



HAL
open science

Régulation de l'activité photosynthétique du microphytobenthos et conséquence sur la dynamique temporelle de la production primaire dans les vasières intertidales de la côte atlantique de l'Europe de l'Ouest

Alexandre Barnett

► **To cite this version:**

Alexandre Barnett. Régulation de l'activité photosynthétique du microphytobenthos et conséquence sur la dynamique temporelle de la production primaire dans les vasières intertidales de la côte atlantique de l'Europe de l'Ouest. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2013. Français. NNT : 2013LAROS412 . tel-01126983

HAL Id: tel-01126983

<https://theses.hal.science/tel-01126983>

Submitted on 6 Mar 2015

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

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



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE

Gay Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés

THÈSE

présentée par :

Alexandre BARNETT

soutenue le **17 décembre 2013**

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biologie des organismes

**Régulation de l'activité photosynthétique du microphytobenthos
et conséquence sur la dynamique temporelle de la production primaire
dans les vasières intertidales de la côte atlantique de l'Europe de l'Ouest**

JURY :

M. Sébastien Lefebvre, Professeur, Université de Lille 1	<i>Rapporteur</i>
M. Wim Vyverman, Professeur, Université de Gand (Belgique)	<i>Rapporteur</i>
M. Dominique Davoult, Professeur, Université PMC-Paris VI	<i>Examineur</i>
Mme Angela Falciatore, CR1 CNRS-Université PMC-Paris VI	<i>Examineur</i>
M. João Serôdio, Assistant Professeur, Université d'Aveiro (Portugal)	<i>Examineur</i>
Mme Vona Méléder-Tard, Maître de Conférences, Université de Nantes	<i>Examineur</i>
Mme Christine Dupuy, Professeur, Université de La Rochelle	<i>Directrice de thèse</i>
M. Johann Lavaud, CR1 CNRS-Université de La Rochelle	<i>Encadrant scientifique</i>

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE

Gay Lussac

Laboratoire Littoral Environnement et Sociétés

THÈSE

présentée par :

Alexandre BARNETT

soutenue le **17 décembre 2013**

pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle

Discipline : Biologie des organismes

**Régulation de l'activité photosynthétique du microphytobenthos
et conséquence sur la dynamique temporelle de la production primaire
dans les vasières intertidales de la côte atlantique de l'Europe de l'Ouest**

JURY :

M. Sébastien Lefebvre, Professeur, Université de Lille 1	<i>Rapporteur</i>
M. Wim Vyverman, Professeur, Université de Gand (Belgique)	<i>Rapporteur</i>
M. Dominique Davoult, Professeur, Université PMC-Paris VI	<i>Examineur</i>
Mme Angela Falciatore, CR1 CNRS-Université PMC-Paris VI	<i>Examineur</i>
M. João Serôdio, Assistant Professeur, Université d'Aveiro (Portugal)	<i>Examineur</i>
Mme Vona Méléder-Tard, Maître de Conférences, Université de Nantes	<i>Examineur</i>
Mme Christine Dupuy, Professeur, Université de La Rochelle	<i>Directrice de thèse</i>
M. Johann Lavaud, CR1 CNRS-Université de La Rochelle	<i>Encadrant scientifique</i>

‘Pour le Graal, j’ai bâti une forteresse, moi. Kaamelott, ça s’appelle. J’ai été chercher des chevaliers dans tout le royaume. En Calédonie, en Carmélide, à Gaunes, à Vannes, aux Pays de Galles. J’ai fait construire une grande table, pour que les chevaliers s’assoient ensemble. Je l’ai voulue ronde, pour qu’aucun d’entre eux ne se retrouve assis dans un angle, ou en bout de table. **C’était compliqué, alors j’ai essayé d’expliquer ce qu’était le Graal, pour que tout le monde comprenne. C’était difficile, alors j’ai essayé de rigoler pour que personne ne s’ennuie. J’ai raté, mais je veux pas qu’on dise que j’ai rien foutu, parce que c’est pas vrai.**’

Alexandre Astier.

À mes parents, qui m'ont porté.

À mes amis qui m'ont supporté

Table de matières

PARTIE 1 : INTRODUCTION GENERALE	1
Partie 1-A : Problématique scientifique	3
Partie 1-B : Etat des connaissances	7
I. Les vasières intertidales	7
I-1. Localisation des vasières intertidales	8
I-2. Morphologie dynamique générale des vasières intertidales	9
I-3. Zonation des vasières intertidales	12
I-4. Les communautés biologiques des vasières intertidales	13
I-4-a. Les producteurs primaires des vasières intertidales	13
I-4-b. La Faune des vasières intertidales : des consommateurs du MPB	14
I-5. Les sites d'étude	16
I-5-a. La Vasière de Brouage	17
I-5-b. La Vasière d'Esnandes, Pointe de Saint-Clément	19
I-5-c. La Vasière de Liarne	20
I-5-d. La Vasière de Ria de Aveiro	21
II. Les diatomées benthiques des vasières intertidales	22
II-1. Généralités	22
II-2. Différentes formes de vie	23
II-2-a. Les diatomées épipéliques des sédiments à vases fines	27
II-2-b. Les diatomées épipsammiques des sédiments vaso-sableux	29
II-3. Les caractéristiques remarquables des diatomées	31
II-3-a. Le frustule : la paroi cellulaire des diatomées	32
II-3-b. Les plastes, lieu de la photosynthèse	34
II-3-c. Les substances exopolymériques ou EPS	36
II-4. Le cycle de division cellulaire des diatomées pénnées, groupe majoritaire du MPB	38
III. La régulation de la productivité photosynthétique du microphytobenthos	41
III-1. La photosynthèse	41
III-1-a. Le Photosystème II	44
III-1-b. Le cytochrome b_6/f , le photosystème I et l'ATP synthase	45
III-1-c. Les particularités principales de l'appareil photosynthétique des diatomées	

III-2.	La réponse du microphytobenthos aux variations de la lumière	46
III-2-a.	La photoprotection physiologique	49
III-2-b.	La photoprotection comportementale	52
III-2-c.	La réponse du microphytobenthos à la lumière <i>in situ</i>	55
IV.	Mesures de la productivité photosynthétique du microphytobenthos	56
IV-1.	Fluorimétrie PAM	57
IV-2.	La fixation de CO ₂	60
Partie 1-C :	Démarche scientifique	62
Partie 1-D :	Production scientifique dans le cadre de la thèse	68
I.	Publications	68
I-1.	Publiée.....	68
I-2.	Soumise.....	68
I-3.	A soumettre dans l’immédiat	69
II.	Communications, présentateur effectif	70
II-1.	Présentation orales.....	70
II-2.	Posters	71
III.	Communications, présentateur non-effectif	71
Partie 2 :	La réponse photo-physiologique du microphytobenthos : diversité fonctionnelle de la régulation de la photosynthèse	75
I.	Introduction	81
II.	Materials and methods	83
III.	Results	89
IV.	Discussion.....	106
Partie 3 :	La réponse photo-comportementale du microphytobenthos : importance de la qualité de la lumière et variation saisonnière de la mise à disponibilité de la biomasse photosynthétiquement active.....	111
I.	Introduction	119
II.	Materials and methods	121
III.	Results	124
IV.	Discussion.....	139
Partie 4 :	Etude exploratoire du couplage entre rythmicité de migration verticale et cycle de division cellulaire du microphytobenthos par cytométrie.	147
I.	Introduction	149
II.	Matériels et Méthodes	152

III. Résultats.....	156
IV. Discussion.....	166
Partie 5 : La réponse physiologique et comportementale du microphytobenthos à un stress environnemental couplé : conséquence sur la productivité photosynthétique	173
Partie 5-A : Réponse à un stress couplé lumière-salinité : diversité fonctionnelle de la régulation de la photosynthèse	177
Partie 5-B : Réponse à un stress couplé lumière-température : équilibre entre réponse photo-physiologique et comportementale, et adaptation latitudinale de la régulation de la photosynthèse	183
Partie 6 : Régulation de la photosynthèse du microphytobenthos dans les vasières intertidales de la côte atlantique française : impact des facteurs environnementaux et importance de la diversité fonctionnelle pour la régulation de la production primaire	195
I. Introduction	197
II. Matériel et méthodes	197
III. Résultats.....	207
IV. Discussion.....	234
Synthèse des principaux résultats.....	244
Conclusions et perspectives	255
Références bibliographiques	264
Annexes.....	278
I. Introduction	280
II. Materials and methods	283
III. Results	287
IV. Discussion.....	293
V. Conclusion.....	299
I. Introduction	315
II. Results	317
III. Discussion.....	329
IV. Experimental procedures	330

Table des figures

Figure 1 : Schéma montrant la diversité d'écosystèmes caractéristiques de la zone littorale....	3
Figure 2 : Production primaire nette des principaux écosystèmes	3
Figure 3 : Illustration du changement d'échelle spatiale.....	5
Figure 4 : Distribution des vasières intertidales dans la zone maritime OSPAR	9
Figure 5 : Distribution des vasières intertidales dans la zone maritime.....	12
Figure 6 : Carte du pertuis d'Oléron,	17
Figure 7 : Site d'étude de la vasière de Brouage.....	18
Figure 8 : Carte du marais Poitevin et de ses marges maritimes.....	19
Figure 9 : Carte de la baie de Bourgneuf et de l'île de Noirmoutier	20
Figure 10 : Localisation du site d'étude de la baie de Bourgneuf.....	21
Figure 11 : Localisation du site d'étude d'Aveiro.....	21
Figure 12 : Phylogénie simplifiée des diatomées	24
Figure 13 : <i>Brockmaniella brockmanii</i>	24
Figure 14 : <i>Plagiogrammopsis vanheurckii</i>	25
Figure 15 : Observation de sédiment intertidal par microscopie électronique à balayage.....	26
Figure 16 : Pourcentage d'irradiance à la surface le long du profil de profondeur d'un sédiment vaseux ('mud') et sableux ('sand').	27
Figure 17 : <i>Halamphora coffeaeformis</i>	28
Figure 18 : <i>Crapedostauras britanicus cox.</i>	29
Figure 19 : <i>Entomoneis paludosa</i>	29
Figure 20 : <i>Biremis lucens</i>	30
Figure 21 : <i>Planothidium delicatulum</i>	31
Figure 22 : Structure de <i>P. tricornutum</i>	31
Figure 23 : Vue schématique des composés siliceux de la paroi d'une diatomée	33
Figure 24 : Les deux vues possibles d'observation d'une diatomée.	33
Figure 25 : Les différents cas d'endosymbioses primaires et secondaires.....	35
Figure 26 : Coupe transversale d'une cellule de <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	36
Figure 27 : Vue d'ensemble de la reproduction végétative chez les diatomées benthiques	39
Figure 28 : Schéma d'une membrane thylacoïdale	41
Figure 29 : Représentation des mécanismes d'accumulation de carbone.....	42
Figure 30 : Réactions de transformation du carbone inorganique en carbone organique par le cycle de Calvin	43
Figure 31 : Variation de la lumière à la surface du sédiment.....	47

Figure 32 : Les quatre voies de désactivation de la chlorophylle excitée	47
Figure 33 : Les différents mécanismes de photoprotection.....	49
Figure 34 : Schéma simplifié du mécanisme d'activation du NPQ (qE) chez les diatomées ...	50
Figure 35 : Schéma synthétisant les modalités principales du fonctionnement du cycle des xanthophylles chez les diatomées.	51
Figure 36 : Clichés en microscopie électronique à balayage montrant la formation d'un biofilm de diatomées épipéliques	53
Figure 37 : Schématisation des rythmes de migration des diatomées épipéliques.....	53
Figure 38 : Schéma résumant le phénomène de mobilité liée à la lumière chez les diatomées benthiques épipéliques et épipsammiques.....	54
Figure 39 : Augmentation du NPQ et augmentation de la fluorescence	58
Figure 40 : Représentation schématique des niveaux de fluorescence chlorophyllienne mesurés par fluorimétrie PAM.....	59
Figure 41 : Schéma de fonctionnement d'une chambre benthique à l'émersion.....	61
Figure 42 : Démarche conceptuelle générale suivie au cours de ce travail de thèse.....	63
Figure 43 : Démarche conceptuelle détaillée suivie au cours de ce travail de thèse.....	64
Figure 44 : Approche méthodologique suivie au cours de ce travail de thèse.	66
Figure 45 : Non-photochemical quenching of Chl fluorescence.....	93
Figure 46 : Growth rate, diadinoxanthin + diatoxanthin content and de-epoxidation in the four benthic diatom growth forms.....	98
Figure 47 : Non-photochemical quenching of Chl fluorescence as function of the amount of diatoxanthin measured during Non-Sequential Light Curves in the five species of epipelon .	99
Figure 48 : Comparison of photosynthetic, non-photochemical quenching of Chl fluorescence and xanthophyll cycle parameters measured in diatom species representative of the four benthic diatom growth forms.	100
Figure 49 : Comparison of growth, photosynthetic, pigment, non-photochemical quenching of Chl fluorescence and xanthophyll cycle parameters measured in the three tychoplankton diatom species in 'benthic' and 'planktonic' conditions.....	104
Figure 50 : Chlorophyll a fluorescence of the microphytobenthos and water level as function of the time measured for 24 h under ambient light conditions.....	126
Figure 51 : Integrate values calculated from the muddy sediment as function of the A) tidal coefficient, B) maximum low tide time and C) season	127
Figure 52 : Chlorophyll a fluorescence of the epipellic MPB of muddy sediment and water level as function of the time measured under different light regimes: A) Ambient conditions	

for the first tidal cycle and darkness for the second tidal cycle, B) Ambient conditions for the first tidal cycle and continuous artificial white light for the second tidal cycle, C) Continuous artificial white light followed by darkness for the first tidal cycle and inverted light regime for the four following tidal cycles.....	130
Figure 53 : Integrate values reported to the ones of the first day under different light qualities	132
Figure 54 : Phases du cycle de division cellulaire.	150
Figure 55 : Disposition des filets en surface du sédiment et recouverts d'une fine couche de sédiment	153
Figure 56 : Exemple de résultats obtenus pour la fluorescence de l'ADN marqué au SybrGreen à différentes phases du cycle de division cellulaire	155
Figure 57 : Cytogramme obtenu pour le microphytobenthos récolté en surface du sédiment à une heure correspondant à la marée basse sur le lieu de prélèvement.	157
Figure 58 : Cytogrammes obtenus pour le microphytobenthos récolté en surface du sédiment à une heure correspondant à la marée basse sur le lieu de prélèvement.	158
Figure 59 : Cytogramme obtenu pour le microphytobenthos récolté dans le sédiment à une heure correspondant à la marée haute sur le lieu de prélèvement.	159
Figure 60 : Cytogrammes obtenus pour le microphytobenthos récolté à une heure correspondant à la marée basse sur le lieu de prélèvement.....	160
Figure 61 : Evolution de la quantité de chlorophylle a dans la culture de <i>Navicula phyllepta</i> poussée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité.	161
Figure 62 : Evolution de la quantité de β -carotène de <i>N. phyllepta</i> cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité.....	162
Figure 63 : Evolution de la quantité de diatoxanthine de <i>N. phyllepta</i> cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité.....	163
Figure 64 : Evolution de la quantité du pool de xanthophylles de <i>N. phyllepta</i> cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité.	163
Figure 65 : Evolution du taux de dé-époxydation de <i>N. phyllepta</i> cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité.....	164
Figure 66 : Proportions relatives des différentes phases de division cellulaire de <i>N. phyllepta</i> cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité..	165
Figure 67 : Moyenne sur la durée de l'expérimentation des différentes phases de cycle cellulaire en fonction des conditions appliquées.....	166

Figure 68 : Image de la fluorescence chlorophyllienne pour la mesure du proxi biomasse avant et après un stress lumineux et une période de récupération en faible lumière.	185
Figure 69: Image de la fluorescence chlorophyllienne pour la mesure de l'activité photosynthétique avant et après un stress lumineux et une période de récupération en faible lumière.....	186
Figure 70 : S Synthèse de protéines Lhcx chez une communauté de diatomées épipéliques présente dans des vases fines prélevées lors d'une émergence diurne estivale sur la vasière intertidale de Ria de Aveiro, Portugal.	190
Figure 71 : Présence de protéines Lhcx détectées par Western-blot chez six espèces de diatomées benthiques	191
Figure 72 : Localisation de la vasière de Bourgneuf.....	198
Figure 73 : Localisation de la vasière de Brouage	199
Figure 74 : Protocole du prélèvement de vase.	203
Figure 75 : Variations de lumière au cours de la marée basse étudiée.....	207
Figure 76 : Variations de température en surface du sédiment au cours de la marée basse étudiée	208
Figure 77 : Variations de la température à (P1) 0,5 cm de profondeur et (P2) 1 cm de profondeur au cours de la marée basse étudiée	209
Figure 78 : Lumière et température à la surface du sédiment au cours de la marée basse étudiée	210
Figure 79 : Evolution du PAR, du Ek et du rETRm. au cours d'une marée basse	214
Figure 80 : rETRm en fonction du PAR moyen sur 5 min pour Brouage Printemps	215
Figure 81 : rETRm en fonction du PAR moyen sur 5 min pour Bourgneuf Printemps (et Automne.....	216
Figure 84 : Evolution du PAR et du NPQm au cours d'une marée basse.....	219
Figure 89 : NPQm en fonction de la DTm.	224
Figure 90 : Biomasse en Chlorophylle a mesurée en P1 et P2 en début, milieu et fin de marée basse.	225
Figure 91 : Diagramme Gravier/Sable obtenu pour Printemps Brouage, Printemps Bourgneuf et Automne Bourgneuf.	226
Figure 92 : Teneur en eau mesurée en P1 et P2 en début milieu et fin de marée basse.....	227
Figure 93 : pH mesuré en P1 et P2 en début milieu et fin de marée basse	228
Figure 94 : Salinité mesurée en P1 et P2 en début, milieu et fin de marée basse :	229

Figure 95 : Concentration en protéines mesurée en P1 et P2 des fractions colloïdales et liées en début, milieu et fin de marée basse :	231
Figure 96 : Concentration en sucre mesurée en P1 et P2 des fractions colloïdales et liées en début, milieu et fin de marée basse	233
Figure 97 : Evolution of the pore-water sediment salinity and chlorophyll a biomass during emersion in the upper sediment layer (0-500 / 500-1000 μm) in two sites of the French Atlantic coast with two different sediment types in Spring.	289
Figure 98 Photophysiological parameters in <i>Navicula phyllepta</i> , <i>Biremis lucens</i> and <i>Plagiogrammopsis vanheurckii</i> exposed to different salinities (33 ‰ to 45 ‰).	290
Figure 99 : Rate of de-epoxidation (DES) of diadinoxanthin (DD) to diatoxanthin (DT) in <i>Navicula phyllepta</i> , <i>Biremis lucens</i> and <i>Plagiogrammopsis vanheurckii</i> exposed to different salinities (33 ‰ to 45 ‰).	290
Figure 100 : <i>In situ environmental conditions and photosynthetic activity of microphytobenthos during a summer diurnal emersion in Portuguese and French intertidal flats.</i>	319
Figure 101 : Index of photoinhibition of microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C, or 40°C) and with an inhibitor of cell motility or without.....	320
Figure 102 : Index of photoprotection of microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C, or 40°C) and with an inhibitor of cell motility or without.....	320
Figure 103 : Pigment content makers of photooxidative stress and of photoprotection of microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility or without.....	322
Figure 104 : Western-blot of the Lhcx proteins of microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility or without	
Figure 105 : Comparison of photoinhibition level and photoprotection in microphytobenthos harvested at the Portuguese and the French sites during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility or without.....	328
Figure 106 : Western-blot of the Lhcx proteins of microphytobenthos harvested at the Portuguese site during a light stress experiment performed on sediment exposed at two	

temperatures (25°C, A- or 40°C, B-) and with or without an inhibitor of cell motility.....	329
.....	
Figure S1 : Non-photochemical quenching of Chl fluorescence as a function of light intensity in the five species of epipelton, the seven species of motile, and non-motile epipsammon, and in the three species of tycho plankton	94
Figure S2 : Chlorophyll <i>a</i> fluorescence of the epipellic microphytobenthos of muddy sediment and water level as a function of the time measured during 4 consecutive days under ambient light conditions.....	122
Figure S3 : Chl <i>a</i> fluorescence of the MPB recorded from the Imaging-PAM on muddy sediment as function of the Chl <i>a</i> fluorescence recorded by the HPLC.	125
Figure S4 : Chl <i>a</i> fluorescence of the epipellic MPB of muddy sediment and water level as function of the time measured for 24 h under ambient light conditions ‘natural photoperiod when the maximum low tide is close A) to sunrise, B) to sunset.	126
Figure S5 : Maximum chlorophyll fluorescence values calculated from the muddy sediment as a function of the A) tidal coefficient, B) low tide timing (00 h) and C) date.....	128
Figure S6 : Pigment content markers of photooxidative stress of microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C, A- or 40°C, B-) and with an inhibitor of cell motility or without.....	323
Figure S7 : Pigment content markers of photoprotection of microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility or without.....	324
Figure S8 : Pigment content markers of photoprotection of microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments on sediment exposed at two temperatures (25°C, A- or 40°C, B-) and with an inhibitor of cell motility or without.....	324
Figure S9 : DES <i>versus</i> NPQ relationship for microphytobenthos harvested at the French site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility or without.....	325
Figure S10 : Amount of lipid peroxidation marker in microphytobenthos harvested at the French and the Portuguese site during light stress experiments performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) with an inhibitor of cell motility	327

Liste des tableaux

Table 1: List of the fifteen diatom species used in this study with their growth form classification, collection number, origin and average biovolume	85
Table 2 : Photophysiological parameters used in this study, their photophysiological meaning and measurement method and conditions.	87
Table 3 : Growth rate, pigment content and photosynthetic properties of the four growth forms of benthic diatoms	90
Table 4 : Non-photochemical quenching (NPQ) and xanthophyll cycle (XC) properties of the four growth forms of benthic diatoms.....	95
Table 5 : Significance of microphytobenthos pigment changes in muddy sediment exposed to blue light exposure of different intensities relative to ambient light	136
Table 6 : Ce tableau récapitule les données du Table 13 et des Figure 98 et Figure 99 du manuscrit présentées en Annexes.....	179
Table 7 : Résultat des tests T de comparaison des lumières moyennes en surface.....	210
Table 8: Résultat des tests T de comparaison des températures moyennes en surface.....	211
Table 9 : Historique lumineux et température pour les campagnes terrain.....	211
Table 10 : Tableau récapitulatif des paramètres photosynthétiques.. ..	212
Table S1 : Light intensity (E in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) provided by the internal halogen lamp of the Diving-PAM.....	88
Table S2 : Growth rate, pigment content and photosynthetic parameters of the fifteen diatom species.	91
Table S3 : Results of the PROC MIXED procedure for the comparison of the parameters of Table 3.....	92
Table S4 : Results of the PROC MIXED procedure for the comparison of the non-photochemical quenching (NPQ) values at different light intensities between the different growth forms.	94
Table S5 : Non-photochemical quenching (NPQ) and xanthophyll cycle (XC) properties of the fifteen diatom species.....	96
Table S6 : Results of PROC MIXED procedure for the comparison of the parameters of Table 7 between the different growth forms.	97
Table S7 : Growth rate and xanthophyll cycle properties of the fifteen diatom species and of the four growth forms of benthic diatoms grown under $75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	101

Table S8 : Photosynthetic, xanthophyll cycle and non-photochemical quenching (NPQ) properties of six diatom species representative of the four benthic growth forms grown under 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	103
Table S9 Growth rate, photosynthetic, xanthophyll cycle and non-photochemical quenching (NPQ) properties of the three tychoplankton diatom species grown under ‘planktonic’ conditions.	105
Table S10 : Significance of the difference between the different light conditions tested.....	133
Table S11 : Pigment content relative to Chl <i>a</i> under ambient light conditions.....	135
Table S12 Microphytobenthos pigment content relative to Chl <i>a</i> in muddy sediment exposed to blue light of three intensities (10, 40 and 120 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{ s}^{-1}$) and under ambient light conditions in Summer.	137
Table S 13: Microphytobenthos pigment content relative to Chl <i>a</i> in muddy sediment exposed to blue light of three intensities (10, 40 and 120 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{ s}^{-1}$) and under ambient light conditions.....	138

PARTIE 1 : INTRODUCTION **GENERALE**

Partie 1-A : Problématique scientifique

La zone littorale est un méta-écosystème complexe où les influences terrestres et marines convergent en une mosaïque structurée d'écosystèmes connectés les uns aux autres par des échanges d'énergie et de matières organique et minérale. Cette zone littorale française est illustrée par la série typique marais/estuaires/vasières intertidales/baies semi-fermées/plateau continental, chacun de ces écosystèmes étant constitué d'un patchwork d'habitats (Figure 1).

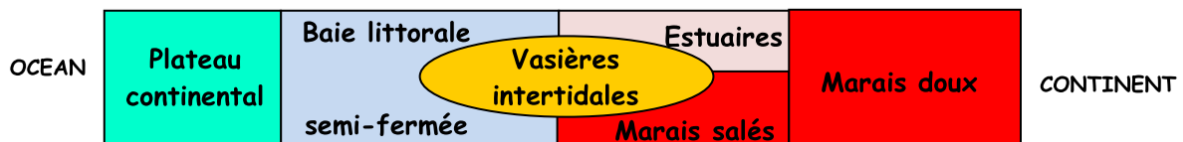


Figure 1 : Schéma montrant la diversité d'écosystèmes caractéristiques de la zone littorale du continent (marais doux) vers l'océan (plateau continental) (d'après Tortajada (2011)).

Ces écosystèmes présentent une forte biodiversité allant des microorganismes aux macroconsommateurs. Ils sont le siège d'une forte production biologique parmi les plus élevées (jusqu'à 30% du total terrestre annuel, Figure 2), et il joue un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques de plusieurs composants essentiels (carbone, azote, silice).

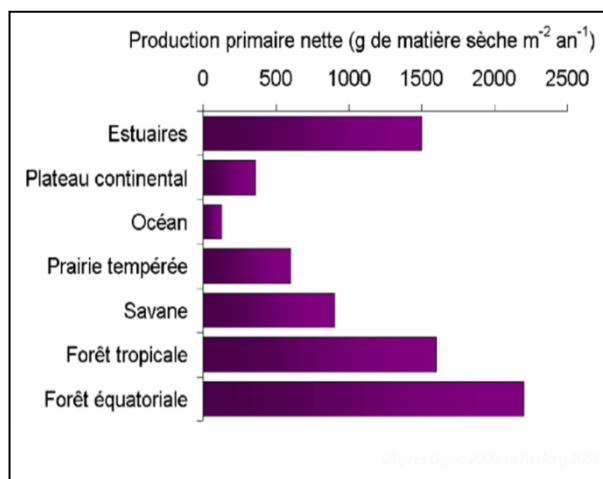


Figure 2 : Production primaire nette des principaux écosystèmes montrant la forte production des zones estuariennes, d'après Dajoz (2000) et Herlory (2007).

Depuis la fin des années 1990, il a été établi que les vasières intertidales jouent un rôle central dans la productivité des zones littorales (Blanchard, 2006) (Figure 1). Il a été estimé qu'à elles seules, les vasières produisent environ $400 \text{ g C. m}^{-2} \cdot \text{an}^{-1}$. Les ressources biologiques uniques des vasières intertidales sont largement exploitées par l'homme depuis plusieurs siècles (des gisements de coquilles d'huitres datés de l'Antiquité en attestent Verger et Ghirardi (2009). Par exemple, les Pertuis Charentais (comprenant le bassin de Marennes-Oléron et l'anse de l'Aiguillon), qui sont le site d'étude principal de ce travail de thèse, sont un des premiers sites français et européens pour l'aquaculture, des sites importants de pêche à pied (professionnelle et récréative) d'espèces de macrofaune, des sites majeurs de nurserie et de nourricerie pour les poissons soutenant les pêcheries locales et celles du golfe de Gascogne. Ces activités sont indissociables d'un tissu socio-économique régional fort, qui participe à la construction d'une image territoriale dont la portée va au-delà du territoire local : zones patrimoniales protégées, gastronomie, etc. et qui engendre des activités socio-économiques supplémentaires comme l'(éco-)tourisme. Les fortes productions des vasières intertidales proviennent du compartiment microbien assurant l'entrée de l'énergie chimique (nutriments) et physique (lumière) et leur conversion efficace en matière organique qui maintient le réseau trophique de l'écosystème entier. **Par conséquent, si l'on veut approfondir notre connaissance du fonctionnement et de la structuration trophique des zones littorales de manière à maintenir les services écosystémiques qu'elles rendent et à les exploiter de façon raisonnée et durable, il est essentiel de mieux comprendre comment la production de l'assemblage microbien des vasières est régulée.**

La forte production des vasières intertidales est due à l'activité microbienne intense d'eucaryotes autotrophes ou microalgues qui constituent le 'microphytobenthos' (Blanchard, 2006, Armbrust, 2009) et de procaryotes hétérotrophes (bactéries et archées). De par son activité photosynthétique, le microphytobenthos est considéré comme le producteur primaire majeur des vasières littorales estuariennes européennes alimentant l'ensemble du réseau trophique benthique (lors des émergences) et pélagique (lors des immersions) (Guarini *et al.*, 2006). Il joue ainsi un rôle majeur dans le fonctionnement et la structuration trophique des vasières intertidales mais aussi des écosystèmes adjacents en fonction de l'export de la production primaire locale par l'hydrodynamisme (houle, clapot, courant tidaux,...) et par voie trophique (vecteurs biotiques) (Saint-Béat, 2012).

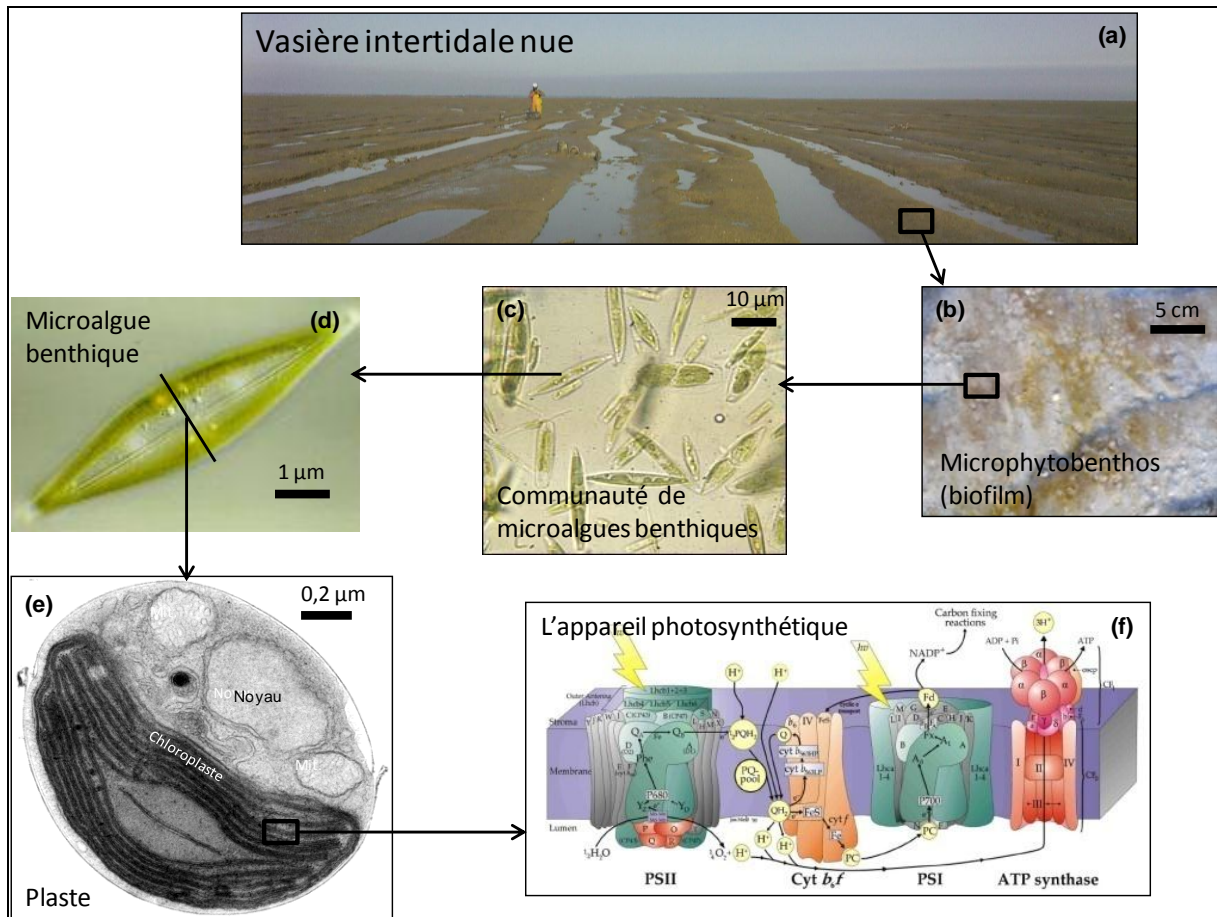


Figure 3 : Illustration du changement d'échelle spatiale (de plusieurs km (a) à l'Angström (f) appliqué au cours de ce travail de thèse. (a) Vasière intertidale du bassin de Marennes-Oléron avec son système de seillons/banquettes ; (b) microphytobenthos formant un biofilm brun à la surface du sédiment, la couleur brune est due à la pigmentation des microalgues (cf photo (d)) ; (c) communauté de microalgues benthiques constituant le microphytobenthos, observation au microscope classique ; (d) une cellule de ces microalgues isolée de la communauté (ici une espèce diatomée épipélique : *Navicula* sp.) ; (e) coupe transversale d'une de ces cellules montrant le contenu intra-cellulaire et en particulier le plaste et ces membranes thylacoïdales, observation au MET (adapté de Lavaud, 2007) ; (f) schéma d'une membrane thylacoïdale montrant les principaux complexes de l'appareil photosynthétique et en particulier le photosystème II (PSII) (crédit : J. Nield).

Bien que la production primaire des vasières intertidales soit plutôt bien quantifiée, l'activité biologique du microphytobenthos demeure une 'boîte noire' dans les modèles trophiques bento-pélagiques proposés (Guarini *et al.*, 2004, Saint-Béat, 2012). En effet, le microphytobenthos est souvent considéré comme une entité simple dont la diversité spécifique et la complexité fonctionnelle ne sont pas prises en compte dans l'étude des réponses aux contraintes environnementales. Ces réponses sont pourtant essentielles car elles régulent la productivité du microphytobenthos et sa disponibilité pour les consommateurs sur

des échelles spatiales (de l'appareil photosynthétique à la vasière en passant par la communauté microphytobenthique) et temporelles (de la minute à la saison en passant par la durée d'une émergence/immersion) variées (Figure 3). Or, les variations des contraintes environnementales, et en particulier des forçages physiques (cycle tidal, variation de la lumière, de la température, de la salinité...), sont connues pour être extrêmes et relativement rapides dans ces systèmes (Paterson et Hagerthey, 2001).

Ainsi, si l'on veut mieux appréhender la régulation et la dynamique spatio-temporelle de la production primaire des vasières intertidales, il est indispensable :

- 1) de mieux comprendre les conditions de la production et de la mise à disposition pour les consommateurs de la biomasse microphytobenthique photosynthétiquement active,
- 2) de mieux comprendre la réponse de l'activité photosynthétique du microphytobenthos aux forçages physiques à des échelles spatiales et temporelles diverses, et en particulier à des échelles fines,
- 3) d'étudier les effets du couplage des forçages physiques majeurs,
- 4) d'intégrer la diversité spécifique fonctionnelle du microphytobenthos dans ce type d'étude.

Partie 1-B : Etat des connaissances

Le texte qui suit est un état des connaissances générales concernant les divers aspects de ce travail de thèse. Des informations plus détaillées sont ensuite apportées dans les introductions et discussions respectives des Parties 2 à 6.

I. Les vasières intertidales

En 1992, la loi sur l'eau a énoncé une définition des zones humides : « On entend par zones humides, les terrains exploités ou non habituellement inondés ou gorgés d'eau douce, salée ou saumâtre de façon permanente ou temporaire » (Vergier et Ghirardi, 2009). En 1999, la convention de Ramsar a mis en évidence la nécessité de maintenir et de préserver les caractéristiques écologiques et les richesses biologiques des zones humides par des mesures prises au plan national (Frossard *et al.*, 1999). Cette convention regroupe différents types de zones humides telles que les lagunes, les estuaires, les mangroves, les herbiers et les vasières nues (appelées par certains auteurs slikkes (Vergier et Ghirardi, 2009)), les récifs coralliens et les marais ainsi que les marais maritimes (Frossard *et al.*, 1999). Cette dernière zone comprend notamment les vasières intertidales, qui sont les étendues sédimentaires soumises à l'effet du balancement des marées. Les formes des vasières et des marais maritimes s'inscrivent pour l'essentiel dans la tranche hypsométrique comprise entre les plus hautes pleines mers et les plus basses mers et soumises aux balancements des marées (Vergier et Ghirardi, 2009). Elles présentent une forte productivité biologique, comme démontrée dans de nombreux travaux (Cadée et Hegeman, 1974, Rasmussen *et al.*, 1983, Colijn et de Jonge, 1984, Pinckney et Zingmark, 1993, MacIntyre *et al.*, 1996, Underwood et Kromkamp, 1999, Serôdio et Catarino, 2000, Degré *et al.*, 2006, Üveges *et al.*, 2011), qui est à la base d'un réseau trophique complexe (Leguerrier *et al.*, 2003, Kromkamp et Forster, 2006) alimentant

une faune diverse allant de la microfaune aux oiseaux en passant par les cultures conchylicoles (Leguerrier *et al.*, 2003) et les poissons (Degré *et al.*, 2006, Kromkamp et Forster, 2006, Orvain *et al.*, 2007, Bouchet et Sauriau, 2008).

I-1. Localisation des vasières intertidales

Les vasières intertidales se forment aux abords de nombreux estuaires tidaux et peuvent être rencontrées dans trois zones climatiques différentes : (1) les zones de basse latitude dans les régions arides ou tropicales ou sous-tropicales humides, ou elles peuvent être colonisées par les mangroves ; (2) les zones de latitude moyenne dans les régions tempérées ; et (3) les zones de forte latitude ou elles sont influencées par les glaciers. Les vasières étudiées au cours de cette thèse se situent en zone tempérée, comprenant trois vasières du littoral français et une vasière du littoral portugais (Dyer *et al.*, 2000) (Figure 4). Les vasières intertidales sont nombreuses sur la façade océanique française avec les 3 estuaires majeurs : Gironde, Loire et Seine. De nombreux autres estuaires de dimensions plus modestes aboutissent à la présence de vasières intertidales comme dans le bassin d'Arcachon (33), la baie de Bourgneuf (44), du Mont-Saint-Michel (50) ou des Veys (50) ou encore les Pertuis Charentais (17) qui regroupent la baie de Marennes-Oléron et l'anse de l'Aiguillon (Verger et Ghirardi, 2009).

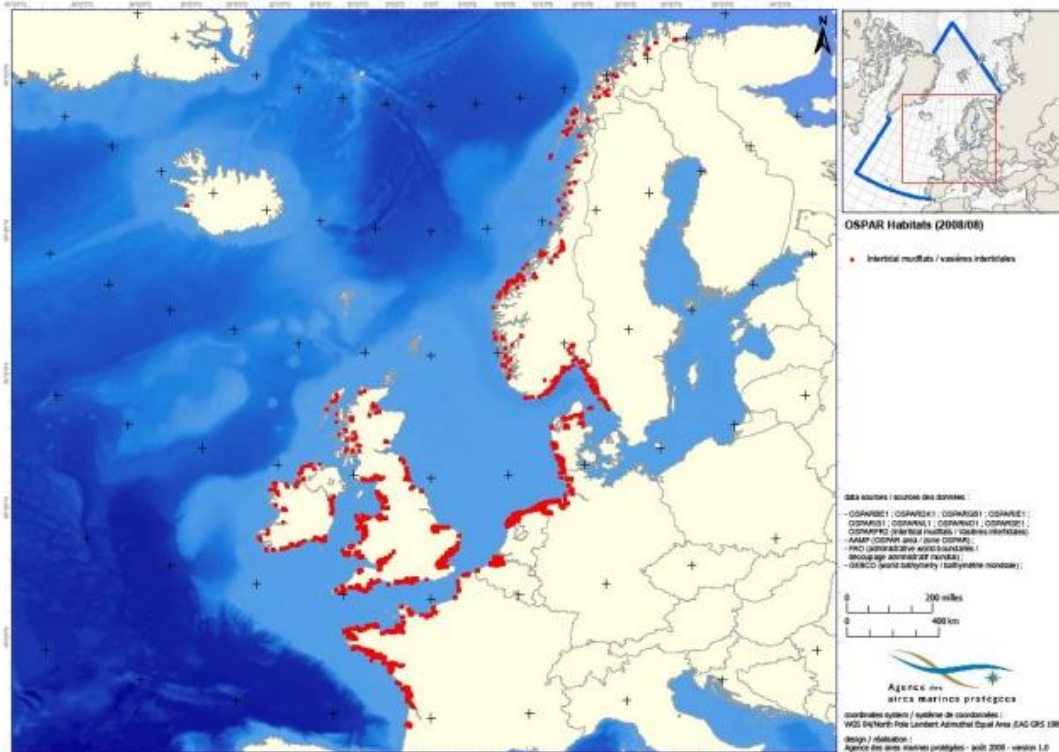


Figure 4 : Distribution des vasières intertidales dans la zone maritime OSPAR.

Ces vasières présentent un sédiment composé de vases (contenant souvent une fraction argileuse notable), et de sables dans des tailles variables pouvant aller de moins de 2 μm à 1000 μm (Alderkamp *et al.*, 2013). Les plus fines, comme celles que l'on trouve dans l'anse de l'Aiguillon, ont une composition granulométrique où la moitié des grains ont une dimension inférieure à 2 μm (Verger et Ghirardi, 2009). Leur composition minéralogique comprend des minéraux argileux variés parmi lesquels les illites sont les plus fréquents (Verger et Ghirardi, 2009).

I-2. Morphologie dynamique générale des vasières intertidales

Il existe une forte diversité de morphologies, sédiments, topographies et fonctionnements des vasières, qui sont globalement due à des facteurs physiques, sédimentologiques et biologiques (Dyer *et al.*, 2000, Verger et Ghirardi, 2009). Dans leur travaux, Dyer *et al.* (2000) ont mis en

place 20 critères environnementaux pour classer les vasières dont les plus structurant sont le marnage, l'exposition aux vagues et la pente de la vasière. Leurs analyses de la flore et de la faune ont montré une relation entre les sites de la zone haute des vasières relative à la taille des grains de sédiment alors qu'aucun schéma clair n'a pu être identifié pour les zones de milieu et de bas de vasière.

Les vasières sont soumises à des échanges de sédiments soit par sédimentation soit par érosion qui influent sur différentes échelles temporelles (Deloffre *et al.*, 2006). L'essentiel du dépôt des vases fines se produit lors de l'étale de pleine mer, instant calme correspondant à une renverse de courant : la lame d'eau presque immobile laisse alors déposer ces vases constituant la laisse de pleine mer à l'extrémité de l'étendue couverte par la marée (Verger et Ghirardi, 2009). La plupart du temps, les phases de sédimentation sont plus importantes dans les périodes où le débit des rivières est le plus faible, à savoir au printemps, alors que les phases d'érosions sont plus souvent observées en hiver, quand les débits de fleuves et l'action des vagues sont plus importants (Deloffre *et al.*, 2006). Deloffre *et al.* (2007) ont comparé trois vasières géographiquement proches afin de montrer les différents rôles joués par les apports sédimentaires, l'hydrodynamisme ainsi que par la morphologie de l'estuaire dans les rythmes de sédimentations. Leurs comportements diffèrent : alors que l'une d'elle reste stable sur les différentes échelles de temps, les taux de sédimentation des deux autres sont relativement élevés. La sédimentation de l'une est expliquée par le rythme tidal permettant une sédimentation au début du flot car peu de vagues sont présentes sur le site, alors que pour l'autre, la sédimentation est plus discontinue et est due à un dépôt à marée haute, majoritairement dû à la forte turbidité engendrée par les importants apports du fleuve. Bien que la dynamique sédimentaire de toutes les vasières ne semble pas être sensible aux mêmes facteurs, certains d'entre eux sont récurrents. Ainsi, Orvain *et al.* (2007) ont montré l'importance de la densité du sédiment pouvant elle-même être influencée par la dessiccation, l'exposition au vent et le drainage. Nittrouer *et al.* (2013) ont quant à eux montré que la dominance en sable ou en vase du sédiment va modifier la morphologie des vasières en affectant différemment les chenaux.

Un autre facteur important dans la dynamique sédimentaire des vasières est la présence de différents organismes vivants. Le microphytobenthos (MPB) sécrète des substances polymériques extracellulaires (EPS, cf chapitre II-3-c), qui vont adhérer au sédiment et ainsi le stabiliser. Des études ont montré le rôle important des diatomées dans la bio-stabilisation

du sédiment (Blanchard *et al.*, 2000) par une augmentation du seuil critique d'érodabilité, non seulement due à la quantité d'EPS excrétées lors de la locomotion du MPB (cf chapitre III-2-b) (Austen *et al.*, 1999, Le Hir *et al.*, 2007) mais aussi à leur structure pouvant varier en fonction des espèces de diatomées présentes (Brouwer *et al.*, 2005). Cependant, d'autres facteurs peuvent jouer sur la biostabilisation des sédiments, comme montré par les travaux d'Orvain *et al.* (2007). La stabilisation indirecte créée par les diatomées peut être diminuée par la pression de broutage engendrée par les invertébrés brouteurs comme *Peringia ulvae* et *Scrobicula plana* (Austen *et al.*, 1999, Orvain *et al.*, 2007) qui, vont aussi avoir une forte activité de bioturbation (Orvain *et al.*, 2007). De plus ces invertébrés déposent à la surface du sédiment des boulettes fécales pouvant être facilement érodées (Austen *et al.*, 1999). La macrofaune a montré un impact sur l'érodabilité du sédiment notamment par la production d'une couche à la surface du sédiment qui s'érode plus facilement que le reste du substrat (Rhoads et Young, 1970).

I-3. Zonation des vasières intertidales

Les vasières intertidales peuvent être divisées en trois différentes zones (Figure 5) (Klein, 1985) : (a) la zone basse qui se situe entre le niveau moyen des basses mers de mortes eaux et le niveau moyen des marées basses de printemps, elles sont souvent soumises à de forts courants tidaux ; (b) la zone moyenne, qui se situe entre la moyenne de marée basse de morte eau et la moyenne de marée haute de morte eau ; (c) la zone haute qui est la moins recouverte par la marée (seulement lors des marées hautes de vives eaux).

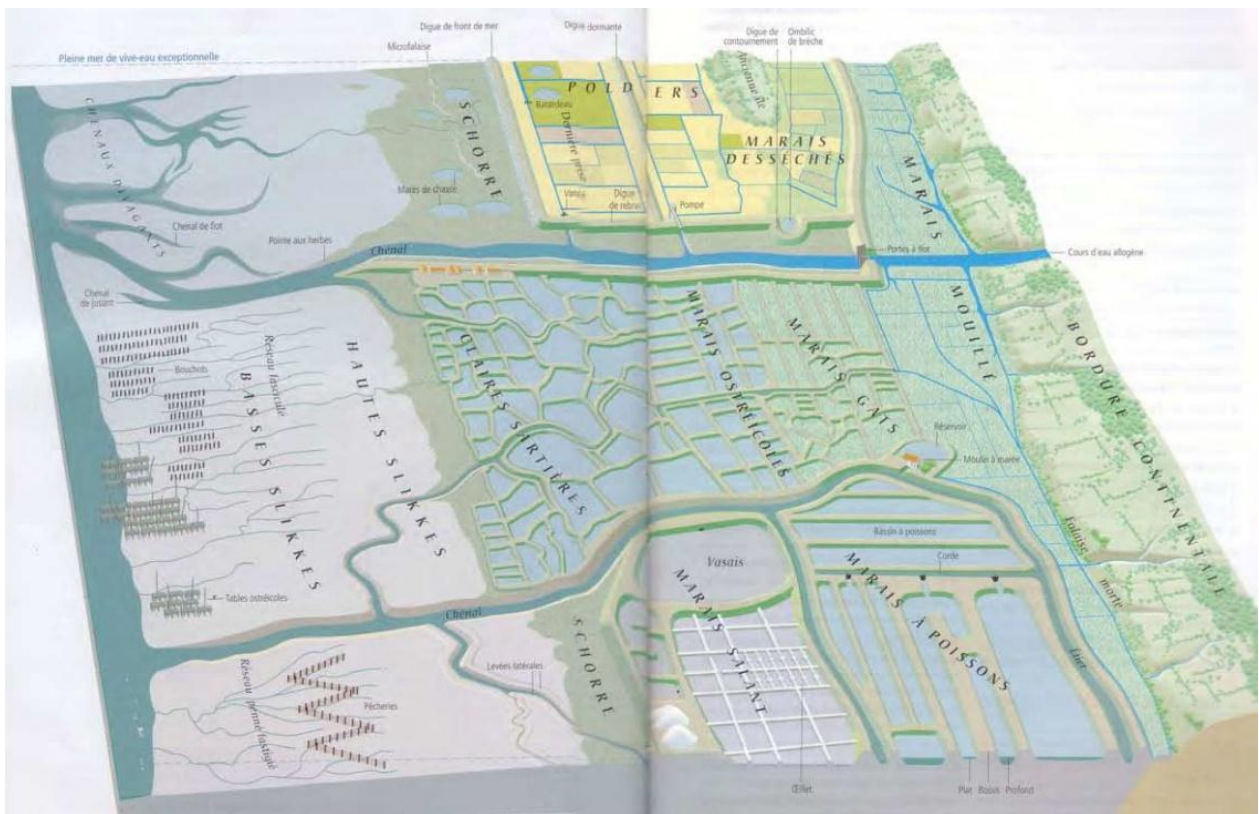


Figure 5 : Bloc diagramme schématique illustrant les principales formes de marais présents le long du littoral atlantique, d'après Verger et Ghirardi (2009)

L'écosystème de ces étendues, exposées aux influences de va et vient des marées, est le lieu de flux de matières et d'énergie, qui circulent en son sein, mais aussi vers les écosystèmes adjacents par voies hydrodynamiques, ou par voies biologiques (Verger et Ghirardi, 2009).

I-4. Les communautés biologiques des vasières intertidales.

En plus des facteurs précédemment cités, les communautés biologiques des vasières littorales connaissent de fortes contraintes principalement liées aux variations des facteurs abiotiques comme la lumière et la température (Rasmussen *et al.*, 1983, Guarini *et al.*, 2000), la salinité (Rasmussen *et al.*, 1983, Verger et Ghirardi, 2009), le pH (Rasmussen *et al.*, 1983), les nutriments et évidemment le cycle tidal (Verger et Ghirardi, 2009). La rudesse des conditions écologiques entraîne une biodiversité limitée des communautés benthiques, alors que l'abondance peut être considérable, notamment grâce à la faible compétition entre espèces (Verger et Ghirardi, 2009). Ces espèces ont elles-mêmes un effet sur leur environnement, en influençant particulièrement les processus sédimentaires (Le Hir *et al.*, 2007) comme décrit précédemment ci-dessus. Les organismes des vasières intertidales sont connectés par un réseau trophique complexe (Leguerrier *et al.*, 2003), dont la structuration est fortement 1) saisonnière (présence d'oiseaux migrateurs limicoles en hiver) et 2) dépendante du cycle répété d'émersion/immersion (Saint-Béat, 2012).

I-4-a. Les producteurs primaires des vasières intertidales

Le microphytobenthos (MPB) est la principale source de production primaire des vasières intertidales nues (Guarini *et al.*, 2000) à la base du réseau trophique. Sous nos latitudes tempérées, le MPB est largement dominé par un groupe de microalgues 'brunes', les diatomées (Admiraal, 1984, MacIntyre *et al.*, 1996, Underwood et Kromkamp, 1999, Haubois *et al.*, 2005) (cf chapitre II). D'autres groupes minoritaires et peu étudiés sont présentés (Barranguet *et al.*, 1997, Underwood, 2001, Méléder *et al.*, 2005) : cyanophytes (Sundbäck, 1984, Cariou, 1995, Sundbäck *et al.*, 1996, Moorthi et Berninger, 2006) nanoflagellés autotrophes, euglénophytes (Sundbäck *et al.*, 1996, Moorthi et Berninger, 2006). Lorsque le terme MPB sera utilisé dans la suite de cette introduction, il s'agira uniquement de diatomées benthiques (cf chapitre II-2 pour une description plus détaillée des différents groupes qui constitue le microphytobenthos).

I-4-b. La Faune des vasières intertidales : des consommateurs du MPB

La méiofaune (0.1 à 1 mm) est un compartiment très important sur les vasières constituée d'une forte proportion de nématodes, notamment *Metachromadoroides*, *Ptycholaimellus*, *Sabatieria* et *Tershellia* qui sont les espèces dominantes consommant majoritairement des bactéries et des microalgues (Rzeznik-Orignac *et al.*, 2003).

Le second groupe important est la macrofaune (taille supérieure à 1 mm) benthique suspensivore, suspensivore/déposivore, limivore ou/et détritivore/déposivore. Les espèces les plus souvent rencontrées dans les sédiments vaseux sont *Corophium volutator*, *Peringia* sp. (nouveau nom de genre d'*Hydrobia* sp.) et *Scrobicularia plana*. *C. volutator* est un petit crustacé dont les populations présentent des densités considérables (Bolam *et al.*, 2002). Déposivore, il se nourrit des débris d'algues, de diatomées (Hagerthey *et al.*, 2002) et de bactéries (Gerdol et Hughes, 1994), il est lui-même une proie connue pour de nombreux oiseaux limicoles migrateurs (Peer *et al.*, 1986). *Peringia* sp. est un petit mollusque gastéropode déposévore et dont les peuplements peuvent atteindre des densités de l'ordre de plusieurs dizaines de milliers d'individus par mètre carré (Sauriau *et al.*, 1989, Orvain *et al.*, 2007, Verger et Ghirardi, 2009). Elle est connue pour être un important consommateur de microalgues benthiques (Bolam *et al.*, 2002, Hagerthey *et al.*, 2002). *S. plana* est un mollusque lamellibranche détritivore et suspensivore (Orvain *et al.*, 2007). Un autre mollusque lamellibranche largement présent sur les vasières intertidales est la *Macoma baltica* (Sauriau *et al.*, 1989, Verger et Ghirardi, 2009). Tous deux sont connus pour se nourrir de microalgues benthiques durant les phases d'émersion (Riera *et al.*, 1999, Bolam *et al.*, 2002). Les espèces les plus communes d'annélides des sédiments de sables très fins sont les arénicoles marines (*Arenicola marina*) et les néréides communes (*Nereis diversicolor*). Dans des sédiments plus grossiers, d'autres annélides assez proches sont trouvées comme les Lanices (Verger et Ghirardi, 2009). Elles se nourrissent principalement de microalgues et de bactéries (Harley, 1953, Rijken, 1979).

Les mollusques bivalves sont particulièrement abondants dans les zones humides littorales et certains font l'objet d'importantes cueillettes par la pêche récréative (Peronnet Isabelle, 2003) et d'autres d'un véritable élevage (Blanchard, 2006, Verger et Ghirardi, 2009). Les moules

(*Mytilus edulis*), les palourdes et les coques sont l'objet d'une culture sur les vasières des estuaires du littoral français (Blanchard, 2006, Verger et Ghirardi, 2009). Mais c'est l'huître plate (*Ostrea edulis*) qui a longtemps été l'espèce emblématique du littoral français, maintenant détrônée par l'huître creuse (*Crasostreas gigas*). Cette dernière fait aujourd'hui l'objet d'un élevage intensif (Verger et Ghirardi, 2009). Des études ont montré que les huîtres creuses, tout comme les moules, qui sont des suspensivores, sont capables de sélectionner leur ressources et vont préférentiellement se nourrir de microalgues benthiques remises en suspension lors du retour de la marée (Marteil, 1976, Riera et Richard, 1996). L'IFREMER a établi un rapport en 2013 montrant que la conchyliculture en France présentait en 2009 un volume de 186 298 tonnes soit 519,6 M€ dont 66.3% sont issus des cultures huîtres, 28.8% des cultures de moules et 4.9% d'autres cultures (majoritairement coques et palourdes) (Meunier *et al.*, 2013). Ces données montrent l'intérêt économique majeur de ces espèces.

La plupart des espèces de poissons présentes lorsque la vasière est recouverte par la marée sont des espèces telles que les bars, les mullets, les soles fréquentant également les zones marines adjacentes (Verger et Ghirardi, 2009). Les vasières servent de zones de transition à certaines espèces migratrices (anguilles, flets, etc), alors que pour d'autres espèces, elles sont des nurseries pour les juvéniles (Blanchard, 2006).

Enfin, les oiseaux limicoles présentent une originalité dans la faune des vasières qui suscite un grand intérêt auprès du grand public comme auprès des naturalistes, ce qui engendre des bénéfices locaux considérables liés à l'écotourisme (85 milliards de dollars aux USA en 2001) (Whelan *et al.*, 2008). Les vasières littorales, avec leur faune benthique abondante, la végétation halophile et basse et les systèmes adjacents (marais salés, plan d'eau douce, canaux, haies) fournissent des sites propices à la nourriture, au repos ainsi qu'au nichage des oiseaux, en particulier les espèces migratrices (Verger et Ghirardi, 2009).

I-5. Les sites d'étude

Plusieurs sites d'étude et d'échantillonnage ont été utilisés dans le cadre de la thèse : la baie de Marennes-Oléron (Partie 6) et l'anse de l'Aiguillon (Parties 3, 4 et 5B) qui font parties des Pertuis Charentais (17-85), la baie de Bourgneuf (44-85) (Partie 6) et dans une moindre mesure la Ria de Aveiro proche de Vista Alegre au Portugal (Partie 5B). Dans la Baie de Marennes-Oléron, la vasière de Brouage, dominée par les diatomées épipéliques, est étudiée depuis longtemps au sein du laboratoire LIENSs (et les laboratoires qui ont précédé). De par la quantité de connaissances disponibles pour ce site, son étude est facilitée, mais son échantillonnage à haute résolution temporelle est difficile pour des raisons logistiques car peu facile d'accès : la zone de vasière moyenne étudiée ici n'est facilement et rapidement accessible que par aéroglisseur. C'est pour cette raison que nous avons également étudié la vasière d'Esnandes (Anse de l'Aiguillon), plus proche et plus facile d'accès, pour échantillonner du sédiment frais lors d'une étude de suivi à long-terme et à relativement haute fréquence (Partie 3).

Afin d'étudier *in situ* les communautés de MPB à dominance épipsammique, la vasière de Liarne dans la baie de Bourgneuf a été étudiée. Elle est depuis longtemps le site d'étude de l'équipe Mer Molécules Santé (MMS) EA 2160, de l'Université de Nantes où travaille Vona Méléder-Tard avec qui ce travail de thèse a été fait en collaboration.

De bonnes descriptions de ces sites ont été faites par Verger dans son ouvrage intitulé « Zones Humides du Littoral Français » (2009), descriptions qui sont synthétisées ci-après.

I-5-a. La Vasière de Brouage

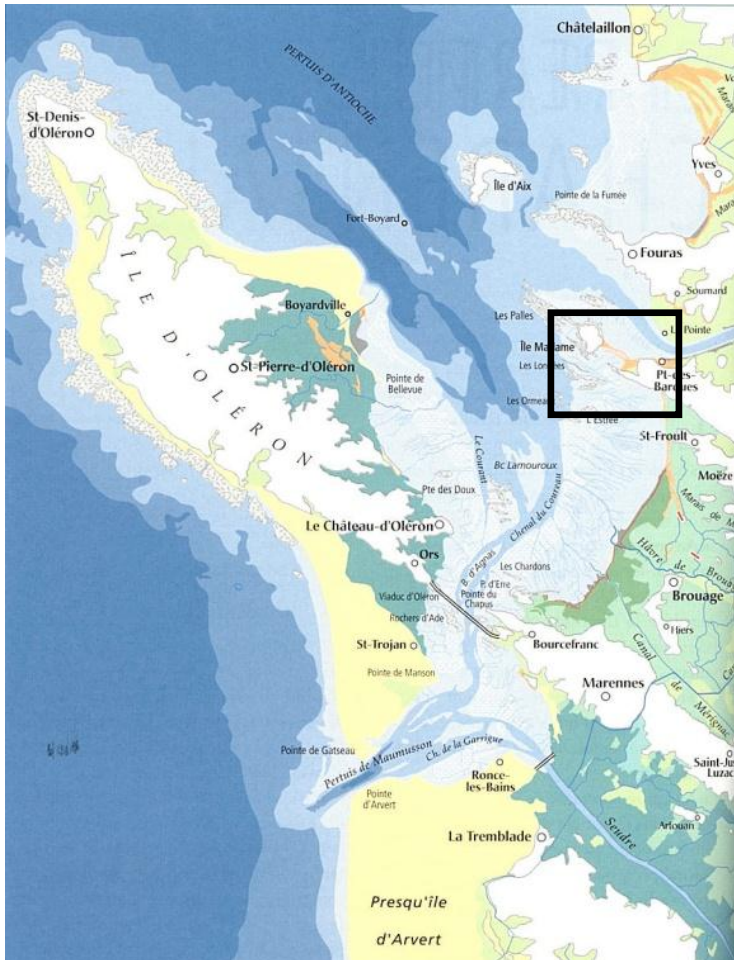


Figure 6 : Carte du pertuis d'Oléron, en encadré, la vasière de Brouage (Verger et Ghirardi, 2009)

La vasière de Brouage se situe dans le pertuis d'Oléron (Figure 6). Toute la région située en arrière de l'île d'Oléron, comprise entre le pertuis d'Antioche au nord et le pertuis de Maumusson au sud, est un milieu favorable au développement des vasières (Verger et Ghirardi, 2009). La vasière de Brouage présente une grande extension et une géomorphologie particulière due à sa situation abritée. Au nord, les affleurements rocheux des Longées, des Ormeaux et de l'Estrée complètent la protection offerte par les platins des Palles, l'île Madame et le cap de Port-des-Barques, et au sud la protection est assurée par la pointe du Chapus précédée de la plateforme d'abrasion de la pointe des Caudons. La Baie de Brouage, abritée des houles à l'ouest par l'île d'Oléron, ne participe que faiblement aux courants méridiens du détroit du Chapus. Elle reçoit par contre lors de la montée des eaux une bonne partie des eaux lourdement chargées en vase que la rencontre des deux flots laisse subsister dans cette partie du Coureau sans les entrainer. Une fois sur les vasières de la baie de

Brouage, ces eaux troubles progressent avec le flot pour décanter, au moins partiellement, lors de la pleine mer. La partie basse de la baie est atteinte par les courants nord-sud qui sont assez rapides dans le chenal du Coureau et seront moins sujets à la sédimentation. Au-dessus des installations conchylicoles commencent les sédiments vaseux étudiés pendant cette thèse (entre les zones 2 et 3, Figure 7) et qui sont les plus riches en MPB. Ils sont couverts de mégarides longitudinales particulièrement développées dans les environs du chenal de Mérignac.

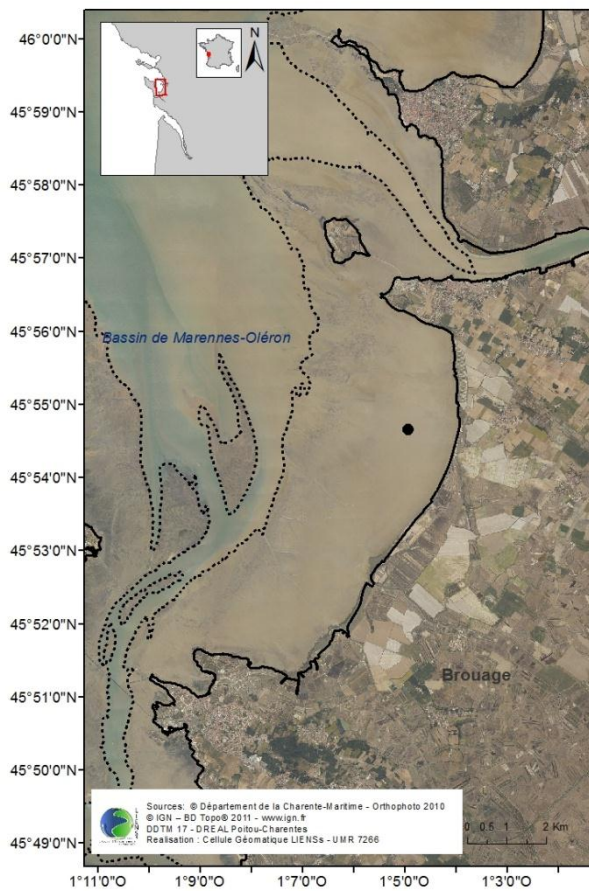


Figure 7 : Site d'étude de la vasière de Brouage

C'est sur cette vasière que s'est concentré le travail *in situ* relatif au sédiment à dominance de diatomées épipéliques (Figure 7). La granulométrie rencontrée sur toute la vasière est homogène, avec des particules de silt et d'argiles de taille inférieure à 10 μm (Gouleau *et al.*, 2000). Une étude de 2005 (Haubois *et al.*) a montré qu'en moyenne au cours de l'année la population est composée de 8 (\pm 2) espèces épipéliques, avec une dominance relative des espèces de petite taille (*Navicula phyllepta*, *N. digitoradiata* et *N. gregaria*) contribuant à 51% du biovolume total du MPB. On rencontre aussi, de façon moins fréquente, des espèces

de taille plus importante (*Gyrosigma fasciola*) qui malgré leur faible nombre contribuent significativement à la biomasse totale du microphytobenthos.

I-5-b. La Vasière d'Eslandes, Pointe de Saint-Clément

Ce site se situe dans l'anse de l'Aiguillon au niveau de l'estuaire du Lay (Figure 8). L'absence de perturbations structurales permet à une morphologie alluviale de se développer librement à l'abri des flèches littorales d'Arçay et de l'Aiguillon. Entre ces pointes, s'ouvre donc l'estuaire du Lay où les mouvements de la marée ont été réduits par la construction de barrages. La diminution du volume d'eau oscillant a accéléré l'envasement de l'estuaire ou de vastes vasières se sont développées sur les deux rives.



Figure 8 : Carte du marais Poitevin et de ses marges maritimes (Verger et Ghirardi, 2009)

Ce site est facile d'accès (10 km au nord de La Rochelle) et il est couramment utilisé pour mettre en place des protocoles de mesure utilisés sur des terrains plus difficile d'accès, ainsi que pour récolter de la vase à des fins expérimentales au laboratoire (cf Thèse O. Herlory, 2005). Les slikkes y sont très développées et constituées de vases très fines ($< 63 \mu\text{m}$) (Lorin, 1968) dans lesquelles on rencontre, de manière similaire à la vasière de Brouage, une dominance de petites diatomées épipéliques du genre *Navicula* et des plus grosses des genres *Gyrosigma* et *Pleurosigma* (observations personnelles). Au cours de cette thèse, c'est sur ce site que le sédiment contenant le MPB a été récolté pour les expérimentations décrites dans les Parties 3, 4 et 5B.

I-5-c. La Vasière de Liarne

La baie de Bourgneuf se situe en arrière de l'île de Noirmoutier et appartient au type des baies frisonnes (Figure 9). Celles-ci ont une morphologie dominée par la rencontre des flots provenant de deux ouvertures, de part et d'autre d'une île. A la différence d'autres baies frisonnes, la baie de Bourgneuf présente une forte dyssymétrie de ces deux ouvertures. Au nord, la baie s'ouvre largement entre la pointe de Saint-Gildas et l'Herbaudière. Au sud, la baie ne communique avec la mer que par l'étroit goulet de Fromentine. Les vasières externes, très sableuses, sont constituées par l'éventail du delta externe de la marée qui se forme à partir du goulet de Fromentine.



Figure 9 : Carte de la baie de Bourgneuf et de l'île de Noirmoutier, en encadré la vasière de Liarne (Verger et Ghirardi, 2009).

Le site que nous avons étudié se situe au nord de la baie. L'hydrodynamisme y est calme avec des vitesses modérées de courant et le transit sédimentaire permet un faible colmatage dans la zone qui borde le Gois au nord.

Sur cette vasière (Figure 10), on rencontre un mélange de sites à dominance de diatomées épipéliques (*Navicula perminuta*, *Fallacia tenera*, *N. spartinetensis* et *N. anglica*) et à dominance épipsammique (*Plagiogrammopsis vanheurkii*, *Amphora spp.*, *Achnanthes hauckiana*, *Thalassiosira decipiens*, *A. lanceolata*, *Cymatosira belgica*, *Plagiogramma tenuissimum*, *Cocconeis hoffmanni*, *Biremis ambigua*, *Fragilaria pinnata* et *Co. pelta*)

(Méléder *et al.*, 2007). Ce sont sur les sites à dominance épipsammique (Figure 10 Site III) dont la granulométrie est composée à 41% de vases inférieures à 63 μm et de sables (entre 63 et 2000 μm) (Méléder *et al.*, 2007) qu'une partie de ce travail de thèse s'est concentrée (Partie 6 et dans une moindre mesure Partie 3).

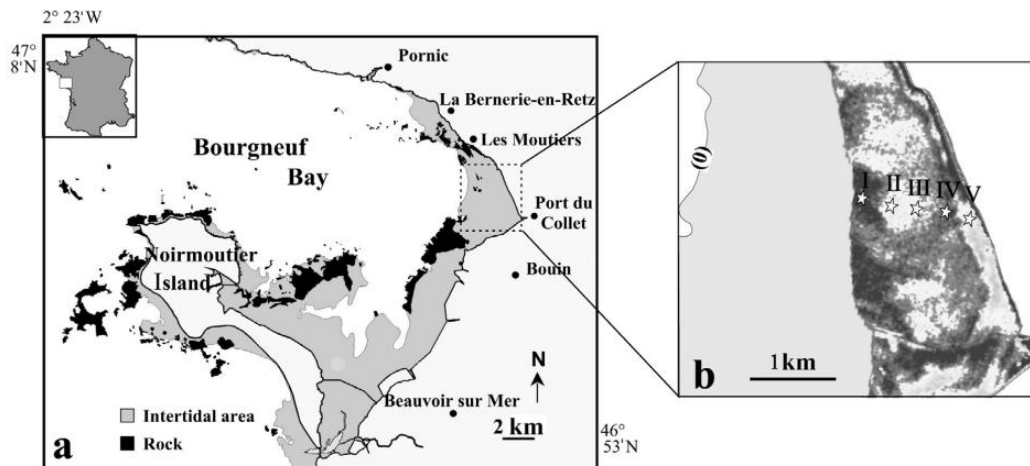


Figure 10 : Localisation du site d'étude (III) de la baie de Bourgneuf (Méléder *et al.*, 2005)

I-5-d. La Vasière de Ria de Aveiro

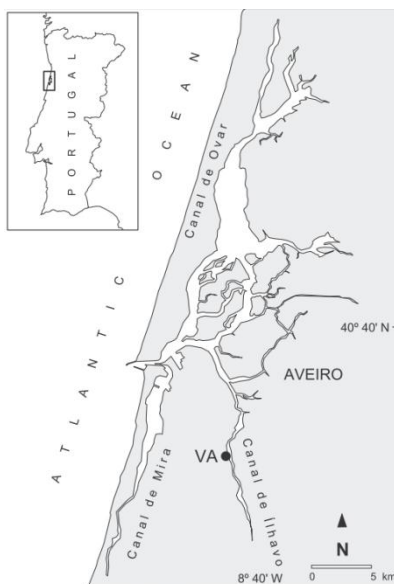


Figure 11 : Localisation du site d'étude (VA) d'Aveiro (Serôdio *et al.*, 2008)

La vasière étudiée au Portugal (Parties 5B) est une vasière intertidale située près de Vista Alegre, sur le canal de l'Ilavo, sur la Ria de Aveiro, un estuaire mésotidal localisé au centre de la côte ouest du Portugal (). Le site d'étude (VA) est composé de sédiment vaseux (97% de vase inférieure à 63 μm) où le microphytobenthos est dominé par des diatomées épipéliques (*Nitzschia* sp., *Navicula* sp. et *Gyrosigma* sp.) (Serôdio *et al.*, 2005a).

II. Les diatomées benthiques des vasières intertidales

Comme spécifié précédemment dans le chapitre I-4-a, ce sont les diatomées qui dominent le microphytobenthos des vasières intertidales dans les régions tempérées. La plupart des informations présentées à leur sujet ci-dessous, si elles ne sont pas accompagnées d'une citation explicite, sont issues du livre 'The Diatoms : Biology & Morphology of the Genera' de Round *et al.* (1990), et des travaux de Kooistra *et al.* (2007, 2009) ou encore de la revue de Armbrust (2009).

II-1. Généralités

Les diatomées sont des protistes, donc unicellulaires (composés d'une seule cellule) et eucaryotes (possédant un noyau). Elles sont pigmentées et donc photoautotrophes (font la photosynthèse), bien que certaines rares espèces soient hétérotrophes (synthèse de carbone organique à partir de carbone organique préexistant) à l'obscurité si elles disposent des sources en carbone organique adéquates. Certaines espèces peuvent former des colonies. Elles sont alors regroupées en amas ou en chaînes. Cependant chaque cellule reste différenciable. Seul un groupe de diatomées fait exception à cette règle, ce sont les *Chaetocerotaceae* qui présentent une fusion siliceuse d'un composant des différentes cellules. Les autres groupes et espèces forment des colonies qui vont soit enchevêtrer des épines, crêtes ou excroissances

siliceuses, soit se lier par des pieds ou des tiges de mucilage ou encore se lier par des filaments d'EPS.

La première observation des diatomées date de 1703 en Angleterre par un anonyme qui, malgré la faible précision du matériel d'observation, émet l'hypothèse qu'il observe un végétal. Cette classification a pendant longtemps fait débat, et ce n'est qu'au milieu du 19^{ème} siècle que l'appartenance des diatomées au règne végétal a été totalement établie. En effet, jusqu'alors, la mobilité de ces êtres unicellulaires avait conduit un grand nombre de naturalistes à les classer dans le règne animal.

II-2. Différentes formes de vie

Les diatomées sont présentes à la surface du globe dans toutes les eaux à l'exception des eaux les plus chaudes ou hypersalines. Elles sont très abondantes, que ce soit sous forme planctonique, ou benthique, dans les eaux salées, saumâtres et les eaux douces.

Deux grandes morphologies de diatomées se distinguent : les diatomées centriques et les diatomées pennées (Figure 12). Alors que les centriques auront une forme circulaire, les pennées présentent une forme plus allongée (fusiforme). De plus, les diatomées pennées possèdent un ou plusieurs raphé(s) (bien que certaines espèces puissent en être dépourvues) alors que les centriques en sont dépourvues. Le raphé est une fente longitudinale le long de la valve (voir chapitre II-3-a). La plupart des espèces pennées présentent deux raphés (biraphidées) le long ou près de la ligne médiane de la valve. Ils sont séparés par un pont de silice qui est généralement plus fin que le reste de la valve et peut parfois porter le terme de 'nodule central'. L'étendue, la position et la structure du raphé sont des caractéristiques taxonomiques importantes.

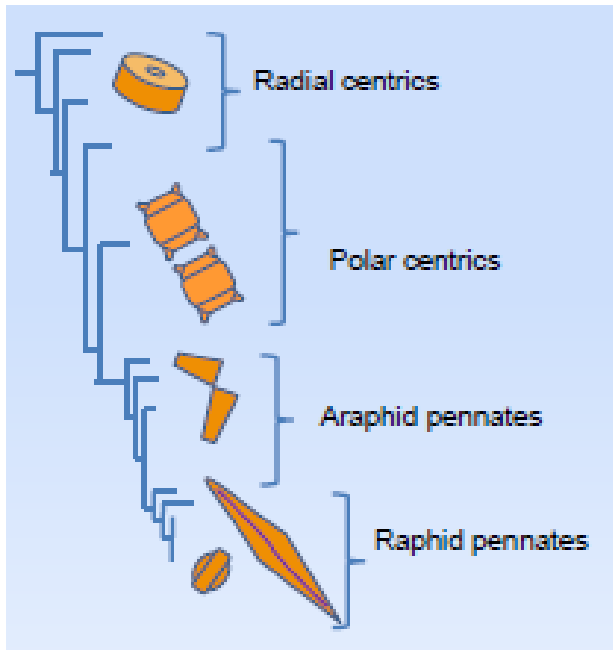


Figure 12 : Phylogénie simplifiée des diatomées montrant les deux grandes morphologies (centriques et pennées). La grande majorité des diatomées benthiques sont pennées (sauf les espèces tychoplanctoniques qui présentent des formes centriques), elles possèdent un ou deux raphé(s) ('raphidées'), c'est le cas de la plupart des espèces épipéliques, ou elles n'en possèdent pas ('araphidées'), c'est le cas de la plupart des espèces épipsammiques (Figure L. Blommaert).

L'écologie des diatomées benthiques est moins bien connue que celle des planctoniques. Bien que le benthos soit plus diversifié que le plancton, que ce soit en termes de nombre d'espèces ou de formes de vie, ce sont des environnements plus compliqués à échantillonner que la colonne d'eau. La distinction entre le plancton et le benthos n'est pas absolue, et certaines espèces sont capables d'avoir une forme de vie alternant entre les deux, les espèces sont alors dites 'tychoplanctoniques' (Figure 13 et Figure 14).

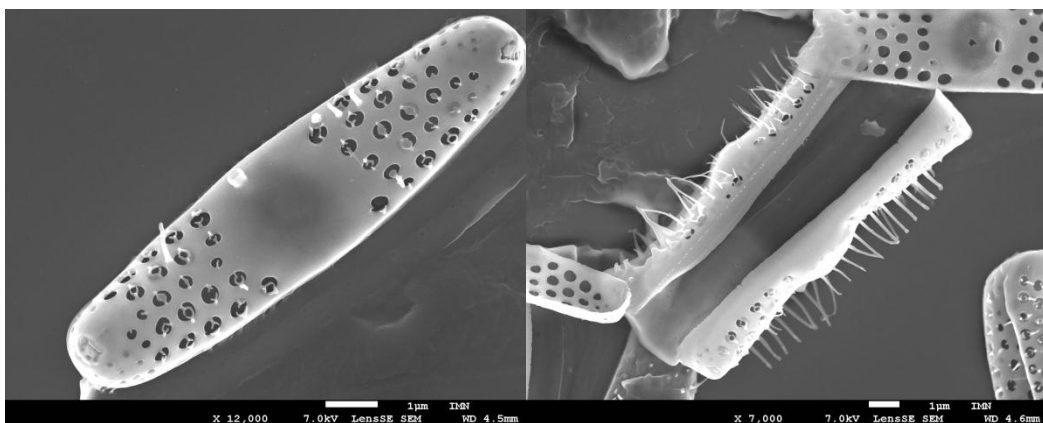


Figure 13 : *Brockmaniella brockmanii* (Hasle *et al.*, 1983). Exemple de diatomées tychoplanctoniques étudiées au cours de cette thèse (cf Parties 2, 5A)

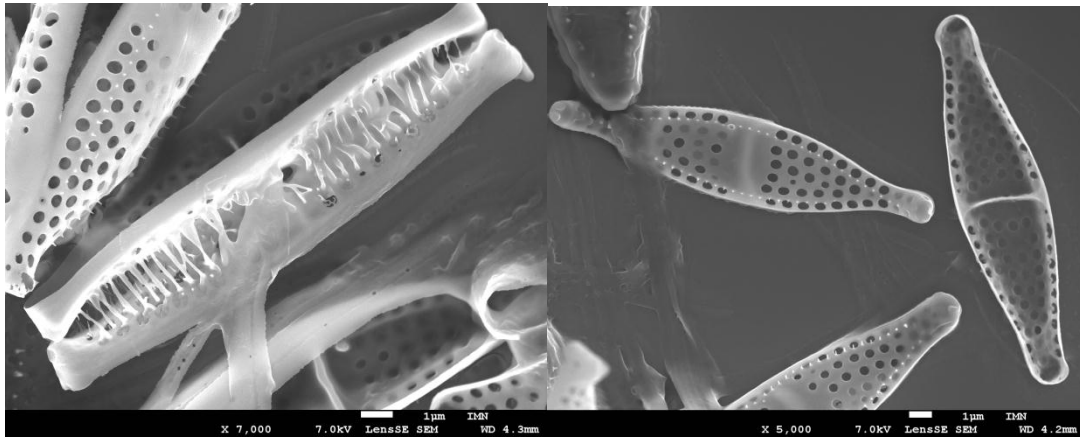


Figure 14 : *Plagiogrammopsis vanheurckii* (Witkowski, 2000). Exemple de diatomées tychoplanctoniques étudiées au cours de cette thèse (cf Parties 2, 5A)

Trois grands groupes de diatomées vivant dans les vasières intertidales peuvent être distingués (Figure 43) : 1) les diatomées épipéliques mobiles qui pour la plupart sont des espèces pennées raphidées migrant dans le sédiment (Round, 1965, Eaton et Moss, 1966, Round et Eaton, 1966, Round et Palmer, 1966, Fischer *et al.*, 1977) ; 2) les diatomées épipsammiques qui sont pour la plupart des espèces pennées vivant attachées aux grains de sédiment ne possédant pas toujours de raphé (Round, 1965, Eaton et Moss, 1966, Round et Eaton, 1966, Round et Palmer, 1966, Fischer *et al.*, 1977) ; et 3) les diatomées tychoplanctoniques qui sont des espèces pennées ou centriques capables de passer une partie de leur cycle de vie dans la colonne d'eau (Vos et de Wolf, 1993, Trites *et al.*, 2005). Ce dernier groupe reste cependant mal défini ; seuls les deux premiers sont détaillés ci-dessous (Figure 15).

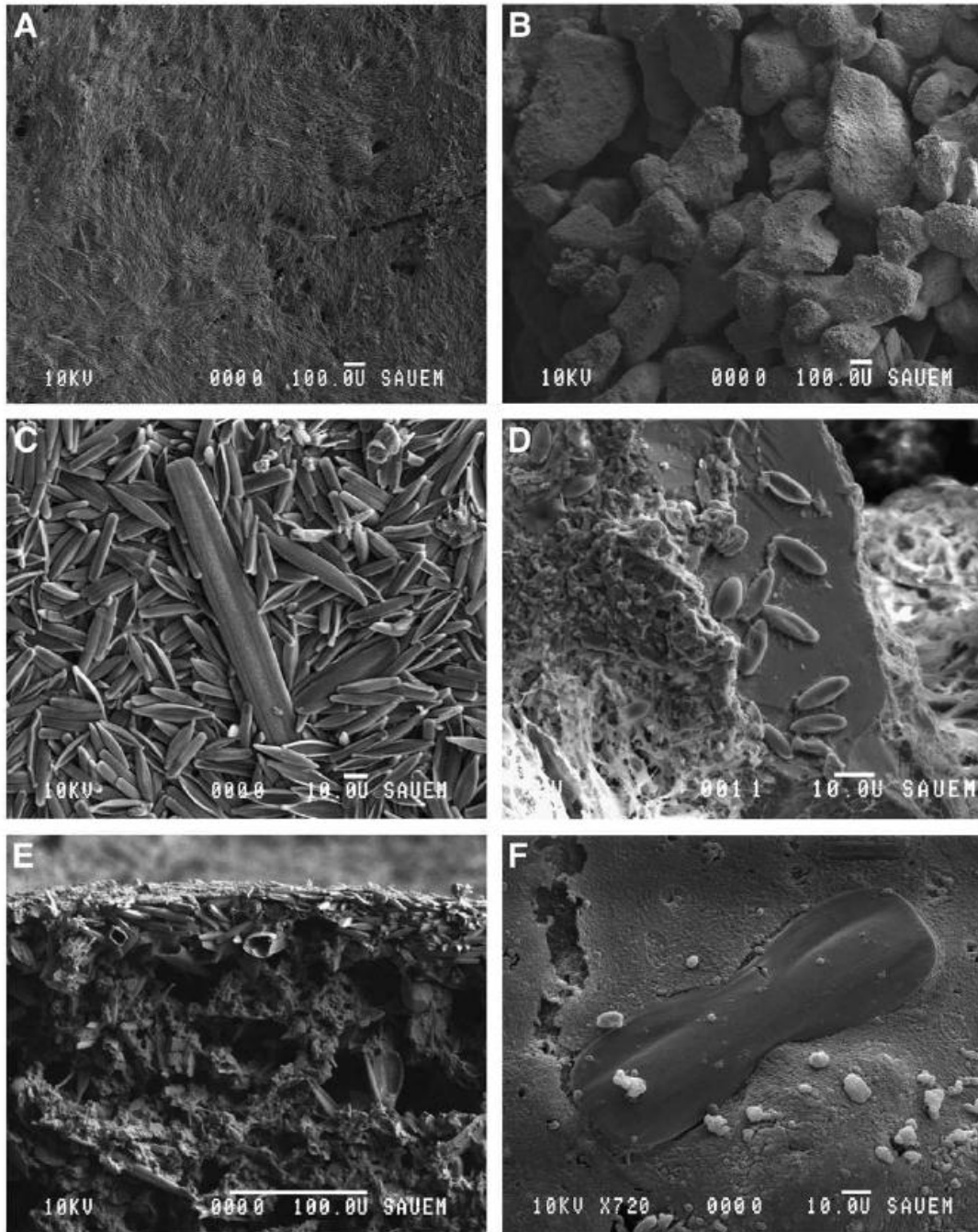


Figure 15 : Observation de sédiment intertidal par microscopie électronique à balayage. (A) Vue générale du sédiment à vases fines montrant une surface compacte de biofilm de diatomées épipéliques ; (B) Vue générale des pores de sédiment sableux ; (C) Grossissement plus important de sédiment à vases fines montrant le microphytobenthos dominée par des diatomées naviculoïdes épipéliques ; (D) Grossissement plus important de la surface de sédiment sableux montrant quelques cellules de petites diatomées épipsammiques attachées aux grains de sédiment ; (E) Coupe transversale de la surface du sédiment vaseux montrant un biofilm de surface extrêmement dense (i.e. 150 µm de d'épaisseur) et quelques diatomées épipéliques plus profondément installées dans le sédiment, probablement en migration vers la surface ; (F) Cellule de *Plagiotropis lepidoptera* (forme épipsammique) à la surface de sédiment sableux (Cartaxana *et al.*, 2011).

II-2-a. Les diatomées épipéliques des sédiments à vases fines

Dans les sédiments cohésifs où la lumière ne pénètre presque pas (quelques dizaines à quelques centaines de micromètres, Figure 16) (Cartaxana *et al.*, 2011), les diatomées épipéliques dominent (Underwood, 2001, Kooistra *et al.*, 2007, Steele *et al.*, 2010) et sont responsables de la majeure partie de la production primaire (Haubois *et al.*, 2005).

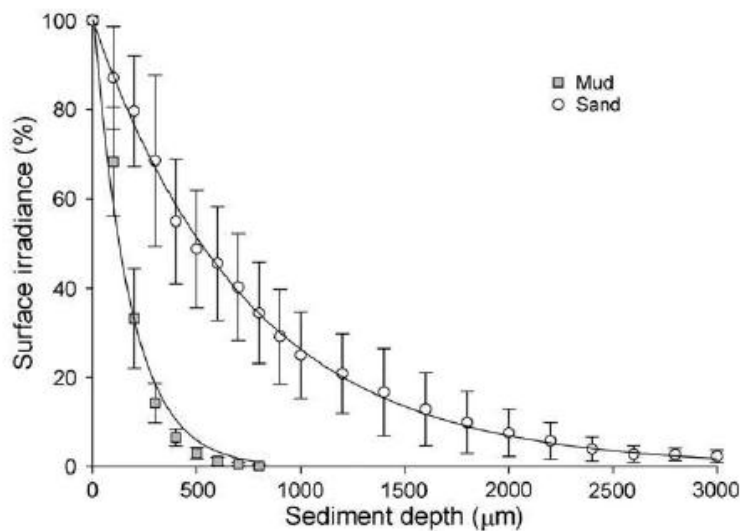


Figure 16 : Pourcentage d'irradiance à la surface (moyenne ± EC) le long du profil de profondeur d'un sédiment vaseux ('mud') et sableux ('sand') (Cartaxana *et al.*, 2011).

Elles sont capables de se concentrer à la surface par migration ascendante lors de l'exondation et de constituer un biofilm photosynthétique dense ; elles se réenfouissent dans le sédiment avant le retour de la marée (Cadée et Hegeman, 1974, Rasmussen *et al.*, 1983, Colijn et de Jonge, 1984, Pinckney et Zingmark, 1993, MacIntyre *et al.*, 1996, Barranguet *et al.*, 1997, Barranguet *et al.*, 1998, Underwood et Kromkamp, 1999, Serôdio et Catarino, 2000, Leguerrier *et al.*, 2003, Saburova et Polikarpov, 2003, Consalvey *et al.*, 2004b, Underwood *et al.*, 2005, Blanchard, 2006, Migné *et al.*, 2007, Coelho *et al.*, 2011). Les modalités de la formation de ce biofilm sont plus approfondies dans le chapitre III-2-b. Herlory (2004) a évalué cette biomasse à environ 20-25 mg Chl a m⁻² qui ne correspond qu'à une fraction de la biomasse disponible (15%) (Herlory *et al.*, 2005), mettant en évidence que seule une partie de la biomasse épipélique est en mesure de se mobiliser pendant la marée basse pour participer à la production primaire (Blanchard, 2006).

Lorsqu'elles sont en surface, elles sont sujettes à la resuspension, au réenfouissement ainsi qu'au broutage par les prédateurs (cf chapitre I-4-b). Leur migration est régie par les stimuli environnementaux (Perkins *et al.*, 2010a, Coelho *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2012, Scholz et Liebezeit, 2012b, Vieira *et al.*, 2013b) dont les plus importants semblent être la lumière (Kingston, 1999b, Sauer *et al.*, 2002, Mitbavkar et Anil, 2004, Wenderoth et Rhiel, 2004, Serôdio *et al.*, 2006a, McLachlan *et al.*, 2009, Du *et al.*, 2012, Vieira *et al.*, 2013b) et le cycle de marée (Drum et Hopkins, 1966, MacIntyre *et al.*, 1996, Barranguet *et al.*, 1998, Kingston, 1999a, Consalvey *et al.*, 2004b, Mitbavkar et Anil, 2004, Apoya-Horton *et al.*, 2006, Coelho *et al.*, 2011). La lumière est modulée en fonction de la typologie des sédiments (Figure 16) et du cycle tidal. Lors des périodes d'exondation, le sédiment sera directement illuminé, alors qu'au retour de la marée, la forte turbidité des eaux empêche toute pénétration lumineuse. Cependant des espèces épipéliques peuvent être rencontrées dans des milieux subtidaux, dans des cas où la colonne d'eau laisse suffisamment pénétrer la lumière (Cibic *et al.*, 2007).

