrice de thèse: C. Dupuy  
Co-directeur: F. Orvain



# Facteurs contrôlant la production bactérienne dans les vasières intertidales du bassin de Marennes-Oléron (Charente-maritime) : rôle des substances exopolymériques

## Contexte

Vasières = conditions difficiles car très variables : alternance des marées, nyctémère, saisons... pourtant : **production primaire très forte** via la formation du **BIOFILM microphytobenthique** qui abrite des quantités très élevées de **bactéries** et d'**EPS**.

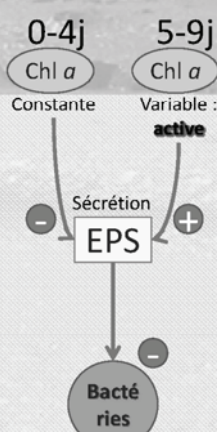
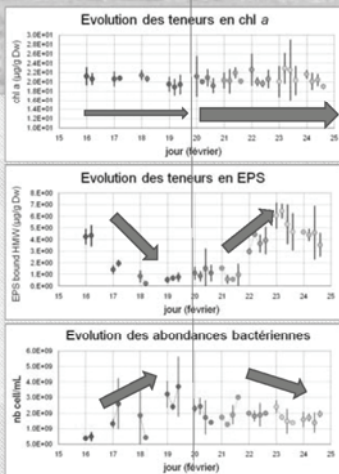


## Premiers résultats

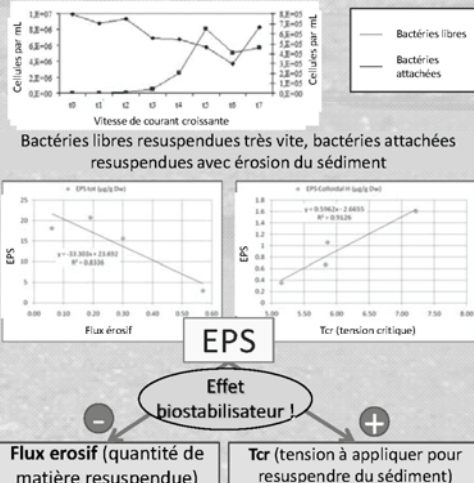
Suivi terrain (9 jours en février 2008) à marée basse et érodimétrie



### Facteurs influençant la production bactérienne



### Devenir des bactéries par remise en suspension (érodimétrie)



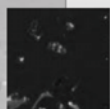
## Conclusion préliminaire

les EPS sécrétées par les diatomées actives dans le biofilm semblent avoir un effet inhibiteur sur le développement bactérien; elles contribuent également à stabiliser le sédiment, et limiteraient donc la remise en suspension des bactéries attachées aux grains sédimentaires.

## Perspectives



Analyses des données du suivi terrain  
15 jours juillet 2008



Suivi des interactions diatomées-EPS-bactéries à micro-échelle et conditions contrôlées  
Microscopie confocale



Suivi des interactions diatomées-EPS-bactéries en conditions contrôlées (dont suivi marée haute)  
Suivi en mésocosme



*ANNEXE 4*

*Resuspension of sediment prokaryotic communities during physical erosion  
process: an experimental approach*

Mallet C, Agogué H, Bonnemoy F, De Crignis M, Guizien K, Orvain F, Dupuy C. UOF 2009,  
Piran, Slovénie (2009)



# Resuspension of sediment prokaryotic communities during physical erosion process: an experimental approach

Clarisse Mallet<sup>1</sup>, Hélène Agogue<sup>2</sup>, Frédérique Bonnemoy<sup>1</sup>, Margot De Crignis<sup>2</sup>, Katell Guizien<sup>3</sup>, Francis Orvain<sup>4</sup>, Christine Dupuy<sup>2</sup>



<sup>1</sup> Laboratoire LMGE, UMR 6023, Université de Clermont-Ferrand, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France  
<sup>2</sup> Laboratoire LIENS, UMR 6250, Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle Cedex, France  
<sup>3</sup> Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, CNRS UMR7621, 66650 Banyuls-sur-Mer, France  
<sup>4</sup> Laboratoire de PE2M, Université de Caen - Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex, France



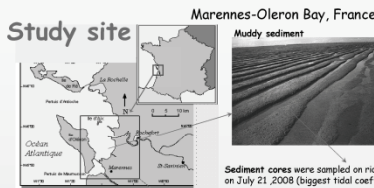
This work was supported by the French ANR (National Research Agency) through the VASIREMI project "Trophic significance of microbial biofilms in tidal flats" (contract ANR-06-BLAN-0393-01).

## Aim

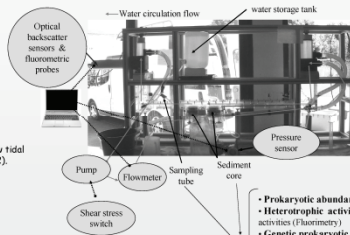
Sediment resuspension into the water column is affected by bed shear stress depending on hydrodynamic forcing and erodibility depending of the properties of the sediment and of the biota. Fate and role of sediment prokaryotic communities in the water column are still poorly known and only few studies have addressed the prokaryotic resuspension and the benthic-pelagic fluxes of organic matter in coastal ecosystems.

The objective of this study is to evaluate the resuspension of the prokaryotic community belonging the microphytobenthic biofilm into the water column. For the first time, the abundance, physiological states, heterotrophic activities and diversity of the prokaryotic cells were studied during this important event.

## Material & methods



### The portable erosion device (ERIS) / Erodimeter



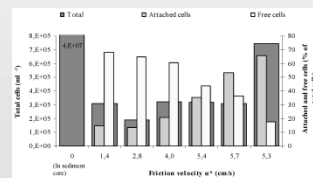
The ERIS system was developed to evaluate the erosion shear stress of *in situ* cohesive sediments. Incremental shear stresses are applied to the mud surface and the bed erosion is monitored by changes in water column turbidity and chlorophyll *a* concentration. Two sediment cores were placed in the ERIS which was filled with 0.2  $\mu$ m filtered seawater. During an erosion test, the flow discharge is progressively increased in small steps (each step was of  $\approx$  10 min duration) until a turbidity jump is observed. This corresponds to the material eroding from the bed and mixing into the recirculating volume. Further increases in the applied shear stress result in further sediment being eroded from the bed surface from which the rate of erosion ( $u^*$  in  $cm \cdot s^{-1}$ ) can be calculated. The pressure difference, DP, is measured between the downstream and upstream positions in the chamber. Bed shear stress estimates are calculated independently for each experimental run, based on DP.

✓ 6 different steps (S1-S6), corresponding to different velocity friction ( $u^*$ ), were sampled:  
 S1-S2 ( $u^* < 3$  cm/s) = rising tide without waves.  
 S3-S6 rising tide with waves (or "gale") = high velocity friction ( $u^* > 4$  cm/s).

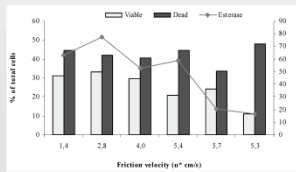
✓ In the sediment core and at 6 different steps (S1-S6), sediment and water samples were made for further analyzes:

- **Prokaryotic abundance and physiological states:** Flow cytometry (Sybgreen (SG) - propidium iodide (PI))
- **Heterotrophic activities:** esterase activity (flow cytometry: CFDA + PI) and leucine aminopeptidase (Leu) + beta-glucosidase (Muf) activities (Fluorometry)
- **Genetic prokaryotic diversity:** PCR-DGGE (Bacteria primers: 968F-1401r, Archaea primers: 934F-1386r; 8% polyacrylamide gels in 1x TAE. Denaturant gradients: 40 to 60%. Electrophoresis: 60°C for 16 h at 100V).
- **Cloning and sequencing:** two samples (corresponding to the highest ribotypes pattern for Bacteria and Archaea) were cloned and subsequently digested with the restriction enzyme HaeIII. The partial 16S rDNA sequences obtained from 32 and 34 clones of Bacteria and Archaea respectively, were compared to sequences of the GenBank database to determine their phylogenetic affiliation.

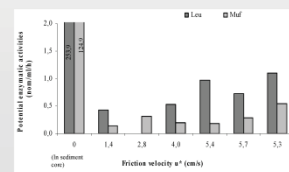
## Prokaryotic abundances and activities



Few prokaryotic cells were resuspended (only 2% at the highest friction velocity). Enrichment started with free cells (64% of the total cells) until step 4 ( $u^* = 5.4$ ) where the proportion of free and attached cells were inverted.



Among these cells, 40% were dead or damaged. This percentage increased only at the last step (47%). Viable cells (30% of the total cells) until step 4 ( $u^* = 5.4$ ) where the proportion of free and attached cells were inverted. The percentage of esterase activity decreased slowly until the end (11%) as for the heterotrophic activity.

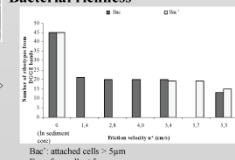


Leucine aminopeptidase and beta-glucosidase activities were lower than those in the sediment. During the erosion experiment, the highest values were obtained for the last step.

## Prokaryotic community structure



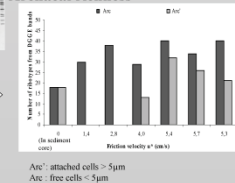
### Bacterial richness



Bac<sup>+</sup>: attached cells - 5  $\mu$ m  
 Bac<sup>-</sup>: free cells - 5  $\mu$ m

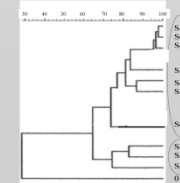
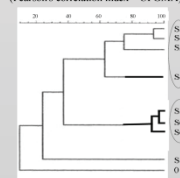


### Archaeal richness



Arch<sup>+</sup>: attached cells - 5  $\mu$ m  
 Arch<sup>-</sup>: free cells - 5  $\mu$ m

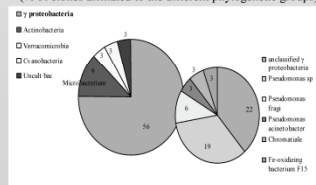
### Dendrograms generated by cluster analysis (Pearson's correlation index - UPGMA)



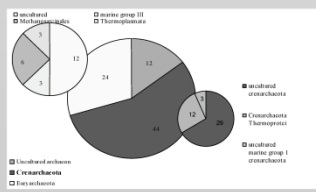
- bacterial ribotype richness lower during the experiment
- bacterial richness is stable and start to decrease at the end of the experiment (for the 2 fractions)
- 2 main clusters ("first steps" cluster and "last steps" cluster)
- sediment and step 1 samples are outgrouped

- archaeal ribotype richness higher during the experiment compare to the sediment sample
- < 5  $\mu$ m fraction: highest number of bands
- 2 main clusters
- sediment sample: outgroup

## Bacterial and archaeal phylogenetic analysis (% of clones affiliated to the different phylogenetic groups)



- Proteobacteria: most abundant group
- Prevalence of Gammaproteobacteria (uncultured and Pseudomonadales)



- Crenarchaeota: most abundant group
- Prevalence of non-assigned Crenarchaeota
- Most abundant Euryarchaeota: non-assigned ones and Methanomicrobium (Methanosarcinales).

## Conclusions

This first experiment on prokaryote resuspension, during rising tide, shows us interesting results.

- During normal rising tide (S1-S2,  $u^* < 3$  cm/s): only few prokaryotes are resuspended and essentially in free cells and well physiological states. These active cells are probably a little stressed (high esterase activity values and low potential proteolytic and glycolytic activities and can integrate the pelagic microbial communities).
- During "gale" (S3-S6,  $u^* > 4$  cm/s): most particles are resuspended (essentially dead cells which release hydrolytic enzymes contributing to the organic matter remineralization and play an important role in the trophic network).
- Whatever the friction velocity, few sediment bacterial cells enrich the water column, contrary to the archaeal ones. As in other tidal ecosystems, Gammaproteobacteria, known to play important role in sulfate metabolisms in marine sediment, dominate the community. Crenarchaeota, like in marine benthic and anoxic sediments, is the most represented archaeal group. Most of Euryarchaeota are clustering into methanogen groups, implying active methanogenic and heterotrophic processes in tidal flat. (Other investigations will be done on other erosion experiments at different tidal coefficients and we will integrate the sulfato-reducing bacteria).





*ANNEXE 5*

*Remise en suspension des communautés prokaryotes du sédiment au cours d'un évènement d'érosion: approche expérimentale en érodimétrie*

Mallet C, Agogué H, Bonnemoy F, De Crignis M, Guizien K, Orvain F, Dupuy C. SFM, Marseille, France (2010)

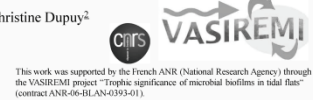


# REMISE EN SUSPENSION DES COMMUNAUTÉS PROCARYOTES DU SÉDIMENT AU COURS D'UN ÉVÉNEMENT D'ÉROSION : APPROCHE EXPÉRIMENTALE EN ÉRODIMÉTRIE

Clarisse Mallet<sup>1</sup>, Hélène Agogue<sup>2</sup>, Frédérique Bonnemoy<sup>1</sup>, Margot De Crignis<sup>2</sup>, Katell Guizien<sup>3</sup>, Francis Orvain<sup>4</sup>, Christine Dupuy<sup>2</sup>



<sup>1</sup>Laboratoire LMGE, UMR 6023, Université de Clermont-Ferrand, 24, avenue des Landais, 63177 Aubière Cedex, France  
<sup>2</sup>Laboratoire LEENS, UMR 6256, Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle Cedex, France  
<sup>3</sup>Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, CNRS UMR7621, 66650 Banyuls-sur-Mer, France  
<sup>4</sup>Laboratoire de PE2M, Université de Caen – Esplanade de la paix, 14032 Caen Cedex, France



## Contexte

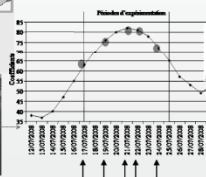
Les vasières intertidales de Marennes-Oléron, soumises aux rythmes des marées, sont le lieu d'une forte production primaire. Un biofilm microphytobenthique (diatomées) s'y forme à marée basse puis est partiellement remis en suspension à marée haute. Ainsi, une des principales questions concernant le fonctionnement de ces écosystèmes tidaux, est de déterminer la contribution de ce réseau trophique benthique au réseau trophique planctonique car à l'heure actuelle peu d'informations sont disponibles sur le devenir de cette forte production benthique et donc son rôle dans la productivité de ces écosystèmes.

L'érosion des microorganismes de ce biofilm dépend de la force des marées, des vagues et des propriétés d'érodabilité du sédiment (liée à sa résistance à l'érosion). Ces propriétés sont dépendantes des propriétés du sédiment, de la méiofaune présente, du microphytobenthos et de la quantité et qualité des exopolymères (EPS) qu'il sécrète.

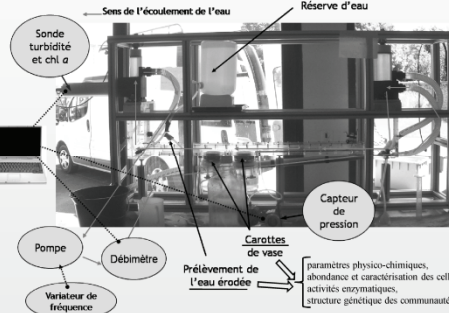
Bat de cette étude est de mieux comprendre le fonctionnement particulier du biofilm et son éventuel impact sur les processus écologiques planctoniques. Aussi nous avons essayé de quantifier les conditions physiques permettant la remise en suspension du biofilm et les microorganismes érodés par une approche expérimentale en érodimétrie.