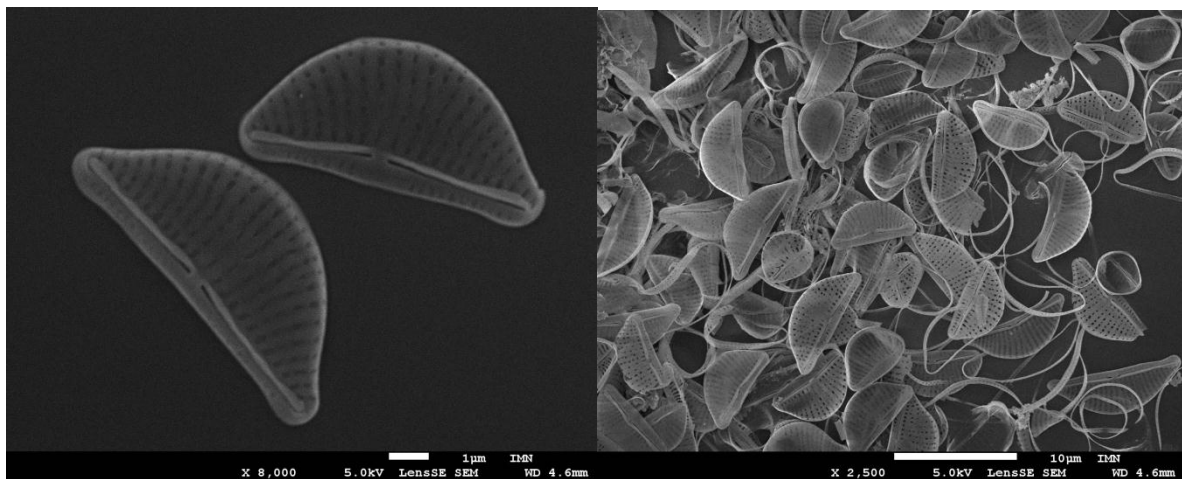


Figure 17 : *Halamphora coffeaeformis* (Levkov, 2009). Exemple de diatomées épipéliques étudiées au cours de ce travail de thèse (cf Parties 2 et 5A)

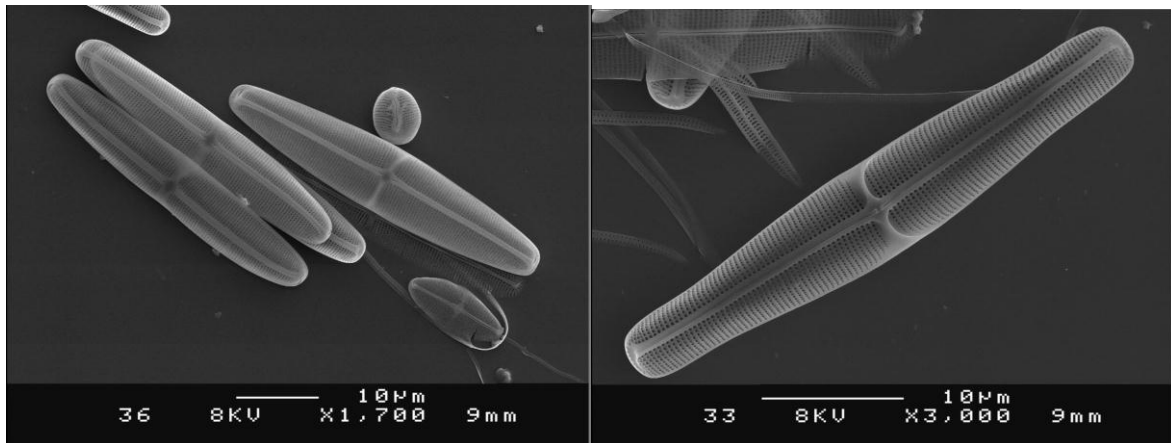


Figure 18 : *Crapedostauraos britanicus cox.* (Cox, 1999).

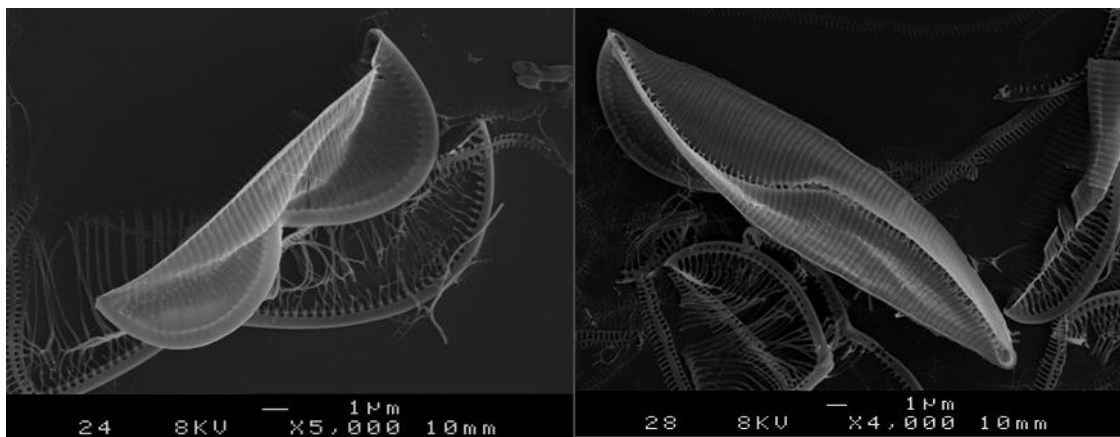


Figure 19 : *Entomoneis paludosa* (Witkowski, 2000).

II-2-b. Les diatomées épipsammiques des sédiments vaso-sableux

Dans le cas de sédiments plus sableux, le microphytobenthos est composé d'un mélange de formes épipéliques et de formes épipsammiques, bien que certaines zones soient majoritairement peuplées de formes épipsammiques (Underwood, 2001, Méléder *et al.*, 2005, Kooistra *et al.*, 2007, Steele *et al.*, 2010). Dans ce type de sédiment, la lumière pénètre plus en profondeur (jusqu'à 3000 µm) (Cartaxana *et al.*, 2011) (Figure 16), le microphytobenthos n'est donc pas obligé de migrer en surface pour capter la lumière (Round, 1979, Saburova *et al.*, 1995). Dans la zone photique sablo-vaseuse (0-2 mm) (Figure 16), les biomasses microalgales sont très variables, 12.2-186.9 mg Chl a m⁻² (Méléder *et al.*, 2005) ; elles ne sont cependant pas comparables aux données de Herlory *et al.* (2004) qui ne prennent en compte

que la surface du sédiment cohésif, alors qu'ici la biomasse photosynthétique est répartie sur des profondeurs plus importantes.

Les espèces épipsammiques sont attachées aux grains de sédiment et sont moins sujettes au réenfouissement, mais plus sujettes au broutage que les espèces épipéliques (qui peuvent migrer pour limiter la pression de broutage). Il existe de nombreux modes de fixation au substrat mais ils peuvent être divisés en deux grandes catégories. Les cellules adnates sont attachées aux grains de sédiment grâce à un mucilage fait d'EPS. Certaines espèces adnates sont capables de mobilité dans la gangue de mucilage entourant le grain de sédiment ce qui leur permet de partiellement moduler leur environnement lumineux en fonction des aspérités du grain de sédiment. L'autre catégorie présente des cellules qui sont pédonculées ('stalked'), à savoir attachées au substrat par des 'pieds' ou des 'tiges' également faites d'EPS. Les espèces adnates sont rarement coloniales alors que les espèces pédonculées peuvent l'être plus souvent.

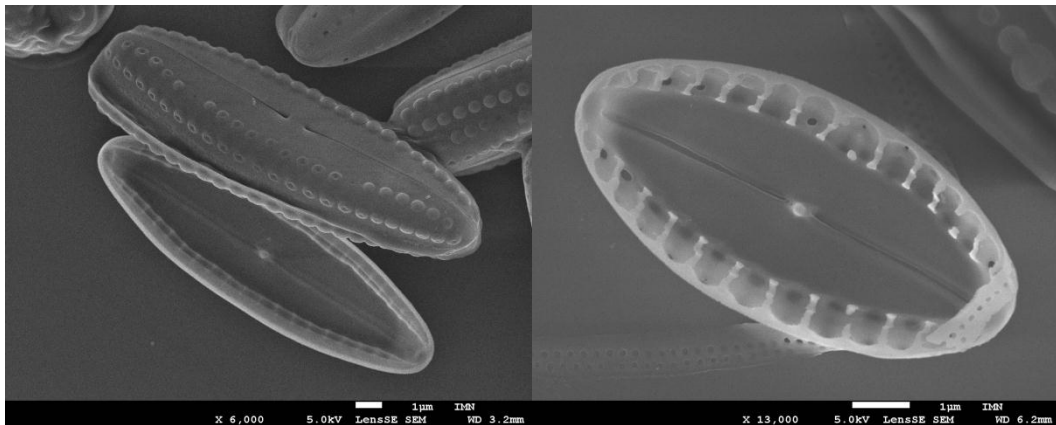


Figure 20 : *Biremis lucens* (Sabbe et al., 1995). Exemple de diatomées épipsammiques étudiées au cours de ce travail de thèse (cf Partie 2 et 5A)

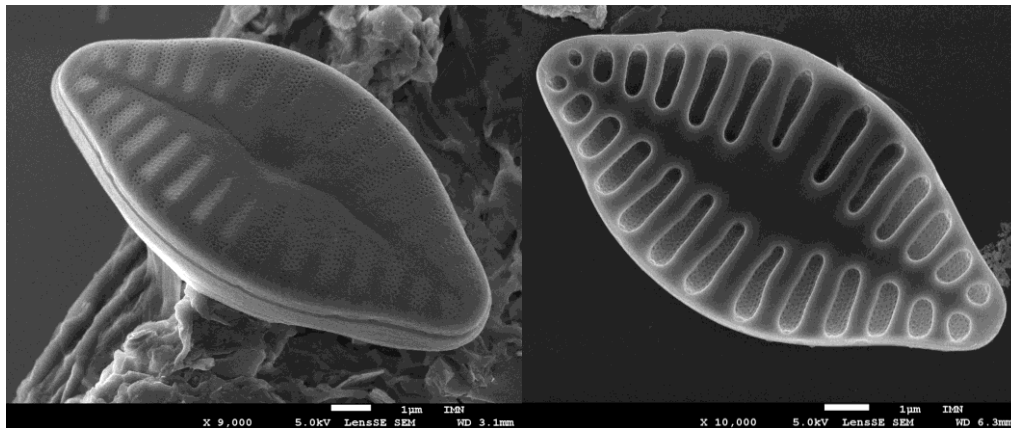


Figure 21 : *Planothidium delicatulum* (Witkowski, 2000). Exemple de diatomées épipsammiques étudiées au cours de ce travail de thèse (cf Partie 2 et 5A)

II-3. Les caractéristiques remarquables des diatomées

De manière générale, le contenu du protoplasme (cellule végétale sans paroi) des diatomées ne se distingue pas de celui des autres algues eucaryotes, elles possèdent les mêmes organelles, à savoir : noyau, dictyosome, mitochondries, (chloro-)plaste(s). Cependant, deux caractéristiques particulières les démarquent : leur paroi cellulaire et leurs plastes (Figure 22).

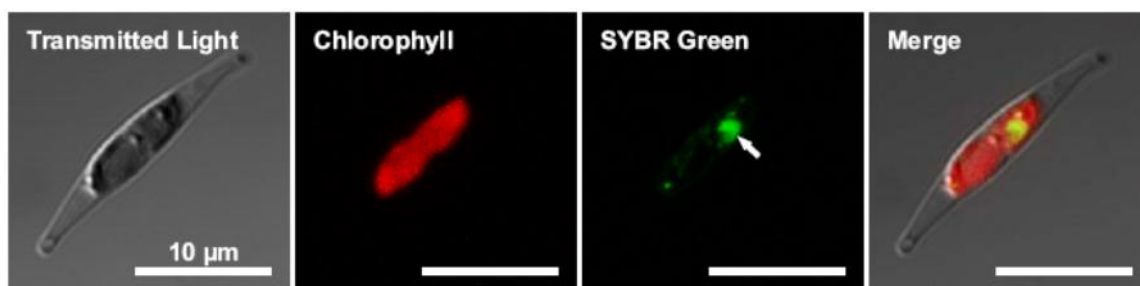


Figure 22 : Structure de *P. tricornutum*. De droite à gauche : image d'une cellule obtenue par microscopie à transmission, autofluorescence rouge de la chlorophylle du chloroplaste, noyau (indiqué par la flèche) dont l'ADN a été marqué au SybrGreen, et mélange des trois précédentes observations (Lavaud, 2007)

II-3-a. Le frustule : la paroi cellulaire des diatomées

La paroi cellulaire des diatomées est particulièrement différenciée du reste de la cellule et (presque) toujours fortement imprégnée de silice. La paroi cellulaire est divisée en plusieurs parties, consistant toujours en deux grosses unités complexement sculptées appelées les ‘valves’. Des parties plus minces lient les deux valves, ce sont les ceintures connectives (‘girdle band’). Les valves s’emboîtent sur toute leur longueur et les ceintures connectives viennent entourer la connexion des valves. Les composants de la paroi cellulaire s’adaptent parfaitement et l’ensemble forme le frustule. Les flux de matière entre l’intérieur et l’extérieur de la cellule doivent donc emprunter des pores ou des fentes présentes à la surface du frustule. En plus de la silice, la paroi cellulaire contient aussi des matières organiques qui forment un manteau très fin autour des valves et des ceintures connectives. Même si des observations n’ont pas été faites pour toutes les espèces étudiées, il est probable que toutes les diatomées sécrètent des EPS (cf chapitre II-3-c), certains diffusant dans le milieu qui les entoure, d’autres restant sous forme de capsule gélatineuse autour de la cellule ou sous forme de fils, pieds ou encore tiges comme décrit plus haut.

Chaque frustule possède une valve formée juste après la division cellulaire alors que l’autre valve est présente pendant plusieurs cycles cellulaires depuis sa formation. Ceci implique donc que chaque partie (valve et ceinture) nouvellement formée soit nécessairement plus petite que les parties déjà présentes. Cette particularité est une des plus connues de la biologie des diatomées. La taille maximale et originelle de la population est récupérée par reproduction sexuée. En dehors de la période de reproduction sexuelle, le protoplasme est totalement confiné dans le frustule. La valve la plus petite, donc plus jeune, est appelée l’hypovalve, alors que la valve la plus grande et donc la plus ancienne est l’épivalve. La ceinture connective est, elle, parallèle à l’hypovalve. L’hypovalve est toujours emboîtée dans l’épivalve comme le seraient les deux parties d’une boîte de Pétri (Figure 23). Les valves et, dans une moindre mesure, les ceintures connectives sont des structures assez rigides qui entourent la cellule vivante qui par conséquent ne peut croître que dans le sens de l’emboîtement des valves.

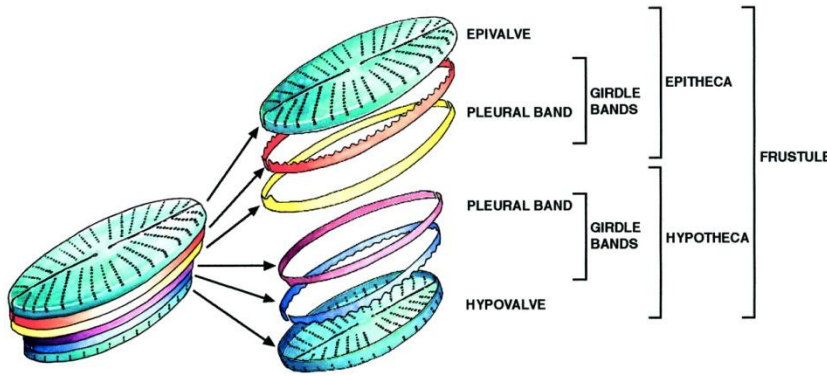


Figure 23 : Vue schématique des composés siliceux de la paroi d'une diatomée (Zurzolo et Bowler, 2001)

La structure des valves a été fortement étudiée. Elle présente une ornementation (voir les clichés du chapitre II-2) particulière à chaque espèce qui sert à leur identification et classification. L'ornementation des valves est essentiellement due à des arrêtes de silices qui poussent à partir d'un schéma circulaire (symétrie centrale) ou allongé (symétrie radiale) à partir du centre lors de la formation de la valve. Ces arrêtes sont réticulées par d'autres arrêtes latérales pour former un système primaire, ou réseau, de silice. Certaines valves plus élaborées présentent une structure plus complexe issue de la superposition d'autres couches de silice qui viennent former un autre système parallèle ou perpendiculaire au système primaire.

Aucune diatomée n'est isodiamétrique (les deux valves n'ont jamais la même taille). Elles peuvent se présenter principalement sous deux orientations : 1) la vue valvaire, quand la valve est vue de face et donc le plan valvaire est perpendiculaire à l'observateur et 2) la vue sous l'angle de la ceinture connective ou les valves sont alors vue de profil (Figure 24).

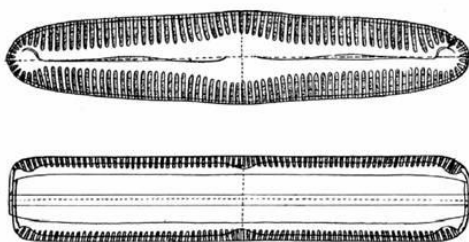


Figure 24 : Les deux vues possibles d'observation d'une diatomée. Au-dessus la vue valvaire, en dessous la vue de profil

II-3-b. Les plastes, lieu de la photosynthèse

Hormis la paroi cellulaire, l'organelle qui distingue les diatomées des autres groupes de microalgues sont les plastes ou chloroplastes. Une définition simpliste, mais réaliste, des plastes a été donnée en 1905 par Mereschkowsky (Martin et Kowallik, 1999) qui les compare à des 'petits esclaves verts' travaillant pour leur hôte pour produire de la nourriture à partir des rayons lumineux solaires. C'est en effet dans les chloroplastes qu'a lieu la photosynthèse (cf chapitre III-1).

La forme des plastes et leur nombre varient énormément chez les diatomées, mais restent constant au niveau d'un groupe. Chez les diatomées pennées, il y a généralement un faible nombre de plastes par cellule et même parfois qu'un seul. Cependant, chez certaines diatomées araphides (sans raphé), de nombreux petits plastes sont rencontrés comme chez les diatomées centriques (McFadden, 2001).

A l'origine, les plastides sont issus d'une endosymbiose (assimilation) par une cellule eucaryote de cyanobactéries ancestrales, dont le génome a été réduit, mais reste présent dans le plastide. Plusieurs niveaux d'endosymbiose sont décrits chez les végétaux et en particulier les microalgues. Ainsi, les plastides des algues rouges, vertes et des glaucophytes ne sont composés que de deux membranes. On parle alors d'endosymbiose primaire, ces plastides sont directement dérivés de l'assimilation d'une cyanobactérie ancestrale. En ce qui concerne les plastides des autres groupes, dont les diatomées, on peut observer 3 à 4 membranes, impliquant une origine plus complexe. L'endosymbiose secondaire rationalise ces membranes en émettant l'hypothèse de l'endosymbiose d'une algue primaire par un eucaryote hétérotrophe, une microalgue rouge en ce qui concerne les diatomées (McFadden, 2001). Au cours de l'évolution, la plupart voire toutes les organelles de la cellule phagocytée auraient disparu excepté le plastide, et un transfert massif de gènes du noyau de l'endosymbionte au noyau hôte aurait eu lieu. (Figure 25).

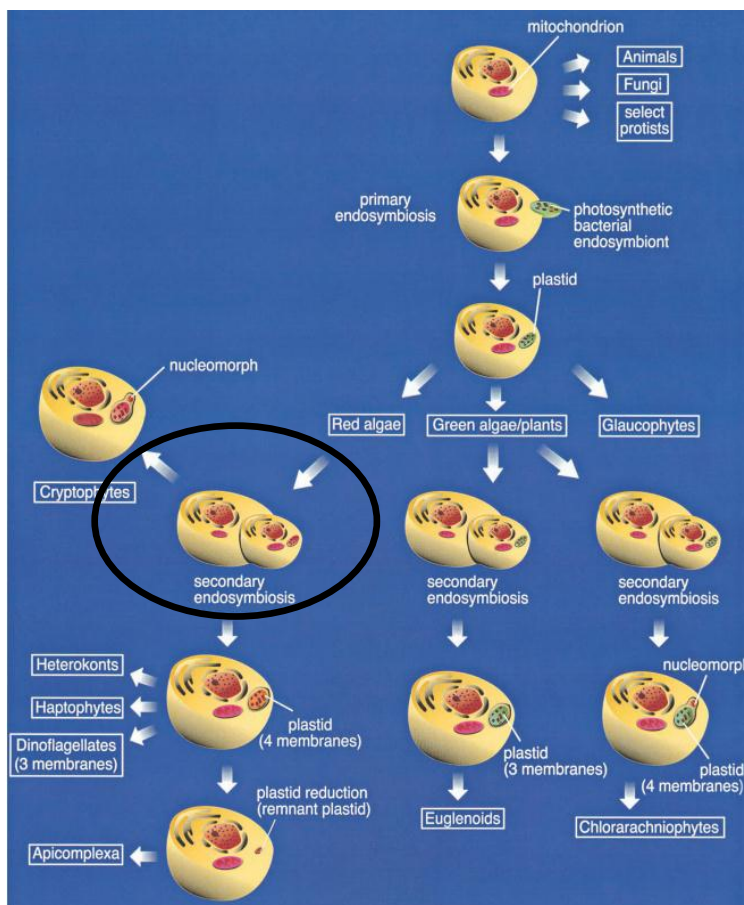


Figure 25 : Les différents cas d'endosymbioses primaires et secondaires qui déterminent les différentes lignées photosynthétiques et d'algues eucaryotes.

L'observation d'une section de plastide de diatomée (Figure 26) permet de voir qu'ils sont entourés de quatre membranes. Les deux extérieures correspondant au réticulum

endoplasmique du plaste, et les deux autres aux membranes de l'organelle en elle-même. A l'intérieur du plaste se trouve une série de membranes dites 'photosynthétiques' : les thylacoïdes (cf chapitre III-1). Chez les diatomées les membranes sont organisées par groupes de trois et elles sont entourées d'un groupe qui fait le tour intérieur du plaste : la 'girdle band'. L'ADN du plaste est localisé dans un anneau juste à côté de la 'ceinture de lamelles'. Les plastes contiennent toujours au moins un pyrenoïde (organelle impliqué dans la fixation du carbone, cf chapitre III-1). Les chloroplastes sont généralement brun-jaune car ils sont riches en pigments de la famille des caroténoïdes (béta-carotènes, diadinoxanthine, diatoxanthine et fucoxanthine) qui masquent la couleur des chlorophylles (verte).

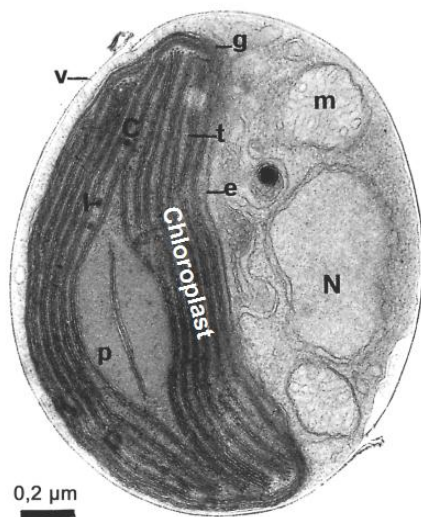


Figure 26 : Coupe transversale d'une cellule de *Phaeodactylum tricornutum* (diatomées pennée planctonique) possédant un seul chloroplaste (c) contenant les faisceaux de trois thylacoïdes (t) entourés de la 'girdle band' (g). (e) enveloppe du thylakoïde, (l) gouttelette lipidique, (m) mitochondrie, (n) noyau, (p) pyrenoïde. Photo : C. Litchlé (Lavaud, 2002).

II-3-c. Les substances exopolymériques ou EPS

La sécrétion d'EPS permet de créer un environnement protecteur pour les diatomées afin de résister aux changements rapides des conditions environnementales en particulier à la surface de la vase (Decho, 1990). Plus précisément, ils interviennent 1) dans la locomotion du MPB (Smith et Underwood, 1998, Underwood et Smith, 1998, De Brouwer et Stal, 2001, Bellinger *et al.*, 2005, Apoya-Horton *et al.*, 2006, Lundkvist *et al.*, 2007) (cf chapitre III-2-b), (2) dans le processus photosynthétique (i.e ; produit de la fixation du carbone, cf chapitre III-1) (Staats *et al.*, 1999, Staats *et al.*, 2000, De Brouwer et Stal, 2001), (3) dans la physiologie des diatomées (Smith et Underwood, 1998, Underwood et Smith, 1998, Staats *et al.*, 1999, Underwood *et al.*, 2004). Lorsque les diatomées sont en phase stationnaire de leur

développement, la production d'EPS augmente car les microalgues sont confrontées à un épuisement des nutriments (majoritairement le phosphate et l'azote). Dans le même temps elles continuent de stocker de l'énergie sous forme de polysaccharides issus de la photosynthèse. Ce trop-plein d'énergie est alors transformé en EPS (Smith et Underwood, 1998, Underwood et Smith, 1998, Smith et Underwood, 2000, Underwood *et al.*, 2004). Cette augmentation de production d'EPS est également associée à un changement dans leur composition (la proportion d'EPS de haut poids moléculaire devient majoritaire lors de la phase stationnaire alors qu'elle ne représente qu'environ 20% dans la phase exponentielle de croissance). Ces sécrétions d'EPS ont un rôle dans le réseau trophique car ils constituent une source de carbone pour les bactéries, la méiofaune ainsi que pour la macrofaune (van Duyl *et al.*, 1999, Goto *et al.*, 2001).

Les EPS sont de différents types, leur composition peut être très variable (de Brouwer *et al.*, 2000, De Brouwer *et al.*, 2002, De Brouwer et Stal, 2002) ainsi que le mode opératoire de leur excrétion. La différence de composition des EPS sous-entend que leur production résulte de processus métaboliques différents. Ces EPS sont des composés riches en carbohydrates (De Brouwer *et al.*, 2002, Underwood *et al.*, 2004) et leur composition varie en fonction de l'état physiologique des cellules (Pierre *et al.*, 2010, Pierre *et al.*, 2012). On rencontre dans la matrice d'EPS des composés très variés tels que des protéines, des polysaccharides ainsi que des acides nucléiques (Pierre *et al.*, 2012). Dans ces EPS, on trouve plusieurs fractions : 1) les EPS colloïdaux correspondant à des polymères excrétés dans le milieu ; 2) des EPS liés qui sont les composés entourant les cellules et servant à leur protection/adhésion ; 3) les EPS internes et de réserve qui correspondent aux EPS relargués lors de la lyse des cellules (Pierre *et al.*, 2012).

Takahashi *et al.* (2010) ont effectué des travaux qui ont permis de mettre au point une méthode fiable d'extraction des EPS. Jusqu'à lors, différents protocoles été utilisés, ne permettant pas une nette séparation des différentes fractions. Tout comme la plupart des méthodes, leur protocole utilise une centrifugation pour extraire la fraction colloïdale, puis différentes méthodes peuvent être utilisées pour extraire les EPS Liés. Leur méthode passe par l'utilisation d'un échangeur de cations (la DOWEX) dans du tampon phosphate afin de récupérer les EPS liés.

II-4. Le cycle de division cellulaire des diatomées pennées, groupe majoritaire du MPB

Les chapitres qui suivent reposent sur 3 revues récentes (Chepurnov *et al.*, 2004, De Martino *et al.*, 2009, Bowler *et al.*, 2010). Ils retracent la plupart des avancées dans le domaine depuis le livre référence de Round (1990). Les diatomées étudiées au cours de cette thèse sont toutes de diatomées pennées, les spécificités des diatomées centriques n'ont pas été énoncées.

Le cycle cellulaire des diatomées a montré des mécanismes différents de ceux rencontrés de façon conventionnelle chez les eucaryotes. Même s'ils sont peu connus, certains mécanismes et facteurs sont responsables du déclenchement de certaines phases du cycle cellulaire chez les diatomées (Figure 27). Des travaux ont montré que la lumière a un rôle majeur dans les changements de phases du cycle cellulaire (Brzezinski *et al.*, 1990, Claquin *et al.*, 2004, Leynaert *et al.*, 2011, Nymark *et al.*, 2013) et l'effet de certaines longueurs d'onde (Depauw *et al.*, 2012), notamment la lumière bleue qui induit une phase particulière du cycle cellulaire (Huysman *et al.*, 2013).

Les diatomées se divisent majoritairement de façon végétative par mitose. Pendant la mitose, une nouvelle valve est synthétisée à l'intérieur de la valve préexistante, ce qui a pour conséquence d'avoir des cellules filles de taille décroissante (Figure 27, schéma grisé au centre). Les cellules filles héritent d'une valve maternelle, l'épivalve qui est la plus grande, alors que l'hypovalve qui est plus petite est synthétisée *de novo* (g-h, Figure 27). Une fois qu'un seuil de taille critique est atteint, environ 30% de diminution de la taille (h, Figure 27), un cycle de reproduction sexuée est nécessaire pour retrouver une taille maximale. Le cycle de vie des diatomées comprend donc deux phases : 1) une phase végétative relativement longue (de plusieurs semaines à plusieurs années), pendant laquelle les cellules se divisent par mitose et, 2) une phase plus courte qui inclue une reproduction sexuée (gamétogénèse et fertilisation, qui prend quelques heures) et ensuite le processus de développement complexe (plusieurs heures à plusieurs semaines) qui mène à la formation d'une nouvelle cellule végétative. Il y a ainsi une alternance entre une phase diploïde (la cellule végétative) et une phase haploïde (les gamètes). Seule la reproduction végétative qui intéresse la Partie 4 de ce manuscrit est décrite plus en détail ici.

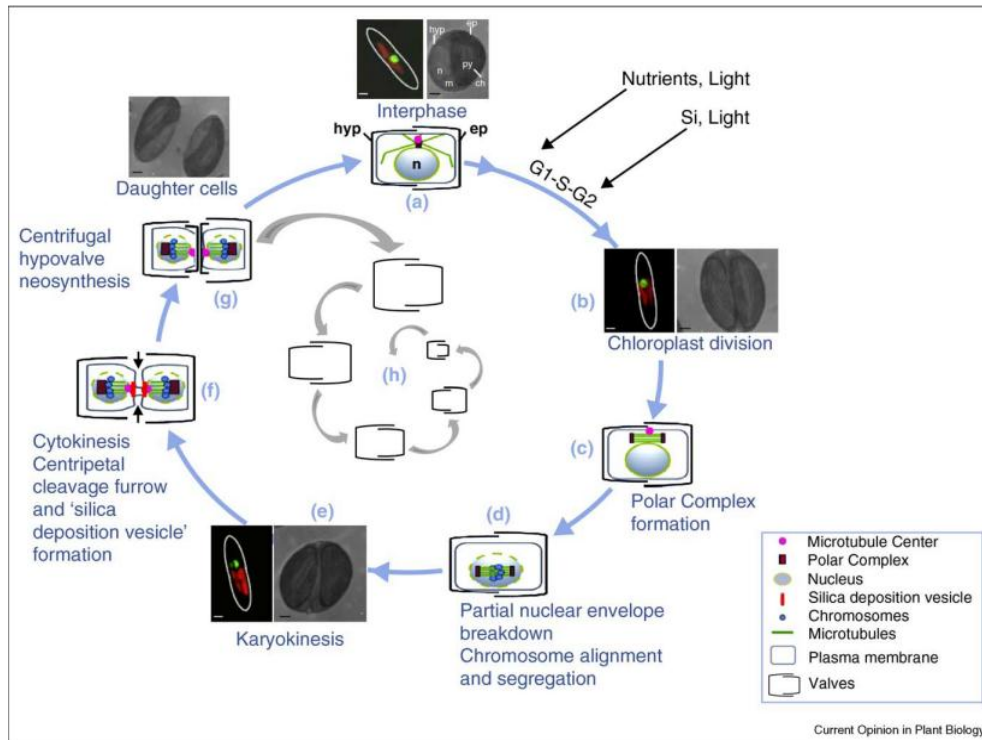


Figure 27 : Vue d'ensemble de la reproduction végétative chez les diatomées benthiques

En condition d'interphase (a, Figure 27), les cellules pratiquent la photosynthèse. En phase G1, la cellule duplique son contenu cellulaire, à l'exception des chromosomes. En phase S, c'est au tour des chromosomes d'être dupliqués. En phase G2, les chromosomes sont contrôlés et acceptés. La ségrégation des chloroplastes (b, Figure 27) se fait avant la séparation des chromosomes (f, Figure 27). Les chloroplastes séparés se placent chacun d'un côté du futur plan de division. La mitose est 'ouverte' avec une rupture partielle de la membrane nucléique impliquant un centre organisationnel des microtubules (MTOC) unique. Le MTOC a d'abord été défini pour désigner les structures à partir desquelles les microtubules (MT) émanent. Il joue un rôle crucial dans la division des cellules eucaryotes. Le MTOC peut se distinguer par deux formes, le centre microtubule (MC) et le complexe polaire (PC). Le MC des diatomées a une ultrastructure différente. Il diverge de celui des animaux par l'absence de centrioles, de celui des levures par une forme sphérique, et aussi de celui des macroalgues brunes, bien que phylogénétiquement proches, qui lui est semblable à celui des animaux. Le MC est toujours fortement associé au noyau cellulaire et à l'appareil de Golgi pendant l'interphase. En plus de l'absence de centrioles, le MC présente un comportement inhabituel pendant le cycle cellulaire. Il ne se duplique pas avant la mitose ; au lieu de ça, une seconde structure, le PC apparait chez les cellules prémitotiques, ce qui entraîne la désintégration du MC. Pendant la prophase, le PC se divise en deux structures

parallèles qui constituent les pôles des fuseaux mitotiques. Une autre particularité des diatomées est que la mitose est initiée à l'extérieur du noyau, quand le PC est produit. L'enveloppe nucléaire reste intacte jusqu'à l'élongation des fuseaux qui entrent dans le noyau pendant la prométaphase (c-d, Figure 27). Pendant la métaphase les chromosomes attachés aux fuseaux en un anneau unique, s'arrangent autour de l'équateur des fuseaux (d, Figure 27). A ce stade-là, une matrice dense est visible au niveau des fuseaux. Le 'collar material' lie les chromosomes au site d'attachement des MT. La cytokinèse (séparation des deux cellules filles) débute par la formation d'un sillon de clivage, comme chez les cellules animales, à savoir un processus d'invagination centripète de la membrane plasmique qui emploie le MC. Une (supposée) bande actinique encercle les cellules et le sillon de clivage. Une autre bande actinique est impliquée dans la morphogénèse de la nouvelle valve siliceuse entourant les bords d'une vésicule spécialisée, la 'Silica Deposit Vesicle' (SDV, comme chez les plantes). La SDV est généralement positionnée au milieu du sillon et pousse vers l'extérieur. Elle est souvent adjacente au MC nouvellement formé et à l'appareil de Golgi. La nouvelle hypovalve est générée par la SDV (f, Figure 27), qui s'étend de manière centrifuge avant l'exocytose (g, Figure 27) créant ainsi deux nouvelles cellules filles.

III. La régulation de la productivité photosynthétique du microphytobenthos

III-1. La photosynthèse

La photosynthèse est le mécanisme par lequel les organismes autotrophes transforment l'énergie lumineuse en énergie organique (Figure 28).

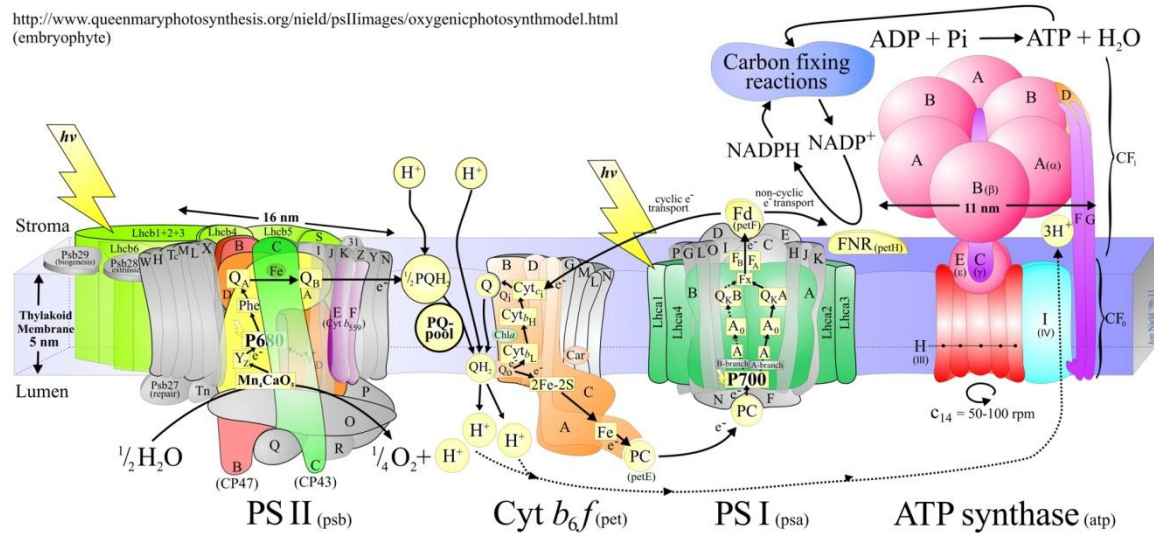


Figure 28 : Schéma d'une membrane thylacoïdale montrant les complexes photosynthétiques principaux et leur fonctionnement.

Son fonctionnement est relativement bien connu, se déroulant en deux grandes étapes. La première a lieu au niveau des thylacoïdes des chloroplastes où se font les réactions photochimiques et le transfert d'électrons de l'eau située dans le lumen (espace intérieur des thylacoïdes) vers le photosystème I (PSI) via une série de transporteurs d'électrons. Ce mécanisme est enclenché au niveau des antennes collectrices d'énergie lumineuse (LHC : Light Harvesting Complex) qui captent les photons servant à oxyder les molécules d'eau (photolyse) qui libèrent alors des électrons, de l'oxygène (O_2) et des protons (H^+). Les électrons sont transférés le long d'une chaîne linéaire de transporteurs impliquant une

translocation couplée d'ions H^+ au travers de la membrane thylacoïdale (i.e. du stroma à l'extérieur vers le lumen). Le transport d'électrons aboutit à la formation de NADPH (molécule à fort pouvoir réducteur) en aval du PSI et d'ATP (molécule très énergétique) via l'ATP synthase qui utilise les H^+ accumulés dans le lumen. Cette partie qui constitue à proprement parler la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique est appelée 'la photochimie'.

La deuxième étape se déroule dans le stroma des chloroplastes et permet la réduction de CO_2 (ou des bicarbonates de l'eau, HCO_3^-) sous forme de glucides au travers du cycle de Calvin-Benson qui utilise une partie de molécules d'ATP et de NADPH précédemment produites. Cette étape a lieu aussi bien à la lumière qu'à l'obscurité. Ces molécules sont également impliquées dans les autres voies métaboliques et en particulier celle de l'azote, de la silice et des phosphates. Ces processus physicochimiques fins permettent en fin de chaîne à l'organisme de générer de la matière organique, et donc de générer de la biomasse pour la croissance et pour la reproduction.

Les mécanismes d'assimilation et de concentration du carbone inorganique chez les diatomées ont connu des avancées récentes (Roberts *et al.*, 2007) (Figure 29). Une fois le carbone accumulé dans la cellule (dans le plaste ou dans le cytoplasme sous forme de CO_2 ou HCO_3^-), il est acheminé au pyrénoïde ou son assimilation est effectuée via l'enzyme Rubisco.

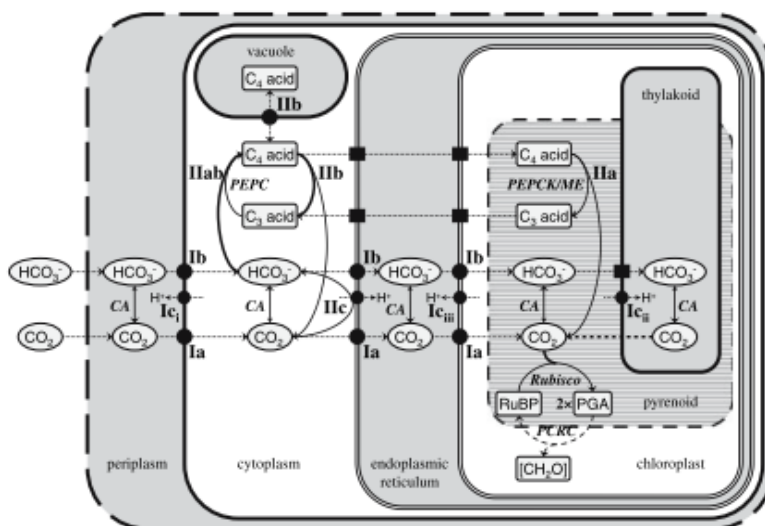


Figure 29 : Représentation schématique des mécanismes probables d'accumulation de carbone dans une cellule de diatomée (Roberts *et al.*, 2007).

Cette assimilation se fait par le cycle de Calvin (Figure 30). Une molécule de CO_2 se combine à un sucre à 5 carbones (ribulose 1,5 diphosphate, RuBP) pour former deux molécules d'un produit à 3 carbones (3-phosphoglycérate, PGA). Ce PGA est ensuite réduit en une molécule à 3 carbones glyceraldéhyde 3-phosphate (PGAL).

Un carbone entre dans le cycle de Calvin à chaque tour de cycle. Trois tours de cycle produisent une molécule de glyceraldéhyde 3-phosphate, convertie en saccharose ou en amidon (Figure 30).

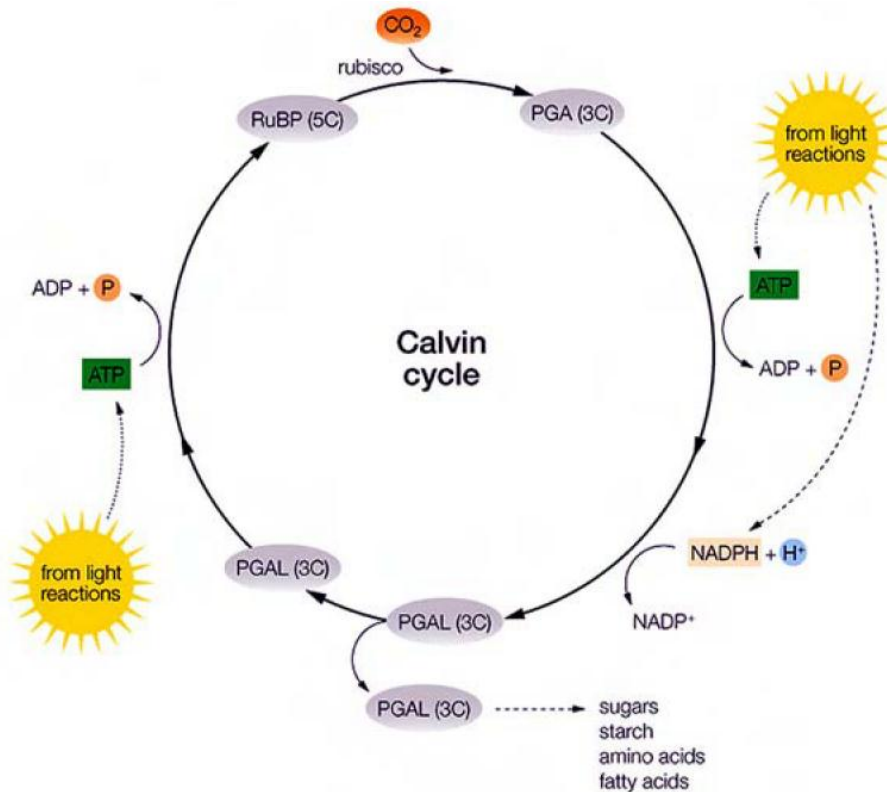


Figure 30 : Réactions de transformation du carbone inorganique en carbone organique par le cycle de Calvin à partir de l'énergie produite lors des réactions dites lumineuses (NADPH t ATP)

Lors de la séparation de charges (au niveau du PSII) et du transport d'électrons aboutissant à la formation d'ATP et de NADPH, quatre grands complexes formés de protéines et/ou de pigments sont impliqués : le PSII, le Cytochrome b_6/f , le PSI et l'ATP synthase. Leur fonctionnement respectif, et en particulier celui du PSII, est rapidement détaillé ci-après.

III-1-a. Le Photosystème II

C'est au niveau du PSII que s'initie la photosynthèse. Il est constitué de deux parties principales : l'antenne collectrice d'énergie lumineuse et le centre réactionnel. L'antenne collectrice d'énergie est composée de pigments (chlorophylles et caroténoïdes) fixés à des protéines spéciales. Ces complexes pigments-protéines sont capables de capter les photons. L'énergie magnétique des photons est convertie en énergie d'excitation au niveau des pigments (déplacement d'un électron du niveau singulet fondamental au premier niveau singulet excité). Cette énergie d'excitation est transmise de pigment en pigment jusqu'au centre réactionnel qui est principalement formé d'un complexe de chlorophylle *a* et protéines (D1 et D2). Lorsque l'énergie d'excitation atteint le centre réactionnel, elle est piégée par la chlorophylle *a* centre du PSII (P680), qui rentre alors dans un état excité. La chlorophylle *a* excitée génère alors une séparation des charges en cédant un électron (elle devient alors P680⁺) à une molécule accepteur, la phéophytine. Cet électron est ensuite cédé en chaîne à des accepteurs, en premier Q_A (lié au centre) et Q_B (mobile, fixé à la protéine D1) qui sont des quinones. Les électrons portés par Q_B sont ensuite pris en charge par la chaîne de transporteurs membranaires (via tout d'abord la plastoquinone, PQ) alors que P680⁺ revient rapidement à son état stable par réduction via l'oxydation de l'eau par le complexe d'oxydation de l'eau ($2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$).

Avant de transmettre des électrons, Q_B est réduite deux fois (ce qui nécessite donc deux séparations de charge), et protonée deux fois, par des H⁺ provenant du stroma. Elle devient alors Q_BH₂ (plastoquinol) qui est mobile. Elle intègre alors le pool de PQ membranaire sous forme de PQH₂, pendant qu'une molécule de PQ oxydée la remplace au niveau de la protéine D1. Les électrons sont transférés au cytochrome *b₆f* et PQH₂ libère ses H⁺ dans le lumen (translocation de protons de l'extérieur, stroma vers l'intérieur, lumen). Avec l'oxydation de l'eau, cette translocation de H⁺ au travers de la membrane thylacoïdale a pour effet d'acidifier le lumen, ce qui génère une différence de pH (ΔpH) entre le stroma et le lumen.

III-1-b. Le cytochrome b_6f , le photosystème I et l'ATP synthase

PQH₂ est oxydée au niveau de Q_o en libérant ainsi deux protons dans le lumen et deux électrons, qui réduisent tour à tour le centre Fer-Soufre (FeS) puis sont transférés au cytochrome b_6f .

Après quatre fonctionnements successifs du centre réactionnel du PSII, libérant 4 électrons injectés dans le pool de PQ, deux quinones réduites sont réoxydées successivement par le cytochrome b_6f , avec recyclage d'un électron à chaque fois. Quatre électrons sont finalement transférés vers le PSI et six protons sont libérés dans le lumen (Farineau et Morot-Gaudry, 2006). Les électrons sont transportés par une molécule de plastocyanine (PC) mobile dans le lumen jusqu'au centre réactionnel chlorophyllien du PSI, le P700. En recevant un électron de la PC, P700 devient excité (P700^{*}), puis cède son électron à différents accepteurs jusqu'à une ferrédoxine soluble située du côté stromatique de la membrane thylacoïdale. L'accepteur terminal d'électrons est le NADP⁺ qui est réduit en NADPH par la ferrédoxine grâce à une enzyme, la ferrédoxine-NADP⁺ oxydoréductase (FNR).

Le gradient de H⁺ formé entre le lumen et le stroma des thylacoïdes alimente l'ATP synthase. Le flux de H⁺ au travers du canal protéique situé dans la membrane thylacoïdale génère une rotation du complexe CF₀-CF₁ dont l'énergie sert à produire de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (Pi).

III-1-c. Les particularités principales de l'appareil photosynthétique des diatomées

Le fonctionnement général de l'appareil photosynthétique des diatomées est très semblable aux autres algues eucaryotes et aux plantes. Il existe cependant quelques particularités parmi lesquelles : l'organisation du plaste et des membranes thylacoïdales (cf chapitre II-3-b) et l'organisation des antennes collectrices d'énergie lumineuse. Les antennes collectrices de lumière des diatomées sont des complexes pigments-protéines nommés FCPs pour Fucoxanthin-Chlorophyll Protein. Une synthèse récente des dernières avancées dans ce

domaine a été effectuée par Lepetit (2012), c'est pourquoi sont seulement développés ici les points les plus importants.

Les FCPs possèdent une quantité de caroténoïdes très élevée, en particulier grâce à la fucoxanthine et la diadinoxanthine-diatoxanthine (DD-DT) (cf chapitre III-2-a). Chaque monomère de FCP possède huit molécules de chlorophylle *a*, huit molécules de fucoxanthine et deux molécules de chlorophylle *c* et une ou zéro molécule de DD-DT. Différentes protéines composent les FCPs : 1) les protéines classiques ou Lhcf, 2) les Lhcr qui sont propres aux FCPs du PS I, et 3) les Lhcx qui sont présentes en moins grande concentration que les deux autres, et dont les caractéristiques et rôles restent pour l'instant peu connus (cf chapitre III-2-a). L'organisation de ces complexes peut varier en fonction des espèces de diatomées et en particulier en fonction des formes pennées et centriques.

III-2. La réponse du microphytobenthos aux variations de la lumière

Le travail central de cette thèse a été de mieux comprendre la réponse du microphytobenthos aux variations de l'environnement lumineux des vasières intertidales. Les effets de deux autres facteurs environnementaux importants qui sont liés à la lumière, la température et la salinité, ont été étudiés ; ils sont décrits dans les introductions et discussions respectives des Parties 5A (effet d'un couplage salinité-lumière) et 5B (effet d'un couplage température-lumière).

L'étude de la réponse du microphytobenthos à la lumière représente un challenge technique ne serait-ce que par la difficulté à mesurer leur capacité photosynthétique dans leur habitat naturel (Perkins *et al.*, 2010b). Leur biotope particulier, le sédiment, fait qu'elles subissent un climat lumineux très différent de celui des diatomées planctoniques. Les fluctuations de lumière à la surface du sédiment sont similaires à celles rencontrées en milieu terrestre (forte amplitude, fréquence rapide, stochasticité, Figure 31), avec en superposition, la succession des périodes d'émersion/immersion rajoutant une contrainte régulière de lumière/obscurité à

la photopériode. De plus, d'autres facteurs environnementaux, en particulier la température et la salinité, peuvent avoir des variations rapides et extrêmes et générer des conditions stressantes supplémentaires pour la photosynthèse des diatomées (cf Parties 5A, 5B et 5C).

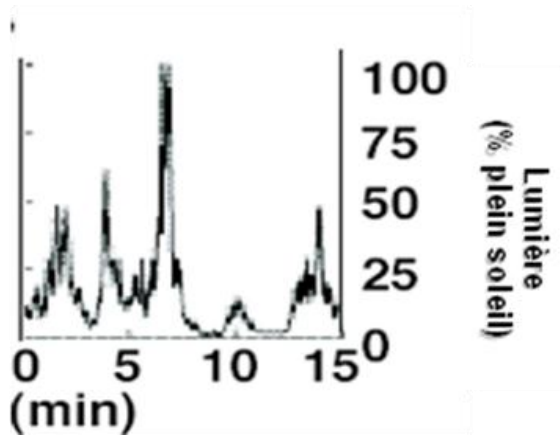


Figure 31 : Variation de la lumière à la surface du sédiment.

Bien qu'indispensable pour la vie des organismes photosynthétiques, la lumière peut avoir des effets néfastes, notamment au niveau du PSII. Comme vu précédemment, lors de la séparation de charge, la chlorophylle centre passe à un état excité, la majorité de cette énergie est utilisée pour la photochimie (Figure 32).

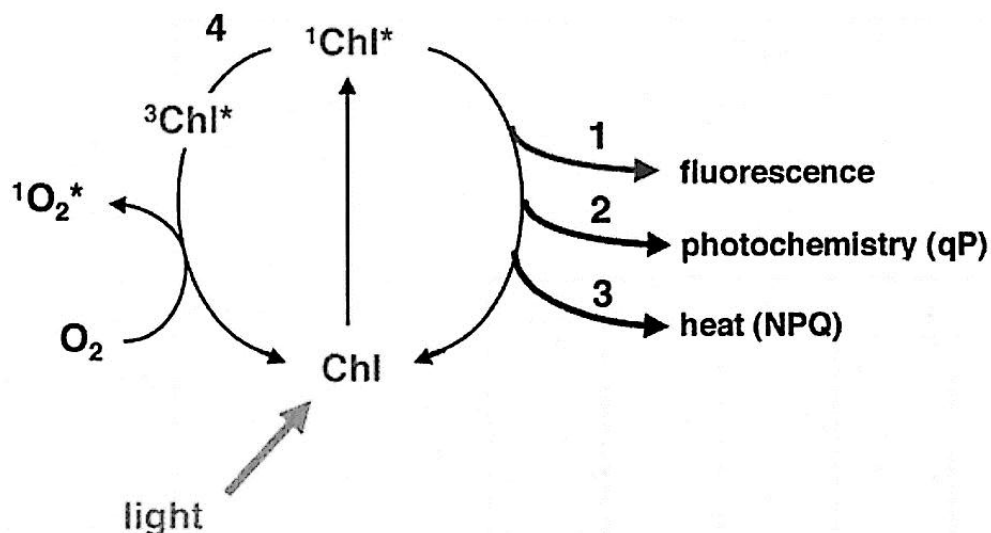


Figure 32 : Les quatre voies de désactivation de la chlorophylle excitée (Chl*) montrant la formation des chlorophylles triplets et des radicaux libres 'ROS'.

Une infime partie de cette énergie est réémise sous forme de fluorescence et/ou dissipée sous forme de chaleur. Dans les conditions d'un excès de lumière (lorsque l'intensité lumineuse est

supérieure aux capacités photosynthétiques), le système est surexcité et il aboutit à la formation de triplets de chlorophylle. Ces chlorophylles triplets sont incapables d'initier une séparation de charge, et l'énergie qu'elles portent doit être dissipée par une voie alternative pour que les molécules de chlorophylle puissent revenir à leur état initial et procéder à une nouvelle séparation de charge. La voie alternative physique naturelle est de réagir avec l' O_2 photosynthétique et de former des singulets d' O_2 (O_2^{\cdot}) qui sont des molécules hautement toxiques qui font partie des ROS ('reactive oxygen species') (Figure 32). Les ROS, ou radicaux libres, réagissent avec toutes les molécules de leur environnement (pigments, protéines, lipides) avec un effet destructeur sur l'appareil photosynthétique, surtout la protéine D1 du PSII. La destruction de la protéine D1 entraîne une inactivation puis une destruction des PSII ce qui, si la protéine n'est pas échangée rapidement (Wu *et al.*, 2012), génère une diminution de la capacité photosynthétique encore appelée photoinhibition (Müller *et al.*, 2001, Serôdio *et al.*, 2012).

Pour se protéger des dommages liés à la photooxydation, les diatomées, comme tous les autres organismes photosynthétiques, possèdent des mécanismes physiologiques de régulation rapide de la photochimie ou photoprotection. La nature de ces mécanismes est variée (Figure 33) mais de manière générale, ils permettent d'équilibrer la distribution de l'énergie d'excitation au sein de la chaîne photosynthétique, de dissiper l'excès d'énergie d'excitation, de prendre en charge l'énergie portée par les ROS et de réparer les dommages, en particulier de la protéine D1 (Niyogi, 2000). Dans le cas particulier des diatomées benthiques mobiles (les formes épipéliques et les formes épipsammiques mobiles), il a été proposé que leur mobilité leur sert à moduler leur environnement lumineux voire à échapper aux excès de lumière, c'est la photoprotection dite 'comportementale' (Admiraal, 1984, Serôdio *et al.*, 2006a, Serôdio *et al.*, 2012).

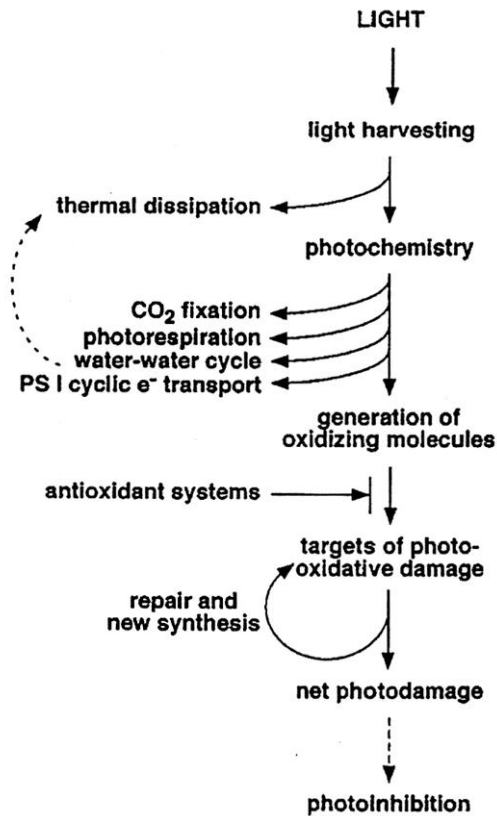


Figure 33 : Les différents mécanismes de photoprotection à partir de l’absorption de la lumière et jusqu’à la photoinhibition potentielle (Niyogi, 2000)

III-2-a. La photoprotection physiologique

Différents processus sont impliqués dans la photoprotection physiologique des diatomées. Ici seront brièvement présentés (voir également les introductions et discussions des Parties 2 et 5) les processus qui ont lieu au sein du PSII et qui ont été étudiés dans ce travail de thèse, à savoir (i) l’extinction non-photochimique de la fluorescence chlorophyllienne, ou ‘Non-Photochemical Quenching’ (NPQ), deux de ses composantes : (a) le cycle des xanthophylles (XC) et (b) les protéines Lhcx, ainsi que le (ii) cycle des électrons du PSII plus mineur (Lavaud *et al.*, 2002b, Lavaud, 2007).

Le NPQ est un mécanisme de régulation rapide de la photochimie qui affecte le taux d’excitation du photosystème II (Figure 34). Il entraîne une diminution de l’émission de la fluorescence chlorophyllienne du centre réactionnel du PSII. Chez les diatomées, il peut être divisé en deux composantes distinctes, le qE appelé extinction de haut niveau d’énergie (‘high

energy state quenching’) car il est lié aux variations de pH (ΔpH) dans les thylacoïdes, et le (qI) qui est l’extinction photoinhibitrice (‘photoinhibitory quenching’) dont l’origine reste méconnue mais qui semble majoritairement induit par les effets de la photoinhibition ; qI apparait donc dans des conditions de lumière particulières. Pour cette raison et parce que, sauf cas extrêmes, le qI représente une portion faible du NPQ chez les diatomées (Wu *et al.*, 2012), le NPQ chez les diatomées est le plus souvent assimilé à qE.

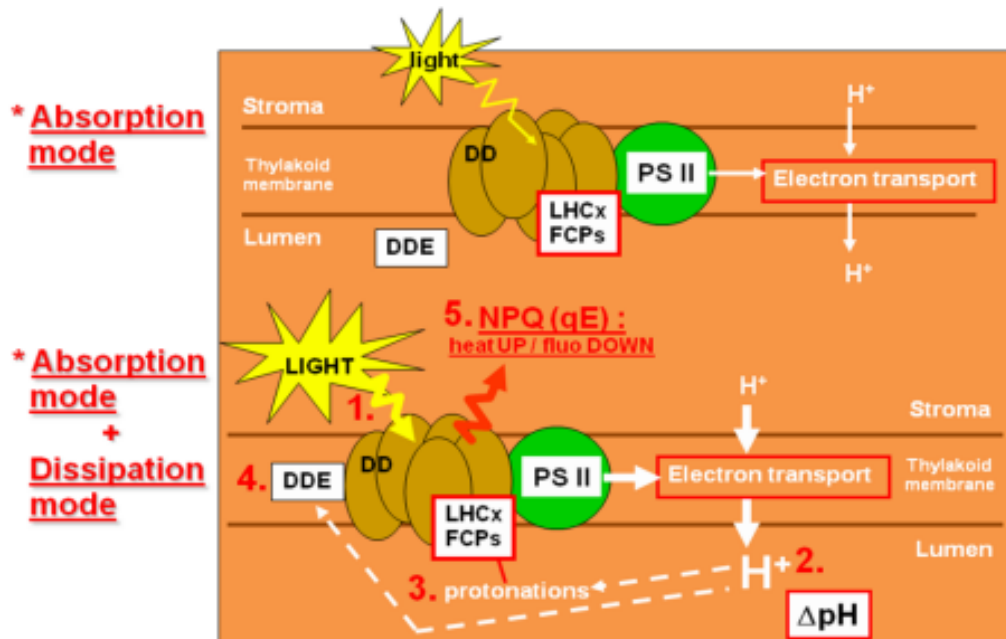


Figure 34 : Schéma simplifié du mécanisme d’activation du NPQ (qE) chez les diatomées

qE est directement lié à l’augmentation de la lumière. Lorsqu’elle dépasse une certaine intensité qui est au-delà des capacités photochimiques et photosynthétiques de l’organisme, l’ATP synthase n’utilise plus suffisamment de H^+ qui s’accumulent dans le lumen. Les H^+ ont deux actions : 1) ils se fixent sur certaines protéines LHC et ils entraînent un changement de conformation spatiale au sein des complexes antennes du PSII, 2) ils activent une enzyme, la dé-époxydase (DDE), qui est impliquée dans le cycle des xanthophylles (cf chapitre ci-dessous). Le changement de conformation de l’antenne auquel s’ajoute la présence de pigments xanthophylles dé-époxydés converti le PSII en un état d’émission de fluorescence basse et d’émission de chaleur haute (Figure 34). Ce système feed-back permet donc à l’organisme de dissiper sous forme de chaleur l’excès d’énergie d’excitation ce qui réduit la probabilité de formation de chlorophylles triplets et de ROS, et donc la probabilité et/ou l’envergure du stress photooxydatif.

Le cycle des xanthophylles chez les diatomées correspond à la conversion enzymatique par la DDE d'une xanthophylle époxydée, la diadinoxanthine (DD), en une forme dé-époxydée, la diatoxanthine (DT). Cette conversion a lieu particulièrement lorsque la lumière est en excès et elle est réversible en faible lumière ou à l'obscurité par la DT dé-époxydase (DEP) (Figure 35).

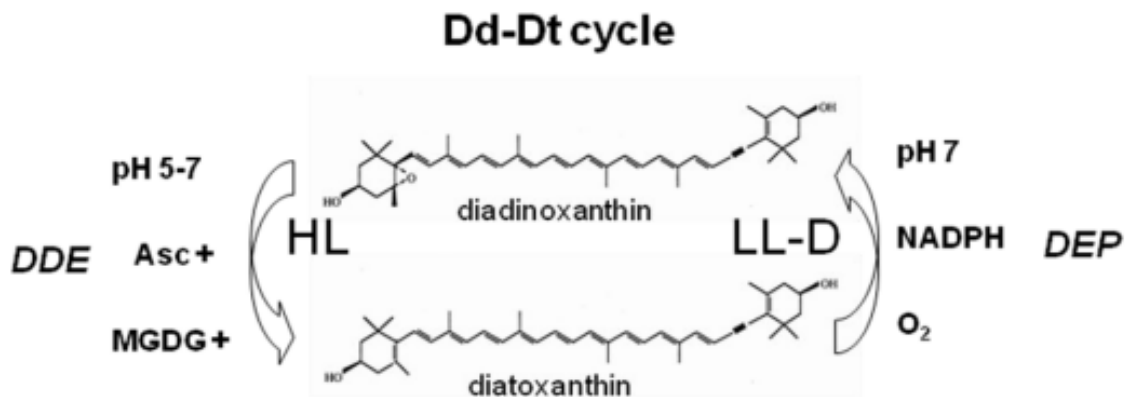


Figure 35 : Schéma synthétisant les modalités principales du fonctionnement du cycle des xanthophylles chez les diatomées. Asc, ascorbate ; D, obscurité ; DDE, diadinoxanthine dé-époxydase ; DEP, diatoxanthine époxydase ; HL, lumière en excès ; LL, lumière faible ; MGDG, lipides.

En fait, les deux enzymes fonctionnent en parallèle mais comme la DEP est plus lente que la DDE, on observe une accumulation de DT en lumière forte (Lavaud, 2007, Eberhard *et al.*, 2008, Goss et Jakob, 2010). La DDE et la DEP sont respectivement localisées dans le lumen et le stroma des thylacoïdes et elles sont activées à des pH différents (Figure 35) ce qui explique leur dépendance vis-à-vis de la translocation de H^+ liée à la photochimie et donc indirectement liée à l'intensité lumineuse. La DT a une fonction protectrice en dehors du NPQ en prenant en charge directement les Chlorophylles triplets et les ROS, ce qui, entre autre, limite la peroxydation des lipides des membranes thylacoïdales (Lepetit *et al.*, 2010).

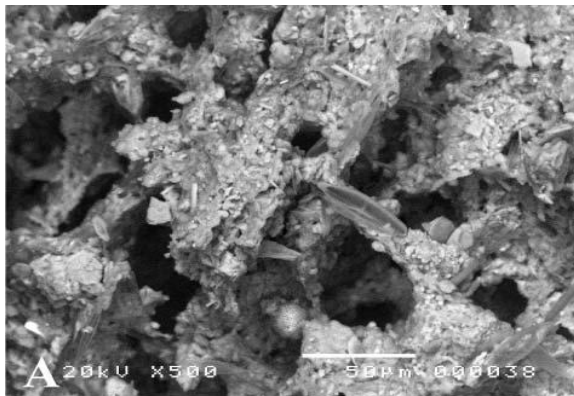
Une troisième composante de qE a récemment été identifiée chez les diatomées, ce sont les protéines Lhcx. Leur localisation dans les antennes collectrices de lumière ainsi que leur rôle exact restent inconnus. On sait qu'elles fixent vraisemblablement des xanthophylles et qu'elles sont essentielles à la formation et l'amplification de qE/NPQ seules et via le XC (Bailleul *et al.*, 2010, Lepetit *et al.*, 2013).

III-2-b. La photoprotection comportementale

La photoprotection comportementale a premièrement été évoquée par Admiraal (1984). Comme évoqué précédemment, les formes épipéliques et les formes épipsammiques mobiles peuvent modifier leur environnement lumineux par des mouvements appelés ‘migration’ et ‘micromigration’. La migration des diatomées épipéliques se fait en fonction du cycle tidal et du cycle nycthéral ; elle peut être modulée par les stimuli environnementaux comme par exemple un excès de lumière ou de température.

Ce phénomène de migration dans le sédiment est connu de longue date (Aleem, 1950, Palmer et Round, 1965, Round et Haphey, 1965, Round et Eaton, 1966, Round et Palmer, 1966, Palmer et Round, 1967) et conduit à la formation d’un biofilm photosynthétique à la surface du sédiment (Figure 36).

Vue du dessus



Vue de profil

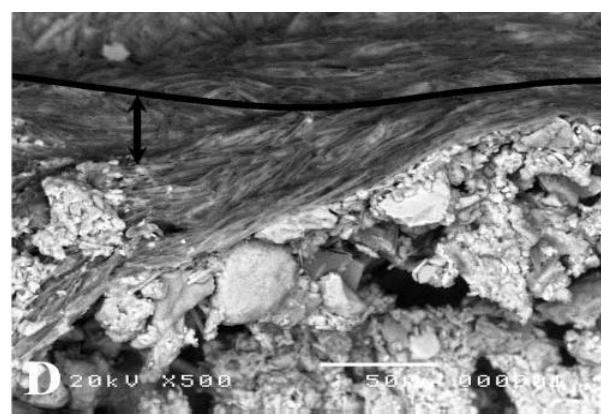
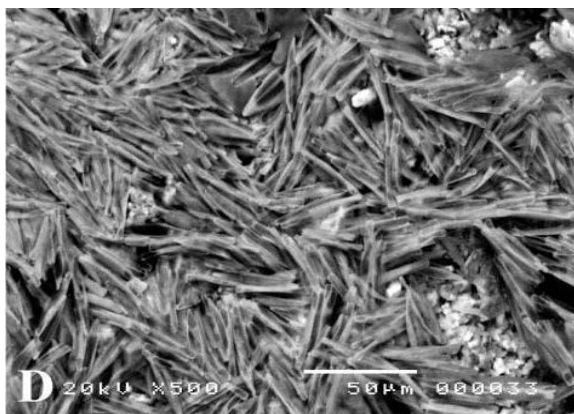
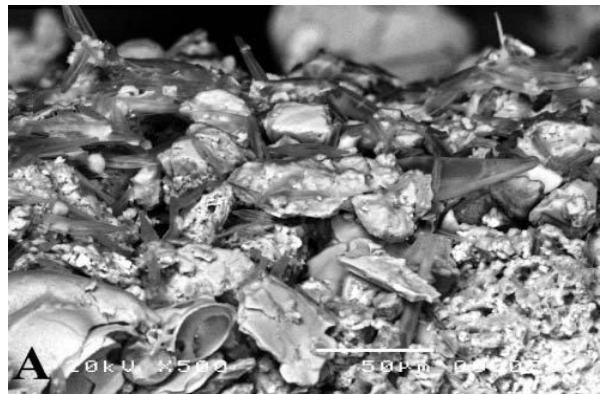


Figure 36 : clichés en microscopie électronique à balayage montrant la formation d'un biofilm de diatomées épipéliques au début (en haut) et après 2 h (en bas) d'émersion (Herlory *et al.*, 2007).

La migration est sous le contrôle d'un rythme endogène car elle persiste quand les diatomées sont maintenues dans des conditions environnementales constantes en laboratoire (Round et Haphey, 1965, Paterson, 1986, Serôdio *et al.*, 1997). Ce rythme migratoire est à la fois synchronisé au cycle nyctéméral et au cycle tidal avec un suivi du décalage des marées basses (Consalvey *et al.*, 2004b) (Figure 37). Deux cas typiques ont été décrits lors du retour de la marée : 1) les diatomées s'enfouissent dans le sédiment avant d'être recouvertes par le flot, 2) les diatomées persistent à la surface du sédiment, le flot est donc susceptible de les remettre en suspension dans la colonne d'eau (et donc de les rendre disponibles pour le réseau trophique pélagique).

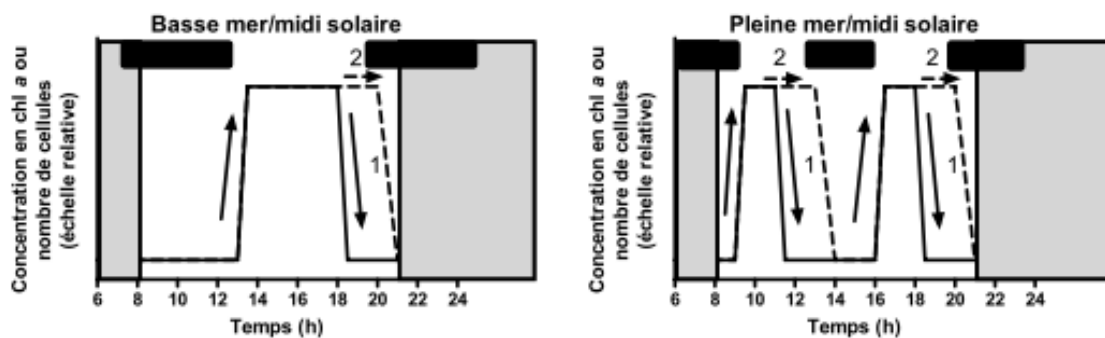


Figure 37 : Schématisation des rythmes de migration des diatomées épipéliques d'après Guarini *et al.* (2000) (Herlory *et al.*, 2007). Les zones grisées représentent la nuit et les barres horizontales noires représentent les périodes d'immersion. Les flèches indiquent le sens de migration des diatomées et les deux situations observées en fin d'émersion sont représentées (1 : enfouissement et 2 : maintien et resuspension éventuelle dans la colonne d'eau). Dans le graphique de gauche, l'émersion diurne coïncide avec le midi solaire, alors que dans le graphique de droite la pleine mer coïncide avec le midi solaire.

Ainsi, les diatomées épipéliques sont capables de se positionner dans le sédiment en fonction de leur environnement lumineux et donc à un optimum de lumière (Figure 38), ou au sein du biofilm en surface du sédiment, c'est ce que certains auteurs ont nommé les 'micromigrations' (Underwood *et al.*, 2005) qui servent entre autre à lutter contre les conditions environnementales défavorables et à optimiser la productivité du biofilm (Consalvey *et al.*, 2004b). Les diatomées épipsammiques mobiles ne migrent pas dans le sédiment mais peuvent se mouvoir autour de la particule de sédiment à laquelle elles sont attachées ce qui leur permet également de moduler leur environnement lumineux mais dans une moindre mesure que les formes épipéliques (Perkins *et al.*, 2001, Consalvey *et al.*, 2004b, Jesus *et al.*, 2006a, Serôdio *et al.*, 2006a, Waring *et al.*, 2007, Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011).

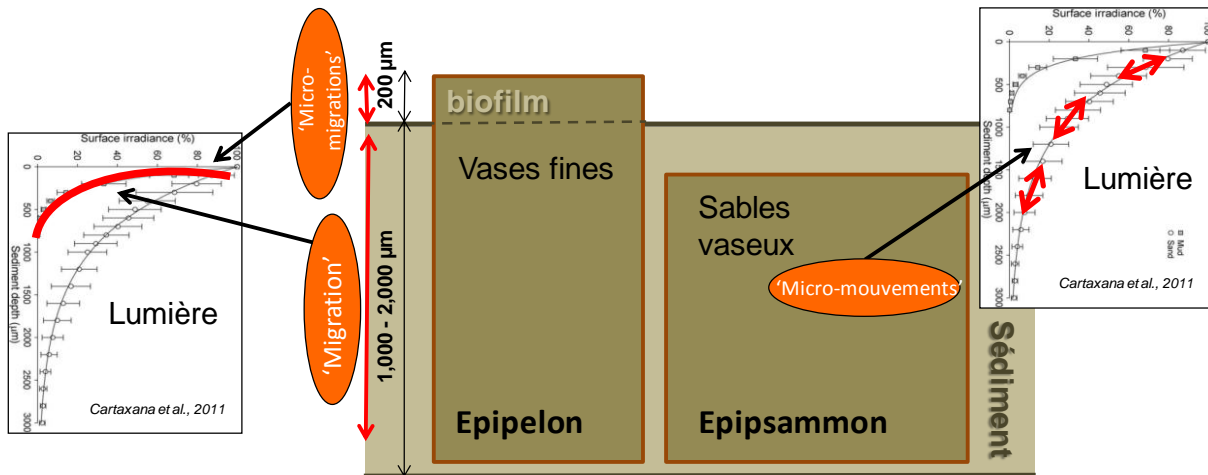


Figure 38 : Schéma résumant le phénomène de mobilité liée à la lumière chez les diatomées benthiques épipéliques et épipsammiques. Les profils de lumière dans le sédiment reprennent la Figure 16.

Les diatomées se déplacent en sécrétant des EPS (cf chapitre II-3-c) qui sont excrétés par le raphé (Apoya-Horton *et al.*, 2006) et qui adhèrent au substrat sédimentaire. Les cellules glissent sur le tapis d'EPS et se propulsent grâce à des structures transmembranaires qui bougent au travers du raphé via des filaments d'actine (Edgar, 1983, Round *et al.*, 1990, Underwood et Paterson, 2003). Des études récentes ont utilisé un inhibiteur des contractions de filaments d'actine : le latruculin-A (Lat-A). Le Lat-A est un produit naturel extrait d'éponges de mer (*Negombata magnifica*) qui possède une affinité de fixation sur l'actine ; elle permet ainsi l'inhibition de la mobilité chez les diatomées épipéliques par la dissolution des filaments d'actine sécrétés au niveau du raphé. Comme la migration est interrompue tout en n'affectant pas l'activité photosynthétique du biofilm (Cartaxana et Serôdio, 2008),

l'application du Lat-A permet d'étudier la réponse physiologique du microphytobenthos épipélique à la lumière en s'affranchissant des effets de la photoprotection comportementale (cf Partie 5B).

III-2-c. La réponse du microphytobenthos à la lumière *in situ*

In situ, la quantité de DD-DT et leur conversion dépend fortement de la lumière et de la température, ainsi que du cycle tidal, de la saison et de la latitude (van Leeuwe *et al.*, 2009, Chevalier *et al.*, 2010, Jordan *et al.*, 2010). La dé-époxydation de la DD est bien corrélée avec les différences d'intensité lumineuse journalières et latitudinales (van Leeuwe *et al.*, 2009, Chevalier *et al.*, 2010, Jordan *et al.*, 2010), ainsi qu'avec la distribution de la lumière dans le sédiment (dé-époxydation plus importante en surface qu'en profondeur) (Jesus *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011). Le NPQ du microphytobenthos *in situ* peut atteindre de fortes valeurs au-delà de 5-6 (Serôdio *et al.*, 2005a, Serôdio *et al.*, 2008). En général, le NPQ est bien corrélé avec la dé-époxydation de la DD, en particulier lors de l'augmentation de l'intensité lumineuse pour les marées basses proches du midi solaire en été (Serôdio *et al.*, 2005a, Chevalier *et al.*, 2010). L'évolution saisonnière du NPQ est fortement influencée par à la fois l'irradiance et la température (Serôdio *et al.*, 2005a, Jesus *et al.*, 2006a). Cette tendance générale d'un contrôle couplé lumière-température est également retrouvé chez des espèces de diatomées benthiques isolées du milieu (Mouget *et al.*, 1999, Perkins *et al.*, 2006, Serôdio *et al.*, 2008, Yun *et al.*, 2010, Salleh et McMinn, 2011).

Les espèces et groupes (épipéliques et épipsammiques) du microphytobenthos montrent des différences de capacités de réponse aux excès de lumière et d'UV (Waring *et al.*, 2006, Jesus *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011). Il a été proposé que ces différences supposées adaptatives pourraient impacter la distribution spatiale (sédiment plus ou moins sableux) tout comme la succession d'espèces au sein du biofilm pendant l'émersion et sur différentes saisons (Tuji, 2000, Serôdio *et al.*, 2005a, Underwood *et al.*, 2005). De par leur mode de vie (attaché aux particules de sédiment), les espèces épipsammiques semblent utiliser essentiellement les processus physiologiques (NPQ et XC) de réponse à la lumière (Jesus *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011). Chez les espèces épipéliques, il apparaît qu'il existe un équilibre entre l'utilisation des processus de photoprotection physiologiques et la photoprotection comportementale, à savoir l'utilisation des mécanismes de migration afin de 'fuir' l'excès

d'énergie lumineuse (Consalvey *et al.*, 2004b, Perkins *et al.*, 2010a). L'importance respective des processus physiologiques et comportementaux a longtemps été un sujet d'intérêt avec des avancées récentes sur lesquelles s'est basé une partie de ce travail de thèse (Partie 5B) (Jesus *et al.*, 2006a, Mouget *et al.*, 2008, Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011). En général, le NPQ-XC et la photoprotection comportementale apportent au microphytobenthos une forte capacité de résistance aux périodes de stress lumineux prolongées (Blanchard *et al.*, 2004, Serôdio *et al.*, 2008, Perkins *et al.*, 2010a, Serôdio *et al.*, 2012) et aux radiations UV (Waring *et al.*, 2007, Mouget *et al.*, 2008). De plus, le microphytobenthos est caractérisé par un fort 'dark NPQ' (Serôdio *et al.*, 2005a, Perkins *et al.*, 2010b, Lefebvre *et al.*, 2011), à savoir un NPQ qui est maintenu actif à l'obscurité de par le maintien d'un pool de DT significatif (Serôdio *et al.*, 2005a, Perkins *et al.*, 2010b, Lefebvre *et al.*, 2011). Ceci permettrait aux diatomées de maintenir leurs antennes collectrices de lumière à un niveau de dissipation de base dans le but d'activer pleinement et rapidement le mécanisme du NPQ (cf chapitre III-2-a) lors de la ré-exposition soudaine à la lumière lors de l'émersion ce qui serait significatif pour des communautés qui passent le plus souvent au moins 18 h à l'obscurité (immersion et émersion de nuit).

IV. Mesures de la productivité photosynthétique du microphytobenthos

Il existe trois méthodes pour mesurer l'activité photosynthétique du microphytobenthos, en particulier *in situ* : 1) l'émission de la fluorescence chlorophyllienne, 2) l'émission d'oxygène photosynthétique, 3) la fixation du CO₂. Les méthodes 1 et 3 ont été utilisées au cours de ce travail de thèse. Leur comparaison est sujet à débat de longue date (Perkins *et al.*, 2010b). Cette comparaison n'est pas le sujet de cet état des connaissances, ces deux méthodes mesurent des aspects différents de l'activité photosynthétique, sur des échelles spatiales et temporelles différentes, elles sont donc complémentaires.

IV-1. Fluorimétrie PAM

Les fluorimètres PAM sont des outils permettant la mesure des variations de fluorescence chlorophyllienne (la fluorescence du PSII), dont l'explication ici se base majoritairement sur deux revues Consalvey *et al.* (2005), Murchie et Lawson (2013).

La fluorescence est la réémission de photons captés sous forme de photons d'un niveau énergétique plus faible. La chlorophylle *a* réémet dans le spectre lumineux rouge. En absence de lumière, les centres réactionnels du PSII sont dit 'ouverts', c'est-à-dire qu'ils sont prêts à recevoir des électrons pour effectuer la séparation de charges. Le niveau de fluorescence est minimal (F_0). Si on applique alors un court flash lumineux suffisant pour fermer tous les centres réactionnels PSII (appelé impulsion de saturation ou 'saturating pulse'), on atteint une fluorescence maximale (F_m). La différence entre ces deux mesures nous donne le potentiel de fluorescence ($F_v = F_m - F_0$). Dans ces conditions, il est facile de calculer le rendement quantique du PSII (F_v / F_m), qui est communément utilisé pour estimer 'l'état de santé' des organismes photosynthétiques.

En présence de lumière dite actinique (capable de stimuler la photosynthèse), les photons vont atteindre l'antenne collectrice d'énergie lumineuse et donc entraîner une acceptation d'électrons par les centres réactionnels PSII. Le signal de fluorescence mesuré sans autre stimulation que la lumière ambiante est donc situé entre F_0 et F_m (F_s ou F'). F_s est proportionnel à la quantité de centres réactionnels PSII fermés. Si on applique un sat-pulse, on atteint un niveau de fluorescence supérieur à F_s , et inférieur à F_m (F_m') lorsque l'intensité de la lumière actinique est suffisamment forte (en excès de la capacité photosynthétique de l'organisme). Le fait que le F_m' soit inférieur au F_m est dû au NPQ qui dissipe une partie de l'énergie envoyée au PSII (voir plus bas) (Figure 39).

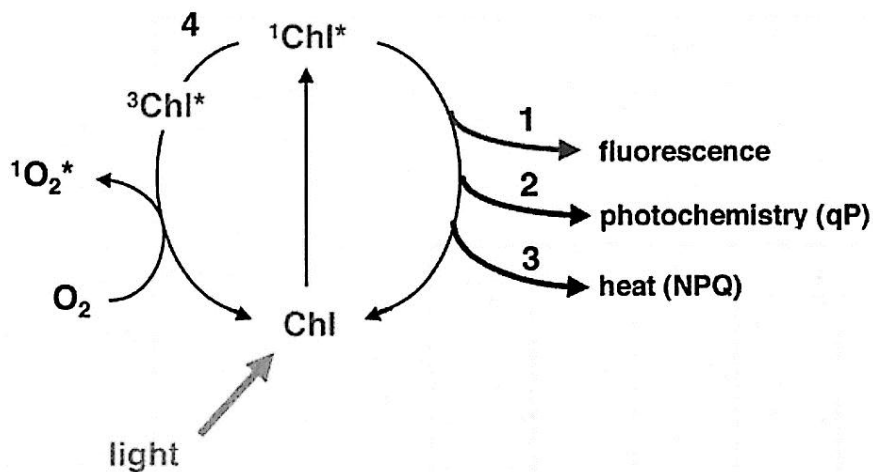


Figure 39 : Lors de l'augmentation du NPQ (3), il y a augmentation de la fluorescence (1)

Sur un échantillon adapté à la lumière, la différence entre le niveau de fluorescence à un niveau particulier F_s (ou F') et F_m' est défini comme la fluorescence qui a été utilisée dans la photochimie ($F_q' = F_m' - F_s$). Il est proportionnel au nombre de centres réactionnels PSII ouverts et, par conséquent, à la quantité d'énergie lumineuse utilisée pour la photochimie. Si F_q' est ramené à F_m' , on calcule alors le rendement photochimique du PSII ou $\Phi_{PSII} = (F_m' - F_s) / F_m'$.

L'utilisation des différents niveaux de fluorescence permet de calculer de nouveaux paramètres qui permettent d'aller plus loin dans l'évaluation de l'activité photosynthétique. En augmentant progressivement l'intensité lumineuse, l'efficacité de son utilisation diminue car de plus en plus de centres réactionnels PSII sont fermés, ce qui entraîne une diminution de l'émission de fluorescence. Ceci est réalisé lors de RLCs ou Rapid Light Curves (cf Parties 2, 3, 5A, 6) lors desquelles l'intensité de la lumière actinique est progressivement augmentée (par paliers de 30 s ; Lefebvre *et al.* (2011)) jusqu'à un maximum qui permet de saturer la

photochimie. De cette manière, le taux de transport d'électrons photosynthétique (ETR : Electron Transport Rate en $\mu\text{mol e}^- \mu\text{g chl a}^{-1} \text{s}^{-1}$) peut être calculé en utilisant les précédents paramètres relatifs à l'efficacité d'utilisation de la lumière : $\text{ETR} = \Phi \text{ PSII} \times E \times a^*$ ou E est l'intensité lumineuse ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), et a^* le coefficient d'absorption de la lumière ($\text{m}^2 \mu\text{g chl a}^{-1}$). Dans les cas où le paramètre a^* ne peut pas être mesuré (ce qui est souvent le cas avec le microphytobenthos), on parle alors de taux de transport d'électron relatif : $\text{rETR} = \Phi \text{ PSII} \times E \times 0.5$, le facteur 0.5 provenant des connaissances issues des plantes et étant utilisé par défaut pour exprimer le fait que seulement la moitié de l'énergie lumineuse absorbée est utilisée pour la photochimie. Chez les diatomées, ce paramètre est très variable d'une espèce à l'autre et en fonction des conditions d'acclimatation environnementale, c'est donc souvent qu'il n'est pas utilisé.

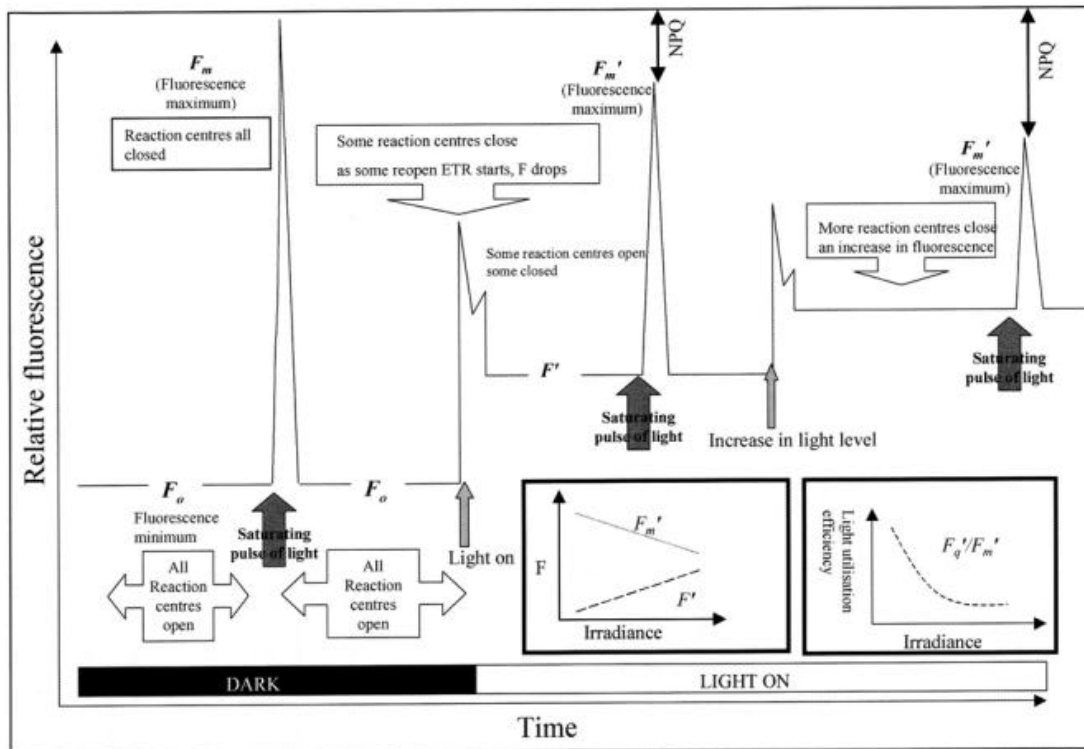


Figure 40 : Représentation schématique des niveaux de fluorescence chlorophyllienne mesurés par fluorimétrie PAM.

La diminution de l'émission de fluorescence chlorophyllienne peut aussi être, dans des conditions de lumière actinique constante, observée lorsque l'on soumet les échantillons à un stress, en particulier un excès de lumière (Figure 40). Ceci est réalisé lors de NSLCs ou Non-Sequential Light Curves (cf Partie 2) lors desquelles l'intensité de la lumière actinique est fixe

pendant 5 minutes (temps nécessaire à la stabilisation de F_s). L'intensité est augmentée jusqu'à un maximum qui sature la photochimie mais à la différence des RLCs, un nouvel échantillon est utilisé pour chaque pas d'intensité. De cette manière, le développement optimal du NPQ peut être évalué contrairement aux RLCs. Néanmoins, les NSLCs peuvent être utilisées au laboratoire mais pas *in situ* ; dans ces conditions NPQ est également évalué par RLCs. Il requiert une connaissance du F_m et donc une acclimatation préalable des échantillons à l'obscurité (pour générer l'ouverture de tous les centres réactionnels PSII). Il correspond à la différence entre le niveau de fluorescence maximal atteint à l'obscurité (F_m) et à la lumière (F_m') ramené à ce dernier : $NPQ = (F_m - F_m') / F_m$; NPQ n'a pas d'unité. Lorsque l'acclimatation des échantillons à l'obscurité n'est pas possible (comme par exemple dans le cas du biofilm épipélique où l'obscurité provoque un changement de biomasse en surface du sédiment) et la mesure d'un 'vrai' F_m impossible, la plus forte valeur de F_m' de la RLC ($F_m'_{max}$) est utilisée comme proxy de F_m (Lefebvre *et al.*, 2011).

Les courbes rETR et NPQ en fonction de l'intensité lumineuse, ETR-E et NPQ-E peuvent être paramétrées par modélisation mathématique (Eilers et Peeters, 1988, Serôdio et Lavaud, 2011). Les paramètres ainsi dérivés des courbes ETR-E sont 1) le rETR maximal ($rETR_m$) qui est l'asymptote de la courbe, 2) α qui est la pente à l'origine et représente l'efficacité d'utilisation de la lumière, 3) $E_k = rETR_m / \alpha$ qui représente le coefficient de saturation de la lumière. Pour les courbes NPQ-E : 1) le NPQ maximal (NPQ_m), 2) $E_{50}NPQ$, l'E nécessaire pour atteindre 50 % de NPQ_m , 3) n qui est le coefficient de sigmoïdité de la courbe et qui représente l'efficacité d'induction du NPQ.

IV-2. La fixation de CO₂

L'utilisation de chambres benthiques permet de mesurer *in situ* la variation de pression partielle de CO₂ à l'intérieur de la chambre (Figure 41). Ce système est constitué d'une embase enfoncée dans le sédiment sur laquelle est fixée un dôme, soit translucide, soit opaque. Le premier permet de mesurer la production nette de la communauté microphytobenthique alors que le second permet de mesurer la respiration. La technique

utilisée au cours de ce travail de thèse a été la même que celle utilisée par Ouisse (Ouisse, 2010).

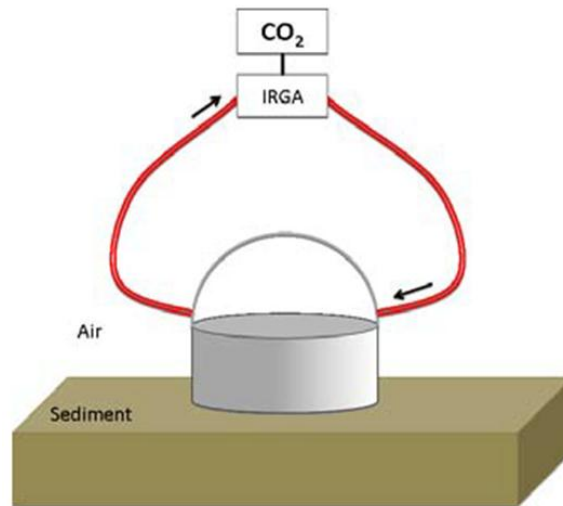


Figure 41 : Schéma de fonctionnement d'une chambre benthique à l'émersion

La concentration de CO₂ est mesurée en continue (sur des périodes de 30 min) à l'aide d'un analyseur de gaz à infrarouge (IRGA). Le flux de CO₂ est ensuite calculé par la variation de pression partielle en CO₂, du temps d'incubation, du volume de la chambre et de la surface de sédiment enfermée par celle-ci. La production brute du microphytobenthos (en mg C. m⁻². h⁻¹) est ensuite calculée par la somme de la production nette et de la respiration.