## Site d'étude

Baie intertidale de Marennes-Oléron, France



## Erodimètre portatif ERIS



## Matériel & méthodes

L'érodimètre ERIS a été développé afin d'évaluer les contraintes de cisaillement (= taux d'érosion =  $u^*$  exprimé en  $cm.s^{-1}$ ) qui s'exercent *in situ* à la surface du sédiment de type vase. Les effets cumulatifs des forces de cisaillement appliquées à la surface du sédiment et la couche érodée sont contrôlés par des mesures de turbidité et de concentrations en chlorophylle *a* dans la colonne d'eau.

Deux carottes sont placées dans l'érodimètre rempli d'eau de mer filtrée sur 0.2  $\mu m$ . Tout au long de l'expérience, le flux d'eau circulant dans la chambre d'érosion est progressivement augmenté par paliers d'environ 10 mm chacun (temps nécessaire pour que l'augmentation de la turbidité soit observée).

✓ 6 paliers différents (S1-S6), correspondant à différentes vitesses de friction ( $u^*$ ), ont été échantillonnés:

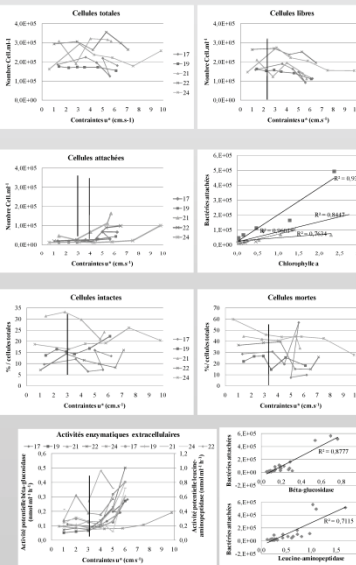
- S1-S2 ( $u^* < 3 cm.s^{-1}$ ) = marée montante sans vague;
- S3-S6 marée montante avec vagues (ou tempête) = fortes vitesses de friction ( $u^* > 4 cm.s^{-1}$ ).

## Paramètres chimiques et biologiques des sédiments

### Communautés procaryotes:

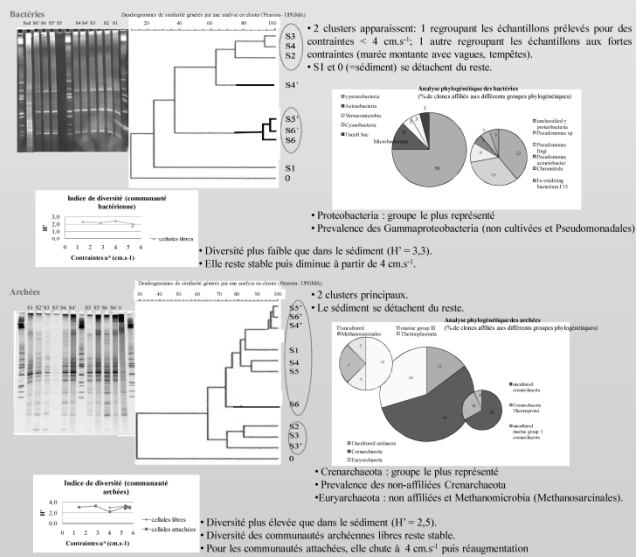
Dates	Salinité de l'eau	NH4	NO3	PO4	Si	Matière organique	Protéines	EPS	Chlorophylle a	Chlorophylle b	Chlorophylle c	Bactéries
	‰	$\mu mol.L^{-1}$	$\mu mol.L^{-1}$	$\mu mol.L^{-1}$	$\mu mol.L^{-1}$	g.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	mg.g <sup>-1</sup>	$\mu g.g^{-1}$	$\mu g.g^{-1}$	$\mu g.g^{-1}$	cell.g <sup>-1</sup>
17/7	41.7	21.2	1.2	1.3	94.2	0.2	4.3	5.1	11.9	7.6	7.3	5.9E+08
19/7	41.5	20.0	2.4	1.5	97.3	0.1	4.4	3.3	10.6	7.2	7.8	9.4E+08
21/7	40.4	31.6	4.7	1.7	96.0	0.1	4.4	10.8	11.1	7.2	6.9	4.1E+07
22/7	47.6	14.9	1.2	1.2	75.8	0.1	3.8	11.4	12.5	9.2	7.3	4.5E+08
24/7	48.1	26.1	10.3	1.2	96.1	0.1	3.8	8.4	10.6	8.9	9.5	5.9E+08

### abondances et activités



- Peu de cellules sont remises en suspension au cours des expériences d'érodimétrie (< 1%, sauf le 21/7 = 2%).
- L'enrichissement est composé majoritairement de cellules libres : 73% (sauf le 21/7 = 34%).
- Diminution pour des contraintes > 3  $cm.s^{-1}$
- A partir de contraintes de cisaillement > 3  $cm.s^{-1}$ , les cellules attachées augmentent.
- Pour le 21, 22 et 24/7 l'enrichissement en cellules attachées n'apparaît que pour des contraintes plus fortes (> 4)  $\Rightarrow$  relier avec les caractéristiques physicochimiques des sédiments.
- La remise en suspension des bactéries attachées suit celle des diatomées.
- Parmi les cellules remises en suspension, seulement 16% d'entre elles semblent intactes et donc potentiellement actives.
- Diminution à partir de 3  $cm.s^{-1}$  sauf le 19 et 24/7.
- 33% des cellules sont mortes.
- Entre 3 et 4  $cm.s^{-1}$  leur pourcentage diminue.
- Augmentation des activités bêta-glucosidase et leucine-aminopeptidase à partir de 3  $cm.s^{-1}$ .
- Activités liées aux bactéries attachées.

### structure génétique /phylogénie (échantillon du 21/07/2008 uniquement)



- 2 clusters apparaissent: 1 regroupant les échantillons prélevés pour des contraintes < 4  $cm.s^{-1}$ ; 1 autre regroupant les échantillons aux fortes contraintes (marée montante avec vagues, tempêtes).
- S1 et 0 (=sédiment) se détachent du reste.
- Analyse phylogénétique des bactéries (% de clones affiliés aux différents groupes phylogénétiques):
  - Proteobacteria : groupe le plus représenté
  - Prévalence des Gammaproteobacteria (non cultivées et Pseudomonadales)
- Diversité plus faible que dans le sédiment ( $H' = 3.3$ ).
- Elle reste stable puis diminue à partir de 4  $cm.s^{-1}$ .
- Analyse phylogénétique des archées (% de clones affiliés aux différents groupes phylogénétiques):
  - 2 clusters principaux.
  - Le sédiment se détache du reste.
  - Crenarchaeota : groupe le plus représenté
  - Prévalence des non-affiliés Crenarchaeota
  - Euryarchaeota : non affiliés et Methanomicrobia (Methanosarcinales).
- Diversité plus élevée que dans le sédiment ( $H' = 2.5$ ).
- Diversité des communautés archéennes libres reste stable.
- Pour les communautés attachées, elle chute à 4  $cm.s^{-1}$  puis réaugmente

## Conclusions

Cette première étude en érodimétrie montre que ce système permet de bien mimer les processus d'érosion liés aux marées (validation par des études *in situ*) et de suivre la remise en suspension des microorganismes notamment les procaryotes. Cette étude expérimentale montre des résultats intéressants : La remise en suspension du biofilm et des procaryotes dépend des contraintes de cisaillement ( $u^*$  liées à la présence ou non de vagues), des caractéristiques du sédiment (salinité, teneur en eau...) et de l'âge du biofilm (quantité et qualité des EPS).

Au cours des marées montantes "normales", peu agitées (S1-S2,  $u^* < 3 cm.s^{-1}$ ) : peu de cellules sont remises en suspension et essentiellement des formes libres potentiellement actives. Ces cellules actives, comme des *Cyanobactéries* et des *Chromatiales*, qui sont les premières espèces bactériennes à être remises en suspension, semblent peu stressées par ces contraintes hydrodynamiques (fortes activités estérase et faibles activités extracellulaires). Elles peuvent donc intégrer et enrichir la communauté microbienne pélagique. Les populations archéennes remises en suspension (autant de Crenarchaeota que d'Euryarchaea) ne sont pas celles qui dominent le sédiment.

Au cours de marées montantes plus agitées (présence de vagues ou tempêtes, S3-S6,  $u^* > 4 cm.s^{-1}$ ) : plus de particules sont remises en suspension, sous formes de cellules attachées mortes libérant leurs enzymes hydrolytiques. Ce n'est qu'à partir de 4  $cm.s^{-1}$  que la structure des communautés bactériennes est modifiée (apparition notamment des *Actinobactéries*) alors que celle des archées est déjà modifiée à faible érosion. L'enrichissement est donc essentiellement sous forme de matière organique, facilement et rapidement minéralisée, qui jouera un rôle important pour le réseau trophique pélagique.

SEM, 2010, Marseille



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---



### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

- Abdullahi AS, Underwood GJC, Gretz MR (2006) Extracellular matrix assembly in diatoms (bacillariophyceae). V. Environmental effects on polysaccharide synthesis in the model diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Journal of Phycology* 42:363-378
- Admiraal W, Peletier H, Brouwer T (1984) The seasonal succession patterns of diatom species on an intertidal mudflat - an experimental analysis. *Oikos* 42:30-40
- Amon RMW, Benner R (1996) Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography* 41:41-51
- Azam F (1998) Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science* 280:694-696
- Bahulikar RA (2006) Diatoms from littoral zone of lake Constance: Diversity, phylogeny, extracellular polysaccharides and bacterial associations. Konstanz. Thèse de doctorat.
- Bauer N, Grossart HP, Hilt S (2010) Effects of bacterial communities on the sensitivity of the phytoplankton *Stephanodiscus minutulus* and *Desmodesmus armatus* to tannic acid. *Aquatic Microbial Ecology* 59:295-306
- Beattie A, Percival E, Hirst EL (1961) Studies on metabolism of Chrysophyceae – comparative structural investigations on leucosin (Chrysolaminarin) separated from diatoms and laminarin from brown algae. *Biochemical Journal* 79:531-537
- Bell W, Mitchell R (1972) chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biological Bulletin* 143:265-277
- Bellinger BJ, Abdullahi AS, Gretz MR, Underwood GJC (2005) Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquatic Microbial Ecology* 38:169-180
- Bellinger BJ, Underwood GJC, Ziegler SE, Gretz MR (2009) Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms determined through isotopic enrichment. *Aquatic Microbial Ecology* 55:169-187
- Belzile C, Demers S, Ferreyra GA, Schloss I, Nozais C, Lacoste K, Mostajir B, Roy S, Gosselin M, Pelletier E, Ganesella SMF, Vernet M (2006) UV effects on marine planktonic food webs: A synthesis of results from mesocosm studies. *Photochemistry and Photobiology* 82:850-856



## Références bibliographiques

- Bhosle NB, Wagh AB (1997) Amino acids in biofilm material on aluminium panels immersed in marine waters. *Biofouling* 11:149-166
- Black KS, Tolhurst TJ, Paterson DM, Hagerthey SE (2002) Working with natural cohesive sediments. *Journal of Hydraulic Engineering-Asce* 128:2-8
- Blanchard G (1994) Photosynthetic characteristics of microphytobenthos on an intertidal mudflat. *Comptes Rendus De l'Academie Des Sciences Serie III-Sciences De La Vie-Life Sciences* 317:633-637
- Blanchard GF, Guarini JM, Bacher C, Huet V (1998) Control of the short-term dynamics of intertidal microphytobenthos by the exondation-submersion cycle. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 321:501-508
- Blanchard GF, Guarini JM, Orvain F, Sauriau PG (2001) Dynamic behaviour of benthic microalgal biomass in intertidal mudflats. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 264:85-100
- Blanchard GF, Paterson DM, Stal LJ, Richard P, Galois R, Huet V, Kelly J, Honeywill C, de Brouwer J, Dyer K, Christie M, Seguignes M (1999) The effect of geomorphological structures on potential biostabilisation by microphytobenthos on intertidal mudflats *Meeting on Intertidal Mudflats - Properties and Processes, Plymouth, England*, p 1243-1256
- Blanchard GF, Paterson DM, Stal LJ, Richard P, Galois R, Huet V, Kelly J, Honeywill C, de Brouwer J, Dyer K, Christie M, Seguignes M (2000) The effect of geomorphological structures on potential biostabilisation by microphytobenthos on intertidal mudflats. *Continental Shelf Research* 20:1243-1256
- Blanchard GF, Sauriau PG, Gall VCL, Gouleau D, Garet MJ, Olivier F (1997) Kinetics of tidal resuspension of microbiota: Testing the effects of sediment cohesiveness and bioturbation using flume experiments. *Marine Ecology-Progress Series* 151:17-25
- Blanchard GF, Simon-Bouhet B, Guarini AM (2002) Properties of the dynamics of intertidal microphytobenthic biomass. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 82:1027-1028
- Bocher P, Piersma T, Dekinga A, Kraan C, Yates MG, Guyot T, Folmer EO, Radenac G (2007) Site- and species-specific distribution patterns of molluscs at five intertidal soft-sediment areas in northwest Europe during a single winter. *Marine Biology* 151:577-594

## Références bibliographiques

- Borsheim KY, Vadstein O, Mykkestad SM, Reinertsen H, Kirkvold S, Olsen Y (2005) Photosynthetic algal production, accumulation and release of phytoplankton storage carbohydrates and bacterial production in a gradient in daily nutrient supply. *Journal of Plankton Research* 27:743-755
- Bratbak G (1985) Bacterial biovolume and biomass estimations. *Applied and Environmental Microbiology* 49:1488-1493
- Bratbak G, Thingstad TF (1985) Phytoplankton-bacteria interactions – an apparent paradox – analysis of a model system with both competition and commensalism. *Marine Ecology-Progress Series* 25:23-30
- Cammen LM (1991) Annual bacterial production in relation to benthic microalgal production and sediment oxygen-uptake in an intertidal sandflat and an intertidal mudflat. *Marine Ecology-Progress Series* 71:13-25
- Cariou-Le Gall V, Blanchard GF (1995) Monthly HPLC measurements of pigment concentration from an intertidal muddy sediment of Marennes-Oleron bay, France. *Marine Ecology-Progress Series* 121:171-179
- Chiovitti A, Dugdale TM, Wetherbee R (2006) Diatom Adhesives: Molecular and Mechanical Properties. *Biological Adhesives*:79-103
- Chiovitti A, Higgins MJ, Harper RE, Wetherbee R, Bacic A (2003) The complex polysaccharides of the raphid diatom *Pinnularia viridis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 39:543-554
- Chiovitti A, Molino P, Crawford SA, Teng RW, Spurck T, Wetherbee R (2004) The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *European Journal of Phycology* 39:117-128
- Cole JJ, Likens GE, Strayer DL (1982) Photosynthetically produced dissolved organic-carbon – an important carbon source for planktonic bacteria. *Limnology and Oceanography* 27:1080-1090
- Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC (2004) The ups and downs of life in a benthic biofilm: Migration of benthic diatoms. *Diatom Research* 19:181-202
- Cook PLM, Revill AT, Butler ECV, Eyre BD (2004) Carbon and nitrogen cycling on intertidal mudflats of a temperate Australian estuary. II. Nitrogen cycling. *Marine Ecology-Progress Series* 280:39-54