Cette méthodologie est utilisée pour mesurer la production primaire du microphytobenthos mais aussi des macrophytes (macroalgues et zostères). Elle a été utilisée au cours de ce travail de thèse *in situ* seulement sur des sites à vases fines et à vases sableuses (cf Partie 6).

Partie 1-C : Démarche scientifique

La production primaire des vasières littorales est un sujet historique du laboratoire LIENSs et du CRELA / LBEM (Université de La Rochelle-Ifremer). Sa quantification et son évolution temporelle en fonction du cycle tidal et saisonnier, et de facteurs environnementaux comme la lumière et la température, ont été le sujet de nombreux travaux dans les années 1990-2000 (pour revues voir Blanchard (2006), Guarini *et al.* (2006);). L'ANR VASIREMI (2006-2011, coordination C. Dupuy) a de plus permis de mieux comprendre la place du microphytobenthos au sein du réseau trophique des vasières intertidales ainsi que les interactions entre les microorganismes du biofilm (thèses, entre autres, (Pascal, 2008, De Crignis, 2010, Ory, 2010, Saint-Béat, 2012), C. Lavergne-2014). Au travers de cette évolution, le microphytobenthos (et le compartiment microbien en général) a été de plus en plus considéré comme une entité complexe dont la diversité spécifique et la complexité fonctionnelle doivent être prises en compte dans l'étude de la régulation environnementale de la productivité du microphytobenthos. Ce degré d'appréhension est devenu indispensable à une meilleure prise en compte de la variabilité de la productivité du microphytobenthos dans les modélisations trophiques benthopélagiques futures. C'est dans ce cadre que se situe ce travail de thèse.

La nouvelle approche suivie au cours de cette thèse est basée en particulier sur l'intégration des changements d'échelle spatiale (Figure 42), i.e. la compréhension de la régulation de la production primaire des vasières intertidales passe par la compréhension de la régulation fine de l'activité photosynthétique du microphytobenthos par les facteurs environnementaux principaux : la lumière, la température et la salinité en particulier (les nutriments n'ont pas été abordés pendant ce travail). Cette approche implique donc un travail linéaire avec des allers-retours continus allant de l'appareil photosynthétique à la vasière en passant par les échelles moléculaire (pigments et protéines photosynthétiques), cellulaire (processus photosynthétiques et de division cellulaire), de la population (cultures mono-spécifiques de microalgues), de la communauté (biofilm microphytobenthique) (Figure 42).

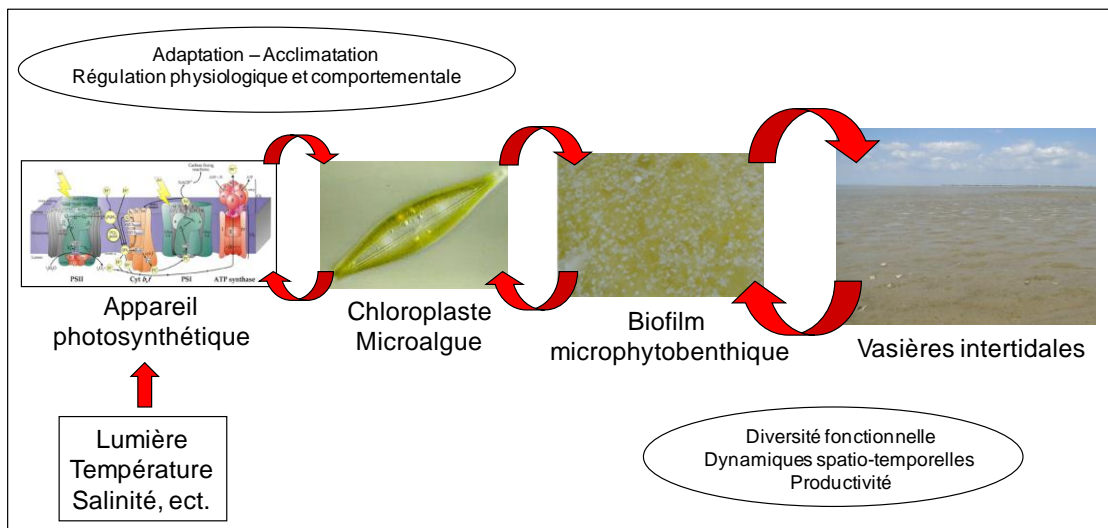


Figure 42 : Démarche conceptuelle générale suivie au cours de ce travail de thèse.

Un aspect important de ce travail de thèse a été d'intégrer la diversité du microphytobenthos ce qui avait été peu fait avant (cf Partie 2). Dans nos régions tempérées, le microphytobenthos est principalement constitué de diatomées ('microalgues brunes') qui peuvent être divisées en trois grandes formes de vie (voir la Partie 1-B pour plus de détails) (Figure 43) : 1) les diatomées épipéliques vivant dans les sédiments à vases fines capables de former, par mobilité verticale, un biofilm en surface du sédiment à marée basse, 2) les diatomées épipsammiques vivant attachées aux particules de sédiment dans les sables vaseux, 3) les diatomées tychoplantoniques qui sont des espèces capables d'alterner entre une vie benthique dans le sédiment (microphytobenthos) et une vie planctonique dans la colonne d'eau (phytoplancton).

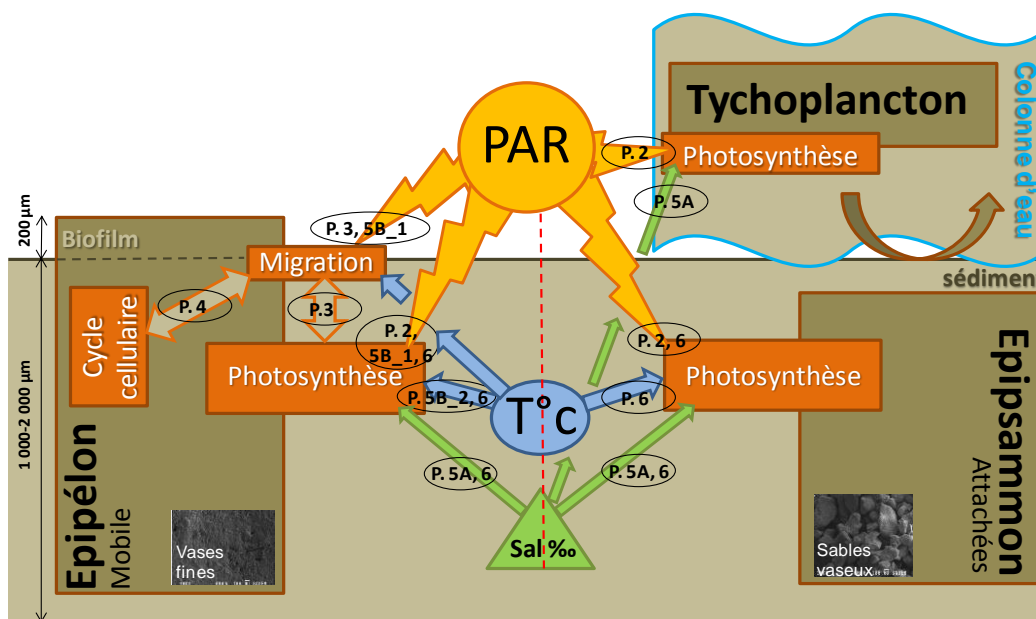


Figure 43 : Démarche conceptuelle détaillée suivie au cours de ce travail de thèse. La numérotation P.2, etc. reprend le découpage des différentes Parties (P.). PAR, Photosynthetic Active Radiation (= lumière, intensité et qualité) ; T°C, température ; Sal‰, salinité.

Dans un premier temps, la réponse physiologique aux variations de la lumière de l'activité photosynthétique de plusieurs espèces de ces trois formes de vie (cultures mono-spécifiques) a été étudiée à des échelles fines d'espace et de temps. Ce travail s'est réalisé en collaboration avec des membres du laboratoire de Protistologie et Ecologie Aquatique de l'université de Gand en Belgique (travail couplé avec la thèse de L. Blommaert), il est décrit en Partie 2. En parallèle, cette approche a été complétée par un travail *in situ* à différentes saisons (échelles spatio-temporelles plus grandes) sur des sites d'étude à dominance de diatomées épipéliques

ou à dominance de diatomées épipsammiques ; ce travail est décrit en Partie 6 car son analyse intègre les nouvelles connaissances des parties précédentes (de 3 à 5).

Dans un deuxième temps, de par leur forme de vie particulière (mobilité), le couplage de la réponse physiologie et comportementale du microphytobenthos épipélique à la lumière a été approfondie à l'échelle de la communauté (il a été réalisé dans une moindre mesure sur des communautés épipsammiques, cf Partie 3). Ce travail avait pour but de mieux comprendre les contrôles (rythme nyctéméral et rythme tidal, intensité et qualité de la lumière) de la production (division cellulaire et photosynthèse) et de la mise à disposition en surface du sédiment pour les consommateurs (migration) de la biomasse microphytobenthique épipélique photosynthétiquement active sur une échelle saisonnière. Cette partie de la thèse est décrite dans les Parties 3 et 4.

Dans un troisième temps, l'étude des effets du couplage des principaux forçages physiques sur l'activité photosynthétique du microphytobenthos a été effectuée par deux approches : 1) l'effet d'un coupage lumière-salinité a été réalisé sur des représentants des trois grandes formes de vie (cultures mono-spécifiques) ; ce travail s'est fait en collaboration avec P. Juneau de l'Université du Québec à Montréal ; il est décrit en Partie 5A ; 2) l'effet d'un coupage lumière-température a été réalisé sur la communauté épipélique seulement; ce travail s'est fait en collaboration avec des membres du laboratoire de Phycologie de l'université d'Aveiro au Portugal ; il est décrit en Partie 5B. Cette approche différenciée est basée sur des aspects techniques (voir le paragraphe suivant) et sur des aspects écophysologiques : tandis que les trois grandes formes de vie des diatomées microphytobenthiques sont toutes susceptibles d'être soumises à des variations importantes de salinité couplées à la lumière, il a semblé que la forme de vie épipélique est celle qui subit le couplage lumière-température le plus fort et dont la réponse allait être la plus significative.

D'un point de vue méthodologique, une telle approche implique de travailler sur différents matériels et sous différentes conditions en maintenant un maximum de liens et de complémentarité (Figure 44).

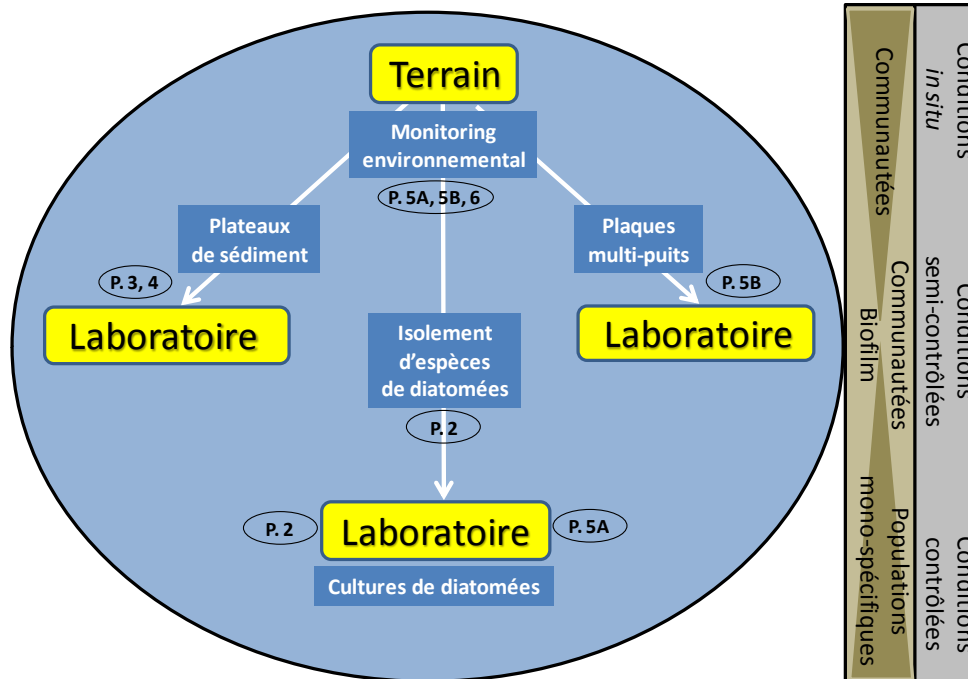


Figure 44 : Approche méthodologique suivie au cours de ce travail de thèse. La numérotation P.2, etc. reprend le découpage des différentes Parties (P.).

Ainsi, le travail sur le terrain et le monitoring environnemental (Partie 6 et 5B) ont permis 1) de prélever et d'isoler certaines des espèces cultivées par la suite en populations mono-spécifiques et étudiées dans les Parties 2 et 5A ; 2) de prélever du sédiment frais contenant des communautés de diatomées épipéliques (et épipsammiques dans une moindre mesure, cf Partie 3) qui ont été ensuite maintenues actives en laboratoire plusieurs jours soit sous forme de plateaux (Partie 3 et 4), soit sous forme de plaques multi-puits (Partie 5B) ; 3) de confronter la crédibilité des conditions expérimentales de lumière, température et salinité utilisées en laboratoire avec la réalité du terrain (Parties 2 et 5 en particulier). De cette manière, il a été possible de coupler un travail dans des conditions environnementales (paramètres physiques et biologiques) contrôlées et semi-contrôlées (laboratoire) ou naturelles (*in situ*), et à différentes échelles biologiques : populations mono-spécifiques (laboratoire), communautés restreintes au biofilm épipélique microbien (incluant procaryotes et virus, laboratoire) ou aux communautés naturelles dans leur ensemble (incluant en plus la faune, *in situ*) (Figure 44).

Le choix de certaines approches a été dicté par des choix conceptuels et/ou par des contraintes ou au contraire des avancées techniques récentes. Par exemple, pour ce qui concerne le travail de la Partie 2 (populations mono-spécifiques), le parti pris a été de cultiver les différentes espèces en milieu liquide ce qui est très éloigné de leur conditions de vie naturelles. Ce choix a été dicté par 1) la restriction de l'étude à la réponse physiologique, la croissance en milieu liquide permettant de s'affranchir de la réponse comportementale de certaines espèces de diatomées et en particulier des formes épipéliques (migration verticale en fonction de la lumière), 2) la difficulté actuelle d'avoir une approche physiologique fine sur des diatomées mélangées au sédiment (cf Partie 3 et 6). A cause de cette approche, certaines espèces de diatomées épipéliques de grande taille (*Pleurosigma* sp. *Gyrosigma* sp., etc.), qui sont pourtant communes, n'ont pu être intégrées au screening avec succès car les biomasses obtenues ont été trop faibles et leur culture nécessiterait du sédiment pour une meilleure croissance. Un autre exemple concerne le travail des Parties 5A et 5B. Tandis que l'étude de l'effet du couplage lumière-salinité (Partie 5A) est très difficile à réaliser sur du sédiment (difficulté à faire varier la salinité et à la maintenir stable au cours de l'expérimentation), elle est possible sur des cultures mono-spécifiques liquides même si là encore seule la réponse physiologique peut être observée. Au contraire, il est relativement simple de faire varier la température du sédiment (Partie 5B). De plus, les avancées récentes en imagerie de la fluorimétrie PAM (cf Parties 1B et 5B pour plus de détails) permettent d'utiliser des plaques multi-puits qui autorisent la multiplication des réplicas et des traitements (inhibiteurs en particulier) et l'analyse approfondie des réponses physiologique et comportementale couplées des diatomées épipéliques à l'échelle de la communauté (biofilm en surface du sédiment). Cependant, cette méthodologie ne permet pas à l'heure actuelle d'effectuer le même type d'expérimentation sur les communautés épipsammiques enfouies dans le sédiment.

Partie 1-D : Production **scientifique dans le cadre de la** **thèse**

I. Publications

I-1. Publiée

Publication correspondant à la Partie 5B_1 ; travail réalisé en collaboration avec J. Serôdio, Assistant Prof., et J. Ezequiel, en thèse, Université d'Aveiro-Portugal, dans le cadre du programme CNRS chercheur invité 2010 :

1_ J. Serôdio, J. Ezequiel, A. Barnett, J.-L. Mouget, V. Méléder, M. Laviale & J. Lavaud. 2012. 'Efficiency of photoprotection in microphytobenthos : role of vertical migration and the xanthophyll cycle against photoprotection'. *Aquatic Microbial Ecology*, 67 : 161-175.

I-2. Soumise

Publication correspondant à la Partie 2 ; travail réalisé en collaboration avec V. Méléder, Maître de Conférences à l'Université de Nantes, en délégation CNRS à LIENSs 2010-11 (stage M2 de P. Gaudin dans ce cadre), et avec K. Sabbe/W. Vyverman, Prof., et L. Blommaert, en thèse, Université de Gand-Belgique, dans le cadre du programme d'échanges

France-Belgique PHC Tournesol 2013-14 ; dans ce cadre j'ai également co-encadré une stagiaire de l'Intechmer (E. Désoche, 2012) :

4_ A. Barnett, V. Méléder, L. Blommaert, B. Lepetit, P. Gaudin, W. Vyverman, K. Sabbe, C. Dupuy & J. Lavaud. 'To move or not to move: Growth form and motility define photoprotective capacity in intertidal benthic diatoms'. Soumis à *The ISME Journal*, 11/10/2013, n°ISMEJ-13-009300A.

I-3. A soumettre dans l'immédiat

Publication correspondant à la Partie 3:

3_ A. Barnett, V. Méléder, L. Ribeiro, Dupuy & J. Lavaud. 'The migratory rhythm of intertidal microphytobenthos in sediment depends on the light photoperiod, intensity and quality: evidence for a positive effect of blue wavelengths'.

→ Reste à faire: calibration fluorescence chlorophyllienne de l'Imaging-PAM versus contenu en Chl *a* du sédiment mesuré à l'HPLC ; analyse des espèces de diatomées en surface du sédiment sous différentes conditions de lumière (lumière bleue de différentes intensités).

Soumission prévue à *Journal of Phycology*, début 2014.

Publication correspondant à la Partie 5A ; travail réalisé en collaboration avec P. Juneau, Prof. à l'Université du Québec à Montréal-Canada dans le cadre du programme chercheur invité CNRS-ULR-RPC 2011 et 2013 :

2_ P. Juneau, A. Barnett & J. Lavaud. 'Combined effect of excess light and salinity on the regulation of photosynthesis in three diatom species belonging to the main growth forms of intertidal microphytobenthos'.

Soumission prévue à *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, fin 2013.

Publication correspondant à la Partie 5B ; travail réalisé en collaboration avec les membres du laboratoire de J. Serôdio de l'Université d'Aveiro-Portugal (M. Laviale, J. Ezequiel, S. Frankenbach, C. Pais) dans le cadre du programme d'échanges France-Portugal PHC Pessoa 2012-13 :

1_ M. Laviale, A. Barnett, J. Ezequiel, B. Lepetit, S. Frankenbach, C. Pais, V. Méléder, J. Serôdio & J. Lavaud. 'Response of intertidal benthic microalgal biofilms to a coupled light-temperature stress: evidence for latitudinal adaptation along the Atlantic coast of Southern Europe'.

→ Reste à faire: analyse des espèces de diatomées en surface du sédiment sur les deux sites d'étude.

Soumission prévue à *Environmental Microbiology*, fin 2013.

II. Communications, présentateur effectif

II-1. Présentation orales

Présentations correspondant à la Partie 2 :

2_ Barnett A., Méléder V., Blommaert L., Gaudin P., Sabbe K., Vyverman W., Dupuy C. & Lavaud J. 'Différences de capacité de photoprotection les diatomées microphytobenthiques des vasières intertidales: conséquence possible sur leur répartition spatiale liée à l'environnement lumineux'. 10/2012. Journées Thématiques du Groupement des Protistologues de Langue Française, La Rochelle, France.

1_ Barnett A., Méléder V., Blommaert L., Gaudin P., Sabbe K., Vyverman W., Dupuy C. & Lavaud J. 'Photoprotection capacity differs among microphytobenthic diatoms inhabiting intertidal mudflats: Possible consequences on their spatial distribution related to the light environment'. 08/2012. 22nd International Diatom Symposium, Ghent, Belgium

Présentation correspondant aux Parties 2, 3 et 6 :

3_ Barnett A., Méléder V., Dupuy C. & Lavaud J., 'La Fluorimétrie comme technique de suivi de la migration des algues microscopiques' 05/2012. Colloque des doctorants en deuxième année de l'ULR 2012, La Rochelle, France.

II-2. Posters

Posters correspondant aux Parties 3 et 4 :

3_ Barnett A., Méléder V., Beaugeard L., Agogué H., Dupuy C. & Lavaud J. 'Influence of the light climate (quantity and quality) on the coupling between migration, photosynthesis and cell division in microphytobenthic diatoms'. 08/2012. 22nd International Diatom Symposium, Ghent, Belgium.

2_ Barnett A., Beaugeard L., Courties C., Martin-Jézéquel M., Agogué H., Lavaud J. 'Coupling between the cell cycle and the vertical migration in intertidal mudflat microphytobenthos (MPB)'. 09/2011. 5th European Phycology Congress, Rhodes Island, Greece.

Posters correspondant aux Parties 2, 3 et 6 :

1_ Barnett A., Gaudin P., Méléder V., Mouget J.-L., Dupuy C. & Lavaud J. 'Regulation of the microphytobenthos photosynthetic activity: consequences on the seasonal dynamics of primary production in the coastal mudflats of the Pertuis-Charentais'. 06/2011. International Symposium on the Trophic Significance of Microbial Biofilm in Tidal Flats, La Rochelle, France.

4_ A. Barnett. 'L'influence de la physique sur l'éco(physio)logie : La lumière comme moteur de la productivité des vasières littorales'. 05/2012. Colloque des doctorants en 2^{ème} année de l'ULR 2012, La Rochelle, France.

III. Communications, présentateur non-effectif

8_ *Présentation orale*-Sabbe K., Blommaert L., Barnett A., Lepetit B., Méléder V., Gaudin P., Dupuy C., Vyverman W. & Lavaud J. 'Functional ecology of marine intertidal diatoms : linking photophysiology to community ecology'. 09/2013. 7th Central EU Diatom Meeting, Thonon-les-Bains, France.

7_ *Présentation orale*-Barnett A., Méléder V., Blommaert L., Lepetit B., Gaudin P., Sabbe K., Dupuy C. & Lavaud J. 'The way you move: photoprotection capacity of microphytobenthic diatoms inhabiting estuarine intertidal mudflats is defined by their ecological behavior'. 06/2013. 2nd International Conference 'The Molecular Life of Diatoms'-EMBO Workshop, Paris, France.

6_ *Poster*-Blommaert L., Barnett A., Huysman M., Vyverman W., Lavaud J. & Sabbe K. 'Light stress in intertidal diatoms : a comparative ecophysiological and molecular study. 06/2013. 2nd International Conference 'The Molecular Life of Diatoms'-EMBO Workshop, Paris, France.

5_ *Poster*-Blommaert L., Barnett A., Vyverman W., Lavaud J., Sabbe K. 'Light stress in intertidal diatoms: a comparative ecophysiological study'. 02/2013. VLIZ Young Scientists' Day-Flanders marine Institute, Bruges, Belgium.

4_ *Poster*-Blommaert L., Barnett A., Méléder V., Gaudin P., Vyverman W., Dupuy C., Lavaud J., Sabbe K. 'Ecological Niche predicts photoprotection capacity of microphytobenthic diatoms inhabiting intertidal mudflats'. 02/2013. 7th International Symposium 'Eco-Evolutionary Dynamics', Leuven, Belgium.

3_ *Présentation orale*-Méléder V., Gaudin P., Lavaud J., Barnett A., Launeau P. & Barillé L. 'Microphytobenthos productivity estimation using hyperspectral remote-sensing: from species to the ecosystem level'. 08/2012. 22nd International Diatom Symposium, Ghent, Belgium.

2_ *Poster*-Blommaert L., Barnett A., Vyverman W., Lavaud J. & Sabbe K. 'Attached intertidal diatoms have stronger photoprotective mechanisms compared to motile diatoms'. 08/2012. 22nd International Diatom Symposium, Ghent, Belgium.

1_ *Poster*-Ribeiro L., Méléder V., Barnett A., Lavaud J. & Brotas V. 'Extracting diatoms from intertidal sediments: a comparison of different methods'. 08/2012. 22nd International Diatom Symposium, Ghent, Belgium.

Partie 2 : La réponse photo-
physiologique du
microphytobenthos : diversité
fonctionnelle de la régulation de la
photosynthèse

Cette section a fait l'objet d'une publication soumise dans ISME en octobre 2013 : Alexandre Barnett, Vona Méléder, Lander Blommaert, Bernard Lepetit, Pierre Gaudin, Wim Vyverman, Koen Sabbe, Christine Dupuy & Johann Lavaud (submitted). Growth form defines physiological photoprotective capacity in intertidal benthic diatoms

Synthèse

Dans les sédiments marins intertidaux nus, caractérisés par des variations de lumières soudaines et souvent extrêmes, la production primaire est fréquemment dominée par des diatomées. Une analyse comparative de la photophysologie de 15 souches de diatomées marines benthiques appartenant aux quatre groupes morphologiques majeurs rencontrés dans ces sédiments a été réalisée. Dans cette première partie de mon travail de thèse, la réponse physiologique fine aux variations d'intensité lumineuse de plusieurs espèces des trois grands groupes de diatomées benthiques (épépélon épipsammon et tychoplancton) a été étudiée. Ce travail portant uniquement sur la photophysologie des diatomées, il a donc fallu s'affranchir de la réponse comportementale à la lumière de l'épépélon et des espèces épipsammiques mobiles. Pour se faire, nous avons travaillé sur des cultures mono-spécifiques en milieu liquide sans la présence de sédiment. Ce travail a été réalisé en collaboration avec des membres du laboratoire de Protistologie et d'Ecologie Aquatique de l'Université de Gand en Belgique dans le cadre du PHC Tournesol-Campus France (2013). Il est couplé au travail de thèse de L. Blommaert qui compare les réponses photophysologiques respectives d'une espèce épépélique (*Seminavis robusta*) et épipsammique (*Opephora* sp.) à une échelle encore plus fine (gènes). Un manuscrit correspondant à ce travail a été soumis à *ISME Journal* : 'Growth form defines physiological photoprotective capacity in intertidal benthic diatoms' (voir ci-après).

L'objectif principal de cette étude était de procéder à une analyse comparative des différences de stratégies photoadaptatives de quinze représentants des trois grands modes de vies des diatomées du microphytobenthos, (épépélon, épipsammon et tychoplancton). Certaines des espèces utilisées sont dominantes et/ou typiques des vasières étudiées lors de ce travail de thèse. *Navicula phyllepta*, retrouvée en abondance dans la plupart des vasières intertidales de la côté atlantique, de la Manche et de la Mer du Nord (Ribeiro et al., 2013), est dominante sur la vasière de Brouage de la baie de Marennes-Oléron et de l'Anse de l'Aiguillon. *Halammphora*

coffeaeformis, *Crapedostauros britannicus* et *Entomoneis paludosa* sont également présentes sur la vasière de Brouage dans des proportions différentes (Haubois *et al.*, 2005). *Plagiogrammopsis vanheurckii* est une espèce majoritaire de la baie de Bourgneuf (Méléder *et al.*, 2007), *H. coffeaeformis*, *C. britannicus*, *E. paludosa*, *Amphora* spp., *Biremis lucens* et *Brockmaniella brockmanii* y sont retrouvées. Un bon nombre de ces espèces (*B. lucens*, *C. closterium*, *E. paludosa*, *Opephora* sp., *P. vanheurckii*, *Planothidium delicatulum*) sont présentes dans les vasières intertidales de l'estuaire du Tage et de la Ria de Aveiro au Portugal (Ribeiro *et al.*, 2013).

L'hypothèse de départ était que : de par leur mode de vie immobile et leur habitat sableux, où la pénétration de la lumière est plus importante, l'épipsammon aurait une réponse photoprotectrice plus performante que l'épipélon qui évolue dans un habitat plus vaseux, où la pénétration de la lumière est moindre (sédiment plus cohésif), et qui, de par sa mobilité, est capable de se positionner dans le gradient de lumière vertical au sein du sédiment et ainsi d'échapper aux excès de lumière. Pour répondre à cette hypothèse, 15 espèces d'algues ont été cultivées à deux intensités lumineuses (faible, 20 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ et 'forte', 75 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). La seconde intensité a permis de forcer les cellules à synthétiser de manière constitutive le pigment photoprotecteur diatoxanthine (DT). Cette condition de lumière se rapproche le plus des conditions naturelles où ce pigment est toujours présent, même quand l'intensité lumineuse est modérée (cf Parties 3, 5B et 6). Ces espèces d'algues ont été exposées à des 'light curves' d'intensité lumineuse croissante afin de mesurer leur réponse photophysologique et en particulier leur photoprotection (en particulier NPQ et cycle des xanthophylles). Les mêmes expérimentations ont été réalisées sur des espèces de tychoplancton en les cultivant à faible lumière (20 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) en mode benthique ('batch culture') et en mode planctonique (airlifts bullés), de manière à tenir compte de leur mode de vie 'amphibie' : lors des émergences les cellules sont resuspendues dans une colonne turbide et en immersion, les cellules sédimentent avec les particules et sont enfouies dans le sédiment ; elles devraient donc être adaptées à une faible lumière.

Les données obtenues ont confirmées nos hypothèses de départ : l'épipsammon montre la plus forte photoprotection physiologique (fort NPQ), l'épipélon la plus faible; le tychoplancton possède également un faible NPQ. Les différences de NPQ observées sont maintenues quelle que soit l'acclimatation des cellules : faible/ forte lumière, benthique/planctonique pour le tychoplancton. Ces différences peuvent s'expliquer en grande partie par la synthèse plus ou

moins importante des pigments xanthophylles photoprotecteurs (paramètres DD+DT, DT et DES). Il semble donc exister un compromis entre la réponse comportementale (mobilité) et la réponse physiologique des diatomées benthiques à leur environnement lumineux, ce qui confirme les quelques travaux réalisés précédemment sur des communautés naturelles (Carataxana et al., 2011) :

1) l'épipélon possède une réponse comportementale forte et une réponse physiologique moins performante (bien que celle-ci peut être modulée en fonction des conditions environnementales, voir Partie 5_B)

2) c'est l'inverse pour l'épipsammon qui est immobile et vit attaché aux particules de sédiment avec cependant la situation particulière des espèces épipsammiques mobiles qui peuvent moduler leur environnement lumineux en se mouvant dans les anfractuosités des grains de sable : leur réponse comportementale existe mais elle est moins performante que celle de l'épipélon, ainsi l'épipsammon mobile possède une photoprotection physiologique que se situe entre celle de l'épipélon et de l'épipsammon immobile.

3) le tychoplancton montre une photoprotection physiologique faible en mode de croissance benthique et planctonique, ceci est corrélé avec leur adaptation à un environnement lumineux de faible intensité dans la colonne d'eau turbide des vasières intertidales et quand elles sont enfouies dans le sédiment, les cellules étant relativement immobiles (cf Partie 5A).

Il est également possible de conclure que le degré de la photoprotection physiologique n'est pas déterminé par les relations phylogéniques des espèces. En effet, bien que la très grande majorité des diatomées benthiques soient des formes pennées raphidées (cf Partie 1B), elles ont adopté une capacité de photoprotection physiologique qui correspond avant tout à leur mode de vie puisque l'on retrouve des diatomées pennées raphidées épipéliques, épipsammiques et tychoplanctoniques. L'exemple le plus frappant est celui de l'espèce épipsammique *B. lucens* qui, parce qu'elle est une forme coloniale est dépourvue de mobilité et possède le degré de photoprotection physiologique de l'épipsammon immobile (formes araphidées), bien que sa morphologie soit plus proche de l'épipsammon mobile et de l'épipélon (formes raphidées).

Ainsi, le micro-habitat des vasières intertidales (cohésion du sédiment) détermine la co-existence de différentes formes de vie de diatomées benthiques via leur réponse

(physiologique mais aussi comportementale, voir aussi les Parties 3 et 5) à leur environnement lumineux qui lui-même dépend de la cohésion des sédiments (pénétration de la lumière). Il semble donc important de tenir compte de la diversité fonctionnelle du microphytobenthos dans l'évaluation de la dynamique spatiale (différence de micro-habitats sur une même vase ou entre vases) et temporelle (régime lumineux différent au cours d'une émergence, entre saisons) de la productivité photosynthétique du microphytobenthos.

I. Introduction

Functional trait-based approaches are increasingly adopted to explain and understand the distribution and diversity of phytoplankton communities (Litchman et Klausmeier, 2008, Barton *et al.*, 2013, Edwards *et al.*, 2013). Various morphological and physiological traits have been shown to define the ecological niches of phytoplankton species, including size, temperature response and resource acquisition and utilization traits. For example, in planktonic diatoms, which play a key role in marine primary production and biogeochemical cycling (Armbrust, 2009), pronounced species-specific differences in photosynthetic architecture and photophysiological strategies have been documented (e.g. (Dimier *et al.*, 2007, Key *et al.*, 2010, Schwaderer *et al.*, 2011, Wu *et al.*, 2012) and related to their *in situ* light environment (Strzepek et Harrison, 2004, Lavaud, 2007, Dimier *et al.*, 2009, Petrou *et al.*, 2011). A high capacity for physiological photoprotection is generally observed in highly fluctuating light climates and/or under on average high irradiances. This suggests that photoprotective capacity is an adaptive trait that shapes the distribution of planktonic diatoms in the environment (Lavaud, 2007, Dimier *et al.*, 2009, Bailleul *et al.*, 2010, Petrou *et al.*, 2011, Lavaud et Lepetit, 2013). Benthic marine environments, and especially intertidal environments, are characterized by even more changeable and extreme light climates resulting from the interplay of weather conditions, tides, water column turbidity and sediment composition (and hence light penetration) (Admiraal, 1984, Underwood et Kromkamp, 1999, Paterson et Hagerthey, 2001). Nevertheless, intertidal sediments rank amongst the most productive ecosystems on Earth, largely owing to the primary production of highly diverse assemblages of benthic diatoms (Underwood et Kromkamp, 1999). To date however, little is known about the role of functional traits, and especially photophysiological traits, in shaping the structure, dynamics and function of benthic diatom assemblages. In most studies, functional groups are defined on the basis of morphological growth form (e.g. (Gottschalk et Kahlert, 2012, Larson et Passy, 2012) and not physiological traits. In addition, photoprotective ability and its relationship with ecology has mainly been studied in natural communities (Jesus *et al.*, 2009, van Leeuwe *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011).

In temperate seas, intertidal benthic communities are largely dominated by diatoms (Méléder *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2013), which display a high degree of taxonomic, phylogenetic and functional diversity (Kooistra *et al.*, 2007). Several growth forms can be distinguished, which mainly differ in their attachment mode and degree of motility (Ribeiro *et al.*, 2013) for a detailed description): (1) the epipelon (EPL) comprises larger (usually $> 10 \mu\text{m}$) motile diatoms which can move freely in between sediment particles and typically form biofilms (cf. (Herlory *et al.*, 2004); (2) the epipsammon (EPS) groups smaller (usually $< 10 \mu\text{m}$) diatoms which live in close association with individual sand grains; and (3) the tycho plankton (TYCHO), which is an ill-defined and rather enigmatic group of largely non-motile diatoms which presumably have an amphibious life style (both sediment and water column) (e.g. (Sabbe *et al.*, 2010)). Within the epipsammic group, non-motile (EPS-NM) species are firmly attached (either stalked or adnate) to sand particles, while motile forms (EPS-M) can move within the sphere of individual sand grains. From a phylogenetic perspective, motile forms (i.e. all EPL and EPS-M) exclusively belong to the pennate raphid clade (Kooistra *et al.*, 2007), possessing a raphe allowing motility. Most EPS-NM belongs to the pennate araphid lineage, but also includes some raphid pennates, such as *Biremis lucens*, which firmly attaches to sand grains (Sabbe *et al.*, 1995). TYCHO includes both centric and pennate raphid forms. Intertidal benthic diatom species, but also growth forms, show distinct distribution patterns in time and space, suggesting pronounced (micro)niche differentiation (Sabbe, 1993, Méléder *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2013). For example, EPS dominates non-cohesive sandy sediments (Méléder *et al.*, 2007), while EPL dominates cohesive muddy sediments (Haubois *et al.*, 2005). EPL typically display vertical ‘micromigration’ in the sediment following endogenous tidal/dial rhythms and environmental stimuli (Saburova et Polikarpov, 2003, Conalvey *et al.*, 2004b, Coelho *et al.*, 2011): during daylight emersion, they migrate to the sediment surface, while during immersion they migrate to deeper sediment layers.

To prevent photoinhibition (Serôdio *et al.*, 2008), benthic diatoms utilize behavioural and physiological responses (Mouget *et al.*, 2008, van Leeuwe *et al.*, 2009, Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011, Serôdio *et al.*, 2012). Behavioural photoprotection involves motility, allowing cells to position themselves in light gradients and escape from prolonged exposure to excess light (Admiraal, 1984, Kromkamp *et al.*, 1998, Conalvey *et al.*, 2004b, Serôdio *et al.*, 2006b). In addition, both motile and non-motile species employ fast regulatory physiological processes for photoprotection (i.e. ‘physiological photoprotection’; (Lavaud *et al.*, 2007, Goss et Jakob, 2010, Depauw *et al.*, 2012, Lepetit *et al.*, 2012). In diatoms, two processes are

important in field situations (Lavaud *et al.*, 2007): photosystem II cyclic electron transfer (PSII CET) and non-photochemical quenching of chlorophyll (Chl) fluorescence (NPQ) (Depauw *et al.*, 2012, Lepetit *et al.*, 2012, Lavaud et Lepetit, 2013). NPQ is controlled by several regulatory partners including the light-dependent conversion of diadinoxanthin (DD) to diatoxanthin (DT) by the DD de-epoxidase (i.e. the ‘xanthophyll cycle’, XC) (Brunet et Lavaud, 2010, Goss et Jakob, 2010). In benthic diatoms however, XC-NPQ has only rarely been studied, and mostly *in situ*: it has been shown to vary with diurnal and tidal cycles, season, latitude (Serôdio *et al.*, 2005a, van Leeuwe *et al.*, 2009, Chevalier *et al.*, 2010), and to the organisms’ position within the sediments and along the intertidal elevation gradient (Jesus *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011).

Our study represents a comprehensive characterization of fast regulatory physiological photoprotection capacity in typical representatives of the major diatom growth forms occurring in intertidal marine sediments. Given the highly dynamic and often extreme intertidal light climate, we hypothesize that photoprotective features are key traits shaping niche differentiation between benthic growth forms, as has been proposed before for phytoplankton (Huisman *et al.*, 2001, Litchman et Klausmeier, 2008, Dimier *et al.*, 2009, Petrou *et al.*, 2011, Lavaud et Lepetit, 2013). In this respect, we predict that the largely immotile epipsammic life forms are better able to cope with pronounced and rapid changes in light intensity at the physiological level than the motile epipelagic forms which can actively position themselves in the sediment light gradient.

II. Materials and methods

Diatom culturing and harvesting

Fifteen benthic diatom strains were used (Table 1). All species were assigned to their respective growth form on the basis of microscopical observations on natural assemblages. They were grown in batch cultures at 20°C in sterile artificial F/2 seawater medium enriched with NaHCO₃ (80 mg L⁻¹ final concentration). TYCHO species were also grown in continuously flushed airlift (i.e. with air bubbling) to mimic ‘planktonic’ growth conditions.

Two light intensities (E, 20 and 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were used with a 16 h light:8 h dark photoperiod white fluorescent tubes, L58W/840, OSRAM, Germany. Cultures were photoacclimated to the above conditions at least 2 weeks before measurements and experiments (see below). Diatom suspensions for the experiments were prepared to a final concentration of 10 mg Chl *a* mL^{-1} and continuously stirred at 20°C under the growth E (i.e. 20 or 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) during the course of the experiments (Lavaud, 2007).

Table 1: List of the fifteen diatom species used in this study with their growth form classification, collection number, origin and average biovolume. Abbreviations: NCC, Nantes Culture Collection-France ; UTCC, University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria-Canada (now the Canadian Phycological Culture Collection-CPCC); CCY, Culture Collection Yerseke-The Netherlands; DCG: BCCM (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms) Diatom Culture Collection hosted by Laboratory for Protistology & Aquatic Ecology, Ghent University, Belgium.

Species	Growth form		Collection n°	Sampling place	Average biovolume	
<i>Craspedostauros britannicus</i> C.b.	Epipelon (EPL)		NCC195-06-2	Pouliguen, Atlantic, France	1740	
<i>Entomoneis paludosa</i> E.p.			NCC18-1	Bay of Bourgneuf, Atlantic, France	1081	
<i>Halamphora coffeaeformis</i> H.c.			UTCC58	Victoria, British Columbia, Pacific, Canada	126	
<i>Navicula phyllepta</i> N.p.			CCY9804	Westerschelde estuary, North sea, The Netherlands	218	
<i>Seminavis robusta</i> S.r.			DCG 0105	Progeny of strains from Veerse Meer, The Netherlands	1790	
<i>Amphora</i> sp. A. sp.	Epipsammon (EPS)	motile (EPS-M)	DCG 0493	Rammekenshoek, North sea, The Netherlands	39	
<i>Nitzschia</i> cf. <i>frustulum</i> N.f.			DCG 0494	Rammekenshoek, North Sea, The Netherlands	29	
<i>Planothidium delicatulum</i> P.d.			NCC363	Bay of Bourgneuf, Atlantic, France	242	
<i>Biremis lucens</i> B.l.		non-motile (EPS-NM)	NCC360.2	Bay of Bourgneuf, Atlantic, France	242	
<i>Fragilaria</i> cf. <i>subsalina</i> F.s.			DCG 0492	Rammekenshoek, North sea, The Netherlands	165	
<i>Opephora</i> sp. O. sp.			DCG 0448	Rammekenshoek, North Sea, The Netherlands	86	
<i>Plagiogramma staurophorum</i> P. s.			DCG 0495	Rammekenshoek, North sea, The Netherlands	2331	
<i>Brockmanniella brockmannii</i> B.b.		Tychoplankton (TYCHO)		NCC161	Bay of Bourgneuf, Atlantic, France	105
<i>Cylindrotheca closterium</i> C.c.				Collection Univ. Aveiro	Ria de Aveiro, Atlantic, Portugal	247
<i>Plagiogrammopsis vanheurckii</i> P.v.	NCC186-2			Bay of Bourgneuf, Atlantic, France	737	

Growth rates and biovolumes

Specific growth rates, μ (d^{-1}), were calculated from regression of the natural logarithm of the number of diatom cells during their exponential growth phase as microscopically determined in a Malassez's counting chamber. Biovolumes (μm^3) were calculated using the formula of (Hillebrand *et al.*, 1999) based on measurements performed on fifteen specimens per species.

Pigment analyses

Chlorophyll *a* (Chl *a*) concentration was determined according to the (Jeffrey et Humphrey, 1975) spectrophotometric method. Contents of Chlorophyll *c* (Chl *c*), Fucoxanthin (Fx), DD, DT and β -carotene (β -car), all normalized to Chl *a* (i.e. expressed as mol. 100 mol Chl *a*⁻¹) were measured by HPLC (Hitachi, Japan) (Jakob *et al.*, 1999, Lepetit *et al.*, 2013). 1 mL of diatom suspension was filtered (AP20 Millipore, Ireland) and frozen in liquid nitrogen before extraction in a mixture of 90% methanol/0.2 M ammonium acetate (90/10 vol/vol) and 10% ethyl acetate. The de-epoxidation state (DES in %) was calculated as $[(DT / DD + DT) \times 100]$, where DD is the epoxidized form and DT is the de-epoxidized form.

Chl fluorescence yield and light curves

For a complete overview of the definition and measurement of the photophysiological parameters, see Table 5

. Chl fluorescence yield was monitored with a Diving-PAM fluorometer (Walz, Germany) on a 2.5 mL stirred and 20°C controlled diatom suspension (Lavaud *et al.*, 2004). Before measurement, the cells were dark-adapted for 15 min, and a saturating pulse (3600 μmol photons $m^{-2} s^{-1}$, duration 0.4 ms) was fired to measure F_0 , F_m and F_v/F_m . Two types of light curves were performed: Non Sequential and Rapid Light Curves (NSLCs and RLCs) (Perkins *et al.*, 2010b). For NSLCs, continuous light (KL-2500 lamp, Schott, Germany) was applied for 5 min at different E_s (see Table S1; 48-1950 μmol photons. $m^{-2}.s^{-1}$); a new diatom suspension was used for each E . At the end of each exposure, F_m' and NPQ were measured. For RLCs, one diatom suspension was exposed to 8 successive, incrementally increasing E_s (29-1042 μmol photons. $m^{-2}.s^{-1}$) of 30 s each (Perkins *et al.*, 2006) (Table S1). RLCs allow constructing rETR vs. E and NPQ vs. E curves. From the fitted rETR- E curves (Eilers et Peeters, 1988) and NPQ- E curves (Serôdio et Lavaud, 2011), $rETR_m$, α , E_k , and NPQ_m , E_{50NPQ} , n_{NPQ} can be derived, respectively. The same fitting procedure can be used for the DT-

E and the DES-E curves, thereby extracting analogous parameters as from the fitted NPQ-E curves.

Table 2 : Photophysiological parameters used in this study, their photophysiological meaning and measurement method and conditions. Abbreviations: Chl, chlorophyll; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; E, light intensity; NSLCs, Non-Sequential Light Curves; PSII, photosystem II; RLCs, Rapid Light Curves. See the Materials and Methods section for further details.

Parameter	Unit	Definition	Photophysiological meaning	Measurement conditions
F_0	No units	Minimum PSII Chl fluorescence yield	Used to calculate F_v/F_m (see below)	Measured with NSLCs after 15 min of dark acclimation
F_m	No units	Maximum PSII Chl fluorescence yield	Used to calculate F_v/F_m and NPQ (see below)	Measured with NSLCs during a saturating pulse after 15 min of dark acclimation
F_v/F_m	No units	Maximum photosynthetic efficiency of PSII; $F_v = F_m - F_0$	Maximum quantum efficiency of PSII photochemistry	See the above measurement conditions for F_0 and F_m
F_m'	No units	F_m for illuminated cells	Used to measure NPQ and rETR	Measured with NSLCs during a saturating pulse after 5 min of illumination at specific E
NPQ	No units	Non-photochemical quenching of Chl fluorescence; $NPQ = F_m / F_m' - 1$	Estimates the photoprotective dissipation of excess energy	Measured with NSLCs
rETR	$\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Relative electron transport rate of PSII; $rETR = \Phi_{PSII} \times E$ where $\Phi_{PSII} = F_m' - F / F_m'$	Effective quantum yield of photochemistry vs. E	Measured with RLCs; F is the steady-state of Chl fluorescence measured after 30 s illumination at a given E)
α	Relative units	rETR-E curve initial slope	Maximum light efficiency use	Derived from fitted rETR-E curves measured with RLCs (Eilers and Peeters, 1988)
rETR _m	$\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	rETR-E curve asymptote	Maximum relative photosynthetic electron transport rate	Derived from fitted rETR-E curves measured with RLCs (Eilers and Peeters, 1988)
E_k	$\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$E_k = rETR_m / \alpha$	Light saturation coefficient	Derived from fitted rETR-E curves measured with RLCs (Eilers and Peeters, 1988)
NPQ _m	No units	NPQ-E curve asymptote	Maximum NPQ	Measured with NSLCs
$E_{50_{NPQ}}$	$\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	E for reaching 50% of NPQ _m	Pattern of NPQ induction vs. E	Derived from fitted NPQ-E curves (Serôdio and Lavaud, 2011) measured with NSLCs
n_{NPQ}	No units	NPQ-E curve sigmoidicity coefficient	Onset of NPQ induction for moderate Es (< $E_{50_{NPQ}}$)	Derived from fitted NPQ-E curves (Serôdio and Lavaud, 2011) measured with NSLCs
DT _m	$\text{mol. 100 mol Chl } a^{-1}$	DT-E curve asymptote	Maximum DT concentration	Measured with NSLCs
$E_{50_{DT}}$	$\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	E for reaching 50% of DT _{max}	Pattern of DT synthesis vs. E	Derived from fitted DT-E curves (Serôdio and Lavaud, 2011) measured with NSLCs
n_{DT}	No units	DT-E curve sigmoidicity coefficient	Onset of DT synthesis for moderate Es (< $E_{50_{NPQ}}$)	Derived from fitted DT-E curves (Serôdio and Lavaud, 2011) measured with NSLCs
DES _m	%	DES-E curve asymptote; $DES = [DT / (DD+DT) \times 100]$	Maximum de-epoxidation state	Measured with NSLCs
NPQ / DT	No units	NPQ-DT curve slope	Effective involvement of DT in NPQ for all Es (Lavaud et Lepetit, 2013)	Measured with NSLCs

Table S1 : Light intensity (E in $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) provided by the internal halogen lamp of the Diving-PAM as measured by a quantameter Li-250A (Li-Cor, Biosciences, USA) immediately and 30 s after the onset of light, respectively. The light measurement was performed at 1.5 cm from the optic guide which corresponded to the centre of the 2.5 mL algal suspension in the DW2/2 O₂ electrode vial (see the Materials and methods section). The decrease of E during the 30 s illumination is unavoidable and is due to the heating of the halogen lamp of the Diving-PAM. E values measured after 30 s were preferred in order to optimize the building of relative electron transport rate (rETR) vs. E curves

Diving-PAM light steps	Instantaneous E	E after 30 s illumination
1	5	5
2	15	15.5
3	31	29
4	55	52
5	81	76
6	111	105
7	164	152
8	222	208
9	333	310
10	478	445
11	698	649
12	1117	1042

O₂ yield and the PSII CET

The relative O₂ yield produced during a sequence of single-turnover saturating flashes at a frequency of 2 Hz was measured with a home-made rate electrode (Lavaud *et al.*, 2002b). The steady-state O₂ yield per flash (Y_{SS}) was attained for the last 4 flashes of a sequence of 20 when the S-state cycle oscillations were fully damped (Lavaud *et al.*, 2002b). Y_{SS} of 15 min dark-adapted (**D**) and illuminated (**L**, samples taken at the end of each NSLC) cells was used to calculate the PSII CET (Lavaud *et al.*, 2002b, Lavaud, 2007) as follows: $\{[(20 \times Y_{SS L}) - (\sum (Y_{1...20} L))] - [(20 \times Y_{SS D}) - (\sum (Y_{1...20} D))]\} / Y_{SS D}$.

Statistics

Statistical analyses were conducted using the statistical software package SAS 9.3. Species were compared using the general linear model PROC GLM. Growth forms (groups) were compared using the mixed linear model PROC MIXED. Groups were regarded as fixed effects. Data were log- or square root-transformed when needed to allow the best possible fit. Where necessary, estimated least squares means (lsmeans) and standard errors (SE) were back-transformed as in (Jørgensen et Pedersen, 1998).

III. Results

Growth rate and photosynthetic properties

Growth rate did not differ significantly between the growth forms (Table 3, Table S2). Relative concentrations of the light-harvesting pigments Chl *c* and Fx were comparable among growth forms. β -car, which is mainly associated with the photosystem cores, was only slightly but significantly higher in EPL than in EPS-NM. DD+DT content was significantly lower in EPL than in the other growth forms. Because the cells were grown at low E (20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), DES was generally low, with no significant differences between the growth forms. The highest DD+DT and DES ($16.4 \pm 6.2 \%$) values were observed in *Plagiogramma staurophorum* (EPS-NM). There were no significant differences in F_v/F_m , α , $rETR_m$, E_k and PSII CET_{max} between the growth forms. E_k was on average 3 to 4 times the growth E in all growth forms. PSII CET_m was close to 3 (its maximum, Lavaud *et al.*, 2002) for the two EPS growth forms, and about 2 in EPL and TYCHO.

Table 3 : Growth rate, pigment content and photosynthetic properties of the four growth forms of benthic diatoms. All parameters were measured on cells in exponential growth phase sampled 2 h after the onset of light. Growth conditions were 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h light:8 h dark, 20°C. Abbreviations: EPL, epipelon; EPS-M, motile epipsammon; EPS-NM, non-motile epipsammon; TYCHO, tychoplankton. μ , growth rate (day⁻¹); pigments are expressed in mol 100 mol. Chl a-1: Chl, chlorophyll; Fx, fucoxanthin; β -car, β -carotene; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin. Definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in Table 5. The values for the individual species can be found in Table S2. Values are least squares means estimates and estimated standard errors (PROC MIXED procedure) Table S3.

Growth Form	Pigments						Photosynthetic parameters				
	μ	Chl c	Fx	β -car	DD+DT	DES	F_v/F_m	α	rETR _m	E _k	PSII CET _m
EPL	1.66 ± 0.12	18.91 ± 3.05	65.99 ± 7.90	3.91 ± 0.39	6.39 ± 0.61	0.75 ± 0.93	0.72 ± 0.01	0.68 ± 0.03	52.41 ± 5.90	78.93 ± 9.79	2.09 ± 0.23
EPS-M	1.56 ± 0.14	16.05 ± 3.34	64.29 ± 10.21	2.76 ± 0.43	10.34 ± 1.17	4.25 ± 1.79	0.68 ± 0.02	0.65 ± 0.04	51.50 ± 7.36	80.41 ± 12.89	2.86 ± 0.33
EPS-NM	1.45 ± 0.12	20.12 ± 3.63	70.52 ± 8.83	2.11 ± 0.43	11.52 ± 1.13	2.30 ± 1.33	0.67 ± 0.02	0.63 ± 0.04	39.20 ± 4.88	61.01 ± 8.52	2.82 ± 0.23
TYCHO	1.61 ± 0.14	24.81 ± 5.17	79.36 ± 10.12	3.04 ± 0.51	9.25 ± 1.09	4.29 ± 1.83	0.73 ± 0.02	0.71 ± 0.04	58.32 ± 8.44	82.79 ± 13.40	2.03 ± 0.26

Table S2 : Growth rate, pigment content and photosynthetic parameters of the fifteen diatom species. All parameters were measured on cells in exponential growth phase sampled 2 h after the onset of light. Growth conditions were 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 16 h light:8 h dark, 20°C. μ , growth rate (day⁻¹); pigments are expressed in mol 100 mol. Chl a-1: Chl, chlorophyll; Fx, fucoxanthin; β -car, β -carotene; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; DES: de-epoxidation state of DD into DT (in %); n.d.: not determined. The full names of the species are listed in Table 1. Abbreviations, definitions and conditions of measurement of the photosynthetic parameters are listed in Table 5. Values are averages per species \pm standard deviation

Species	Growth form	μ	Pigments					Photosynthetic parameters				
			Chl c	Fx	β -car	DD+DT	DES	Fv/Fm	α	rETRm	Ek	PSII CETm
C.b.	EPL	1.62 ± 0.12	24.58 ± 0.90	68.68 ± 1.96	4.55 ± 0.12	5.98 ± 1.78	0.98 ± 0.11	0.74 ± 0.00	0.70 ± 0.05	86.35 ± 6.02	128.28 ± 21.39	n.d.
E.p.		1.71 ± 0.02	19.13 ± 0.08	72.92 ± 1.81	3.57 ± 0.21	5.66 ± 0.46	0.70 ± 0.99	0.73 ± 0.01	0.73 ± 0.03	31.92 ± 1.85	44.36 ± 3.54	2.48 ± 0.51
H.c.		2.05 ± 0.02	15.29 ± 0.63	60.96 ± 3.77	3.68 ± 0.01	7.76 ± 1.42	2.87 ± 1.55	0.69 ± 0.04	0.67 ± 0.07	42.26 ± 6.54	63.71 ± 10.20	2.32 ± 0.59
N.p.		1.33 ± 0.21	15.99 ± 1.22	56.89 ± 2.02	4.31 ± 0.53	7.53 ± 0.78	0.00 ± 0.00	0.71 ± 0.03	0.61 ± 0.09	53.72 ± 11.12	86.04 ± 17.92	2.01 ± 0.57
S.r.		1.77 ± 0.13	21.18 ± 2.13	70.52 ± 4.73	3.54 ± 1.23	5.78 ± 2.12	1.19 ± 0.33	0.72 ± 0.02	0.69 ± 0.06	63.09 ± 10.87	98.77 ± 6.36	1.60 ± 0.37
A. sp.		1.38 ± 0.15	11.87 ± 0.21	50.30 ± 2.46	3.09 ± 1.05	10.01 ± 1.41	4.52 ± 2.20	0.70 ± 0.02	0.67 ± 0.02	51.27 ± 3.73	75.32 ± 3.53	3.24 ± 0.81
N.f.		1.37 ± 0.02	17.53 ± 0.32	64.02 ± 2.40	2.98 ± 0.46	11.06 ± 0.90	8.66 ± 1.72	0.69 ± 0.01	0.69 ± 0.12	62.30 ± 3.77	92.31 ± 14.16	n.d.
P.d.		1.98 ± 0.20	19.98 ± 2.22	78.64 ± 0.10	2.22 ± 1.23	10.32 ± 1.75	2.56 ± 3.13	0.66 ± 0.01	0.58 ± 0.06	43.16 ± 3.72	76.41 ± 11.26	2.48 ± 0.25
B.l.		1.30 ± 0.07	15.13 ± 0.37	56.83 ± 0.43	1.26 ± 0.12	8.88 ± 0.96	1.77 ± 1.57	0.72 ± 0.01	0.74 ± 0.07	34.29 ± 3.72	46.53 ± 2.06	2.85 ± 0.11
F.s.		1.43 ± 0.11	24.49 ± 2.39	74.16 ± 3.75	1.70 ± 0.48	13.01 ± 5.23	0.91 ± 1.31	0.70 ± 0.01	0.58 ± 0.03	45.35 ± 11.79	82.08 ± 20.41	2.54 ± 0.30
O. sp.	1.65 ± 0.06	10.43 ± 0.85	41.82 ± 1.78	3.62 ± 0.48	9.81 ± 0.66	0.68 ± 0.96	0.71 ± 0.01	0.71 ± 0.05	37.22 ± 2.64	54.11 ± 5.29	3.59 ± 0.27	
P. s.	1.43 ± 0.02	42.95 ± 4.24	109.54 ± 4.51	1.70 ± 0.48	16.95 ± 2.58	16.41 ± 6.23	0.59 ± 0.09	0.51 ± 0.05	44.12 ± 14.84	71.44 ± 21.20	2.29 ± 0.47	
B.b.	TYCHO	1.92 ± 0.08	25.63 ± 0.95	86.37 ± 4.82	2.59 ± 0.28	11.23 ± 0.58	9.56 ± 1.31	0.69 ± 0.04	0.70 ± 0.08	44.82 ± 2.36	67.77 ± 5.38	2.08 ± 0.38
C.c.		1.53 ± 0.26	23.82 ± 0.22	64.98 ± 0.54	4.50 ± 0.34	7.10 ± 0.73	2.62 ± 4.54	0.77 ± 0.01	0.74 ± 0.02	68.41 ± 3.36	92.87 ± 7.35	1.66 ± 0.33
P.v.		1.45 ± 0.02	25.04 ± 0.99	86.76 ± 3.48	1.93 ± 0.34	11.04 ± 3.71	5.37 ± 1.19	0.73 ± 0.01	0.67 ± 0.02	62.95 ± 9.58	90.59 ± 10.71	2.36 ± 0.22

Table S3 : Results of the PROC MIXED procedure for the comparison of the parameters of Table 3 between the different growth forms. Red: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; light green: $p < 0.01$; dark green: $p < 0.001$. Abbreviations: EPL, epipelon; EPS-M, motile epipsammon; EPS-NM, non-motile epipsammon; TYCHO, tychoplankton; μ , growth rate (day⁻¹); Chl, chlorophyll; Fx, fucoxanthin; β -car, β -carotene; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin. Abbreviations, definitions and conditions of measurement of the photosynthetic parameters are listed in Table 5

	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO		EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO		EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
μ					F_v/F_m					DES				
EPL		Red	Red	Red	EPL		Red	Red	Red	EPL		Red	Red	Red
EPS-M	Red		Red	Red	EPS-M	Red		Red	Red	EPS-M	Red		Red	Red
EPS-NM	Red	Red		Red	EPS-NM	Red	Red		Red	EPS-NM	Red	Red		Red
TYCHO	Red	Red	Red		TYCHO	Red	Red	Red		TYCHO	Red	Red	Red	
Chl c					α									
EPL		Red	Red	Red	EPL		Red	Red	Red					
EPS-M	Red		Red	Red	EPS-M	Red		Red	Red					
EPS-NM	Red	Red		Red	EPS-NM	Red	Red		Red					
TYCHO	Red	Red	Red		TYCHO	Red	Red	Red						
Fx					rETR_m									
EPL		Red	Red	Red	EPL		Red	Red	Red					
EPS-M	Red		Red	Red	EPS-M	Red		Red	Red					
EPS-NM	Red	Red		Red	EPS-NM	Red	Red		Red					
TYCHO	Red	Red	Red		TYCHO	Red	Red	Red						
β-car					E_k									
EPL		Red	Red	Red	EPL		Red	Red	Red					
EPS-M	Red		Red	Red	EPS-M	Red		Red	Red					
EPS-NM	Red	Red		Red	EPS-NM	Red	Red		Red					
TYCHO	Red	Red	Red		TYCHO	Red	Red	Red						
DD+DT					PSII CET_m									
EPL		Light Green	Light Green	Light Green	EPL		Red	Red	Red					
EPS-M	Light Green		Red	Red	EPS-M	Red		Red	Red					
EPS-NM	Light Green	Red		Red	EPS-NM	Red	Red		Red					
TYCHO	Light Green	Red	Red		TYCHO	Red	Red	Red						

NPQ properties

At E values ≥ 230 and $\geq 1050 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ respectively, NPQ was significantly higher in EPS-NM and EPS-M than in both EPL and TYCHO). NPQ was also significantly higher in EPS-NM than in EPS-M except at the lowest and highest E values. Likewise, NPQ_m was significantly higher (x 3.5 and x 2.4, respectively) in EPS-NM and EPS-M than in EPL and TYCHO. In EPL and TYCHO, the NPQ-E curves showed a lower variability than in the two EPS growth forms (Figure 45 and Figure S1). $E50_{\text{NPQ}}$ was significantly higher in EPS-M than in EPS-NM). In contrast, n_{NPQ} was not significantly different and close to its optimum (i.e. 2,(Serôdio et Lavaud, 2011) in most species).

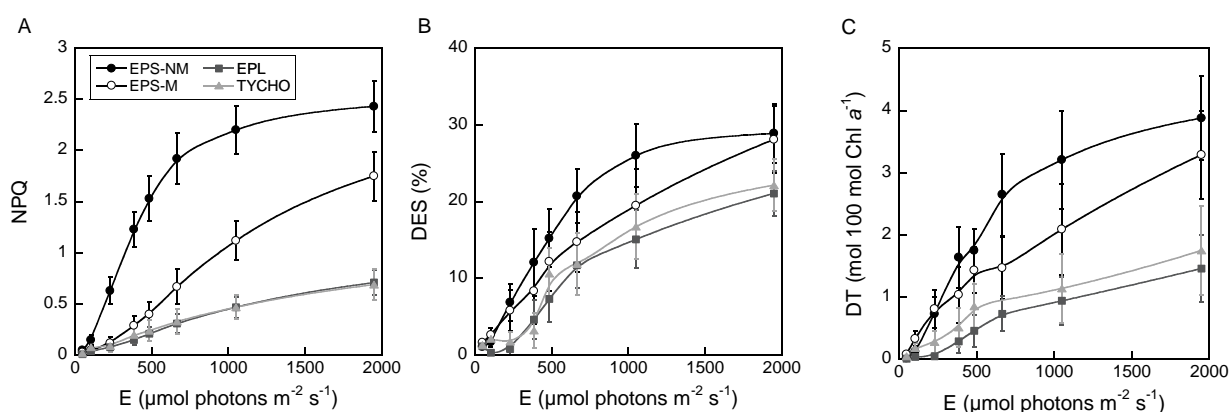


Figure 45 : Non-photochemical quenching of Chl fluorescence (NPQ) (A), de-epoxidation state of the diadinoxanthin (DD) to diatoxanthin (DT) [DES = DT / (DD + DT) x 100] (B), and DT content (C) as a function of light intensity (E from darkness to 1950 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ which is equivalent to full sunlight in the field) measured during Non-Sequential Light Curves (NSLCs) in the four benthic diatom growth forms (EPS-NM, epipsammon non-motile, EPS-M, epipsammon motile; EPL, epipelon; TYCHO, thychoplankton). Cells were grown at 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The NPQ-E curves for the individual species can be found in Figure S1. Values are estimated least squares means \pm estimated standard errors (PROC MIXED procedure).

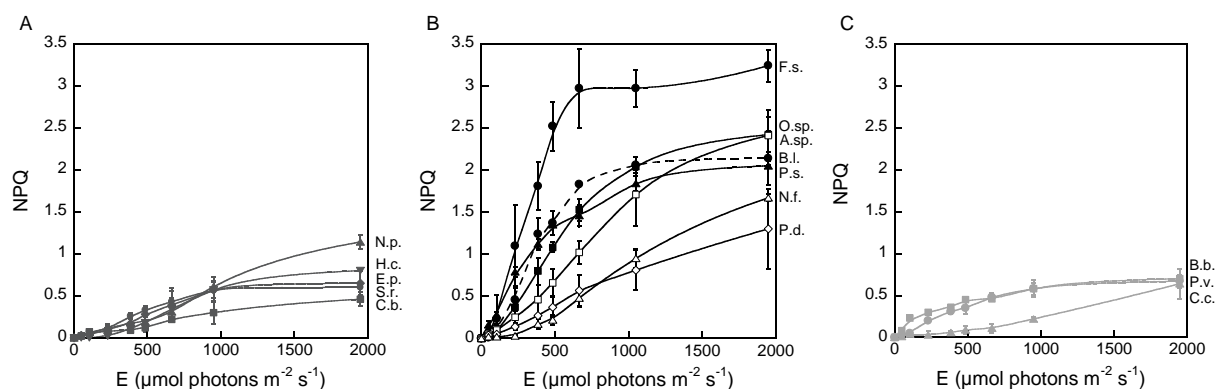


Figure S1 : Non-photochemical quenching of Chl fluorescence (NPQ) as a function of light intensity (E from darkness to $1950 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ which is equivalent to full sunlight in the field) measured during Non-Sequential Light Curves (NSLCs) in the five species of epipelton (EPL) (A), the seven species of motile epipsammon (EPS-M, open symbols) (B) and non-motile epipsammon (EPS-NM, closed symbols), and in the three species of tychoplankton (TYCHO) (C). Cells were grown at $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The full names and functional classification of all species are listed in Erreur ! Source du renvoi introuvable.. Values are averages \pm standard deviation.

Table S4 : Results of the PROC MIXED procedure for the comparison of the non-photochemical quenching (NPQ) values at different light intensities (cf. Figure 45) between the different growth forms. Red: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; light green: $p < 0.01$; dark green: $p < 0.001$. Abbreviations: EPL, epipelton; EPS-M, motile epipsammon; EPS-NM, non-motile epipsammon; TYCHO, tychoplankton; E , light intensity (in $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$).

E	EPL vs. TYCHO	EPL vs. EPS-M	EPL vs. EPS-NM	EPS-M vs. EPS-NM	EPS-M vs. TYCHO	EPS-NM vs. TYCHO
48	Red	Red	Red	Red	Red	Red
105	Red	Red	Red	Red	Red	Red
230	Red	Red	Dark Green	Light Green	Red	Light Green
385	Red	Red	Dark Green	Dark Green	Red	Dark Green
485	Red	Red	Dark Green	Light Green	Red	Dark Green
665	Red	Light Green	Dark Green	Light Green	Red	Dark Green
1050	Red	Light Green	Dark Green	Light Green	Orange	Dark Green
1950	Red	Light Green	Dark Green	Red	Light Green	Dark Green

Table 4 : Non-photochemical quenching (NPQ) and xanthophyll cycle (XC) properties of the four growth forms of benthic diatoms. Abbreviations: EPL, epipelon; EPS-M, motile epipsammon; EPS-NM, non-motile epipsammon; TYCHO, tychoplankton. Definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in Table 5. The values for the individual species can be found in Table S4. For some species/parameters, the fitting procedure yielded unsatisfactory results: these have been indicated as n.d. and were excluded from further statistical analyses. Values are least square mean estimates and estimated standard errors (PROC MIXED procedure).

Growth form	NPQ _m	E50 _{NPQ}	n _{NPQ}	DES _m	DT _m	E50 _{DT}	n _{DT}	NPQ/DT
EPL	0.69 ± 0.09	623.19 ± 135.35	1.91 ± 0.46	21.20 ± 3.38	1.34 ± 0.52	753.63 ± 98.67	2.42 ± 0.17	0.46 ± 0.10
EPS-M	1.71 ± 0.28	1106.45 ± 135.35	1.79 ± 0.44	28.68 ± 4.37	3.08 ± 1.36	776.00 ± 143.86	1.18 ± 0.27	0.52 ± 0.14
EPS-NM	2.41 ± 0.34	385.73 ± 94.23	2.45 ± 0.60	29.43 ± 3.79	3.45 ± 2.21	504.00 ± 101.73	2.36 ± 0.19	0.67 ± 0.16
TYCHO	0.66 ± 0.11	n.d.	1.01 ± 0.72	22.73 ± 4.39	1.78 ± 0.61	n.d.	1.43 ± 0.30	0.36 ± 0.10

Table S5 : Non-photochemical quenching (NPQ) and xanthophyll cycle (XC) properties of the fifteen diatom species. The full names of the species are found in Table 1. Definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in Table 5. For some species, the fitting procedure yielded unsatisfactory results: these have been indicated as n.d. and were excluded from further statistical analyses. Values represent averages per species \pm standard deviation.

Species	Growth form	NPQm	E50NPQ	nNPQ	DESm	DTm	E50DT	nDT	NPQ/DT
C.b.	EPL	0.46 \pm 0.08	n.d.	n.d.	16.57 \pm 3.51	1.12 \pm 0.16	528.00 \pm 127.18	2.63 \pm 0.81	0.33 \pm 0.07
E.p.		0.65 \pm 0.14	399.50 \pm 184.55	1.97 \pm 0.51	28.00 \pm 2.72	1.81 \pm 0.06	682.67 \pm 278.75	2.18 \pm 0.70	0.35 \pm 0.08
H.c.		0.80 \pm 0.16	821.33 \pm 222.83	2.88 \pm 0.52	19.48 \pm 1.34	1.56 \pm 0.33	974.00 \pm 93.98	2.80 \pm 0.45	0.47 \pm 0.11
N.p.		1.14 \pm 0.08	n.d.	1.30 \pm 0.29	28.88 \pm 2.14	2.05 \pm 0.06	796.60 \pm 236.56	2.20 \pm 0.40	0.60 \pm 0.22
S.r.		0.60 \pm 0.06	n.d.	n.d.	12.45 \pm 3.61	0.76 \pm 0.27	n.d.	n.d.	0.74 \pm 0.10
A.sp.	EPS-M	2.41 \pm 0.30	997.00 \pm 198.03	1.85 \pm 0.31	34.48 \pm 4.46	4.82 \pm 0.46	950.50 \pm 58.69	1.16 \pm 0.01	0.46 \pm 0.09
N.f.		1.67 \pm 0.04	1230.00 \pm 319.61	2.49 \pm 0.88	17.78 \pm 0.08	2.19 \pm 0.69	n.d.	n.d.	0.79 \pm 0.18
P.d.		1.30 \pm 0.48	n.d.	1.36 \pm 0.51	33.70 \pm 1.93	2.88 \pm 0.04	623.00 \pm 193.38	1.20 \pm 0.49	0.42 \pm 0.16
B.l.		2.14 \pm 0.32	348.67 \pm 41.04	2.56 \pm 0.27	35.25 \pm 0.86	3.71 \pm 0.23	313.50 \pm 79.90	1.99 \pm 0.63	0.67 \pm 0.03
F.s.	EPS-NM	3.24 \pm 0.19	297.50 \pm 98.29	2.80 \pm 0.78	23.36 \pm 1.61	2.90 \pm 0.74	790.33 \pm 198.90	2.23 \pm 0.70	1.09 \pm 0.47
O.sp.		2.42 \pm 0.21	598.67 \pm 48.23	2.13 \pm 0.23	20.54 \pm 2.69	1.97 \pm 0.21	412.33 \pm 45.00	2.77 \pm 0.48	1.07 \pm 0.17
P.s.		2.05 \pm 0.01	288.00 \pm 84.18	1.65 \pm 0.31	38.40 \pm 4.48	7.07 \pm 1.51	472.50 \pm 67.18	2.33 \pm 1.24	0.26 \pm 0.04
B.b.	TYCHO	0.70 \pm 0.03	n.d.	0.56 \pm 0.05	27.45 \pm 0.48	2.50 \pm 0.42	n.d.	n.d.	0.21 \pm 0.03
C.c.		0.64 \pm 0.18	n.d.	1.82 \pm 0.11	18.44 \pm 4.29	1.05 \pm 0.53	n.d.	1.60 \pm 1.05	0.62 \pm 0.62
P.v.		0.67 \pm 0.08	n.d.	n.d.	22.28 \pm 2.96	1.78 \pm 0.19	n.d.	1.27 \pm 0.47	0.37 \pm 0.02

Table S6 : Results of PROC MIXED procedure for the comparison of the parameters of Table 7 between the different growth forms. Red: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; light green: $p < 0.01$; dark green: $p < 0.001$; grey: not determined. Abbreviations: EPL, epipelon; EPS-M, motile epipsammon; EPS-NM, non-motile epipsammon; TYCHO, tychoplankton. Abbreviations, definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in. Species whose parameter values were not determined (see Table S4) were not included in the PROC MIXED analysis for that specific parameter.

NPQ _m	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO	E50 _{DT}	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
EPL		Dark Green	Dark Green	Dark Green	Red		Red	Red	Red
EPS-M	Dark Green		Red	Light Green	Red	Red		Red	
EPS-NM	Dark Green	Red		Dark Green	Red	Red			
TYCHO	Red	Light Green	Dark Green		Red	Red	Red	Red	
E50 _{NPO}	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO	n _{DT}	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
EPL		Red	Red		EPL		Dark Green	Red	Light Green
EPS-M	Red		Light Green		EPS-M	Dark Green		Light Green	Red
EPS-NM	Red	Light Green			EPS-NM	Red	Light Green		Orange
TYCHO					TYCHO	Light Green	Red	Orange	
n _{NPO}	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO	NPQ/DT	EPS-M	EPS-NM	TYCHO	
EPL		Red	Red	Red	EPL	Red	Red	Red	
EPS-M	Red		Red	Red	EPS-M	Red	Red	Red	
EPS-NM	Red	Red		Red	EPS-NM	Red		Red	
TYCHO	Red	Red	Red		TYCHO	Red	Red		
DES _m	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO	DT _m	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
EPL		Red	Red	Red	EPL		Orange	Orange	Red
EPS-M	Red		Red	Red	EPS-M	Orange		Red	Red
EPS-NM	Red	Red		Red	EPS-NM	Orange	Red		Red
TYCHO	Red	Red	Red		TYCHO	Red	Red	Red	

XC properties

DES_m varied between 21.2 ± 3.4 for EPL, 22.7 ± 4.4 for TYCHO, 28.7 ± 4.4 for EPS-M and 29.4 ± 3.8 for EPS-NM (means \pm SE)). The slight difference between EPL and the EPS growth forms, although not significant, in combination with the significantly higher DD+DT in the latter, generated a significantly lower DT_m in EPL than in the EPS growth forms. E50_{NPQ} was significantly higher in EPS-M than in EPS-NM and EPL. E50_{DT} was close to the E50_{NPQ} in all growth forms (both parameters not determined for TYCHO), but no significant differences between the EPS and EPL were observed. n_{DT} was significantly lower in EPS-M and TYCHO than in EPL and EPS-NM; no difference was found for n_{NPQ}. NPQ/DT was about half its optimum (= 1 under these experimental conditions) in all groups except EPS-NM). It roughly followed the same order as observed for NPQ_m, i.e. EPS-NM > EPS-M > EPL \cong TYCHO, with a 2x higher value in EPS-NM). The difference between EPS-NM and the other growth forms, however, was not significant due to the low NPQ/DT value in *Plagiogramma staurophorum*. shows that in all growth forms except EPS-M there were species (*Seminavis robusta*, *Fragilaria* cf. *subsalina*, *P. staurophorum*, *Brockmanniella brockmannii*) for which NPQ (0.16 ± 0.04) developed without DT synthesis, while two EPS-M species (*Amphora* sp. and *Planothidium delicatulum*) showed DT synthesis (0.17 ± 0.03 mol 100 mol Chl *a*⁻¹) without NPQ. All other species showed a NPQ/DT relationship with an origin close to 0, as expected (Figure 47).

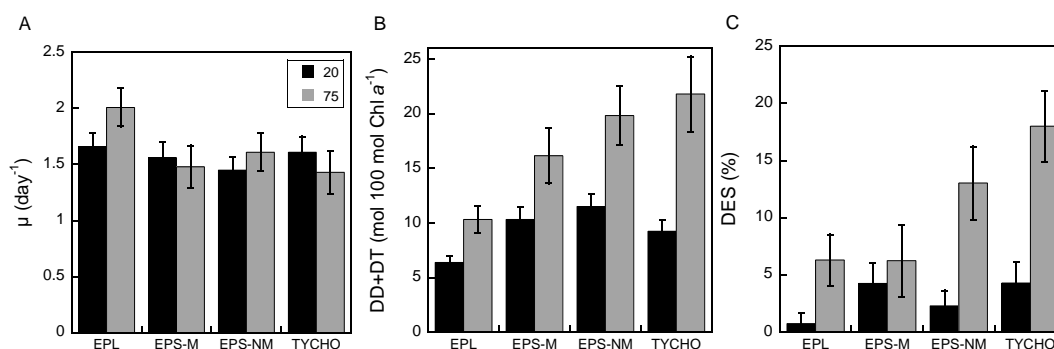


Figure 46 : Growth rate (μ) (A), diadinoxanthin (DD) + diatoxanthin (DT) content (B) and de-epoxidation state of DD to DT [DES = (DT / DD+DT x 100)] (C) in the four benthic diatom growth forms (EPS-NM, epipsammon non-motile, EPS-M, epipsammon motile; EPL, epipelon motile; TYCHO, thycho plankton) for cells grown at light intensities of 20 and 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectively. All parameters were measured on cells in exponential growth and sampled 2 h after the onset of light; growth conditions were 16 h light:8 h dark, 20°C. The values for all species in 20 and 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ conditions are found in Table S2 and Table S7 respectively. Values are estimated least squares means \pm estimated standard errors (PROC MIXED procedure).

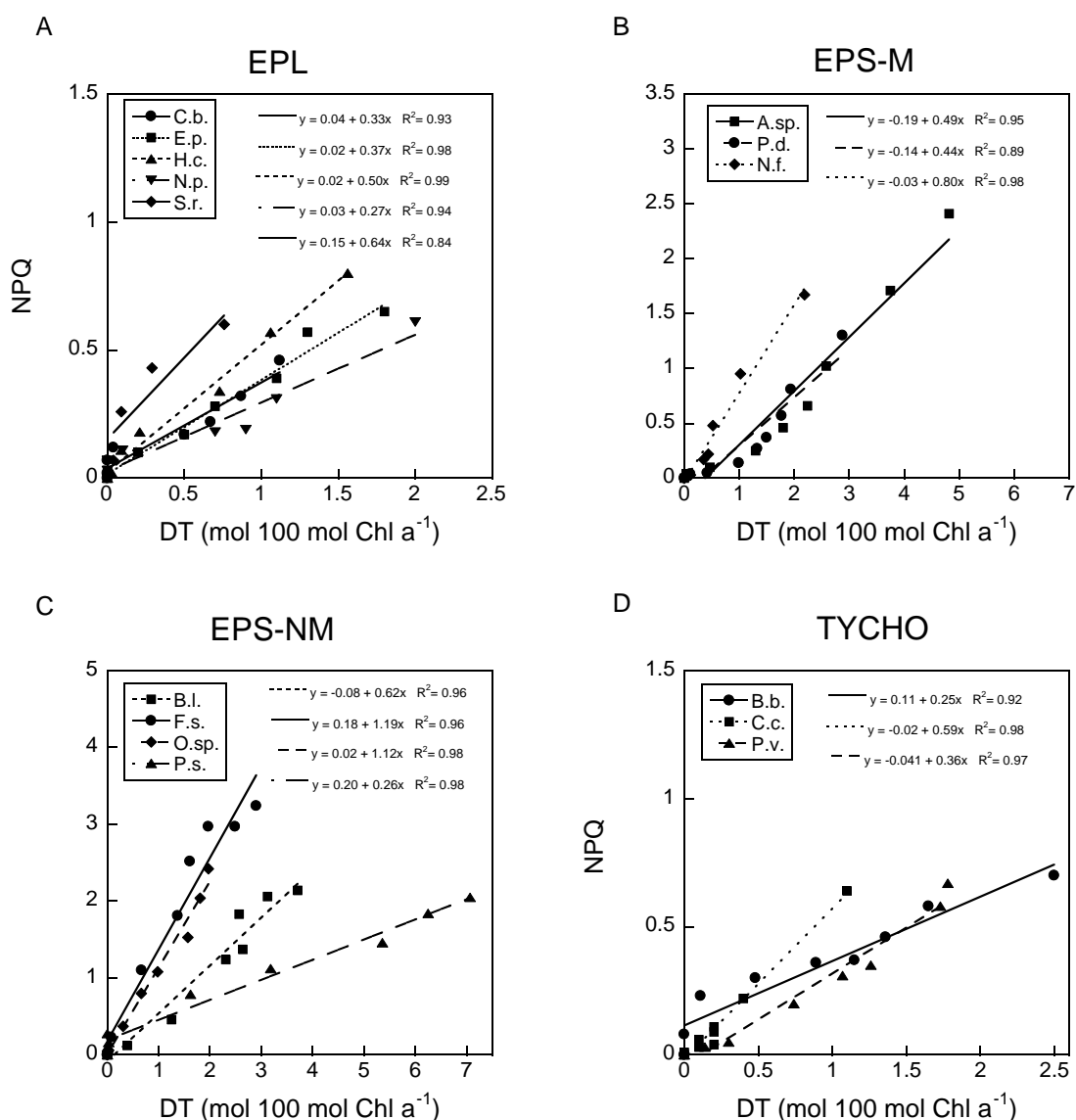


Figure 47 : Non-photochemical quenching of Chl fluorescence (NPQ) as a function of the amount of diatoxanthin (DT) measured during Non-Sequential Light Curves (NSLCs) in the five species of epipelton (EPL) (A), the four species of motile epipsammon (EPS-M) (B), the three species of tychoplankton (TYCHO) (C), and the three species of non-motile epipsammon (EPS-NM) (D). Cells were grown at $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The full names and classification of all species is listed in Table 1.

Effect of high light acclimation on the NPQ and XC properties

All species were grown under an E ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) roughly corresponding to the mean E_k for the low E acclimated cells ($20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Table 3). There were no significant differences between μ_{75} and μ_{20} for all growth forms (Figure 46). DD+DT substantially increased with a factor 1.6-1.7 in EPL and EPS, and 2.3 in TYCHO (Figure 46). There was a significant increase in DES at $75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in all growth forms except

in EPS-M (Figure 46). The increase in DD+DT and DES at the higher light intensity was most pronounced in TYCHO and resulted in a pronounced, significant difference in both parameters between TYCHO and EPL at this light intensity (Figure 46). The comparison of Chl fluorescence yield and light curve parameters could only be performed for a selection of six species (covering all growth forms) and is summarised in Figure 48

. There was only a slight (up to about 10 %) decrease in F_v/F_m in all species, illustrating the unstressed state of the cells (note that in *Seminavis robusta* and *Planothidium delicatulum* this decrease was slightly significant). DES_m significantly increased in *S. robusta* only. Together with the overall increase in DD+DT, this resulted in a significant increase in DT_m (by a factor of 4) in this species, but also in *P. delicatulum* and *Plagiogrammopsis vanheurckii*. The corresponding NPQ_m did not follow the same trend: it significantly increased in all species (except for *P. delicatulum* and *Opephora* sp.) but only by a factor of maximally 2. NPQ/DT remained low (0.2 to 0.5) in all species (and significantly decreased in *Opephora* sp.).

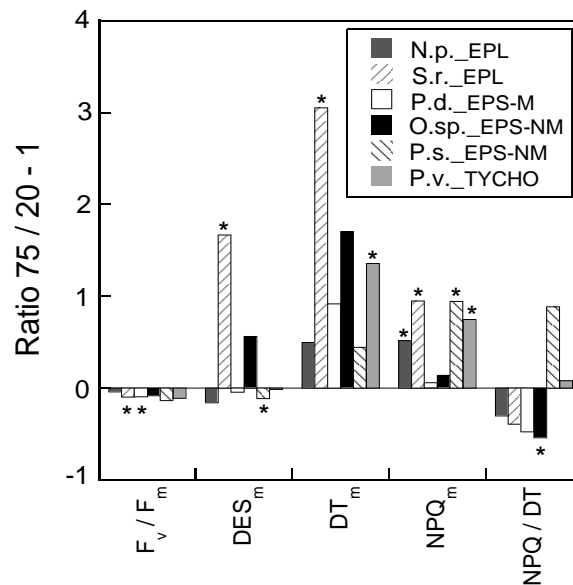


Figure 48 : Comparison of photosynthetic, non-photochemical quenching of Chl fluorescence (NPQ) and xanthophyll cycle (XC) parameters measured in diatom species representative of the four benthic diatom growth forms grown at light intensities of 20 and 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ respectively. For each parameter the ratio of the values obtained at 75 and 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1} - 1$ was calculated (i.e. the 0 line is equal to a 75/20 ratio = 1 which is equivalent to no change of values between light intensities). Significant changes between both light intensities are indicated with an asterisk. The values used for the 20 and the 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ conditions can be found in Table S2, Table S4 and Table S18 respectively.

Table S7A : Growth rate and xanthophyll cycle properties of the fifteen diatom species and of the four growth forms of benthic diatoms grown under 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. For each parameter, the ratio of the values obtained under 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (this table, left side) and 20 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (see Table S2) growth conditions was calculated (this table, right side). The full names of all species can be found in Table 1. Abbreviations: EPL, epipelon; EPS-M, motile epipsammon; EPS-NM, non-motile epipsammon; TYCHO, tychoplankton; μ , growth rate (in day^{-1}); DD+DT, diadinoxanthin+ diatoxanthin in mol 100 mol Chl a^{-1} ; DES, de-epoxidation state of DD into DT (in %). Values are averages \pm standard deviation for species and estimated least-square means from the PROC MIXED procedure \pm estimated standard error for the growth forms

Species	Growth form	Parameters 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$			Ratio 75/20		
		μ	DD+DT	DES	μ	DD+DT	DES
C.b.	EPL	1.69 ± 0.10	9.27 ± 0.20	3.09 ± 0.08	1.04	1.55	3.15
E.p.		1.81 ± 0.02	11.38 ± 0.39	6.53 ± 0.53	1.06	2.01	9.37
H.c.		2.52 ± 0.03	13.32 ± 1.03	4.16 ± 0.38	1.23	1.72	1.45
N.p.		1.64 ± 0.06	10.41 ± 1.72	10.68 ± 6.99	1.23	1.38	n.d.
S.r.		2.53 ± 0.18	8.12 ± 1.24	6.69 ± 2.25	1.43	1.40	5.62
A.sp.	EPS-M	1.94 ± 0.22	17.42 ± 0.59	7.32 ± 1.10	1.40	1.74	1.62
N.f.		1.34 ± 0.07	12.30 ± 2.07	9.22 ± 2.64	0.98	1.11	1.07
P.d.		1.23 ± 0.08	19.88 ± 0.51	2.56 ± 3.13	0.62	1.93	1.00
B.l.		1.46 ± 0.09	19.86 ± 2.12	18.49 ± 1.52	1.13	2.24	10.47
F.s.	EPS-NM	1.57 ± 0.21	16.45 ± 1.87	13.65 ± 7.63	1.10	1.26	14.92
O.sp.		2.12 ± 0.02	14.14 ± 1.58	6.98 ± 1.67	1.28	1.44	10.29
P.s.		1.34 ± 0.05	34.00 ± 5.38	23.09 ± 2.94	0.93	2.01	1.41
B.b.		1.50 ± 0.03	26.63 ± 4.83	27.16 ± 4.70	0.78	2.37	2.84
C.c.		1.57 ± 0.02	17.09 ± 0.71	10.13 ± 2.30	1.03	2.41	3.86
P.v.	TYCHO	1.25 ± 0.17	23.13 ± 3.03	16.17 ± 1.88	0.86	2.10	3.01
	EPL	2.01 ± 0.17	10.33 ± 1.24	6.31 ± 2.24	1.21	1.62	8.41
	EPS-M	1.48 ± 0.19	16.17 ± 2.52	6.26 ± 3.14	0.95	1.56	1.47
	EPS-NM	1.61 ± 0.17	19.85 ± 2.72	13.04 ± 3.19	1.11	1.72	5.67
	TYCHO	1.43 ± 0.19	21.81 ± 3.43	18.00 ± 3.08	0.89	2.36	4.20

Table S17B .: Results of the PROC MIXED procedure for the comparison of the parameters measured at 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (see Table S17A) between the growth forms (left) and for the comparison of the same parameters at 20 vs 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cf. Table 3 and Table S7A) for all growth forms (right). Red: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; light green: $p < 0.01$; dark green: $p < 0.001$. Arrows indicate an increase or decrease in the parameter from 20 to 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

μ	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
EPL				
EPS-M				
EPS-NM				
TYCHO				

μ	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
μ	↑			
DD+DT	↑↑	↑	↑	↑↑↑
DES	↑↑		↑	↑↑

DD+DT	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
EPL				
EPS-M				
EPS-NM				
TYCHO				

DES	EPL	EPS-M	EPS-NM	TYCHO
EPL				
EPS-M				
EPS-NM				
TYCHO				

Table S8A : Photosynthetic, xanthophyll cycle and non-photochemical quenching (NPQ) properties of six diatom species representative of the four benthic growth forms grown under 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The full names of all species can be found in Table 1. Abbreviations, definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in Table 5. Abbreviations: EPL, epipelon; EPS-M, motile epipsammon; EPS-NM, non-motile epipsammon; TYCHO, tychoplankton. n.d. = not determined due to curve fitting problems. Values are averages \pm standard deviation for each species.

Species	Growth form	F_v/F_m	DES_m	DT_m	NPQ_m	NPQ/DT	$E50_{NPQ}$
N.p.	EPL	0.68 ± 0.04	24.28 ± 2.79	3.07 ± 1.26	1.73 ± 0.24	0.42 ± 0.16	n.d.
S.r.		0.65 ± 0.05	33.21 ± 1.29	3.08 ± 0.98	1.17 ± 0.03	0.45 ± 0.08	287.00 ± 84.12
P.d.	EPS-M	0.60 ± 0.01	32.19 ± 6.45	5.52 ± 0.65	1.38 ± 0.45	0.22 ± 0.04	n.d.
O. sp.	EPS-NM	0.65 ± 0.03	32.13 ± 5.89	5.33 ± 1.92	2.76 ± 0.46	0.49 ± 0.10	584.00 ± 65.78
P. s.		0.51 ± 0.06	33.98 ± 1.02	10.23 ± 0.49	3.99 ± 0.06	0.49 ± 0.10	720.50 ± 67.18
P.v.	TYCHO	0.65 ± 0.05	22.01 ± 8.66	4.20 ± 0.60	1.17 ± 0.20	0.40 ± 0.24	n.d.