## Références bibliographiques

- Cook PLM, Veuger B, Boer S, Middelburg JJ (2007) Effect of nutrient availability on carbon and nitrogen incorporation and flows through benthic algae and bacteria in near-shore sandy sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 49:165-180
- Costerton JW, Ingram JM, Cheng KJ (1974) Structure and function of cell envelope of Gram-negative bacteria. *Bacteriological Reviews* 38:87-110
- Covert JS, Moran MA (2001) Molecular characterization of estuarine bacterial communities that use high- and low-molecular weight fractions of dissolved organic carbon. *Aquatic Microbial Ecology* 25:127-139
- Crawford CC, Hobbie JE, Webb KL (1974) Utilization of dissolved free amino-acids by estuarine microorganisms. *Ecology* 55:551-563
- Dajoz R (2000) Précis d'écologie. 2de édition. Dunod (1971) 444p.
- de Brouwer JFC, Stal LJ (2001) Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Marine Ecology-Progress Series* 218:33-44
- de Brouwer JFC, Stal LJ (2002) Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 38:464-472
- de Brouwer JFC, Wolfstein K, Ruddy GK, Jones TER, Stal LJ (2005) Biogenic stabilization of intertidal sediments: The importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. *Microbial Ecology* 49:501-512
- de Brouwer JFC, Wolfstein K, Stal LJ (2002) Physical characterization and diel dynamics of different fractions of extracellular polysaccharides in an axenic culture of a benthic diatom. *European Journal of Phycology* 37:37-44
- de Deckere E, Tolhurst TJ, de Brouwer JFC (2001) Destabilization of cohesive intertidal sediments by infauna. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 53:665-669
- de Winder B, Staats N, Stal LJ, Paterson DM (1999) Carbohydrate secretion by phototrophic communities in tidal sediments. *Journal of Sea Research* 42:131-146
- Decho AW (1990) Microbial exopolymer secretions in ocean environments – their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanography and Marine Biology* 28:73-153
- Decho AW (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Continental Shelf Research* 20:1257-1273
- Decho AW, Kawaguchi T (1999) Confocal imaging of in situ natural microbial communities and their extracellular polymeric secretions using Nanoplast (R) resin. *Biotechniques* 27:1246-1252

## Références bibliographiques

- Decho AW, Lopez GR (1993) Exopolymer microenvironments of microbial-flora – multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnology and Oceanography* 38:1633-1645
- Degre D, Leguerrier D, du Chatelet EA, Rzeznik J, Auguet JC, Dupuy C, Marquis E, Fichet D, Struski C, Joyeux E, Sauriau PG, Niquil N (2006) Comparative analysis of the food webs of two intertidal mudflats during two seasons using inverse modelling: Aiguillon Cove and Brouage Mudflat, France. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 69:107-124
- Desbois AP, Mearns-Spragg A, Smith VJ (2009) A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology* 11:45-52
- Ducklow HW, Carlson CA (1992) Oceanic bacterial production. *Advances in Microbial Ecology* 12:113-181
- Eaton JW, Moss B (1966) Estimation of numbers and pigment content in epipelagic algal populations. *Limnology and Oceanography* 11:584-&
- Edgar LA, Pickettheaps JD (1984) Valve morphogenesis in the pennate diatom *Navicula cuspidata* *Journal of Phycology* 20:47-61
- Fernandez-Prada CM, Zelazowska EB, Nikolich M, Hadfield TL, Roop RM, Robertson GL, Hoover DL (2003) Interactions between *Brucella melitensis* and human phagocytes: Bacterial surface O-polysaccharide inhibits phagocytosis, bacterial killing, and subsequent host cell apoptosis. *Infection and Immunity* 71:2110-2119
- Flemming HC, Wingender J (2002) What biofilms contain - Proteins, polysaccharides, etc. *Chemie in Unserer Zeit* 36:30-42
- Fuhrman JA (1981) INFLUENCE OF METHOD ON THE APPARENT SIZE DISTRIBUTION OF BACTERIOPLANKTON CELLS - EPIFLUORESCENCE MICROSCOPY COMPARED TO SCANNING ELECTRON-MICROSCOPY. *Marine Ecology-Progress Series* 5:103-106
- Fuhrman JA, Noble RT (1995) Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater. *Limnology and Oceanography* 40:1236-1242
- Galois R, Blanchard G, Seguignes M, Huet V, Joassard L (2000) Spatial distribution of sediment particulate organic matter on two estuarine intertidal mudflats: a comparison between Marennes-Oleron Bay (France) and the Humber Estuary (UK). *Continental Shelf Research* 20:1199-1217

## Références bibliographiques

- Garny K, Horn H, Neu TR (2008) Interaction between biofilm development, structure and detachment in rotating annular reactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 31:619-629
- Gattuso JP, Frankignoulle M, Wollast R (1998) Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29:405-434
- Gerbersdorf SU, Manz W, Paterson DM (2008) The engineering potential of natural benthic bacterial assemblages in terms of the erosion resistance of sediments. *Fems Microbiology Ecology* 66:282-294
- Giroldo D, Vieira AAH, Paulsen BS (2003) Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira* sp (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 39:1109-1115
- Giroldo D, Vieira AAH, Paulsen BS (2005) Extracellular polysaccharides produced by a tropical cryptophyte as a carbon source for natural bacterial populations. *European Journal of Phycology* 40:241-249
- Glud RN, Gundersen JK, Roy H, Jorgensen BB (2003) Seasonal dynamics of benthic O<sub>2</sub> uptake in a semienclosed bay: Importance of diffusion and faunal activity. *Limnology and Oceanography* 48:1265-1276
- Goldman JC, Caron DA, Dennett MR (1987) regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C-N- ratio. *Limnology and Oceanography* 32:1239-1252
- Goto N, Kawamura T, Mitamura O, Terai H (1999) Importance of extracellular organic carbon production in the total primary production by tidal-flat diatoms in comparison to phytoplankton. *Marine Ecology-Progress Series* 190:289-295
- Goto N, Mitamura O, Terai H (2001) Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257:73-86
- Granum E, Mykkestad SM (1999) Effects of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation on dark carbon fixation and beta-1,3-glucan metabolism in the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 35:1191-1199
- Granum E, Mykkestad SM (2001) Mobilization of beta-1,3-glucan and biosynthesis of amino acids induced by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> addition to N-limited cells of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* 37:772-782

## Références bibliographiques

- Guarini JM, Blanchard GF, Gros P, Gouleau D, Bacher C (2000) Dynamic model of the short-term variability of microphytobenthic biomass on temperate intertidal mudflats. *Marine Ecology-Progress Series* 195:291-303
- Guarini JM, Gros P, Blanchard GF, Bacher C (1999) Short-term dynamics of intertidal microphytobenthic biomass. *Mathematical modelling. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iii-Sciences De La Vie-Life Sciences* 322:363-373
- Hamels I, Muylaert K, Casteleyn G, Vyverman W (2001) Uncoupling of bacterial production and flagellate grazing in aquatic sediments: a case study from an intertidal flat. *Aquatic Microbial Ecology* 25:31-42
- Hanlon ARM, Bellinger B, Haynes K, Xiao G, Hofmann TA, Gretz MR, Ball AS, Osborn AM, Underwood GJC (2006) Dynamics of extracellular polymeric substance (EPS) production and loss in an estuarine, diatom-dominated, microalgal biofilm over a tidal emersion-immersion period. *Limnology and Oceanography* 51:79-93
- Haubois AG, Guarini JM, Richard P, Fichet D, Radenac G, Blanchard GF (2005a) Ingestion rate of the deposit-feeder *Hydrobia ulvae* (Gastropoda) on epipellic diatoms: effect of cell size and algal biomass. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 317:1-12
- Haubois AG, Sylvestre F, Guarini JM, Richard P, Blanchard GF (2005b) Spatio-temporal structure of the epipellic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oleron Bay, France. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 64:385-394
- Hay SI, Maintland TC, Paterson DM (1993) The speed of diatom migration through natural and artificial substrata. *Diatom research* 8:371-384
- Haynes K, Hofmann TA, Smith CJ, Ball AS, Underwood GJC, Osborn AM (2007) Diatom-derived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 73:6112-6124
- Heinzelmann C, Wallisch S (1991) Benthic settlement and bed erosion – a review. *Journal of Hydraulic Research* 29:355-371
- Heip CHR, Goosen NK, Herman PMJ, Kromkamp J, Middelburg JJ, Soetaert K (1995) Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries. In: *Oceanography and Marine Biology - an Annual Review, Vol 33, Vol 33, p 1-149*
- Herlory O, Guarini JM, Richard P, Blanchard GF (2004) Microstructure of microphytobenthic biofilm and its spatio-temporal dynamics in an intertidal mudflat (Aiguillon Bay, France). *Marine Ecology-Progress Series* 282:33-44

## Références bibliographiques

- Higgins MJ, Sader JE, Mulvaney P, Wetherbee R (2003) Probing the surface of living diatoms with atomic force microscopy: The nanostructure and nanomechanical properties of the mucilage layer. *Journal of Phycology* 39:722-734
- Hoagland KD, Rosowski JR, Gretz MR, Roemer SC (1993) Diatom extracellular polymeric substances – function, fine-structure, chemistry, and physiology. *Journal of Phycology* 29:537-566
- Hofmann T, Hanlon ARM, Taylor JD, Ball AS, Osborn AM, Underwood GJC (2009) Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Marine Ecology-Progress Series* 379:45-58
- Ianora A, Miralto A (2010) Toxigenic effects of diatoms on grazers, phytoplankton and other microbes: a review. *Ecotoxicology* 19:493-511
- Jesus B, Brotas V, Marani M, Paterson DM (2005) Spatial dynamics of microphytobenthos determined by PAM fluorescence. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 65:30-42
- Jin Y, Zhang T, Samaranayake YH, Fang HHP, Yip HK, Samaranayake LP (2005) The use of new probes and stains for improved assessment of cell viability and extracellular polymeric substances in *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 159:353-360
- Jorgensen NOG, Kroer N, Coffin RB, Hoch MP (1999) Relations between bacterial nitrogen metabolism and growth efficiency in an estuarine and an open-water ecosystem. *Aquatic Microbial Ecology* 18:247-261
- Keil RG, Kirchman DL (1991) Contribution of dissolved free amino-acids and ammonium to the nitrogen requirements of heterotrophic bacterioplankton. *Marine Ecology-Progress Series* 73:1-10
- Keil RG, Kirchman DL (1993) Dissolved combined amino-acids – chemical form and utilization by marine-bacteria. *Limnology and Oceanography* 38:1256-1270
- Koroleff F (1966) Direct spectrophotometric determination of ammonia in precipitation. *Tellus* 18:562-&
- Koroleff F (1969) Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. *International Council for the Exploration of the Sea* 9:19-22
- Krembs C, Eicken H, Junge K, Deming JW (2002) High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep-Sea Research Part I-Oceanographic Research Papers* 49:2163-2181

## Références bibliographiques

- Kusaikin MI, Ermakova SP, Shevchenko NM, Isakov VV, Gorshkov AG, Vereshchagin AL, Grachev MA, Zvyagintseva TN (2010) Structural characteristics and antitumor activity of a new Chrysolaminaran from the diatom alga. *Synedra acus*. *Chemistry of Natural Compounds* 46:1-4
- Lancelot C., Billen G. (1985) Carbon-nitrogen relationships in nutrient metabolism of coastal marine ecosystems, Vol 3. Academic Press, London, ROYAUME-UNI
- Lateur M (2002) Perspectives de lutte contre les maladies des arbres fruitiers à pépins au moyen de substances naturelles inductrices d'une résistance systémique, Vol 6. Faculté universitaire des sciences agronomiques, Gembloux, Belgique
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology* 173:6558-6567
- Lawrence JR, Neu TR (1999) Confocal laser scanning microscopy for analysis of microbial biofilms. In: *Biofilms*, Vol 310, p 131-144
- Lawrence JR, Swerhone GDW, Kuhlicke U, Neu TR (2007) In situ evidence for microdomains in the polymer matrix of bacterial microcolonies. *Canadian Journal of Microbiology* 53:450-458
- Lee JJ, Rodriguez D, Neori A, Zmora O, Symons A, Shpigel M (2004) Nutrient study for the transition from earthen sedimentation ponds to ones lined with pvc in integrated mariculture systems, what needs to be done? *Journal of Applied Phycology* 16:341-353
- Leguerrier D, Niquil N, Boileau N, Rzeznik J, Sauriau PG, Le Moine O, Bacher C (2003) Numerical analysis of the food web of an intertidal mudflat ecosystem on the Atlantic coast of France. *Marine Ecology-Progress Series* 246:17-37
- Lévêque C (2008) *La biodiversité au quotidien. Le développement durable à l'épreuve des faits*. Editions Quae, 286p.
- Lind JL, Heimann K, Miller EA, vanVliet C, Hoogenraad NJ, Wetherbee R (1997) Substratum adhesion and gliding in a diatom are mediated by extracellular proteoglycans. *Planta* 203:213-221
- Lucas CH, Widdows J, Wall L (2003) Relating spatial and temporal variability in sediment chlorophyll a and carbohydrate distribution with erodibility of a tidal flat. *Estuaries* 26:885-893
- Lundkvist M, Gangelhof U, Lunding J, Flindt MR (2007) Production and fate of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms and bacteria: A laboratory study. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 75:337-346



## Références bibliographiques

- Ma LY, Lu HP, Sprinkle A, Parsek MR, Wozniak DJ (2007) Pseudomonas aeruginosa PSI is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. *Journal of Bacteriology* 189:8353-8356
- MacIntyre HL, Cullen JJ (1996) Primary production by suspended and benthic microalgae in a turbid estuary: Time-scales of variability in San Antonio Bay, Texas. *Marine Ecology-Progress Series* 145:245-268
- Mann DG (1999) The species concept in diatoms. *Phycologia* 38:437-495
- Mann DG, Droop SJM (1996) Biodiversity, biogeography and conservation of diatoms. *Hydrobiologia* 336:19-32
- Mann, K H (1982) *The ecology of coastal waters a systems approach*, Blackwell, Oxford
- Middelburg JJ, Barranguet C, Boschker HTS, Herman PMJ, Moens T, Heip CHR (2000) The fate of intertidal microphytobenthos carbon: An in situ C-13-labeling study. *Limnology and Oceanography* 45:1224-1234
- Mueller LN, de Brouwer JFC, Almeida JS, Stal LJ, Xavier JB (2006) Analysis of a marine phototrophic biofilm by confocal laser scanning microscopy using the new image quantification software PHLIP. *BMC Ecol* 6:1
- Nagata T, Meon B, Kirchman DL (2003) Microbial degradation of peptidoglycan in seawater. *Limnology and Oceanography* 48:745-754
- Neu TR, Lawrence JR (1997) Development and structure of microbial biofilms in river water studied by confocal laser scanning microscopy. *Fems Microbiology Ecology* 24:11-25
- Neu TR, Swerhone GDW, Bockelmann U, Lawrence JR (2005) Effect of CNP on composition and structure of lotic biofilms as detected with lectin-specific glycoconjugates. *Aquatic Microbial Ecology* 38:283-294
- Neu TR, Swerhone GDW, Lawrence JR (2001) Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology-Sgm* 147:299-313
- Neuman A, Gillier-Pandraud H, Longchambon F, Rabinovich D (1975) Structure cristalline de la N-acetyl-[alpha]-d-galactosamine. *Acta Crystallographica Section B* 31:474-477
- Nichols CAM, Guezennec J, Bowman JP (2005) Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: A review. *Marine Biotechnology* 7:253-271
- Nikaido H, Vaara M (1985) Molecular-basis of bacterial outer-membrane permeability. *Microbiological Reviews* 49:1-32
- Obernosterer I, Herndl GJ (1995) Phytoplankton extracellular release and bacterial-growth – dependence on the inorganic N-P ratio. *Marine Ecology-Progress Series* 116:247-257