Table S8B : Results of the PROC GLM procedure for the comparison of the parameters of A at 20 vs 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cf. Tables S3, S4 and S8A) for all growth forms. Red: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; light green: $p < 0.01$; dark green: $p < 0.001$; grey: not determined. The full names of all species can be found in Table 1. Abbreviations, definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in Table 2. Arrows indicate an increase or decrease in the parameter from 20 to 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$

	N.p.	S.r.	P.d.	O.sp.	P.s.	P.v.
F_v/F_m	Red	Yellow ↓	Yellow ↓	Red	Red	Red
DES_m	Red	Light Green ↑↑	Red	Red	Red	Red
DT_m	Red	Light Green ↑↑	Light Green ↑↑	Red	Red	Light Green ↑↑
NPQ_m	Light Green ↑↑	Light Green ↑↑	Red	Red	Dark Green ↑↑↑	Yellow ↑
NPQ/DT	Red	Red	Red	Light Green ↓↓	Red	Red
$E50_{NPQ}$	Grey	Grey	Grey	Red	Light Green ↑↑	Grey

Effect of ‘planktonic’ growth on the NPQ and XC properties of TYCHO

The three TYCHO species were grown under ‘planktonic’ conditions (at 20 $\mu\text{mol photons.m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for a comparison with growth under ‘benthic’ conditions (Figure 49). *Brockmaniella*

brockmannii responded most strongly to a switch from ‘benthic’ to ‘planktonic’ growth: it showed a significantly lower growth rate and a higher DES and DES_m but a lower NPQ_m, suggesting photosynthetic stress and investment of additional DT in other processes than NPQ. *Plagiogrammopsis vanheurckii* and *Cylindrotheca closterium* showed very little change, apart from a significantly higher growth rate during planktonic growth in *P. vanheurckii*, a slight decrease in NPQ/DT in *C. closterium*, and an increase in DES in both species. The most pronounced and consistent change in TYCHO thus concerned an increase in DES when grown in suspension. Note that there is also an overall decrease in rETR_m, but this decrease was just not significant (p=0.08).

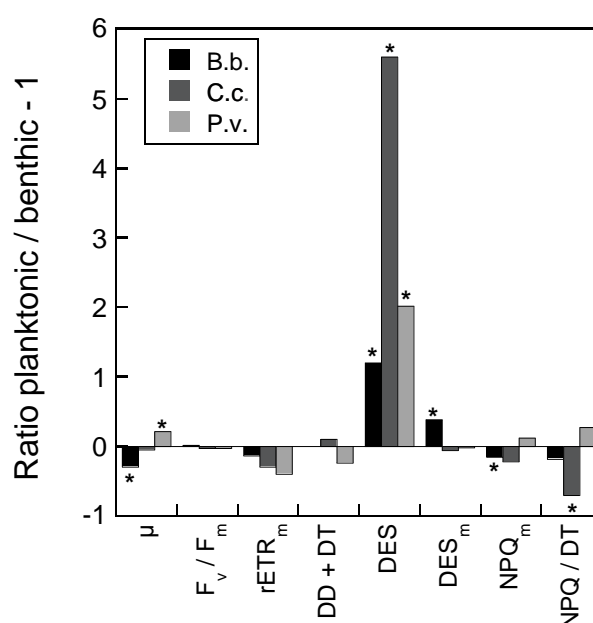


Figure 49: Comparison of growth, photosynthetic, pigment, non-photochemical quenching of Chl fluorescence (NPQ) and xanthophyll cycle (XC) parameters measured in the three tycho plankton diatom species in ‘benthic’ and ‘planktonic’ conditions. For each parameter the ratio of the values obtained under benthic and planktonic conditions – 1 was calculated (i.e. the 0 line is equal to a planktonic/benthic ratio = 1 which is equivalent to no change of values between ‘benthic’ and ‘planktonic’ conditions). Growth rates (in day⁻¹) were measured on cells in exponential growth phase sampled 2 h after the onset of light; growth conditions were 20 μmol photons m⁻² s⁻¹, 16 h light:8 h dark, 20°C. Significant changes between both light intensities are indicated with an asterisk. The values used for the ‘benthic’ and ‘planktonic’ growth conditions can be found in Tables S2/S4 and S9 respectively.

Table S9A Growth rate, photosynthetic, xanthophyll cycle and non-photochemical quenching (NPQ) properties of the three tychoplankton diatom species grown under ‘planktonic’ conditions. The full names of the species can be found in Table 1. Abbreviations, definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in Table 2. μ , growth rate (day^{-1}). Values are averages \pm standard deviation per species.

Species	μ	F_v/F_m	$rETR_m$	DD+DT	DES	NPQ_m	DES_m	NPQ/DT
B.b.	1.34 ± 0.13	0.70 ± 0.00	38.9 ± 0.41	11.19 ± 2.19	21.02 ± 3.03	0.59 ± 0.03	37.87 ± 2.79	0.17 ± 0.04
C.c.	1.46 ± 0.03	0.75 ± 0.02	47.72 ± 16.56	7.82 ± 1.20	17.29 ± 3.32	0.50 ± 0.02	17.29 ± 3.32	0.18 ± 0.11
P.v.	1.76 ± 0.06	0.71 ± 0.03	37.64 ± 6.72	8.43 ± 2.68	16.18 ± 5.51	0.75 ± 0.09	21.74 ± 7.29	0.47 ± 0.12

Table S19B : Results of the PROC MIXED procedure (group effect) and PROC GLM procedure (species difference) for the comparison of the parameters of Table S9A measured under ‘benthic’ vs ‘planktonic’ conditions (cf. Tables S3, S4 and S9A). Red: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; light green: $p < 0.01$; dark green: $p < 0.001$; grey: not determined. The full names of the species can be found in Table 1. Abbreviations, definitions and conditions of measurement of all parameters are listed in Table 2. Arrows indicate an increase or decrease in the parameter from benthic to planktonic growth condition.

	B.b.	C.c.	P.v.	TYCHO
μ	↓↓		↑↑	
F_v/F_m				
$rETR_m$				
DD+DT				
DES	↑	↑	↑	↑↑↑
NPQ_m	↓			
DES_m	↑			
NPQ/DT		↓		

IV. Discussion

The present work constitutes the first comparative experimental study, using unialgal cultures in standardized conditions, of fast regulatory photoprotective mechanisms in the four main benthic diatom growth forms present in intertidal marine sediments (epipelon, motile and non-motile epipsammon and tychoplankton). Because no sediment was added in our experiments, motile diatoms were not able to position themselves in a light gradient, hence effectively incapacitating their behavioural response. As the growth rate and photosynthetic characteristics (main pigments, F_v/F_m , α , E_k , $rETR_m$) of the studied species were comparable between the growth forms, we were able to compare their purely physiological light response.

Our study revealed a highly significant and pronounced difference in NPQ between the four growth forms (Figure 45). While no significant differences in DES were observed, NPQ was significantly lower in epipellic and tychoplanktonic than in epipsammonic species. Within the epipsammon, NPQ capacity was significantly higher in the non-motile than in the motile forms. As all growth forms included both small and large species (cf. Table 1), the functional light response (NPQ capacity) apparently did not depend on biovolume, as has also been observed *in situ* (Jesus *et al.*, 2009). The absence of significant differences in PSII CET between growth forms underscores the importance of NPQ as the main fast photoprotective process in intertidal benthic diatoms, confirming earlier results for these organisms (Lavaud *et al.*, 2002a) but in contrast with planktonic diatoms (Lavaud *et al.*, 2002a, Lavaud, 2007). By analogy with previous studies on planktonic diatoms (Strzepek et Harrison, 2004, Lavaud, 2007, Dimier *et al.*, 2009, Petrou *et al.*, 2011, Lavaud et Lepetit, 2013), our data suggest that epipellic and tychoplanktonic diatoms are adapted to a less fluctuating light climate and/or to a lower average irradiance, and vice versa for epipsammonic diatoms. This result fits well with the ecology of these growth forms. Epipelon is not only more abundant in muddy cohesive sediments where light penetration is more restricted than in sandy sediments (Paterson et Hagerthey, 2001, Cartaxana *et al.*, 2011), but, more importantly, their (micro-)migratory behaviour allows positioning at the optimal irradiance in the vertical light gradient and rapid escape from periodic excess light (Conn *et al.*, 2004, Consalvey *et al.*, 2004b, Serôdio *et al.*, 2006a). This alleviates the need to invest in a strong physiological capacity to respond to light

stress (Jesus *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011), although the right balance between motility and physiology still remains essential (van Leeuwe *et al.*, 2009, Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011, Serôdio *et al.*, 2012). Such balance is more crucial in the motile epipsammic species, which can move but have only limited control over their immediate light environment as movement is restricted, usually within the sphere of individual sand grains. As expected, they showed a significantly lower NPQ and a higher $E_{50_{NPQ}}$ than non-motile epipsammon, which have no behavioural control over their light environment. Finally, tychoplankton typically alternates between resuspension in a highly turbid shallow water column at high tide and deposition and burial in the upper sediment layers of muddy sediments at low tide (deposition in sandy sediments does not occur due to the intense hydrodynamic disturbance in these sediments). As such, the tychoplankton resembles planktonic diatoms adapted to subtle light fluctuations and/or on average low irradiance (Bailleul *et al.*, 2010, Lavaud et Lepetit, 2013).

The reason for the NPQ differences between epipelon and epipsammon can be explained by its main control: the XC dynamics. As recently shown, a high NPQ is supported by the strong effective involvement of DT which first depends both on a high DD+DT content and a high DES (Lavaud et Lepetit, 2013). The slope of the NPQ/DT relationship has been proposed as a good indicator of light climate adaptation: the higher the NPQ/DT slope, the better the adaptation to a highly fluctuating and/or on average high light climate (Dimier *et al.*, 2009, Lavaud et Lepetit, 2013). All epipsammic species, and especially the non-motile ones, showed XC parameter values which are characteristic for a high NPQ capacity, viz. a higher DD+DT content and DT_m which was 2x higher than in EPL. Non-motile epipsammon also tended to show a higher efficiency in promoting NPQ (NPQ/DT), but this difference was not significant due to high intra-group variability (Figure 46).

Within the epipsammon, NPQ is clearly more efficient in non-motile than motile epipsammic species. In motile epipsammon, the discrepancy between $E_{50_{NPQ}}$ and E_k is more pronounced than in non-motile forms: while there is no significant difference in E_k between both growth forms, $E_{50_{NPQ}}$ is significantly higher in the motile growth forms. This suggests a weaker relationship between NPQ development and photochemistry in the latter group, with slower NPQ development with increasing E. Remarkably, $E_{50_{DT}}$ does not significantly differ between both growth forms, and the significantly higher initial induction of DT synthesis (n_{DT}) but not NPQ (n_{NPQ}) in the motile group, together with the fact that some representatives

of this group show DT synthesis without NPQ (Figure 46), suggests that either DT is less or not involved in NPQ development, or that the light-dependent built-up of the transthylakoidal proton gradient (which is involved in both the activation of the DD de-epoxidase and the molecular control of NPQ) and the onset of NPQ are uncoupled (Lavaud *et al.*, 2012, Lavaud et Lepetit, 2013). Our observations thus suggest that in contrast to the non-motile group, motile epipsammic species rely more on a behavioural response (motility) and/or involve DT in other photoprotective processes such as the prevention of lipid peroxidation by reactive oxygen species (ROS) (Lepetit *et al.*, 2010).

The influence of DT on the inter-group/species NPQ differences was further investigated by the acclimation to higher light ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, close to the mean E_k for cells acclimated to $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). High light exposure is known to induce constitutive DT synthesis (Schumann *et al.*, 2007) and in field conditions, DT is usually even present in significant amounts in cells adapted to low/moderate light (Jesus *et al.*, 2009, van Leeuwe *et al.*, 2009, Chevalier *et al.*, 2010, Cartaxana *et al.*, 2011). Acclimation to higher light resulted in a significant increase in XC pigments (DD+DT) and DES in all growth forms, suggesting that although epipelton uses behavioural photoprotection, the XC is still important (cf. above). NPQ_m increased in most of the species examined, mainly due to a higher DT_m resulting from a higher DD+DT rather than a higher DES_m . The discrepancy between DES_m and NPQ_m as well as the low NPQ/DT may be due to the fact that the additional DT primarily served in the prevention of lipid peroxidation rather than in NPQ as previously reported in high light acclimated diatoms (see also above).

While under low light conditions, the growth, photosynthetic and light-response features of tychoplankton were similar to those of epipellic diatoms (i.e. low NPQ, NPQ_m and DT_m), their response to higher light was much more pronounced, with the strongest increase in XC pigments and DES of all growth forms (Figure 47). However, the NPQ_m and DT_m data (only available however for one representative species, *Plagiogrammopsis vanheurckii*) did not show a similar response, with DT_m showing a more pronounced increase than NPQ_m , suggesting that NPQ development was low and that DT may have mainly been involved in other processes than NPQ. For most parameters, the response of the tychoplankton species to growth in suspension ('planktonic' growth) was limited and largely species-specific, except for a general increase in DES and a decrease (albeit just non-significant) in rETR_m . These data suggest that representatives of the tychoplanktonic growth form are well-adapted to their

amphibious life style, which is characterized by an on average low irradiance (MacIntyre *et al.*, 1996). In contrast, epipellic species do not grow well in suspended, turbulent conditions (J. Lavaud, pers. observation).

Our study for the first time shows that intertidal benthic diatoms display growth form specific variation in fast regulatory physiological mechanisms for photoprotective capacity (NPQ and the XC), which mirrors their behavioural light response. In epipellic motile diatoms, exclusively belonging to the raphid pennate clade, the physiological response is not well developed, as these diatoms appear to largely rely on motility to control their immediate light environment. In the motile epipsammon however the physiological response remains essential because their movement is restricted to the sphere of individual sand grains. The evolution of the raphe system, the hallmark synapomorphy of the raphid pennate diatom clade which enables locomotion, has therefore been essential for the colonization of intertidal sediments by not only migratory epipellic biofilms but also motile epipsammon. In contrast, NPQ and XC capacity is high in non-motile araphid pennate diatoms which passively have to abide often pronounced variations in the intertidal light climate. Tychoplanktonic diatoms, which alternate between high tide resuspension in a turbulent and turbid water column, and low tide deposition in muddy sediments, appear to be adapted to an on average low light environment, with low NPQ and XC capacity.

While we made no formal analysis of the relationship between functional and phylogenetic diversity, it is obvious that despite the fact that a behavioural photoprotective response (motility) is restricted to the raphid pennate diatom clade, differences in the studied physiological traits are more strongly driven by growth form than phylogenetic relatedness. For example, the epipsammonic species *Biremis lucens*, despite being a raphid pennate species, has a non-motile growth form, and shows a NPQ capacity which is more similar to non-motile epipsammon than to the (phylogenetically more closely related) motile epipsammon and epipelon. Likewise, photophysiological features of pennate raphid (*Cylindrotheca closterium*) and centric (*Plagiogrammopsis vanheurckii* and *Brockmanniella brockmannii*) tycho plankton species were similar as reported before in planktonic centric/pennate species (Lavaud *et al.*, 2004). Raphid pennate diatoms which have colonized an epipsammonic or tycho planktonic niche thus display a reverse evolutionary trade-off switch towards a much more performant physiological response. Our observations thus suggest that photoprotective capacity in diatoms is a highly adaptive trait which is to a certain degree constrained by clade-specific

evolutionary innovations (the evolution of the raphe system and hence a behavioural response) but also, and more importantly, by growth form, which ultimately defines the balance between the physiological and behavioural photoprotective response in these organisms. Such differential adaptation is of primary importance for the regulation of the photosynthetic productivity *vs.* light, as has been demonstrated before in planktonic diatoms, where the photochemical *vs.* the photoprotective energy allocation as a function of light is drastically different in species adapted to a fluctuating *vs.* a more stable light environment (Wagner *et al.*, 2006, Lavaud, 2007, Petrou *et al.*, 2011, Deblois *et al.*, 2013). However, unlike in planktonic environments, the trade-off between a physiological and behavioural response in benthic diatoms allows local co-existence of different growth forms under the same overall light environment.

Partie 3 : La réponse photo-
comportementale du
microphytobenthos : importance
de la qualité de la lumière et
variation saisonnière de la mise à
disponibilité de la biomasse
photosynthétiquement active

Synthèse

Dans cette seconde partie de mon travail de thèse, la réponse comportementale de l'épipélon et de l'épipsammon mobile aux variations de la lumière a été étudiée afin de compléter le travail photophysologique réalisé en Partie 2. Ce travail est également un pré-requis aux études présentées en Parties 5B_1 et 5B_2 sur l'équilibre en réponse comportementale et physiologique du biofilm épipélique à un stress lumineux seul et à une combinaison de stress lumière-température. Bien que principalement réalisé sur du sédiment à vases fines contenant une communauté épipélique (site de l'Anse de l'Aiguillon), une partie des expérimentations a également été réalisée sur du sédiment vaso-sableux dominé par une communauté épipsammique et sur une échelle de temps longue (prélèvements de vase réguliers pendant deux ans). En ce sens, ce travail complète l'approche de comparaison de différents habitats réalisée en Partie 6 et l'approche saisonnière réalisée en Parties 5B_1 et 6. Comme pour les Parties 2, 5 et 6, une partie des expérimentations, a été réalisée en collaboration avec des membres du laboratoire 'Mer, Molécules, Santé' de l'Université de Nantes. Un manuscrit correspondant à ce travail est en préparation pour *Journal of Phycology* : 'The migratory rhythm of intertidal microphytobenthos in sediment depends on the light photoperiod, intensity and quality : evidence for a positive effect of blue wavelengths' (voir ci-après).

L'objectif central de cette étude était de mieux comprendre comment la lumière (sa photopériode, son intensité et sa qualité spectrale) influence le rythme migratoire du microphytobenthos. Pour ce faire, il d'abord fallu mettre au point une méthodologie d'expérimentation en laboratoire sur du sédiment frais contenant du microphytobenthos actif. Nous avons pu maintenir ce type de dispositif grâce à l'utilisation de plateaux de sédiment ré-homogénéisés toutes les 24 h avec de l'eau de mer fraîche. Dans ces conditions, le microphytobenthos maintient un rythme migratoire calqué sur le cycle tidal du site de prélèvement pendant plusieurs jours (4 à 6 jours) sans réel forçage physique émergence/immersion. En parallèle, nous avons pu suivre son rythme de migration en continu (24 h) grâce à l'utilisation de la fluorimétrie par image (Imaging-PAM) qui permet de mesurer la fluorescence chlorophyllienne en surface du sédiment. Cette fluorescence peut être utilisée comme proxy de biomasse et convertie en biomasse chlorophyllienne (comme mesurée *in situ*, cf Partie 6). Pour la première fois, nous avons utilisé le niveau de fluorescence F_s avec

succès et la conversion des valeurs de Fs en quantité de chlorophylle *a* présente dans le sédiment est en cours de calibration (via une extraction par HPLC).

A partir de ce dispositif, nous avons pu :

1- suivre le rythme de migration du microphytobenthos dans différents sédiments (plus ou moins cohésifs) en fonction des conditions de lumière ‘ambiantes’ du laboratoire (photopériode naturelle, température contrôlée à 20°C, concentration en nutriments et salinité du sédiment maintenues constantes par addition d’eau de mer fraîche toutes les 24 h) et vérifier la bonne mise en place des profils de migration en fonction du cycle tidal (du site de prélèvement) avec en particulier deux situations : i) migration parfaitement synchronisée au cycle tidal quand l’heure du maximum de la marée basse est proche du midi solaire, ii) migration décalée (jusqu’à 1 h) quand l’heure du maximum de la marée basse est proche du lever ou du coucher du soleil. De plus, la modélisation des profils de migration (basée sur des travaux précédents), nous a permis de définir deux paramètres caractérisant la présence du microphytobenthos en surface du sédiment au cours d’une migration de 24 h : la biomasse photosynthétiquement active totale (ou TPAB, la surface sous la courbe de migration) et la biomasse photosynthétiquement active maximale (ou MPAB, l’amplitude maximale de migration à la lumière lors de l’émersion).

2- suite à cette vérification, nous avons soumis des sédiments cohésifs contenant une communauté épipélique à différentes manipulations de la photopériode (alternance artificielle jour/nuit, lumière ou obscurité artificielle pendant 24 h et inversion artificielle jour/nuit par rapport à la photopériode naturelle). Ces expérimentations nous ont permis de clairement démontrer que le rythme migratoire de l’épipélon est avant tout calqué sur le cycle tidal, sans doute par l’intermédiaire de régulations endogènes (‘internal clock’), et que cette synchronisation peut être modulée voire même totalement effacée par la photopériode dans des conditions où l’alternance des phases physiques d’émersion/immersion sont absentes.

3- afin de mieux comprendre l’effet modulateur de la lumière, nous avons exposé le sédiment à plusieurs lumières de qualités et d’intensités différentes grâce à des panneaux de LEDs contrôlés par ordinateur. Nous avons pu vérifier l’effet positif de la lumière en général sur la migration de l’épipélon (TPAB et MPAB) jusqu’à une intensité seuil (120-180 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ dans nos conditions expérimentales) au-delà de laquelle une réponse photophobique se met en place. Les longueurs d’onde utilisées (rouge, vert et bleu) ont un effet positif croissant

sur la TPAB et la MPAB dans cet ordre bleu > vert > rouge (avec ou sans rouge lointain). Des analyses pigmentaires nous ont permis d'écarter la synthèse de pigments absorbants préférentiellement les longueurs d'onde bleues (chlorophyll *c*, fucoxanthine, diadinaoxanthine, β -carotène) comme étant responsable de l'effet positif de la lumière bleue. Dans le sédiment, comme dans la colonne d'eau, la pénétration de la lumière s'accompagne d'une modification similaire de son spectre avec un enrichissement des longueurs d'onde rouges en surface et bleues en profondeur. Ces données pourraient parfaitement expliquer l'effet positif de la lumière bleue sur la TPAB et la MPAB et sa différence avec la lumière rouge.

4- parce que ces expérimentations ont été réalisées sur une échelle de temps relativement longue, il nous a été possible de corrélérer la TPAB et la MPAB avec le coefficient de marée (pas de corrélation au site de prélèvement qui est haut sur la vasière), avec l'heure du maximum de la marée basse (TPAB et MPAB maximum quand l'heure de la marée basse coïncide avec le midi solaire), et avec la saison (TPAB et MPAB maximum l'hiver et minimum l'été probablement et principalement à cause de la pression de broutage). Ces facteurs n'ont pas d'influence sur l'effet positif des longueurs d'onde bleues sur la migration de l'épipélon.

Des avancées récentes ont été réalisées chez les diatomées planctoniques : i) découverte de photorécepteurs de lumière rouge et bleue (auréochromes) en particulier, ii) importance de ces longueurs d'onde dans plusieurs processus biologiques : photoacclimatation, cycle cellulaire, mobilité, régulation de cycles cellulaires circadiens. De plus dans la colonne d'eau, on suspecte les diatomées planctoniques d'utiliser le ratio rouge/bleu pour 'percevoir' la surface de l'eau. On peut alors se poser la question : 1) de la capacité des diatomées épipéliques à percevoir différentes longueurs d'onde et en particulier le ratio rouge/bleu afin de réguler leur rythme migratoire en fonction de la pénétration de la lumière dans le sédiment et donc de l'alternance émergence/immersion, 2) de l'influence du spectre lumineux sur un possible équilibre entre la régulation de la photosynthèse à différents environnements lumineux dans la couche de surface du sédiment au cours de l'émergence (photoacclimatation/photoprotection physiologique) et la multiplication cellulaire quand les cellules sont enfouies dans le sédiment lors de l'immersion ? De plus, quid de l'épipsammon qui de part son habitat est possiblement adapté à des ratios rouge/bleu différents en terme d'amplitude de variation ? Ces questions sont au cœur de mon projet d'Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER) à

l'Université de La Rochelle (2013-14) (cf Partie 7, Perspectives). Cependant avant de pouvoir les explorer une mise au point méthodologique est indispensable. Celle-ci bien que non-aboutie est présentée dans la Partie suivante (Partie 4) ; elle vient compléter le travail décrit ici.

De façon plus générale, cette étude nous permet de conclure que l'intensité de la lumière n'est pas son unique caractéristique qui détermine l'activité photosynthétique du microphytobenthos (Partie 2), et la mobilité de l'épipélon et donc sa disponibilité pour les consommateurs en surface du sédiment (Partie 5B) ; sa photopériode et son spectre semblent également être des facteurs essentiels. Le cycle tidal ainsi que le cycle saisonnier (qui eux-mêmes influencent l'environnement lumineux : synchronisation au cycle nyctéméral, pénétration de la lumière dans le sédiment) sont également prépondérants dans la mise à disposition de la biomasse microphytobenthique productive (i.e. photosynthétiquement active) en surface du sédiment et doivent être pris en compte dans l'interprétation des données in situ (Partie 6).

I. Introduction

Mudflat have been known for a long time to be inhabited by microphytobenthos (MPB) communities which is under temperate latitude dominated by diatoms (Aleem, 1950, Round, 1953, Perkins, 1960, Round et Happey, 1965, Drum et Hopkins, 1966, Hopkins, 1966, Round et Palmer, 1966, Palmer et Round, 1967, Ribeiro *et al.*, 2013). This microphytobenthos is well known 1) to form highly dense photosynthetic biofilm at the surface of the sediment which is responsible of a significant fraction of the total primary production; and 2) to migrate in the sediment when the tide comes back (Cadée et Hegeman, 1974, Rasmussen *et al.*, 1983, Colijn et de Jonge, 1984, Pinckney et Zingmark, 1993, MacIntyre *et al.*, 1996, Barranguet *et al.*, 1997, Barranguet *et al.*, 1998, Underwood et Kromkamp, 1999, Serôdio et Catarino, 2000, Leguerrier *et al.*, 2003, Underwood *et al.*, 2005, Migné *et al.*, 2007). Epipsammic species dominates sandy-muddy sediments (>95% of MPB; Méléder *et al.* 2006) where it lives attached to the particles; it includes Epipsamic motile species which move on individual grains and Epipsamic non-motile stalked to them and/or forming colonies. Epipellic motile dominates cohesive muddy sediments (>90% of the MPB; (Haubois *et al.*, 2005) where it vertically 'migrates' following endogenous tidal/dial rhythms and environmental stimuli (Saburova et Polikarpov, 2003, Consalvey *et al.*, 2004b, Coelho *et al.*, 2011).

This migration pattern has been studied from a long time with different technics: observation of the coloration of the mud surface (Aleem, 1950); microscopic count after collection with lens tissues (Round et Happey, 1965, Round et Eaton, 1966, Round et Palmer, 1966, Fischer *et al.*, 1977); low temperature scanning electron microscopy (Paterson, 1986, Paterson *et al.*, 2000); chlorophyll *a* (Chl *a*) concentration (Pinckney *et al.*, 1994); in vivo Chl *a* fluorescence with pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry (Serôdio *et al.*, 1997) which use has been exponentially democratized in the recent years (Consalvey *et al.*, 2004a, Consalvey *et al.*, 2005, Jesus *et al.*, 2005, Serôdio *et al.*, 2005b, Serôdio *et al.*, 2006a, Migné *et al.*, 2007, Serôdio *et al.*, 2008, Du *et al.*, 2010a, Perkins *et al.*, 2010a, Lefebvre *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2012, Vieira *et al.*, 2013a).

PAM fluorescence is rapid and non-intrusive and thus ideal to study MPB in sediment (Consalvey *et al.*, 2005, Kromkamp et Forster, 2006). Imaging-PAM contrast with other PAM fluorometers because it measures only the surface of the sediment without deep penetration due both to the camera recording system, and the low penetration of blue measuring light in the sediment (Consalvey *et al.*, 2005, Vieira *et al.*, 2013a). The measurement of F_0 is known to be a good proxy of the MPB biomass present at the surface of sediment (Kromkamp et Forster, 2006). More specifically with Imaging-PAM, about it is possible to assess the 'photosynthetically active biomass' (PAB) defined as the microalgal biomass that is present in the photic zone of the sediment (Guarini *et al.*, 2000, Coelho *et al.*, 2011). The measurement of the F_0 requires a darkening of the sample which, in the case of diatoms, should be prolonged for a period of 10 minutes or even more (Ting et Owens, 1993, Consalvey *et al.*, 2004a, Jesus *et al.*, 2006b). Nevertheless, Serodio *et al.* (2006a) showed that with sediment, the exposure to darkness can induce a decrease in surface MPB biomass because of downward migration. In order to avoid such situation, and to limit interference with MPB migration recording, F_s the steady-state fluorescence level, which corresponds to the F_0 of a non-dark adapted sample as measured by an Imaging-PAM, can be used to evaluate PAB (Consalvey *et al.*, 2005).

Although environmental cues can rapidly vary to an extreme in intertidal flats (Admiraal, 1984, Paterson et Hagerthey, 2001), irradiance and temperature are often cited as the two major forcings of the photosynthetic productivity of MPB diatoms (Guarini *et al.*, 2006). Because of the combination of the open field like light fluctuations, the emersion/immersion balance, the sediment-dependent light penetration, and the high turbidity of the shallow water column, the light environment of MPB diatoms can be extremely complex and changing (Paterson et Hagerthey, 2001). Thus the MPB have to cope with the tide cycle (Drum et Hopkins, 1966, MacIntyre *et al.*, 1996, Barranguet *et al.*, 1998, Kingston, 1999a, Consalvey *et al.*, 2004b, Mitbavkar et Anil, 2004, Apoya-Horton *et al.*, 2006, Coelho *et al.*, 2011) that changes along the days and the light that can be highly changing (Kingston, 1999b, Sauer *et al.*, 2002, Mitbavkar et Anil, 2004, Wenderoth et Rhiel, 2004, Serôdio *et al.*, 2006a, McLachlan *et al.*, 2009, Du *et al.*, 2012, Vieira *et al.*, 2013b).

Even if MPB migration is well documented (Pinckney et Zingmark, 1991, Consalvey *et al.*, 2004b), most studies focused on the migration at diurnal low tides, and a question remains unsolved : what stimulus or stimuli cause the MPB to penetrate into the substratum at high

tide and to reappear at the surface at low tide during daylight (Aleem, 1950) ? Using Imaging-PAM fluorescence, we described here different migratory patterns of muddy and sandy sediment under different light conditions. We tried to understand the factors that can influence the appearance/disappearance of MPB biomass at the surface of sediment. We especially focused on the effect of different light intensities and qualities over a long period (April 2011-March 2013) in order to decipher a possible seasonal pattern.

II. Materials and methods

Study site and sediment harvesting

Sediment samples were regularly collected from March 2011 to March 2013 in the upper zone (500 m from the shore, ca. 4 m above the marine chart datum) of two intertidal flats on the Atlantic French coast: bay of l'Aiguillon ('Esnandes' site, 46° 15.36' N, 1° 8.55' W) and in the bay of Bourgneuf ('Liarne' site, 47°2'35" N, 1°59'59" W). The sampling sites sediment of Esnandes and Liarne are composed of very fine muddy sediments (particle size < 63 µm) and of muddy-sand (63-200 µm), respectively (Méléder *et al.*, 2007, Serôdio *et al.*, 2012). For both sites, the microphytobenthic (MPB) community is largely dominated by diatoms throughout the year (Herlory *et al.*, 2004, Méléder *et al.*, 2007). The upper-layer (approx. the top 1st cm) of sediment was collected at low tide, and immediately brought back to the laboratory. After sieving through a 500 µm mesh to remove macrofauna and especially the mud snails as *Peringia* sp., the sediment was homogenized by thoroughly mixing and was spread as a plane layer in 4 cm deep plastic trays (Serôdio *et al.*, 2012). In order to keep it fresh, sediment was homogenized each 24 h at the time of in situ high tide at the sampling sites and filtered (GF/F, 0.7 µm) fresh sea water was added. In these conditions, MPB conserved its natural migratory rhythm for several days (5 ± 1 days) as already shown in other studies : three days (Serôdio *et al.*, 1997), eight days for (Round et Happey, 1965) and a maximum of 21 days (Paterson, 1986) (Figure S2).

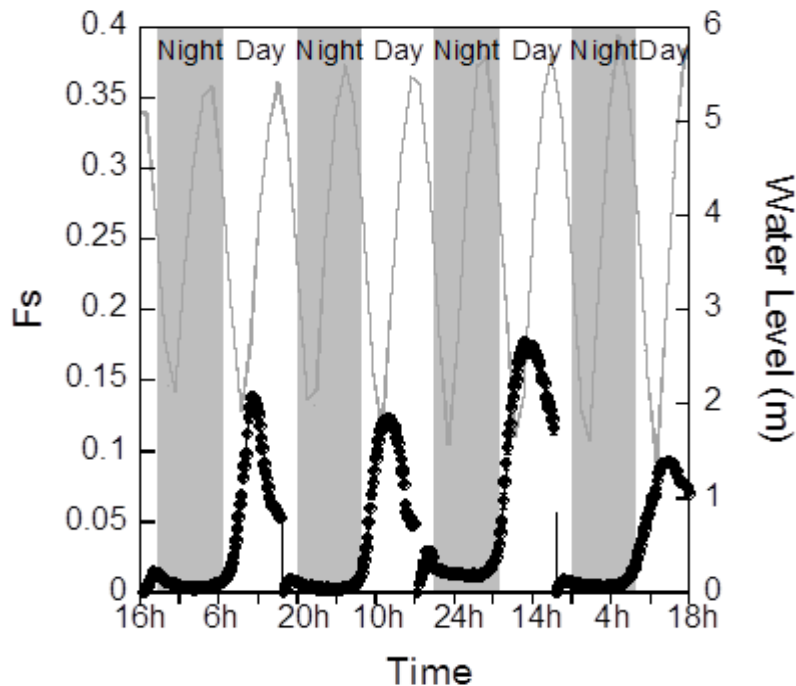


Figure S2 : Chlorophyll *a* fluorescence (Fs) of the epipellic microphytobenthos (MPB) of muddy sediment and water level (m) as a function of the time (00 h) measured during 4 consecutive days under ambient light conditions (natural photoperiod). In black dotted line the Fs level, in grey line the water level, in grey background the night periods and in white background the day periods. Chl *a* fluorescence values are averaged \pm the standard deviation of 5 ‘areas of interest’ on the sediment tray.

Monitoring of the motile microphytobenthic biomass

The ‘minimum’ chlorophyll *a* fluorescence F_s was used as a proxy for the motile MPB biomass present at the surface of the sediment (see Jesus et al., 2006). F_s level was measured on sediment tray by the non-actinic detecting beam (settings: intensity 1, frequency 1, 470 nm) for 24 h using an Imaging-PAM fluorometer (Maxi-PAM M-series, Walz, Effeltrich, Germany). Five ‘areas of interest’ were randomly defined in order to measure pseudo-replicates on a given sediment tray and to take into account the heterogeneity of the sediment fluorescence surface signal although sediment was well homogenized. For each experiment, two phases were recorded. During the first phase, the 24 h first tidal cycle (based on the *in situ* tidal cycle) was recorded under ‘ambient’ light conditions (i.e. natural photoperiod) as a control for the evolution of the MPB biomass at the surface of the sediment over 24 h; this experiment was used as a ‘MPB migration control’. During the second phase (also following

the *in situ* tidal cycle) and after homogenization of the sediment with fresh sea water (see above), different conditions of light intensities and qualities were tested using 4 LED panels (FloraLEDs panels, Plant Climatics): darkness, 'white' light (20, 120, 350 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mix of different LED sources with 455 nm and 557 nm maximum wavelengths), red light (with and without far red) (130 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 673 nm), blue light, (10, 40, 130 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 471 nm), and green light (10, 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 'white' light with a 520 nm filter, 124 Dark Green Lee filter, Andover England). For each light condition, a new sediment tray was used and a new 'MPB migration control' was recorded. 'Desynchronization experiments' where the photoperiod was inverted were additionally performed: during the first 'control' phase, the day/night photoperiod was artificially provided following the natural photoperiod timings, during the second phase, the natural photoperiod was artificially inverted by applying a white light (intensity) during the night period and darkness during the day period. All experiments were carried at the same temperature of 20°C which is known to be optimal for MPB activity throughout the year (Blanchard *et al.*, 1997).

The profiles of the presence of the MPB biomass at the surface of the sediment were analyzed by computing two parameters: 1) the maximum MPB biomass reached at the time of the maximum low tide *in situ* (tidal cycle of the sampling site), 2) the area under the curve that integrates MPB biomass evolution during the whole photoperiod (night and day periods). In previous works (Guarini *et al.*, 2000, Coelho *et al.*, 2011), the maximum and integrated MPB biomasses were used as proxies for the maximum and for the total photosynthetically active biomass (PAB) of MPB present at the surface of the sediment during its migration.

Pigment analyses

The pigment content of sediment was determined by reversed phase HPLC (Hitachi High Technologies Co., Japan). Sediment cores were collected in the sediment tray during blue light conditions for different seasons (120 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in winter and summer; 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in early spring and summer, and 10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ in summer) at three timings of the corresponding *in situ* tidal cycle: 1) 3 h before the low tide maximum, 2) at the low tide maximum, and 3) 3 h after the low tide maximum. The same procedure was followed for the corresponding control sediment trays of each blue light conditions. The sediment cores were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. In order to decipher the pigment content of the upper sediment layer, the surface of the sediment cores was cut in three sub-layers (0-200 μm , 200-400 μm and 400-600 μm) with a cryostat (Leica

CM1850, Germany). The sediment samples were lyophilized during 24 h and the pigments were extracted with 0.5 mL of a mixture of 90% methanol/0.2 M ammonium acetate (90/10 vol/vol) and 10% ethyl acetate as described in Lepetit et al. (2013). Pigment quantification was as described before (Jakob *et al.*, 1999) and normalized to the sediment dry weight. The xanthophyll de-epoxidation state (DES in %) was calculated as $DES = [(DT / (DD + DT)) \times 100]$, where DD is the diadinoxanthin, the epoxidized form, and DT is the diatoxanthin, the de-epoxidized form.

Statistical analyses.

The graphic analysis of maximum and integrated MPB biomass was performed using Excel 2010. Integrated biomass was computed with the Integral (gamma.xla) macro provided by <http://fordom.free.fr> with Excell 2010. Statistical analyses were performed using the student t-test (Excel)

III. Results

Imaging PAM calibration and HPLC calibration

Because the Imaging-PAM records the Chl *a* fluorescence, a correlation was possible in order to convert the Chl *a* fluorescence data as Chl *a* concentrations in sediment as measured by the HPLC (Figure S3). There was a clear correlation between the HPLC fluorescence and the Imaging-PAM fluorescence, with a Pearson coefficient of 0.92.

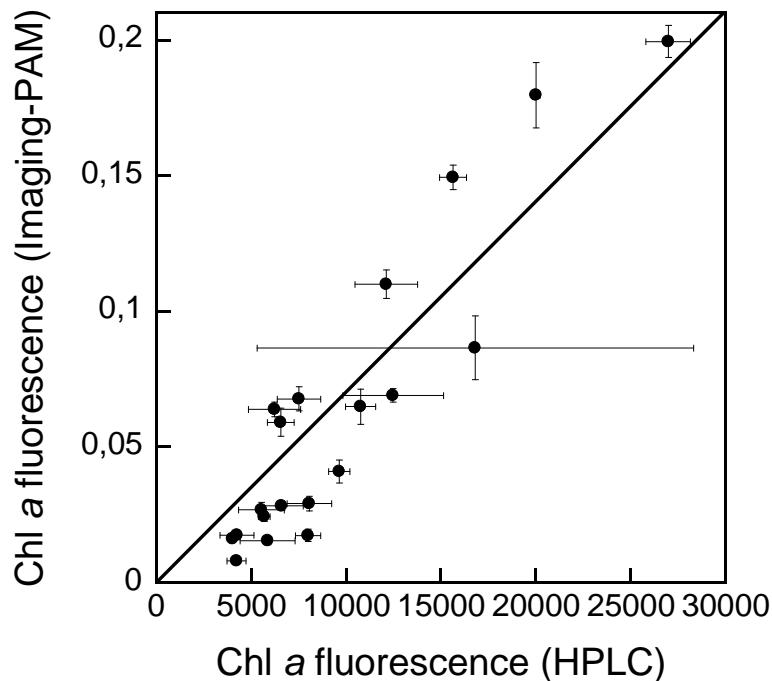


Figure S3 : Chl *a* fluorescence (Fs) of the MPB recorded from the Imaging-PAM on muddy sediment as function of the Chl *a* fluorescence recorded by the HPLC. Values are the average of 5 measurements from the Imaging-PAM and 3 for the HPLC \pm the standard deviation The linear regression equation: $y = 0.000007 x$ (Pearson coefficient of 0.92)

Migration pattern of epipellic and epipsammic microphytobenthos in different sediment

For the experiments carried on muddy sediment in ambient conditions (natural photoperiod), different migration patterns were observed. The classical pattern occurred when the low tide maximum was around the middle of the daytime period (i.e. around the solar noon) (Figure 50A). During the daytime, the Fs level increased from high tide time to the low tide and reached values around 0.11 ± 0.7 , ranging from 0.01 to 0.25. Afterwards, it started to decrease until the next high tide either back to its original value or around half of the maximum Fs (Figure 50). At night, a smaller Fs was observed (Figure 50A). A different pattern was observed when low tide maximum was near the sunrise (Figure S4A). In this case, Fs started to increase later during the daytime period and the maximum Fs level was usually reached about 1 h after the low tide maximum. When the low tide maximum was close or just after the sunset (Figure S4B), Fs increased from the high tide maximum and started to decrease at the sunset time.

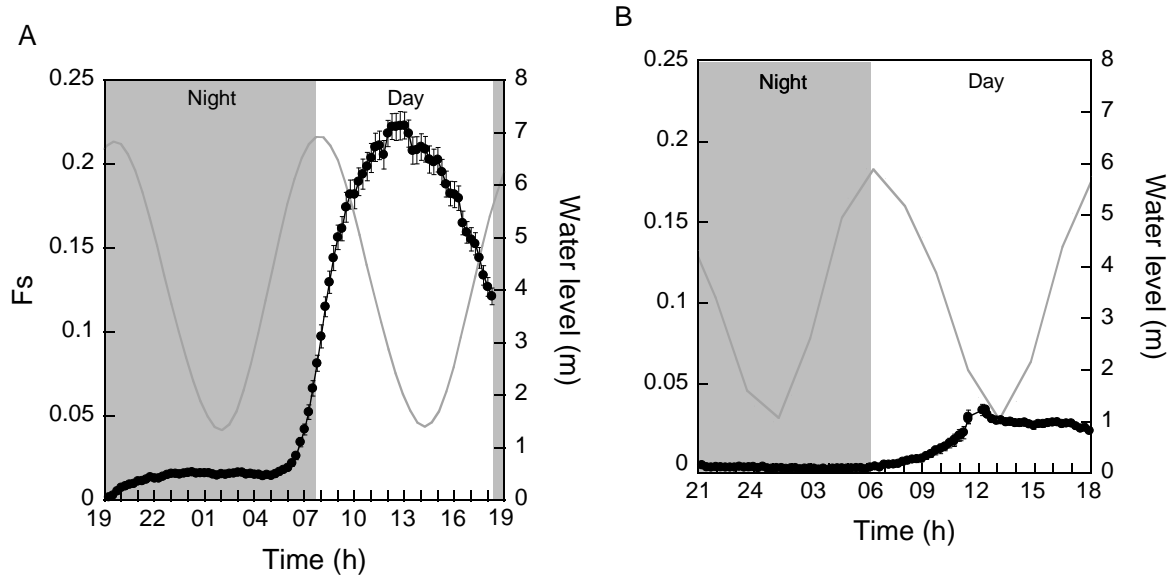


Figure 50 : Chlorophyll *a* fluorescence (Fs) of the microphytobenthos (MPB) and water level (m) as function of the time (00 h) measured for 24 h under ambient light conditions (natural photoperiod): A) muddy sediment inhabited by epipellic diatoms, B) sandy-muddy sediment inhabited by epipsammic diatoms. In black dotted line the Fs level, in grey line the water level, in grey background the night period and in white background the day period. Fs values were averaged \pm the standard deviation of 5 ‘areas of interest’ on the sediment tray.

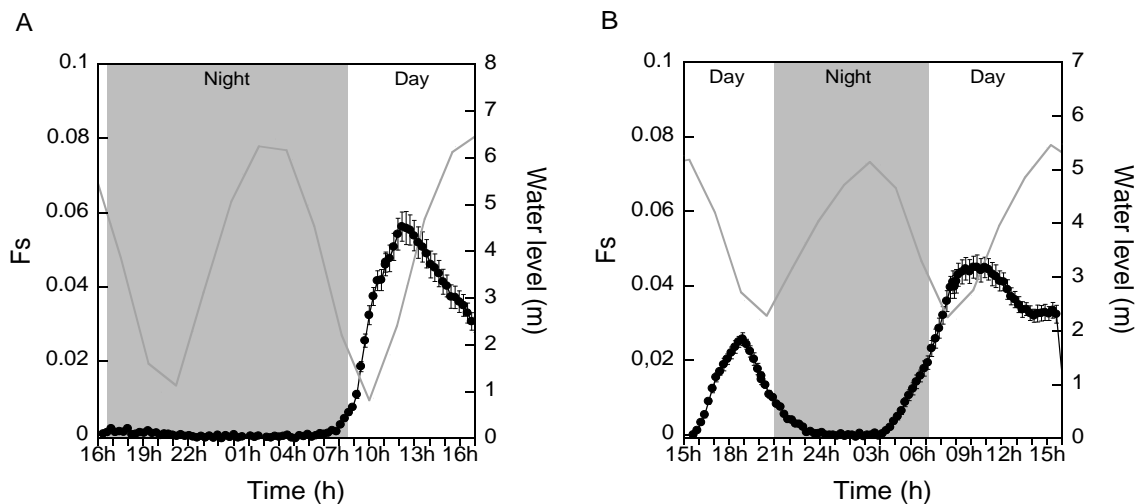


Figure S4 : Chl *a* fluorescence (Fs) of the epipellic MPB of muddy sediment and water level (m) as function of the time (00 h) measured for 24 h under ambient light conditions (‘natural photoperiod’) when the maximum low tide is close A) to sunrise, B) to sunset. In black dotted line the Fs level, in grey line the water level, in grey background the night periods and in white background the day periods. Fluorescence values are averaged \pm the standard deviation of 5 ‘areas of interest’ on the sediment tray

For the sandy sediment, we also recorded an increase of Fs from the high tide to the low tide maxima, and decreased after the low tide maximum (Figure 50B). The fluorescence values reached were lower (5x at the low tide maximum) than the one observed for muddy sediment. The area under the curve (integrate) and the maximum Fs values were calculated for the experiments on the muddy sediment. The integrate value was calculated for the duration of the experiment (24 h). This approach allowed us to analyze the same way the MPB migration that occurred in the middle of the daytime and the ones that occurred closer to the sunset and sunrise.

Overall, the integrate values ranged from 5.71 to 169.85. When plotted as function of the tidal coefficient (Figure 51A), although the repartition was rather random, the maximum of the integrate value was observed for tidal coefficients of 80 ± 10 . When plotted vs. the low tide time maximum (Figure 51B), a clearer pattern was observed. Although the lowest values were recorded for all times, there was a clear increase of the integrate value around the solar noon (gray part of the graph; around 13h00). When plotted vs. date (Figure 51C), the maximum integrate values were reached during winter, they decreased afterwards to reach a minimum during summer and they increased again towards the next winter. Similar features re found for the maximum value (see supplemental Figure S5).

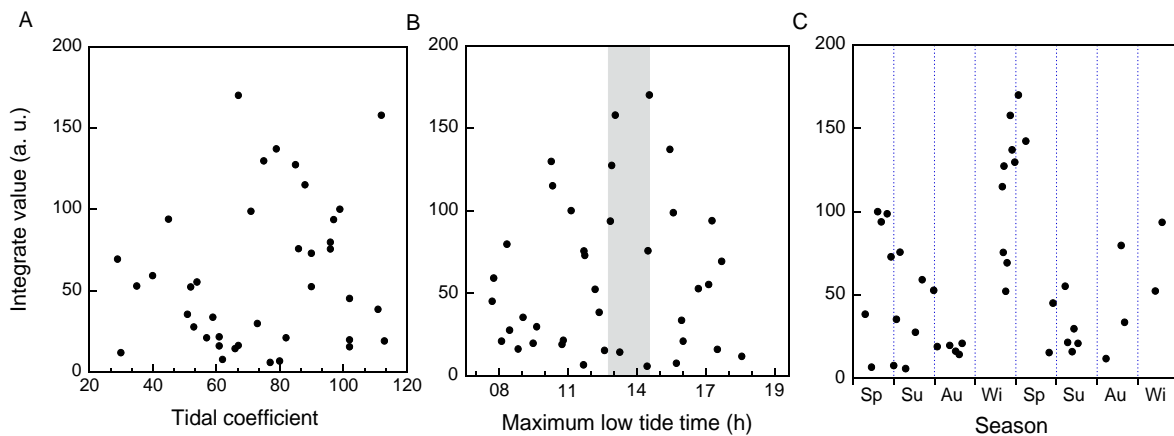


Figure 51 : Integrate values calculated from the muddy sediment as function of the A) tidal coefficient, B) maximum low tide time and C) season (season abbreviations are Sp, Spring; Su, Summer; Au, Autumn; Wi, Winter). Tidal coefficient and low tide time were retrieved from the Service Hydrographique et Océanographique de la Marine (SHOM) at the sampling site.

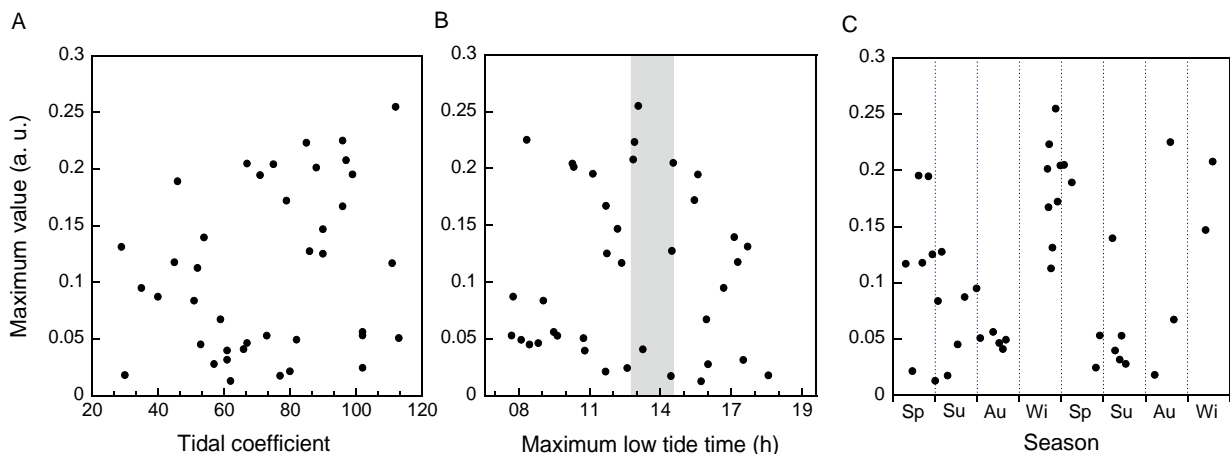


Figure S5 : Maximum chlorophyll fluorescence values calculated from the muddy sediment as a function of the A) tidal coefficient, B) low tide timing (00 h) and C) date (month abbreviations are shown). Tidal coefficient and low tide time were retrieved from the Service Hydrographique et Océanographique de la Marine (SHOM) at the sampling site.

Migration pattern of epipellic microphytobenthos under different light regimes

Experiments were carried out with different light regimes for the muddy sediment. Figure 52A shows the F_s level recorded over two days of experiments. The first day, F_s shown a classical pattern (see Figure 50A) i.e. no/low F_s at night, starting of the migration just after the high tide and F_s maximum synchronized with the maximum diurnal low tide. The second day, the sediment was exposed to complete artificial darkness. In darkness, F_s followed the same pattern as under ambient light conditions, but with a lower maximum (0.15 vs. 0.2) value than the one reached during the first day.

Figure 52B shows a similar experiment where artificial darkness was replaced by continuous artificial light during the second day. During the first day, F_s evolved in a similar way as in Figure 52A reaching the same maximum F_s value (0.2). During the second day, under continuous white light, F_s immediately increased with the start of the light exposure and slowed down to a plateau around the night low tide maximum, reaching 0.1. During the following daytime period, F_s increased slower as usual during the flood period and at ebb F_s largely increases to reach values around 0.32 at the low tide maximum before it started to decrease until the end of the experiment reaching values around 0.22 at the high tide maximum which was much higher than during the first tidal cycle (0.11).

In Figure 52C, the purpose of the experiment was to desynchronize the MPB migration from the tidal cycle. During the first 24 h, the sediment was exposed to a continuous white light and darkness were applied during the daytime and nighttime periods, respectively. F_s increased from the high tide to the low tide times where maximum value was reached (0.28). During the nighttime, F_s decreased to a value of about 0.1 at high tide maximum and then increased with the night low tide. When light was switched on again to mimic the sunrise, F_s went on rising until artificial darkness was imposed at daytime. During the following days, the same artificial light regime was maintained with darkness during daytime and artificial continuous light during nighttime. During the first day of the inverted light regime, the F_s pattern was still synchronized with the in situ tidal cycle at the sampling site. Nevertheless, over the following days, the MPB migration pattern progressively lost its synchronization with the tidal cycle and started to synchronize to the light period with a maximum F_s nearly corresponding to the nighttime high tide maximum after 4 days of this light inverted regime.

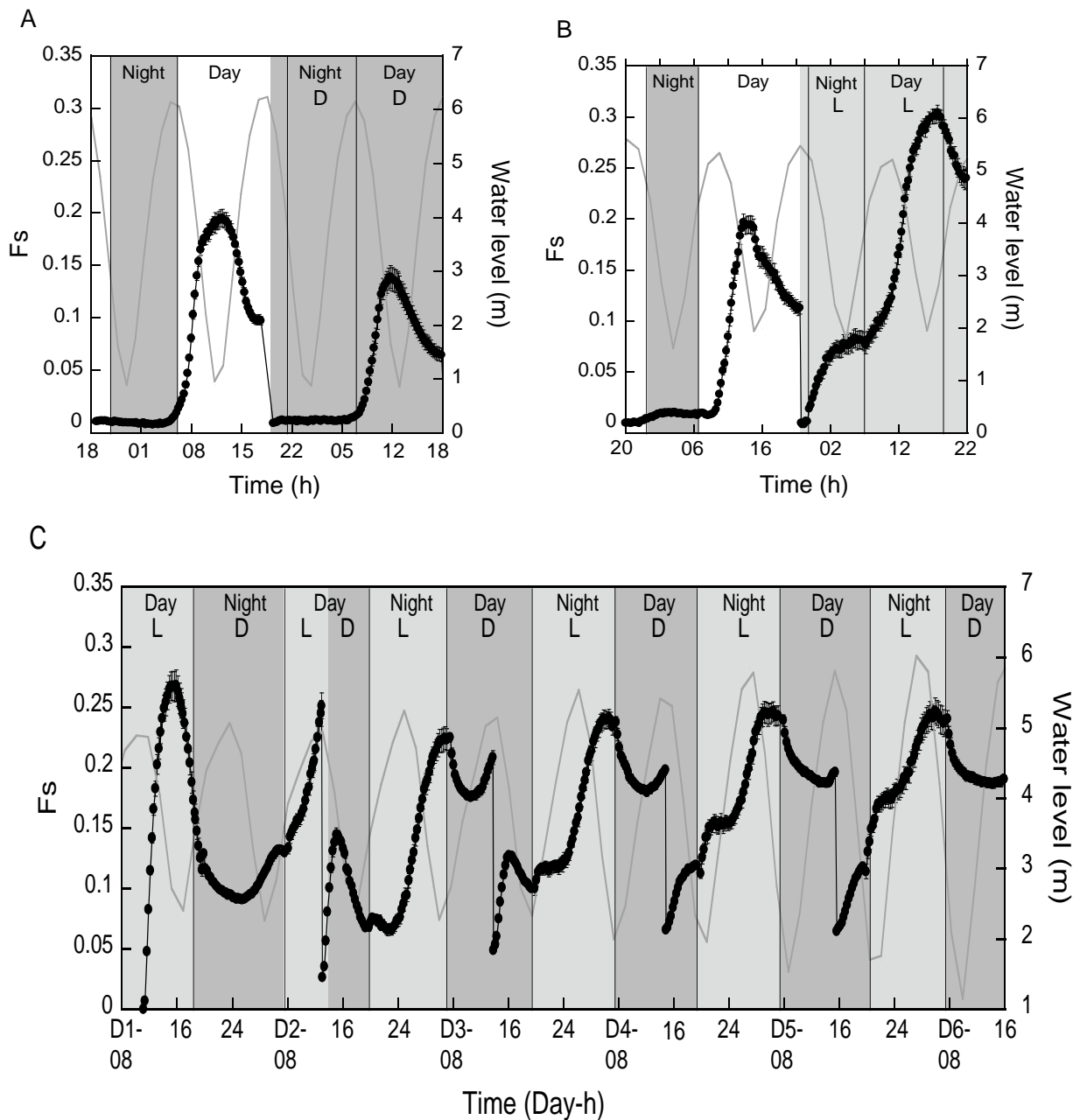


Figure 52 : Chlorophyll *a* fluorescence (F_s) of the epipellic MPB of muddy sediment and water level (m) as function of the time (00 h) measured under different light regimes: A) Ambient conditions for the first tidal cycle and darkness (D) for the second tidal cycle, B) Ambient conditions for the first tidal cycle and continuous artificial white light (L) for the second tidal cycle, C) Continuous artificial white light (L) followed by darkness (D) for the first tidal cycle and inverted light regime for the four following tidal cycles. In black dotted line the F_s level, in grey line the water level, in bold grey background the dark period, in light grey background the light period, and in white background the daytime period. F_s values were averaged \pm the standard deviation of 5 'areas of interest' on the sediment tray.

Migration pattern of epipellic microphytobenthos under different light intensities and qualities

The different light qualities had differential effects on the integrate value at all seasons (i.e. experiments with the same light conditions were performed at different seasons and were compiled in Figure 53 and Table S10). Under darkness, migration still occurred to 39 ± 1.71 % of the ambient conditions ($p < 0.05$). Under constant high 'white' light ($350 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), there was no significant changes of the integrate value while it increased to 144 ± 2.93 % ($p < 0.005$) of ambient light under medium 'white' light ($120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and it decreased to 69.25 ± 21.15 % of ambient light under low 'white' light treatment ($20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (although it was not significantly different from the ambient light and the high 'white' light, but significantly different from the medium 'white' light ($p < 0.05$)). The red light conditions ($180 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) did not significantly change the integrate value ($p > 0.05$) whether it was enriched with far red light (123.24 ± 26.78 %) or not (111.28 ± 16.49 %). Green light of $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (our set-up did not provide a stronger green light) did not significantly change the integrate value (127 ± 27.49 % of ambient conditions). When the green light was decreased to $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, results were similar to the one obtained in darkness with a significant decrease of the integrate value (46 ± 8.64 %, $p < 0.05$) in comparison to ambient light. It was the blue light which provided the most significant maximum increase of the integrate value (175.7 ± 37.78 %) ($p < 0.05$) for integrate light intensity of $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. The integrate value decreased with the blue light intensity : 101 ± 6.08 % for $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (not significantly different from the ambient light, but significantly lower than the high blue light ($p < 0.005$)) and 75 ± 2.77 % for $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (significant decrease from ambient light ($p < 0.05$), high ($p < 0.05$) and medium ($p < 0.005$) blue lights). The maximum value was also impacted by the light conditions with a similar pattern (Fig S5) although to different extents. The most significant changes were a diminution of the maximum value for the darkness (39.13 ± 4.97 %) and the green light ($10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (38.73 ± 5.49 %) treatments.

Among the different light conditions tested, the highest values of integrate and maximum values were obtained for light ('white' and blue wavelengths) of $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; lower and higher intensities, whatever the wavelengths generated no changes or a decrease. This effect was true whatever the season albeit the MPB biomass difference during ambient conditions (see Figure 51C).

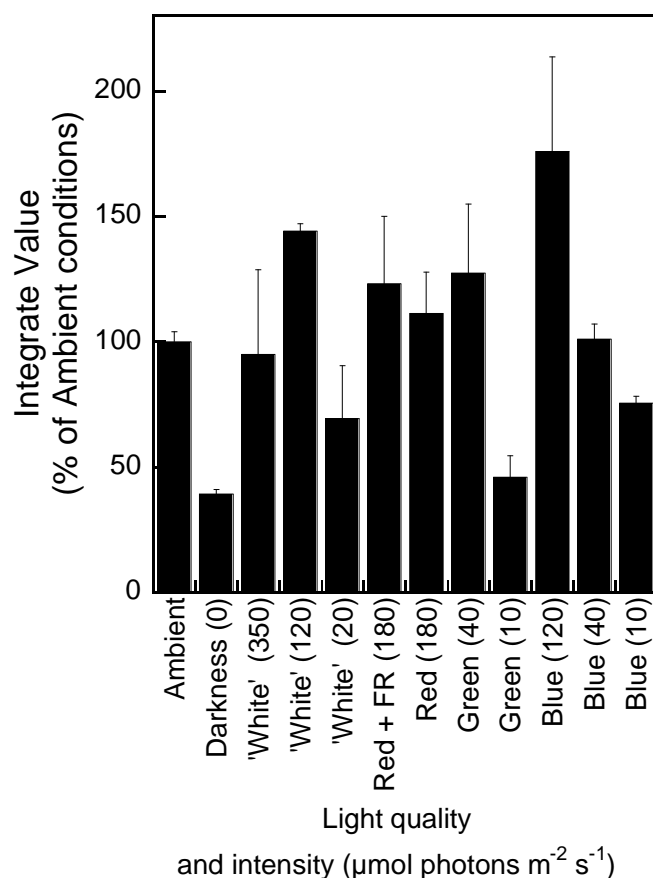


Figure 53 : Integrate values (in % of the ambient conditions) reported to the ones of the first day under different light qualities. Integrate values are averaged \pm the standard deviation from all the experiments under the same light conditions ($n = 3$). The light conditions were: ambient (natural photoperiod), darkness ($0 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), 'white' light ($350, 120, 20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 455 nm and 557 nm maximum wavelengths), red light (with and without far red-FR) ($180 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 673 nm), green light ($40, 10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$; 520 nm), and blue light ($120, 40$ and $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 471 nm).

Table S10 : Significance (student test, $p > 0,005$) of the difference between the different light conditions tested in Figure 4. Abbreviations: Integrate = significant difference of the Integrate value; ValMax = significant difference of the Maximum values; ValMax+Integrate = both were significant. Light intensities ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) are given in between brackets

	Ambient	Darkness (0)	'White' (350)	'White' (120)	'White' (20)	Red + Far Red (180)	Red (180)	Green (40)	Green (10)	Blue (120)	Blue (40)	Blue (10)
Ambient		Integrate		Integrate					Integrate	Integrate		Integrate
Darkness (0)	Integrate			ValMax + Integrate		Integrate	ValMax + Integrate	ValMax + Integrate		ValMax + Integrate	ValMax + Integrate	ValMax + Integrate
'White' (350)								ValMax		Integrate		
White (120)	Integrate	ValMax + Integrate			Integrate				ValMax + Integrate		Integrate	Integrate
'White' (20)				Integrate						Integrate	Integrate	
Red + Far Red (180)		Integrate										
Red (180)		ValMax + Integrate							ValMax			
Green (40)		ValMax + Integrate	ValMax						ValMax + Integrate		ValMax	
Green (10)	Integrate			ValMax + Integrate			ValMax	ValMax + Integrate		ValMax + Integrate	ValMax + Integrate	ValMax
Blue (120)	Integrate	ValMax + Integrate	Integrate		Integrate				ValMax + Integrate		ValMax + Integrate	Integrate
Blue (40)		ValMax + Integrate		Integrate	Integrate			ValMax	ValMax + Integrate	ValMax + Integrate		Integrate
Blue (10)	Integrate	ValMax + Integrate		Integrate					ValMax	Integrate	Integrate	

Effect of blue light on the epipellic microphytobenthos pigment composition during migration

During the experiments carried out with blue light of different intensities (10, 40 and 120 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, Figure 53) sediment was sampled at three different timings of the emersion period (at maximum low tide time and 3 h before and after). Pigments were extracted at three different depths: 0-200 μm , 200-400 μm and 400-600 μm and expressed relative to Chl *a* in order to discard any pigment changes due to biomass seasonal and tidal evolution (see Figure 51). As expected, the pigment content of microphytobenthos was significantly different (but diadinoxanthin, DD) between Summer and Winter with lower chlorophyll *c* (Chl *c*) and fucoxanthin (Fx) and higher β -carotene (β -Car), diatoxanthin (DT) and consequently higher DD+DT and DES (Table 5). The highest difference was the DT content (and DES) which was on average 63% lower in Winter. These differences were similar whatever the depth and emersion timing with the noticeable exception of i) DD+DT at the surface of sediment, ii) Fx at 600 μm depth and at the end of the emersion, iii) of all pigments but DT (and DES) at the maximum low tide time (Table 5). The content of blue light absorbing pigments (Chl *c*, Fx, DD and β -Car) was compared in all blue light conditions with the corresponding ambient conditions (Table 5, Table S12 and Table S13). The most significant differences were observed for the DD content which was lower in blue light conditions whatever the season and the light intensity at different depths and emersion timings. Noteworthy is the decrease of the significance of the difference with increasing light intensity, i.e. the higher the intensity the lower the difference between blue light and ambient conditions. Chl *c* showed no difference with ambient conditions whatever the season, depth and emersion timing (Table 5, Table S12 and Table S13). Limited differences were observed for Fx and β -Car, as well as for DES (Table 5, Table S12 and Table S13). On the overall the only pigment which increased in blue light conditions compared to ambient light conditions was Fx: in Winter under 120 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ at 200-400 μm depth (D2) and at the beginning of low tide (D1) but the difference remained low ($< 10\%$) (Table 5, Table S12 and Table S13)).

Table S11 : Pigment content relative to Chl a (mol. 100 mol Chl a-1) under ambient light conditions in muddy sediment harvested in Winter (02/21 to 03/14) and in Summer (06/05 to 07/27). Abbreviations: β -Car, β -carotene; Chl c, chlorophyll c; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; Fx, fucoxanthin; DES, DD de-epoxidation state [DES = DT / (DD+DT) x 100], SD, standard deviation. Values are averaged \pm the SD (n = 3). The significance of the difference between mean values was tested with the student test: red, P > 0.05 no significance; orange *, P < 0.05 significance; light green **, P < 0.01 significance; bold green *, P < 0.001 significance.**

		SD		SD					
Chl c	7,77	1,85	9,98	1,75	***				
Fx	42,02	2,87	44,44	4,98	*				
DD	12,93	1,87	12,51	2,02					
DT	2,27	0,65	0,73	0,26	***				
β -Car	4,23	0,93	2,80	1,31	***				
DD+DT	15,20	2,25	13,24	2,19	**				
DES	14,85	3,14	5,45	1,51	***				
Summer			Winter			Summer		Winter	
0-200 μm, whole emersion				3 h before max low tide, whole 600 μm					
		SD		SD		SD		SD	
Chl c	8,22	1,52	10,83	1,89	7,40	1,49	10,29	1,98	
Fx	41,31	2,44	45,61	6,44	42,91	3,38	44,29	4,44	
DD	12,91	1,91	13,25	2,67	13,40	0,96	12,66	2,03	
DT	1,97	0,58	0,92	0,26	2,20	0,66	0,65	0,28	
β -Car	4,12	0,93	3,53	1,79	4,37	0,80	2,58	1,54	
DD+DT	14,88	2,20	14,17	2,88	15,60	0,72	13,32	2,26	
DES	13,23	2,98	6,42	1,34	14,11	4,26	4,78	1,48	
200-400 μm, whole emersion				At max low tide, whole 600 μm					
Chl c	7,54	1,85	9,29	1,75	8,48	1,80	9,36	1,71	
Fx	40,91	2,85	45,03	5,13	42,20	1,96	44,00	5,22	
DD	13,18	1,96	12,21	2,05	11,89	2,31	12,22	2,33	
DT	2,27	0,70	0,55	0,16	1,89	0,47	0,70	0,24	
β -Car	4,31	1,05	2,36	0,81	3,81	0,82	3,12	1,42	
DD+DT	15,45	2,48	12,76	2,15	13,78	2,63	12,92	2,52	
DES	14,48	3,05	4,26	0,94	13,71	2,19	5,38	1,25	
400-600 μm, whole emersion				3 h after max low tide, whole 600 μm					
Chl c	7,55	2,28	9,81	1,33	7,30	2,07	10,28	1,52	
Fx	44,12	2,50	42,69	2,47	41,16	3,42	45,04	5,60	
DD	12,69	1,98	12,07	0,89	13,64	1,50	12,66	1,81	
DT	2,57	0,58	0,73	0,20	2,71	0,57	0,83	0,23	
β -Car	4,28	0,92	2,51	0,87	4,57	1,04	2,69	0,95	
DD+DT	15,26	2,35	12,80	0,99	16,35	1,86	13,49	1,91	
DES	16,84	2,55	5,66	1,39	16,47	2,72	6,18	1,56	

Table 5 : Significance of microphytobenthos pigment changes in muddy sediment exposed to blue light exposure of different intensities relative to ambient light conditions harvested in A) Summer, and B) Winter. Abbreviations: β -Car, β -carotene; Chl *c*, chlorophyll *c*; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; D1, depth 0-200 μm ; D2, depth 200-400 μm ; D3, depth 400-600 μm ; Fx, fucoxanthin; DES, DD de-epoxidation state [DES = DT / (DD+DT) x 100]; T1, 3 h before the maximum low tide; T2, maximum low tide; T3, 3 h after the maximum low tide. The significance of the difference between mean values was tested with the student test: red, $P > 0.05$ no significance; orange *, $P < 0.05$ significance; light green **, $P < 0.01$ significance; bold green *, $P < 0.001$ significance.**

A	10 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$						40 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$						120 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$					
	D1	D2	D3	T1	T2	T3	D1	D2	D3	T1	T2	T3	D1	D2	D3	T1	T2	T3
Chl <i>c</i>																/		
Fx				*												/		
DD	*	*		*	*	***					**	*				/		
β -Car																/		
DES					*	*										/		

B	40 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$						120 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$					
	D1	D2	D3	T1	T2	T3	D1	D2	D3	T1	T2	T3
Chl <i>c</i>												
Fx								**		*		
DD	**	**		*		*			*			*
β -Car	*											
DES							*					*

Table S12 Microphytobenthos pigment content relative to Chl *a* (mol. 100 mol Chl *a*⁻¹) in muddy sediment exposed to blue light of three intensities (10, 40 and 120 μmol photons. m⁻². s⁻¹) and under ambient light conditions in Summer. Sediment was harvested during the microphytobenthos migration at three times (3 h before ('beginning') and after ('end'), and at the middle of the emersion). Pigments were extracted from sediment at three depths : 0-200 μm, 200-400 μm and 400-60 μm. Abbreviations: β-Car, β-carotene; Chl *c*, chlorophyll *c*; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; Fx, fucoxanthin; DES, DD de-epoxidation state [DES = DT / (DD+DT) x 100], SD, standard deviation. Values are averaged ± the SD (n = 3).

Blue 10				Ambient				Blue 10				Ambient					
0-200 μm,								Beginning of emersion,									
whole emersion								whole 600 μm									
	SD	SD			SD	SD			SD	SD			SD	SD			
Chl <i>c</i>	5,93	0,78	8,19	2,04	7,11	1,02	7,78	1,89	Chl <i>c</i>	8,41	1,92	7,95	1,89	8,04	2,17	7,02	1,24
Fx	45,57	2,60	43,61	0,88	47,75	0,74	45,66	0,95	Fx	38,98	7,10	40,68	1,49	34,27	3,54	40,16	2,24
Dd	11,85	0,50	13,48	0,84	11,93	0,23	12,69	0,36	Dd	12,52	1,58	14,09	0,65	13,52	0,71	14,11	0,81
Dt	2,42	0,70	2,59	0,29	2,00	0,37	2,67	0,35	Dt	1,50	0,44	1,68	0,40	1,83	0,58	1,73	0,55
β-Car	5,07	0,65	5,16	0,15	4,24	0,44	5,02	0,30	β-Car	3,67	0,55	3,71	0,43	3,64	0,57	3,72	0,49
DD+DT	14,28	0,63	16,08	1,11	13,94	0,42	15,36	0,23	DD+DT	14,03	1,24	15,77	0,63	15,35	0,28	15,84	1,04
DES	16,88	4,49	16,10	0,78	14,34	2,33	17,35	2,23	DES	10,9	3,83	10,62	2,42	11,93	3,81	10,86	2,96
200-400 μm,								Middle of emersion,									
whole emersion								whole 600 μm									
	SD	SD			SD	SD			SD	SD			SD	SD			
Chl <i>c</i>	6,83	1,34	8,47	1,34	5,61	0,84	7,69	1,95	Chl <i>c</i>	6,95	2,12	6,66	1,28	7,91	2,09	7,87	1,89
Fx	46,08	3,59	43,68	2,37	43,18	1,62	43,46	1,15	Fx	39,34	5,58	39,33	1,89	42,90	2,83	42,69	1,36
Dd	10,99	1,08	13,71	0,88	10,81	0,93	13,32	0,11	Dd	11,78	1,01	14,17	1,34	11,27	0,65	13,54	0,09
Dt	2,37	0,47	2,64	0,22	2,76	0,51	2,45	0,06	Dt	2,11	0,49	2,02	0,77	1,40	0,18	1,75	0,24
β-Car	4,59	0,74	5,13	1,15	5,27	0,09	4,76	0,66	β-Car	3,91	0,25	3,81	0,84	3,96	0,26	3,55	0,12
DD+DT	13,36	1,3	16,35	1,10	13,57	1,43	15,77	0,15	DD+DT	13,89	1,28	16,19	2,11	12,67	0,64	15,29	0,26
DES	17,74	2,7	16,11	0,33	20,19	1,73	15,51	0,23	DES	15,12	2,84	12,20	2,97	11,07	1,52	11,44	1,41
400-600 μm,								End of emersion,									
whole emersion								whole 600 μm									
	SD	SD			SD	SD			SD	SD			SD	SD			
Chl <i>c</i>	6,39	1,25	7,47	2,68	6,43	1,07	8,65	2,40	Chl <i>c</i>	6,51	1,52	6,42	1,78	5,92	0,34	6,14	1,74
Fx	46,86	1,61	46,27	1,79	47,59	0,48	44,45	3,26	Fx	39,73	1,81	43,41	1,10	40,88	1,89	39,15	1,29
Dd	11,86	0,39	13,43	1,22	11,96	0,34	14,61	0,21	Dd	12,17	1,26	13,81	0,50	11,69	0,52	14,43	1,13
Dt	2,80	0,41	2,90	0,44	2,84	0,08	3,02	0,18	Dt	2,04	0,74	2,57	0,66	2,43	0,38	2,78	0,61
β-Car	5,09	0,40	4,94	0,30	5,25	0,36	5,46	0,76	β-Car	4,21	0,50	4,31	1,03	4,19	0,46	4,55	1,07
DD+DT	14,66	0,28	16,32	1,43	14,80	0,29	17,62	0,34	DD+DT	14,22	1,84	16,38	0,71	14,12	0,86	17,21	1,25
DES	19,11	2,7	17,75	2,28	19,19	0,83	17,10	0,78	DES	14,12	3,89	15,6	3,56	17,14	1,80	16,12	3,34

Table S 13: Microphytobenthos pigment content relative to Chl *a* (mol. 100 mol Chl *a*⁻¹) in muddy sediment exposed to blue light of three intensities (10, 40 and 120 μmol photons. m⁻². s⁻¹) and under ambient light conditions in Winter. Sediment was harvested during the microphytobenthos migration at three times (3 h before ('beginning') and after ('end'), and at the middle of the emersion). Pigments were extracted from sediment at three depths : 0-200 μm, 200-400 μm and 400-600 μm. Abbreviations: β-Car, β-carotene; Chl *c*, chlorophyll *c*; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; Fx, fucoxanthin; DES, DD de-epoxidation state [DES = DT / (DD+DT) x 100], SD, standard deviation. Values are averaged ± the SD (n = 3).

Blue 40				Ambient				Blue 40				Ambient			
0-200 μm,								Beginning of emersion,							
whole emersion								whole 600 μm							
	SD		SD		SD		SD		SD		SD		SD		
Chl <i>c</i>	12,26	2,85	11,03	1,74	12,94	2,75	10,80	0,91							
Fx	45,88	3,38	49,07	7,36	46,31	3,38	47,05	4,22							
Dd	11,47	1,02	15,45	1,97	11,65	0,84	14,18	1,66							
Dt	0,766	0,56	1,08	0,12	0,57	0,42	0,80	0,27							
β-Car	1,934	0,57	4,56	1,94	1,75	1,16	3,41	1,75							
DD+DT	12,24	1,15	16,52	2,092	12,37	1,28	14,98	1,85							
DES	6,143	4,22	6,53	0,16	5,65	1,90	5,30	1,37							
200-400 μm,								Middle of emersion,							
whole emersion								whole 600 μm							
	SD		SD		SD		SD		SD		SD		SD		
Chl <i>c</i>	12,24	2,44	9,60	1,08	11,65	3,00	9,22	1,71							
Fx	46,60	2,55	48,33	5,43	46,30	2,55	46,78	5,98							
Dd	11,50	1,13	13,86	0,86	11,88	0,64	13,75	2,08							
Dt	0,57	0,40	0,60	0,16	0,79	0,62	0,79	0,29							
β-Car	2,519	1,4	2,62	0,81	2,35	0,88	3,58	1,89							
DD+DT	12,16	1,21	14,46	1,00	12,67	0,22	14,54	2,28							
DES	5,68	2,62	4,10	0,82	6,21	4,91	5,38	1,49							
400-600 μm,								End of emersion,							
whole emersion								whole 600 μm							
	SD		SD		SD		SD		SD		SD		SD		
Chl <i>c</i>	9,64	1,75	9,79	1,70	10,44	1,83	10,40	1,77							
Fx	45,75	1,69	44,42	1,75	45,81	2,36	47,99	6,87							
Dd	11,01	1,56	12,30	0,75	10,70	1,46	13,68	1,98							
Dt	0,62	0,23	0,77	0,17	0,61	0,21	0,86	0,23							
β-Car	2,516	0,83	2,23	0,90	2,72	0,87	2,42	1,18							
DD+DT	11,63	1,34	13,08	0,68	11,31	1,28	14,54	2,07							
DES	5,56	2,81	5,95	1,43	5,65	2,57	5,91	1,49							
Blue 120				Ambient				Blue 120				Ambient			
0-200 μm,								Beginning of emersion,							
whole emersion								whole 600 μm							
	SD		SD		SD		SD		SD		SD		SD		
Chl <i>c</i>	8,506	2,35	10,64	2,17	10,58	4,47	9,78	2,67							
Fx	43,53	1,34	42,15	2,88	43,76	0,98	41,52	2,69							
Dd	10,52	0,59	11,06	0,48	10,56	0,42	11,15	0,94							
Dt	0,454	0,17	0,76	0,28	0,28	0,07	0,51	0,22							
β-Car	2,575	1,26	2,50	0,84	1,78	0,99	1,75	0,70							
DD+D	10,97	0,68	11,82	0,72	10,84	0,48	11,66	1,11							
DES	4,099	1,41	6,31	1,98	2,59	0,55	4,26	1,53							
200-400 μm,								Middle of emersion,							
whole emersion								whole 600 μm							
	SD		SD		SD		SD		SD		SD		SD		
Chl <i>c</i>	9,46	4,15	8,99	2,32	9,61	3,11	9,51	1,85							
Fx	44,44	0,71	41,73	1,50	43,89	1,44	41,23	2,41							
Dd	10,16	1,30	10,56	1,39	10,47	1,29	10,69	1,42							
Dt	0,36	0,10	0,49	0,16	0,49	0,13	0,61	0,18							
β-Car	2,782	1,02	2,10	0,77	3,44	0,63	2,67	0,61							
DD+D	10,52	1,3	11,05	1,5004	10,96	1,37	11,30	1,56							
DES	3,506	1,03	4,408	1,1097	4,49	0,95	5,38	1,10							
400-600 μm,								End of emersion,							
whole emersion								whole 600 μm							
	SD		SD		SD		SD		SD		SD		SD		
Chl <i>c</i>	10,79	2,77	9,82	1,01	8,75	2,41	10,16	1,40							
Fx	42,75	1,42	40,96	1,76	42,96	1,53	42,09	1,01							
Dd	10,65	0,60	11,85	1,02	10,36	0,60	11,63	0,88							
Dt	0,48	0,16	0,69	0,23	0,51	0,12	0,81	0,26							
β-Car	3,14	1,06	2,79	0,81	3,11	0,96	2,96	0,65							
DD+D	11,13	0,71	12,53	1,23	10,87	0,67	12,44	1,06							
DES	4,264	1,25	5,37	1,41	4,64	0,90	6,44	1,71							

IV. Discussion

Measurement of the PAB at the surface of sediment by Imaging-PAM fluorimetry

In this study we have used an Imaging-PAM fluorometer, which contrasts with the other PAM fluorometers by the measurement of the surface of the sediment only (Consalvey *et al.*, 2005, Vieira *et al.*, 2013a) in a rapid and non-intrusive way (Consalvey *et al.*, 2005, Kromkamp et Forster, 2006). The measurement of the F_0 level is known to be a good proxy for the MPB biomass (Kromkamp et Forster, 2006) but it requires a darkening of the sediment sample which in the case of epipellic diatoms (Ting et Owens, 1993, Consalvey *et al.*, 2004a, Jesus *et al.*, 2006b) that in sediment experiments, can induce a decrease in biomass. In order to avoid MPB biomass decrease which would have interfered with the recording of MPB migration, we used F_s (which correspond to the F_0 of sediment not acclimated to dark) for assessing the evolution of PAB (Consalvey *et al.*, 2005). The measuring beam of the Imaging-PAM penetrates only the top 200 μm (Consalvey *et al.*, 2005) which is the depth where most of the epipellic MPB biomass is located during emersion when it is exposed to light (Consalvey *et al.*, 2004b). Previous studies have found a linear relationship between minimum fluorescence (F_0) and MPB biomass in sediment in laboratory and *in situ* (Serôdio *et al.*, 1997, Barranguet *et al.*, 1998, Serôdio *et al.*, 2001, Honeywill *et al.*, 2002). To our knowledge, the present study is the first successful attempt for defining a correlation between the surface sediment Chl *a* content and the F_s Chl *a* fluorescence. A good correlation was found between the two proxy of MPB biomass ($r = 0.923$), which was as good as the ones found between Chl *a* content and F_0 ($r = 0.965$ in (Serôdio *et al.*, 2006a) and 0.84 in (Honeywill *et al.*, 2002). Nevertheless, the F_s -Chl *a* correlation was not good anymore for high Chl *a* contents (over 0.2). This can be explained by the lowering of the detecting beam in the tens μm of sediment due to the dense MPB biofilm and/or by the lowering of the detection of the emitted fluorescence which could partly be reabsorbed by the top surface layers of the MPB biofilm. Nevertheless, in our experimental conditions most of the F_s signal could be converted into Chl *a* content. F_s measured by an Imaging-PAM is therefore a valuable proxy for assessing the PAB at the surface of sediment.

Microphytobenthos migration patterns

In the present study, migration patterns of epipelagic MPB in muddy sediment under ambient light can be divided in three cases. The first concerns migration that occurs when the maximum low tide timing is around the solar noon. It corresponds to the ‘classic’ migration pattern as defined by (Consalvey et al., 2004b) : the migration of epipelagic diatoms to the sediment surface occurs as the water retreats and it is followed by a downward migration in anticipation of the incoming water towards the end of emersion. The use of the Imaging-PAM for continuous measurements enabled the observation of the less ‘classical’ patterns which corresponds to special photoperiod conditions which for a long time could not be observed and sometimes were even supposed not to exist (Aleem, 1950). Two different patterns could be observed in our experimental conditions: 1) when the maximum low tide was close to the sunrise and the MPB migration was shifted (both the beginning of the upward and downward migration) by a maximum of one hour compared to the timing migration should have already occurred; 2) when the maximum low tide was close to the sunset when downward migration started at the sunset ahead of the end of emersion. Among these three patterns several intermediary patterns exist (Happy-Wood et Jones, 1988). Even if MPB biomass varied from a season to another, these migration patterns were still observed (although their amplitude was different, see below) throughout the year as also reported before (Underwood et al., 2005).

Epipelagic MPB migration during night was also observed; nevertheless it is unclear if it is an artifact of our experimental conditions. Many authors have been convinced that there is no migration during night emersion (Aleem, 1950, Harper, 1969) while others could observe it (Serôdio et al., 1997). In the case of the utilization of the Imaging-PAM, MPB migration by night could be generated by the detecting beam which, even if it is non-actinic in theory, could be detected by the cells located in the upper layer of sediment and could have a positive effect on their migration (see below).

In sandy sediment, changes in F_s related to the tidal cycle were also observed as previously reported (Consalvey et al., 2004a). The extent of the migration pattern was nevertheless much lower than in the case of epipelagic MPB in muddy sediment. The MPB community inhabiting the site where the sediment was harvested is known to be dominated by epipsammic diatoms (Méléder et al., 2007). The epipsammic group comprises non-motile forms which are firmly

attached to sand particles and small motile forms which display micro-movements within the sphere of individual sand grains (Barnett et al., Submitted). Although no species identifications was performed, it is likely that the small MPB biomass increased observed at the maximum low tide was due to epipsammic motile diatoms that moved towards the surface of sediment to collect a maximum of light for their photosynthesis. However, because some epipelagic species can be also found on this site (Méléder et al., 2007), it can not be excluded that part/all of the migration pattern could be due to them.

Influence of the tidal coefficient, emersion timing and season on the PAB available at the surface of sediment

The integrate value (surface area below the curve) and the maximum value reached during migration is assumed to be a proxy for the total and for the maximum photosynthetically active MPB biomass present at the surface of sediment as defined before (TPAB and MPAB, respectively) (Guarini et al., 2000, Coelho et al., 2011). MPB biomass at the surface of sediment is known to be influenced by three main factors: 1) migration of the biomass through the sediment (itself influenced by various factors as light intensity (Perkins, 1960, Paterson, 1986, Kingston, 1999b, Sauer et al., 2002), light spectrum (Cohn et al., 1999), sediment physical disturbance (Hopkins, 1966), water cover (Pinckney et al., 1994, Mitbavkar et Anil, 2004) wave action (Kingston, 1999a), temperature (Cohn et al., 2003), salinity (Sauer et al., 2002) or sub-surface nutrients (Kingston, 2002)); 2) the local biomass loss process (i.e. stress-induced mortality and benthic grazing by the surface and sub-surface deposit feeders (Guarini et al., 2006) and resuspension in the water column at high tide (Orvain et al., 2004)); and 3) the local biomass production processes (i.e. mostly cell division (Saburova et Polikarpov, 2003) in the sediment and cell settling at low tide (Méléder et al., 2005).

No clear effect of the tidal coefficient on the TPAB and MPAB could be found. It means that the MPB biomass at the surface of sediment during emersion was not affected by the water level. This is possibly due to the fact that the site where sediment was harvested is in the upper zone of the shore and exposed to regular and sharp emersion/immersion sequences whatever the tidal coefficient. As expected from the 'classical' migration pattern, there was a higher TPAB and MPAB when the maximum low tide time was around the solar noon. When the maximum low tide was shifted to the sunrise or the both TPAB and MPAB were reduced. Interestingly, even if days are longer in Summer, the maximum values of TPAB and MPAB were found in Winter with a clear decrease of TPAB and MPAB from Winter to Summer and

followed by an increase towards the next Winter. This result was coherent with our in situ observations. Several factors can explain this yearly evolution. Although high temperatures, but not extreme ones, increase the motility of epipellic diatoms (Cohn *et al.*, 2003, Du *et al.*, 2012) but remain longer at the surface of sediment at low Winter temperatures (Du *et al.*, 2010b). Most probably the main factor is the grazing rate of microphytobenthos by *Peringia* sp.. Goldfinch and Carman (2000) showed that it varies throughout the year with a minimum in January and a maximum in May. In the site where the sediment was harvested, the biomass of the mud snail *Peringia* sp. was shown to follow this pattern but with a maximum in Summer. Hence, temperature and grazing rate could well explain the yearly TPAB and MPAB pattern observed: in Winter, MPB stays longer at the sediment surface and its biomass is not impacted by predation while in Summer both extreme environment (especially temperature and light) and strong predation generated a dramatic decrease in TPAB and MPAB.

Influence of the light regime on the microphytobenthos migration pattern

It is still unclear which factor between photoperiod and tidal cycle mainly control the migratory rhythm. Some authors proposed it is the tidal rhythm which is the driving force (Perkins, 1960, Paterson, 1986, Du *et al.*, 2012), others do not distinct between tides and tidal cycles (Aleem, 1950, Haphey-Wood et Jones, 1988, Pinckney et Zingmark, 1991, Underwood et Kromkamp, 1999, Consalvey *et al.*, 2004b, de Brouwer *et al.*, 2006, Coelho *et al.*, 2011) and others proposed that migration is primarily driven by an internal clock (Consalvey *et al.*, 2004b, Kromkamp et Forster, 2006).

Our experiments clearly show that migration can occur in total darkness, but with a lower amplitude as reported before (Sauer *et al.*, 2002), which tend to prove that light is not the main factor driving the migratory rhythm. When the sediment was exposed to continuous light, the MPAB increased, hence light can obviously modulate the 'intensity' of migration. Finally, when we totally desynchronize the natural photoperiod cycle from the tidal cycle of the sampling site, migration rhythm first remained synchronized to the tidal cycle irrespective of artificial 'day/night' succession. After few days, it progressively shifted from a synchronization with the tidal cycle to a synchronization to the artificial photoperiod. Hence, it seems that the migratory rhythm is first driven by the tidal cycle, possibly via an endogenous clock (Consalvey *et al.*, 2004b, Kromkamp et Forster, 2006) and that photoperiod can, on top of it, modulate this internal rhythm. This is even more conclusive than in our

experimental conditions, there was no real alternation of true emersion/immersion periods (i.e. immersion was mimicked only once per 24 h by mixing the sediment with fresh seawater)

Influence of the light intensity and quality on the TPAB available at the surface of sediment

In order to better decipher light as a modulator of the migratory rhythm, the effect of its intensity and quality were explored. It is known that both light intensity (Kingston, 1999b, Sauer *et al.*, 2002, Serôdio *et al.*, 2006a, Kingston et Gough, 2009, McLachlan *et al.*, 2009) and spectral composition (Cohn *et al.*, 2004, Wenderoth et Rhiel, 2004, McLachlan *et al.*, 2009) can induce upward migration and biofilm formation at the sediment surface, or conversely, promote the downward movement and decrease the surface biomass (Sauer *et al.*, 2002, Mitbavkar et Anil, 2004, Jesus *et al.*, 2005, Serôdio *et al.*, 2006a, McLachlan *et al.*, 2009, Perkins *et al.*, 2010a). We prospected for similar effects with a larger range of spectral quality and intensity as well as over different seasons. Darkness exposure indeed carried a decrease of the TPAB and 'white' light exposure of moderate intensity ($120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) increased the TPAB as reported before (Sauer *et al.*, 2002). MPAB was also decreased by darkness exposure but surprisingly there was no significant change during 'white' light exposure. For higher and lower intensity of 'white' light (350 and $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), TPAB and MPAB recorded were lower. Serôdio *et al.* (2006a) showed the existence of a biphasic pattern in the MPB migration *vs.* light intensity with an increase of TPAB and MPAB from darkness to $100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, a plateau between 100 - $250 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, and a gradual decrease irradiances higher than $250 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ indicating a strong photophobic downward migratory response. In our experimental conditions, it seems that 120 - $180 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ was the optimal intensity to reach maximum TPAB and MPAB.