## Références bibliographiques

- Ogbebo FE, Ochs C (2008) Bacterioplankton and phytoplankton production rates compared at different levels of solar ultraviolet radiation and limiting nutrient ratios. *Journal of Plankton Research* 30:1271-1284
- Orvain F, Galois R, Barnard C, Sylvestre A, Blanchard G, Sauriau PG (2003a) Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: An integrated approach in a tidal mesocosm. *Microbial Ecology* 45:237-251
- Orvain F, Le Hir P, Sauriau PG (2003b) A model of fluff layer erosion and subsequent bed erosion in the presence of the bioturbator, *Hydrobia ulvae*. *Journal of Marine Research* 61:823-851
- Orvain F, Sauriau PG, Le Hir P, Guillou G, Cann P, Paillard M (2007) Spatio-temporal variations in intertidal mudflat erodability: Marennes-Oleron Bay, western France. *Continental Shelf Research* 27:1153-1173
- Pascal P-Y (2008) Devenir des bactéries dans les réseaux trophiques des vasières intertidales : le cas de Brouage (Baie de Marennes-Oléron). La Rochelle. Thèse de doctorat.
- Pascal PY, Dupuy C, Mallet C, Richard P, Niquil N (2008a) Bacterivory by benthic organisms in sediment: Quantification using ISN-enriched bacteria. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 355:18-26
- Pascal PY, Dupuy C, Richard P, Haubois AG, Niquil N (2008b) Influence of environment factors on bacterial ingestion rate of the deposit-feeder *Hydrobia ulvae* and comparison with meiofauna. *Journal of Sea Research* 60:151-156
- Pascal PY, Dupuy C, Richard P, Mallet C, du Chatelet EA, Niquil N (2009) Seasonal variation in consumption of benthic bacteria by meio- and macrofauna in an intertidal mudflat. *Limnology and Oceanography* 54:1048-1059
- Pascal PY, Dupuy C, Richard P, Niquil N (2008c) Bacterivory in the common foraminifer *Ammonia tepida*: Isotope tracer experiment and the controlling factors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 359:55-61
- Pascal PY, Dupuy C, Richard P, Rzeznik-Orignac J, Niquil N (2008d) Bacterivory of a mudflat nematode community under different environmental conditions. *Marine Biology* 154:671-682
- Paterson DM, Tolhurst TJ, Kelly JA, Honeywill C, de Deckere E, Huet V, Shayler SA, Black KS, de Brouwer J, Davidson I (1999) Variations in sediment properties, Skeffling mudflat, Humber Estuary, UK Meeting on Intertidal Mudflats - Properties and Processes, Plymouth, England, p 1373-1396

## Références bibliographiques

- Paul JH, Jeffrey WH, David AW, DeFlaun MF, Cazares LH (1989) Turnover of extracellular DNA in eutrophic and oligotrophic fresh-water environments of southwest Florida. *Applied and Environmental Microbiology* 55:1823-1828
- Perkins RG, Underwood GJC, Brotas V, Snow GC, Jesus B, Ribeiro L (2001) Responses of microphytobenthos to light: primary production and carbohydrate allocation over an emersion period. *Marine Ecology-Progress Series* 223:101-112
- Pierre G, Graber M, Orvain F, Dupuy C, Maugard T (sous presse) Biochemical characterization of Extracellular Polymeric Substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*.
- Pierre G, Graber M, Rafiliposon BA, Dupuy C, Orvain F, De Crignis M, Maugard T (soumis) Biochemical composition of Extracellular Polymeric Substances (EPS) produced during microphytobenthic biofilm development on an intertidal mudflat of a macrotidal bay.
- Pollard PC, Moriarty DJW (1984) Validity of the tritiated-thymidine method for estimating bacterial-growth rates – measurement of isotope-dilution during DNA-Synthesis. *Applied and Environmental Microbiology* 48:1076-1083
- Pomeroy LR, Wiegert RG (1981) *The Ecology of a salt marsh* / edited by L.R. Pomeroy and R.G. Wiegert, Vol. Springer-Verlag, New York :
- Porter KG, Feig YS (1980) The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnology and Oceanography* 25:943-948
- Ricart M, Barcelo D, Geiszinger A, Guasch H, de Alda ML, Romani AM, Vidal G, Villagrasa M, Sabater S (2009) Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* 76:1392-1401
- Rier ST, Stevenson RJ (2001) Relation of environmental factors to density of epilithic lotic bacteria in 2 ecoregions. *Journal of the North American Benthological Society* 20:520-532
- Rier ST, Stevenson RJ (2002) Effects of light, dissolved organic carbon, and inorganic nutrients on the relationship between algae and heterotrophic bacteria in stream periphyton. *Hydrobiologia* 489:179-184
- Rince Y, Lebeau T, Robert JM (1999) Artificial cell-immobilization: a model simulating immobilization in natural environments? *Journal of Applied Phycology* 11:263-272
- Romani AM, Fund K, Artigas J, Schwartz T, Sabater S, Obst U (2008) Relevance of polymeric matrix enzymes during biofilm formation. *Microbial Ecology* 56:427-436

## Références bibliographiques

- Ruttenberg KC, Goni MA (1997) Phosphorus distribution, C:N:P ratios, and delta C-13(oc) in arctic, temperate, and tropical coastal sediments: Tools for characterizing bulk sedimentary organic matter. *Marine Geology* 139:123-145
- Sahan E, Sabbe K, Creach V, Hernandez-Raquet G, Vyverman W, Stal LJ, Muyzer G (2007) Community structure and seasonal dynamics of diatom biofilms and associated grazers in intertidal mudflats. *Aquatic Microbial Ecology* 47:253-266
- Schmidt JL, Deming JW, Jumars PA, Keil RG (1998) Constancy of bacterial abundance in surficial marine sediments. *Limnology and Oceanography* 43:976-982
- Selvaraj R, Manivasaham S, Purushothaman A, Subramanian A (1989) Preliminary investigation on antibacterial activity of some marine diatoms. *Indian Journal of Medical Research Section a-Infectious Diseases* 89:198-200
- Serodio J, daSilva JM, Catarino F (1997) Nondestructive tracing of migratory rhythms of intertidal benthic microalgae using in vivo chlorophyll a fluorescence. *Journal of Phycology* 33:542-553
- Sherr EB, Sherr BF, Albright LJ (1987) Bacteria: link or sink? *Science* 235:88a
- Sinsabaugh RL, Shah JJF (2010) Integrating resource utilization and temperature in metabolic scaling of riverine bacterial production. *Ecology* 91:1455-1465
- Smith DC, Simon M, Alldredge AL, Azam F (1992) Intense hydrolytic enzyme-activity on marine aggregates and implications for rapid particle dissolution. *Nature* 359:139-142
- Smith DC, Steward GF, Long RA, Azam F (1995) Bacterial mediation of carbon fluxes during a diatom bloom in a mesocosm. *Deep-Sea Research Part II-Topical Studies in Oceanography* 42:75-97
- Smith DJ, Underwood GJC (1998) Exopolymer production by intertidal epipellic diatoms. *Limnology and Oceanography* 43:1578-1591
- Smith DJ, Underwood GJC (2000) The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: The effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology* 36:321-333
- Staats N, De Winder B, Stal LJ, Mur LR (1999) Isolation and characterization of extracellular polysaccharides from the epipellic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum*. *European Journal of Phycology* 34:161-169
- Staats N, Stal LJ, de Winder B, Mur LR (2000a) Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Marine Ecology-Progress Series* 193:261-269