Kühl and Jorgensen (1994) showed that in sandy sediment, light spectrum was attenuated from full spectrum at the surface (including infrared and far-red radiations) to be progressively enriched in blue-green wavelengths deep in the sediment. Blue wavelength had a strong effect on TPAB, this effect was intensity dependent. While $120 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ of blue light promoted a stronger effect than 'white' light of the same intensity, $40 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ had no significant effect compared to the ambient conditions and at $10 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ TPAB was decreased. This effect was independent of the season during which the experiments were carried out (Summer and Winter). The blue light positive effect on

migration was not due to a higher synthesis of blue absorbing pigments whatever the depth and timing of emersion. The positive effect of blue light on MPB upward migration is in accordance with previous report (Wenderoth et Rhiel, 2004). Green wavelength of 40 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ had a similar effect to blue wavelength of the same intensity and to red wavelength of 4.5x higher intensity (irrespective of far-red radiation). In contrast green wavelength of 10 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ had a lower effect than blue wavelength of the same intensity and a similar negative effect on migration than darkness. These results fit well with the change in the light spectrum with depth, i.e. even low fluences of blue light, as encountered deep in the sediment, can promote migration while higher intensity of green and red radiations are needed. In diatoms, blue light photoreceptors are known to regulate circadian endogenous rhythms related to photosynthesis and to cell cycle (Depauw et al., 2012). Recently, a family of blue photoreceptors, the aureochromes, was identified as key regulator of the diatom cell cycle (Takahashi *et al.*, 2007, Huysman *et al.*, 2013). Blue light was indeed shown to increase the settlement and cell division of benthic diatoms (*Navicula sp.*) (Cao et al., 2013) while red, green and yellow wavelengths have a negative effect. Aureochromes and blue wavelengths were also shown to be involved in the photoacclimation of diatoms to high light intensity with a complex interaction with red wavelengths (Schellenberger Costa *et al.*, 2013a, Schellenberger Costa *et al.*, 2013b). The strong positive effect of blue light could then be explained by its possible involvement in the endogenous clock that regulate the migratory rhythm as a function of the tidal cycle (and thus light availability) and its involvement in the diatom cell division. This effect would be even stronger when the proportion of monochromatic blue wavelength is increased to an optimum of intensity (120 $\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) so that diatom would produce more PAB at the surface of sediment in these light conditions. The effect of red light sensing in marine diatoms is also assume to control many processes such as pigment synthesis, photoadaptation, phototaxis, movement velocity, gravitaxis and chloroplast movement in the cell (Depauw et al., 2012). In the water column, the perception of red light and more specifically of red/far-red and red/blue wavelength ratios of the water column light spectrum may allow the planktonic diatoms to perceive the water surface. In sediment, red and far-red wavelengths were shown to induce downward migration of MPB (Consalvey *et al.*, 2004a, Wenderoth et Rhiel, 2004).

One can therefore question if benthic diatoms are also able to sense ratio of different wavelengths, especially red and blue, in order to regulate their migratory rhythm as a function of light penetration in the sediment (which depends on the sediment type and on the

emersion/immersion balance) and the balance between the regulation of photosynthesis to different light intensities in the top layer of the sediment during emersion (photoacclimation) and cell division when they are deep in the sediment during immersion (Saburova and Polikarpov, 2003).

**Partie 4 : Etude exploratoire du
couplage entre rythmicité de
migration verticale et cycle de
division cellulaire du
microphytobenthos par cytométrie.**

Barnett A., Beaugeard L., Agogué H., Dupuy C. & Lavaud J.

I. Introduction

La Partie 3 a démontré l'importance de la lumière (intensité et qualité) sur la migration des diatomées épipéliques en surface du sédiment. Cet aspect de l'activité de migration des formes épipéliques est important car il détermine la présence des cellules en surface du sédiment et donc la disponibilité de la biomasse photosynthétique active pour les consommateurs (cf chapitre Partie 1B I-4-b). Cette biomasse se renouvelle majoritairement par division cellulaire végétative (Bowler *et al.*, 2010). Les connaissances actuelles sur les spécificités du cycle de division cellulaire des diatomées ont déjà été présentées dans la Partie 1-B (cf chapitre II-4.). Il comporte une phase végétative (multiplication par mitose) dominante, qui entraîne une décroissance en taille des cellules jusqu'à un seuil minimal, et une phase de reproduction sexuée permettant aux cellules de récupérer leur taille maximale d'origine.

L'hypothèse de Saburova et Polikarpov (2003) est celle actuellement admise par la communauté scientifique. Ces auteurs suggèrent un découplage entre la division cellulaire et la photosynthèse chez les diatomées épipéliques : la division cellulaire se déroule en profondeur dans le sédiment et donc à l'obscurité lors des immersions, alors que la photosynthèse (au moins la photochimie, cf chapitre Partie 1-B III-1, Partie 1-C) a lieu en surface du sédiment à la lumière lors des émergences. Toutefois, la méthodologie proposée pour supporter cette hypothèse, se basant uniquement sur des comptages cellulaires effectués en microscopie, ne nous paraît pas suffisante pour l'accepter de manière irréfutable. C'est pourquoi nous proposons une approche alternative, originale et novatrice qui est l'utilisation de la cytométrie en flux afin d'appréhender au mieux ce couplage.

L'utilisation de la cytométrie en flux permet de mesurer les différentes phases du cycle de division cellulaire par mesure de la fluorescence de l'ADN marqué par des sondes fluorescentes (Claquin *et al.*, 2002, Claquin *et al.*, 2004, Huysman *et al.*, 2013). Lorsque les diatomées ne se divisent pas, elles ont une quantité d'ADN stable. C'est l'interphase, la période où elles se préparent à se diviser. Plusieurs phases vont ensuite se succéder : les phases G1, S, G2 et M (Figure 54).

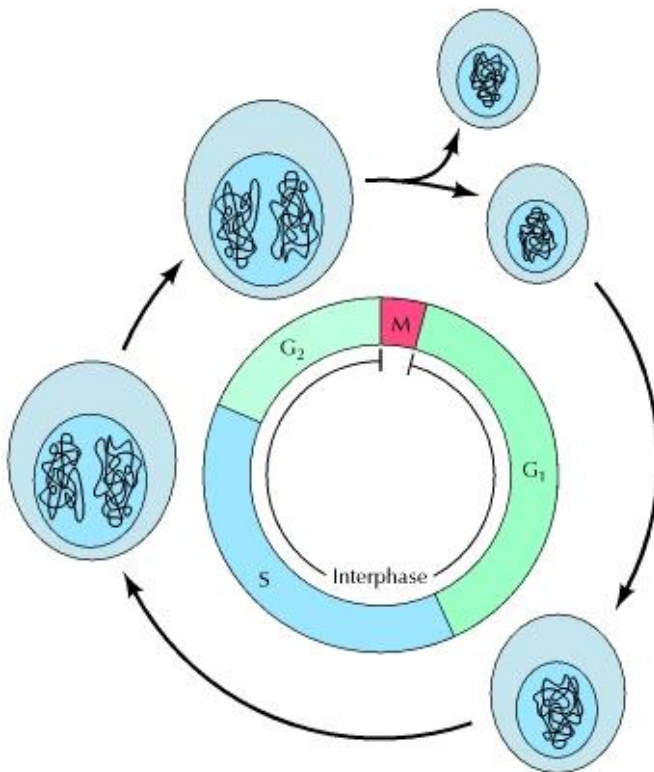


Figure 54 : Phases du cycle de division cellulaire. Pendant l'interphase, les cellules traversent les stades G1, où l'ADN est à n chromosomes, S la phase de synthèse d'ADN pendant laquelle sa quantité augmente progressivement pour atteindre $2n$ chromosomes en phase G2. Après l'interphase se passe la mitose (M) où la cellule mère se divise en deux cellules filles (Cooper, 2000).

Au cours de la phase G1, la cellule sort de sa précédente division, sa taille vient de diminuer et son ADN est composé de n chromosomes. Lors de la phase S, l'ADN est répliqué, sa quantité augmente progressivement. Une fois la réplication terminée, la cellule dispose alors d'une quantité d'ADN doublée par rapport au stade G1, c'est la phase G2 à $2n$ chromosomes. S'en suit la mitose (M), où la cellule mère à $2n$ chromosomes se divise en deux cellules filles à n chromosomes (Mitchison, 1971, Cooper, 2000). Il est parfois difficile de différencier, par cytométrie, la phase G2 de la mitose en elle-même, c'est pour cela que bien souvent, ces deux phases sont considérées comme le bloc G2/M.

Des travaux ont montré un lien entre les différentes phases du cycle cellulaire et la production chez la diatomée planctonique *Cylindrotheca fusiformis* montrant un minimum de production

avant la division cellulaire (G2/M), et un maximum pendant la phase G1 (Claquin *et al.*, 2004), ce qui tend à confirmer l'hypothèse de Saburova et Polikarpov (2003) d'une division des diatomées épipéliques à l'obscurité, donc suite à la migration en profondeur et d'une production photosynthétique suite à la migration en surface. La photosynthèse servirait à accumuler un maximum de réserves afin de permettre la division, et donc la production de nouvelle biomasse, pendant laquelle la production photosynthétique diminue considérablement (Kaftan *et al.*, 1999). Plusieurs études (e.g. Claquin *et al.*, 2004) présentent les mêmes conclusions, notamment pour les algues vertes, chez qui ce découplage est lié au cycle nycthéral (Nymark *et al.*, 2013). Chez les diatomées épipéliques, il est possible qu'il existe un contrôle surimposé du cycle nycthéral et du cycle tidal sur lesquels la migration (hors stimuli environnementaux extrêmes) base sa rythmicité : la migration en surface a lieu seulement à marée basse diurne (cf Partie 1-B, Chapitre III-2-b).

Ces expérimentations (complémentaires des résultats de la partie 3) sont exploratoires et nécessitent plus de travail pour aboutir à des conclusions. Cette partie présente donc des avancées méthodologiques et des résultats préliminaires. L'objectif de cette étude est de tester l'hypothèse d'une division cellulaire des communautés microphytobenthiques épipéliques dans le sédiment c'est-à-dire au moment des marées hautes et à l'obscurité. Ce travail a donc été réalisé sur des communautés fraîchement récoltées sur la vasière de la baie de l'Aiguillon à marée basse diurne. Afin d'interpréter le signal complexe d'une communauté comprenant des espèces de différentes tailles (de 10 μm à plus de 100 μm), deux étapes préliminaires ont consisté, premièrement en l'observation des différentes étapes du cycle de division cellulaire par cytométrie en flux chez des espèces de différentes tailles, et deuxièmement d'estimer l'influence du cycle nycthéral sur le cycle de division cellulaire. Ces étapes ont été réalisées à l'aide de cultures monospécifiques d'espèces de diatomées épipéliques.

II. Matériels et Méthodes

Expérimentations sur la communauté microphytobenthique à deux profondeurs provenant de sédiment frais.

Le premier centimètre de sédiment a été récolté sur la vasière d’Esnandes-Pointe St Clément, puis ramené au laboratoire, tamisé sur 200 μm pour, réparti dans des plateaux, et conservé à lumière et à température ambiantes. Afin de maintenir le rythme migratoire du microphytobenthos pendant plusieurs jours (cf Partie 3), le sédiment a été homogénéisé une fois par 24 h à l’heure correspondant à celle de marée haute au site de prélèvement ; ceci a été réalisé avec l’ajout d’eau de mer filtrée (0,2 μm) afin de conserver le sédiment humide permettant la mobilité des cellules, et donc le maintien du rythme migratoire. Deux types de plateaux ont été préparés (Figure 55) : un premier plateau a servi au prélèvement en surface du microphytobenthos, un second au prélèvement à 0,5 cm de profondeur. Pour le premier plateau, trois filets de maille 60 μm ont été placés à la surface du sédiment (Figure 55a). Ces filets permettent la migration de la majorité des diatomées en surface et ils facilitent leur récolte. La récolte du microphytobenthos a eu lieu à l’heure correspondant à la marée basse (sur le lieu de prélèvement) suivant l’homogénéisation du sédiment. Pour le second plateau, le protocole d’Eaton et Moss (1966) a été adapté. Le sédiment a été homogénéisé comme décrit ci-dessus, et cinq couches de filets ont été disposées à la surface du sédiment : 3 couches de filets à mailles 60 μm encadrés de deux filets à mailles 100 μm (un au-dessus, un au-dessous). Une couche de sédiment (variable mais < 0,5 cm) a ensuite été étalée sur les filets (Figure 55b) de manière à tenter de ‘piéger’ le microphytobenthos à une profondeur inférieure à 0,5 cm. Les deux filets à mailles 100 μm permettent de laisser passer les cellules les plus grosses tout en réduisant le contact des 3 filets à mailles 60 μm avec le sédiment, seuls les 3 filets à mailles 60 μm ont été récoltés. La récolte du microphytobenthos a eu lieu à l’heure correspondant à la marée haute (sur le lieu de prélèvement) suivant la marée basse à laquelle le microphytobenthos de surface a été récolté dans le plateau 1.

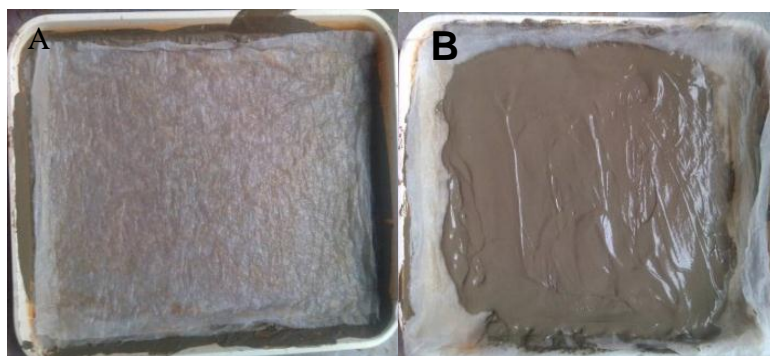


Figure 55 : a) Plateau 1 : disposition des filets en surface du sédiment ; b) Plateau 2 : les filets sont recouverts d'une fine couche de sédiment

*Expérimentations sur des cultures mono-spécifiques en milieu liquide : effet d'un rythme nyctéméral sur la division cellulaire et le contenu pigmentaire de *N. phyllepta*.*

Les cultures ont été maintenues comme décrit dans la Partie 2 : 20°C en erlenmeyers stériles avec 1 L de milieu F/2 élaboré à base d'eau de mer artificielle enrichie en NaHCO₃ (pour une concentration finale de 80 mg L⁻¹). Les cultures ont été au préalable photoacclimatées pendant deux semaines à 75 μmol photons m⁻² s⁻¹ (cf Partie 2) à un rythme lumineux de 6 h lumière : 6 h obscurité. Ce rythme a été choisi afin de simuler les contraintes lumineuses engendrées en milieu naturel par le rythme tidal : à marée basse, le microphytobenthos en surface du sédiment est exposé à la lumière, à marée haute il est enfoui dans le sédiment qui est recouvert d'une colonne d'eau turbide et est donc à l'obscurité. La lumière a été fournie par des tubes fluorescents (L58W/840, OSRAM, Allemagne).

Les cultures photoacclimatées ont ensuite été repiquées en duplicat en Erlenmeyers (a et b) de 1 L à une concentration de 0,1 mg Chl *a* mL⁻¹. Le suivi de la croissance a été effectué et, dès le début de la phase exponentielle de croissance, les cultures ont subi une privation de lumière pendant 24 h afin de synchroniser le cycle cellulaire des cellules. Des expérimentations préliminaires nous ont montré que la privation de lumière semble synchroniser cette espèce en stoppant le cycle cellulaire en phase G1 (tout comme *Seminavis robusta* et *Phaeodactylum tricorutum*) (Gillard *et al.*, 2008, Huysman *et al.*, 2010) ainsi qu'en phase S (donc probablement par l'empêchement de la phase G2 comme pour *Cylindrotheca fusiformis*) (Brzezinski *et al.*, 1990). Après 24 h, les cultures ont été replacées à la lumière (cycle 6 h L : 6 h O). Toutes les 3 h, des prélèvements ont été effectués 1) dans les duplicats pour le dosage de la chlorophylle *a*, 2) pour l'évaluation de la proportion de diatomées présentes aux

différents stades du cycle cellulaire en cytométrie en flux dans un des duplicats (prélèvement de quatre fois 2 mL dans le flacon a ; ajout de 55,6 µL de formol filtré pour une concentration finale de 37% puis congélation par azote liquide avant d'être stocké à -80°C), et 3) pour la mesure du contenu des différents pigments dans le second duplicat (prélèvement et filtration sur GF/F 0,5 µm de trois fois 5 mL dans le flacon b puis congélation par azote liquide avant d'être stocké à -80°C).

Paramètres mesurés

- Cytométrie en flux : proportion de diatomées présentes aux différents stades du cycle cellulaire.

La quantité d'ADN dans les cellules a été mesurée par cytométrie en flux (BD FACS CANTO II, Californie, USA). La méthode de cytométrie en flux permet une étude multiparamétrique des cellules. Les cellules passent dans une chambre de mesure via un flux de liquide. Ce flux permet de caractériser chaque cellule grâce à des lasers de différentes longueurs d'onde. Ainsi, il est possible de compter les cellules, de mesurer leur fluorescence (due aux chlorophylles des plastes), et de caractériser leur complexité (taille relative). Par marquage au SybrGreen (excitation 497/émission 520nm), un fluorochrome qui s'intercale dans la molécule d'ADN, il est possible de mesurer la quantité d'ADN des cellules, alors que la mesure de la fluorescence chlorophyllienne et de la taille relative des cellules permettent de distinguer différentes classes de tailles au sein d'une communauté.

Le laser d'excitation et de lecture utilisé est un laser bleu (488nm, 20mW) permettant de mesurer la taille relative de l'évènement (SSC, 488/10) et différentes fluorescences (dont FL1 : 530/30LP et FL3 : 670LP). Les voltages utilisés pour l'analyse sont les suivants : FSC = 515 V ; SSC = 200 V ; FL1 = 300 LP ; FL1 = 370 V ; FL3 = 350 V, dont les seuils de mesure ont été réglés à 500 pour le FL1 et 1000 pour le FL3.

Les échantillons issus des cultures monospécifiques ont été marqués au SybrGreen (1 :10 000) après fixation au formol (voir ci-dessus) ; les échantillons récoltés à partir du sédiment ont préalablement été tamisés sur un filet de 100 µm afin de limiter la quantité de sédiment introduit dans une chambre de mesure.

La fluorescence de l'ADN marqué au SybrGreen est interprétée comme suit. Dans le cas d'un pic simple, les cellules sont en phase G0/G1. Un étalement de ce pic signifie une augmentation de la quantité d'ADN dans les cellules (phase S). Quand le pic est double les cellules ont une quantité d'ADN double correspondant à la phase G2/M (Figure 56).

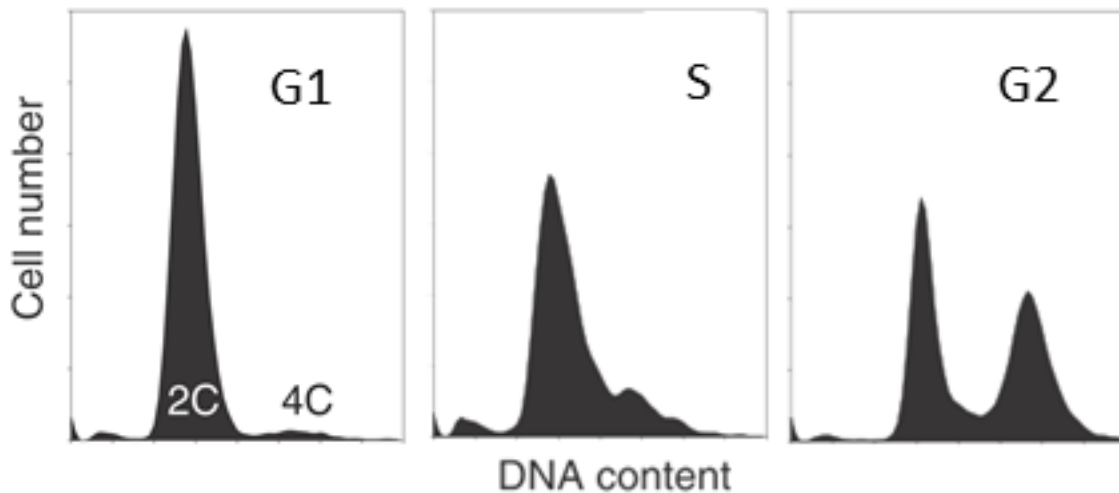


Figure 56 : Exemple de résultats obtenus pour la fluorescence de l'ADN marqué au SybrGreen à différentes phases du cycle de division cellulaire (Huysman *et al.*, 2010).

Les cytogrammes ont été traités à l'aide du logiciel ModFit (Verity Software House, US) qui permet d'identifier les différentes phases du cycle cellulaire et de les quantifier. Un seul réplica a pour le moment été traité pour les cultures monospécifiques et le microphytobenthos issu du sédiment.

- Spectrophotométrie et HPLC : pigments photosynthétiques chez *N. phyllepta*.

Le suivi de la quantité de chlorophylle *a* (Chl *a*) a été effectué pour suivre la croissance des cellules en suivant la méthode spectrophotométrique de Jeffrey et Humphrey (1975) (cf Partie 2).

Le contenu pigmentaire rapporté à la quantité de Chl *a* (mol. 100 mol Chl a^{-1}) a été mesuré afin de suivre l'évolution des proportions pigmentaires au cours du cycle nyctéméral. L'extraction des pigments et l'analyse HPLC sont celles décrites en Partie 2.

III. Résultats

Effet du cycle tidal sur la division cellulaire du microphytobenthos : influence du couplage entre les rythmicités tidale et migratoire

La communauté microphytobenthique est constituée d'un mélange complexe de populations présentant des cellules de différentes tailles (de 10 μm à plus de 100 μm). Ainsi, des tests préliminaires ont été réalisés afin de déterminer la faisabilité de distinguer des cellules de diatomées benthiques de différentes tailles (même espèce) seules et en mélange. Ces expérimentations ont été réalisées avec cultures monospécifiques de trois espèces de diatomées de différentes tailles (cellules de petite taille ($\sim 10 \mu\text{m}$) : *N. phyllepta*, cellules de grande taille ($> 100 \mu\text{m}$) : *Pleurosigma sp.*, cellules de taille intermédiaire ($10 \mu\text{m} < x < 100 \mu\text{m}$) : *C. closterium*). Les tests préliminaires réalisés (résultats non montrés) ont permis de démontrer la faisabilité de distinguer des cellules, que ce soit sur des échantillons monospécifiques ou des mélanges, ainsi que dans les échantillons de microphytobenthos prélevés dans le sédiment en surface/marée basse et en profondeur/marée haute.

Ainsi, pour le microphytobenthos prélevé en surface du sédiment à une heure correspondant à la marée basse, il est possible de distinguer quatre populations en fonction de la taille relative (SSC) et de la fluorescence chlorophyllienne (FL3) (Figure 57). Parmi ces quatre populations, trois présentent un signal similaire aux populations de diatomées de trois tailles différentes (P3 correspondant à des cellules de petite taille, P4 correspondant à des cellules de taille intermédiaire et P5 correspondant à des cellules de grande taille). La population P2 ayant une taille bien distincte des trois autres, elle pourrait être composée d'autres microalgues (possiblement des euglènes).

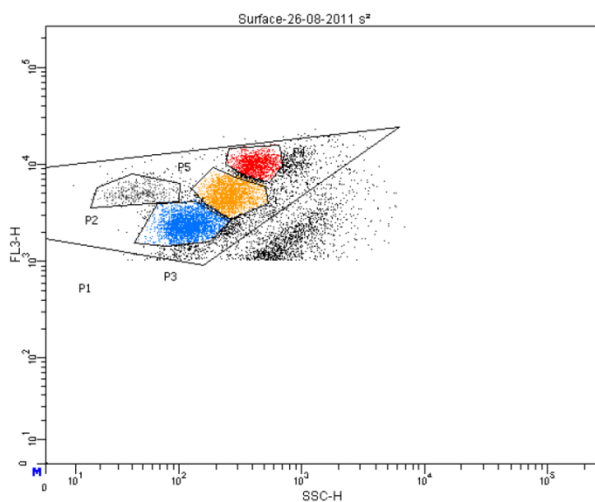


Figure 57 : Cytogramme obtenu pour le microphytobenthos récolté en surface du sédiment à une heure correspondant à la marée basse sur le lieu de prélèvement. Il représente la fluorescence chlorophyllienne (FL3) en fonction de la taille relative des événements (SSC). En gris la population P2, en bleu la population P3 (correspondant à des cellules de petite taille), en orange la population P4 (cellules de taille intermédiaire) et en rouge la population P5 (cellules de grande taille). La population totale P1, en noir.

Ainsi, pour chacune des trois populations, il est possible d'obtenir la quantité de cellules comptées en fonction de l'intensité de la fluorescence de l'ADN (Figure 58). La population P3 (bleu, cellules de petite taille) présente le plus grand nombre de cellules comptées (plus de 3000) et une fluorescence de l'ADN montrant un seul pic bien marqué qui correspond à de l'ADN 1n. Compte-tenu de la clarté du signal, il pourrait s'agir de la population d'un seul genre ou même d'une seule espèce qui à l'instant de l'échantillonnage n'était pas en division ; l'espèce de petite taille dominante sur le site de prélèvement est vraisemblablement *Navicula* sp. (Haubois *et al.*, 2005). La population P4 (représentée en jaune, cellules de taille intermédiaire) est composée d'environ 2250 individus, avec deux pics de fluorescence de l'ADN (1n) qui pourraient correspondre à deux populations de deux espèces ayant une taille proche et qui à l'instant de l'échantillonnage n'étaient pas en division. Pour la population P5 (rouge, cellules de grandes taille), la quantité de cellules comptées est d'environ 1300, avec un étalement plus large de la fluorescence de l'ADN (1n) qui pourrait correspondre à un

mélange de plusieurs espèces de taille similaire présentant chacun un nombre d'individus peu important (par rapport aux deux autres classes de taille) et qui à l'instant de l'échantillonnage n'était pas en division. Il est intéressant de noter que 1) le nombre d'individus décroît avec la classe de taille : petite taille > taille intermédiaire > grande taille, correspondant bien aux observations *in situ* (Haubois et al., 2005); 2) les trois classes de tailles préalablement définies par des tests sur cultures monospécifiques (voir ci-dessus) sont bien différenciables en cytométrie : petite taille, FL3-H ~ 20, taille intermédiaire, 30 < FL3-H < 50, grande taille 40 < FL3-H < 80.

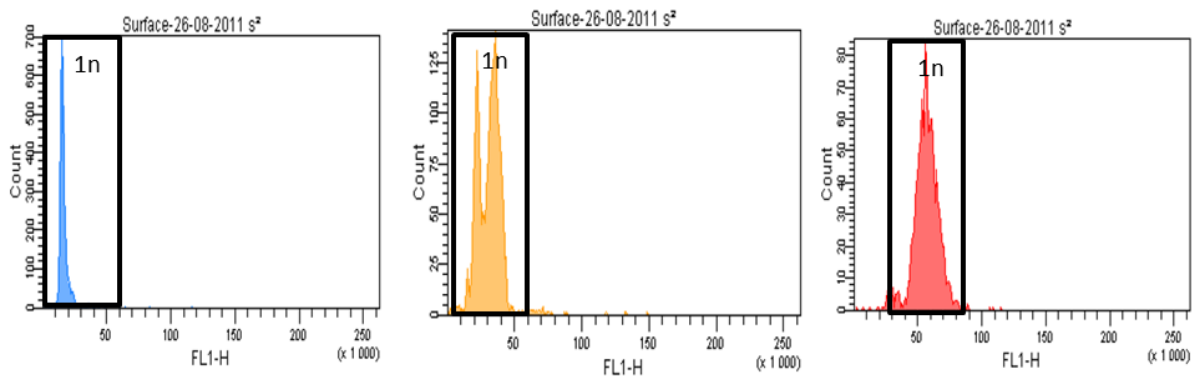


Figure 58 : Cytogrammes obtenus pour le microphytobenthos récolté en surface du sédiment à une heure correspondant à la marée basse sur le lieu de prélèvement. Il représente la quantité d'évènements qui est le nombre de cellules (Count) en fonction de la fluorescence de l'ADN marqué par SybrGreen (FL1). En bleu la population P3 (cellules de petite taille), en orange la population P4 (cellules de taille intermédiaire) et en rouge la population P5 (cellules de grande taille).

En profondeur, les mêmes populations sont retrouvées, mais avec des densités bien plus faibles (Figure 59) (P3 = 477, P4 = 218 et P5 = 498).

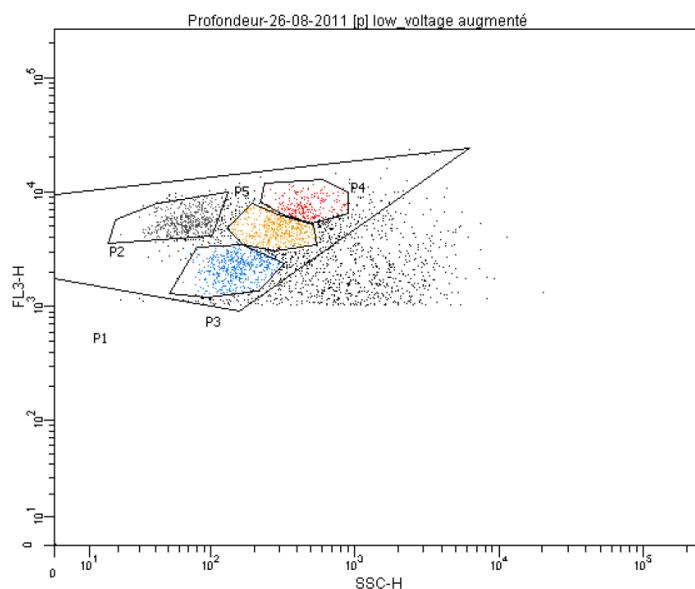


Figure 59 : Cytogramme obtenu pour le microphytobenthos récolté dans le sédiment (< 0,5 cm) à une heure correspondant à la marée haute sur le lieu de prélèvement. Il représente la fluorescence chlorophyllienne (FL3) en fonction de la taille relative des événements (SSC). En gris la population P2, en bleu la population P3 (cellules de petite taille), en orange la population P4 (cellules de taille intermédiaire) et en rouge la population P5 (cellules de grande taille).

La mesure de l'intensité de la fluorescence de l'ADN est montrée en Figure 60. A part pour la population P2 (bleu, cellules de petite taille), le signal reste très faible (moins de particules pour les populations P4 et P5 comme observé en surface). La faiblesse du signal provient à la fois d'une concentration en cellule plus faible, mais aussi à une augmentation de la quantité de sédiment ce qui oblige à diminuer le seuil de détection du cytomètre. Les gammes de FLH décrites pour les cytogrammes de surface sont respectées. Pour les cellules de petites tailles, la valeur de FLH est similaire à ce qui est observé en surface du sédiment (FLH ~ 20) et deux pics d'ADN sont visibles. Ces deux pics d'ADN correspondraient à deux fractions de la population : une qui n'était pas en division au moment du prélèvement (ADN 1n) et une qui serait en phase G2/M et donc sur le point de se diviser (ADN 2n). Compte-tenu de la faiblesse du signal et du bruit de fond, il est difficile de véritablement conclure sur la présence ou non de ce second pic d'ADN pour les deux autres classes de taille.

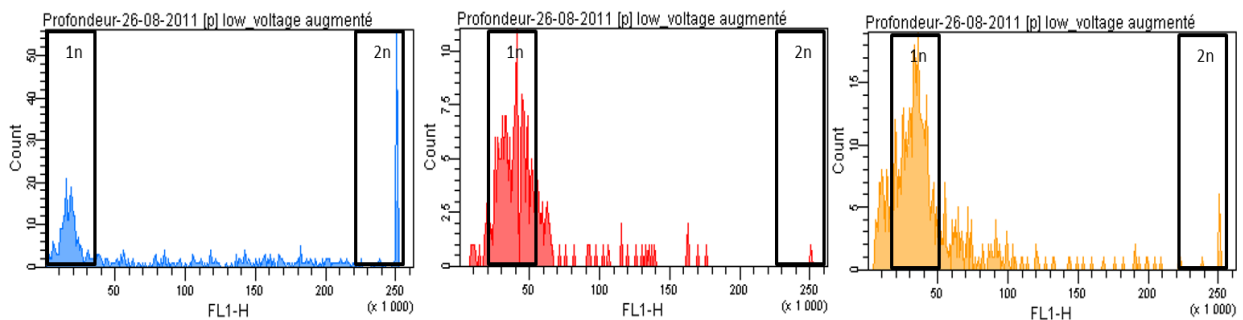


Figure 60 : Cytogrammes obtenus pour le microphytobenthos récolté (< 0,5 cm) à une heure correspondant à la marée basse sur le lieu de prélèvement. Il représente la quantité d'évènements qui est le nombre de cellules (Count) en fonction de la fluorescence de l'ADN marqué par SybrGreen (FL1). En bleu la population P3 (cellules de petite taille), en orange la population P4 (cellules de taille intermédiaire) et en rouge la population P5 (cellules de grande taille).

Cultures monospécifiques : Effet du cycle nyctéméral sur la division cellulaire et le contenu pigmentaire de N. phyllepta

Deux protocoles de synchronisation du cycle cellulaire ont été testés : 1) une synchronisation par le nocodazole (protocole fourni par V. Martin-Jézéquel), 2) par une privation de lumière pendant 24 heures (protocole fourni par K. Sabbe). C'est cette dernière méthode qui s'est avérée la plus efficace. La privation de lumière a déjà été utilisée sur des cultures de diatomées pennées et présente différents résultats en fonction des espèces étudiées. Chez *Cylindrotheca fusiformis* (Brzezinski *et al.*, 1990), le cycle cellulaire peut être stoppé pendant

la phase G1 ainsi que pendant la phase G2/M, alors que chez d'autres espèces telles que *Phaeodactylum tricornutum* (Huysman *et al.*, 2010) et *Seminavis robusta* (Gillard *et al.*, 2008) l'arrêt n'a lieu qu'en phase G1.

Dans nos conditions de culture, les trois premiers jours après ensemencement, *N. phyllepta* est en phase de latence, puis le quatrième jour, le début de la phase exponentielle est observé (résultats non montrés). Le cinquième jour, à 8 :00, la culture est placée à l'obscurité pour 24 h. A partir du sixième jour 8 :00 (début de l'expérience nommé 'J1 8', Figure 61), des prélèvements sont effectués toutes les 3 h. On observe alors que l'augmentation de la quantité de Chl *a* (qui suit la croissance de la culture) n'est pas régulière mais il est difficile de distinguer une tendance entre les périodes de lumière (rectangles blancs, Figure 61) et les périodes d'obscurité (rectangle grisés, Figure 61) compte-tenu de l'écart-type des mesures.

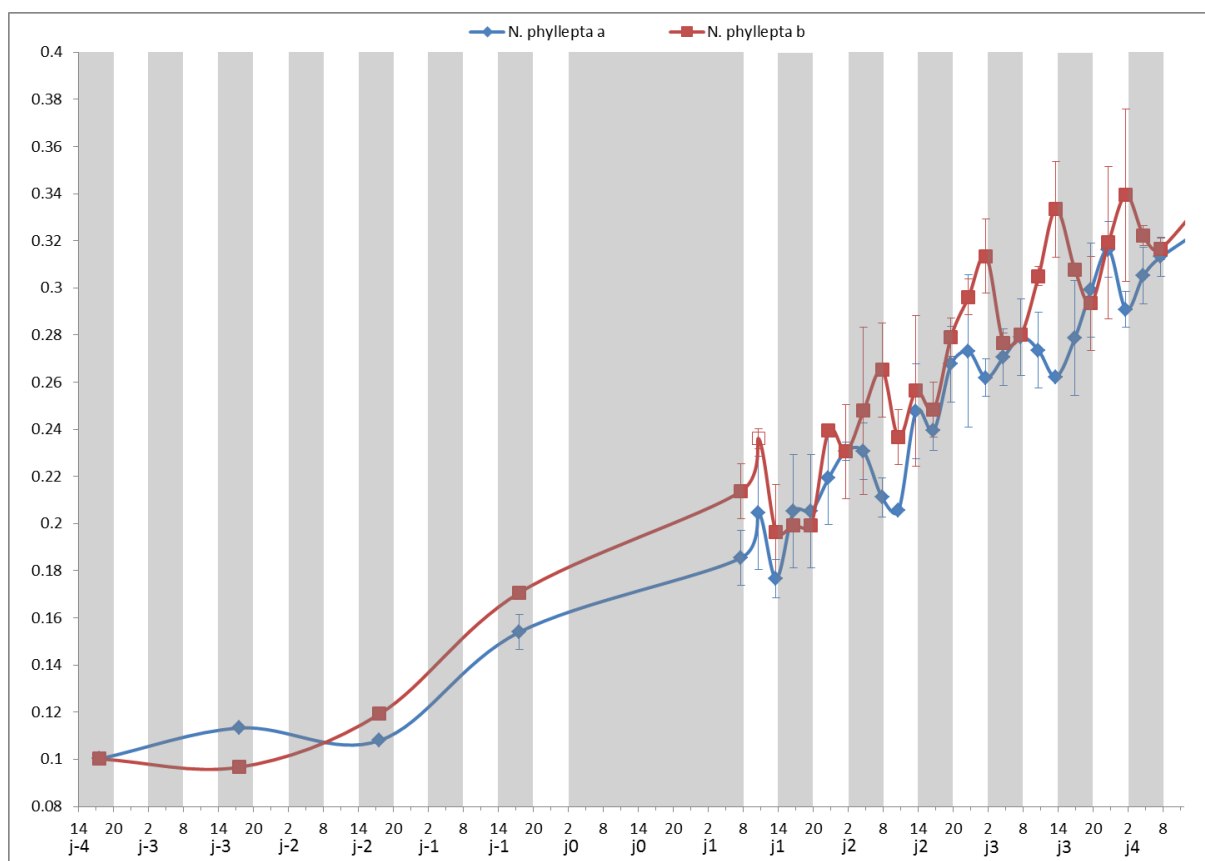


Figure 61 : Evolution de la quantité de chlorophylle *a* (Chl *a*) dans la culture de *Navicula phyllepta* poussée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité. En blanc les périodes d'illumination (75 μmol photons m⁻² s⁻¹) et en gris les périodes d'obscurité. Chaque point correspond à la moyenne ± EC des deux prélèvements effectués dans les erlenmeyers a (courbe bleu) et b (courbe rouge).

En ce qui concerne les autres pigments, seuls le β -carotène, la diatinoxanthin (DT) et le taux de dé-époxydation de la diadinoxanthin (DES) ont montré une évolution intéressante durant le suivi. La Chl *c* oscille autour de $16 \pm 0,67$ mol. 100 mol Chl *a*⁻¹ et la fucoxanthine autour de $57 \pm 2,45$ mol. 100 mol Chl *a*⁻¹ avec des valeurs similaires entre les périodes d'illumination et d'obscurité sur la période de suivi. Malgré des écarts-types très importants pour le β -carotène, une augmentation est observée pendant les périodes d'illumination, alors que pour les périodes d'obscurité, une diminution de la proportion de β -carotène par rapport à la Chl *a* est observée (Figure 62). Cette évolution est comprise entre des valeurs de 6,5 et 7,5 mol β -carotène. 100 mol Chl *a*⁻¹ pour le premier jour (J1), puis la proportion de β -carotène diminue, pour évoluer entre 6.5 et 5.5 mol β -carotène. 100 mol Chl *a*⁻¹ pour la dernière journée (J4).

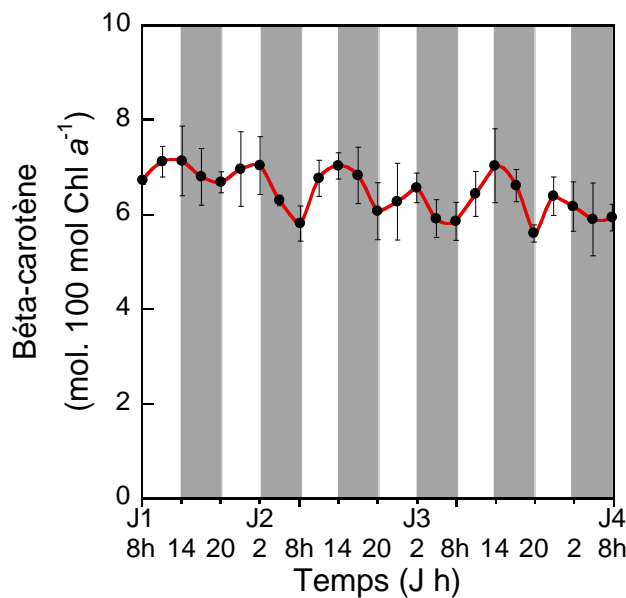


Figure 62 : Evolution de la quantité de β -carotène (mol. 100 mol Chl *a*⁻¹) de *N. phyllepta* cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité. En blanc les périodes d'illumination ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et en gris les périodes d'obscurité. Chaque point correspond à la moyenne des trois prélèvements \pm EC.

Dans notre suivi de la culture de *Navicula phyllepta*, la diadinoxanthine (DD) augmente pendant les périodes d'obscurité et diminue pendant les périodes d'illumination, bien que des écarts types importants aient été observés. La DT montre une nette augmentation pendant les phases d'illumination et une diminution pendant les périodes d'obscurité (Figure 63). Ces augmentations et diminutions successives sont variables mais globalement comprises entre 3 et 7 mol DT. 100 mol Chl *a*⁻¹.

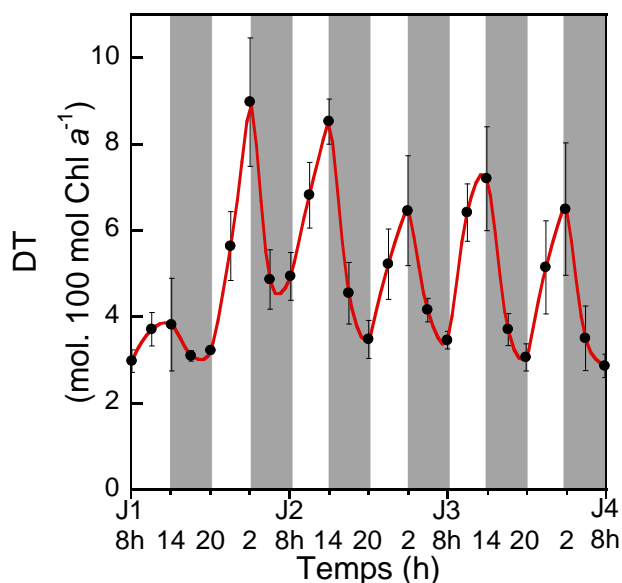


Figure 63 : Evolution de la quantité de diatoxanthine (DT) (mol. 100 mol Chl a^{-1}) de *N. phyllepta* cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité. En blanc les périodes d'illumination ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et en gris les périodes d'obscurité. Chaque point correspond à la moyenne des trois prélèvements \pm EC.

Le pool de xanthophylles (DD+DT) (Figure 64) évolue lui aussi en fonction des alternances lumière/obscurité, indiquant une synthèse *de novo* de la DT (i.e. si la DT n'était synthétisée qu'à partir de la dé-époxydation de la DD, la somme DD+DT serait stable). Pour la période entre J2 20h et J3 8h, cette synthèse *de novo* n'est pas présente, indiquant que l'augmentation de DT est due à une conversion de la DD et DT. Pour les phases d'illumination et d'obscurité suivantes (J3 8h à J3 20h) une nouvelle synthèse *de novo* apparaît puis pour la fin de l'expérience, les variations de DT semblent de nouveau dues à la conversion via la dé-époxydation de la DD en DT.

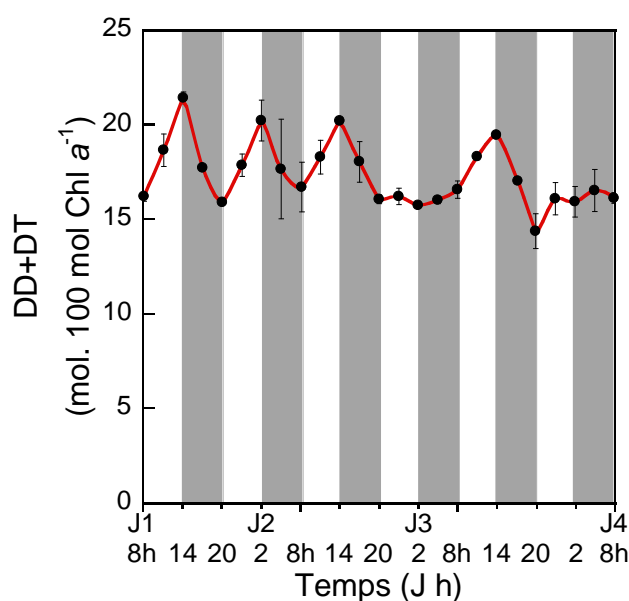


Figure 64 : Evolution de la quantité du pool de xanthophylles (DT+DT) (mol. 100 mol Chl a^{-1}) de *N. phyllepta* cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité. En blanc les périodes d'illumination ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et en gris les périodes d'obscurité. Chaque point correspond à la moyenne des trois prélèvements \pm EC.

Comme attendu, l'évolution de la DT est concordante avec celle de la DES (qui est pour rappel calculée selon la formule : $DES(\%) = \frac{DT}{DD+DT} \times 100$) (Figure 65). En effet, celle-ci varie en suivant le même schéma, à savoir une augmentation pendant les périodes d'illumination et une diminution pendant les périodes d'obscurité avec des valeurs variant entre 18.5 et 48.5 %.

Comme pour la DT, il est intéressant de noter que pour la première période d'illumination (J1), l'augmentation est certes présente, mais dans une ampleur bien plus faible que lors des illuminations suivantes.

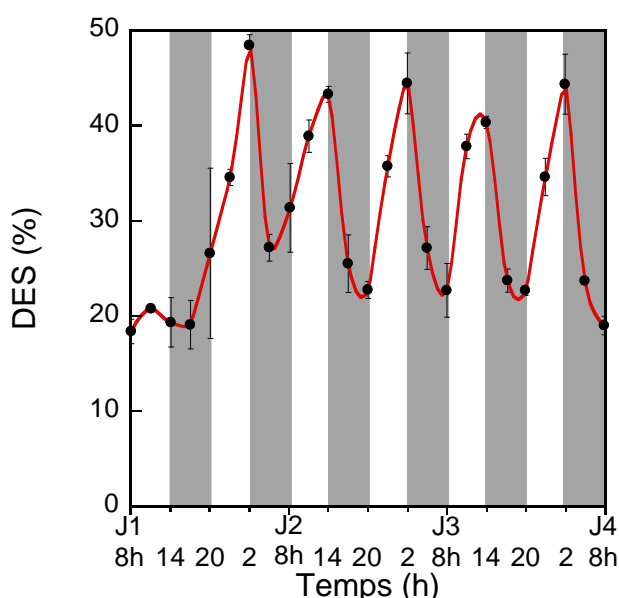


Figure 65 : Evolution du taux de dé-époxydation (DES) de *N. phyllepta* cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité. En blanc les périodes d'illumination ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et en gris les périodes d'obscurité. Chaque point correspond à la moyenne des trois prélèvements \pm EC.

En parallèle, les différentes phases (G0/G1, S et G2/M) du cycle de division cellulaire de *N. phyllepta* a montré une évolution calquée sur la photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité (Figure 66). Après 24 h d'obscurité, les cellules sont bloquées en phases G1 et G2/M dans une proportion proche du 50 % (G0/G1) -50% (phase S qui précède la G2/M). Pour les trois premiers prélèvements, à la sortie de l'obscurité, pas (ou peu) de cellules en phase G2/M sont observables. Au cours de ces 6 h d'illumination, la proportion de cellules en phase G0/G1 diminue progressivement en faveur de cellules en phase S. Lors du passage à l'obscurité, on note une ré-augmentation de la proportion de cellules en phase G0/G1 ainsi que l'apparition de cellules en phase G2/M concordant avec une diminution de la proportion de cellules en phase S. En fin de période d'obscurité, quand la culture repasse à la lumière (J1 20h), on note

une diminution de la proportion de cellules en phase S et une augmentation de la proportion de cellules en phase G2/M alors que la proportion de cellules en phase G0/G1 n'évolue pas. Pendant la période d'obscurité suivante, la quantité de cellules en phase G0/G1 diminue parallèlement à une augmentation de la proportion de cellules en phase S, qui pendant la période d'illumination suivante semble s'accroître, avec cependant une forte proportion de cellules en phase G2/M au retour de la lumière (J2 8h). Par la suite, le schéma global est moins prononcé. Suite à la grande proportion de cellules en G2/M, on observe à J2 17h une totale absence de cellules en phase G2/M avec une forte augmentation de cellules en phase G0/G1. Après la période d'obscurité suivante, la quantité de cellules en phase G0/G1 diminue progressivement avec une forte augmentation de cellules en phase S, puis de cellules en phase G2/M. En fin de suivi, peu de cellules en phase G2/M sont observées avec une grande proportion en phase S et en phase G0/G1.

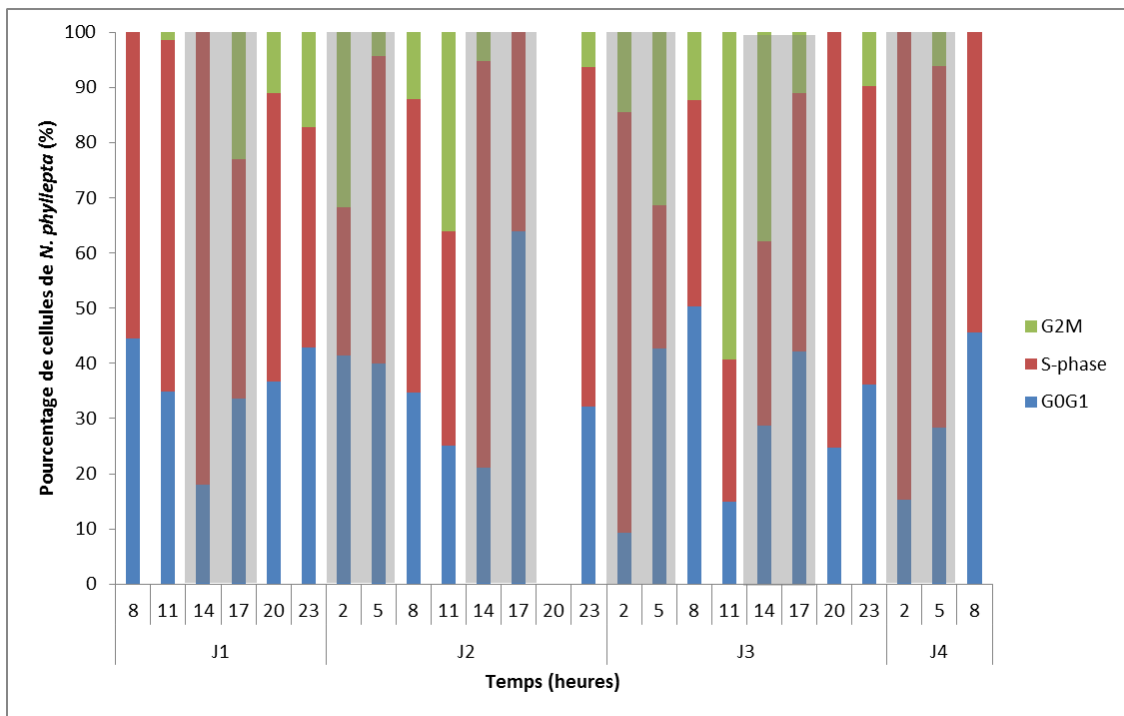


Figure 66 : Proportions relatives (en pourcentage) des différentes phases de division cellulaire de *N. phyllepta* cultivée sous une photopériode 6 h lumière : 6 h obscurité. En bleu la proportion de cellules en phase G0/G1, en rouge la proportion de cellules en phase S et en vert la proportion de cellules en phase G2/M. Les rectangles gris représentent les périodes d'obscurités.

Quand la somme des différentes phases du cycle de division cellulaire est réalisée sur la période suivie (72 h) entre les périodes de lumière et celles d'obscurité (Figure 67), aucune différence entre les deux conditions n'est observée.

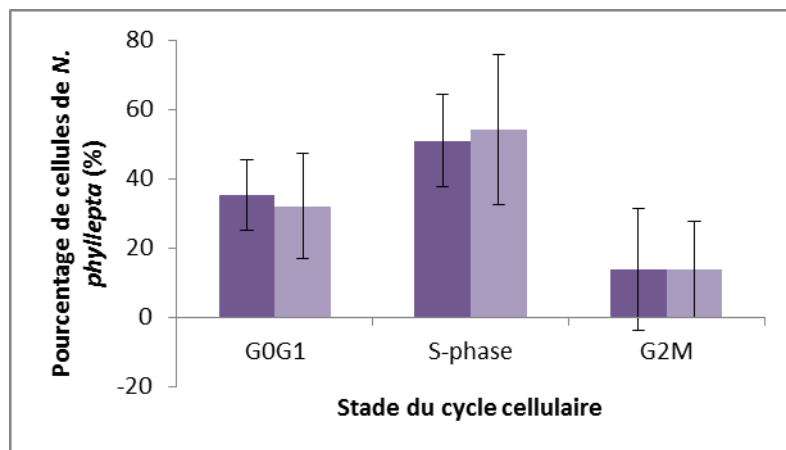


Figure 67 : Moyenne sur la durée de l'expérimentation (72 h) \pm EC des différentes phases de cycle cellulaire en fonction des conditions appliquées. En violet foncé les périodes d'illumination ($75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) et en violet clair les périodes d'obscurité.

IV. Discussion

Ces expérimentations très préliminaires ont montré la faisabilité de mesurer les différentes phases du cycle cellulaire (G0/G1, S et G2/M) sur 1) des cultures monospécifiques de diatomées benthiques, ainsi que 2) pour le microphytobenthos (mélange d'espèces) récolté en surface et plus difficilement en profondeur du sédiment. Bien que la récolte du microphytobenthos dans le sédiment reste à améliorer de façon à augmenter le signal de fluorescence (naturelle et par marquage de l'ADN), à terme, il serait possible d'étudier en parallèle les effets du cycle tidal et du cycle nyctéméral sur la division cellulaire des diatomées épipéliques et son couplage avec le rythme de la migration et le contenu cellulaire (ici les pigments photosynthétiques), en couplant des expérimentations sur du sédiment frais contenant du microphytobenthos qui continue de migrer pendant plusieurs jours et des expérimentations sur des cultures monospécifiques en conditions lumineuses contrôlées.

Effet du cycle tidal sur la division cellulaire du microphytobenthos : influence du couplage entre les rythmicités tidale et migratoire

A notre connaissance, les mesures du cycle de division cellulaire réalisées sur la communauté microphytobenthique extraite du sédiment sont une première. Il apparaît clair que plusieurs populations de différentes espèces de diatomées, montrant des classes de taille différentes, sont observables, que ce soit en surface ou en profondeur du sédiment. Au sein de la classe de petite taille, il semble qu'un seul genre (très probablement *Navicula* sp., (Haubois *et al.*, 2005) voire même une seule espèce (*N. phyllepta* ?) soit détecté(e). Au sein des classes de taille intermédiaire et grande plusieurs populations de différentes espèces (avec un contenu en ADN légèrement différent, i.e. toutes les espèces de diatomées n'ont pas le même contenu en ADN, (Armbrust, 2009, Tirichine et Bowler, 2011)) coexistent. Il apparaît que la cytométrie en flux permet de les distinguer. L'utilisation d'un trieur de cellules en cytométrie en flux qui sépare les particules obtenues en fonction de leur taille pourrait permettre de confirmer ces observations en identifiant les espèces chacune des classes.

Pour chacune des trois classes de tailles, un pic d'ADN, correspondant à des populations qui n'étaient pas en division au moment de l'échantillonnage, a pu être observé en surface du sédiment et également en profondeur, bien que le signal soit moins fort. En plus de ce pic en profondeur, les cellules de petite taille ont montré un niveau de fluorescence plus élevé (un second pic) pouvant correspondre à l'augmentation de l'ADN (ADN 2n) induit par la phase G2 et correspondant à des cellules sur le point de se diviser (phase M). Ce second pic n'était pas présent dans les échantillons de surface de la même classe de taille, de même que pour les deux autres classes de taille. Compte-tenu de la faiblesse du signal et du faible ratio cellules en division/cellules non en division observé pour la petite classe de taille, il est vraiment difficile de conclure sur la présence ou non de ce second pic d'ADN pour les deux autres classes de taille (i.e. le nombre de cellules en division est trop faible pour avoir été bien récolté et/ou détecté). Ces observations montrent qu'au moment de l'échantillonnage 1), les diatomées épipéliques du microphytobenthos n'étaient pas en division cellulaire en surface du sédiment, 2) les diatomées épipéliques de la classe de taille petite seraient sur le point de se diviser (phase G2/M). Ceci tendrait à confirmer l'hypothèse d'un couplage entre le rythme migratoire (qui est calqué sur le rythme tidal) et le cycle de division cellulaire : les diatomées se diviseraient préférentiellement (peut-être uniquement ?) en profondeur et à l'obscurité (Saburova et Polikarpov, 2003).

La méthodologie utilisée sur le sédiment est cependant largement améliorable. La faible quantité d'évènements enregistrés dans les échantillons prélevés en profondeur du sédiment est due principalement à deux facteurs. Premièrement, la quantité de sédiment présente dans l'échantillon reste trop importante. Elle entraîne un bruit de fond qui nous a contraints à modifier les réglages de l'appareil, notamment le seuil de détection. L'amélioration de la séparation sédiment/microphytobenthos est indispensable à l'amélioration du signal. Elle peut être obtenue par l'utilisation du polytungstate de sodium qui permet de séparer les diatomées du sédiment sans endommager la physiologie des cellules comme d'autres produits chimiques déjà testés (le ludox). Ces tests sont l'objet d'une collaboration en cours avec V. Méléder et L. Ribeiro (cf la Partie 1-D, Chapitre III, poster 1). Deuxièmement, la faible quantité d'évènements est due à la faible quantité de diatomées récoltées, en particulier en profondeur du sédiment. La manière la plus simple pour augmenter la biomasse récoltée serait d'augmenter le nombre de plateaux de sédiment utilisé. De plus, la fréquence des prélèvements est très important dans le temps car les évènements de division peuvent être rapides et un mauvais phasage peut manquer ces évènements surtout si les populations sont synchrones. Ici, un seul prélèvement a été effectué (au 'pic' de marée basse en surface et au 'pic' de marée haute en profondeur) ; il est donc essentiel d'augmenter la fréquence de ces prélèvements (un prélèvement toutes les 2 h voire toutes les heures) ce qui implique l'utilisation de plusieurs plateaux de sédiment en parallèle pour maintenir une biomasse suffisante.

*Effet de rythme nyctéméral sur la division cellulaire et le contenu pigmentaire de *N. phyllepta**

L'objectif de cette expérimentation était d'explorer l'influence du cycle nyctéméral sur le cycle de division cellulaire chez une diatomée épipélique modèle : *Navicula phyllepta* qui est dominante sur la vasière de Brouage (bassin de Marennes-Oléron) (Haubois *et al.*, 2005). Le mode de culture choisi, liquide sans sédiment, permettait de s'affranchir de l'aspect rythme migratoire de façon à tenter de répondre à la question suivante : la division supposée des cellules dans le sédiment est-elle liée au passage de la lumière (en surface) à l'obscurité (en profondeur) ?

Tout comme pour *Cylindrotheca fusiformis* (Brzezinski *et al.*, 1990), la privation de lumière pendant 24 h semble interrompre le cycle cellulaire à deux phases : G1 et G2/M. Quand les

cultures sont de nouveau soumises à la lumière, le cycle cellulaire redémarre, et l'on peut observer des transitions logiques entre les différentes phases de cycle cellulaire. Bien que les premières phases G2/M soient observées seulement à l'obscurité, aucun schéma clair d'avancée du cycle cellulaire entre les périodes de lumière et d'obscurité ne semble se dégager. Au contraire, la répartition des différentes phases du cycle de division cellulaire est identique entre les périodes de lumière et d'obscurité. Des observations similaires ont été rapportées pour *C. fusiformis* (Claquin *et al.*, 2004). Ce résultat tendrait donc à montrer que lorsqu'une espèce de diatomée épipélique est placée dans des conditions où la migration est impossible, où les cellules sont synchronisées (ce qui est non-connu pour des conditions naturelles) et en phase exponentielle de croissance, et où la photopériode est de 6 h lumière : 6 h obscurité, la division végétative a lieu indifféremment à la lumière comme à l'obscurité. Si ce résultat est validé, il signifierait que la division cellulaire végétative observée dans le sédiment en profondeur (et donc à marée haute) au moins pour la classe de taille petite ne serait pas due à l'alternance lumière (en surface)/obscurité (en profondeur) mais que le stimulus principal serait le rythme de migration qui serait calqué sur l'alternance marée basse (cellules en surface)/marée haute (cellules en profondeur).

Cependant, la souche de *N. phyllepta* utilisée ici est cultivée en conditions de laboratoire depuis de nombreuses années sous une photopériode 12 h lumière : 12 h obscurité ou 16 h lumière : 8 h obscurité et son cycle de division cellulaire a pu perdre sa rythmicité nyctémérale naturelle. De plus, en conditions naturelles, il est rare d'observer ce rythme lumineux 'grossier' (6 h L : 6 h O) qui se rapproche des jours à deux marées basses diurnes. En effet, pour la plupart des jours, une seule marée basse a lieu le jour, et la seconde a lieu pendant la nuit, ce qui implique un rythme grossier de 4-6 h lumière : 18-20 h obscurité. Pour la suite, il serait donc important 1) de travailler autant que possible avec des souches fraîchement isolées du milieu naturel, 2) d'imposer à ces souches un rythme 4 h L : 20 h O ou 6 h L : 18 h O en fonction du lieu d'échantillonnage sur l'estran.

En parallèle, du suivi de l'évolution du cycle cellulaire, le contenu pigmentaire des cultures a été mesuré. L'augmentation de la Chl *a* suit un schéma classique de croissance exponentielle. Le contenu en Chl *a* des cellules n'ayant pas été mesuré (il aurait fallu compter le nombre de cellules en parallèle), il n'est pas possible de conclure sur les périodes de division des chloroplastes qui renseignent également sur l'évolution du cycle cellulaire (Huysman *et al.*, 2013). En effet pendant la phase G1, les cellules dupliquent leur contenu cellulaire, à

l'exception faite des chromosomes (Round *et al.*, 1990). Cette duplication induit aussi la duplication des chloroplastes. Leur séparation se fait juste avant la séparation des chromosomes, puis chaque chloroplaste est donné à une cellule fille. Il existe donc une période du cycle où le contenu en Chl *a* des cellules est doublé (Huysman *et al.*, 2013).

Le suivi des autres pigments en tant que marqueurs physiologiques nous a permis d'explorer la faisabilité de suivre la rythmicité de physiologie de la photosynthèse en parallèle du cycle de division cellulaire. Pour ces pigments normalisés à la quantité de Chl *a*, on note deux évolutions différentes : 1) la Chl *c* et la fucoxanthine sont stables tout au long du suivi ; pour ce type de photopériode et d'intensité lumineuse ($75 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$), ces pigments ne réagissent donc pas à l'alternance lumière-obscurité ; lorsque la photopériode est de 12 h L : 12 h O, ces pigments réagissent (Ragni et d'Alcalà, 2007), 2) le β -carotène, la DD et la DT augmentent à la lumière et diminuent à l'obscurité. L'interconversion entre DD et DT entre la lumière et l'obscurité est bien connue (cf les Parties 2, 3, 5 et 6). Compte-tenu des taux de dé-époxydation de base (20%) et à la lumière (45 %) qui sont élevés, cette expérimentation pourrait être réalisée à une intensité plus faible ($20 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$, cf Partie 2), cependant ces taux se rapprochent de conditions plus naturelles (cf Parties 2 et 6). L'évolution du β -carotène est également bien connue (Ragni et d'Alcalà, 2007). Comme pour la DT, elle correspond à l'implication de ce pigment dans la photoprotection.

Ces données montrent qu'il est intéressant de suivre la photophysiology des cellules en parallèle du cycle cellulaire de façon à explorer le découplage entre le rythme de migration, le cycle de division cellulaire et la photosynthèse en fonction de l'alternance lumière/obscurité et du cycle tidal (photosynthèse à la lumière en surface du sédiment *versus* division cellulaire en profondeur). Ce type d'expérimentation pourrait également être envisagé sur du sédiment frais soumis à un environnement lumineux artificiel contrôlé se calquant (ou pas, cf Partie 3) sur le cycle tidal du site de prélèvement (cf Partie 7). Dans ce cas, des mesures de l'activité photosynthétique par fluorimétrie (cf Partie 6) seraient indispensables.

**Partie 5 : La réponse physiologique
et comportementale du
microphytobenthos à un stress
environnemental couplé :
conséquence sur la productivité
photosynthétique**

Après avoir exploré à une échelle fine la réponse photophysologique de plusieurs espèces des trois grandes formes de vie des diatomées qui constituent le microphytobenthos (épipélon, épipsammon et tychoplancton) (Partie 2), et après avoir étudié la réponse comportementale de la communauté épipélique vis-à-vis de la lumière (Partie 3), nous nous sommes concentrés sur l'étude des effets du couplage de certains des principaux forçages abiotiques : combinaison excès de lumière-forte salinité (Partie 5A) et combinaison excès de lumière-forte température (Partie 5B). Ces deux parties ont fait l'objet de trois travaux dont un est publié et les deux autres sont en préparation. J'ai participé à ces travaux en complément du corps principal de mon travail de thèse (Parties 2, 3, 4 et 6) mais je n'en suis pas l'auteur principal. C'est pour cette raison qu'ils sont résumés ci-après et qu'ils sont présentés dans leur état actuel en Annexes.

Partie 5-A : Réponse à un stress couplé lumière-salinité : diversité fonctionnelle de la régulation de la photosynthèse

Cette section fait l'objet d'une publication en préparation

Philippe Juneau, Alexandre Barnett, Vona Méléder, Christine Dupuy and Johann Lavaud (in prep.). Combined effect of excess light and salinity on the regulation of photosynthesis in three diatom species belonging to intertidal microphytobenthos

Synthèse

Dans un premier temps, nous avons étudié la combinaison d'un stress lumière-forte salinité sur trois espèces représentatives de chacun des groupes : épipélon-*Navicula phyllepta*, épipsammon-*Biremis lucens* et thychoplancton-*Plagiogrammopsis vanheurckii*. Ces trois espèces ont été sélectionnées car elles sont dominantes et/ou typiques de la Baie de Marennes-Oléron (*N. phyllepta*) et de la baie de Bourgneuf (*B. lucens* et *P. vanheurckii*). Pour les raisons méthodologiques expliquées en Partie 1C, nous avons en effet préféré travailler sur des cultures mono-spécifiques en conditions contrôlées de lumière et de salinité. Ce travail a été réalisé en collaboration avec P. Juneau de l'Université du Québec à Montréal (chercheur invité à LIENSs en 2011, 2012 et 2013). Un manuscrit correspondant à ce travail est prévu pour soumission avant la fin de l'année 2013 à *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* : 'Combined effect of excess light and salinity on the regulation of photosynthesis in three diatom species belonging to the main growth forms of intertidal microphytobenthos' (cf Annexes).

L'objectif de ce travail était triple:

1) déterminer si une forte salinité peut augmenter l'effet négatif d'un excès de lumière sur l'efficacité photosynthétique des diatomées microphytobenthiques,

2) déterminer si la photophysologie des trois espèces appartenant aux trois grands groupes (épipélon, épipsammon et tychoplancton) réagit différemment à un stress combiné excès de lumière-forte salinité.

3) si différences, confronter ces données à la littérature existante afin de déterminer si la différence de réponse peut être corrélée à la différence de mode de vie et d'habitat des trois grands groupes comme réalisée en Partie 2.

En effet, le peu de travaux réalisés précédemment sur les effets de la salinité sur le microphytobenthos (voir la liste de références du manuscrit correspondant en Annexes) concernaient soit un effet de faibles salinités couplées à un gradient de nutriments (formes azotées) dus au déversement des rivières d'estuaire, soit un effet long-terme de changements de salinités (faibles et fortes) le plus souvent mesuré via la croissance. Peu d'études avaient exploré l'effet d'un changement à court-terme (de l'ordre de l'heure) et encore moins sur l'activité photosynthétique du microphytobenthos. De plus, à notre connaissance, la grande majorité des travaux précédents avaient concerné des représentants de l'épipélon, beaucoup moins du tychoplancton et très peu de l'épipsammon.

Notre approche a été confortée par le monitoring environnemental saisonnier de la salinité de l'eau interstitielle sur nos deux sites d'étude principaux (baie de Marennes-Oléron et de Bourgneuf) (Table 6 et Figure 97 du manuscrit en Annexes) qui a montré : **i)** des augmentations importantes de salinité (jusqu'à 48 ‰) en surface du sédiment (les premiers 500 mm), **ii)** des variations rapides de ces salinités à l'échelle de l'émersion (sur un intervalle d'1 h 30), **iii)** des différences d'amplitude de variations entre les sédiments cohésifs (vases fines) et ceux moins cohésifs (sables vaseux). A partir de ce constat, nous avons mis au point un protocole expérimental permettant de reproduire des conditions de lumière, salinité et température typiques du printemps/début d'été sur nos deux sites d'étude (Table 12 et Figure 97) soit une combinaison de : **1)** une température stable optimale (20°C), **2)** une variation court-terme (1 h) et stable de la salinité de 33 ‰ à 45 ‰ avec 4 ‰ d'amplitude, **3)** un stress lumineux court-terme (1 h également) et d'intensité modérée (600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)

représentant 10x la lumière de croissance. Nous avons délibérément choisi une intensité lumineuse modérée pensant qu'une intensité forte (jusqu'à plus de 2000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pourrait éventuellement 'cacher' la réponse plus spécifique à la forte salinité. De même pour la température (voir la Partie 5B), ainsi de telles conditions d'augmentation de salinité sur le terrain sont dues à une évaporation de l'eau interstitielle engendrée avant tout par le vent, plus que par une augmentation de température.

Table 6 : Ce tableau récapitule les données du Table 13 et des Figure 98 et Figure 99 du manuscrit présentés en Annexes. Abréviations : -, paramètres stables (changement < à 10 %) par rapport à la salinité 33 ‰ de la condition de lumière correspondante (faible lumière ou excès de lumière) ; ↑ paramètre augmente ; ↓ paramètre diminue ; la valeur de salinité pour laquelle a lieu l'augmentation ou la diminution est précisée. Voir le Tableau 1 du manuscrit correspondant en Annexes pour une définition des paramètres photophysologiques.

Paramètres photophysologiques	Combinaison faible lumière/forte salinité			Combinaison excès de lumière/forte salinité		
	N.p.	B.l.	P.v.	N.p.	B.l.	P.v.
F_v/F_m	-	-	-	-	-	-
Φ PSII	-	-	-	-	-	↓ 41 ‰
α	-	-	↓ 37 ‰	-	↑ 37 ‰	↓ 37 ‰
E_k	-	-	↑ 37 ‰	-	↓ 37 ‰	↑ 37 ‰
rETR _m	-	-	↑ 41 ‰	-	↓ 37 ‰	↑ 41 ‰
DES	-	-	-	-	-	-
NPQ	-	-	↓ 37 ‰	↑ 45 ‰	↑ 37 ‰	↓ 45 ‰

La photophysologie des trois espèces répond différemment à un stress couplé lumière-salinité (cf ci-dessus). Tandis que *N. phyllepta* est quasiment insensible (dans nos conditions expérimentales) aux fortes salinités seules (i.e. en combinaison avec de la lumière de faible intensité) et à la combinaison excès de lumière/fortes salinités, *P. vanheurckii* est très sensible aux deux conditions, et *B. lucens* est sensible uniquement à la combinaison stress lumière-salinité. Ces réponses spécifiques correspondent bien **i**) à leur habitat naturel (sédiment plus ou moins cohésifs), et **ii**) à leur mode de vie (benthique mobile, benthique immobile,

benthique/planctonique). Le premier détermine l'amplitude des changements de lumière (voir également la Partie 2) et de salinité. En effet, comme montré dans cette étude (Figure 97 et Table 12, voir également la Partie 6), la salinité en surface du sédiment (les premiers 500 mm) varie plus dans un site où le sédiment est cohésif (Baie de Marennes-Oléron, vases fines) comparé à un site où le sédiment l'est moins (Baie de Bourgneuf, sables-vaseux). Ainsi, les diatomées épipéliques qui vivent préférentiellement dans les sédiments cohésifs sont susceptibles d'être soumises à des variations de salinités extrêmes (jusqu'à 48 ‰ en baie de Marennes-Oléron) couplées à de fortes lumières (cf Partie 2). Les diatomées épipsammiques qui vivent préférentiellement dans des sédiments moins cohésifs sont sujettes à des variations de lumière et une intensité lumineuse moyenne encore plus importantes (cf Partie 2) mais à des variations de salinité moins importantes (voir Figure 97). Ainsi, dans leur habitat naturel un stress combiné lumière-salinité est moins probable que pour des sédiments cohésifs, i.e. les diatomées épipsammiques vivent à des profondeurs auxquelles la salinité est proche de 33 ‰ et même en surface (premiers 500 mm) les variations de salinité restent modérées (38 ± 2 ‰, Figure 91). En ce qui concerne le tychoplancton, en émergence il est resuspendu dans une colonne d'eau dont la salinité est le plus souvent proche de 33 ‰ (sur nos sites d'étude), et à l'immersion il sédimente avec les particules de vase et se retrouve probablement le plus souvent enfoui sous une couche de sédiment à partir de laquelle la salinité est proche de 32-34 ‰ (voir la Figure 91).

En ce qui concerne le mode de vie, on a vu en Partie 2 comment celui-ci influence fortement la photophysologie des différents groupes. Ce mode de vie détermine la probabilité des représentants de chacun des groupes à être confronté à un stress lumineux. Il en est de même avec la réponse couplée à une augmentation de salinité. Bien que les diatomées épipéliques possèdent une réponse physiologique non-négligeable (NPQ et DES), d'après la littérature, leur réponse physiologique est avant tout basée sur la synthèse d'osmorégulateurs (acides aminés) et la sécrétion d'EPS dont elles s'entourent pour minimiser les effets de la dessiccation et de l'augmentation de la salinité. Cette sécrétion leur permet également de se mouvoir de manière à, si nécessaire, migrer dans le sédiment vers des profondeurs où les valeurs de salinité et leurs variations sont moindres (voir la Figure 97), i.e. équivalent à la 'photoprotection comportementale' décrite en Parties 1B et 2. Comme décrit ci-dessus, l'épipsammon est moins susceptible de faire face un stress combiné excès de lumière-forte salinité et, bien que certaines espèces peuvent en partie moduler leur environnement lumineux (cf Partie 2), elles ne peuvent 'échapper' à la salinité des pores interstitiels. Leur réponse

photophysiological est plus forte (NPQ et DES supérieurs) comme le montre cette étude. Il est cependant difficile d'en dire plus sur ce groupe car sa réaction aux changements de salinité a été très peu étudiée. En ce qui concerne le tychoplancton, comme montré en Partie 2, ce groupe semble adapté à de faibles intensités lumineuses ce qui est confirmé ici. Sa photophysiology est très impactée par les fortes salinités et encore plus par la combinaison stress lumineux-salin. Il est à noter que **i)** les changements photochimiques de manière à réduire la pression d'excitation sur le PSII même à faible lumière, i.e. les fortes salinités provoquent en faible lumière une acclimatation de l'appareil photosynthétique qui habituellement est observée pour des intensités lumineuses fortes, et **ii)** une inhibition partielle du NPQ malgré un DES stable. D'après la littérature, cette inhibition pourrait être liée à une diminution du potentiel des membranes thylacoïdales due à la peroxydation des lipides. La réponse au stress oxydatif engendré par de fortes salinités (seules ou en combinaison avec un stress lumineux) a également été étudiée pour ce groupe et a montré une réponse forte de ce système de protection, démontrant là aussi la forte sensibilité du tychoplancton aux variations de salinité.

Il semble donc possible de conclure que bien que la lumière et la température, en particulier quand elles sont en excès de la capacité photosynthétique, sont souvent considérées comme les forçages physiques majeurs de la productivité photosynthétique du microphytobenthos des vasières intertidales des côtes européennes, les fortes salinités, peuvent moduler de façon non-négligeable la photosynthèse du microphytobenthos quand elles sont couplées, comme c'est souvent le cas, à de fortes lumières et /ou températures en fonction des conditions météorologiques.

Partie 5-B : Réponse à un stress couplé lumière-température : équilibre entre réponse photo-physiologique et comportementale, et adaptation latitudinale de la régulation de la photosynthèse

Dans un deuxième temps, nous nous sommes concentrés sur l'effet de la combinaison d'un stress lumière-forte température sur l'équilibre entre la réponse physiologique et comportementale de communauté de diatomées épipéliques (biofilm en surface du sédiment). Nous avons choisi de travailler sur l'épipélon seulement car il nous a semblé que ce groupe, de part son habitat et son mode de vie, exprimerait la plus forte réponse à un stress lumière-température. L'analyse de la réponse comportementale à l'échelle de la communauté épipélique ne peut être réalisée que sur du sédiment frais, comme en Partie 3, dont la température peut être expérimentalement contrôlée (contrairement à la salinité, cf Partie 5A). De plus, l'étude de son couplage à la réponse physiologique ne peut s'effectuer que si une technique d'imagerie permet de mesurer en simultanée la biomasse épipélique en surface du sédiment (Partie 3) et son activité photosynthétique. Cette mise au point a été réalisée au début de ma thèse et a ensuite été utilisée et améliorée pour le travail décrit ici. Ces deux actions ont été menées en collaboration avec le groupe de J. Serôdio de l'Université d'Aveiro au Portugal dans le cadre de deux programmes : CNRS-chercheurs invités 2010 et PHC Pessoa-Campus France 2012-2013 :

1- le premier travail a permis la mise au point méthodologique et l'étude saisonnière de l'équilibre réponse physiologique/comportementale lors d'un stress lumineux seul ; il a donné lieu à une publication dans *Aquatic Microbial Ecology* (cf Annexes) intitulée '**Efficiency of photoprotection in microphytobenthos : role in vertical migration and the xanthophyll cycle against photoinhibition**' ,

2- le second sur l'étude du stress couplé lumière-température en conditions extrêmes (été) est actuellement en cours de rédaction ; le manuscrit intitulé '**Response of intertidal benthic microalgal biofilms to a coupled light-temperature stress: evidence for latitudinal adaptation along the Atlantic coast of Southern Europe**' est également disponible dans les Annexes dans son état actuel (discussion non-finalisée en particulier), sa soumission est prévue pour la fin de l'année 2013 à *Environmental Microbiology*.

Pour les mêmes raisons de logistique qu'en Partie 3, le sédiment a été récolté dans l'Anse de l'Aiguillon pour les Parties 5B_1 et 5B_2. Pour la Partie 5B_2, du sédiment a également été récolté dans la Ria de Aveiro au Portugal pour comparaison avec la réponse d'une communauté épipélique provenant d'une latitude sud.

Partie 5B_1 : Equilibre réponse physiologique/comportementale chez le microphytobenthos épipélique lors d'un stress lumineux seul : acclimatation saisonnière.

Cette étude a profité des avancées récentes en imagerie de la fluorescence chlorophyllienne par fluorimétrie PAM ('Imaging-PAM') qui permet d'obtenir en simultanément la mesure de la biomasse photosynthétique sur une surface (ici le biofilm microphytobenthique en surface du sédiment, cf Partie 3) et la mesure de son activité photosynthétique (paramètres photophysiques, cf Parties 2 et 5A).

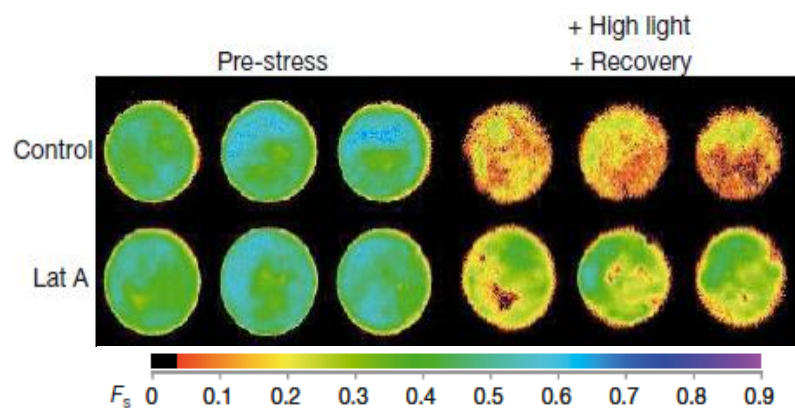


Figure 68 : Image de la fluorescence chlorophyllienne (en fausses couleurs) pour la mesure du proxi biomasse (F_s) d'une portion de plaque multi-puits avant et après un stress lumineux (3 h, $1200 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) et une période de récupération en faible lumière (15 min, $55 \mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). En haut : aucun traitement sur le microphytobenthos n'a été effectué ; en bas : l'inhibiteur de migration, le Lat-A, a été rajouté avant le stress lumineux et a bloqué la réponse comportementale du microphytobenthos à l'excès de lumière (F_s plus élevé que dans les puits du haut après le stress lumineux). Adapté de Serôdio et al., 2012 (voir Annexes).

Un nouveau protocole a été mis au point afin de combiner 1) les mesures de la fluorescence chlorophyllienne sur du sédiment réparti dans des plaques multi-puits (24 puits), ce qui autorise la multiplication des réplicats et des traitements (Figure 68 et Figure 73), 2) l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la migration verticale des diatomées épipéliques (Lat-A, cf Partie 1B, Figure 68) et du cycle des xanthophylles (DTT, dithiothréitol, Figure 69), ce qui permet d'évaluer la contribution relative de la photoprotection comportementale et physiologique, 3) l'analyse des cinétiques de récupération de l'activité photosynthétique (mesurée par le ΦPSII , cf Partie 5A, Figure 69) après exposition du microphytobenthos à un stress lumineux, ce qui permet de distinguer deux phases de récupération : la relaxation rapide

des processus de la photoprotection physiologique (NPQ et cycle des xanthophylles), et la récupération lente des dommages dus à la photoinhibition. L'exemple de la Figure 69 montre que la récupération de l'activité photosynthétique après le stress lumineux est complète pour les puits non-traités alors qu'elle ne l'est pas dans les puits où le sédiment a été pré-traité avec du Lat-A (qui bloque la réponse comportementale). Il en est de même dans les puits pré-traités avec du Lat-A et du DTT. La différence témoin/Lat-A et Lat-A/DTT permet d'évaluer l'importance relative de la photoprotection comportementale et physiologique, respectivement.

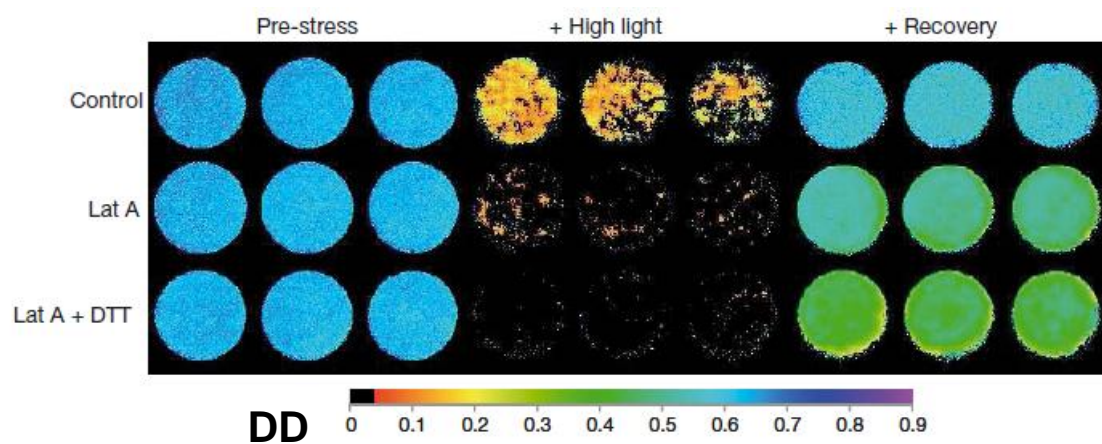


Figure 69: Image de la fluorescence chlorophyllienne (en fausses couleurs) pour la mesure de l'activité photosynthétique (Φ_{PSII}) d'une portion de plaque multi-puits avant et après un stress lumineux (3 h, $1200 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) et une période de récupération en faible lumière (15 min, $55 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). En haut : aucun traitement sur le microphytobenthos n'a été effectué ; au milieu : l'inhibiteur de migration, le Lat-A, a été rajouté avant le stress lumineux ; en bas : le Lat-A et l'inhibiteur du cycle des xanthophylles, le DTT, ont été rajoutés. Adapté de Serôdio et al., 2012 (voir Annexes).

Les résultats principaux de ces expérimentations sont les suivants : **i)** le microphytobenthos récolté au printemps (mai) et à l'automne (octobre) montre une forte capacité de photoprotection avec des taux de photoinhibition d'environ 20 %, **ii)** comme attendu la photoacclimatation du microphytobenthos est différente entre le printemps et l'automne : il est acclimaté à de plus faibles intensités lumineuses en automne avec une susceptibilité plus importante pour la photoinhibition, **iii)** au printemps, la photoprotection comportementale et physiologique sont équivalentes alors qu'en automne, la réponse comportementale semble prédominer.

Partie 5B_1 : Equilibre réponse physiologique/comportementale chez le microphytobenthos épipélique lors d'un stress couplé lumière-température : adaptation latitudinale.

Suite aux avancées méthodologiques précédentes, le même type d'approche a été utilisé afin d'étudier l'effet d'un stress lumière-température combiné sur le microphytobenthos épipélique. L'objectif de ce travail était triple :

- 1) continuer d'améliorer l'approche méthodologique en testant de nouvelles techniques (prélèvement de disques de sédiment de 500 μm d'épaisseur au diamètre des puits à l'aide de 'mini-cores'), introduire des marqueurs du stress oxydatif (AR, ratio d'alloximation de la chlorophylle *a* ; TBARs, marqueur de la peroxydation lipidique) et de la photoprotection physiologique (protéines Lhcx partenaires de régulation du NPQ avec les xanthophylles DD-DT),
- 2) déterminer à quel point une forte température peut augmenter l'effet négatif d'un excès de lumière sur l'efficacité photosynthétique du microphytobenthos épipélique, et si l'équilibre entre réponse comportementale et réponse physiologique est maintenu,
- 3) comparer les réponses de deux communautés épipéliques provenant de vasières avec des expositions solaires et des régimes de température différents (l'Anse de l'Aiguillon-France et la Ria de Aveiro-Portugal).

En parallèle des expérimentations en laboratoire dans des conditions contrôlées de lumière et de température, un suivi *in situ* a été réalisé sur les deux sites en période estivale (à 10 j d'intervalle) afin de suivre l'évolution de la l'intensité lumineuse en surface du sédiment, de la température à différentes profondeurs (surface, -0,5 cm ; -2 cm ; -5 cm et -10 cm), et de deux paramètres photophysiques : ΦPSII et NPQ (Fig. 1 du manuscrit en Annexes). Ce suivi nous a d'abord permis de conforter nos choix expérimentaux : 3 h d'exposition à une intensité de 1200 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$ à deux températures, 25°C et 40°C (cf Table S1). Ces conditions sont proches de l'environnement lumineux (3 h à 3 h 30 d'éclairage après le début de l'émersion pour obtenir une 'light dose' équivalente au laboratoire) et du régime de températures moyennes en surface du sédiment (27°C sur le site français, 37°C sur le site portugais).

Les résultats présentés en Figure 101 à Figure 104 et Figure S6 à Figure S8 montrent pour le site français :

1) une baisse de l'efficacité photosynthétique (Φ PSII) au cours du stress lumineux plus importante à 40°C qu'à 25°C et une récupération en faible lumière moindre à 40°C qu'à 25°C (Figure 101) ; cette situation est accentuée par l'inhibition de la migration de l'épipélon (+Lat-A) ; la diminution est cependant plus importante qu'*in situ* (Figure 100D),

2) une augmentation du marqueur de stress oxydatif AR accentué par l'inhibition de la migration de l'épipélon (+Lat-A) seulement (Figure 103A, Figure S6) ; pas de changement du marqueur de stress oxydatif TBAR (Figure S10A).

3) une augmentation de la photoprotection photophysologique (NPQ) au cours du stress lumineux plus importante à 40°C qu'à 25°C (Figure 94) ; les valeurs sont cependant plus importantes qu'*in situ*,

4) une augmentation des pigments photoprotecteurs (xanthophylles, DD+DT et DES) au cours du stress lumineux plus importante à 40°C qu'à 25°C (Figure 103B, Figure 103C, Figure 103D, Figure S7, Figure S8) ; cette situation est accentuée par l'inhibition de la migration de l'épipélon (+Lat-A),

5) une synthèse de protéines photoprotectrices (Lhcx) plus importante à 40°C qu'à 25°C même en faible lumière et qui est accentuée par l'inhibition de la migration de l'épipélon (+Lat-A) (Figure 104).

La comparaison avec le microphytobenthos issu du site portugais (Figure 105) montre que **i**) la récupération de l'efficacité photosynthétique (Φ PSII) après le stress lumineux seul (25°C) ou combiné à un stress thermique (40°C) est plus importante pour le site portugais, en particulier quand le stress lumière-température est couplé et que la migration de l'épipélon est inhibée (+Lat-A) ; **ii**) le NPQ est plus important sur le site portugais quel que soit le traitement (25°C/40°C, +/- Lat-A), **iii**) la synthèse de protéines Lhcx est très marquée et accentuée par le stress thermique et l'inhibition de la migration de l'épipélon (Figure 106).

D'après ces données, il est possible de conclure que les fortes températures augmentent significativement l'effet néfaste (baisse de l'efficacité photosynthétique, photoinhibition) du stress lumineux dont une des manifestations est le stress oxydatif. La réponse photophysologique et migratoire de l'épipélon confirme que l'équilibre entre photoprotection physiologique et comportementale est encore plus essentielle dans le cas d'un stress couplé lumière-température, l'épipélon utilisant un mix migration, NPQ, xanthophylles, Lhcx pour répondre au mieux au stress combiné lumière-température. Compte-tenu des profils verticaux de température dans le sédiment (vases fines) qui montrent une forte atténuation dans les premiers 500 mm (Figure 100B) avec une température moyenne autour de 25-30°C, il est certain que les diatomées épipéliques utilisent leur motilité verticale pour 'échapper' aux fortes températures en surface du sédiment de manière similaire à l'échappement aux fortes lumières (Parties 2, 3 et 5B_1) et aux fortes salinités (Partie 5A). La comparaison du comportement de l'épipélon des deux sites permet de conclure à une photo-/thermo-adaptation plus performante au site portugais ce qui va de paire avec le régime lumineux et thermique à cette latitude (Figure 100A et Figure 100B). Il semble que cette adaptation plus performante est avant tout le résultat d'une photoprotection physiologique plus forte (NPQ et synthèse Lhcx plus importants), l'effet de l'inhibition de la migration de l'épipélon étant moindre comparé au site français.

Ces données confirment la conclusion d'études précédentes réalisées au laboratoire CRELA (ancêtre de LIENSs) sur le fait que la température est un forçage abiotique important de la productivité photosynthétique du microphytobenthos épipélique. Les deux facteurs (i.e. fortes intensités lumineuses et températures élevées) étant nécessairement liés *in situ*, la combinaison des deux doit nécessairement être prise en compte pour des études écophysologiques sur la régulation de la productivité photosynthétique du microphytobenthos.

Enfin, d'un point de vue méthodologique, hormis les TBARs, les nouveautés testées ont été concluantes en particulier l'AR comme bio-marqueur de stress oxydatif et les Lhcx comme bio-marqueur de stress environnemental du microphytobenthos (Figure 102).

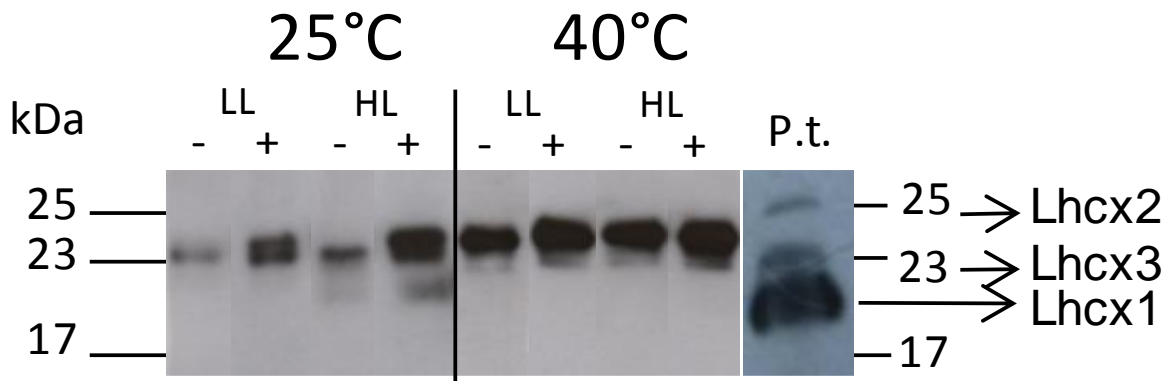


Figure 70 : Synthèse de protéines Lhcx (partenaire de régulation du NPQ) chez une communauté de diatomées épipéliques présente dans des vases fines prélevées lors d'une émergence diurne estivale (juin 2012) sur la vasière intertidale de Ria de Aveiro, Portugal (Western-Blot avec anticorps monoclonal Lhcx1 de *Cyclotella cryptica*). Le sédiment a été soumis à différents traitements de lumière (LL, 50 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$; HL : 3 h, 1200 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) et de température (25°C et 40°C) en présence ou pas d'inhibiteur de migration (+/- Lat-A). P.t. = *Phaeodactylum tricornutum*, une diatomée pennée qui sert de modèle pour la standardisation des protéines Lhcx1, Lhcx2 et Lhcx3 de différents poids moléculaires (kDa : kiloDaltons).