## Références bibliographiques

- Staats N, Stal LJ, Mur LR (2000b) Exopolysaccharide production by the epipelagic diatom *Cylindrotheca closterium*: effects of nutrient conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 249:13-27
- Stal LJ, de Brower JFC (2003) Biofilm formation by benthic diatoms and their influence on the stabilization of intertidal mudflats, Forschungszentrum TERRAMARE (12)
- Storseth TR, Hansen K, Reitan KI, Skjermo J (2005) Structural characterization of beta-D-(1 - > 3)-glucans from different growth phases of the marine diatoms *Chaetoceros mulleri* and *Thalassiosira weissflogii*. *Carbohydrate Research* 340:1159-1164
- Storseth TR, Kirkvold S, Skjermo J, Reitan KI (2006) A branched beta-D-(1 -> 3,1 -> 6)-glucan from the marine diatom *Chaetoceros debilis* (Bacillariophyceae) characterized by NMR. *Carbohydrate Research* 341:2108-2114
- Sutherland IW, Mackenzie CL (1977) Glucan common to microcyst walls of cyst-forming bacteria. *Journal of Bacteriology* 129:599-605
- Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2009) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Marine and Freshwater Research* 60:1201-1210
- Taylor IS, Paterson DM, Mehlert A (1999) The quantitative variability and monosaccharide composition of sediment carbohydrates associated with intertidal diatom assemblages. *Biogeochemistry* 45:303-327
- Thingstad TF (2000) Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnology and Oceanography* 45:1320-1328
- Thingstad TF, Hagstrom A, Rassoulzadegan F (1997) Accumulation of degradable DOC in surface waters: Is it caused by a malfunctioning microbial loop? *Limnology and Oceanography* 42:398-404
- Thornton DCO, Kopac SM, Long RA (2010) Production and enzymatic hydrolysis of carbohydrates in intertidal sediment. *Aquatic Microbial Ecology* 60:109-125
- Toerien DF, Cloete TE, Pieterse AJH (1984) Potential bacterial algal interactions of a pond system for the treatment of cattle feedlot effluent. *Agricultural Wastes* 9:159-173
- Tolhurst TJ, Watts CW, Vardy S, Saunders JE, Consalvey MC, Paterson DM (2008) The effects of simulated rain on the erosion threshold and biogeochemical properties of intertidal sediments. *Continental Shelf Research* 28:1217-1230

## Références bibliographiques

- Tranvik LJ (1990) Bacterioplankton Growth on Fractions of Dissolved Organic Carbon of Different Molecular Weights from Humic and Clear Waters. *Appl Environ Microbiol* 56:1672-1677
- Tuomi P, Lundsgaard C, Ekeboom J, Olli K, Kunnis K (1999) The production and potential loss mechanisms of bacterial biomass in the southern Gulf of Riga. *Journal of Marine Systems* 23:185-196
- Underwood GJC (1994) Seasonal and spatial variation in epipellic diatom assemblages in the Severn estuary. *Diatom Research* 9:451-472
- Underwood GJC, Boulcott M, Raines CA, Waldron K (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: Dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology* 40:293-304
- Underwood GJC, Fietz S, Papadimitriou S, Thomas DN, Dieckmann GS (2010) Distribution and composition of dissolved extracellular polymeric substances (EPS) in Antarctic sea ice. *Marine Ecology-Progress Series* 404:1-19
- Underwood GJC, Kromkamp J (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In: *Advances in Ecological Research*, Vol 29, Vol 29, p 93-153
- Underwood GJC, Paterson DM (2003) The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipellic diatoms. In: *Advances in Botanical Research*, Vol 40, Vol 40, p 183-240
- Underwood GJC, Paterson DM, Parkes RJ (1995) The measurement of microbial carbohydrate exopolymers from intertidal sediments. *Limnology and Oceanography* 40:1243-1253
- Van der Grinten E, Janssen M, Simis SGH, Barranguet C, Admiraal W (2004) Phosphate regime structures species composition in cultured phototrophic biofilms. *Freshwater Biology* 49:369-381
- van Duyl FC, de Winder B, Kop AJ, Wollenzien U (1999) Tidal coupling between carbohydrate concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats. *Marine Ecology-Progress Series* 191:19-32
- Varum KM, Myklestad S (1984) Effects of light, salinity and nutrient limitation on the production of beta-1,3-D-glucan and exo-D-glucanase activity in *Skeletonema costatum* (Grev) Cleve. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 83:13-25

## Références bibliographiques

- Waksman SA, Butler MR (1937) Relation of Bacteria to Diatoms In Sea Water. *Journal of the Marine Biological Association of the UK* 22:359-373
- Welker C, Sdrigotti E, Covelli S, Faganeli J (2002) Microphytobenthos in the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea): Relationship with labile sedimentary organic matter and nutrients. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 55:259-273
- Wheeler PA, Kirchman DL (1986) Utilization of inorganic and organic nitrogen by bacteria in marine systems. *Limnology and Oceanography* 31:998-1009
- Wingender J, Strathmann M, Rode A, Leis A, Flemming HC (2001) Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Microbial Growth in Biofilms, Pt A, Vol 336*, p 302-314
- Wolfstein K, de Brouwer JFC, Stal LJ (2002) Biochemical partitioning of photosynthetically fixed carbon by benthic diatoms during short-term incubations at different irradiances. *Marine Ecology-Progress Series* 245:21-31
- Yallop ML, Paterson DM, Wellsbury P (2000) Interrelationships between rates of microbial production, exopolymer production, microbial biomass, and sediment stability in biofilms of intertidal sediments. *Microbial Ecology* 39:116-127
- Yarmolinsky MB (1995) Programmed cell-death in bacterial-populations. *Science* 267:836-837

## Résumé

---

Les vasières intertidales sont le siège d'une forte production primaire sous la forme d'un biofilm microphytobenthique qui se développe en surface à marée basse. Ce biofilm se compose principalement de diatomées et de bactéries hétérotrophes. Ces deux composantes sécrètent des substances polymériques extracellulaires (EPS) qui jouent différents rôles dans le biofilm. Le travail présenté s'est basé sur différentes échelles d'observation (*in situ* à deux saisons, mésocosme en laboratoire, et échelle fine du biofilm en microscopie confocale) et a permis de mettre en évidence les interactions des diatomées et des bactéries à différents moments de la marée et du nyctémère. L'utilisation d'une nouvelle méthode d'extraction des EPS a permis d'éclaircir leur rôle en évitant les contaminations par les substances internes provoquées par les méthodes classiques. Les EPS colloïdales particulièrement riches en glucose s'associent au déplacement des diatomées, notamment lors d'un stress (sursalure, carence en nutriments) et sont préférentiellement consommées par les bactéries, après leur dégradation par les enzymes ou leur hydrolyse dans l'eau interstitielle. Les EPS liées au frustule, et plus particulièrement les sucres, inhiberaient le développement bactérien à proximité de la cellule algale. Elles sont surtout sécrétées lors de la mise en place du biofilm et pour protéger la cellule quand les conditions sont osmotiquement défavorables et leur richesse en protéine leur confère un potentiel intéressant pour les bactéries qui peuvent les utiliser comme substrat azoté en cas de carence. D'autres substances ont été plutôt sécrétées par les bactéries telles que les N-acétylglucosamines et les protéines colloïdales de bas poids moléculaire, certainement des enzymes bactériennes, ainsi que le glucose qui semble être associé aux EPS colloïdales des diatomées mais aussi aux EPS bactériennes selon l'analyse en microscopie confocale en utilisant des lectines comme marqueurs d'EPS.

## Abstract

---

Microphytobenthic biofilms that develop at the intertidal mudflat surface are responsible of a substantial primary production. These biofilms are composed of diatoms and heterotrophic bacteria, both excreting extracellular polymeric substances (EPS) that have various functions into the biofilm. The present thesis is based on different observation scales that have highlighted the complex interactions between diatoms and bacteria for different moment of the biofilm development (*in situ* at 2 seasons, in laboratory mesocosm and at the scale of the biofilm at confocal microscopy). Furthermore, a new extraction method that avoids contamination with internal substances was used and provides new insights about the role of EPS. Colloidal EPS are excreted during the diatom migrations, notably in case of environmental stress (nutrient depletion, high salinity). They are preferentially consumed by bacteria, after hydrolysis or enzymatic cleavage. Bound EPS are associated to a bacterial inhibition, especially sugars. These EPS are mainly excreted during biofilm formation and also in case of osmotic stress, if diatoms cannot migrate toward favorable slices. Some substances are associated to bacterial development, such as N-acetylglucosamine, low molecular weight proteins that probably consist of bacterial enzymes and also glucose that seems to be associated to colloidal EPS secreted by diatoms as well as bacterial EPS, when analyzing the biofilm with confocal microscopy by using lectins as EPS biomarkers.