Ce travail est le premier à avoir tenté de détecter les Lhcx dans des communautés naturelles (microphytobenthos épipélique dans le sédiment) des échantillons naturels (ici le sédiment) et dans. Une approche parallèle et complémentaire (qui n'a pas été intégrée dans le manuscrit de la Partie 2 car trop prématurée) a été réalisée sur une sélection d'espèces étudiées en Partie 2 basée sur leur appartenance aux trois grands modes de vie (épipélon, épipsammon, tychoplancton) et sur leur capacité de photoprotection physiologie (NPQ plus ou moins fort). À ce stade il n'est pas possible de relier le nombre de Lhcx et/ou leur quantité avec les formes de vie et/ou l'amplitude du NPQ car les anti-corps utilisés ne sont pas spécifiques des diatomées benthiques (anti-corps provenant de diatomées planctoniques pennées et centriques). Cependant, ces données montrent que toutes les diatomées benthiques possèdent au moins une protéine Lhcx avec pour certaines d'entre elles un profil plus complexe que chez les diatomées planctoniques (jusqu'à 11 gènes *Lhcx* chez la diatomée épipélique *Seminavis robusta*, L. Blommaert, com. pers.) (Figure 71). Les Lhcx sont donc un marqueur de stress qu'il sera intéressant d'intégrer dans les futures études à l'échelle spécifique et du microphytobenthos.

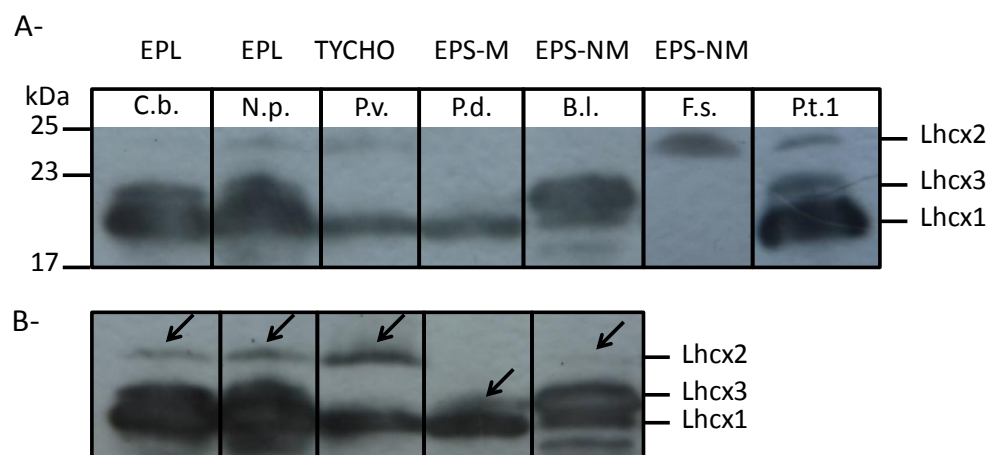


Figure 71 : Présence de protéines Lhc détectées par Western-blot chez six espèces de diatomées benthiques *Crapesdostauros britannicus*, *Navicula phyllepta*, *Plagiogrammopsis vanheurckii*, *Planothidium delicatulum*, *Biremis lucens*, *Fragilaria subsalina* (NPQ croissant de la gauche vers la droite). Les protéines Lhc ont été détectées à l'aide d'un anticorps monoclonal Lhc1 (provenant de *C. cryptica*) qui permet également de détecter Lhc2 et Lhc3 chez *Phaeodactylum tricornutum* qui sert ici de souche modèle (souche 'P.t.1'). La partie B de la figure permet de mettre en évidence, grâce un temps d'exposition plus long, des bandes Lhc2 et Lhc3 présentes en plus petite quantité (indiquées par des flèches). Abréviations : EPL, épipélon ; EPS-M, épipsammon mobile ; EPS-NM, épipsammon non-mobile ; TYCHO, tychoplancton.

**Partie 6 : Régulation de la
photosynthèse du
microphytobenthos dans les
vasières intertidales de la côte
atlantique française : impact des
facteurs environnementaux et
importance de la diversité
fonctionnelle pour la régulation de
la production primaire**

I. Introduction

Ce travail complète les expérimentations effectuées en laboratoire sur des espèces isolées (Partie 2) et les travaux sur le couplage de la salinité et la température à la lumière (Partie 5), ainsi que les travaux sur l'évolution de la biomasse annuelle et au cours d'une marée (Partie 3 et 4). Dans les conditions contrôlées que nous avons utilisées, seul l'effet de la lumière ou son couplage à un second paramètre abiotique a été mesuré, tout en s'affranchissant de la mobilité des espèces (par le travail en milieu de culture liquide, Parties 2 et 5A) ou de la communauté épipélique (utilisation du Lat-A, Partie 5B). Ici, le travail à l'échelle des communautés dans leur milieu naturel permet de replacer dans un contexte *in situ* les résultats expérimentaux du laboratoire, tout en prenant en compte d'autres paramètres que la lumière, la température et la salinité.

L'objectif principal de ce travail était de 1) replacer dans un contexte *in situ* les résultats expérimentaux, 2) comparer la régulation de l'activité photosynthétique et la production photosynthétique dans une vasière intertidale à vases fines (dominance de diatomées épipéliques, vasière de Brouage, bassin de Marennes-Oléron) et dans une vasière à sédiments vos-sableux (dominance de diatomées épipsammiques, vasière de Liarne, baie de Bourgneuf) sous des conditions de lumière modérées mais fluctuantes et des conditions de températures modérées comme retrouvées au printemps et à l'automne. Ce travail vient également compléter un projet ANR « VASIREMI », au cours duquel le microphytobenthos de la vasière de Brouage a été étudié au cours de l'été et de l'hiver.

II. Matériel et méthodes

Sites d'étude et périodes d'échantillonnage

Deux sites ont été étudiés. Ces sites sont détaillés en introduction (Partie 1-B) : 1) la vasière de Liarne à Bourgneuf (Partie 1B-I-5-c),; 2) la vasière de Brouage (Partie 1B-I-5-a).

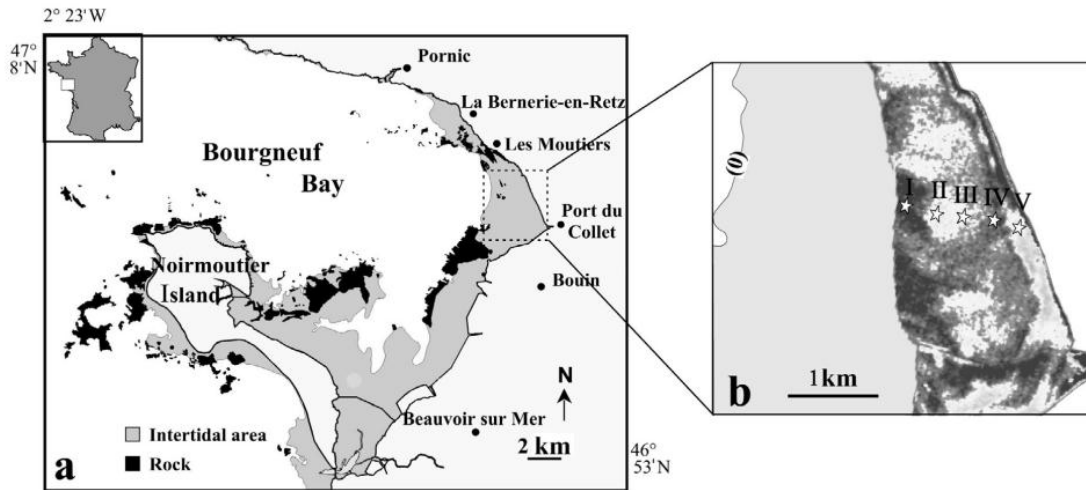


Figure 72 : Localisation de la vasière de Bourgneuf

La vasière de Liarne se situe dans la Baie de Bourgneuf ($46^{\circ}53' - 47^{\circ}06' \text{ N}$, $1^{\circ}58' - 2^{\circ}15' \text{ W}$) (Figure 72). Cette baie se situe au sud de l'estuaire de la Loire, c'est une baie macrotidale dont les amplitudes de marée maximales sont de 6 m. Sa surface totale est de 340 km^2 , dont 100 km^2 sont composés de vasières. Cette baie est caractérisée par une turbidité moyenne par jour allant de 4 à 415 mg. L^{-1} (Haure *et al.*, 1996) et pouvant atteindre 1 g. L^{-1} pendant les plus fortes marées. La granulométrie est composée à 41% de vases inférieures à $63 \mu\text{m}$ et de sables (entre 63 et $2000 \mu\text{m}$) (Méléder *et al.*, 2007).

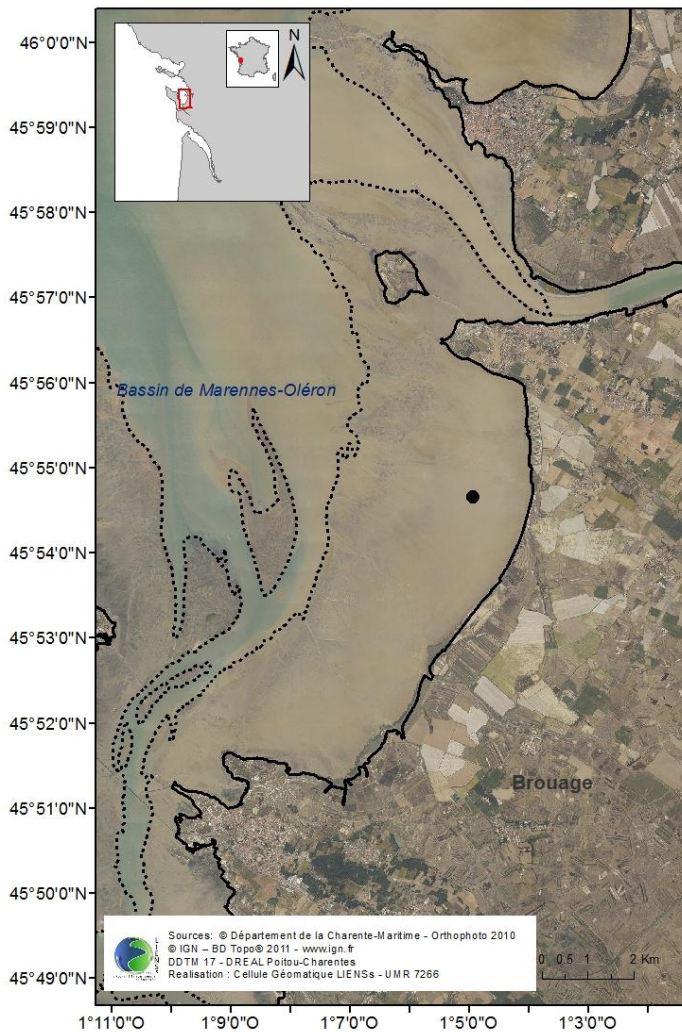


Figure 73 : Localisation de la vasière de Brouage

La vasière de Brouage est localisée dans la baie macrotidale de Marennes-Oléron (45°54,53'N, 1°05,23'W) (Figure 73) dont les amplitudes moyennes des marées sont d'environ 6 m. Les eaux de la baie peuvent être très turbides de par les apports de la Charente, et la remise en suspension du sédiment de la vasière, entraînant une quantité de matière en suspension très forte pouvant dépasser les 2000 mg. L⁻¹ (Bassoullet *et al.*, 2000). La surface totale de la baie représente 196 km² dont 60% sont couverts de vasière (Riera & Richard, 1996). Le sédiment de Brouage est composé à 92% d'argiles de taille inférieure à 63 µm (Galois *et al.*, 2000). Cette vasière se divise en trois parties distinctes, en s'éloignant de la plage, présentant chacune une forme de relief caractéristique : 1) partie haute sans relief apparent ; 2) partie centrale caractérisée par la présence de seillons-banquettes, et 3) partie basse utilisée pour l'aquaculture (Gouleau *et al.* 2000). Le site étudié se situe dans la première zone de la partie centrale ayant un relief marqué de seillons-banquettes (Dyer *et al.*, 2000).

Les prélèvements de sédiment ont été réalisés sur le site de Liarne au printemps (07/05/2012) et à l'automne (01/10/2012). Le site de Brouage a été étudié au printemps (22/04/2012). Les prélèvements sur ces deux sites ont été réalisés à différentes profondeurs : P1 (0-0,5 cm ; correspondant grossièrement à la profondeur à laquelle la majorité de la biomasse microphytobenthique se trouve) et en P2 (0.5-1 cm). Différents carottages ont été effectués. Des carottes de 3 cm de diamètre (7,065 cm²) ont été récoltées tout au long de la marée (en parallèle des mesures de fluorimétrie, voir ci-dessous), et congelées dans de l'azote liquide, puis conservées à -80°C, afin d'effectuer des analyses pigmentaires par HPLC. D'autres carottes, de taille supérieure (15 cm de diamètre pour 176,625 cm²), ont été collectées à trois moments différents de la marée : (D) en début de marée (2 heures avant l'heure du maximum de marée basse), (M) à l'heure du maximum de marée basse, et (F) en fin de marée (2 heures après l'heure du maximum de marée basse). Ce deuxième type de prélèvement a été soit congelé pour l'analyse de la biomasse chlorophyllienne, soit conservé dans l'alcool pour la diversité de la macrofaune et de la méiofaune, soit traité directement (voir ci-dessous).

Paramètres physiques : lumière et température

La lumière, plus exactement les radiations actives pour la photosynthèse (PAR), a été mesurée en continu à la surface du sédiment à l'aide d'un capteur PAR (Leaf-PAR) raccordé à un data-logger (ULM-500, Walz, Allemagne). En parallèle, la température a été mesurée en continu en surface (Plane Temperature Leaf Sensor ; accessoire du ULM-500) via le même data-logger et, à chaque profondeur à l'aide d'un capteur de température (Hobo Pro V2 Temp/Ext Temp, modèle U23-004, ONSET, USA).

Fluorescence chlorophyllienne

Les mesures de fluorimétrie ont été réalisées de façon semi-continue avec un Water-PAM (Fiber version, Walz, Effeltrich, Allemagne). La fluorescence de la chlorophylle *a* est excitée, par une lumière non actinique (460 nm), et des 'saturating pulse' de lumière bleue (3000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) ont été appliqués pour mesurer respectivement le F_0 et le F_m (le niveau minimum et le maximum de fluorescence du PSII) sur des échantillons adaptés à l'obscurité. Dans le cadre de mesures *in situ*, l'absence de lumière provoque une diminution de la biomasse en surface (Serôdio *et al.*, 2006a), c'est pourquoi le 'vrai' F_0 ne peut être mesuré de façon conventionnelle. Sa mesure est effectuée une fois la mesure de cinétique en

fonction de la lumière (RLC) effectuée, après adaptation à l'obscurité (5 minutes) (Lefebvre *et al.*, 2011). Le rendement quantique maximal d'excitation piégé par le PSII a été calculé par le ratio F_v/F_m où $F_v = F_m - F_0$. Les RLCs (Rapid Light Curves) correspondent à une exposition de la surface du sédiment (et donc du microphytobenthos) à huit paliers de lumière croissante successive (E) prodigués par la lumière LED bleue interne du Water-PAM. La durée de chaque palier a été soit de 10 s afin d'évaluer au mieux les paramètres ETR, soit de 30 s pour évaluer au mieux les paramètres NPQ comme conseillé par (Perkins *et al.*, 2006, Lefebvre *et al.*, 2011). Les RLC permettent la mise en place de courbes relatives au taux de transport d'électrons au travers du PSII (rETR) en fonction de la lumière (E) ainsi que l'établissement de courbes du quenching non photochimique (NPQ) en fonction de la lumière (E). ETR-E et NPQ-E sont respectivement ajustés (auquel on préférera le terme anglais 'Fit') par le modèle proposé par (Eilers et Peeters, 1988) et adapté par (Serôdio et Lavaud, 2011). Ce 'fitting' des courbes ETR-E permet d'extraire certains paramètres photosynthétiques du PSII relatifs au taux de transport d'électrons (rETR, rETR_m, alpha, E_k). Le 'fitting' des courbes NPQ-E permet quant à lui de récupérer le NPQ_m et l'irradiance nécessaire pour atteindre 50% du NPQ_m (E50_{NPQ}). Six paramètres importants ont ainsi été exploités :

-rETR_m : Il représente le taux relatif de transport d'électrons photosynthétique maximal. Ce paramètre permet d'évaluer la capacité photochimique maximale du microphytobenthos.

E_k : Il représente le coefficient de saturation de la lumière. Ce paramètre est relatif à la photoacclimatation du microphytobenthos. Plus il est élevé, plus le microphytobenthos est acclimaté à de fortes intensités lumineuses.

Alpha : Ce paramètre est la pente à l'origine dans les cas de courbes ETR-E. Plus il est élevé, plus la lumière est efficacement utilisée.

NPQ_m : Ce paramètre est le mécanisme de régulation rapide de la photochimie par diminution du taux d'excitation du PSII. Il représente la photoprotection maximale physiologique du microphytobenthos.

E50_{NPQ} : Il représente l'énergie lumineuse nécessaire pour atteindre 50% du NPQ maximal.

E50_{NPQ}/E_k : Ce paramètre représente le lien entre la photochimie et le développement de la photoprotection. Plus ce paramètre est fort, plus la régulation de la photosynthèse aux fluctuations de lumière (équilibre photochimie/photoprotection) est efficace.

Mesure de la production primaire du MPB

L'évaluation du bilan de carbone journalier a été effectuée par la mesure des flux de carbone à la surface du sédiment. Des cloches benthiques, reliées à un data logger (IRGA), ont été déployées sur une période de 30 minutes à la lumière et à l'obscurité. Ce dispositif permet la mesure des variations de pression partielle de CO₂ qui sont la résultante de la respiration et de la production. La mesure à l'obscurité permet d'établir la respiration alors que la mesure à la lumière permet d'établir la production nette. En ajoutant ces deux valeurs, il est possible de calculer la 'production brute' du microphytobenthos (GPP, 'gross primary production'). Ces mesures ont été effectuées à Bourgneuf et à Brouage seulement pour le printemps (respectivement 07/05/2012 et 22/04/2012).

Collecte de vase

Des échantillons de sédiment ont été récoltés sur la vase à deux profondeurs, l'une correspondant grossièrement au biofilm (P1 = 0-0,5 cm) et une autre plus profonde (P2 = 0,5-1 cm). Ces prélèvements ont été effectués à trois moments différents de la marée (voir ci-dessus). Des carottiers de 15 cm de diamètre (176,625 cm²) ont été enfoncés dans la vase afin de récupérer une carotte de sédiment (Figure 74). Les carottes extraites ont été conservées dans leur carottier. Un anneau de mesure de 0,5 cm a été disposé à la surface sur le carottier et la vase a été amenée à sa surface à l'aide d'un poussoir. L'anneau a ensuite été retiré, et le sédiment a été raclé et récupéré puis conservé à 4°C (dans une glacière) le temps de son conditionnement sur la plage. Cette opération a ensuite été répétée afin de collecter le sédiment à la deuxième profondeur. Dès le retour sur la plage, les prélèvements ont été conditionnés au fur et à mesure en triplicats pour les différents paramètres mesurés ci-dessous.

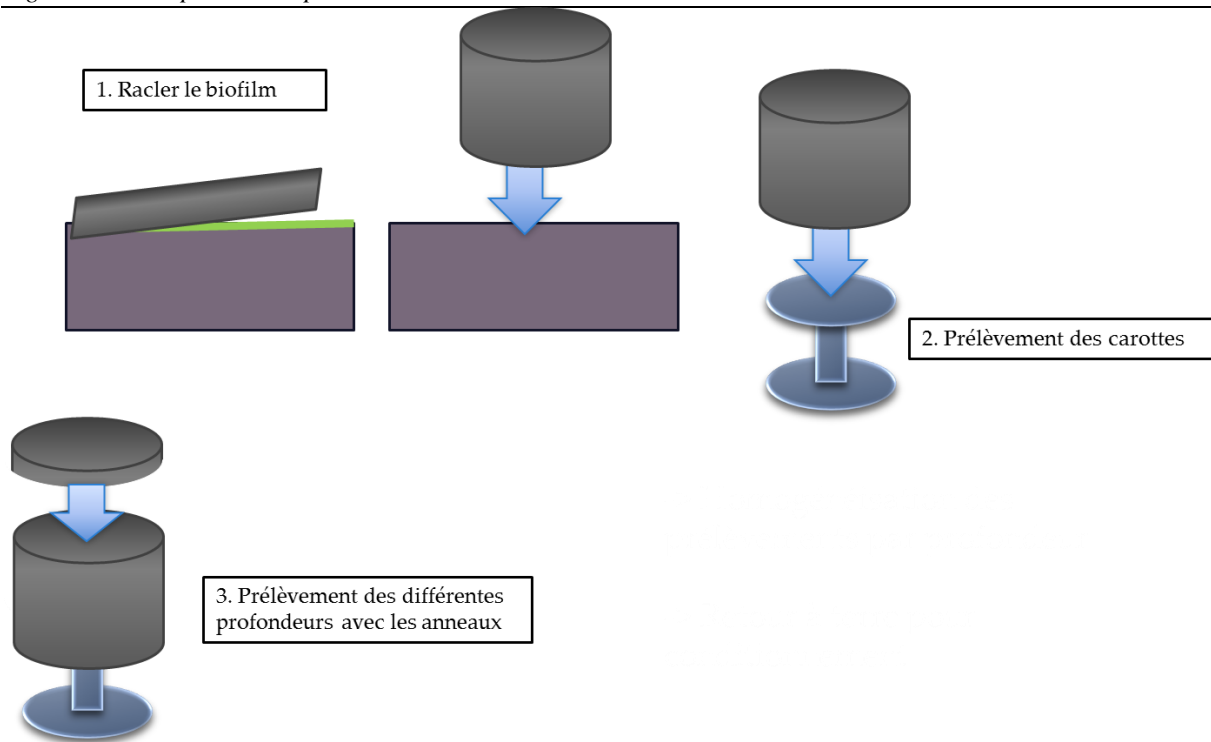


Figure 74 : Protocole du prélèvement de vase.

Contenu pigmentaire

Le sédiment a été récolté tout au long de la marée, en même temps que des RLCs ont été effectuées (voir ci-dessus), afin d'analyser le contenu pigmentaire du biofilm en suivant la même méthode que pour la Partie 3. Le sédiment de surface (240 μm) des carottes a été coupé à l'aide d'un cryomicrotome, la fraction récoltée a été lyophilisée et extraite dans un mélange de 90% méthanol :0.2 M ammonium acétate (90/10 vol/vol) et 10% éthyle acétate comme décrit dans Lepetit *et al.* (2013). L'analyse a été faite par HPLC (Hitachi High Technologies Co., Japan). La quantification des pigments a été faite selon le protocole de Jakob *et al.* (1999) et normalisée au poids sec de sédiment. Le taux de dé-époxydation des xanthophylles (DES, %) a été calculé selon l'équation $DES = [(DT/DD + DT) \times 100]$, où DD représente la diadinoxanthine (la forme époxydée), DT la diatoxanthine (la forme dé-époxydée). Trois paramètres importants ont été exploités :

- DD+DT : représente le pool total de xanthophylles. Ce pool rentre dans le mécanisme de NPQ et est donc un paramètre intéressant dans l'étude de la photoprotection physiologique.

- DES_m : Ce paramètre correspond aux taux de dé-époxydation maximale de la DD en DT. Cette dé-époxydation est un des mécanismes de la photoprotection physiologique. Plus la DES est importante, plus la photoprotection est importante.
- DT_m : Ce paramètre représente la synthèse de DT maximale. C'est donc de la DT qui intervient dans le mécanisme de photoprotection physiologique (NPQ_m)

La concentration en chlorophylle *a* a elle aussi été mesurée afin de servir comme proxy de biomasse du microphytobenthos (MPB). Le sédiment conservé à -20°C a été lyophilisé puis broyé à l'aide d'un mortier et pesé avant dosage par fluorimétrie selon la méthode de Aminot et Kérouel (2004). L'extraction de la chlorophylle *a* à l'acétone à 90% a été réalisée à partir d'environ 50 mg de sédiment lyophilisé broyé. L'échantillon a été extrait pendant 12 h à 4°C dans un tube en verre avec une agitation par retournement, le tout à l'obscurité pour éviter la dégradation de la chlorophylle *a*. Après extraction, les échantillons ont été centrifugés 10 min à 3500g à 8°C . Le surnageant a été récupéré puis l'absorption a été mesurée grâce au fluorimètre (Turner TD 700, Turner Designs, USA) à 640 nm. Afin de doser la quantité de produits de dégradation de la chlorophylle *a* (phéopigments), les échantillons ont été acidifiés par ajout de 10 μl d'acide chlorhydrique (HCl 0.33N) par mL d'acétone. Après quelques minutes, l'absorption a été lue à nouveau.

$$\text{Biomasse de chlorophylle } [\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ sédiment sec}] = \frac{F - Fa}{K - Ka} * \frac{v}{m}$$

Avec : F et Fa : lecture avant et après acidification

K et Ka : coefficients de l'étalonnage du fluorimètre avant et après acidification

v : volume d'acétone (ml)

m : masse de sédiment pesé (g)

$$\text{Concentration en phéopigments } [\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{ sédiment sec}] = \frac{(K * Fa) - (Ka * F)}{Ka (K - Ka)} * \frac{v}{m}$$

Granulométrie

15 mL de sédiment ont été prélevés et conservés à température ambiante. L'analyse de la granulométrie est effectuée sur du sédiment nettoyé par une solution de sels dispersifs (sodium hexametaphosphate—HMP, 1 g L^{-1}), en granulométrie laser (Coulter LS 230, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA). Cette analyse permet de définir des groupes de

texture de sédiment par abondance relative (% du volume) de vase ($\emptyset < 63 \mu\text{m}$) et sable ($63 < \emptyset < 2000 \mu\text{m}$) en se basant sur l'échelle d'Udden-Wentworth's (les grains de taille plus grossière n'ont pas été pris en compte dans cette étude). Le traitement des données est réalisé par l'utilisation du programme GRADISTAT (Blott et Pye, 2001).

Teneur en eau

Un volume connu (50 mL) de sédiment a été placé dans un pot préalablement pesé. Une fois au laboratoire, le pot a été pesé avec la même balance que celle utilisée pour tarer le pot. Le sédiment a alors été séché à l'étuve à 60°C, couvercles ouverts pendant 2 j. La matière sèche a été pesée. La teneur en eau est calculée ($W(\%) = \frac{m_h - m_s}{m_h}$) avec : m_h représentant le poids humide (g) et m_s poids sec (g).

pH et Salinité

L'eau interstitielle du sédiment a été récupérée par centrifugation (10 minutes à 3500 g). Le pH a été mesuré par un pHmètre (Eutech Instruments PC 150, USA) et la salinité a été évaluée grâce à un conductimètre TetraCon325 (WTW, Weilhem, Allemagne).

Concentration en exopolysaccharides-EPS

Les EPS colloïdaux et les EPS liés ont été dosés selon le protocole de Takahashi *et al.* (2007). 5 mL de sédiments ont été prélevés, 5 mL d'eau de mer artificielle stérile ont été rajoutés et les échantillons ont été mis à agitation par balancement pendant 1 heure à 4°C. Les échantillons ont été ensuite centrifugés (10 minutes à 3500 g à 4°C) et le surnageant, correspondant à la fraction colloïdale des EPS, a été récolté et stocké à -20°C jusqu'à l'analyse. 5mL d'eau de mer artificielle stérile et une pointe de DOWEX, préalablement activée avec du PBS (Tampon Phosphate Salin) ont été rajoutés au culot de sédiment, puis l'échantillon a été remis en agitation par balancement pendant 1 h à 4°C. Les échantillons ont été ensuite centrifugés (10 min à 3500 g à 4°C) et le surnageant, correspondant à la fraction liée des EPS, a été récolté et à -20°C jusqu'à l'analyse.

Pour ces deux fractions d'EPS, la concentration en protéines et la concentration en carbohydrates (sucres) ont été déterminées en laboratoire. Le dosage des protéines a été mené grâce au kit Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA1, Sigma-Aldrich) selon la méthode

BCA. Une gamme étalon de bovine serum albumine (BSA, A2153, Sigma Aldrich) de 10 points entre 0 et 1 g.L⁻¹ a été préparée. Suivant les instructions du kit, un réactif a été préparé avec une solution de Sulfate de Cuivre (CuSO₄) dilué 50 fois dans de l'acide bicinchoninique. L'ion CU(II) est réduit par les protéines en ion Cu(I) qui combiné à l'acide bicinchoninique forme un complexe violet dont l'intensité est directement proportionnelle à la quantité de protéines. 200 µM de réactif sont disposés dans les puits d'une microplaque, puis 25 µL d'échantillons ont été ajoutés. Après une incubation de 30 min à 37°C à l'obscurité, l'absorbance a été mesurée à 562 nm. Le dosage des carbohydrates a été réalisé selon la méthode de Dubois (1956). Une gamme étalon de 12 points (entre 0 et 3 g.L⁻¹) de glucose a été effectuée. Dans des tubes à hémolyse en verre, 100 µL d'échantillon à doser ont été déposés, puis 100 µL d'une solution aqueuse de phénol à 5% ont été ajoutés avec précaution. Enfin 500 µL d'acide sulfurique à 98% ont été ajoutés dans chaque tube réactionnel. Les tubes ont été ensuite incubés à l'obscurité pendant 30 min à température ambiante. 200 µL de cette réaction ont été transférés dans une microplaque et l'absorbance est lue par spectrométrie à 485 nm.

Abondance de la méiofaune et de la macrofaune

Six carottes de 15 cm de diamètre et de 20 cm de haut (176,625 cm²) ont été prélevées. La macrofaune a été récupérée par tamisage du sédiment sur 500 µm. Le méiobenthos a été récupéré par tamisage sur 50 µm. Les échantillons sont conservés dans de l'éthanol à 70 % jusqu'à l'identification. La méiofaune a été observée, identifiée et comptée à la loupe binoculaire (Zeiss) après colorisation au rose de bengale. Les grands groupes de la méiofaune ont été comptés (abondance en individus/cm³): nématodes, foraminifères, copépodes, ostracodes, petits gastéropodes, petits bivalves. La macrofaune a aussi été observée à la loupe binoculaire (Zeiss). L'abondance est exprimée en en individus/cm³. Dans la mesure du possible, chaque individu a été identifié jusqu'à l'espèce. Toutefois certains individus abîmés n'ont pu faire l'objet d'une telle précision lors de l'identification.

III. Résultats

Lumière et température

L'heure du maximum de la marée basse était à 12 h 21 pour Brouage au printemps, 12 h 35 pour Bourgneuf au printemps et 12 h 23 pour Bourgneuf en automne avec des coefficients de marée de 84, 109 et 92, respectivement.

La lumière a été assez fluctuante, en raison de passages nuageux fréquents (Figure 75)

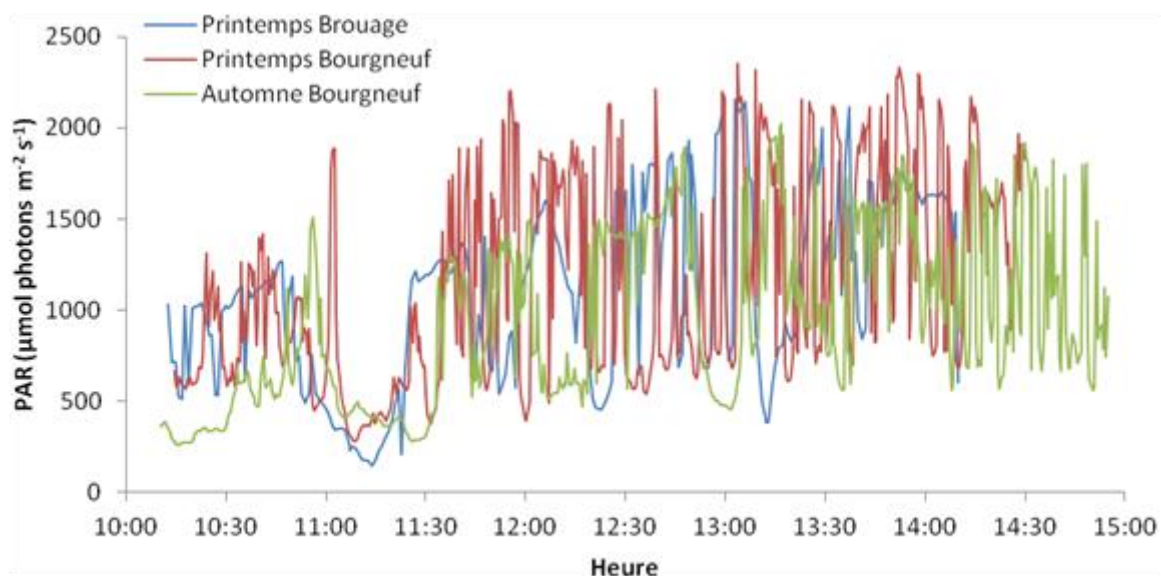


Figure 75 : Variations de lumière au cours de la marée basse étudiée : en bleu printemps Brouage (22/04/2012), en rouge printemps Bourgneuf (07/05/2012) et en vert automne Bourgneuf (01/10/2012)

La température était aussi très variable. Globalement, la température a augmenté au cours de la marée basse mais pour le printemps à Brouage, il y a eu deux fortes diminutions de températures entre 11 h et 11 h 30 et entre 13 h et 13 h 30 dues à des passages nuageux (Figure 76).

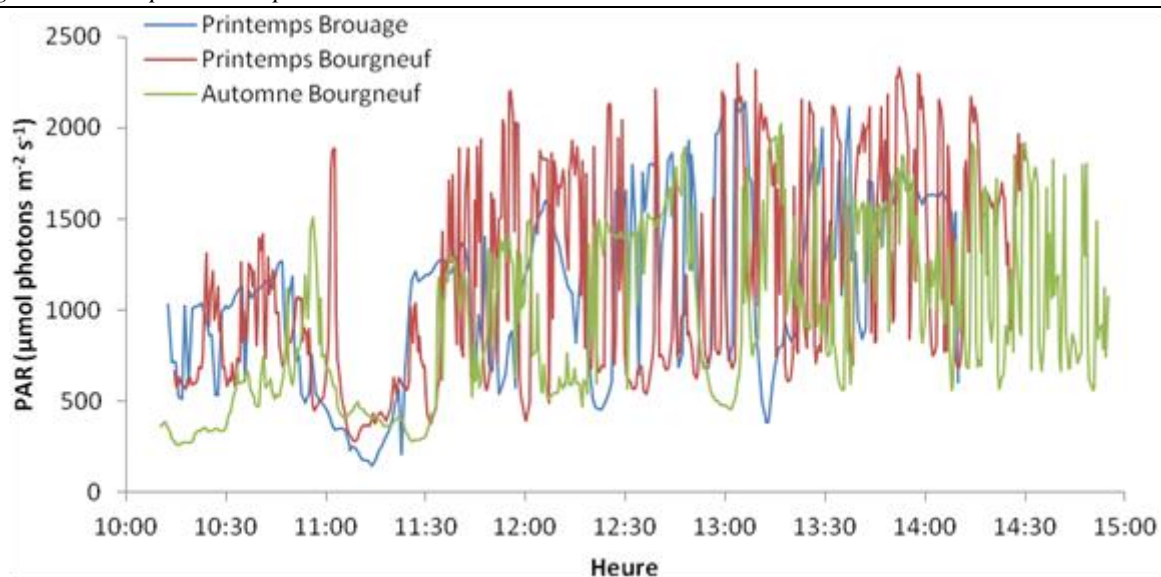


Figure 76 : Variations de température en surface du sédiment au cours de la marée basse étudiée : en bleu printemps Brouage (22/04/2012), en rouge printemps Bourgneuf (07/05/2012) et en vert automne Bourgneuf (01/10/2012)

Dans le sédiment, la température était plus faible qu'en surface avec des variations moins prononcées (Figure 77), mais avec toujours une légère augmentation au cours de la marée basse. Les températures à -0,5 cm et 1 cm étaient similaires dans ces conditions météorologiques.

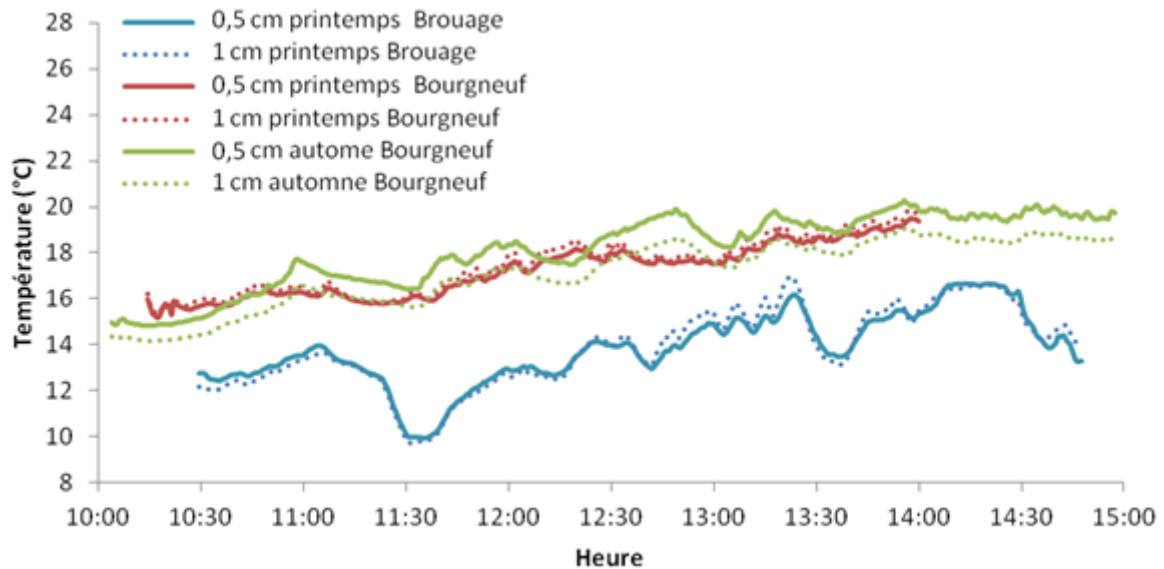


Figure 77 : Variations de la température à (P1) 0,5 cm de profondeur (trait plein) et (P2) 1 cm de profondeur (trait discontinu) au cours de la marée basse étudiée : en bleu printemps Brouage (22/04/2012), en rouge printemps Bourgneuf (07/05/2012) et en vert automne Bourgneuf (01/10/2012)

Afin de comparer ces sites, les valeurs minimales, maximales et les moyennes avec les écarts-types ont été calculées (Figure 78) à partir des mesures en continu. La lumière moyenne en surface pour le printemps se situait aux alentours de $1100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ($\pm 495 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour Brouage et $1150 \pm 566 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pour Bourgneuf) (Table 7). Elle était légèrement plus faible ($944 \pm 469 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) pour l'automne à Bourgneuf ($p < 0,001$) (Table 7). La lumière maximale dépassait toujours les $2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (considérée comme une valeur théorique de plein soleil). La lumière minimale mesurée à Brouage au printemps était de $148 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pour Bourgneuf, elle est de $283 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ au printemps et $262 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en automne.

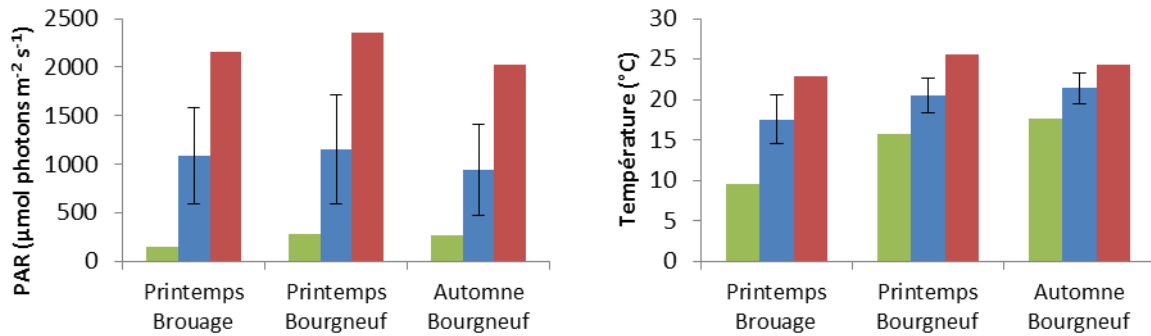


Figure 78 : Lumière (gauche) et température (droite) à la surface du sédiment au cours de la marée basse étudiée : en vert les valeurs minimales, en bleu les moyennes sur la marée basse (moyenne et SD) et en rouge les valeurs maximales.

Table 7 : Résultat des tests T de comparaison des lumières moyennes en surface. Rouge: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; vert clair: $p < 0.01$; vert foncé: $p < 0.001$.

	Brouage printemps	Bourgneuf printemps	Bourgneuf automne
Brouage printemps			
Bourgneuf printemps			
Bourgneuf automne			

La température moyenne pour le printemps à Brouage était de $17,5 \pm 3^\circ\text{C}$ alors que pour Bourgneuf, la température au printemps était de $20,5 \pm 2,2^\circ\text{C}$ et en automne de $21,4 \pm 2^\circ\text{C}$. Ces températures sont significativement différentes ($p < 0.001$) (Table 8) mais cependant très variables. Pour Brouage, la température minimale était de $9,5^\circ\text{C}$, alors que pour Bourgneuf elle était de $15,7^\circ\text{C}$ au printemps et $17,6^\circ\text{C}$ en automne. La valeur maximale atteinte pour Brouage au printemps était de $22,9^\circ\text{C}$ et pour Bourgneuf de $22,6^\circ\text{C}$ au printemps et $24,3^\circ\text{C}$ en automne.

Table 8 : Résultat des tests T de comparaison des températures moyennes en surface. Rouge: $p > 0.05$; orange: $p < 0.05$; vert clair: $p < 0.01$; vert foncé: $p < 0.001$.

	Brouage printemps	Bourgneuf printemps	Bourgneuf automne
Brouage printemps			
Bourgneuf printemps			
Bourgneuf automne			

Il est important de prendre en compte la lumière et la température des jours précédents quand on travaille sur la fluorescence terrain. Ces paramètres très variables vont influencer l'acclimatation (photoacclimatation et thermoacclimatation) du MPB. L'historique lumineux tout comme la température (Table 9), vont particulièrement influencer les mesures de fluorimétrie. Ainsi, la lumière moyenne à la surface du sédiment était comprise entre $371,3 \pm 239,4 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et $1292,7 \pm 499,9 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La 'light dose' à la surface du sédiment a varié quant à elle de 5,6 à 18,3 mol photons m^{-2} . La température moyenne était comprise entre $15,2 \pm 2,3 \text{ }^\circ\text{C}$ et $26,4 \pm 5,3 \text{ }^\circ\text{C}$.

Table 9 : Historique lumineux et température pour les campagnes terrain de Brouage et Bourgneuf.

Jour	PAR ($\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	'Light dose' (mol photons m^{-2})	Température ($^\circ\text{C}$)
Brouage printemps			
J1	825.6 ± 514.4	11.7	15.8 ± 3.5
J2	842.8 ± 279.9	12.6	16.6 ± 1.8
J3	1292.7 ± 499.9	10.6	17.9 ± 2.2
J4	1092.6 ± 495.4	16.4	17.5 ± 3.0
Bourgneuf printemps			
J1	371.3 ± 239.4	5.6	15.2 ± 2.3
J2	780.1 ± 428.5	12.2	18.5 ± 2.9
J3	1194.7 ± 612.1	18.3	20.6 ± 4.3
J4	1150.4 ± 565.4	17.6	20.5 ± 2.2
Bourgneuf automne			
J1	1014.8 ± 290.7	17.2	26.4 ± 5.3
J2	944.1 ± 469.1	16.1	21.4 ± 1.9
J3	1132.0 ± 164.5	17.5	23.2 ± 2.0

Paramètres photosynthétiques moyens

Les paramètres photosynthétiques globaux ont été étudiés. Les valeurs moyennes calculées sur l'ensemble d'une journée ont permis d'avoir une vue d'ensemble sur les différents sites. Le $rETR_m$ est plus élevé à Brouage qu'à Bourgneuf, au printemps (1,7x) ainsi qu'à l'automne (2,6x). Le paramètre E_k est équivalent entre Brouage au printemps et Bourgneuf à l'automne (autour de $340 \pm 180 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) et légèrement plus faible au printemps à Bourgneuf ($223,71 \pm 94,31 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). Le paramètre Alpha mesuré au printemps ($0,41 \pm 0,08$ pour Brouage et $0,42 \pm 0,12$ pour Bourgneuf) est supérieur à celui mesuré en automne ($0,17 \pm 0,04$ pour Bourgneuf) (Table 10).

Table 10 : Tableau récapitulatif des paramètres photosynthétiques. En rouge les données pour lesquelles trop peu de données sont disponibles pour avoir une moyenne fiable.

	Brouage printemps	Bourgneuf printemps	Bourgneuf automne
	Moyenne	Moyenne	Moyenne
ETR_m	147.31 ± 41.32	87.16 ± 22.05	59.63 ± 33.63
E_k	341.63 ± 183.55	223.71 ± 94.31	343.02 ± 176.59
Alpha	0.41 ± 0.08	0.42 ± 0.12	0.17 ± 0.04
NPQ_m	3.69 ± 0.50	3.62 ± 1.53	3.89 ± 0.67
E50_{NPQ}	1582.90 ± 442.83	829.24 ± 560.95	1419.36 ± 436.85
E50_{NPQ}/E_k	4.62 ± 1.07	3.51 ± 2.59	4.47 ± 2.00
DD+DT	12.97 ± 4.66	11.19 ± 7.77	9.91 ± 4.83
DES_m	18.82 ± 8.78	27.08 ± 10.01	19.73 ± 11.39
DT_m	2.68 ± 1.65	3.48 ± 1.87	3.06 ± 1.23

Le NPQ_m mesuré, pour les 2 sites, est relativement élevé, avec des valeurs au printemps de $3,69 (\pm 0,50)$ à Brouage et $3,62 (\pm 1,53)$ à Bourgneuf et en automne, pour Bourgneuf, les valeurs sont aux alentours des $3,89 (\pm 0,67)$ (Table 10).

Le pool de xanthophylle (DD+DT) était similaire entre Brouage et Bourgneuf pour le printemps (environ $12 \text{ mol. } 100 \text{ mol Chl } a^{-1}$), cependant les valeurs ont été plus variables à l'automne. À l'automne, le pool de xanthophylle à Bourgneuf était plus faible ($9,91 \pm 4,83 \text{ mol. } 100 \text{ mol Chl } a^{-1}$).

La DES était plus élevée à Bourgneuf ($27,08 \pm 10,01$ %) qu'à Brouage ($18,82 \pm 8,78$ %) au printemps. Le peu de mesures exploitables à Bourgneuf à l'automne n'a pas permis de comparaison fiable.

La DT_m était plus importante à Bourgneuf ($3,48 \pm 1,87$ mol. 100 mol Chl a^{-1}) qu'à Brouage ($2,68 \pm 1,65$ mol. 100 mol Chl a^{-1}) au printemps. Tout comme pour la DES le peu de mesures exploitables à Bourgneuf à l'automne n'a pas permis de comparaison fiable.

Pour l' $E50_{NPQ}$ les valeurs mesurées étaient plus élevées au printemps à Brouage ($1582,90 \pm 442,83$ $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) qu'à Bourgneuf ($829,24 \pm 560,95$ $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) mais, à l'automne, les valeurs de Bourgneuf ont augmentées ($1419,36 \pm 436,85$ $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). De même, l' $E50_{NPQ}/E_k$ était plus important à Brouage au printemps ($4,62 \pm 1,07$) qu'à Bourgneuf ($3,51 \pm 2,59$) au printemps alors qu'à l'automne, sa valeur a augmenté ($4,47 \pm 2,00$) (Table 10).

Le NPQ_m moyen était relativement élevé pour tous les sites en comparaison de nos expérimentations en laboratoire sur cultures mono-spécifiques (Parties 2 et 5B) mais pas sur biofilm épipélique (Parties 5B). Il est important de remarquer que le NPQ_m moyen à Brouage était moins variable qu'à Bourgneuf pour la même saison. Le pool de xanthophylle, DD+DT, présentait les mêmes caractéristiques à savoir des valeurs semblables entre Brouage et Bourgneuf au printemps, mais avec une variabilité, cette fois encore, plus importante à Bourgneuf. La DES et la DT_m étaient plus importantes et plus variables à Bourgneuf qu'à Brouage. Ces différents paramètres pris en compte semble indiquer que de fortes variations de NPQ étaient présentes à Bourgneuf au printemps avec un rôle important des xanthophylles (dé époxidation et synthèse *de novo*) alors que le NPQ élevé de Brouage semblait être constant.

Taux de transport d'électrons relatif maximal ($rETR_m$) et le coefficient de saturation (E_k)

Variations en fonction de la lumière

Au cours de la marée basse, quel que soit le site ou la saison, E_k et $rETR_m$ ont varié avec les fluctuations lumineuses (PAR : radiations actives pour la photosynthèse) (Figure 79). Cependant, ces évolutions n'étaient pas instantanées et c'est pourquoi il faut tenir compte de l'environnement lumineux récent (Figure 80 et Figure 81).

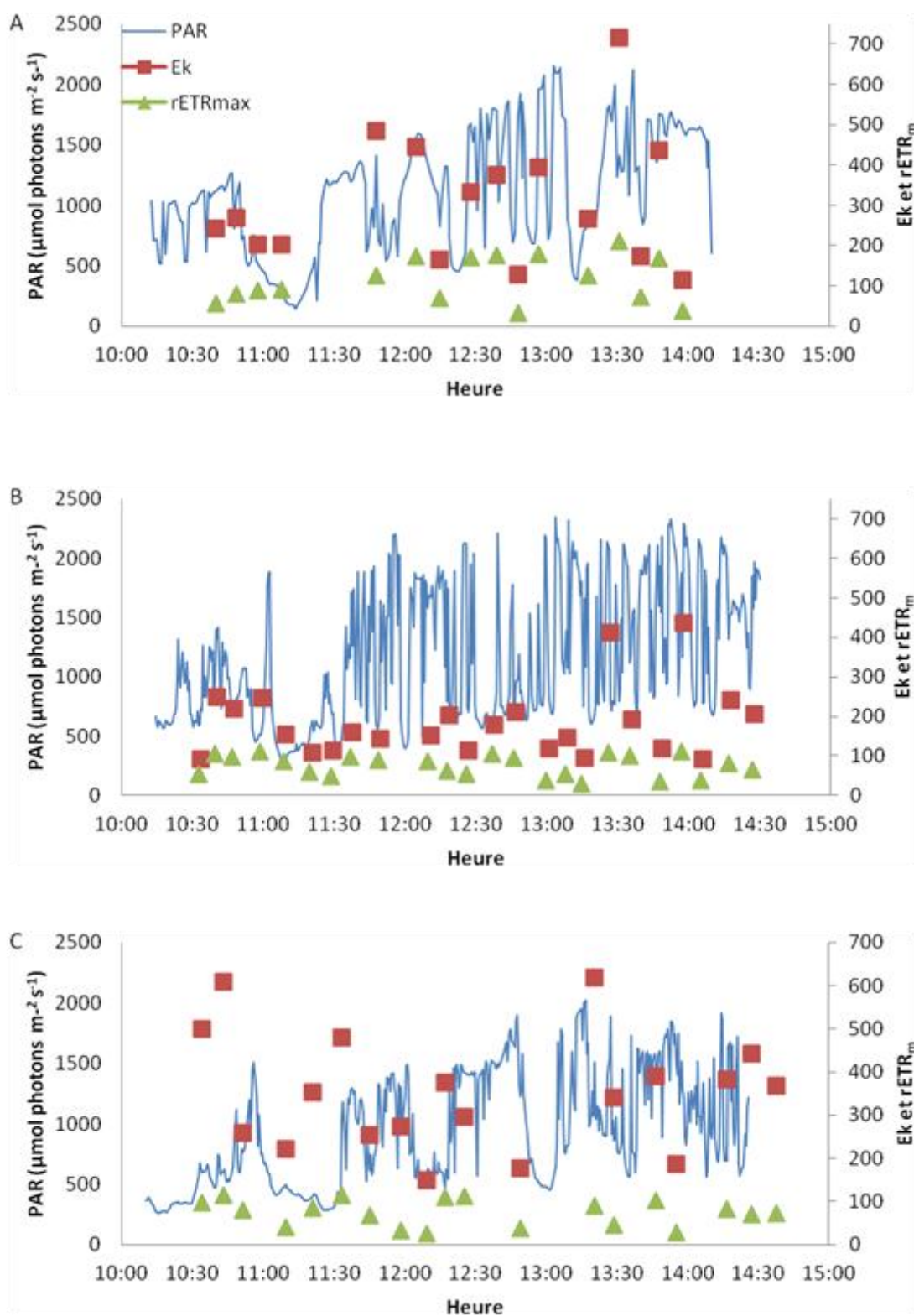


Figure 79 : Evolution du PAR (courbe bleu), du E_k (en rouge) et du $rETR_{max}$ (en vert).
A) Brouage Printemps, B) Bourgneuf Printemps et C) Bourgneuf Automne.

$rETR_m$ est un paramètre de photochimie, il est donc étroitement lié à la lumière. Les courbes de $rETR_m$ en fonction du PAR moyen (moyenne sur 5 min avant la mesure, Lefebvre *et al.*, 2011) peuvent être tracées (Figure 80 et Figure 81). Pour Brouage au printemps, $rETR_m$ fluctuait autour d'une moyenne de $147 \pm 41 \mu\text{mol e}^- \text{s}^{-1}$ qui correspond à un PAR moyen de $1150 \pm 449 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La majorité des valeurs est groupée autour de ces valeurs (zone délimitée en trait discontinu sur la Figure 80).

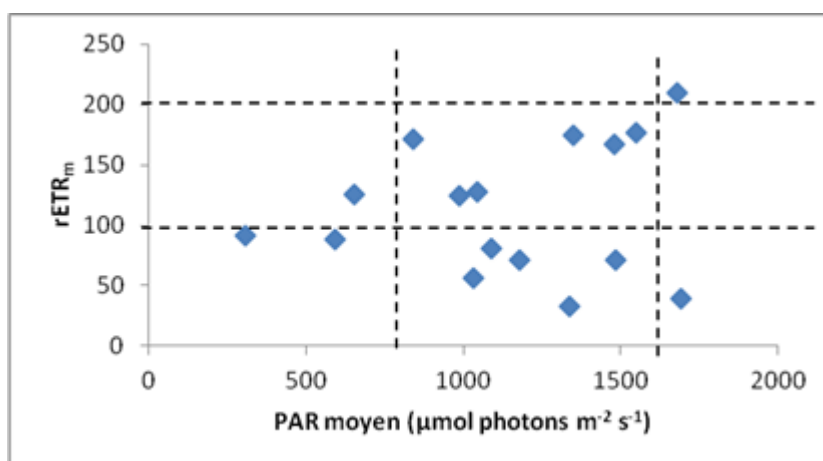


Figure 80 : $rETR_m$ en fonction du PAR moyen sur 5 min pour Brouage Printemps. En traits discontinus, la zone regroupant les valeurs moyennes de lumière et $rETR_m$.

La même observation a pu être faite pour Bourgneuf au printemps et à l'automne (Figure 81). Les valeurs de $rETR_m$ évoluent autour d'une moyenne de $87,16 \pm 22,05 \mu\text{mol e}^- \mu\text{g s}^{-1}$ au printemps et $59,63 \pm 33,63 \mu\text{mol e}^- \mu\text{g s}^{-1}$ en automne, pour des valeurs de PAR moyennes de respectivement $1206,1 \pm 458,4 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et de $979,7 \pm 507,3 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

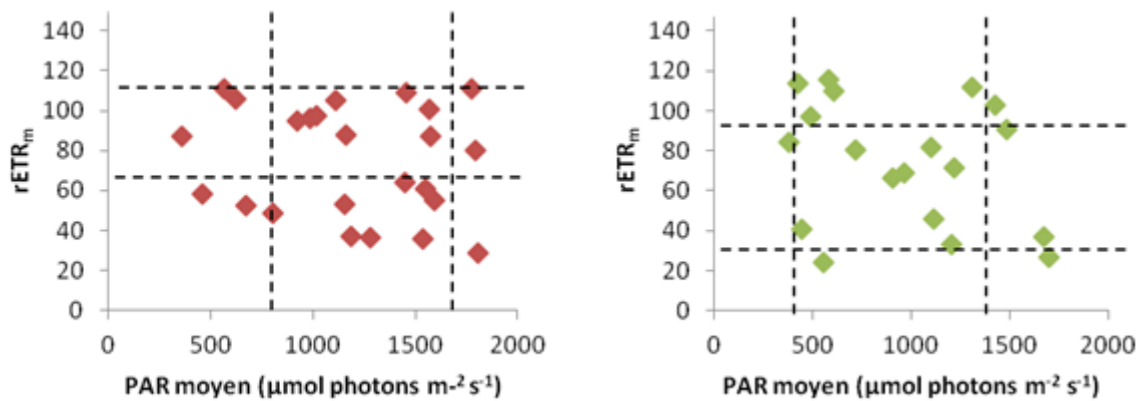


Figure 81 : rETR_m en fonction du PAR moyen sur 5 min pour Bourgneuf Printemps (à gauche) et Automne (à droite). En traits discontinus, la zone regroupant les valeurs moyennes de lumière et rETR_m.

E_k est un paramètre de photochimie qui par conséquent est, lui aussi, lié à la lumière moyenne reçue au cours des 5 min précédant la mesure (Figure 82). Pour Brouage au printemps, E_k évoluait autour d'une valeur moyenne de 286,6 ($\pm 171,7$) pour un PAR moyen de 1204,2 $\pm 399,4$ $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pour les valeurs de Bourgneuf, le même type de schéma a été observé, à savoir une répartition autour d'une valeur moyenne qui est de 183,2 ($\pm 89,65$) pour le printemps et 343,0 ($\pm 176,6$) pour l'automne, pour des PARs moyens de respectivement 1206,1 $\pm 458,4$ $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et 979,7 $\pm 507,3$ $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

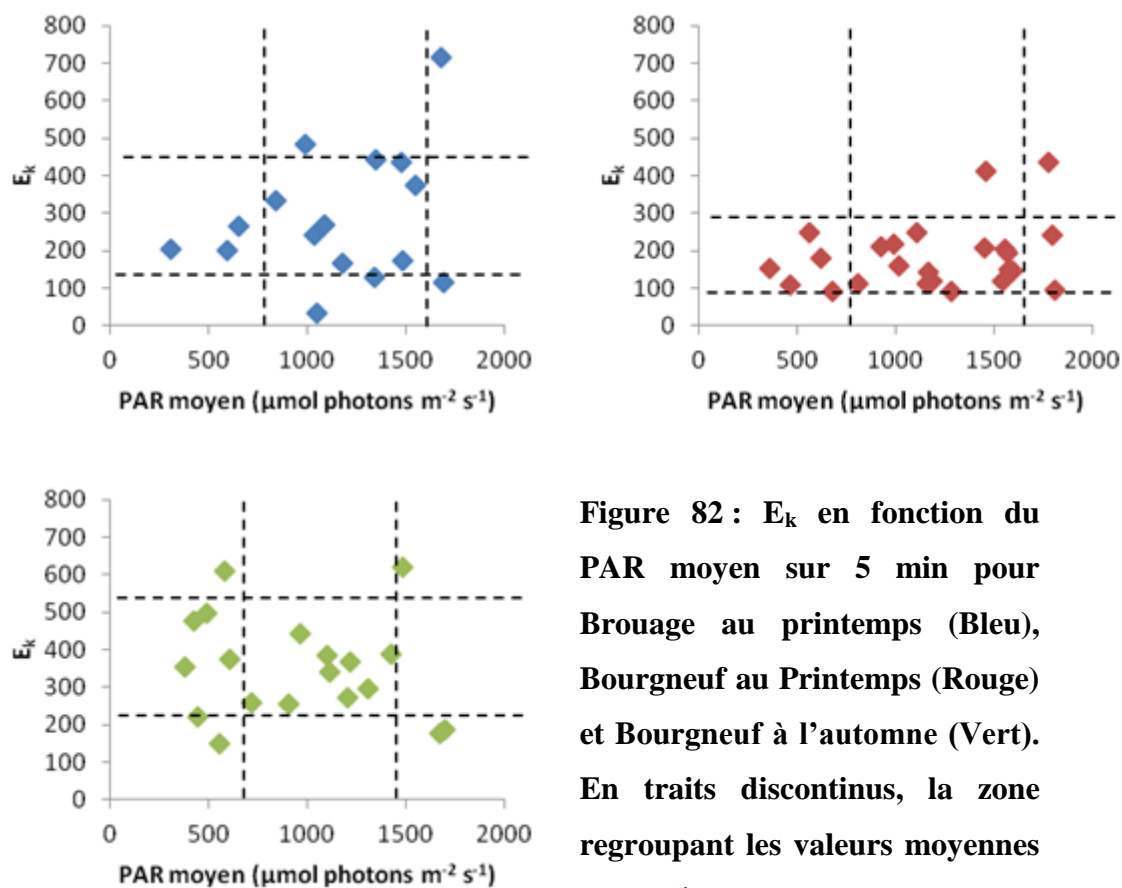


Figure 82 : E_k en fonction du PAR moyen sur 5 min pour Brouage au printemps (Bleu), Bourgneuf au Printemps (Rouge) et Bourgneuf à l'automne (Vert). En traits discontinus, la zone regroupant les valeurs moyennes de lumière et E_k .

Variations en fonction de la température

Quand $rETR_m$ est comparé avec la température, aucun réel schéma ne se dégage, peu importe le site ou la saison (Figure 83).

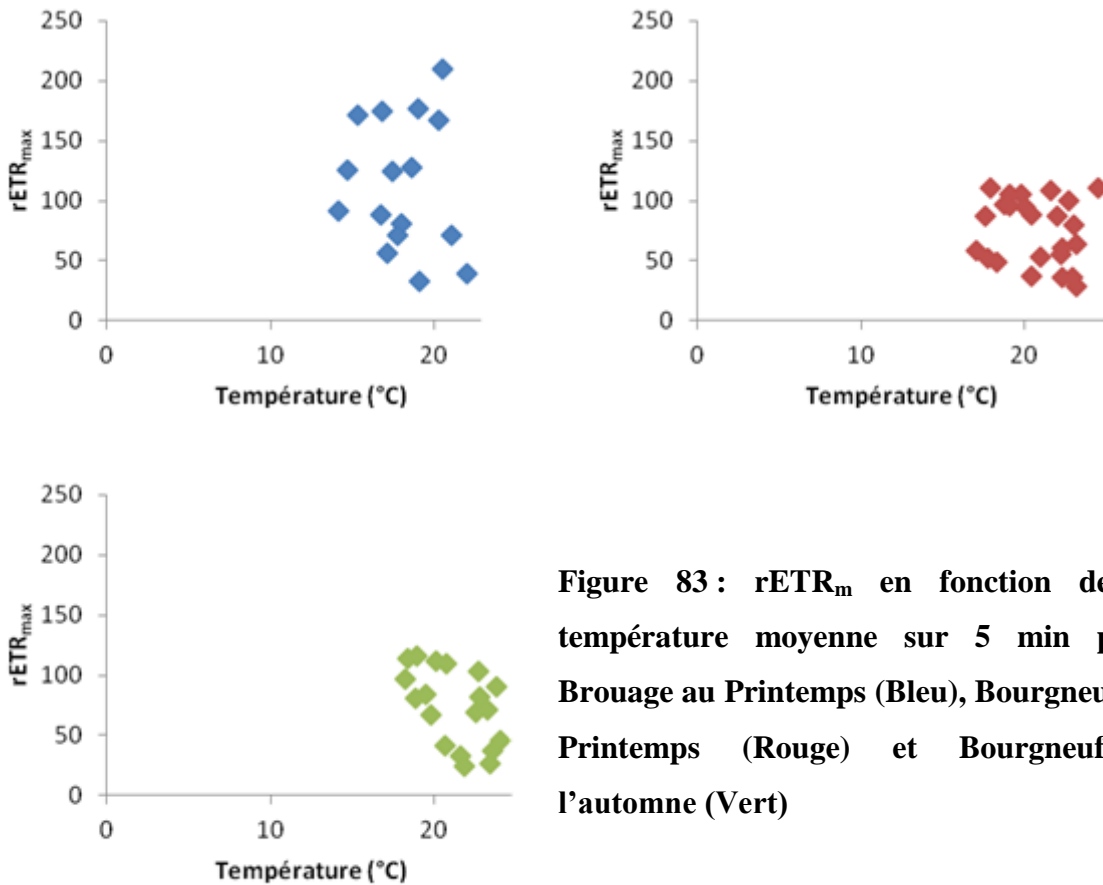


Figure 83 : rETR_m en fonction de la température moyenne sur 5 min pour Brouage au Printemps (Bleu), Bourgneuf au Printemps (Rouge) et Bourgneuf à l'automne (Vert)

Quenching non photochimique (NPQ)

Variations en fonction de la lumière

Quand on observe le NPQ_m mesuré (Figure 84) pour Brouage au printemps, il n'évolue pas en fonction des fluctuations de lumière, restant autour d'une moyenne de 3,8 (± 0,4). À l'opposé, les variations de NPQ_m pour Bourgneuf, au printemps comme à l'automne, présentent des fluctuations importantes liées aux variations d'intensité lumineuse.

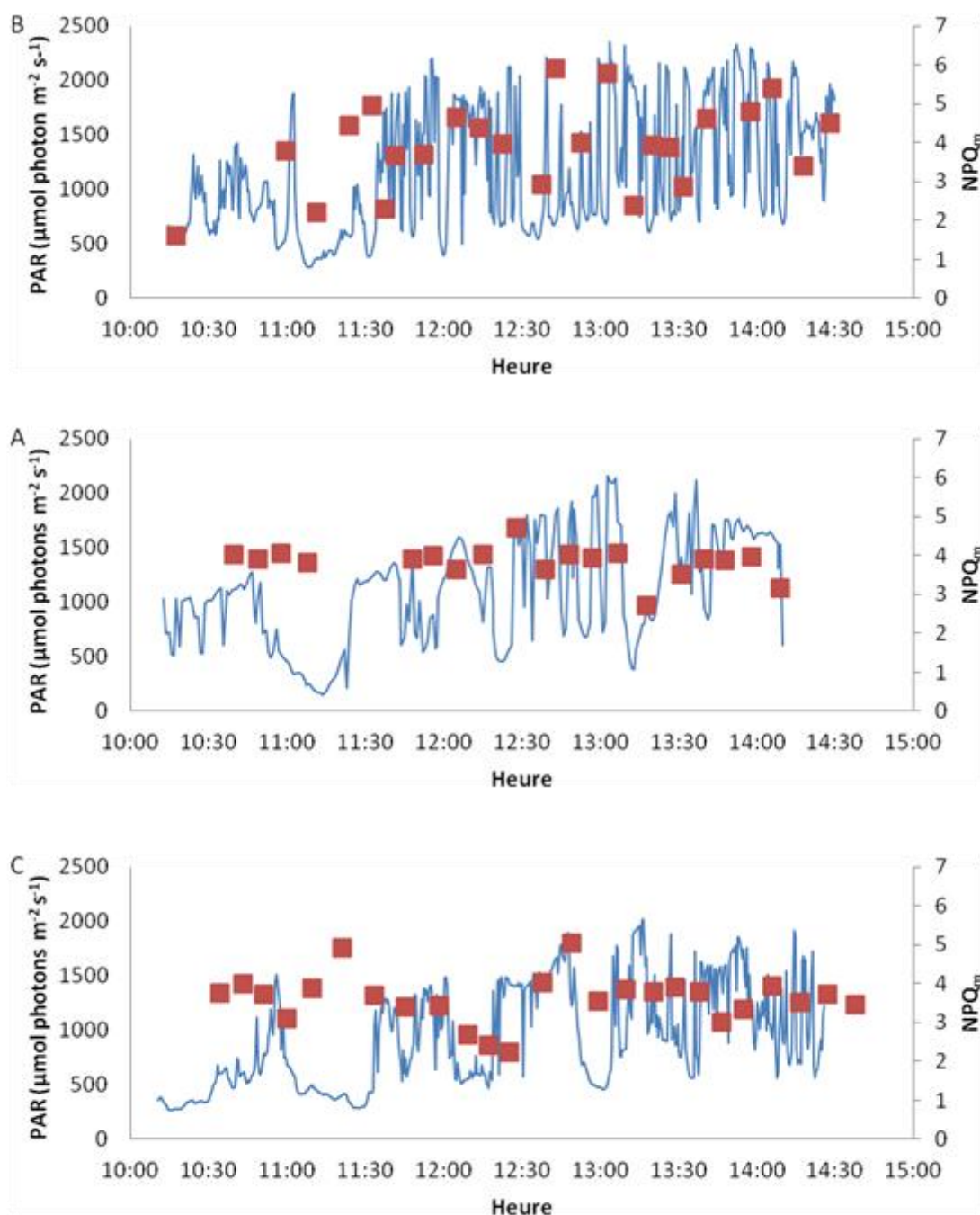


Figure 84 : Evolution du PAR (courbe bleu) et du NPQ_m (en rouge). A) Brouage Printemps, B) Bourgneuf Printemps et C) Bourgneuf Automne.

Comme précédemment, les valeurs de NPQ_m ont été représentées par rapport à l'intensité lumineuse moyenne sur les 5 min précédentes la mesure (Figure 85). À Brouage au printemps, les valeurs de NPQ_m n'évoluent pas avec la lumière, mais restent constantes. Pour Bourgneuf, au printemps, les valeurs de NPQ_m montrent clairement une augmentation en

fonction de la lumière moyenne des 5 dernières min. Cette évolution du NPQ_m en fonction de la lumière est moins claire pour les données de Bourgneuf à l'automne.

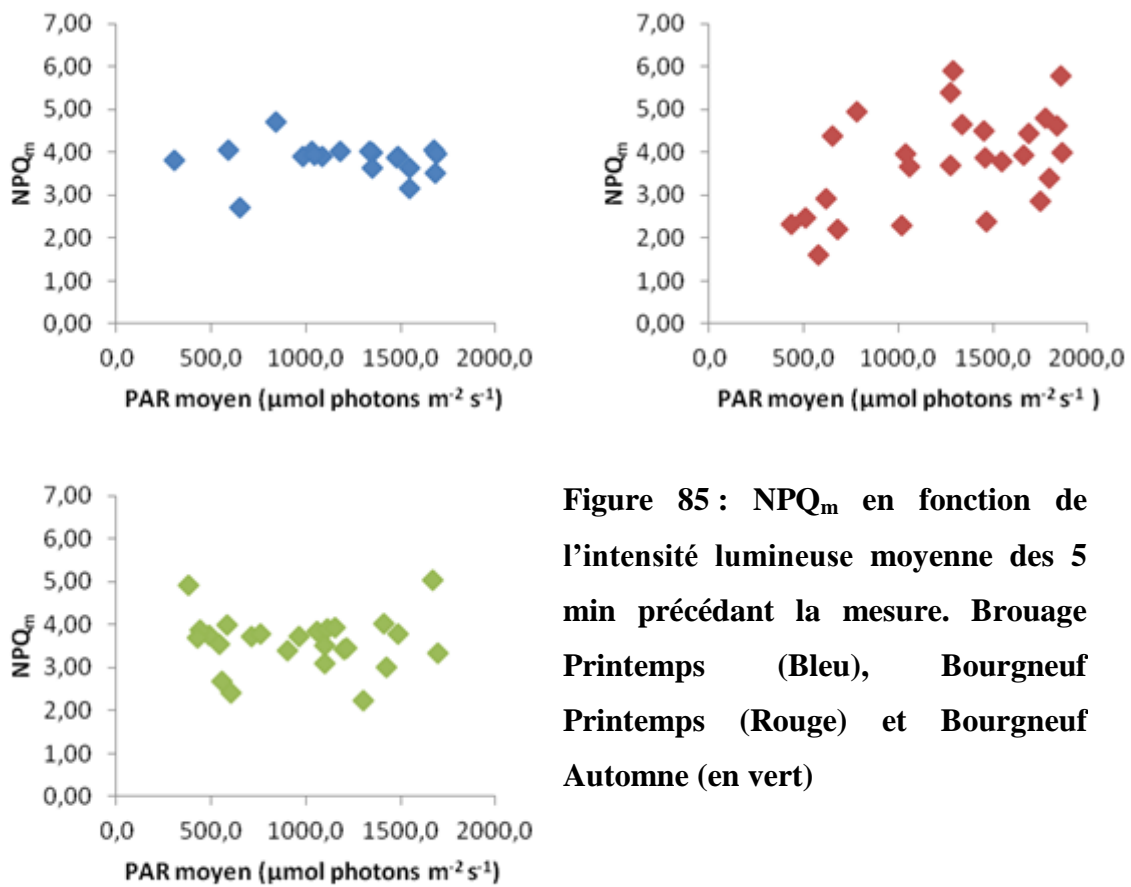


Figure 85 : NPQ_m en fonction de l'intensité lumineuse moyenne des 5 min précédant la mesure. Brouage Printemps (Bleu), Bourgneuf Printemps (Rouge) et Bourgneuf Automne (en vert)

Variations en fonction de la température

Si on regarde le lien entre la température et le NPQ_m (Figure 86), tout comme pour la lumière, pour Brouage au printemps, les valeurs n'évoluent pas. Ce lien est cependant présent pour Bourgneuf au printemps avec une augmentation du NPQ_m en fonction de la température. Pour les données de Bourgneuf à l'automne, la même observation peut être faite, mais de façon moins flagrante.

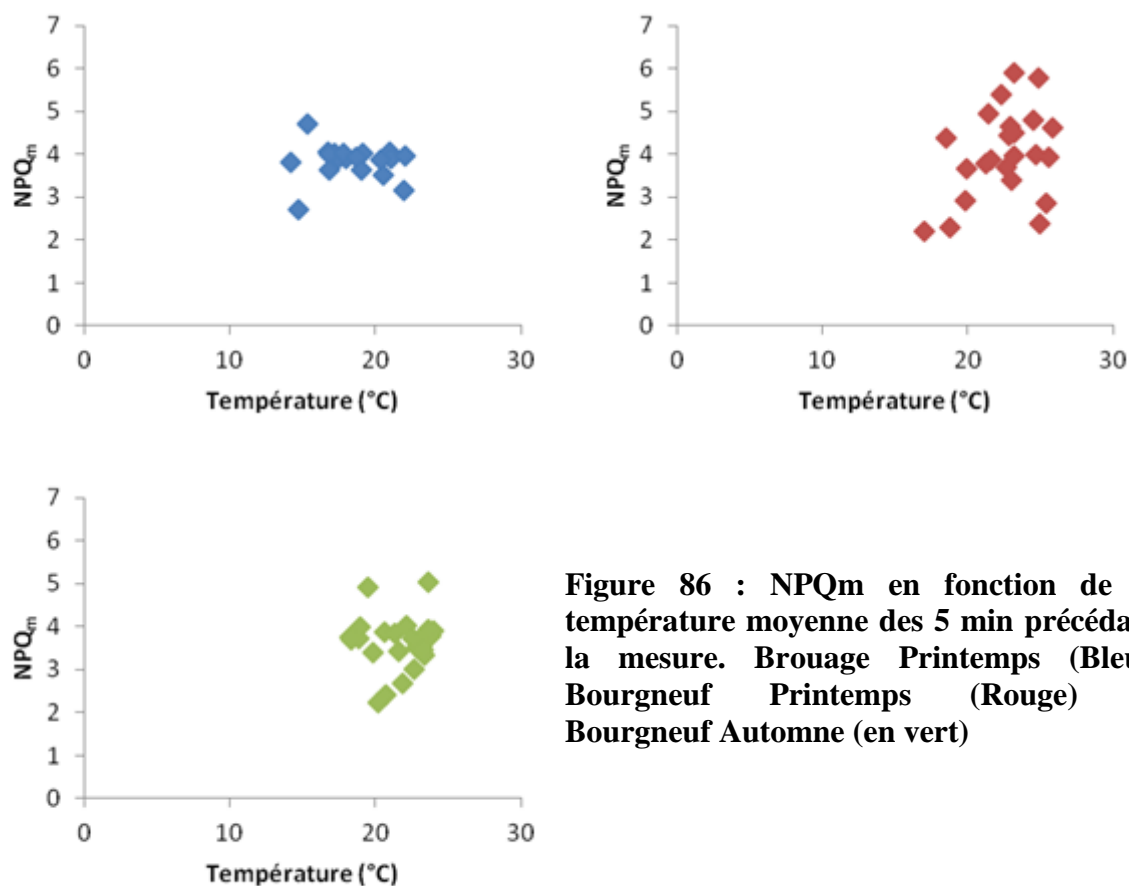


Figure 86 : NPQ_m en fonction de la température moyenne des 5 min précédant la mesure. Brouage Printemps (Bleu), Bourgneuf Printemps (Rouge) et Bourgneuf Automne (en vert)

Le NPQ et ses composantes

Quand le $E_{50_{NPQ}}/E_k$ est représenté en fonction de l'intensité lumineuse moyenne des 5 dernières min (Figure 87), un lien est visible entre ces deux paramètres. Ce lien est relativement clair pour Bourgneuf (surtout à l'automne) alors que pour Brouage ce lien est moins prononcé.

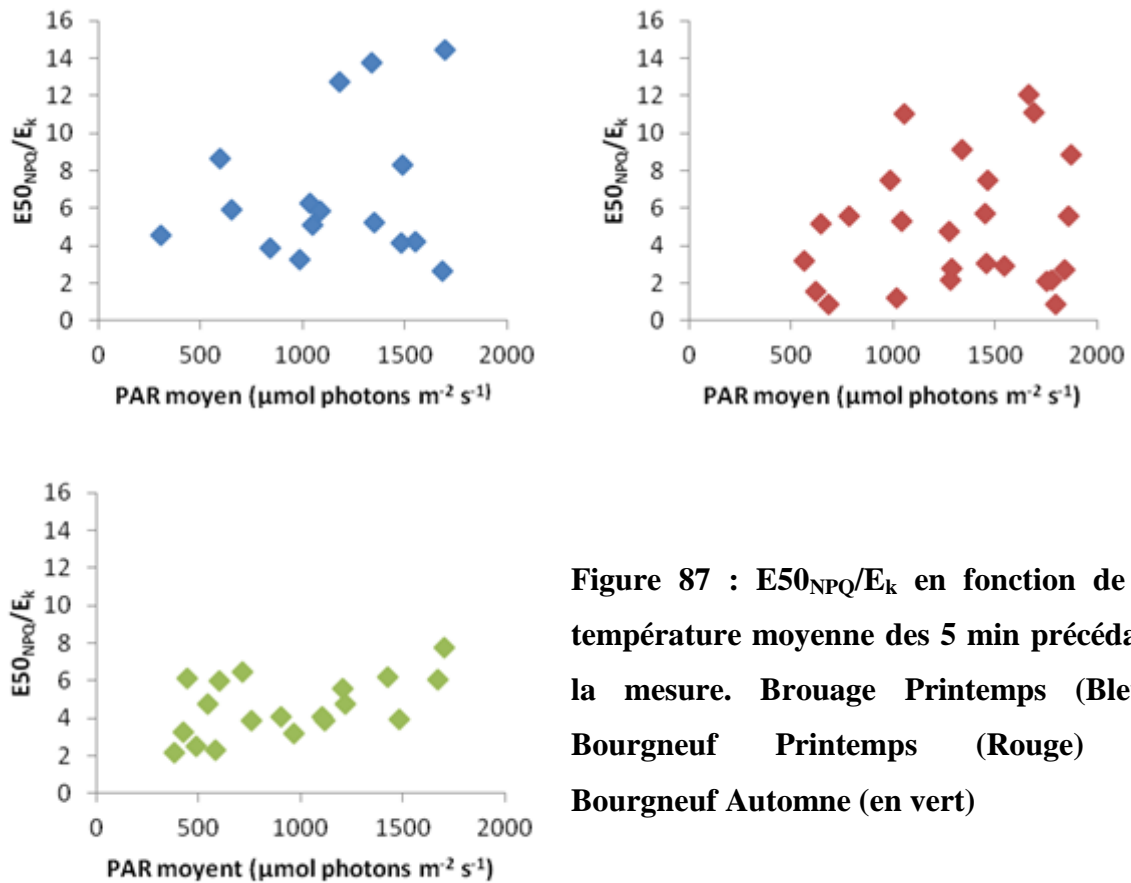


Figure 87 : $E50_{NPQ}/E_k$ en fonction de la température moyenne des 5 min précédant la mesure. Brouage Printemps (Bleu), Bourgneuf Printemps (Rouge) et Bourgneuf Automne (en vert)

Le mécanisme du NPQ fait intervenir la DES (comme expliqué en Partie 1B). Par le tracé du NPQ_m en fonction de la DES (Figure 88), il est possible de vérifier l'existence de ce lien (observé sur des cultures monospécifiques en Partie 2 et sur le biofilm épipélique en Partie 5B_2) dans les conditions *in situ*. À Brouage au printemps le NPQ_m reste relativement stable en fonction de la DES. En revanche, pour Bourgneuf, que ce soit au printemps ou à l'automne, on peut observer une augmentation du NPQ_m en fonction de la DES.

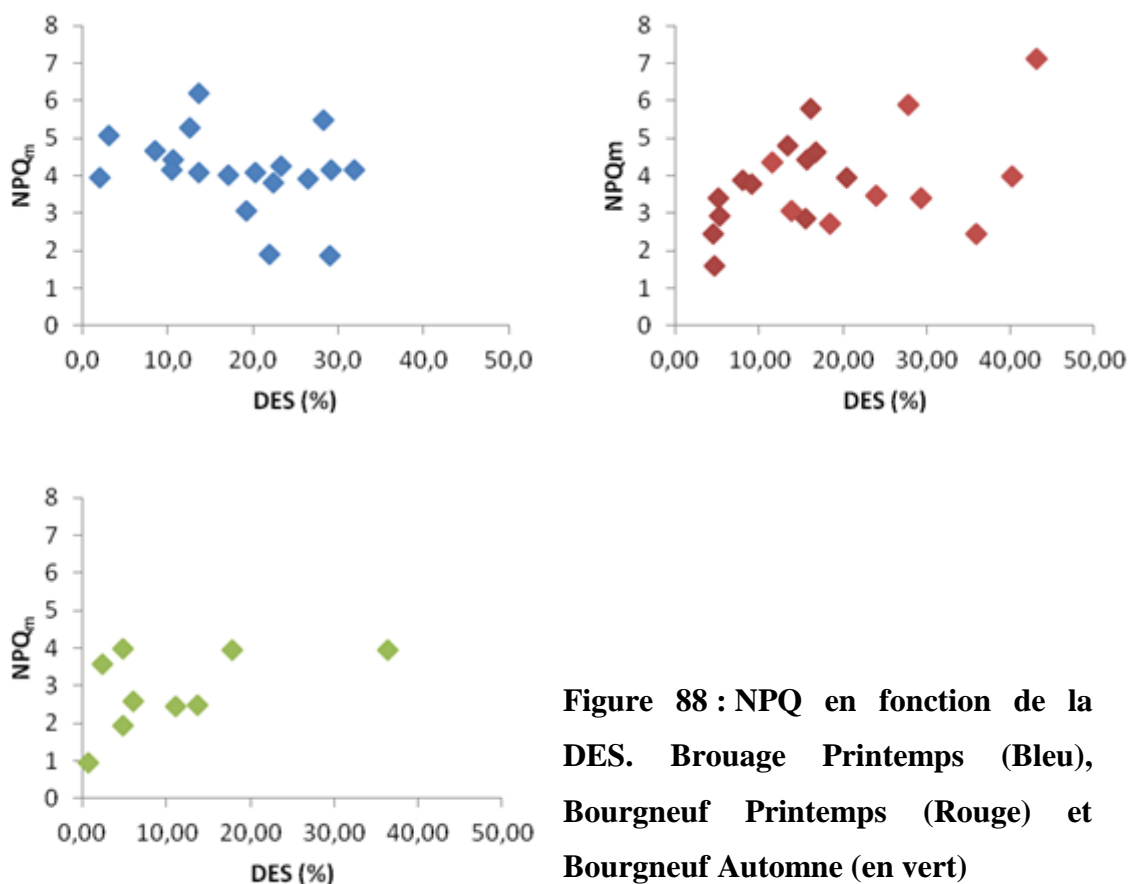


Figure 88 : NPQ en fonction de la DES. Brouage Printemps (Bleu), Bourgneuf Printemps (Rouge) et Bourgneuf Automne (en vert)

Pour les deux stations et les deux saisons, le NPQ_m est fortement lié à la DT. Dans tous les cas, le lien entre ces deux paramètres est décomposé en deux phases, une phase où le NPQ augmente de façon très importante, avec une augmentation faible de la DT, et une phase où le NPQ reste plus stable, mais avec une augmentation plus forte de la DT. Cette transition entre les deux phases se déroule aux alentours de 1 mol de DT 100 mol Chl *a*⁻¹ et des valeurs de NPQ_m entre 3 et 4.

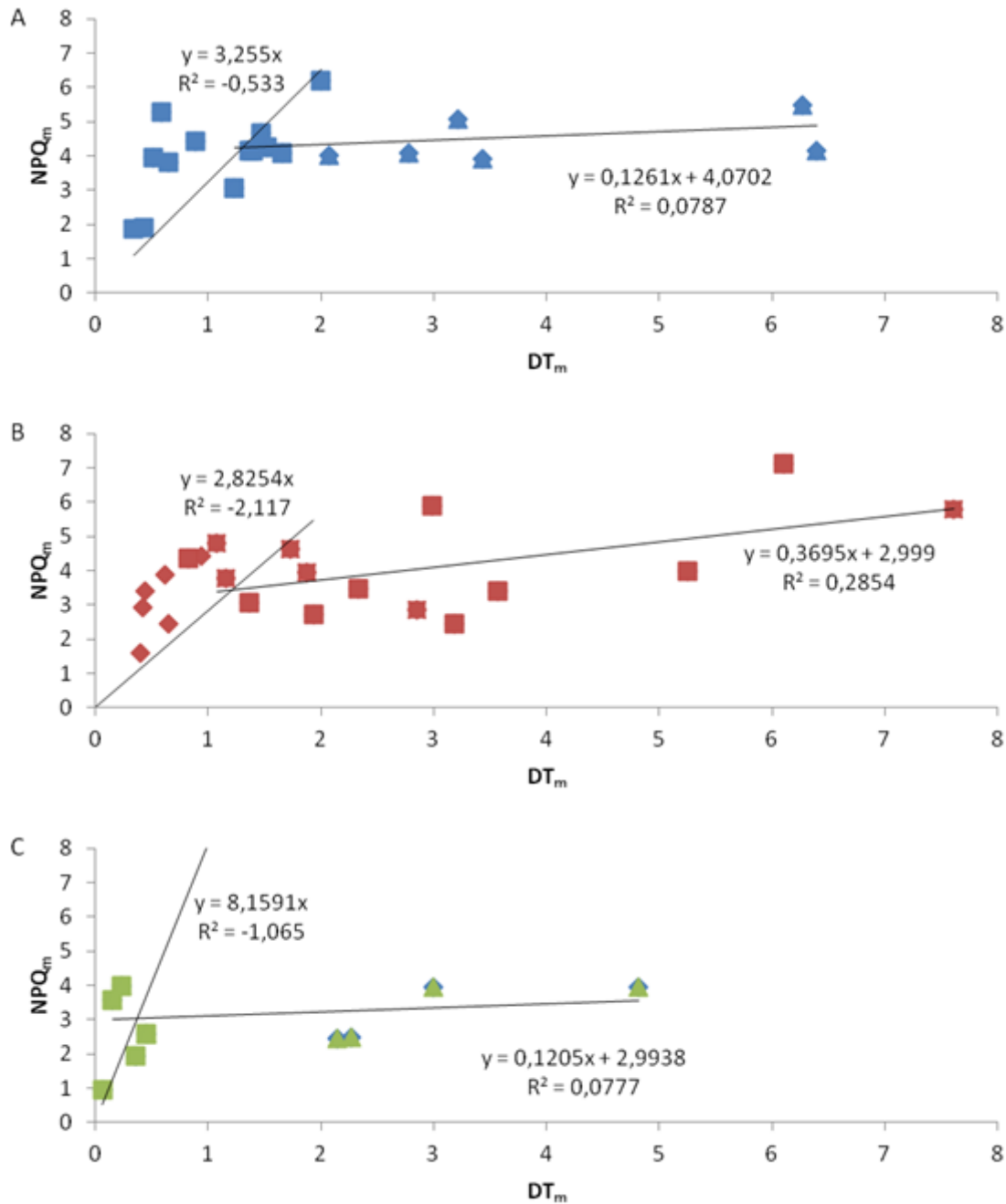


Figure 89 : NPQ_m en fonction de la DT_m . A) Printemps Brouage (Bleu), B) Printemps Bourgneuf (Rouge) et C) Automne Bourgneuf (Vert)

Production brute et biomasse chlorophyllienne

La production primaire a été mesurée ponctuellement, et les différentes valeurs obtenues sont moyennées afin d'obtenir une valeur de production primaire à l'échelle d'une marée. Cette

production est plus importante à Brouage ($10,35 \pm 0,88 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$) qu'à Bourgneuf ($2,74 \pm 0,88 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1}$).

En P1, la biomasse en chlorophyllienne augmente au cours de la marée basse (Figure 90) pour le printemps à Brouage de $72,15 \pm 4,58 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec en début de marée basse, $89,58 \pm 0,14 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec en milieu de marée basse et $93,71 \pm 10,53 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec en fin de marée basse ($p < 0,05$ entre le D et M et entre D et F). Pour Bourgneuf, la biomasse chlorophyllienne reste stable en P1 pendant la marée basse avec des valeurs de $63,01 \pm 2,65 \mu\text{g.g}^{-1}$ sédiment sec au printemps et $68,03 \pm 1,74 \mu\text{g.g}^{-1}$ sédiment sec à l'automne. En profondeur (P2), la concentration en chlorophylle *a* n'évolue pas entre les différents moments de marée basse, et ce quel que soit le site au printemps. Une légère augmentation est mesurée à Bourgneuf à l'automne au cours de la marée basse ($p < 0,05$ entre D et F). Pour le printemps à Brouage, la biomasse chlorophyllienne est d'environ $40,51 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec ($\pm 0,83$), pour le printemps à Bourgneuf elle est de $49,82 \pm 0,86 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec. À l'automne à Bourgneuf elle est de $58,60 \pm 5,53 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec en début de marée basse, $63,74 \pm 5,15 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec en milieu de marée et $70,67 \pm 3,82 \mu\text{g.g}^{-1}$ de sédiment sec en fin de marée basse. La biomasse chlorophyllienne présente en P1 est plus élevée au printemps à Brouage que celle présente en P2. Pour Bourgneuf au printemps, la biomasse chlorophyllienne elle aussi diminue entre P1 et P2, alors qu'à l'automne, cette biomasse reste similaire entre la surface et la profondeur.

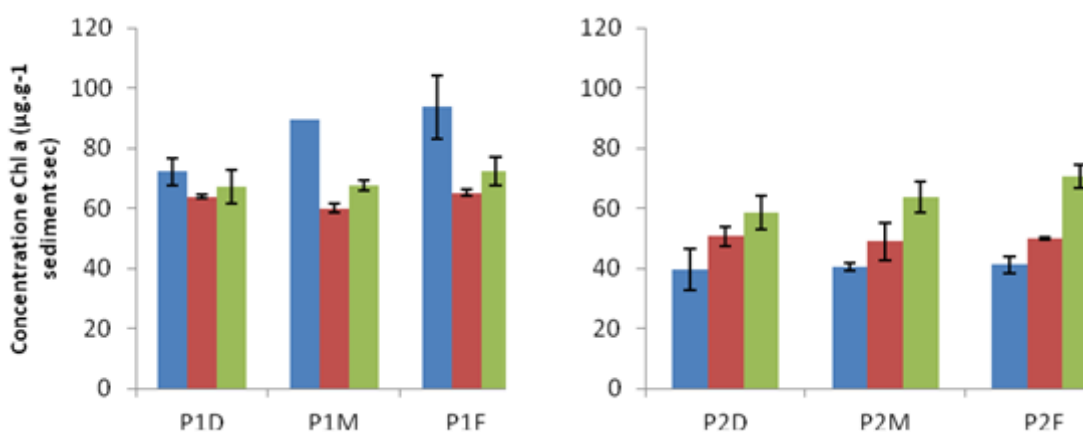


Figure 90 : Biomasse en Chlorophylle *a* mesurée en P1 (à gauche) et P2 (à droite) en début (D, milieu (M) et fin (F) de marée basse : en bleu Brouage au printemps, en rouge Bourgneuf au printemps et en vert automne Bourgneuf à l'automne.

Paramètres descriptifs de l'environnement du microphytobenthos

Granulométrie

La granulométrie obtenue pour les échantillons de Brouage a été située dans la catégorie vase par l'analyse Gradistat. Pour Bourgneuf, quelle que soit la saison, la granulométrie apparait entre la vase et le sable (Figure 91).

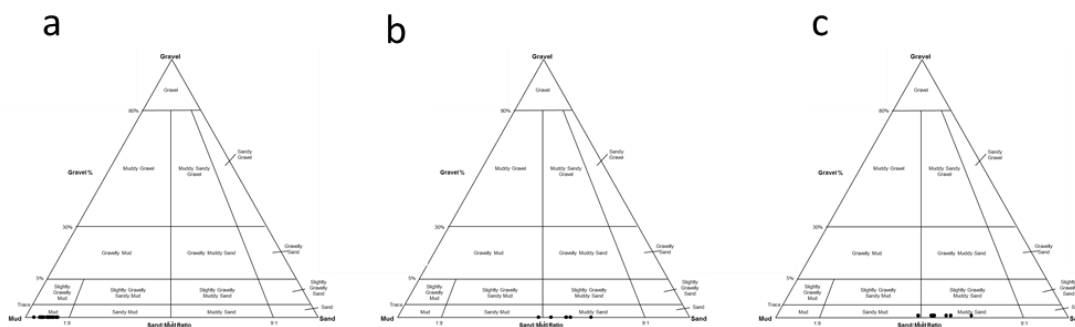


Figure 91 : Diagramme Gravier/Sable obtenu pour a) printemps Brouage, b) printemps Bourgneuf et c) automne Bourgneuf.

Teneur en eau

La teneur en eau était relativement constante en P1 du sédiment pour le printemps à Brouage ($62,97 \pm 0,50$ %) alors que pour Bourgneuf, au printemps elle a diminué entre le début et la fin de la marée basse ($p < 0,05$) (Figure 92). Elle était de $33,96 \pm 0,84$ % en début de marée basse, $34,09 \pm 1,41$ % en milieu de marée basse et $38,01 \pm 2,17$ % en fin de marée basse. Pour l'automne à Bourgneuf, elle était de $39,87 \pm 2,77$ % en début de marée basse, $42,22 \pm 7,61$ % en milieu de marée basse et $37,49 \pm 0,67$ % en fin de marée basse, mais ces changements n'était pas significatifs ($p > 0,05$). En P2, aucune variation de teneur en eau n'était significative quel que soit le site ou la saison. Les valeurs mesurées à Brouage au printemps était de $59,01 \pm 1,66$ %, à Bourgneuf au printemps de $37,25 \pm 0,67$ % et à l'automne de $41,50 \pm 0,69$ %.

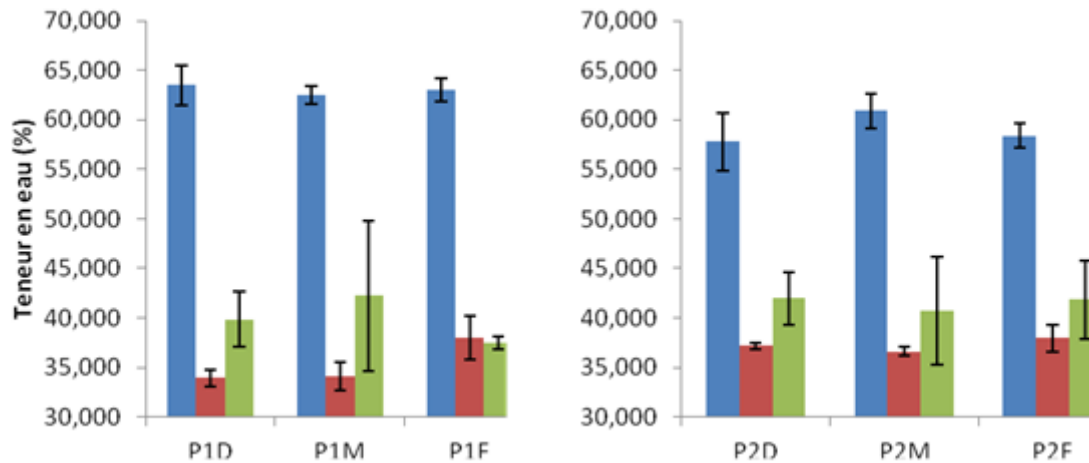


Figure 92 : Teneur en eau mesurée en P1 (à gauche) et P2 (à droite) en début (D) milieu (M) et fin (F) de marée basse : en bleu Brouage au printemps, en rouge Bourgneuf au printemps et en vert automne Bourgneuf à l'automne

pH

Le pH en P1 était équivalent pour les trois différentes campagnes de terrain (Figure 93). La valeur moyenne était de $7,84 \pm 0,06$. En P2 les valeurs de pH les plus faibles ont été rencontrées pour le printemps à Brouage $7,05 \pm 0,01$, le printemps de Bourgneuf présentait des valeurs moyennes $7,51 \pm 0,03$ et les valeurs de pH maximales ont été rencontrées pour l'automne à Bourgneuf $7,92 \pm 0,03$. Les différences entre ces valeurs en P2 sont significatives ($p < 0,001$ quelle que soit la comparaison).

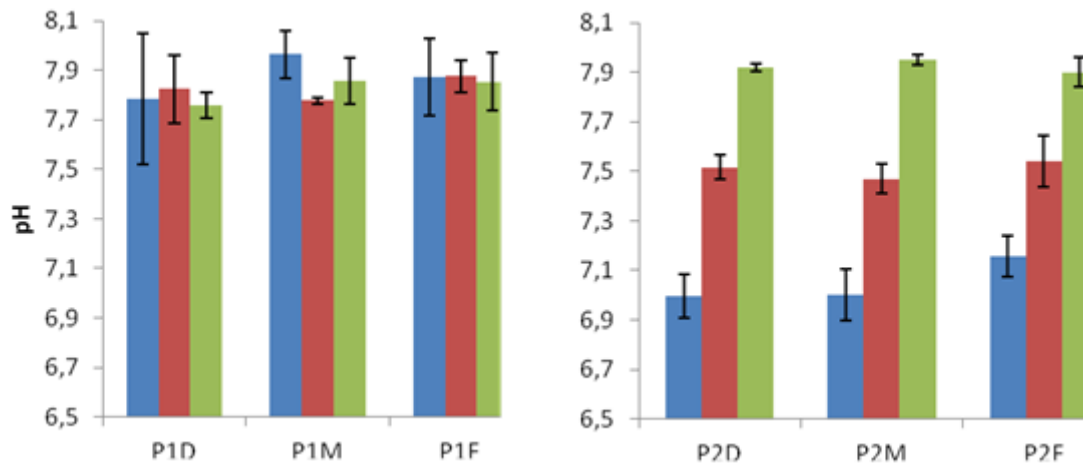


Figure 93 : pH mesuré en P1 (à gauche) et P2 (à droite) en début (D) milieu (M) et fin (F) de marée basse : en bleu Brouage au printemps, en rouge Bourgneuf au printemps et en vert automne Bourgneuf à l'automne

Salinité

La salinité en surface a varié pour toutes les stations en fonction du moment de la marée (Figure 94). Pour Brouage au printemps, elle était à $35,3 \pm 0,87 \text{ ‰}$ en début de marée basse, puis diminue en milieu de marée basse à $32,2 \pm 2,9 \text{ ‰}$ ($p > 0,05$, non significatif) si pour finir en fin de marée basse par augmenter à $41,17 \pm 1 \text{ ‰}$ ($p < 0,005$). Pour le printemps à Bourgneuf, la salinité augmente au cours de la marée basse et passe de $32,57 \pm 0,23 \text{ ‰}$ en début de marée basse à $35,67 \pm 0,49 \text{ ‰}$ en milieu de marée basse ($p < 0,001$) puis se stabilise à $37,21 \pm 2,12 \text{ ‰}$ ($p > 0,005$). À l'automne, à Bourgneuf, les valeurs mesurées sont restées stables ($34,03 \pm 1,43 \text{ ‰}$; $34,87 \pm 1,85 \text{ ‰}$; $34,8 \pm 1,56 \text{ ‰}$). En revanche, en profondeur, les valeurs de salinité sont restées similaires pour les différentes stations à tous les moments de marée ($33,88 \pm 0,70 \text{ ‰}$).

Les augmentations de salinité sont imputables à l'évaporation par le vent, alors que la diminution de salinité en P1 au milieu de la marée à Brouage au printemps, même si non significative, fait suite à une averse.

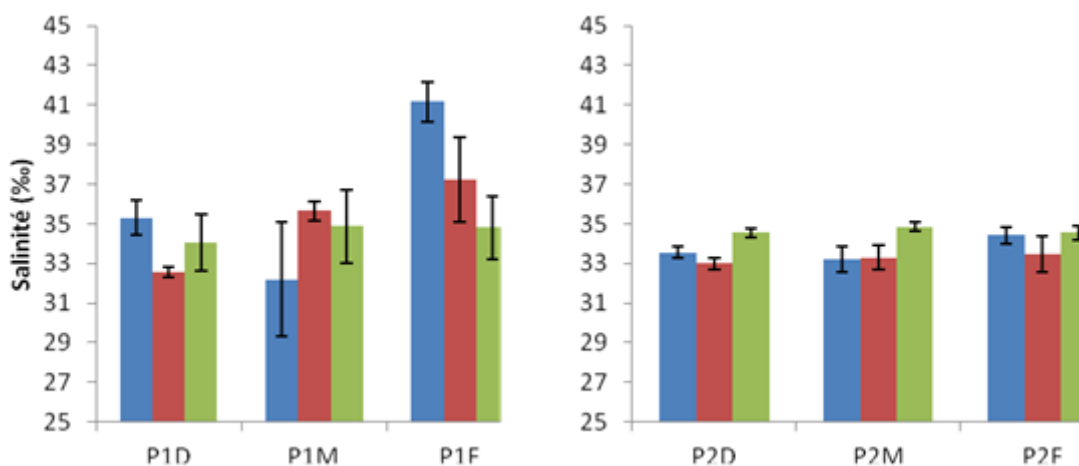


Figure 94 : Salinité mesurée en P1 (à gauche) et P2 (à droite) en début (D), milieu (M) et fin (F) de marée basse : en bleu Brouage au printemps, en rouge Bourgneuf au printemps et en vert automne Bourgneuf à l'automne

Concentration en EPS

La concentration en protéines des EPS a été mesurée pour les EPS colloïdaux et EPS liés (Figure 95). Les concentrations en protéines dans la fraction colloïdale des EPS étaient variables. Pour le printemps à Brouage, la concentration en protéines en P1 était en moyenne de $549,1 \pm 241,8 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $473,4 \pm 127,6 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $516,5 \pm 73,4 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ poids sec de sédiment en fin de marée basse. Ces valeurs n'ont pas variées significativement ($p > 0,05$). Pour le printemps à Bourgneuf, les échantillons ont été analysés, mais toutes les valeurs étaient indétectables (en dessous du seuil de l'appareil ou échantillons avec précipités?). A l'automne à Bourgneuf, la concentration en protéines en P1 était en moyenne de $30,8 \pm 27,1 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $41,8 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec (\pm nd) en milieu de marée basse et $27,7 \pm 7,2 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse. La faible quantité d'échantillons analysable n'a pas permis l'utilisation de statistiques. En P2, le même schéma a été observé, avec une plus grande concentration de protéines dans les EPS colloïdaux à Brouage qu'à Bourgneuf, avec des valeurs avoisinant les $592,5 \pm 42,2 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec pour Brouage (aucunes variations significatives), $85,6 \pm 14,2 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec au printemps et $53,9 \pm 2,1 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec à l'automne pour Bourgneuf.

La concentration en protéines dans la fraction liées a augmenté en P1 à Brouage entre le début ($77,8 \pm 12,7 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec) et le milieu de la marée basse ($142,9 \pm 59,7 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec), mais cette augmentation n'était pas significative ($p > 0,05$). Elle est resté

équivalente en fin de marée basse ($155,9 \pm 51,8 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec). Ici encore les concentrations de protéines à Bourgneuf étaient plus faibles au printemps qu'à Brouage au printemps ($25,6 \pm 6,6 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $17,2 \pm 9,4 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $2,4 \pm 1,9 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse) avec une diminution significative entre le début et la fin de la marée basse ($p < 0,001$). À l'automne à Bourgneuf, la valeur moyenne était de $31,3 \pm 4,0 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec (pas d'évolution significative). En P2, les concentrations à Brouage étaient, comme en surface, plus importantes avec $122,5 \pm 13,4 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $137,8 \pm 32,0 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $197,5 \pm 65,0 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment en fin de marée basse (évolution non significative) qu'à Bourgneuf au printemps. Les valeurs mesurées à Bourgneuf au printemps étaient de $9,0 \pm 0,9 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée, $19,3 \pm 7,7 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée et $4,3 \pm 1,7 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse, avec une augmentation significative entre le début et la fin de la marée basse ($p < 0,01$) et une diminution entre le milieu et la fin de marée basse ($p < 0,05$).

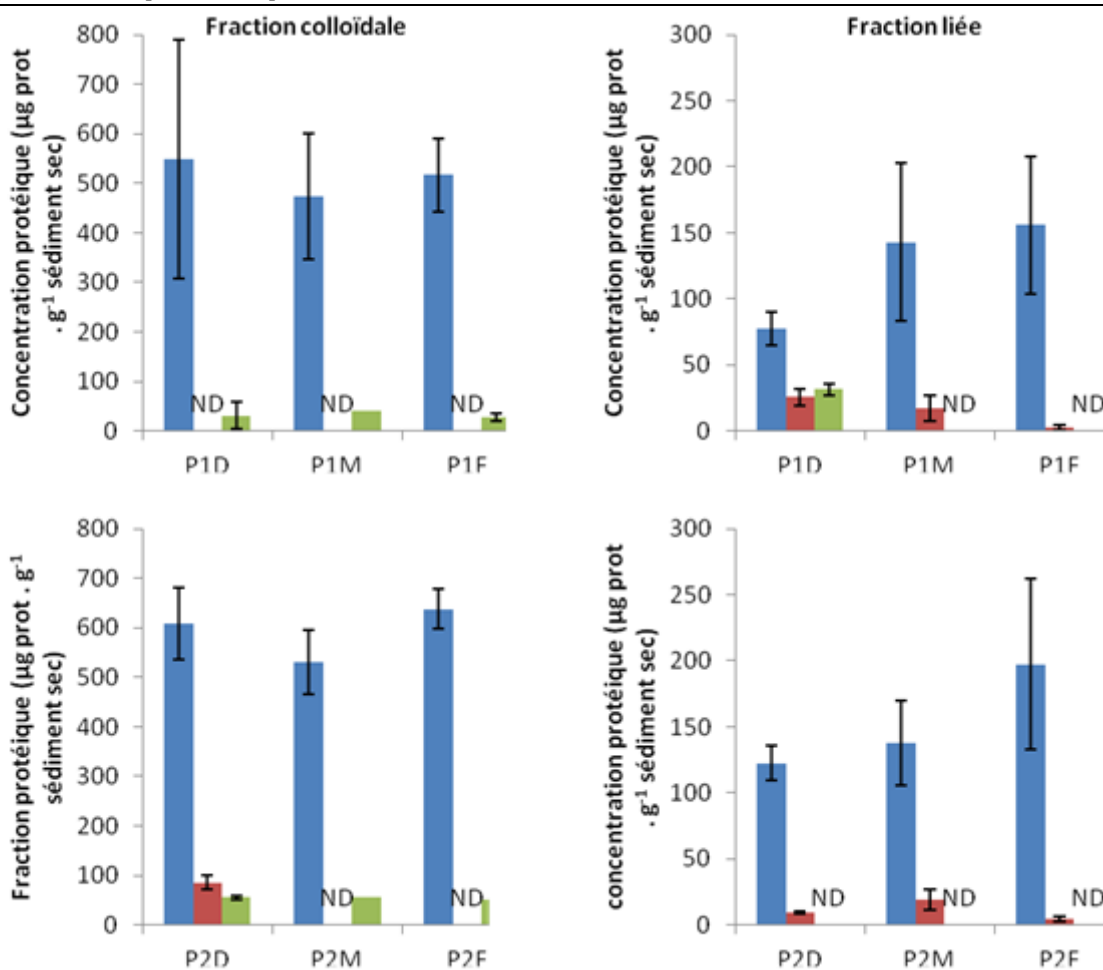


Figure 95 : Concentration en protéines mesurée en P1 (surface) et P2 (profondeur) des fractions colloïdales (gauche) et liées (droite) entre début (D), milieu (M) et fin (F) de marée basse : en Bleu Printemps Brouage, en Rouge Printemps Bourgneuf et en Vert Automne Bourgneuf. Pour la concentration protéique de la fraction colloïdale les valeurs sont comprises entre 0 et 800 µg prot g⁻¹ sédiment sec alors que pour la fraction liées elles sont comprises entre 0 et 300 µg prot g⁻¹ sédiment sec.

La concentration des carbohydrates des EPS a été déterminée (Figure 96). La concentration en sucres colloïdaux en P1 ainsi qu'en P2 au printemps à Brouage, était de $5,4 \pm 1,5 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, restant stable en milieu de marée basse ($5,1 \pm 0,6 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec) et augmentant en fin de marée basse ($8,13 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec \pm nd). Cependant, cette augmentation n'a pu être testée en raison d'un nombre d'échantillons trop faible. Pour Bourgneuf, au printemps, les concentrations en P1 en sucres étaient plus faibles qu'à Brouage au printemps, et stables au cours de la marée basse ($0,5 \pm 0,1 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec au printemps et $1,2 \pm 0,5 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en automne). Pour Bourgneuf

à l'automne, les concentrations ont augmenté entre le début ($0,78 \pm 0,08 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec) et le milieu de la marée basse ($1,12 \pm 0,1 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec) ($p < 0,05$) et sont restées stables en fin de marée basse ($1,71 \pm 0,72 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec). En P2, ces concentrations étaient bien plus élevées à Brouage au printemps, avec une augmentation entre le début et la fin de la marée basse ($p < 0,01$) ($42,5 \pm 22,8 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $65,5 \pm 47,6 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $164,0 \pm 29,26 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse). Pour Bourgneuf, la concentration en P2 est restée similaire à celles mesurées en P1 au printemps ($1,2 \pm 0,2 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec) et en automne une légère augmentation (non significative) est apparue au cours de la marée basse ($1,2 \pm 0,9 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $1,7 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ $\mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec $\pm 0,2$ en milieu de marée basse et $3,3 \pm 0,9 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse).

La concentration en carbohydrates des EPS liés en P1 était plus importante à Brouage qu'à Bourgneuf. De plus, à Brouage, elle a diminué le long de la marée basse ($328,3 \pm 136,1 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $168,6 \pm 70,9 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $127,7 \pm 2,0 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse), mais cette diminution était trop variable pour être significative. A Bourgneuf, les concentrations étaient plus faibles au printemps ($1,4 \pm 0,3 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec) qu'en automne ($4,6 \pm 0,1 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $9,6 \pm 0,4 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $9,6 \pm 0,1 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse) où elles augmentaient significativement entre le début et le milieu de la marée basse ($p < 0,001$). En P2, les concentrations mesurées étaient plus faibles, avec des valeurs diminuant le long de la marée basse à Brouage ($45,9 \pm 2,0 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $35,0 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $22,5 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec $\pm 7,4 \pm 5,3$ en fin de marée basse) ($p < 0,05$). Les concentrations mesurées à Bourgneuf étaient plus faibles, augmentant le long de la marée basse au printemps ($0,6 \pm 0,4 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en début de marée basse, $1,8 \pm 0,3 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en milieu de marée basse et $2,9 \pm 1,0 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec en fin de marée basse) ($p < 0,05$). A Bourgneuf, en automne, elles sont restées stables, autour de $6 \pm 0,5 \mu\text{g prot.g}^{-1}$ sédiment sec.

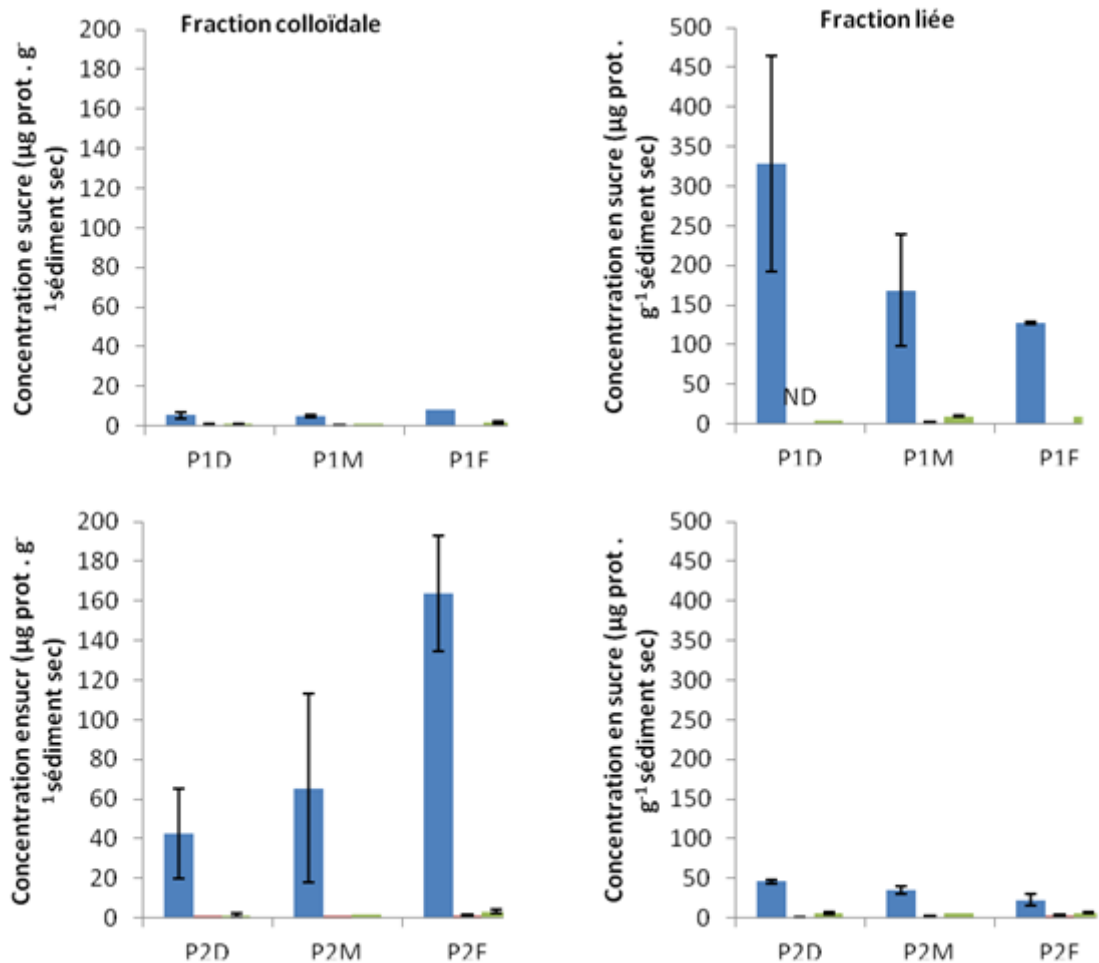


Figure 96 : Concentration en sucre mesurée en P1 (surface) et P2 (profondeur) des fractions colloïdale (gauche) et liées (droite) entre début (D), milieu (M) et fin (F) de marée basse : en Bleu Printemps Brouage, en Rouge Printemps Bourgneuf et en Vert Automne Bourgneuf. Pour la concentration protéique de la fraction colloïdale les valeurs sont comprises entre 0 et 200 $\mu\text{g prot g}^{-1}$ sédiment sec alors que pour la fraction liée elles sont comprises entre 0 et 500 $\mu\text{g prot g}^{-1}$ sédiment sec.

La méiofaune ainsi que la macrofaune ont été analysées pour ces deux sites. Un total de 19 espèces de macrofaune est présente sur le site de Brouage au printemps, tout comme pour Bourgneuf au printemps alors qu'à l'automne la diversité diminue pour ne présenter plus que 7 espèces. Quel que soit le site ou la saison, *Peringia ulvae* domine, représentant $62,9 \pm 25,5$ % des individus au Printemps Brouage, $47,7 \pm 22,4$ % des individus à Bourgneuf au printemps et $96,5 \pm 2,8$ % des individus à l'automne. Pour la méiofaune, ce sont les nématodes qui dominent à Bourgneuf (*com pers.* S. Drouet), tout comme à Brouage, représentant toujours plus de 95% de la population.

IV. Discussion

L'environnement du microphytobenthos

L'objectif de ces campagnes de terrain était de comparer le comportement du microphytobenthos de deux vasières distinctes, une à dominance de diatomées épipéliques (Brouage), l'autre à dominance de diatomées épipsammiques (Bourgneuf), et ce, pour deux saisons distinctes (printemps et automne)

Comme attendu, l'analyse de la granulométrie a mis en évidence un sédiment vaseux pour la vasière de Brouage qui contraste avec le sédiment sablo-vaseux de la vasière de Bourgneuf. Cette distinction de granulométrie est connue pour entraîner une distinction de communautés (Méléder *et al.*, 2007), à savoir une dominance de diatomées épipéliques à Brouage, et une dominance de diatomées épipsammiques à Bourgneuf.

Les saisons ont été choisies dans le but de mesurer le comportement du microphytobenthos dans des conditions de lumière fluctuantes et de températures modérées. En période de printemps et d'automne, des variations de lumière rapides sont attendues. Si ce critère a bien été observé, les conditions de température ont montrées des différences moins marquées que celles attendues (printemps froid et automne tempéré). Les conditions météorologiques, n'ont pas permis la mise en place de la campagne terrain de Brouage à l'automne (vents violents ne permettant pas des conditions de sécurité suffisantes pour l'accès au site en aéroglisseur). De part ces conditions météorologiques inattendues, bien que nous ayons pu observer des variations d'intensités lumineuses au cours des échantillonnages, les variations de lumière entre les saisons n'étaient pas aussi marquées que les différences espérées. De même pour la température, légèrement plus fraîche à Brouage au printemps avec deux diminutions flagrantes dues à des averses.

Que ce soit pour les 2 sites ou les 2 saisons, les variations de lumière et de température moyennes ne nous permettent pas de placer ce travail dans un vrai cadre saisonnier à proprement parler, mais de le placer dans un cadre 'temporel' avec des échantillonnages effectués à 6 mois d'intervalle, dans des conditions environnementales similaires.

Les valeurs de pH de l'environnement ne sont pas des valeurs néfastes pour le microphytobenthos (Cook et Røy, 2006). Bien que les mesures de la photosynthèse soient différentes entre les sites et les saisons, les valeurs de pH en P1 peuvent être expliquées par le microphytobenthos pratiquant la photosynthèse. En effet, l'activité photosynthétique fait augmenter le pH par l'assimilation du CO₂ dissout dans l'eau qui produit avec l'eau un acide

faible $H^+ HCO_3^-$ (Partie 1B III) (Revsbech et Ward, 1984). Les valeurs en P2 sont plus faibles à Brouage au printemps qu'à Bourgneuf au printemps comme à l'automne. Ceci est dû à la formation du biofilm photosynthétique en surface du sédiment pour Brouage (pour rappel, site à dominance de diatomées épipéliques) qui concentre donc l'activité photosynthétique en surface. En revanche, l'activité photosynthétique dans le sédiment sablo-vaseux (Bourgneuf) est connue pour prendre place plus en profondeur dans le sédiment par une meilleure pénétration de la lumière (Cartaxana *et al.*, 2011). Le pH plus important en P2 à Bourgneuf à l'automne pourrait être expliqué par une plus grande production primaire, mais ces mesures n'ont pu être effectuées.

Les variations de salinité observées ne correspondent pas aux variations de teneur en eau. Les variations de salinité sont expliquées par l'évaporation par le vent ou par les précipitations qui devraient, par la même occasion, entraîner des variations de teneur en eau. Il est possible que les mesures, ou le protocole de prélèvement, pour la teneur en eau ne soient pas adaptés pour ce travail.

Biomasse chlorophyllienne et production

La biomasse chlorophyllienne mesurée dans le sédiment est plus importante à Brouage au printemps qu'à Bourgneuf au printemps et à l'automne. Cependant les différences observées sont bien plus faibles que celles observées dans la littérature. Cartaxana *et al.* (2011) ou encore Trites *et al.* (2005) ont montré des différences de biomasse chlorophyllienne, entre deux sites proches dominés par des communautés similaires à celles de nos sites d'étude (un site vaseux à large dominance de diatomées épipéliques, et l'autre sablo-vaseux à dominance de diatomées épipsammiques, dépassant le facteur 100. Cependant, même si les techniques de mesure de la biomasse utilisées sont différentes, Jesus *et al.* (2009) ont obtenu des résultats équivalents aux nôtres.

La biomasse de chlorophylle *a* en P1 n'évolue pas pour le site de Bourgneuf (au printemps comme en automne) car ce site est à dominance de diatomées épipsammiques (Méléder *et al.*, 2005, Méléder *et al.*, 2007). Les diatomées épipsammiques sont des diatomées fixées aux grains de sédiment. Même si certaines sont capables de légers mouvements, elles ne réalisent pas de migrations verticales, mais des micro-mouvements autour des grains de sédiment (Partie 1B III-2-b). En revanche, pour Brouage, une augmentation de la biomasse chlorophyllienne en surface est observée entre le début et le milieu de la marée basse. Dans la Partie 3, il a été confirmé que le microphytobenthos épipélique est capable de migration en

surface du sédiment à marée basse, ce qui explique cette augmentation de biomasse chlorophyllienne . En fin de marée basse, la biomasse reste constante en surface, mais l'augmentation de la variabilité montre que la biomasse chlorophyllienne est moins homogène et donc, la migration en profondeur est déjà initiée. En profondeur, les biomasses chlorophylliennes sont plus faibles qu'en surface pour Brouage, alors qu'elles le sont bien moins pour le site de Bourgneuf. La lumière est connue pour pénétrer plus profondément dans le sédiment sablo-vaseux (de Bourgneuf) que dans les sédiments vaseux (Cartaxana *et al.*, 2011). La pénétration plus en profondeur de la lumière dans les sédiments sablo-vaseux explique pourquoi une biomasse plus importante est mesurée à Bourgneuf qu'à Brouage en P2.

La production primaire brute est plus de 2x supérieure à Brouage qu'à Bourgneuf (pour la période de printemps). Cette plus forte production à Brouage peut être expliquée par la biomasse plus importante rencontrée, mais aussi par les capacités photosynthétiques différentes rencontrées sur les deux sites (voir ci-dessous).

Concentration en EPS

Les EPS ont un rôle important dans la biologie du microphytobenthos. Ici les EPS colloïdaux (connus pour être relargués dans l'environnement) et les EPS liés (servant à la protection/adhésion) ont été étudiés. Dans tous les cas, les concentrations mesurées ont été plus importantes à Brouage qu'à Bourgneuf. Le protocole que nous avons ici utilisé a été mis en place sur des cultures d'algues et utilisé jusqu'à présent seulement sur du sédiment vaseux (Takahashi *et al.*, 2010, Pierre *et al.*, 2012). A notre connaissance, il n'existe pas d'études des EPS en milieu sablo-vaseux ce qui rend la comparaison de nos résultats difficiles. Nous ne pouvons pas statuer sur le fait que 1) les faibles concentrations en EPS mesurées à Bourgneuf sont dues à des faibles concentrations dans le sédiment ; 2) ou si les EPS dans le sédiment sablo-vaseux ne sont pas correctement extraits. Bien qu'une de ces deux explications soit possible, la revue de de Brouwer *et al.*(2006), dont une partie traite de l'extraction d'EPS *in situ*, semble privilégier la première hypothèse. Le sédiment sablo-vaseux contiendrait moins d'EPS car ils seraient facilement dissouts entre deux marées basses (sédiment peu cohésif et donc lessivage des EPS par l'eau interstitielle), alors que dans les sédiments vaseux les EPS sont plus fortement attachés au sédiment cohésif.

En P1, à Brouage au printemps, les concentrations protéiques de la fraction colloïdale est constante mais plus concentrée que les sucres, ce qui diffère de précédentes observations

(Staats *et al.*, 1999, Pierre *et al.*, 2010). En P2, la concentration protéique de la fraction colloïdale est aussi importante que la concentration mesurée en P1, avec une augmentation au cours de l'émergence pour les sucres. Les concentrations totales (protéines et sucres) sont semblables aux concentrations rencontrées dans la littérature (50-5000 $\mu\text{g g}^{-1}$ sédiment sec) (Underwood et Smith, 1998, Goto *et al.*, 1999, Pierre *et al.*, 2010, Pierre *et al.*, 2012)

Comme présenté dans la Partie 1, les EPS colloïdaux sont excrétés dans le milieu. Cette fraction colloïdale crée une gangue qui procure aux diatomées un environnement protecteur, notamment vis-à-vis des variations environnementales (en particulier la lumière, la température et la salinité, cf Partie 5) (de Brouwer *et al.*, 2006).

A Brouage, l'augmentation d'EPS liés protéiques en P1 entre le début et le milieu de la marée est facilement explicable par la formation du biofilm photosynthétique en surface (même si ces augmentations ne sont pas significatives). En effet, la fraction liée est impliquée dans la migration des diatomées (Underwood et Smith, 1998, De Brouwer et Stal, 2001). Les EPS liés protéiques sécrétés ainsi dans le milieu restent présents, même après la migration en profondeur du microphytobenthos ce qui correspond aux attentes (De Brouwer et Stal, 2002). Ils ne semblent disparaître que par lessivage au retour de l'eau (de Brouwer *et al.*, 2006). En profondeur, cette augmentation en EPS liés protéiques est présente, semblant indiquer que la migration du microphytobenthos est présente même entre 0,5 et 1 cm de profondeur. La concentration en sucre de la fraction liée des EPS n'évolue pas en profondeur et présente une diminution en surface le long de la marée. Il est probable que cette diminution soit due à une consommation des EPS, soit par les diatomées elles-mêmes, soit par les bactéries.

La photosynthèse in situ en conditions de lumière fluctuante

Les différents paramètres étudiés présentent des conditions favorables au développement du biofilm photosynthétique. Ainsi des conditions similaires à celles utilisées en Partie 2 sont observées pour la température (proche de 20°C) (Blanchard *et al.*, 1997, Blanchard *et al.*, 1998, Blanchard *et al.*, 2006), le pH proche et la salinité du milieu de culture. Les expérimentations présentent des conditions de température optimales (comprises entre 20 et 25°C) et des conditions de lumières modérées à fortes (autour de 1000 $\mu\text{mol photons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) ce qui représente la moitié de ce qui est considéré comme la lumière maximale (Blanchard *et al.*, 1997, Blanchard *et al.*, 1998, Blanchard *et al.*, 2006).

Les conditions saisonnières ne sont pas fortement marquées, obligeant à raisonner en fonction de différences temporelles et non en fonction de différences saisonnières.

$rETR_m$, qui représente la photochimie maximale, et E_k , qui représente la photoacclimatation, varient dans tous les cas avec les fluctuations de lumière. Les valeurs moyennes au niveau d'une marée basse montrent que les $rETR_m$ sont plus élevées à Brouage au printemps qu'à Bourgneuf pour les deux saisons étudiées, ce qui est retrouvé au niveau des données de production, plus élevées à Brouage ($10,35 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1} \pm 0,88$) qu'à Bourgneuf ($2,74 \text{ mg C m}^{-2} \text{ h}^{-1} \pm 0,88$). Cependant la différence entre $rETR_m$ moyen entre les deux sites est plus faible que pour la production. Ceci peut être expliqué par la biomasse chlorophyllienne plus importante à Brouage. Le microphytobenthos présent à Bourgneuf n'est pas capable de migrer et est donc soumis à une plus forte pression de broutage ce qui peut expliquer cette amplification des différences au niveau de la production. De plus en Partie 2, il a été montré que $rETR_m$ des cultures épipéliques est plus élevé que celui des cultures épipsammiques, bien qu'ici, les différences de biomasse et la présence de prédateurs atténuent ces observations.

E_k plus faible au printemps à Bourgneuf qu'à Brouage peut être expliqué par l'historique lumineux. Bien que les épipéliques soient capables de migrer, la 'light dose' moyenne est plus importante sur les jours précédents à Brouage qu'à Bourgneuf. Ceci implique donc que le microphytobenthos est acclimaté à une plus forte lumière. De plus α est identique entre les sites, ce qui permet de conclure que les diatomées sont acclimatées à la même lumière (PAR moyen et light dose équivalentes), mais l'historique lumineux est différent. Au printemps, le microphytobenthos sort d'une adaptation à la faible lumière (suite à l'hiver) ce qui peut expliquer les fortes valeurs de α . En revanche, à l'automne, à Bourgneuf, $rETR_m$ et α sont plus faibles et par conséquent E_k est plus fort. L'efficacité d'absorption des faibles intensités est plus faible et la photochimie est donc plus faible car les diatomées sont 1) soit adaptées à de plus fortes lumières (sortie d'été), 2) soit un facteur que nous n'avons pas pu identifier limite ETR.

$rETR_m$ et la photoacclimatation E_k évoluent avec les variations lumineuses. Les courbes de $rETR_m$ et E_k en fonction du PAR moyen sur les 5 min précédant la mesure montrent un lien clair et direct avec l'historique lumineux récent. Aucun lien n'est présent sur les courbes $rETR_m$ en fonction de la température, confirmant l'idée que ces mesures ont été faites dans des conditions de température optimales (Blanchard *et al.*, 1997, Blanchard et Guarini, 1998a, Blanchard et Guarini, 1998b).

L'étude du NPQ dans ces conditions de lumière modérées et fluctuantes est particulièrement intéressante car ce mécanisme est connu pour réguler la photosynthèse en conditions de lumière fluctuantes (Lavaud *et al.*, 2007).

Les valeurs de NPQ_m sont plus élevées que ce qui a été observé en Partie 2 pour les diatomées épipéliques acclimatées à $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et même à $75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ et équivalent pour les diatomées épipsammiques acclimatées à $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Ce NPQ plus fort *in situ* qu'en laboratoire est sûrement dû à des différences de conditions naturelles par rapport aux conditions contrôlées, même si, pour les épipéliques, les conditions environnementales permettent une migration dont elles étaient affranchies en laboratoire (Jesus *et al.*, 2005, Migné *et al.*, 2007, Deblois *et al.*, 2013).

La DD+DT mesurée pour Bourgneuf présente des valeurs identiques aux expérimentations en laboratoire menées à $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, alors que les valeurs obtenues *in situ* sont plus élevées pour Brouage que pour les cultures d'épipéliques à $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mais correspondent aux expérimentations menées à $75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. La DES mesurée est plus élevée à Bourgneuf qu'à Brouage, ce qui est concordant avec les mesures effectuées en laboratoire sur les épipsammiques et les épipéliques cultivées à $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (cf Partie 2). DT_m est, elle aussi, plus élevée à Bourgneuf qu'à Brouage, et correspond aux valeurs mesurées sur les cultures d'épipsammiques à $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Les concentrations mesurées à Brouage sont plus faibles que celle effectuées à Bourgneuf, mais correspondent aux mesures laboratoire sur les cultures acclimatées à $75 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, expliquant ainsi le plus fort NPQ mesuré *in situ* que celui dans les cultures d'épipéliques acclimatées à $20 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

$E50_{NPQ}$ est plus élevé à Brouage qu'à Bourgneuf, ce qui est explicable par la (meilleure) capacité des épipéliques à se placer à un optimum de lumière. Une fois encore la capacité de migration de ce groupe explique nos observations. $E50_{NPQ}/E_k$ est similaire pour les deux sites étudiés, et plus faible que celui observé en laboratoire, notamment pour les épipéliques. Ceci est explicable par les fortes fluctuations lumineuses observées ainsi que par les faibles intensités utilisées en laboratoire. Dans le cas de conditions terrain, les diatomées sont obligées de posséder un lien fort entre la photochimie (E_k) et le développement du NPQ ($E50_{NPQ}$) afin de réguler rapidement les mécanismes de photosynthèse pour faire face aux fluctuations lumineuses, alors qu'en laboratoire, les conditions de lumière continue faibles à modérées, font qu'elles n'ont pas besoin de créer un lien aussi fort pour réguler leur photosynthèse.

Même si les conditions de lumière sont différentes entre le laboratoire et le terrain, les différences de photoprotection physiologique mesurées entre la communauté épipélique et la communauté épipsammique sont retrouvées. Ainsi, malgré des variations plus importantes *in*

situ, et une impossibilité de migration en laboratoire (cf Partie 2) les conclusions restent les mêmes, à savoir une meilleure capacité de photoprotection physiologique des diatomées épipsammiques que celle mesurée pour les épipéliques (Saburova et Polikarpov, 2003, Consalvey *et al.*, 2004b, Coelho *et al.*, 2011).

NPQ mesuré *in situ* est différent de celui mesuré en laboratoire car il est ici régulé par un ensemble de facteurs environnementaux (température, pH, salinité, etc.) qui s'additionne à la lumière (seul paramètre influent le NPQ en conditions de laboratoire). De plus les conditions de lumière fluctuantes engendrent un fort NPQ pour toutes les populations (épipéliques au printemps et épipsammiques au printemps et à l'automne). Les diatomées épipéliques de Brouage semblent favoriser le développement d'un NPQ fort par une synthèse de DT qui semble moins contraignant qu'une migration en continue pour s'adapter aux fluctuations de lumière.

L'observation dans le détail du NPQ_m en fonction de la lumière pour Brouage ne montre pas de fluctuations. De plus, les fluctuations lumineuses mesurées en surface ne sont pas celles perçues par les diatomées qui sont dans le biofilm ou dans le sédiment qui vont atténuer cette lumière (diminution de plus de 18% (Kuhl et Jorgensen, 1994). Il semblerait donc que les diatomées épipéliques soient acclimatées à une certaine intensité (plus faible que celle mesurée en surface) et développent un NPQ en fonction de cette intensité. Ainsi, nous proposons l'hypothèse suivante : avec ou sans fluctuations, si l'intensité lumineuse était plus faible, le biofilm épipélique générerait moins de NPQ. Si l'intensité lumineuse était plus forte (avec ou sans fluctuations), ce microphytobenthos se protégerait par migration photophobique.

Pour le site de Bourgneuf, l'observation du NPQ_m au cours des fluctuations lumineuses montre des valeurs beaucoup plus variables. Un sédiment moins cohésif laisse mieux pénétrer la lumière, et atténue moins les fluctuations lumineuses que pour les populations épipéliques (Kuhl et Jorgensen, 1994). De plus le microphytobenthos épipsammique ne produit pas de biofilm et les diatomées ne peuvent pas/peu migrer. Ceci conduit donc à des fluctuations de NPQ. Ces conclusions rejoignent donc directement les observations faites en laboratoire (cf Partie 2).

Les observations du NPQ_m en fonction du PAR moyen des 5 dernières min avant la mesure confirme ces idées. NPQ_m en fonction de la température montre un lien seulement pour Bourgneuf (plus prononcé au printemps). Ici, nous assumons l'idée que le lien avec la

température, fort à Bourgneuf et faible à Brouage, est dû à la cohésion du sédiment (forte à Brouage et faible à Bourgneuf) qui tempore plus ou moins les variations.

Le lien entre le NPQ et la DES *in situ* pour le microphytobenthos épipéliques n'est pas aussi fort que celui théorique rencontré dans la littérature (Lavaud et Kroth, 2006). Dans ces mesures *in situ*, une DES importante n'induit pas un NPQ élevé. A Brouage, au printemps, le NPQ est fort et stable, quelle que soit la DES. Cependant, le NPQ est plus dépendant du pool DD+DT et de l'implication de la DT dans le NPQ comme observé dans les travaux de Lavaud et Lepetit (2013) : la DD+DT dépend de la photoacclimatation à long-terme alors que la DES réagit aux changements de lumière à court terme. Dans ce cas le microphytobenthos peut se situer à une même profondeur dans le sédiment, recevoir la même intensité lumineuse, mais avoir un historique lumineux différent. De part cet historique lumineux différent il n'aura pas le même pool de xanthophylles. Le microphytobenthos va cependant réagir à la lumière en synthétisant la même quantité de DT, mais comme le pool de xanthophylle est différent, la DES le sera elle aussi.

Pour les communautés épipsammiques, le NPQ est fortement lié à la DES ce qui est explicable par les résultats obtenus en Partie 2 : la régulation physiologique des diatomées épipsammiques (ne bougeant peu ou pas) est plus efficace que celle des diatomées épipéliques (mobiles).

Le NPQ apparaît bien plus lié à la DT_m qui semble un bien meilleur indice de la photoprotection comme proposé dans les travaux de Lavaud & Lepetit (2013). Pour les deux sites que nous avons étudiés, le lien entre le NPQ et la DT peut être décomposé en deux phases : une première phase où l'utilisation de la DT par le NPQ est très efficace (forte augmentation du NPQ avec faible augmentation de la DT), suivi d'une phase où la DT ne semble plus utilisée dans les mécanismes de NPQ. Il semblerait donc que cette DT soit alors utilisée dans la prévention de la peroxydation lipidique par les ROS (Lepetit *et al.*, 2010). Cette conclusion est flagrante pour la communauté observée à Brouage (épipélique) et plus modérée pour la communauté épipsammique. À notre connaissance, c'est la première description *in situ* de ce lien en deux phases entre le NPQ et la DT.

Synthèse des principaux résultats

Les vasières intertidales ont un rôle central dans les méta-écosystèmes littoraux de par leur forte productivité qui est facilement exportée vers les systèmes adjacents (Blanchard, 2006). Cette forte productivité est connue pour alimenter les ressources biologiques (Blanchard *et al.*, 2001, Degré *et al.*, 2006) des vasières intertidales qui sont largement exploitées par l'homme économiquement (aquaculture, pêche récréative, pêche professionnelle, etc.) et qui rendent des fonctions socio-économiques locales essentielles (image territoriale, zones patrimoniales protégées, éco-tourisme, etc.). La forte productivité des vasières intertidales est assurée par le microphytobenthos (MPB), une communauté de microalgues, qui permet l'entrée de l'énergie chimique (nutriments) et physique (lumière) dans le réseau trophique et leur conversion en matière organique.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons cherché à approfondir notre connaissance de la régulation de la productivité photosynthétique du MPB, et plus précisément d'un groupe de microalgues, les diatomées, qui dominent sous les latitudes tempérées. Ce travail a couplé des approches de physiologie, d'écophysiologie et d'écologie en se concentrant sur les mécanismes de régulation de l'efficacité de la photosynthèse face à certains facteurs abiotiques (lumière, température, salinité).

Plusieurs vasières intertidales, présentant différentes granulométries et communauté de diatomées associée, ont été étudiées. Les vasières de Brouage (bassin de Marennes-Oléron), d'Esnandes (Anse de l'Aiguillon) en France et d'Aveiro (Ria de Aveiro) au Portugal sont caractérisées par un sédiment cohésif principalement composé de vases fines qui ne permettent qu'une faible pénétration de la lumière au cours de l'émersion. Les diatomées épipéliques mobiles constituent la forme de vie principale qui habite ces vasières. En comparaison, nous avons également étudié la vasière intertidale de la Liarne (baie de Bourgneuf, France) dont le sédiment sablo-vaseux est moins cohésif. Dans ce type de sédiment, la lumière pénètre plus profondément et les diatomées épipsammiques immobiles constituent la forme de vie principale. La différence de cohésion du sédiment n'influence pas seulement la pénétration de la lumière mais également les changements de température et de salinité, les trois paramètres étant souvent liés (i.e. une forte salinité est souvent, mais pas

toujours due à une forte évaporation de l'eau interstitielle en surface du sédiment qui est elle-même générée par un fort ensoleillement et des températures élevées).

L'originalité de ce travail de thèse tient à deux points : 1) la complémentarité des échelles spatio-temporelles étudiées, par des aller-retour continus entre l'appareil photosynthétique et la vasière passant par l'échelle moléculaire, cellulaire, population et communauté ainsi que par la prise en compte de plusieurs saisons ; 2) la prise en compte de la diversité spécifique et de la complexité fonctionnelle des grands modes de vie des diatomées benthiques. Il existe trois grands modes de vie : 1) les diatomées épipéliques des sédiments cohésifs (vases fines) sont mobiles et 'migrent' en fonction du cycle tidal et des variations des facteurs environnementaux, 2) les diatomées épipsammiques des sédiments moins cohésifs (mélange de sables et de vases) qui vivent attachées aux grains de sable et dont certaines espèces sont capables de micro-mouvements, et 3) les diatomées tychoplanctoniques qui habitent différents types de sédiments (excepté les sables) et qui sont dites 'amphibies', *i.e.* elles sont capables d'alterner entre une vie benthique dans le sédiment (MPB) et une vie planctonique dans la colonne d'eau (phytoplancton) en fonction des phases d'émersion/immersion.

Afin de mieux comprendre la régulation de la productivité photosynthétique du microphybenthos des vasières intertidales à différentes échelles de temps et d'espace, nous nous sommes intéressés aux réponses physiologiques (en particulier la photophysologie) et comportementales ('migration') des diatomées benthiques dans leur ensemble face à certaines contraintes environnementales (facteurs abiotiques seuls) à différentes échelles biologiques allant de l'espèce (populations mono-spécifiques, Parties 2, 4 et 5A) à la communauté (biofilm du sédiment, Parties 3, 4, 5B et 6). L'environnement lumineux (intensité, qualité, photopériode), bien que facteur environnemental central dans ce travail (Parties 2, 3 et 5B_1), n'a pas été le seul paramètre environnemental pris en compte. Le couplage entre la lumière et d'autres forçages abiotiques, dont les variations sont connues pour être fréquentes et parfois extrêmes dans les vasières intertidales (Paterson et Hagerthey, 2001), a été considéré : le cycle tidal (Partie 3), la température (Partie 5B_2), et la salinité (Partie 5A). Finalement des campagnes terrain ciblées (Parties 5B et 6) ont permis de i) replacer dans un contexte *in situ* les observations faites au laboratoire ainsi que de ii) définir de la manière la plus pertinente possible l'amplitude de variation des facteurs environnementaux lors des expérimentations réalisées en conditions (semi-)contrôlées (Parties 2, 5A et 5B).

1- La réponse photophysologique du MPB : diversité fonctionnelle de la régulation de la photosynthèse (Partie 2)

Dans un premier temps, nous avons cherché à comprendre la réponse photophysologique des différents groupes de diatomées composant le MPB. Ce travail s'est effectué sur des cultures monospécifiques de diatomées benthiques appartenant aux trois grands modes de vie. L'affranchissement du substrat sédimentaire a permis de mesurer la réponse physiologique fine dans des conditions contrôlées tout en s'affranchissant de la réponse comportementale que peuvent avoir certaines espèces mobiles.

L'hypothèse sur laquelle reposait cette étude était que le mode de vie (mobilité/immobilité) et l'habitat (granulométrie qui définit la pénétration de la lumière dans le sédiment) pourrait entraîner une meilleure capacité de photoprotection (fort NPQ et cycle des xanthophylles) de l'épipsammon comparé à l'épipélon. De par son mode de vie, le tychoplancton évolue dans un milieu turbide lors de sa remise en suspension et lors des émergences les cellules sont enfouies dans le sédiment et donc devraient être adaptées à un environnement lumineux faible. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement pour la première fois. Ceci nous a permis i) de conforter la proposition de la capacité de photoprotection en tant que trait fonctionnel écologique (Meyer *et al.*, 2000, Dimier *et al.*, 2007, Lavaud *et al.*, 2007), et ii) conforter l'idée selon laquelle la migration verticale dans le sédiment peut être considérée comme un mécanisme de 'photoprotection comportementale' (Saburova et Polikarpov, 2003, Cartaxana *et al.*, 2011). De plus, certaines diatomées épipsammiques sont capables de micro-mouvements et, bien qu'elles soient plus proches de l'épipélon (formes raphidées) elles montrent une capacité de photoprotection physiologique plus proche de l'épipsammon immobile (formes araphidées). Ainsi, le degré de photoprotection physiologique n'est pas déterminé par les relations de phylogénie (division raphidée/araphidée), mais par le mode de vie (mobilité/immobilité).

La lumière, et ce quelle que soit sa pénétration dans le sédiment, étant la source d'énergie du processus de photosynthèse, cette partie du travail de thèse nous a permis de mieux comprendre comment, les trois grandes formes de vie des diatomées benthiques, gèrent, physiologiquement, les variations de leur environnement lumineux et en particulier les excès de lumière qui peuvent être néfastes pour leur efficacité photosynthétique et potentiellement leur productivité.

2- La réponse photophysologique des trois grandes formes de vie de diatomées benthiques à un stress couplé forte lumière-salinité (Partie 5_A)

La régulation de la photosynthèse *in situ* implique de nombreux paramètres environnementaux abiotiques. Après avoir mieux compris la réponse photophysologique des diatomées benthiques à la lumière seule (Partie 2), il est primordial de comprendre le couplage de la lumière à d'autres facteurs abiotiques potentiellement stressant afin de mieux comprendre l'effet d'ensemble des différents facteurs *in situ* (Partie 6). Dans cette partie, le stress lumineux a d'abord été couplé à une augmentation de salinité observée *in situ* (Partie 6). Comme pour la partie 2, nous avons utilisé des cultures mono-spécifiques d'espèces représentatives des grands modes de vie des diatomées benthiques. À notre connaissance, c'est la première fois i) que la diversité fonctionnelle des diatomées benthiques est prise en compte dans ce type d'étude, ii) que les effets d'une augmentation de salinité à court terme (de l'ordre de l'heure) sur l'efficacité photosynthétique sont étudiés. Cette échelle de temps est importante car se rapproche des changements de salinité qui peuvent être mesurés *in situ* lors d'une émergence (Partie 6). Les fortes salinités peuvent en effet amplifier la réponse physiologique à un excès de lumière, mais son effet additif dépend du groupe considéré. Les différences mesurées sont, comme en Partie 2, en lien étroit avec l'habitat (cohésion du sédiment) et le mode de vie (mobile/immobile/amphibie). En effet, la salinité est plus variable et atteint des valeurs plus élevées dans les sédiments cohésifs en comparaison des sédiments sableux (voir Partie 6). Ainsi, les diatomées épipélagiques sont relativement insensibles à un stress couplé forte lumière-salinité contrairement aux diatomées épipsammiques. Les diatomées tychoplanktoniques, en plus d'être sensibles au stress lumineux seul (Partie 2), sont sensibles au stress salin seul (contrairement à l'épipsammon) et au stress couplé lumière-salinité. Tout comme la lumière seule (Partie 2), l'impact d'une combinaison excessive de facteurs environnementaux sur l'efficacité photosynthétique est donc différent au sein des diatomées benthiques ; il doit donc être pris en compte pour mieux appréhender les données *in situ* en fonction de l'habitat et de la communauté microphytobenthique considérés.

3- La réponse photophysiological et comportementale du biofilm épipélique à un stress couplé forte lumière-température (Partie 5_B)

Afin d'approfondir la prise en compte de combinaison de facteurs environnementaux en surface du sédiment, nous nous sommes focalisé sur l'épipélon et sur sa réponse à un stress couplé forte lumière-températures au niveau de la communauté (biofilm en surface du sédiment). Dans un premier temps, nous avons étudié l'équilibre saisonnier entre photoprotection physiologique et comportementale face à un stress lumineux seul. Dans un deuxième temps nous avons étudié cet équilibre face à un stress couplé lumière-température et sur des communautés provenant de latitudes différentes et susceptibles de présenter des stratégies photoadaptatives différentes.

Importance de la photoprotection comportementale du biofilm épipélique lors d'un stress lumineux : acclimatation saisonnière (Partie 5B_1)

La partie 5B_1 nous a permis d'étudier la relation entre la photoprotection physiologique et comportementale du biofilm épipélique et leur rôles respectifs dans la récupération de l'efficacité photosynthétique suite à un stress lumineux. Cette étude a été réalisée sur deux saisons (printemps, automne) pour éventuellement soulever des différences. Cette partie vient donc compléter le travail effectué sur la photophysiology fine des diatomées épipéliques (Partie 2).

Nous avons observé une récupération de l'efficacité photosynthétique en deux phases : 1) une relaxation rapide du NPQ et du cycle des xanthophylles, et 2) une récupération plus lente des dommages dus à l'excès de lumière (photoinhibition). Globalement, le biofilm épipélique résiste bien à un excès de lumière avec un taux de photoinhibition qui reste relativement bas ce qui confirme des études précédentes (Blanchard et Cariou-Le Gall, 1994). Le biofilm épipélique est capable d'augmenter sa photoprotection physiologique lorsque la photoprotection comportementale est diminuée (inhibition de la migration par le Lat-A) ce qui démontre que les deux processus sont complémentaires. La photoacclimatation saisonnière joue un rôle important dans l'équilibre entre la réponse physiologique et comportementale avec une réponse physiologique plus forte au printemps. Ceci a été vérifié *in situ* (Partie 6) : la photoacclimatation différente (due à historique lumineux différent) est responsable des différences du coefficient de saturation de la lumière (α) (pour des conditions de lumière récente similaires).

Équilibre entre la réponse physiologique et comportementale du biofilm épipélone lors d'un stress couplé forte lumière-température : adaptation latitudinale (Partie 5B_2)

Le couplage forte lumière-température est indissociable *in situ*. En effet, nos mesures sur le terrain ont montré un lien direct entre l'augmentation de l'intensité lumineuse et l'augmentation de température (données non présentées en Partie 6), et ce quel que soit l'habitat (sédiment plus ou moins cohésif). Il est donc primordial de comprendre dans quelle mesure une forte température a un effet additif au stress lumineux pour permettre un meilleur lien entre les Parties 2 et 6.

Dans ce travail, l'épipélon provient de deux sites à sédiments cohésifs géographiquement éloignés : Esnandes (France) et Aveiro (Portugal). La comparaison de la réponse physiologique et comportementale montre que la récupération de l'efficacité photosynthétique après le stress lumineux seul (25°C) ou combiné à un stress thermique (40°C) est plus importante pour l'épipélon du site portugais, en particulier quand le stress lumière-température est couplé et que la migration est inhibée. La photophysologie de l'épipélon du site portugais est plus marquée (plus fort NPQ, synthèse de protéines Lhcx accentuée) ce qui dénote d'une adaptation physiologique à des intensités lumineuses et des températures plus élevées. Plus généralement, ces résultats ont montré qu'une température élevée démultiplie les effets néfastes du stress lumineux sur l'efficacité photosynthétique de l'épipélon. La complémentarité entre la photoprotection physiologique et la photoprotection comportementale est alors essentielle. La température est donc un forçage abiotique important de la productivité photosynthétique du MPB épipélone, ce qui confirme des études précédentes réalisées à une échelle spatio-temporelle différente (Blanchard *et al.*, 1997).

4- La réponse photocomportementale du microphytobenthos : importance de la qualité de la lumière et variation saisonnière de la mise à disponibilité de la biomasse photosynthétiquement active (Partie 3 et 4).

Par ce travail nous avons cherché à compléter l'approche réalisée en Partie 5B sur l'effet de l'intensité lumineuse sur la photoprotection physiologique et comportementale de l'épipélon. En effet, pour l'étude réalisée *in situ* (Partie 6), il était important de comprendre les facteurs influençant la migration afin de les différencier de la photoprotection comportementale. En particulier, quelle est l'influence des autres caractéristiques de la lumière, son spectre et sa photopériode, sur le rythme migratoire de l'épipélon et donc sur sa mise à disposition en surface du sédiment pour les consommateurs, *i.e.* accessibilité à la biomasse productive = photosynthétiquement active (ou PAB). Cette étude nous a également permis de mieux comprendre la synchronisation du rythme migratoire au cycle tidal et nyctéméral, ainsi que la dynamique saisonnière de la PAB un aspect indispensable pour une meilleure appréhension des expérimentations/données *in situ*.

Des variations saisonnières ont ainsi été observées, avec une diminution de la PAB entre l'hiver, où elle est maximale et l'été où elle est minimale.

Les schémas de migrations de l'épipélon ont déjà été décrits (Heckman, 1985, Consalvey *et al.*, 2004b, Easley *et al.*, 2005, Guarini *et al.*, 2008) mais ces études ont négligé les situations où le maximum de la marée basse se situe au crépuscule ou à l'aurore. Dans ces cas-là, un décalage entre le maximum de biomasse épipélique en surface du sédiment et le maximum de la marée basse a pu être observé. De plus, nous avons pu déterminer que la migration de l'épipélon est sans doute liée à un rythme endogène, étroitement lié au cycle tidal, mais qui peut être modulé par la lumière.

La lumière, en particulier de par son intensité et sa qualité, influence la mobilité de l'épipélon (Consalvey *et al.*, 2004a, Mitbavkar et Anil, 2004, Wenderoth et Rhiel, 2004), en entraînant une 'fuite' lorsque la lumière est en excès (réponse photophobique, Partie 5B_1). Nous avons retrouvé cette réponse pour une intensité bien plus faible (350 vs. 1200 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$). De plus, la lumière bleue a montré un réel impact positif sur la migration et la PAB. Il reste cependant à comprendre quel est le réel effet de la lumière bleue sur le microphytobenthos. Des études récentes ont montrées la présence de photorécepteurs spécifiques de la lumière bleue chez les diatomées planctoniques (Takahashi *et al.*, 2007) et notamment d'un photorécepteur (auréochrome) étroitement lié avec le cycle cellulaire (Huysman *et al.*, 2013) et la photoclimation aux excès de lumière (Schellenger Costa *et al.*, 2013). Dans l'état actuel,

il n'est pour l'instant pas possible d'attribuer l'augmentation de la PAB par la lumière bleue à une amplification de la migration en elle-même, ou à une augmentation de la division cellulaire en surface du sédiment (voir Partie 4 et Huysman *et al.*(2013)). Des mesures de paramètres photophysiques ont été réalisées à l'aide d'un Water-PAM (comme en Partie 6) aux mêmes temps de prélèvements que pour l'analyse pigmentaire (début, milieu et fin d'émersion) ce qui nous permettra de mieux comprendre le lien entre migration et photosynthèse en fonction de l'environnement lumineux, et en particulier sous lumière bleue de différentes intensités, et de compléter les approches des Parties 5B et 6.

Afin de d'explorer le lien possible de l'effet positif de la lumière bleue sur la PAB avec le cycle cellulaire, nous avons entrepris une mise au point méthodologique (décrite en Partie 4) qui se poursuivra pendant mon projet d'ATER à l'Université de La Rochelle (2013-14) (cf Perspectives ci-après). Cette approche qui couple des expérimentations sur des communautés épipéliques dans le sédiment et sur des cultures monospécifiques est prometteuse mais a montré certaines limites que mon projet ATER essayera de lever.

5- Régulation de la photosynthèse du MPB dans les vasières intertidales de la côte atlantique française : impact des facteurs environnementaux et importance de la diversité fonctionnelle pour la régulation de la production primaire

La finalité de ce travail de thèse était de replacer dans un contexte global les observations effectuées à des échelles moindres et simplifiées. La compréhension de mécanismes aussi complexes que la photochimie et la photoprotection du MPB n'est pas envisageable *in situ* sans prendre en compte l'ensemble des facteurs les influençant, c'est pourquoi de nombreux paramètres, dont certains sont encore en cours d'analyse, ont été mesurés. Par les parties précédentes, nous avons montré que la lumière (Partie 2 et 5B_1), mais aussi son couplage avec la salinité (Partie 5A) et la température (partie 5B_2) influence la photochimie et la photoprotection. De plus la migration (Partie 3) régit la disponibilité en surface de la biomasse microphytobenthique (PAB), tout en permettant la photoprotection comportementale de l'épipélon (Partie 5B). La PAB est régulées par la lumière (Partie 3) mais aussi par la division cellulaire (Partie 4).

La biomasse microphytobenthique présente à la surface du sédiment vaseux est plus importante que celle en surface du sédiment sablo-vaseux. À Bourgneuf, la biomasse est répartie de façon homogène dans le sédiment alors qu'à Brouage la concentration en surface augmente au cours de la marée basse par migration verticale (rejoignant les résultats obtenus en Partie 3). Cette observation est confortée par les concentrations d'exopolysaccharides (EPS) qui augmentent au cours de la marée basse à Brouage. Les concentrations d'EPS à Bourgneuf sont faibles mais il n'est pas possible de statuer sur de réelles faibles concentrations, ou sur un problème dans le protocole d'extraction des EPS du sédiment sablo-vaseux.

Ces données de biomasses sont à recouper avec les données de production, qui, à l'échelle d'une journée, est plus importante dans le sédiment vaseux que dans le sédiment sablo-vaseux.

Ainsi, sur les deux sites, pour toutes les saisons, il a été montré que le taux de transport relatif maximal d'électrons ($rETR_m$) et évolue avec l'intensité lumineuse. La photochimie mesurée est plus importante en sédiment vaseux qu'en sédiment sablo-vaseux, ce qui rejoint les résultats obtenus pour la biomasse et la production. Ce travail, a souligné l'intérêt de prendre en compte l'historique lumineux. En effet, l'efficacité d'utilisation de la lumière (α) mesurée aux différentes saisons a montré des valeurs identiques pour des différences de coefficient de saturation de la lumière E_k , mettant en évidence le fait que les populations sont acclimatées à

la même intensité lumineuse, mais que l'historique lumineux différent conduit à des E_k différents. L'historique lumineux pourrait expliquer la variabilité de profils de migration obtenus pour des conditions similaires dans la Partie 3.

L'originalité principale de ce travail *in situ* se situe au niveau des mesures du NPQ_m . Les valeurs mesurées sur le terrain sont globalement plus élevées que celles mesurées en laboratoire pour les communautés épipéliques qui pourtant, dans les conditions de terrain, sont capables de migrer (photoprotection comportementale ; Parties 2, 5B). De plus, le NPQ_m ne montre pas d'évolution en fonction de la lumière pour le site vaseux, alors qu'il fluctue en fonction de la lumière pour le site sablo-vaseux. Ici encore les mesures en laboratoire peuvent être recoupées avec celles du terrain : les diatomées épipsammiques développent un NPQ_m pour se protéger des variations de lumière alors que les diatomées épipéliques ont la capacité de migrer et de se positionner dans le gradient de lumière du sédiment (Partie 2), expliquant ainsi les fluctuations enregistrées pour les populations épipsammiques et le NPQ_m stable enregistré pour les populations épipéliques.

Les mesures de NPQ_m ne se corrèlent pas directement avec les mesures de DES ou de pool de xanthophylles (DD+DT). En revanche, une corrélation en deux phases est trouvée pour la DT. Cette observation rejoint celle de travaux récents (Lavaud et Lepetit, 2013) qui montre un lien direct entre le NPQ et la DT en début d'augmentation du NPQ puis après un seuil, la DT est utilisée pour d'autres mécanismes de photoprotection comme la prévention de la peroxydation lipidique par les radicaux libres.

Les températures mesurées *in situ*, n'étant pas extrêmes, les observations de la partie 5B_2 n'ont pu être confrontées aux observations *in situ*. Cependant, des données *in situ* ont été collectées sur les sites d'Esnandes et d'Aveiro, en été, qui nous ont permis de confronter nos observations en laboratoire à la réalité du terrain (Partie 5B_2).

La salinité mesurée *in situ* n'a augmenté qu'à Brouage, mais de façon non significative. Pour cette raison, mais aussi par les résultats de la partie 5A (tolérance importante des diatomées épipéliques aux variations de salinité), cette augmentation n'a pas été confronté aux paramètres photochimiques. Là encore une compilation de données *in situ* incluant ce travail de terrain nous a aider à cadrer les expérimentations en laboratoire avec la réalité du terrain (Partie 5A).

Au cours des campagnes de terrain, de nombreux paramètres ont été prélevés et n'ont pu être présentés car encore en cours d'analyse. L'ajout de ces paramètres à ceux déjà mesurés, ainsi que la comparaison des différents jours (3 à 4 par session terrain) permettra une meilleure

vision d'ensemble de la dynamique de la PAB et de la régulation de la production photosynthétique du MPB. Ce travail se fera en particulier par une analyse multivariée qui au vue de l'avancement actuel de ce travail nous parait trop précoce.

Conclusions et perspectives

La complémentarité des échelles spatiales nous a conduits à étudier l'appareil photosynthétique à une échelle fine pour pouvoir comprendre la régulation physiologique de la photosynthèse. La capacité de régulation photoprotection est fonction de l'habitat et du mode de vie. Sans la prise en compte de l'habitat (écologie) des diatomées étudiées, le lien entre la photoprotection physiologie et comportementale aurait été impossible, nous contraignant à 'seulement' conclure que l'épipsammon à une meilleure photoprotection physiologique que l'épipélon. De plus le mode de vie, et donc encore une fois la prise en compte de l'écologie des diatomées, nous a permis de comprendre les différences de photoprotection des diatomées épipsammiques, sont fonction de leur (faible) mobilité ou immobilité. Inversement, les mesures physiologiques au niveau de l'espèce nous ont permis d'identifier les individus appartenant au tychoplancton. La distinction de ce groupe est difficile car quand il est échantillonné, il est déposé sur le sédiment et l'approche physiologique permet de détecter ses particularités physiologiques liées à sa capacité amphibie.

Les mesures de schéma de migration complètent les mesures monospécifiques. Pour les diatomées épipsammique, un rythme de migration semble apparaître. Cette faible capacité de migration rejoint les différences de photoprotection entre l'épipsammon non mobile et l'épipsammon faiblement mobile.

Le travail à l'échelle de communautés *ex situ* n'aurait pas été aussi complet sans le travail préalable sur les cultures. Le sédiment permet la migration (photoprotection comportementale) des diatomées épipéliques et dans une moindre mesure des diatomées épipsammiques. L'étude en laboratoire sur des communautés *ex situ* ne permet de s'affranchir de la migration que par l'utilisation d'un inhibiteur chimique (Lat-A). Son utilisation permet la mesure de la physiologie fine de la photosynthèse en conditions de migration inhibée, mais des effets secondaires ne sont pas impossibles. Pour cela il est important de disposer au préalable de données sur des cultures monospécifiques.

Le travail à différentes échelles temporelles, au niveau de la PAB, nous permis d'observer une biomasse maximale en hiver diminuant jusqu'à un minimum en été pour ré-augmenter par la suite. Ce résultat est surprenant, et permet d'expliquer que sur le terrain les biomasses sont similaires pour les saisons choisies (printemps et automne). Les observations effectuées sur le

terrain ont montré une importance particulière de la photoacclimatation. Sans les travaux sur les cultures monospécifiques (acclimaté à 20 et 75 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$), cette conclusion aurait été moins évidente au regard des données journalières de lumière *in situ*.

Le changement d'échelle spatiale ne permet cependant pas d'expliquer tous les résultats. Les mesures *in situ* de NPQ sont bien plus élevées que celles sur les cultures monospécifiques. Les résultats obtenus pour le couplage de facteurs abiotiques à la lumière (température, salinité) ont montré une augmentation de la réponse physiologique face à la lumière seule. Cependant, les mesures faites sur de la vase ramené en laboratoire (Partie 5B_2) ont montré des valeurs de NPQ équivalentes à celles rencontrées sur le terrain, même dans des conditions de température ambiantes (20°C). Les valeurs de NPQ mesurées augmentent entre les cultures et les mesures sur le sédiment ramené en laboratoire. Une étape manque donc dans notre démarche afin de comprendre ces différences de valeurs obtenues. Existe-il des interactions entre les différents individus composant le biofilm qui augmentent la capacité de photoprotection physiologique ? Les conditions utilisées pour nos mesures sur les cultures monospécifiques ne sont-elles pas optimales ? Pour répondre à ces questions, il faudrait récolter du biofilm *in situ* et le placer en milieu liquide pour procéder à des mesures. Si cette étape-là ne permet pas d'obtenir de réponse, il faudrait alors envisager l'utilisation de mésocosmes qui permettent un travail dans des conditions contrôlées mais proches du terrain.

La démarche temporelle n'a montré que peu de différence *in situ*. Le travail sur l'évolution de la PAB au cours de l'année nous a appris que pour les saisons choisies, printemps et automne, les biomasses sont sensiblement équivalentes. Les mesures *in situ* ont montré des conditions de lumières fluctuantes pour les deux saisons, mais cependant très proches. Dans le but de mieux comprendre la dynamique temporelle de la production primaire, dans les sédiments vaseux et sablo-vaseux, il est indispensable de reconduire des campagnes terrain en hiver et en été, ou d'analyser les données des campagnes de l'ANR VASIREMI sous un nouvel angle prenant en compte les résultats de ce travail de thèse.

Par ce travail, nous avons en partie réussi à ouvrir la 'boîte noire' du MPB, et à souligner l'importance de la diversité spécifique, fonctionnelle, de l'habitat et du mode de vie. Bien que les diatomées dominent sous nos latitudes le MPB, il serait intéressant de travailler aussi sur les autres groupes rencontrés dans le MPB comme les euglènes et les cyanobactéries.

Le travail effectué dans chaque partie de cette thèse a permis des avancées qui pourraient être encore approfondies ou améliorées :

À l'heure actuelle la plupart des travaux sur la photophysologie au niveau de l'espèce concernent les diatomées planctoniques (Lavaud, 2007, Lavaud et al., 2007, Beer et al., 2011, Wu et al., 2012), les diatomées benthiques étant souvent étudiées au niveau de la communauté, majoritairement les assemblages épipéliques (Perkins *et al.*, 2010b, Cartaxana *et al.*, 2011, Serôdio *et al.*, 2012, Cartaxana *et al.*, 2013). Les diatomées épipsammiques sont plus négligées (Cartaxana et al., 2011) et les diatomées tychoplanctoniques ne sont souvent pas prises en compte ou placées dans d'autres groupes que le leur (Rijstenbil, 2005, Apoya-Horton et al., 2006, McLachlan et al., 2009).

L'effet de la lumière sur la physiologie des différents groupes de diatomées benthiques est désormais mieux compris, et il apparaît clair que les capacités de photoprotection physiologique des diatomées sont fonction de leur habitat et de leur mode de vie, comme c'est cas pour les planctoniques (Lavaud *et al.*, 2007). Par ce travail, nous avons donc pu montrer qu'il est important, dans les études *in situ*, de prendre en compte les différents groupes ainsi que la diversité spécifique.

Cependant toutes les réponses physiologiques ne sont pas prises encore en compte. D'importantes avancées ont été faites au niveau moléculaire notamment par l'étude des protéines Lhcx (Lepetit *et al.*, 2012, Lepetit *et al.*, 2013) dont le rôle exact est encore peu compris, mais dont le rôle dans la photoprotection est avéré (notamment en Partie 5B_2) et qu'il faudra à l'avenir prendre en compte. La lumière dans le sédiment n'est pas monochromatique comme celle que nous avons utilisée en laboratoire, sur les cultures monospécifiques en Partie 2 et sur le sédiment en Partie 3. L'importance de la composition spectrale a déjà été soulignée pour la migration (Wenderoth et Rhiel, 2004) que nous avons exploré en Partie 3, le cycle cellulaire des diatomées (Huysman *et al.*, 2013, Lockhart, 2013) et la photophysologie (Furukawa *et al.*, 1998, Mercado *et al.*, 2004, Schellenberger Costa *et al.*, 2013a, Vieira *et al.*, 2013b). Il est connu que dans le sédiment la composition lumineuse évolue avec la profondeur (Kuhl et Jorgensen, 1994, Vieira *et al.*, 2013a), s'appauvrissant en rouge et s'enrichissant en bleu. Ainsi il serait intéressant, de travailler sur différentes lumières, notamment en jouant avec le ratio bleu-rouge, pour prendre en compte les photorécepteurs. Depauw *et al.* (2012) ont notamment évoqué l'importance du 'sensing' de la lumière bleue dans des mécanismes variés tels que les régulations circadiennes, la photosynthèse, la photoprotection. La lumière rouge semble impliquée dans la synthèse de pigments, la photoadaptation, le phototaxisme et le déplacement des chloroplastes. Ainsi travailler sur ce

ratio lumière rouge et lumière bleue à l'échelle moléculaire semble primordial pour faire progresser la connaissance du rôle de la lumière sur les diatomées benthiques.

Dans le travail en Partie 2, la capacité de photoprotection comportementale a, en partie, expliquée les différences de photoprotection physiologique. Il serait intéressant de mesurer la vitesse de déplacement des cellules en fonction de la lumière. J. Ezéquier et J. Serôdio ont déjà mesuré (travaux non publiés) que sous un gradient lumineux, les diatomées épipéliques se placent à un optimum de lumière. Il est donc envisageable de compléter ces travaux par des mesure de vitesse de déplacement.

Ce travail a montré l'importance de la lumière sur la physiologie des diatomées, mais *in situ* la lumière n'est jamais le seul facteur forçant. Afin de pouvoir comprendre l'effet de tous les facteurs évoluant sur le terrain, il est indispensable de passer par une étude laboratoire du couplage des différents facteurs (comme nous l'avons fait en Partie 5). Le couplage de la lumière avec la salinité et la température est déjà en cours d'étude. Cependant ce travail mérite d'être complété en prenant en compte la diversité des trois groupes dans les expérimentations sur le couplage lumière température. De par les mesures *in situ* (Partie 6), il semble intéressant de travailler sur un couplage lumière-pH. Le pH environnemental est fonction de l'activité photosynthétique, qui elle-même est régie par la lumière. Cette approche permettrait d'acquérir des connaissances supplémentaires qui pourraient permettre de mieux expliquer les résultats *in situ*.

La concentration en nutriments *in situ* sera bientôt connue et pourrait indiquer, s'ils sont limitant, si des travaux sur des cultures monospécifiques de couplage lumière nutriment sont pertinents.

Jusqu'à présent, l'étude des sédiments vaseux (donc à dominance en diatomées épipéliques) a été privilégiée, et comme dit précédemment, l'épipsammon est moins étudié. Nous sommes, à notre connaissance, les premiers à avoir pu observer des changements de fluorescence chlorophyllienne dans du sédiment sablo-vaseux. Bien que ces variations suivent le même schéma que celles mesurées pour les communautés épipéliques, il reste encore à déterminer si elles sont dues à des micro-migrations de diatomées épipsammiques, ou si des diatomées épipéliques capable de migrer dans ce type de sédiment sont présentes (en faible quantité). Ce travail nécessite donc d'être complété par l'étude de la composition spécifique.

Nos travaux en Partie 3 ont montré une corrélation entre la fluorescence chlorophyllienne, et la biomasse. Cette corrélation est connue (Serôdio *et al.*, 1997, Barranguet *et al.*, 1998, Honeywill *et al.*, 2002), mais avec une acclimatation préalable à l'obscurité. Nous sommes les

premiers à montrer que cette acclimatation n'est pas obligatoire. Il est indispensable, dans les travaux futurs, d'évaluer la surface prélevée afin d'avoir une réelle mesure de biomasse présente *in situ*. Bien que nous supposons la prédation comme responsable de la diminution PAB au cours de l'année, cette hypothèse mérite d'être confirmée. *P. ulvae*, pour la macrofaune, est dominante sur les vasières étudiées (cf partie 6). Cette espèce se nourrit essentiellement sur le MPB (Morrisey, 1988, Sauriau *et al.*, 1989, Hagerthey *et al.*, 2002, Haubois *et al.*, 2002) et il serait intéressant de pouvoir relier sa prédation aux variations de PAB. Lors de la préparation des plateaux de vase une étape de tamisage est effectuée et il serait envisageable de récolter le reflux de tamis pour évaluer leur abondance et ainsi la lier aux variations de PAB.

Comme pour les communautés épipéliques, il serait intéressant de prospecter un lien entre fluorescence chlorophyllienne et biomasse pour les communautés épipsammiques. Ainsi un suivi de leur biomasse le long de l'année serait envisageable.

Depuis longtemps étudié, le rythme interne de migration des diatomées épipéliques a longtemps été attribué à la lumière (Serôdio *et al.*, 2006a, Coelho *et al.*, 2011, Du *et al.*, 2012). Nous avons pu conforter le fait que cette migration est fonction du rythme tidal mais régit par un rythme endogène qui peut être modulé par la lumière (Consalvey *et al.*, 2004b, Kromkamp et Forster, 2006). L'origine du rythme endogène n'est pour l'instant pas identifié et, en toute vraisemblance, doit être contrôlé/régulé par des paramètres environnementaux pour suivre le décalage journalier des marées. Une approche moléculaire semble indispensable pour identifier ce mécanisme interne. Il serait intéressant de prélever du biofilm à différents moments de marée basse et d'explorer l'expression génétique. De plus, la lumière modulant ce rythme (Partie 3), il serait intéressant d'identifier les photorécepteurs qui en sont responsable. Tout comme proposé précédemment, des prélèvements pourraient être fait en parallèle sur du sédiment illuminé et du sédiment placé à l'obscurité.

Notre travail a confirmé que la lumière bleu amplifie les migrations du biofilm (Wenderoth et Rhiel, 2004) et que cette amplification n'est pas due à une synthèse de pigments. Pour aller plus loin, l'approche moléculaire est inévitable afin de comprendre si la lumière bleue est perçue par des photorécepteurs (Depauw *et al.*, 2012) et entraîne une réponse de migration plus importante, ou si elle augmente la biomasse présente en déclenchant la division des diatomées en surface (observation de la cycline dsCYC2 comme dans les travaux de Huysmann *et al.*(2013)). Cette division est supposée avoir lieu en profondeur (voir Partie 4),

et c'est justement les longueurs d'ondes bleu qui pénètrent le sédiment le plus en profondeur (Kuhl et Jorgensen, 1994).

Nous avons montré que la lumière rouge n'amplifie pas la réponse de migration et elle a été identifiée pour entrainer une migration en profondeur (Consalvey *et al.*, 2004a, Wenderoth et Rhiel, 2004). L'approche moléculaire sur la lumière rouge permettrait de vérifier l'activation de photorécepteurs qui limiteraient la migration par, comme c'est le cas chez les diatomées planctoniques qui ont un photorecepteur rouge, le 'sensing' de la surface (Depauw *et al.*, 2012). D'autres études sont cependant envisageables pour répondre à ces questions. Des observations au microscope électronique à balayage de l'interface air-sédiment (Herlory *et al.*, 2004) permettrait de savoir où se positionne les diatomées en fonction des lumières bleu et rouge. Une autre approche est encore envisageable, cette fois ci sur des cultures monospécifiques, en illuminant (en bleu ou en rouge) une zone réduite et en mesurant la répartition des diatomées.

L'hypothèse du découplage entre la division des diatomées épipéliques en profondeur dans le sédiment et de la photochimie en surface (Saburova et Polikarpov, 2003), a été confortée. L'utilisation de la cytométrie sur les diatomées épipéliques représente une réelle avancée dans le domaine. Ce travail a montré la possibilité de mesurer les différentes phases du cycle cellulaire sur des cultures monospécifiques de *N. phyllepta*. Cependant cette espèce, cultivée depuis de nombreuses années en milieu liquide, a pu perdre sa rythmicité naturelle supposée dans le sédiment. La technique de synchronisation effectuée (privation de lumière) n'a pas permis de bloquer toutes les cellules en même phase de cycle cellulaire.

Il est indispensable de reproduire ce travail, avec une approche sensiblement différente. L'utilisation de cultures monospécifiques, dont les individus seraient fraîchement isolés du milieu, permettrait une meilleure approche de la question. De plus, un comptage microscopique des individus au cours des échantillonnages serait à privilégier aux échantillons dédiés aux mesures HPLC, qui n'apporte pas d'informations supplémentaires. Il serait aussi intéressant, en parallèle de la mesure du cycle cellulaire, de mesurer les paramètres photochimique afin de confirmer/infirmer les observations précédentes relatives au découplage entre la photosynthèse et la division cellulaire (Kaftan *et al.*, 1999, Nymark *et al.*, 2013).

L'amélioration du protocole utilisé dans cette partie est indispensable. L'utilisation de polytungstate de sodium (technique en cours de développement par L. Ribeiro) pourrait permettre de mieux séparer les diatomées du sédiment afin d'améliorer le signal mesuré en

profondeur. Les diatomées épipsamiques ne migrent pas en surface et donc ne sont pas récoltables par la méthode employée (filets). L'utilisation de polytungstate de sodium pourrait ainsi permettre l'étude de leur cycle cellulaire.

Ces améliorations de protocoles sont envisagées dans un avenir proche. Elles font partie d'un projet d'ATER (2013-2014, Université de La Rochelle) qui sera, dans la mesure du possible, continué par un post-doctorat. Ce travail prendra en compte l'effet qualité de la lumière sur le sédiment, rejoignant ainsi le travail effectué en Partie 3. De récents travaux de l'Université de Ghent (Belgique) (Huysman *et al.*, 2013) ont mis en évidence l'effet de la lumière bleue dans le déclenchement d'une phase du cycle cellulaire. Le travail en collaboration envisagé avec cette université permettrait de mettre en commun nos compétences afin de clarifier le cycle cellulaire et approfondir l'impact de la lumière bleue sur le sédiment

In situ, des différences, autre que la lumière, dans les paramètres qui, au laboratoire, sont contrôlés, sont donc présentes notamment pour le NPQ. Ces différences n'ont pas pu être identifiées mais il est possible qu'elles proviennent du couplage de différents paramètres. Les expérimentations proposées sur le couplage à la lumière d'autres paramètres (pH, nutriments) pourraient, à terme, permettre la compréhension du fort NPQ mesuré sur le terrain. Les EPS sont impliquées dans la mobilité, mais aussi dans la protection des diatomées épipéliques. Il semble intéressant d'étudier leur concentration, notamment dans les couplages de la lumière avec la salinité, la température et le pH..

Les faibles concentrations d'EPS mesurées pour le sédiment sablo-vaseux n'ont pas pu être attribuées à de réelles faibles concentrations, ou à un problème de protocole. La mesure de concentration d'EPS par des techniques différentes, en complément de celle utilisée, sur des cultures monospécifiques fraîchement isolées du sédiment sablo-vaseux, pourrait permettre de comprendre si les diatomées de ce sédiment sécrètent peu d'EPS, ou si notre protocole n'est pas adapté.

Il serait intéressant de compléter ce travail de vue d'ensemble des paramètres photosynthétiques, par des campagnes terrain en hiver pour avoir des conditions de lumière faibles non fluctuantes faibles et en été pour avoir des conditions de lumière non fluctuantes fortes sur les sites de Brouage et de Bourgneuf. *In fine*, une approche multivariée des paramètres mesurés sur le terrain permettrait de mieux comprendre les différents couplages de paramètres abiotiques, et la dynamique du microphytobenthos des vasières intertidales.

Références bibliographiques

- Admiraal W (1977). Salinity Tolerance of Benthic Estuarine Diatoms as Tested with a Rapid Polarographic Measurement of Photosynthesis. *Marine Biology* **39**: 11-18.
- Admiraal W, Peletier H (1980). Distribution of Diatom Species on an Estuarine Mud Flat and Experimental Analysis of the Selective Effect of Stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **46**: 157-175.
- Admiraal W (1984). The Ecology of Estuarine Sediment Inhabiting Diatoms. *Progress in Phycological Research* **3**: 269-314.
- Alderkamp A-C, Mills MM, van Dijken GL, Arrigo KR (2013). Photoacclimation and Non-Photochemical Quenching under in Situ Irradiance in Natural Phytoplankton Assemblages from the Amundsen Sea (Southern Ocean). *Limnology and Oceanography*.
- Aleem AA (1950). The Diatom Community Inhabiting the Mud-Flats at Whitstable. *New Phytologist* **49**: 174-188.
- Aminot A, Kérouel R (2004). *Hydrologie Des Écosystèmes Marins: Paramètres Et Analyses*. Ifremer.
- Apoya-Horton MD, Yin L, Underwood GJC, Gretz MR (2006). Movement Modalities and Responses to Environmental Changes of the Mudflat Diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **42**: 379-390.
- Armbrust EV (2009). The Life of Diatoms in the World's Oceans. *Nature* **459**: 14.
- Austen I, Andersen TJ, Edolvang K (1999). The Influence of Benthic Diatoms and Invertebrates on the Erodibility of an Intertidal Mudflat, the Danish Wadden Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **49**: 99-111.
- Bailleul B, Rogato A, de Martino A, Coesel S, Cardol P, Bowler C *et al* (2010). An Atypical Member of the Light-Harvesting Complex Stress-Related Protein Family Modulates Diatom Responses to Light. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 18214-18219.
- Barnett A, Méléder V, Blommaert L, Lepetit B, Gaudin P, Vyverman W *et al* (Submitted). Growth Form Defines Photoprotective Capacity in Intertidal Benthic Diatoms. *The ISME journal*.
- Barranguet C, Herman PMJ, Sinke JJ (1997). Microphytobenthos Biomass and Community Composition Studied by Pigment Biomarkers: Importance and Fate in the Carbon Cycle of a Tidal Flat. *Journal of Sea Research* **38**: 59-70.
- Barranguet C, Kromkamp J, Peene J (1998). Factors Controlling Primary Production and Photosynthetic Characteristics of Intertidal Microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* **173**: 117-126.
- Barton AD, Pershing AJ, Lichtman E, Record NR, Edwards KF, Finkel ZV *et al* (2013). The Biogeography of Marine Plankton Traits. *Ecology Letters* **16**: 522-534.
- Bassoullet P, Le Hir P, Gouleau D, Robert S (2000). Sediment Transport over an Intertidal Mudflat: Field Investigations and Estimation of Fluxes within the "Baie De Marenngres-Oleron" (France). *Continental Shelf Research* **20**: 1635-1653.
- Beer A, Juhas M, Büchel C (2011). Influence of Different Light Intensities and Different Iron Nutrition on the Photosynthetic Apparatus in the Diatom *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **47**: 1266-1273.
- 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.
- Blanchard G, Guarini J-M, Gros P, Richard P (1997). Seasonal Effect on the Photosynthetic Capacity of Intertidal Microphytobenthos and Temperature. *Journal of Phycology* **33**: 723-728.
- Blanchard G, Guarini J (1998a). Temperature Effects on Microphytobenthic Productivity in Temperate Intertidal Mudflat. *Vie et Milieu* **48**: 271-284.
- Blanchard G, Guarini J-M, Dang C, Richard P (2004). Characterizing and Quantifying Photoinhibition in Intertidal Microphytobenthos. *Journal of Phycology* **40**: 692-696.
- Blanchard G (2006). Analyse Conceptuelle Du Système De Production Primaire Microphytobenthique Des Vasières Intertidales. *Océanis* **32**: 215-235.
- Blanchard G, Agion T, Guarini J-M, Herlory O, Richard P (2006). Analysis of the Short-Term Dynamics of Microphytobenthos Biomass on Intertidal Mudflats. In: Kromkamp J, de Brouwer JFC, Blanchard G, Forster RM, Créach V (eds). *Functioning of Microphytobenthos in Estuaries*. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences: Amsterdam. pp 85-97.

- Blanchard GF, Cariou-Le Gall V (1994). Photo Synthetic Characteristics of Microphytobenthos in Marennes-Oléron Bay, France: Preliminary Results. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **182**: 1-14.
- Blanchard GF, Guarini J-M, Richard P, Gros P, Mornet F (1996). Quantifying the Short-Term Temperature Effect on Light-Saturated Photosynthesis of Intertidal Microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* **134**: 309-313.
- Blanchard GF, Guarini J-M, Bacher C, Huet V (1998). Contrôle De La Dynamique À Court Terme Du Microphytobenthos Intertidal Par Le Cycle Exondation-Submersion. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie* **321**: 501-508.
- Blanchard GF, Guarini JM (1998b). Temperature Effects on Microphytobenthic Productivity in Temperate Intertidal Mudflat. *Vie et Milieu* **48**: 271-284.
- Blanchard GF, Paterson DM, Stal LJ, Richard P, Galois R, Huet V *et al* (2000). The Effect of Geomorphological Structures on Potential Biostabilisation by Microphytobenthos on Intertidal Mudflats. *Continental Shelf Research* **20**: 1243-1256.
- 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.
- Blott SJ, Pye K (2001). Gradistat: A Grain Size Distribution and Statistics Package for the Analysis of Unconsolidated Sediments. *Earth surface processes and Landforms* **26**: 1237-1248.
- Bolam SG, Fernandes TF, Huxham M (2002). Diversity, Biomass, and Ecosystem Processes in the Marine Benthos. *Ecological Monographs* **72**: 599-615.
- Bouchet VMP, Sauriau P-G (2008). Influence of Oyster Culture Practices and Environmental Conditions on the Ecological Status of Intertidal Mudflats in the Pertuis Charentais (Sw France): A Multi-Index Approach. *Marine Pollution Bulletin* **56**: 1898-1912.
- Bowler C, De Martino A, Falciatore A (2010). Diatom Cell Division in an Environmental Context. *Current Opinion in Plant Biology* **13**: 623-630.
- Brito AC, Fernandes TF, Newton A, Facca C, Tett P (2012). Does Microphytobenthos Resuspension Influence Phytoplankton in Shallow Systems ? A Comparison through a Fourier Series Analysis. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **110**: 77-84.
- 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.
- Brunet C, 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.
- Brzezinski MA, Olson RJ, Chisholm SW (1990). Silicon Availability and Cell-Cycle Progression in Marine Diatoms. *Marine Ecology Progress Series* **67**: 83-96.
- Cadée GC, Hegeman J (1974). Primary Production of the Benthic Microflora Living on Tidal Flats in the Dutch Wadden Sea. *Netherlands Journal of Sea Research* **8**: 260-291.
- Cao S, Wang J, Chen D (2013). Settlement and Cell Division of Diatom *Navicula* Can Be Influenced by Light of Various Qualities and Intensities. *Journal of Basic Microbiology*.
- Cariou V (1995). Of Marennes-Oleron Bay, France. *Marine Ecology Progress Series* **121**: 171-179.1995.
- Cartaxana P, Serôdio J (2008). Inhibiting Diatom Motility: A New Tool for the Study of the Photophysiology of Intertidal Microphytobenthic Biofilms. *Limnology and Oceanography Methods* **6**: 466-476.
- Cartaxana P, Ruivo M, Hubas C, Davidson I, Serôdio J, Jesus B (2011). Physiological Versus Behavioral Photoprotection in Intertidal Epipelagic and Epipsammic Benthic Diatom Communities. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **405**: 120-127.
- Cartaxana P, Domingues N, Cruz S, Jesus B, Laviale M, Serôdio J *et al* (2013). Photoinhibition in Benthic Diatom Assemblages under Light Stress. *Aquatic Microbial Ecology* **70**: 87-92.
- Chepurnov VA, Mann DG, Sabbe K, Vyverman W (2004). Experimental Studies on Sexual Reproduction in Diatoms. *International Review of Cytology*. Academic Press. pp 91-154.
- Chevalier EM, Gévaert F, Créach A (2010). In Situ Photosynthetic Activity and Xanthophylls Cycle Development of Undisturbed Microphytobenthos in an Intertidal Mudflat. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **385**: 44-49.
- Cibic T, Blasutto O, Falconi C, Fonda Umami S (2007). Microphytobenthic Biomass, Species Composition and Nutrient Availability in Sublittoral Sediments of the Gulf of Trieste (Northern Adriatic Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **75**: 50-62.
- Claquin P, Martin-Jézéquel V, Kromkamp JC, Veldhuis MJW, Kraay GW (2002). Uncoupling of Silicon Compared with Carbon and Nitrogen Metabolisms and the Role of the Cell Cycle in Continuous Cultures of *Thalassiosira*

- Pseudonana (Bacillariophyceae) under Light, Nitrogen, and Phosphorus Control. *Journal of Phycology* **38**: 922-930.
- Claquin P, Kromkamp JC, Martin-Jezequel V (2004). Relationship between Photosynthetic Metabolism and Cell Cycle in a Synchronized Culture of the Marine Alga *Cylindrotheca Fusiformis* (Bacillariophyceae). *European Journal of Phycology* **39**: 33-41.
- Clavero E, Hernandez-Mariné M, Grimalt JO, Garcia-Pichet F (2000). Salinity Tolerance of Diatoms From Thalassic Hypersaline Environments. *Journal of Phycology* **36**: 1021-1034.
- Coelho H, Vieira S, Serôdio J (2009). Effects of Desiccation on the Photosynthetic Activity of Intertidal Microphytobenthos Biofilms as Studied by Optical Methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **381**: 98-104.
- Coelho H, Vieira S, Serôdio J (2011). Endogenous Versus Environmental Control of Vertical Migration by Intertidal Benthic Microalgae. *European Journal of Phycology* **46**: 271-281.
- Cohn SA, Spurck TP, Pickett-Heaps JD (1999). High Energy Irradiation at the Leading Tip of Moving Diatoms Causes a Rapid Change of Cell Direction. *Diatom Research* **14**: 193-206.
- Cohn SA, Farrell JF, Munro JD, Ragland RL, Weitzell RE, Wibisono BL (2003). The Effect of Temperature and Mixed Species Composition on Diatom Motility and Adhesion. *Diatom Research* **18**: 225-243.
- Cohn SA, Bahena M, Davis JT, Ragland RL, Rauschenberg CD, Smith BJ (2004). Characterisation of the Diatom Photophobic Response to High Irradiance. *Diatom Research* **19**: 167-179.
- Colijn F, de Jonge VN (1984). Primary Production of Microphytobenthos in the Ems-Dollard Estuary. *Marine Ecology Progress Series* **14**: 185-196.
- Conn SA, Bahena M, Davis JT, Ragland RL, Rauschenberg CD, Smith BJ (2004). Characterisation of the Diatom Photophobic Response to High Irradiance *Diatom Research* **19**: 167-179.
- Consalvey M, Jesus B, Perkins RG, Brotas V, Underwood GJC, Paterson DM (2004a). Monitoring Migration and Measuring Biomass in Benthic Biofilms: The Effects of Dark/Far-Red Adaptation and Vertical Migration on Fluorescence Measurements. *Photosynthesis Research* **81**: 91-101.
- Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC (2004b). The Ups and Downs of Life in a Benthic Biofilm: Migration of Benthic Diatoms. *Diatom Research* **19**: 181-202.
- Consalvey M, G. PR, Paterson DM, C. UGJ (2005). Pam Fluorescence: A Beginners Guide for Benthic Diatomists. *Diatom Research* **20**: 1-22.
- Cook PL, Røy H (2006). Advective Relief of Co₂ Limitation in Microphytobenthos in Highly Productive Sandy Sediments. *Limnology and Oceanography* **51**: 1594-1601.
- Cooper (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. ASM Press.
- Cox E (1999). *Craspedostauros* Gen. Nov., a New Diatom Genus for Some Unusual Marine Raphid Species Previously Placed in *Stauroneis* Ehrenberg and *Stauronella* Mereschkowsky. *European Journal of Phycology* **34**: 131-147.
- Cruz S, Serôdio J (2008). Relationship of Rapid Light Curves of Variable Fluorescence to Photoacclimation and Non-Photochemical Quenching in a Benthic Diatom. *Aquatic Botany* **88**: 256-264.
- Dajoz R (2000). *Pécis D'écologie* 7ème Édition. *Dunod, Paris* 615p.
- De Brouwer J, 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 Brouwer JF, Stal LJ (2002). Daily Fluctuations of Exopolymers in Cultures of the Benthic Diatoms *Cylindrotheca Closterium* and *Nitzschia* Sp.(Bacillariophyceae) 1. *Journal of Phycology* **38**: 464-472.
- de Brouwer JFC, Bjelic S, de Deckere EMGT, Stal LJ (2000). Interplay between Biology and Sedimentology in a Mudflat (Biezelingse Ham, Westerschelde, the Netherlands). *Continental Shelf Research* **20**: 1159-1177.
- 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, Neu TR, L.J. S (2006). On the Function of Secretion of Extracellular Polymeric Substances by Benthic Diatoms and Their Role in Intertidal Mudflats: A Review of Recent Insights and Views. In: Kromkamp J, de Brouwer JFC, Blanchard G, Forster RM, Créach V (eds). *Functioning of Microphytobenthos in Estuaries*. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences: Amsterdam. pp 45-61.
- De Crignis M (2010). Déterminisme De La Production Bactérienne Dans Les Vasières Intertidales Du Bassin De Marennes-Oléron Rôle Des Exopolysaccharides.
- De Martino A, Amato A, Bowler C (2009). Mitosis in Diatoms: Rediscovering an Old Model for Cell Division. *BioEssays* **31**: 874-884.

- Deblois CP, Marchand A, Juneau P (2013). Comparison of Photoacclimation in Twelve Freshwater Photoautotrophs (Chlorophyte, Bacillariophyte, Cryptophyte and Cyanophyte) Isolated from a Natural Community. *PLoS ONE* **8**.
- Decho AW (1990). Microbial Exopolymer Secretions in Ocean Environments: Their Role (S) in Food Webs and Marine Processes. *Oceanogr Mar Biol Annu Rev* **28**: 73-153.
- Degré D, Leguerrier D, Armynot du Chatelet E, Rzeznik J, Auguet JC, Dupuy C *et al* (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.
- Deloffre J, Lafite R, Lesueur P, Verney R, Lesourd S, Cuvilliez A *et al* (2006). Controlling Factors of Rhythmic Sedimentation Processes on an Intertidal Estuarine Mudflat — Role of the Turbidity Maximum in the Macrotidal Seine Estuary, France. *Marine Geology* **235**: 151-164.
- Deloffre J, Verney R, Lafite R, Lesueur P, Lesourd S, Cundy AB (2007). Sedimentation on Intertidal Mudflats in the Lower Part of Macrotidal Estuaries: Sedimentation Rhythms and Their Preservation. *Marine Geology* **241**: 19-32.
- Depauw FA, Rogato A, d'Alcala MR, Falciatore A (2012). Exploring the Molecular Basis of Responses to Light in Marine Diatoms. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1575-1591.
- Dijkman NA, Kromkamp JC (2006). Photosynthetic Characteristics of the Phytoplankton in the Scheldt Estuary: Community and Single-Cell Fluorescence Measurements. *European Journal of Phycology* **41**: 425-434.
- Dimier C, Corato F, Tramontano F, Brunet C (2007). Photoprotection and Xanthophyll-Cycle Activity in Three Marine Diatoms1. *Journal of Phycology* **43**: 937-947.
- Dimier C, Giovanni S, Ferdinando T, Brunet C (2009). Comparative Ecophysiology of the Xanthophyll Cycle in Six Marine Phytoplanktonic Species. *Protist* **160**: 397-411.
- Drum R, Hopkins J (1966). Diatom Locomotion: An Explanation. *Protoplasma* **62**: 1-33.
- Du GY, Oak JH, Li H, Chung IK (2010a). Effect of Light and Sediment Grain Size on the Vertical Migration of Benthic Diatoms. *Algae* **25**: 133-140.
- Du GY, Son M, An S, Chung IK (2010b). Temporal Variation in the Vertical Distribution of Microphytobenthos in Intertidal Flats of the Nakdong River Estuary, Korea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **86**: 62-70.
- Du GY, Li WT, Li H, Chung IK (2012). Migratory Responses of Benthic Diatoms to Light and Temperature Monitored by Chlorophyll Fluorescence. *Journal of Plant Biology* **55**: 159-164.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers Pt, Smith F (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical chemistry* **28**: 350-356.
- Dyer KR, Christie MC, Wright EW (2000). The Classification of Intertidal Mudflats. *Continental Shelf Research* **20**: 1039-1060.
- Easley JT, Hymel SN, Plante CJ (2005). Temporal Patterns of Benthic Microalgal Migration on a Semi-Protected Beach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **64**: 486-496.
- Eaton JW, Moss B (1966). The Estimation of Numbers and Pigment Content in Epipelagic Algal Populations. *Limnology and Oceanography* **11**: 584-595.
- Eberhard S, Finazzi G, Wollman F-A (2008). The Dynamics of Photosynthesis. *Annual Review of Genetics* **42**: 463-515.
- Edgar LA (1983). Mucilage Secretions of Moving Diatoms. *Protoplasma* **118**: 44-48.
- Edwards KF, Litchman E, Klausmeier CA (2013). Functional Traits Explain Phytoplankton Community Structure and Seasonal Dynamics in a Marine Ecosystem. *Ecology Letters* **16**: 56-63.
- Eilers PHC, Peeters JCH (1988). A Model for the Relationship between Light Intensity and the Rate of Photosynthesis in Phytoplankton. *Ecological Modelling* **42**: 199-215.
- Falciatore A, d'Alcala MR, Croot P, Bowler C (2000). Perception of Environmental Signals by a Marine Diatom. *Science* **288**: 2363-2366.
- Farineau J, Morot-Gaudry J-F (2006). *La Photosynthèse: Processus Physiques, Moléculaires Et Physiologiques*. Editions Quae.
- Fischer H, Gröning C, Köster C (1977). Vertical Migration Rhythm in Freshwater Diatoms. *Hydrobiologia* **56**: 259-263.
- Frossard JM, van Bogaert O, douce FmPlnPpléde (1999). *Ramsar 1999: Septième Session De La Conférence Des Parties Contractantes À La Convention Sur Les Zones Humides (Ramsar, Iran, 1971) : San José, Costa Rica, 10-18 Mai 1999*. WWF International.
- Furukawa T, Watanabe M, Shihira-Ishikawa I (1998). Green- and Blue-Light-Mediated Chloroplast Migration in the Centric Diatom *Pleurosira laevis*. *Protoplasma* **203**: 214-220.

- 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.
- Gerdol V, Hughes RG (1994). Effect of *Corophium Volutator* on the Abundance of Benthic Diatoms, Bacteria and Sediment Stability in Two Estuaries in Southeastern England. *Marine Ecology Progress Series* **114**: 109-116.
- Gillard J, Devos V, Huysman MJ, De Veylder L, D'hondt S, Martens C *et al* (2008). Physiological and Transcriptomic Evidence for a Close Coupling between Chloroplast Ontogeny and Cell Cycle Progression in the Pennate Diatom *Seminavis Robusta*. *Plant Physiology* **148**: 1394-1411.
- Goldfinch A, Carman K (2000). Chironomid Grazing on Benthic Microalgae in a Louisiana Salt Marsh. *Estuaries and Coasts* **23**: 536-547.
- Goss R, Jakob T (2010). Regulation and Function of Xanthophyll Cycle-Dependent Photoprotection in Algae. *Photosynthesis Research* **106**: 103-122.
- 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.
- Gottschalk S, Kahlert M (2012). Shifts in Taxonomical and Guild Composition of Littoral Diatom Assemblages Along Environmental Gradients. *Hydrobiologia* **694**: 41-56.
- Gouleau D, Jouanneau JM, Weber O, Sauriau PG (2000). Short- and Long-Term Sedimentation on Montportail-Brouage Intertidal Mudflat, Marennes-Oléron Bay (France). *Continental Shelf Research* **20**: 1513-1530.
- Guarini J-M, Blanchard G, Bacher C, Gros P, Riera P, Richard P *et al* (1998). Dynamics of Spatial Patterns of Microphytobenthic Biomass: Inferences from a Geostatistical Analysis of Two Comprehensive Surveys in Marennes-Oléron Bay (France). *Marine Ecology Progress Series* **166**: 131-141.
- Guarini J-M, 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 J-M, Gros P, Blanchard G, Richard P, Fillon A (2004). Benthic Contribution to Pelagic Microalgal Communities in Two Semi-Enclosed, European-Type Littoral Ecosystems (Marennes-Oléron Bay and Aiguillon Bay, France). *Journal of Sea Research* **52**: 241-258.
- Guarini J-M, Blanchard G, Richard P (2006). Modelling the Dynamics of the Microphytobenthic Biomass and Primary Production in European Intertidal Mudflats. In: Kromkamp J, de Brouwer JFC, Blanchard G, Forster RM, Créach V (eds). *Functioning of Microphytobenthos in Estuaries*. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences: Amsterdam. pp 187-226.
- Guarini JM, Sari N, Moritz C (2008). Modelling the Dynamics of the Microalgal Biomass in Semi-Enclosed Shallow-Water Ecosystems. *Ecological Modelling* **211**: 267-278.
- Hagerthey SE, Defew EC, Paterson DM (2002). Influence of *Corophium Volutator* and *Hydrobia Ulvae* on Intertidal Benthic Diatom Assemblages under Different Nutrient and Temperature Regimes. *Marine Ecology Progress Series* **245**: 47-59.
- Hancke K, Glud RN (2004). Temperature Effects on Respiration and Photosynthesis in Three Diatom-Dominated Benthic Communities. *Aquatic Microbial Ecology* **37**: 265-281.
- Happéy-Wood CM, Jones P (1988). Rhythms of Vertical Migration and Motility in Intertidal Benthic Diatoms with Particular Reference to *Pleurosigma Angulatum*. *Diatom Research* **3**: 83-93.
- Harley MB (1953). The Feeding Habits of *Nereis Diversicolor* (O. F. Müller). *The British Journal of Animal Behaviour* **1**: 88.
- Harper MA (1969). Movement and Migration of Diatoms on Sand Grains. *British Phycological Journal* **4**: 97-103.
- Hasle GR, Von Stosch H, Syvertsen EE (1983). *Cymatosiraceae*, a New Diatom Family. *Bacillaria* **6**: 9-156.
- Haubois AG, Guarini JM, Richard P, Blanchard GF, Sauriau PG (2002). Spatio-Temporal Differentiation in the Population Structure of *Hydrobia Ulvae* on an Intertidal Mudflat (Marennes-Oléron Bay, France). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **82**: 605-614.
- 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 and Shelf Science* **64**: 385-394.
- Haure J, Sauriau P, Baud J (1996). Effets Du Vent Sur La Remise En Suspension Particulaire En Baie De Bourgneuf: Conséquences Sur La Croissance De *Crassostrea Gigas*. *J Rech Océanogr* **11**: 21-30.

- Heckman CW (1985). The Development of Vertical Migration Patterns in the Sediments of Estuaries as a Strategy for Algae to Resist Drift with Tidal Currents. *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie* **70**: 151-164.
- Herlory O, Guarini J-M, 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.
- Herlory O, Blanchard GF, Planche S, Huet V, Richard P (2005). Does the Size of the Microphytobenthic Biofilm on Intertidal Mudflats Depend on the Available Photosynthetic Biomass? *Marine Ecology Progress Series* **298**: 95-100.
- Herlory O, Richard P, Blanchard G (2007). Methodology of Light Response Curves: Application of Chlorophyll Fluorescence to Microphytobenthic Biofilms. *Marine Biology* **153**: 91-101.
- Hillebrand C, Durselen CD, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T (1999). Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *Journal of Phycology* **35**: 403-424.
- Honeywill C, Paterson D, Hagerthey S (2002). Determination of Microphytobenthic Biomass Using Pulse-Amplitude Modulated Minimum Fluorescence. *European Journal of Phycology* **37**: 485-492.
- Hopkins JT (1966). The Role of Water in the Behaviour of an Estuarine Mud-Flat Diatom. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **46**: 617-626.
- Huisman J, Johansson AM, Folmer EO, Weissing FJ (2001). Towards a Solution of the Plankton Paradox: The Importance of Physiology and Life History. *Ecology Letters* **4**: 408-411.
- Huysman MJJ, Martens C, Vandepoele K, Gillard J, Rayko E, Heijde M *et al* (2010). Genome-Wide Analysis of the Diatom Cell Cycle Unveils a Novel Type of Cyclins Involved in Environmental Signaling. *Genome Biology* **11**.
- Huysman MJJ, Fortunato AE, Matthijs M, Costa BS, Vanderhaeghen R, van den Daele H *et al* (2013). Aureochrome1a-Mediated Induction of the Diatom-Specific Cyclin Dscyc2 Controls the Onset of Cell Division in Diatoms (*Phaeodactylum Tricornutum*). *Plant Cell* **25**: 215-228.
- Ihaka R, Gentleman R (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of computational and graphical statistics* **5**: 299-314.
- Jackson AE, Ayer SW, Laycock MV (1992). The Effect of Salinity on Growth and Amino Acid Composition in the Marine Diatom *Nitzschia Pungens*. *Can J Bot* **70**: 2198-2201.
- Jakob T, Goss R, Wilhelm C (1999). Activation of Diadinoxanthin De-Epoxidase Due to a Chlororespiratory Proton Gradient in the Dark in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Plant Biology* **1**: 76-82.
- Janknegt PJ, Van De Poll WH, Visser RJ, Rijstenbil JW, Buma AG (2008). Oxidative Stress Responses in the Marine Antarctic Diatom *Chaetoceros Brevis* (Bacillariophyceae) During Photoacclimation1. *Journal of Phycology* **44**: 957-966.
- Jeffrey SW, Humphrey GR (1975). New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, B, C1 and C2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem Physiol Pflanzen Bd* **167**: 191-194.
- 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.
- Jesus B, Perkins RG, Consalvey MC, Brotas V, Paterson DM (2006a). Effects of Vertical Migration by Benthic Microalgae on Fluorescence Measurements of Photophysiology. *Marine Ecology Progress Series* **315**: 55-66.
- Jesus B, Perkins RG, Mendes CR, Brotas V, Paterson DM (2006b). Chlorophyll Fluorescence as a Proxy for Microphytobenthic Biomass: Alternatives to the Current Methodology. *Marine Biology* **150**: 17-28.
- Jesus B, Brotas V, Ribeiro L, Mendes CR, Cartaxana P, Paterson DM (2009). Adaptations of Microphytobenthos Assemblages to Sediment Type and Tidal Position. *Continental Shelf Research* **29**: 1624-1634.
- Jordan L, McMinn A, Thompson P (2010). Diurnal Changes of Photoadaptive Pigments in Microphytobenthos. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* **90**: 1025-1032.
- Jørgensen E, Pedersen AR (1998). How to Obtain Those Nasty Standard Errors from Transformed Data - and Why They Should Not Be Used. In: 7 BRU-Ir (ed). Danish Institute of Agricultural Sciences. p 20.
- Kaftan D, Meszaros T, Whitmarsh J, Nedbal L (1999). Characterization of Photosystem II Activity and Heterogeneity During the Cell Cycle of the Green Alga *Scenedesmus Quadricauda*. *Plant Physiology* **120**: 433-442.
- Key T, McCarthy A, Campbell DA, Six C, Roy S, Finkel ZV (2010). Cell Size Trade-Offs Govern Light Exploitation Strategies in Marine Phytoplankton. *Environmental Microbiology* **12**: 95-104.
- Kingston M (1999a). Wave Effects on the Vertical Migration of Two Benthic Microalgae: *Hantzschia Virgata* Var. *Intermedia* and *Euglena Proxima*. *Estuaries and Coasts* **22**: 81-91.
- Kingston MB (1999b). Effect of Light on Vertical Migration and Photosynthesis of *Euglena Proxima* (Euglenophyta). *Journal of Phycology* **35**: 245-253.

- Kingston MB (2002). Effect of Subsurface Nutrient Supplies on the Vertical Migration of *Euglena Proxima* (Euglenophyta). *Journal of Phycology* **38**: 872-880.
- Kingston MB, Gough JS (2009). Vertical Migration of a Mixed-Species *Euglena* (Euglenophyta) Assemblage Inhabiting the High-Intertidal Sands of Nye Beach, Oregon. *Journal of Phycology* **45**: 1021-1029.
- Klein G (1985). Intertidal Flats and Intertidal Sand Bodies. In: Davis R, Jr. (ed). *Coastal Sedimentary Environments*. Springer New York. pp 187-224.
- Koh C-H, Khim JS, Araki H, Yamanishi H, Mogi H, Koga K (2006). Tidal Resuspension of Microphytobenthic Chlorophyll *a* in a Nanaura Mudflat, Saga, Ariake Sea, Japan: Flood-Ebb and Spring-Neap Variations. *Marine Ecology Progress Series* **312**: 85-100.
- Kooistra WHCF, Gersonde R, Medlin LK, Mann DG (2007). The Origin and the Evolution of the Diatoms: Their Adaptation to a Planktonic Existence. In: Falkowski PG, Knoll AH (eds). *Evolution of Primary Producers in the Sea*. Elsevier Academic Press: Burlington. pp 207-249.
- Kooistra WHCF, Forlani G, De Stefano M (2009). Adaptations of Araphid Pennate Diatoms to a Planktonic Existence. *Marine Ecology* **30**: 1-15.
- Kromkamp J, Barranguet C, Peene J (1998). Determination of Microphytobenthos P_{max} Quantum Efficiency and Photosynthetic Activity by Means of Variable Chlorophyll Fluorescence. *Marine Ecology Progress Series* **162**: 45-55.
- Kromkamp J, Forster RM (2006). Developments in Microphytobenthos Primary Productivity Studies. In: Kromkamp J, de Brouwer JFC, Blanchard G, Forster RM, Créach V (eds). *Functioning of Microphytobenthos in Estuaries*. Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences: Amsterdam. pp 9-30.
- Kuhl M, Jorgensen BB (1994). The Light Field of Microbenthic Communities: Radiance Distribution and Microscale Optics of Sandy Coastal Sediments. *Limnology and Oceanography* **39**: 1368-1398.
- Larson CA, Passy SI (2012). Taxonomic and Functional Composition of the Algal Benthos Exhibits Similar Successional Trends in Response to Nutrient Supply and Current Velocity. *FEMS Microbiol Ecol* **80**: 352-360.
- Lavaud J, Rousseau B, van Gorkom H, Etienne A-L (2002a). Influence of the Diadinoxanthin Pool Size on Photoprotection in the Marine Planktonic Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Plant Physiology* **129**: 1398-1406.
- Lavaud J, Van Gorkom HJ, Etienne AL (2002b). Photosystem II Electron Transfer Cycle and Chlororespiration in Planktonic Diatoms. *Photosynthesis Research* **74**: 51-59.
- Lavaud J, Rousseau B, Etienne AL (2004). General Features of Photoprotection by Energy Dissipation in Planktonic Diatoms (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **40**: 130-137.
- Lavaud J, Kroth P (2006). In Diatoms, the Transthylakoid Proton Gradient Regulates the Photoprotective Non-Photochemical Fluorescence Quenching Beyond Its Control on the Xanthophyll Cycle. *Plant and Cell Physiology* **47**: 1010-1016.
- Lavaud J (2007). Fast Regulation of Photosynthesis in Diatoms: Mechanisms, Evolution and Ecophysiology. *Functional Plant Science and Biotechnology*: 267-287.
- Lavaud J, Strzepek RF, Kroth PG (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.
- Lavaud J, Materna AC, Sturm S, Vugrinec S, Kroth PG (2012). Silencing of the Violaxanthin De-Epoxidase Gene in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Reduces Diatoxanthin Synthesis and Non-Photochemical Quenching. *PLoS ONE* **7**.
- Lavaud J, Lepetit B (2013). An Explanation for the Inter-Species Variability of the Photoprotective Non-Photochemical Chlorophyll Fluorescence Quenching in Diatoms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1827**: 294-302.
- Lavaud J, Goss R (2014). The Peculiar Features of Non-Photochemical Fluorescence Quenching in Diatoms and Brown Algae. In: Demmig-Adams B, Adams WWI, Garab G, Govindjee (eds). *Non-Photochemical Fluorescence Quenching and Energy Dissipation in Plants, Algae, and Cyanobacteria*. Springer: Dordrecht. p In press.
- Lavaud JÉA-LUPeMC (2002). Stratégies D'adaptation Des Diatomées Phytoplanctoniques Aux Variations De L'intensité Lumineuse Rencontrées Dans Leur Environnement Naturel, [s.n.], [S.I.].
- Le Hir P, Monbet Y, Orvain F (2007). Sediment Erodability in Sediment Transport Modelling: Can We Account for Biota Effects? *Continental Shelf Research* **27**: 1116-1142.
- Le Rouzic B (2012). Changes in Photosynthetic Yield (Fv/Fm) Responses of Salt-Marsh Microalgal Communities Along an Osmotic Gradient (Mont-Saint-Michel Bay, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **115**: 326-333.
- Lefebvre S, Mouget JL, Lavaud J (2011). Duration of Rapid Light Curves for Determining the Photosynthetic Activity of Microphytobenthos Biofilm in Situ. *Aquatic Botany* **95**: 1-8.

- Leguerrier D, Niquil N, Boileau N, Rzeznik J, Sauriau PG, Le Moine O *et al* (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.
- Lepetit B, Volke D, Gilbert M, Wilhelm C, Goss R (2010). Evidence for the Existence of One Antenna-Associated, Lipid-Dissolved and Two Protein-Bound Pools of Diadinoxanthin Cycle Pigments in Diatoms. *Plant Physiology* **154**: 1905-1920.
- Lepetit B, Goss R, Jakob T, Wilhelm C (2012). Molecular Dynamics of the Diatom Thylakoid Membrane under Different Light Conditions. *Photosynthesis Research* **111**: 245-257.
- Lepetit B, Sturm S, Rogato A, Gruber A, Sachse M, Falciatore A *et al* (2013). High Light Acclimation in the Secondary Plastids Containing Diatom *Phaeodactylum Tricornutum* Is Triggered by the Redox State of the Plastoquinone Pool. *Plant Physiology* **161**: 853-865.
- Levkov Z (2009). *Amphora Sensu Lato*, vol. 5. Koeltz.
- Leynaert A, Longphuiert SN, An S, Lim JH, Claquin P, Grall J *et al* (2011). Tidal Variability in Benthic Silicic Acid Fluxes and Microphytobenthos Uptake in Intertidal Sediment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **95**: 59-66.
- Litchman E, Klausmeier CA (2008). Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **39**: 615-639.
- Lockhart J (2013). Blue Light Checkpoint: How Blue Light Controls the Onset of Cell Division in Diatoms. *Plant Cell* **25**: 1.
- Lorin J (1968). Contribution À L'étude Des Transits Sédimentaires Dans La Partie Orientale Du Pertuis Breton Et La Baie De L'aiguillon. *Bulletin de l'Institut Géologique du Bassin d'Aquitaine* **5**: 111-139.
- 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.
- MacIntyre H, Geider R, Miller D (1996). Microphytobenthos: The Ecological Role of the "Secret Garden" of Unvegetated, Shallow-Water Marine Habitats. I. Distribution, Abundance and Primary Production. *Estuaries and Coasts* **19**: 186-201.
- Marteil L (1976). La Conchyliculture Française. 2ème Partie. Biologie De L'huître Et De La Moule. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes* **40**: 149-346.
- Martin W, Kowallik K (1999). Annotated English Translation of Mereschkowsky's 1905 Paper 'Über Natur Und Ursprung Der Chromatophoren Impflanzenreiche'. *European Journal of Phycology* **34**: 287-295.
- McFadden GI (2001). Primary and Secondary Endosymbiosis and the Origin of Plastids. *Journal of Phycology* **37**: 951-959.
- McLachlan DH, Brownlee C, Taylor AR, Geider RJ, Underwood GJC (2009). Light-Induced Motile Responses of the Estuarine Benthic Diatoms *Navicula Perminuta* and *Cylindrotheca Closterium* (Bacillariophyceae)1. *Journal of Phycology* **45**: 592-599.
- Méléder V, Barillé L, Rincé Y, Moraçais M, Rosa P, Gaudin P (2005). Spatio-Temporal Changes in Microphytobenthos Structure Analysed by Pigment Composition in a Macrotidal Flat (Bourgneuf Bay, France). *Marine Ecology Progress Series* **297**: 83-99.
- Méléder V, Rincé Y, Barillé L, Gaudin P, Rosa P (2007). Spatiotemporal Changes in Microphytobenthos Assemblages in a Macrotidal Flat (Bourgneuf Bay, France). *Journal of Phycology* **43**: 1177-1190.
- Mercado JM, del Pilar Sánchez-Saavedra M, Correa-Reyes G, Lubián L, Montero O, Figueroa FL (2004). Blue Light Effect on Growth, Light Absorption Characteristics and Photosynthesis of Five Benthic Diatom Strains. *Aquatic Botany* **78**: 265-277.
- Meunier M, Daures F, Girard S (2013). Etat Des Lieux Des Secteurs Pêche Et Aquaculture Et De La Consommation Des Produits Aquatiques. Approche Nationale (France) Et Régionale (Bretagne).
- Meyer AA, Tackx M, Daro N (2000). Xanthophyll Cycling in *Phaeocystis Globosa* and *Thalassiosira* Sp.: A Possible Mechanism for Species Succession. *Journal of Sea Research* **43**: 373-384.
- Migné A, Gévaert F, Créach A, Spilmont N, Chevalier E, Davoult D (2007). Photosynthetic Activity of Intertidal Microphytobenthic Communities During Emersion: In Situ Measurements of Chlorophyll Fluorescence (Pam) and Co 2 Flux (Irga). *Journal of Phycology* **43**: 864-873.
- Mitbavkar S, Anil AC (2004). Vertical Migratory Rhythms of Benthic Diatoms in a Tropical Intertidal Sand Flat: Influence of Irradiance and Tides. *Marine Biology* **145**: 9-20.
- Mitchison JM (1971). *The Biology of the Cell Cycle*. University Press.
- Moorthi S, Berninger U-G (2006). Mixotrophic Nanoflagellates in Coastal Sediments in the Western Baltic Sea. *Aquatic Microbial Ecology* **45**: 79-87.

Morrisey DJ (1988). Differences in Effects of Grazing by Deposit-Feeders *Hydrobia Ulvae* (Pennant) (Gastropoda : Prosobranchia) and *Corophium Arenarium* Crawford (Amphipoda) on Sediment Microalgal Populations. II. Quantitative Effects. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **118**: 43-53.

Mouget J-L, Tremblin G, Morant-Manceau A, Morançais M, Robert J-M (1999). Long-Term Photoacclimation of *Haslea Ostrearia* (Bacillariophyta): Effect of Irradiance on Growth Rates, Pigment Content and Photosynthesis. *European Journal of Phycology* **34**: 109-115.

Mouget JL, Perkins R, Consalvey M, Lefebvre S (2008). Migration or Photoacclimation to Prevent High Irradiance and Uv-B Damage in Marine Microphytobenthic Communities. *Aquatic Microbial Ecology* **52**: 223-232.

Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001). Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. *Plant Physiology* **125**: 1558-1566.

Murchie E, Lawson T (2013). Chlorophyll Fluorescence Analysis: A Guide to Good Practice and Understanding Some New Applications. *Journal of Experimental Botany*.

Muylaert K, Sabbe K, Vyverman W (2009). Changes in Phytoplankton Diversity and Community Composition Along the Salinity Gradient of the Schelde Estuary (Belgium/the Netherlands). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **82**: 335-340.

Natana Murugaraj G, Jeyachandran S (2007). Effect of Salinity Stress on the Marine Diatom *Amphora Coffeaeformis* (Ag.) Kuetz. (Bacillariophyceae) in Relation to Proline Accumulation. *Seaweed Res Utiln* **29**: 227-231.

Nittrouer CA, Raubenheimer B, Wheatcroft RA (2013). Lessons Learned from Comparisons of Mesotidal Sand- and Mudflats. *Continental Shelf Research*.

Niyogi KK (2000). Safety Valves for Photosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 455-460.

Nymark M, Valle KC, Brembu T, Hancke K, Winge P, Andresen K *et al* (2009). An Integrated Analysis of Molecular Acclimation to High Light in the Marine Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *PLoS ONE* **4**: e7743.

Nymark M, Valle KC, Hancke K, Winge P, Andresen K, Johnsen G *et al* (2013). Molecular and Photosynthetic Responses to Prolonged Darkness and Subsequent Acclimation to Re-Illumination in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *PLoS ONE* **8**.

Orvain F, Sauriau P-G, Sygut AI, Joassard L, Hir PL (2004). Interacting Effects of *Hydrobia Ulvae* Bioturbation and Microphytobenthos on the Erodibility of Mudflat Sediments. *Marine Ecology Progress Series* **278**: 205-223.

Orvain F, Sauriau PG, Le Hir P, Guillou G, Cann P, Paillard M (2007). Spatio-Temporal Variations in Intertidal Mudflat Erodability: Marennes-Oléron Bay, Western France. *Continental Shelf Research* **27**: 1153-1173.

Ory P (2010). Interactions Entre Les Virus, Les Flagellés Et Les Bactéries Au Sein Du Réseau Microbien Planctonique Du Bassin De Marennes-Oléron.

Ouisse V (2010). *Production Primaire Et Respiration Des Communautés D'herbiers À Zostères Rôle Dans Le Cycle Du Carbone En Milieu Côtier*. Station biologique de Roscoff: Roscoff.

Palmer JD, Round FE (1965). Persistent, Vertical-Migration Rhythms in Benthic Microflora: I. The Effect of Light and Temperature on the Rhythmic Behaviour of *Euglena Obtusa*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)* **45**: 567-582.

Palmer JD, Round FE (1967). Persistent, Vertical-Migration Rhythms in Benthic Microflora. VI. The Tidal and Diurnal Nature of the Rhythm in the Diatom *Hantzschia Virgata*. *The Biological Bulletin* **132**: 44-55.

Pascal P-Y (2008). *Devenir Des Bactéries Dans Les Réseaux Trophiques Des Vasières Intertidales Le Cas De Brouage (Baie De Marennes-Oléron)*.

Paterson DM (1986). The Migratory Behaviour of Diatom Assemblages in a Laboratory Tidal Micro-Ecosystem Examined by Low Temperature Scanning Electron Microscopy. *Diatom Research* **1**: 227-239.

Paterson DM, Tolhurst TJ, Kelly JA, Honeywill C, De Deckere EMGT, Huet V *et al* (2000). Variations in Sediment Properties, Skeffling Mudflat, Humber Estuary, Uk. *Continental Shelf Research* **20**: 1373-1396.

Paterson DM, Hagerthey SE (2001). Microphytobenthos in Contrasting Coastal Ecosystems: Biology and Dynamics. In: Reise K (ed). *Ecological Comparisons of Sedimentary Shores*. Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. pp 106-125.

Paul JS (1979). Osmoregulation in the Marine Diatom *Cylindrotheca Fusiformis*. *Journal of Phycology* **15**: 280-284.

Peer DL, Linkletter LE, Hicklin PW (1986). Life History and Reproductive Biology of *Corophium Volutator* (Crustacea: Amphipoda) and the Influence of Shorebird Predation on Population Structure in Chignecto Bay, Bay of Fundy, Canada. *Netherlands Journal of Sea Research* **20**: 359-373.

Perkins EJ (1960). The Diurnal Rhythm of the Littoral Diatoms of the River Eden Estuary, Fife. *Journal of Ecology* **48**: 725-728.

Perkins R, Lavaud J, Serodio J, Mouget JL, Cartaxana P, Rosa P *et al* (2010a). Vertical Cell Movement Is the Primary Response of Intertidal Benthic Biofilms to Increasing Light Dose. *Marine Ecology Progress Series* **416**: 93-103.

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.

Perkins RG, Mouget JL, Lefebvre S, Lavaud J (2006). Light Response Curve Methodology and Possible Implications in the Application of Chlorophyll Fluorescence to Benthic Diatoms. *Marine Biology* **149**: 703-712.

Perkins RG, Kromkamp JC, Serôdio J, Lavaud J, Jesus B, Mouget JL *et al* (2010b). The Application of Variable Chlorophyll Fluorescence to Microphytobenthic Biofilms. In: Suggett DJ, Prášil O, Borowitzka MA (eds). *Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications*. Springer Netherlands. pp 237-275.

Peronnet Isabelle TC, Daures Fabienne (2003). Etudes Des Activites De Peche Dans Le Golfe Du Morbihan, Peche Professionnelle.

Petrou K, Doblin MA, Ralph PJ (2011). Heterogeneity in the Photoprotective Capacity of Three Antarctic Diatoms During Short-Term Changes in Salinity and Temperature. *Marine Biology* **158**: 1029-1041.

Pierre G, Graber M, Orvain F, Dupuy C, Maugard T (2010). Biochemical Characterization of Extracellular Polymeric Substances Extracted from an Intertidal Mudflat Using a Cation Exchange Resin. *Biochemical Systematics and Ecology* **38**: 917-923.

Pierre G, Graber M, Rafiliposon BA, Dupuy C, Orvain F, De Crignis M *et al* (2012). Biochemical Composition and Changes of Extracellular Polysaccharides (Ecps) Produced During Microphytobenthic Biofilm Development (Marennes-Oléron, France). *Microbial Ecology* **63**: 157-169.

Pinckney J, Zingmark RG (1991). Effects of Tidal Stage and Sun Angles on Intertidal Benthic Microalgal Productivity. *Marine Ecology Progress Series* **76**: 81-89.

Pinckney J, Piceno Y, Lovell CR (1994). Short-Term Changes in the Vertical Distribution of Benthic Microalgal Biomass in Intertidal Muddy Sediments. *Diatom Research* **9**: 143-153.

Pinckney JL, Zingmark RG (1993). Modelling the Annual Production of Intertidal Benthic Microalgae in Estuarine Ecosystems. *Journal of Phycology* **29**: 396-407.

Pinheiro JC, Bates DM (2000). *Mixed Effects Models in S and S-Plus*. U.S. Government Printing Office.

Ragni M, d'Alcalà MR (2007). Circadian Variability in the Photobiology of *Phaeodactylum Tricornutum*: Pigment Content. *Journal of Plankton Research* **29**: 141-156.

Rasmussen MB, Henriksen K, Jensen A (1983). Possible Causes of Temporal Fluctuations in Primary Production of the Microphytobenthos in the Danish Wadden Sea. *Marine Biology* **73**: 109-114.

Revsbech NP, Ward DM (1984). Microelectrode Studies of Interstitial Water Chemistry and Photosynthetic Activity in a Hot Spring Microbial Mat. *Applied and environmental microbiology* **48**: 270-275.

Rhoads DC, Young DK (1970). Influence of Deposit-Feeding Organisms on Sediment Stability and Community Tropic Structure. *Journal of Marine Research* **28**: 150-178.

Ribeiro L, Brotas V, Rincé Y, Jesus B (2013). Structure and Diversity of Intertidal Benthic Diatom Assemblages in Contrasting Shores: A Case Study from the Tagus Estuary¹. *Journal of Phycology*.

Riera P, Richard P (1996). Isotopic Determination of Food Sources of *Crassostrea Gigas* Along a Trophic Gradient in the Estuarine Bay of Marennes-Oleron. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **42**: 347-360.

Riera P, Stal LJ, Nieuwenhuize J, Richard P, Blanchard G, Gentil F (1999). Determination of Food Sources for Benthic Invertebrates in a Salt Marsh (Aiguillon Bay, France) by Carbon and Nitrogen Stable Isotopes: Importance of Locally Produced Sources. *Marine Ecology Progress Series* **187**: 301-307.

Rijken M (1979). Food and Food Uptake in *Arenicola Marina*. *Netherlands Journal of Sea Research* **13**: 406-421.

Rijstenbil JW (2003). Effects of Uvb Radiation and Salt Stress on Growth, Pigments and Antioxidative Defence of the Marine Diatom *Cylindrotheca Closterium*. *Marine Ecology Progress Series* **254**: 37-47.

Rijstenbil JW (2005). Uv- and Salinity-Induced Oxidative Effects in the Marine Diatom *Cylindrotheca Closterium* During Simulated Emersion. *Mar Biol* **147**: 1063-1073.

Roberts K, Granum E, Leegood RC, Raven JA (2007). Carbon Acquisition by Diatoms. *Photosynthesis Research* **93**: 79-88.

Roncarati F, Rijstenbil JW, Pistocchi R (2008). Photosynthetic Performance, Oxidative Damage and Antioxidants in *Cylindrotheca Closterium* in Response to High Irradiance, Uvb Irradiance and Salinity. *Marine Biology* **153**: 965-973.

Round FE (1953). An Investigation of Two Benthic Algal Communities in Malham Tarn, Yorkshire. *Journal of Ecology* **41**: 174-197.

- Round FE (1965). The Epipsammon; a Relatively Unknown Freshwater Algal Association. *British Phycological Bulletin* **2**: 456-462.
- Round FE, Happey CM (1965). Persistent, Vertical-Migration Rhythms in Benthic Microflora: Iv. A Diurnal Rhythm of the Epipellic Diatom Association in Non-Tidal Flowing Water. *British Phycological Bulletin* **2**: 463-471.
- Round FE, Eaton JW (1966). Persistent, Vertical-Migration Rhythms in Benthic Microflora: Iii. The Rhythm of Epipellic Algae in a Freshwater Pond. *Journal of Ecology* **54**: 609-615.
- Round FE, Palmer JD (1966). Persistent, Vertical-Migration Rhythms in Benthic Microflora: Ii. Field and Laboratory Studies on Diatoms from the Banks of the River Avon. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom (New Series)* **46**: 191-214.
- Round FE (1979). A Diatom Assemblage Living Below the Surface of Intertidal Sand Flats. *Marine Biology* **54**: 219-223.
- Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990). *The Diatoms: The Biology and Morphology of the Genera*. Cambridge University Press.
- Rzeznik-Orignac J, Fichet D, Boucher G (2003). Spatio-Temporal Structure of the Nematode Assemblages of the Brouage Mudflat (Marennes Oléron, France). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **58**: 77-88.
- Sabbe K (1993). Short-Term Fluctuations in Benthic Diatom Numbers on an Intertidal Sandflat in the Westerschelde Estuary (Zeeland, the Netherlands). *Hydrobiologia* **269-270**: 275-284.
- Sabbe K, Witkowski A, Vyverman W (1995). Taxonomy, Morphology and Ecology of *Biremis Lucens* Comb. Nov. (Bacillariophyta) : A Brackish-Marine, Benthic Diatom Species Comprising Different Morphological Types. *Botanica Marina* **38**: 379-391.
- Sabbe K, Vanelslander B, Ribeiro L, Witkowski A, Muylaert K, Vyverman W (2010). A New Genus, *Pierrecomperia* Gen. Nov., a New Species and Two New Combinations in the Marine Diatom Family *Cymatosiraceae*. *Vie et Milieu* **60**: 243-256.
- Saburova M, Polikarpov I, Burkovsky I (1995). Spatial Structure of an Intertidal Sandflat Microphytobenthic Community as Related to Different Spatial Scales. *Marine Ecology Progress Series* **129**: 229-239.
- Saburova MA, Polikarpov IG (2003). Diatom Activity within Soft Sediments: Behavioural and Physiological Processes. *Marine Ecology Progress Series* **251**: 115-126.
- Saint-Béat B (2012). Modélisation Du Rôle Du Biofilm Dans Le Fonctionnement Du Réseau Trophique De La Vasière De Brouage (Bassin De Marennes – Oléron) : Influence Sur Les Flux De Carbone Et Conséquences Sur La Stabilité Université de La Rochelle, La Rochelle.
- Salleh S, McMinn A (2011). The Effects of Temperature on Th Photosynthetic Parameters and Recovery of Two Temperate Benthic Microalgae, *Amphora* Cf. *Coffeaeformis* and *Cocconeis* Cf. *Sublittoralis* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology* **47**: 1413-1424.
- Sauer J, Wenderoth K, Maier UG, Rhiel E (2002). Effects of Salinity, Light and Time on the Vertical Migration of Diatom Assemblages. *Diatom Research* **17**: 189-203.
- Sauriau PG, Mouret V, Rince JP (1989). Trophic System of Wild Soft-Bottom Molluscs in the Marennes-Oleron Oyster-Farming Bay. *Organisation trophique de la malacofaune benthique non cultivée du bassin ostréicole de Marennes-Oleron* **12**: 193-204.
- Schellenberger Costa B, Jungandreas A, Jakob T, Weisheit W, Mittag M, Wilhelm C (2013a). Blue Light Is Essential for High Light Acclimation and Photoprotection in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Journal of Experimental Botany* **64**: 483-493.
- Schellenberger Costa B, Sachse M, Jungandreas A, Bartulos CR, Gruber A, Jakob T *et al* (2013b). Aureochrome 1a Is Involved in the Photoacclimation of the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *PLoS ONE* **8**: e74451.
- Scholz B, Liebezeit G (2012a). Growth Responses of 25 Benthic Marine Wadden Sea Diatoms Isolated from the Solthörn Tidal Flat (Southern North Sea) in Relation to Varying Culture Conditions. *Diatom Research* **27**: 65-73.
- Scholz B, Liebezeit G (2012b). Microphytobenthic Dynamics in a Wadden Sea Intertidal Flat - Part I: Seasonal and Spatial Variation of Diatom Communities in Relation to Macronutrient Supply. *European Journal of Phycology* **47**: 105-119.
- Schumann A, Goss R, Jakob T, Wilhelm C (2007). Investigation of the Quenching Efficiency of Diatoxanthin in Cells of *Phaeodactylum Tricornutum* (Bacillariophyceae) with Different Pool Sizes of Xanthophyll Cycle Pigments. *Phycologia* **46**: 113-117.
- Schwaderer AS, Yoshiyama K, De Tezanos Pinto P, Swenson NG, Klausmeier CA, Litchman E (2011). Eco-Evolutionary Differences in Light Utilization Traits and Distributions of Freshwater Phytoplankton. *Limnology and Oceanography* **56**: 589-598.
- Serôdio J, Marques da Silva J, Catarino F (1997). Nondestructive Tracing of Migratory Rhythms of Intertidal Benthic Microalgae Using in Vivo Chlorophyll a Fluorescence^{1,2}. *Journal of Phycology* **33**: 542-553.

- Serôdio J, Catarino F (2000). Modelling the Primary Productivity of Intertidal Microphytobenthos: Time Scales of Variability and Effects of Migratory Rhythms. *Marine Ecology Progress Series* **192**: 13-30.
- Serôdio J, Silva JMd, Catarino F (2001). Use of in Vivo Chlorophyll a Fluorescence to Quantify Short-Term Variations in the Productive Biomass of Intertidal Microphytobenthos. *Marine Ecology Progress Series* **218**: 45-61.
- Serôdio J, Cruz S, Vieira S, Brotas V (2005a). Non-Photochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence and Operation of the Xanthophyll Cycle in Estuarine Microphytobenthos. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **326**: 157-169.
- Serôdio J, Vieira S, Cruz S, Barroso F (2005b). Short-Term Variability in the Photosynthetic Activity of Microphytobenthos as Detected by Measuring Rapid Light Curves Using Variable Fluorescence. *Marine Biology* **146**: 903-914.
- Serôdio J, Coelho H, Vieira S, Cruz S (2006a). Microphytobenthos Vertical Migratory Photoresponse as Characterised by Light-Response Curves of Surface Biomass. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **68**: 547-556.
- Serôdio J, Vieira S, Cruz S, Coelho H (2006b). Rapid Light-Response Curves of Chlorophyll Fluorescence in Microalgae: Relationship to Steady-State Light Curves and Non-Photochemical Quenching in Benthic Diatom-Dominated Assemblages. *Photosynthesis Research* **90**: 29-43.
- Serôdio J, Vieira S, Barroso F (2007). Relationship of Variable Chlorophyll Fluorescence Indices to Photosynthetic Rates in Microphytobenthos. *Aquatic Microbial Ecology* **49**: 71-85.
- Serôdio J, Vieira S, Cruz S (2008). Photosynthetic Activity, Photoprotection and Photoinhibition in Intertidal Microphytobenthos as Studied in Situ Using Variable Chlorophyll Fluorescence. *Continental Shelf Research* **28**: 1363-1375.
- Serôdio J, Lavaud J (2011). A Model for Describing the Light Response of the Nonphotochemical Quenching of Chlorophyll Fluorescence. *Photosynthesis Research* **108**: 61-76.
- Serôdio J, Ezequiel J, Barnett A, Mouget JL, Meléder V, Laviale M *et al* (2012). Efficiency of Photoprotection in Microphytobenthos: Role of Vertical Migration and the Xanthophyll Cycle against Photoinhibition. *Aquatic Microbial Ecology* **67**: 161-175.
- Serôdio J, Ezequiel J, Frommlet J, Laviale M, Lavaud J (2013). A Method for the Rapid Generation of Non-Sequential Light-Response Curves of Chlorophyll Fluorescence. *Plant Physiology*: pp. 113.225243.
- 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 (2000). Oxygenic Photosynthesis as Driving Process in Exopolysaccharide Production of Benthic Diatoms. *Marine Ecology Progress Series* **193**: 261-269.
- Steele JH, Thorpe SA, Turekian KK (2010). *Marine Ecological Processes: A Derivative of the Encyclopedia of Ocean Sciences*. Access Online via Elsevier.
- Strzepak RF, Harrison PJ (2004). Photosynthetic Architecture Differs in Coastal and Oceanic Diatoms. *Nature* **431**: 689-692.
- Sundbäck K (1984). Distribution of Microbenthic Chlorophyll-a and Diatom Species Related to Sediment Characteristics. *Ophelia, suppl* **3**: 229-246.
- Sundbäck K, Nilsson P, Nilsson C, Jönsson B (1996). Balance between Autotrophic and Heterotrophic Components and Processes in Microbenthic Communities of Sandy Sediments: A Field Study. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **43**: 689-706.
- Takahashi E, Ledauphin J, Goux D, Orvain F (2010). 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.
- Takahashi F, Yamagata D, Ishikawa M, Fukamatsu Y, Ogura Y, Kasahara M *et al* (2007). Aureochrome, a Photoreceptor Required for Photomorphogenesis in Stramenopiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 19625-19630.
- Thessen AE, Dortch Q, Parsons ML, Morrison W (2005). Effect of Salinity on Pseudo-Nitzschia Species (Bacillariophyceae) Growth and Distribution. *Journal of Phycology* **41**: 21-29.
- Thornton DCO, Dong LF, Underwood GJC, Nedwell DB (2002). Factors Affecting Microphytobenthic Biomass, Species Composition and Production in the Colne Estuary (Uk). *Aquatic Microbial Ecology* **27**: 285-300.

- Ting CS, Owens TG (1993). Photochemical and Nonphotochemical Fluorescence Quenching Processes in the Diatom *Phaeodactylum Tricornutum*. *Plant Physiology* **101**: 1323-1330.
- Tirichine L, Bowler C (2011). Decoding Algal Genomes: Tracing Back the History of Photosynthetic Life on Earth. *Plant Journal* **66**: 45-57.
- Tortajada S (2011). De L'étude Du Fonctionnement Des Réseaux Trophiques Planctoniques Des Marais De Charente Maritime Vers La Recherche D'indicateurs, Université de La Rochelle.
- Trites M, Kaczmarek I, Ehrman JM, Hicklin PW, Ollerhead J (2005). Diatoms from Two Macro-Tidal Mudflats in Chignecto Bay, Upper Bay of Fundy, New Brunswick, Canada. *Hydrobiologia* **544**: 299-319.
- Tuji A (2000). The Effect of Irradiance on the Growth of Different Forms of Freshwater Diatoms: Implications for Succession in Attached Diatom Communities. *Journal of Phycology* **36**: 659-661.
- Underwood GJC, Smith DJ (1998). Predicting Epipellic Diatom Exopolymer Concentrations in Intertidal Sediments from Sediment Chlorophyll A. *Microbial Ecology* **35**: 116-125.
- Underwood GJC, Kromkamp J (1999). Primary Production by Phytoplankton and Microphytobenthos in Estuaries. In: Nedwell DB, Raffaelli DG (eds). *Advances in Ecological Research*. Academic Press. pp 93-153.
- Underwood GJC, Provot L (2000). Determining the Environmental Preferences of Four Estuarine Epipellic Diatom Taxa: Growth across a Range of Salinity, Nitrate and Ammonium Conditions. *European Journal of Phycology* **35**: 173-182.
- Underwood GJC (2001). Microphytobenthos. In: Editor-in-Chief: John HS (ed). *Encyclopedia of Ocean Sciences*. Academic Press: Oxford. pp 1770-1777.
- Underwood GJC, Paterson DM (2003). The Importance of Extracellular Carbohydrate Production by Marine Epipellic Diatoms. *Advances in Botanical Research* **40**: 183-240.
- 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, Perkins RG, Consalvey MC, Hanlon ARM, Oxborough K, Baker NR *et al* (2005). Patterns in Microphytobenthic Primary Productivity: Species-Specific Variation in Migratory Rhythms and Photosynthetic Efficiency in Mixed-Species Biofilms. *Limnology and Oceanography* **50**: 755-767.
- Úveges V, Vörös L, Padišák J, Kovács AW (2011). Primary Production of Epipsammic Algal Communities in Lake Balaton (Hungary). *Hydrobiologia* **660**: 17-27.
- Van de Poll WH, Janknegt PJ, Van Leeuwe MA, Visser RJ, Buma AG (2009). Excessive Irradiance and Antioxidant Responses of an Antarctic Marine Diatom Exposed to Iron Limitation and to Dynamic Irradiance. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **94**: 32-37.
- 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.
- van Leeuwe MA, Brotas V, Consalvey M, Forster RM, Gillespie D, Jesus B *et al* (2009). Photacclimation in Microphytobenthos and the Role of the Xanthophylls Pigments. *European Journal of Phycology* **43**: 123-132.
- Vergier F, Ghirardi R (2009). *Zones Humides Du Littoral Français: Estuaires, Deltas, Marais Et Lagunes*. Belin.
- Vieira S, Ribeiro L, Jesus B, Cartaxana P, Silva JMd (2013a). Photosynthesis Assessment in Microphytobenthos Using Conventional and Imaging Pulse Amplitude Modulation Fluorometry. *Photochemistry and Photobiology* **89**: 97-102.
- Vieira S, Ribeiro L, Marques da Silva J, Cartaxana P (2013b). Effects of Short-Term Changes in Sediment Temperature on the Photosynthesis of Two Intertidal Microphytobenthos Communities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **119**: 112-118.
- Vos PC, de Wolf H (1993). Diatoms as a Tool for Reconstructing Sedimentary Environments in Coastal Wetlands; Methodological Aspects. *Hydrobiologia* **269-270**: 285-296.
- Wagner H, Jakob T, Wilhelm C (2006). Balancing the Energy Flow from Captured Light to Biomass under Fluctuating Light Conditions. *New Phytologist* **169**: 95-108.
- Waring J, Underwood GJC, Baker NR (2006). Impact of Elevated Uv-B Radiation on Photosynthetic Electron Transport, Primary Productivity and Carbon Allocation in Estuarine Epipellic Diatoms. *Plant, Cell and Environment* **29**: 521-534.
- Waring J, Baker NR, Underwood GJC (2007). Responses of Estuarine Intertidal Microphytobenthic Algal Assemblages to Enhanced Ultraviolet B Radiation. *Global Change Biology* **13**: 1398-1413.
- Waring J, Klenell M, Bechtold U, Underwood GJ, Baker NR (2010). Light-Induced Responses of Oxygen Photoreduction, Reactive Oxygen Species Production and Scavenging in Two Diatom Species. *Journal of Phycology* **46**: 1206-1217.

- Wenderoth K, Rhiel E (2004). Influence of Light Quality and Gassing on the Vertical Migration of Diatoms Inhabiting the Wadden Sea. *Helgoland Marine Research* **58**: 211-215.
- Westermann M, Rhiel E (2005). Localisation of Fucoxanthin Chlorophyll a/C-Binding Polypeptides of the Centric Diatom *Cyclotella Cryptica* by Immuno-Electron Microscopy. *Protoplasma* **225**: 217-223.
- Whelan CJ, Wenny DG, Marquis RJ (2008). Ecosystem Services Provided by Birds. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1134**: 25-60.
- Williams RB (1964). Division Rates of Salt Marsh Diatoms in Relation to Salinity and Cell Size. *Ecology* **45**: 877-880.
- Witkowski A (2000). Diatom Flora of Marine Coasts I. *Iconographia diatomologica* **7**: 1-925.
- Wu H, Roy S, Alami M, Green BR, Campbell DA (2012). Photosystem II Photoinactivation, Repair, and Protection in Marine Centric Diatoms. *Plant Physiology* **160**: 464-476.
- Yun SM, Lee SH, Chung IK (2010). Photosynthetic Activity of Benthic Diatoms in Response to Different Temperatures. *Journal of Applied Phycology* **22**: 559-562.
- Zhu SH, Green BR (2010). Photoprotection in the Diatom *Thalassiosira pseudonana*: Role of L1818-Like Proteins in Response to High Light Stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1797**: 1449-1457.
- Zurzolo C, Bowler C (2001). Exploring Bioinorganic Pattern Formation in Diatoms. A Story of Polarized Trafficking. *Plant Physiology* **127**: 1339-1345.

Annexes

Partie 5A : Philippe Juneau, Alexandre Barnett, Vona Méléder, Christine Dupuy and Johann Lavaud (in prep.). Combined effect of excess light and salinity on the regulation of photosynthesis in three diatom species belonging to intertidal microphytobenthos

I. Introduction

Estuarine intertidal flats belong to the most productive ecosystems on Earth (MacIntyre *et al.*, 1996, Underwood et Kromkamp, 1999) and they have a central role in structuring the food-web of coastal areas as a whole (Kromkamp et Forster, 2006). A large part of the strong productivity of intertidal flats is due to the microphytobenthos (MPB) (Admiraal, 1984, MacIntyre *et al.*, 1996, Underwood et Kromkamp, 1999) which in temperate seas is mainly dominated by benthic diatoms (Méléder *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2013). Benthic and planktonic diatoms are essential primary producers which contribute to about 40% of the marine primary production; they also play a major role in the silica and nitrogen biogeochemical cycles (Armbrust, 2009). The MPB diatoms constitute the bulk of the diatom diversity (Kooistra *et al.*, 2007). They can be divided in three main growth forms which mainly differ in their life in the sediment (Kooistra *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2013): i) the epipelon comprises motile species free-living in between sediment particles (Herlory *et al.*, 2004), ii) the epipsammon which lives attached to sediment particles, and iii) the tychoplankton which presumably have an amphibious life style (i.e. both sediment and water column) (e.g. (Sabbe *et al.*, 2010)). Epipelon and epipsammon growth forms show distinct distribution among intertidal habitats characterised by different types of sediment (Sabbe, 1993, Méléder *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2013). Epipelon dominates cohesive muddy sediments (> 90% of MPB; (Haubois *et al.*, 2005) while epipsammon dominates less cohesive sandy sediments (> 95% of MPB; (Méléder *et al.*, 2007)). Because of different habitats, epipelon and epipsammon have evolved different ways of coping with their intertidal environment. Epipelon displays vertical ‘micromigration’ following endogenous tidal/dial rhythms and environmental stimuli (Saburova et Polikarpov, 2003, Consalvey *et al.*, 2004b, Coelho *et al.*, 2011): typically, during daylight emersion, they move to the sediment surface and form a dense biofilm, while during immersion they migrate downward. Epipsammon lives more or less firmly attached (stalked or adnate forms) to individual sand grains including some species able to exert micro-movements within the sphere of grains. Tychoplankton (which is sometimes considered as resuspended epipelon during immersion, (MacIntyre *et al.*, 1996)) can live either as part of MPB or of phytoplankton, depending on the hydrodynamics

(Koh *et al.*, 2006); it can contribute to up to one third of phytoplankton (Guarini *et al.*, 2004, Brito *et al.*, 2012).

Environmental cues can rapidly vary to an extreme in intertidal flats (Admiraal, 1984, Paterson et Hagerthey, 2001) and impair the photosynthetic productivity of MPB diatoms (i.e. photoinhibition) (Blanchard *et al.*, 2004, Serôdio *et al.*, 2008). In order to prevent such situation, benthic diatoms have evolved diverse responses that can be distinguished in two main types: behaviour and physiology. Only epipelon can escape from a combination of sometimes harsh environmental conditions at the surface of the sediment by migrating downward to the most optimal conditions (i.e. the so-called ‘behavioural photoprotection’; (Admiraal, 1984, Kromkamp *et al.*, 1998, Consalvey *et al.*, 2004b, Serôdio *et al.*, 2006a), especially as regards to salinity (Sauer *et al.*, 2002). In contrast, all growth forms use physiological processes for the fast regulation of photochemistry (i.e. ‘physiological photoprotection’; (Lavaud *et al.*, 2007, Goss et Jakob, 2010, Depauw *et al.*, 2012, Lepetit *et al.*, 2012). In diatoms, two physiological processes are important in field situation (Brunet et Lavaud, 2010, Lavaud et Goss, 2014): i) the non-photochemical quenching of chlorophyll (Chl) fluorescence (NPQ) (Depauw *et al.*, 2012, Lepetit *et al.*, 2012, Lavaud et Goss, 2014), and ii) the partly related light-dependent conversion of diadinoxanthin (DD) to diatoxanthin (DT) by the DD de-epoxidase (i.e. the ‘xanthophyll cycle’, XC) (Brunet et Lavaud, 2010, Goss et Jakob, 2010). In benthic diatoms, NPQ-XC has been scarcely studied *in situ*: it varies with the diurnal and tidal cycles, season, latitude (Serôdio *et al.*, 2005a, van Leeuwe *et al.*, 2009, Chevalier *et al.*, 2010, Serôdio *et al.*, 2012), to position within the sediment and along the intertidal elevation gradient (Jesus *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011). The respective importance of behavioural and physiological responses in epipelon has received a major interest (Mouget *et al.*, 2008, van Leeuwe *et al.*, 2009, Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011, Serôdio *et al.*, 2012). These studies have shown that although micro-migration is essential for an optimal response to the changes in environmental cues, NPQ and XC remain important features, and even compensate for micro-migration under conditions where motility is limited, to finely tune photosynthetic efficiency. Also, a recent analysis of NPQ and XC abilities among the growth forms of MPB diatoms has revealed a clear relationship between growth form and capacity for physiological photoprotection (Barnett *et al.*, Submitted), i.e. while epipsammon showed the highest NPQ-XC, epipelon and tychoplankton showed the lowest NPQ-XC reflecting their respective motility and adaptation to a low light environment

(i.e. tychoplankton is either buried in sediment or resuspended in a turbid water column, (Roncarati *et al.*, 2008).

Changes in light intensity and temperature are often considered as the two major forcings of the photosynthetic productivity of MPB diatoms (Guarini *et al.*, 2006). Surprisingly, changes in salinity have been less studied in benthic diatoms while it is known to induce modification of community species diversity (Thessen *et al.*, 2005, Dijkman et Kromkamp, 2006, Muylaert *et al.*, 2009, Petrou *et al.*, 2011), and of growth and photosynthesis in planktonic diatoms (Thessen *et al.*, 2005, Dijkman et Kromkamp, 2006, Petrou *et al.*, 2011). Salinity often covaries with other environmental gradients like light and temperature in the case of high salinities (due to pore-water evaporation in the upper-layer of the sediment) and with nutrient concentrations in the case of low salinities (due to the discharge of estuarine rivers) (Admiraal et Peletier, 1980, Underwood et Provot, 2000, Thornton *et al.*, 2002). Although earlier works stated that MPB diatoms are highly tolerant to a wide range of salinity changes (Williams, 1964, Admiraal, 1977, Admiraal et Peletier, 1980), further studies have shown that changes of salinity, often combined with excess light, impairs the growth from 40 ‰ and above (Natana Murugaraj et Jeyachandran, 2007, Scholz et Liebezeit, 2012a), it reduces the photosynthetic performance (Roncarati *et al.*, 2008, Le Rouzic, 2012) via (photo-)oxidative stress (Rijstenbil, 2003, Rijstenbil, 2005, Roncarati *et al.*, 2008), and it can modify the motility of epipellic diatoms in the sediment (Sauer *et al.*, 2002) via changes in the excretion of exopolysaccharides (Apoya-Horton *et al.*, 2006). Furthermore, although the different growth forms of MPB diatoms pertain to habitats in which the salinity can differentially vary due to the degree of cohesion of sediment (Paterson et Hagerthey, 2001), to our knowledge, no study explored if they show different photophysiological response to a combine excess light-salinity stress and if it correlates to their habitat-associated growth form. The objectives of the present study was to determine i) if a higher salinity can increase the negative effect of excess light on the photosynthetic efficiency, ii) if three representatives belonging to each of the growth forms of MPB diatoms react differently to a combined high light-salinity stress.

II. Materials and methods

Culture conditions

Three species belonging to the three main growth forms of MPB diatoms were used: 1) Epipelon, *Navicula phyllepta* (Culture Collection Yerseke-The Netherlands CCY9804, isolated in the Westerschelde estuary, North sea, The Netherlands); 2) Epipsammon, *Biremis lucens* (Nantes Culture Collection-France NCC360, isolated in the bay of Bourgneuf, Atlantic, France); 3) Tychoplankton, *Plagiogrammopsis vanheurckii* (NCC186-2, isolated in the bay of Bourgneuf). Cultures were grown in batch sterile artificial seawater F/2 medium enriched with NaHCO_3 (80 mg L^{-1} final concentration) at 20°C under an illumination of 60 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a salinity of 33 ‰ with a 16 h:8 h light:dark photoperiod. When cultures reached exponential phase, Cells were harvested during their exponential phase of growth by gentle centrifugation (5 min, 4000 g), resuspended to a chlorophyll concentration of $6 \pm 1 \text{ mg Chl } a \text{ mL}^{-1}$, and continuously stirred under the growth conditions before the high light and salinity treatments.

Excess light and salinity treatments

Diatom cells were exposed in Erlenmeyers for 1 h to a range of increasing salinities (33, 37, 41 and 45 ‰) under the growth light intensity and under excess light intensity (10x the growth light intensity, 600 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). During each treatment, cells were stirred manually every 10 min to prevent settling.

Pigment analyses

At the end of each salinity and light treatments, 1 mL of diatom suspension was filtered on membrane filter (Membrane Isopore Polycarbonate 1.2-mm filter), quickly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis. Pigment extraction and determination of pigment content were performed as previously described (Lepetit *et al.*, 2013). The de-epoxidation state (DES in %) was calculated as $\text{DES} = [(\text{DT} / \text{DD} + \text{DT}) \times 100]$, where DD is the diadinoxanthin, epoxidized form, and DT is the diatoxanthin, the de-epoxidized form.

Chl fluorescence yield and rapid light curves

For a complete overview of the definition and measurement of the photophysiological parameters, see Table 11. Chl fluorescence yield was monitored with a Diving-PAM fluorometer (Walz, Germany) on a 2.5 mL stirred and 20°C controlled diatom suspension (Lavaud *et al.*, 2004). Before measurement, the cells were dark-adapted for 15 min, and a

saturation pulse ($3600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, duration 0.4 ms) was fired to measure F_0 , F_m and F_v/F_m . Rapid Light Curves (RLCs) (Perkins *et al.*, 2010b) were performed whereby one suspension was exposed to 8 successive, incrementally increasing intensities (29 - $1038 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) of 60 s each. At the end of each exposure, F_m' and NPQ were measured. For RLCs, one diatom suspension was exposed to 8 successive, incrementally increasing E_s (29 - $1042 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) of 60 s each (Perkins *et al.*, 2006). RLCs allow constructing rETR vs. E ; from the fitted rETR- E curves (Eilers et Peeters, 1988) $rETR_m$, α , E_k , can be derived.

Table 11 : Photophysiological parameters used in this study, their meaning and how they were measured. Abbreviations: Chl, chlorophyll; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; E, light intensity; PSII, photosystem II; RLCs, Rapid Light Curves. See the Materials and Methods section for further details.

Parameter	Unit	Definition	Photophysiological meaning	Measurement conditions
F ₀	No units	Minimum PSII Chl fluorescence yield	Used to calculate F _v /F _m (see below)	Measured with RLCs after 15 min of dark acclimation
F _m	No units	Maximum PSII Chl fluorescence yield	Used to calculate F _v /F _m and NPQ (see below)	Measured with RLCs during a saturating pulse after 15 min of dark acclimation
F _v /F _m	No units	Maximum PSII quantum yield; $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$	Maximum potential quantum efficiency of PSII photochemistry	See the above measurement conditions for F ₀ and F _m
F _m '	No units	F _m for illuminated cells	Used to measure NPQ and rETR	Measured with RLCs during a saturating pulse after 60 s of illumination at specific E
ΦPSII	No units	Operational PSII quantum yield; $\Phi_{PSII} = (F_m' - F) / F_m'$	Maximum effective quantum efficiency of PSII photochemistry	See the above measurement conditions for F ₀ and F _m ; F is the steady-state of Chl fluorescence measured after 60 s illumination at specific E
NPQ	No units	Non-photochemical quenching of Chl fluorescence;	Estimates the photoprotective dissipation of excess	Measured with RLCs

		$NPQ = F_m / F_m' - 1$	energy	
rETR	$\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	Relative electron transport rate of PSII; $rETR = \Phi_{PSII} \times E$	Effective quantum yield of photochemistry vs. E	Measured with RLCs
α	Relative units	rETR-E curve initial slope	Maximum light efficiency use	Derived from fitted rETR-E curves (Eilers et Peeters, 1988)
rETRm	$\mu\text{mol electrons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	rETR-E curve asymptote	Maximum relative photosynthetic electron transport rate	Derived from fitted rETR-E curves (Eilers et Peeters, 1988)
E_k	$\mu\text{mol photons. m}^{-2} \text{ s}^{-1}$	$E_k = rETR_m / \alpha$	Light saturation coefficient	Derived from fitted rETR-E curves (Eilers et Peeters, 1988)
NPQm	No units	Maximum NPQ	Maximum ability for dissipation of excess energy	Measured at maximum E of RLCs
DES	%	$DES = [DT / (DD+DT) \times 100]$	De-epoxidation state of DD to DT	Measured during growth at LL and after 1 h HL treatment

Sediment size, pore-water salinity and MPB biomass of sediment

Parameters were measured at different seasons and for two sites of the Atlantic French coast: the bay of Brouage and the bay of Bourgneuf; see (Haubois *et al.*, 2005) and (Mélédér *et al.*, 2007) for a respective characterization of the two sampling sites. Sediment size was determined with the software Gradistat (Blott et Pye, 2001) after evaporation of the pore-water. Sediment samples were centrifuged for 10 min at 3500 g and salinity was measured on the supernatant with a xxx sensor. The sediment content of Chl *a* was used as a proxy for MPB biomass. Chl *a* was measured as previously described (Herlory *et al.*, 2004). Spectrofluorimetric measurement (Turner TD-700 fluorometer) was performed on supernatant of sediment samples after lyophilisation, extraction (90% acetone, 12 h, 4°C, in the dark, continuous shaking) and centrifugation 10 min at 4000 g.

III. Results

Pore-water salinity and MPB biomass in different sediments of the French Atlantic coast

The changes in pore-water salinity in the upper layer (first 1000 mm) was measured over different seasons at two sites of the French Atlantic coast characterised by two sediment types: 1) a site with 95% of cohesive muddy sediment which is known to be dominated by a community of epipelagic diatoms throughout the year (Haubois *et al.*, 2005), 2) a site with a mix of muddy and sandy (thus less cohesive) sediment which is known to be dominated by a community of epipsammic diatoms (Mélédér *et al.*, 2007). Overall, pore-water salinity varied between 29 and 48 ‰ during the 3 h emersion period (Table 12). As expected, variations over an emersion were higher in summer than in winter, and over seasons in cohesive than in less cohesive sediment with an overall minimum and maximum variation over an emersion of 2.3 ‰ and 8.3 ‰, respectively.

Table 12 : Pore-water salinity (‰) measured during emersion in the upper sediment layer (first 1000 µm) in two sites of the French Atlantic coast with two different sediment types and at different seasons. Values are averages ± standard deviation (n = 9 to 12).

Sediment type	Season period	Min	Max	Emersion Δ max	Emersion Δ mean
Mud (95.1 ± 0.1 % mud/ 4.9 ± 0.1% sand)	Winter 02/19-02/24	29.0 ± 1.2	34.1 ± 1.1	2.3	1.3 ± 0.6
	Spring 04/19-04/22	32.5 ± 1.1	38.8 ± 1.1	5.1	4.4 ± 1.0
	Summer 07/13-07/26	35.8 ± 0.2	48.2 ± 0.7	8.3	4.6 ± 2.7
Muddy sand (57.9 ± 7.9% sand/ 42.1 ± 7.9% mud)	Spring 04/05-07/05	30.8 ± 1.0	35.4 ± 2.8	3.2	1.9 ± 1.2
	Fall 09/30-10/02	32.8 ± 0.4	37.3 ± 2.7	3.8	3.7 ± 0.2

The changes in pore-water salinity were further deciphered at the two sites over the course an emersion in Spring at two depths in the upper layer of sediment (0-500 mm and 500-1000 mm). Large changes in pore-water salinity occurred within only 1.5 h: 5.1 ‰ and 3.5 ‰ for the muddy and the muddy-sandy sediment, respectively. Nevertheless, these changes were mainly (muddy sediment, Figure 97A) and even exclusively (muddy-sandy sediment, Figure 97B) observed in the first 500 mm where most of the MPB biomass was present (Figure 97C). Although a high equivalent MPB biomass (40.5 ± 3.5 and $48.5 \pm 5.3 \mu\text{g Chl } a \text{ g sediment}^{-1}$ in muddy and muddy-sandy sediment, respectively) was observed between 500-1000 mm depth, the pore-water salinity was close to 33 ‰: 34.0 ± 0.7 ‰ in mud and 33.0 ± 1.3 ‰ in muddy sand.

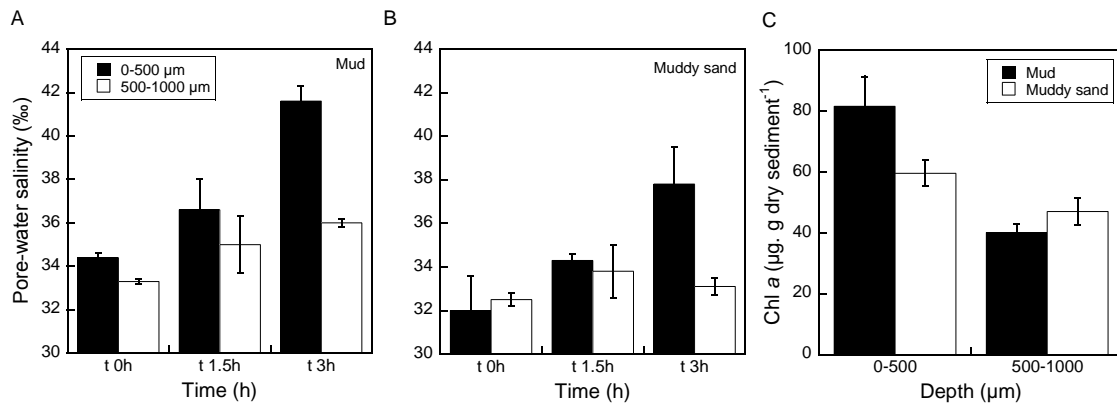


Figure 97 : Evolution of the pore-water sediment salinity (A, B) and chlorophyll *a* (Chl *a*) biomass (C) during emersion in the upper sediment layer (0-500 / 500-1000 μm) in two sites of the French Atlantic coast with two different sediment types in Spring. The representative day was 2012/04/20 for the muddy site and 2012/05/06 for the muddy sandy site. They showed the following features: emersion maximum at 11:25 AM ± 5 min, no rain, surface temperature = 16.6 ± 1.8 °C and 20.6 ± 4.3 °C for the muddy and the muddy sandy sites, respectively; temperatures which were similar to the 20°C experimental temperature used in this study. Values are averages ± standard deviation (n = 3).

Photophysiological response of *Navicula phyllepta* (epipelon) to a combined excess light-salinity stress

Varying the salinity from 33 ‰ to 45 ‰ had no effect on F_v/F_m (0.726 ± 0.003) neither on Φ_{PSII} (0.599 ± 0.001) in cells acclimated to growth LL (Table 13). HL treatment induced a mean decrease in F_v/F_m of -8.3 ± 1.00 % and in Φ_{PSII} of -6.3 ± 1.5 % whatever the salinity (from 33 ‰ to 45 ‰) (Table 13). In parallel, the photophysiological parameters measured from RLCs (α , $rETR_m$ and E_k , see Table 11) were not affected either by changes in salinity or by the HL treatment (Figure 98A, B, C). NPQ_m of LL acclimated cells was on average 0.224 ± 0.135 and, as expected, it increased after the HL treatment, by a mean factor of 1.8 ± 0.3 for all salinities except 45 ‰ for which the increase was the highest ($NPQ_m = 0.653 \pm 0.016$). In parallel to NPQ, DES was measured in LL acclimated cells and after 1 h HL exposure: as expected DES increased (mean values from 12 ± 3 % to 31 ± 2 %) but it did not vary with salinity (Figure 99A).

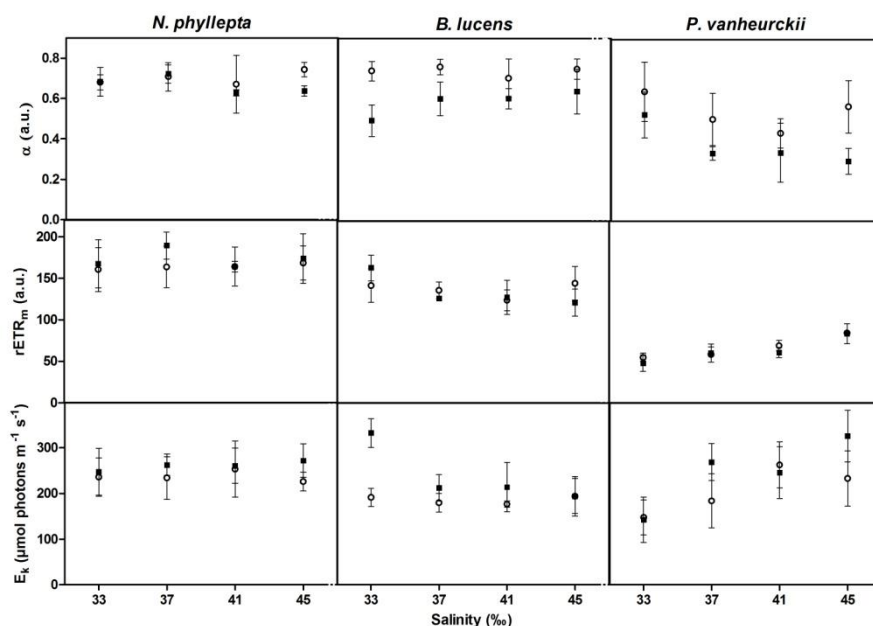


Figure 98 Photophysiological parameters in *Navicula phyllepta*, *Biremis lucens* and *Plagiogrammopsis vanheurckii* exposed to different salinities (33 ‰ to 45 ‰). Abbreviations: LL, growth low light ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons); HL, after 1h high light ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons) treatment; α , maximum light efficiency use; $rETR_m$, maximum relative electron transport rate; E_k , light saturation coefficient. Values are averages \pm standard deviation ($n = 3$).

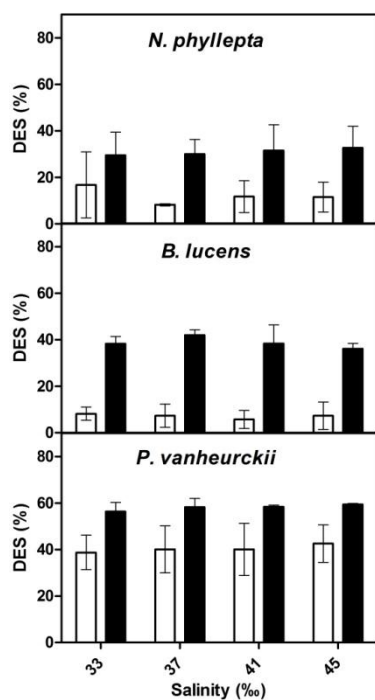


Figure 99 : Rate of de-epoxidation (DES) of diadinoxanthin (DD) to diatoxanthin (DT) in *Navicula phyllepta*, *Biremis lucens* and *Plagiogrammopsis vanheurckii* exposed to different salinities (33 ‰ to 45 ‰). Abbreviations: DES = $[(DD + DT) / DT \times 100]$; LL, growth low light ($60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons); HL, after 1h high light ($600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons) treatment. Values are averages \pm standard deviation ($n = 3$).

Table 13 : Photochemical potential and non-photochemical fluorescence quenching in *Navicula phyllepta* (N.p.), *Biremis lucens* (B.l.) and *Plagiogrammopsis vanheurckii* (P.v.) exposed to different salinities. Abbreviations: LL, growth low light (60 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons); HL, high light (600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ photons); S ‰, salinity. Definitions and conditions of measurement of F_v/F_m , ΦPSII and NPQ_m are listed in Table 11. Values are averages \pm standard deviation (n = 3).

Species	S ‰	LL			HL		
		F_v/F_m	ΦPSII	NPQ_m	F_v/F_m	ΦPSII	NPQ_m
N.p.	33	0.724 ± 0.011	0.599 ± 0.030	0.306 ± 0.060	0.667 ± 0.028	0.551 ± 0.031	0.547 ± 0.053
	37	0.727 ± 0.019	0.597 ± 0.031	0.315 ± 0.044	0.659 ± 0.007	0.568 ± 0.041	0.485 ± 0.070
	41	0.730 ± 0.010	0.600 ± 0.068	0.250 ± 0.022	0.662 ± 0.006	0.559 ± 0.038	0.542 ± 0.017
	45	0.724 ± 0.015	0.600 ± 0.051	0.259 ± 0.038	0.674 ± 0.009	0.571 ± 0.019	0.653 ± 0.016
B.l.	33	0.694 ± 0.010	0.563 ± 0.009	0.323 ± 0.097	0.629 ± 0.009	0.504 ± 0.003	0.588 ± 0.142
	37	0.694 ± 0.012	0.554 ± 0.016	0.315 ± 0.071	0.602 ± 0.010	0.498 \pm 0.040	0.864 ± 0.186
	41	0.689 ± 0.020	0.569 ± 0.008	0.332 ± 0.024	0.607 ± 0.041	0.496 ± 0.039	0.736 ± 0.332
	45	0.703 ± 0.010	0.560 ± 0.019	0.357 ± 0.103	0.627 ± 0.019	0.530 ± 0.038	0.782 ± 0.271
P.v.	33	0.588 ± 0.034	0.312 ± 0.024	0.791 ± 0.141	0.370 ± 0.032	0.265 ± 0.031	1.003 ± 0.048
	37	0.539 ± 0.009	0.292 ± 0.095	0.622 ± 0.129	0.352 ± 0.028	0.270 ± 0.021	1.178 ± 0.103
	41	0.555 ± 0.021	0.291 ± 0.017	0.625 ± 0.011	0.336 ± 0.051	0.213 ± 0.032	0.908 ± 0.163
	45	0.577 ± 0.055	0.316 ± 0.041	0.542 ± 0.019	0.359 (0.018)	0.221 ± 0.066	0.870 ± 0.143

Photophysiological response of *Biremis lucens* (epipsammon) to a combined excess light-salinity stress

The same way as in *N. phyllepta*, varying the salinity had no effect on F_v/F_m (0.695 ± 0.006) neither on $\Phi PSII$ (0.562 ± 0.006) in cells acclimated to growth LL (Table 13). HL treatment induced a mean decrease in F_v/F_m of $-11.3 \pm 1.7 \%$ and in $\Phi PSII$ of $-10.0 \pm 3.3 \%$ whatever the salinity (Table 13). The photophysiological parameters were not affected by salinity in LL acclimated cells (Figure 99B). Nevertheless, increasing salinities (from 37 ‰ and above) induced an increase in α ($25.5 \pm 3.5 \%$), a decrease in $rETR_m$ ($24.5 \pm 1.5 \%$) and a subsequent decrease in E_k ($39 \pm 3 \%$). As a consequence, α and E_k were different after HL treatment compared to L acclimated cells but only at 33 ‰. NPQ_m of LL acclimated cells was on average 0.332 ± 0.018 (Table 13). It increased after the HL treatment by a mean factor of 2.2 ± 0.4 for all salinities. DES increased (mean values from $7 \pm 1 \%$ to $39 \pm 3 \%$) but it did not vary with salinity (Figure 99B).

Photophysiological response of *Plagiogrammopsis vanheurckii* (tychoplankton) to a combined excess light-salinity stress. Similar to *N. phyllepta* and *B. lucens*, varying the salinity had no effect on F_v/F_m (0.565 ± 0.022) neither on $\Phi PSII$ (0.303 ± 0.013) in cells acclimated to growth LL (Table 13). While HL treatment induced a mean decrease in F_v/F_m of $-37.3 \pm 1.7 \%$ whatever the salinity, the $\Phi PSII$ was salinity-dependent, i.e. it was of $-11.5 \pm 3.5 \%$ from 33-37 ‰ and of $28.5 \pm 1.5 \%$ for 41-45 ‰ (Table 13). The photophysiological parameters were affected by salinity in both LL acclimated cells and after the HL treatment (Figure 99

Figure 99B α decreased by a mean of $23 \pm 14 \%$ and of $39 \pm 5 \%$ in LL acclimated cells and after HL treatment (especially from 33 ‰ to 37 ‰), respectively. $rTER_m$ followed an opposite trend increasing with salinity by a mean factor of up to 1.60 ± 0.13 with no difference between the two light treatments. As a consequence, E_k increased together with salinity for both light treatments with a higher mean factor for the cells exposed to the HL treatment (1.96 ± 0.3 compared to 1.53 ± 0.3 for LL acclimated cells). NPQ_m of LL acclimated cells was on average 0.645 ± 0.105 . In contrast to *N. phyllepta* and *B. lucens*, NPQ_m of LL acclimated cells decreased by -30% from 33 ‰ to 45 ‰ (Table 13). This difference was maintained after HL treatment as NPQ_m increased by a mean factor of 1.6 ± 0.3 whatever the salinity. DES in LL acclimated cells of *P. vanheurckii* was higher than in *N. phyllepta* and *B. lucens* ($40 \pm 4 \%$). It increased with HL treatment by $18 \pm 2 \%$ on average but it did not differ with salinity in both LL acclimated cells and after HL treatment.

IV. Discussion

In the field, the upper layer sediment pore-water salinity can highly ($\Delta 5 \text{ ‰}$) and rapidly increase (within 1.5 h), and reach values as high as 48 ‰ in Summer (values up to 55-60 ‰ were even reported, (Roncarati *et al.*, 2008, Serôdio *et al.*, 2008). Nevertheless, such events of high salinity are not restricted to hot sunny days but also occur at moderate temperature (16-20°C) as shown here in Spring on intertidal flats of the Atlantic French coast. Therefore, conditions of relatively high light intensity, high salinity and moderate temperature can be observed on dry days during Spring (and Fall) in Western Europe coastlines, most probably due to water evaporation at the surface of the sediment which is accelerated by windy conditions (Williams, 1964, Sauer *et al.*, 2002, Coelho *et al.*, 2009). Furthermore, the changes in salinity occur in the 500 mm of the upper layer of sediment (both mud and muddy sand) where the bulk of the MPB biomass inhabits. This is also the depth where the highest light intensities occur in sediment with 10% of surface irradiance in cohesive muddy sediment and 50% in less cohesive sandy ones (Cartaxana *et al.*, 2011). Therefore, although temperature is optimal (20-25 °C, (Blanchard *et al.*, 1997, Scholz et Liebezeit, 2012a), the combined conditions of excess light and high salinity in the first 500 mm may impair the photosynthetic efficiency of MPB diatoms. This was the conceptual framework of our study which explored the photophysiological response of MPB diatoms to a combination of light, salinity and temperature conditions simulating a typical Spring-early Summer environment on the Atlantic French coast, i.e. a short (1 h exposure) moderate excess light ($600 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) combined to large changes in salinity (from 33 ‰ to 45 ‰ with a 4 ‰ amplitude) at a stable and non-stressful temperature of 20°C. This combination has been rarely studied before (Rijstenbil, 2003, Rijstenbil, 2005, Roncarati *et al.*, 2008) since most previous works focused on low salinity stress combined to nutrient gradient due to estuarine rivers discharge (Admiraal et Peletier, 1980, Underwood et Provot, 2000, Thornton *et al.*, 2002) and on the long-term effect of salinity changes (most often measured by specific growth, (Williams, 1964, Jackson *et al.*, 1992, Underwood et Provot, 2000, Natana Murugaraj et Jeyachandran, 2007, Scholz et Liebezeit, 2012a) instead of effects (including short-term exposure) on the photosynthetic efficiency (Admiraal, 1977, Admiraal et Peletier, 1980, Roncarati *et al.*, 2008). Additionally, changes in the sediment pore-water salinity are different in cohesive and less cohesive sediment with higher values and amplitude in cohesive sediment. This is probably due to the fact that pore-water remains trapped at the surface of sediment and is thus more

susceptible to evaporation (Paterson et Hagerthey, 2001). Based on such observation, we furthermore studied the effect of the coupled high light-salinity stress on representatives of the different MPB communities that inhabit different sediment types: i) *Navicula phyllepta* which dominates the epipelon MPB community in cohesive muddy sediment (Haubois *et al.*, 2005), ii) *Biremis lucens* and *Plagiogrammopsis vanheurckii* which are typical of the epipsammon and tychoplankton in less cohesive sandy sediment (Mélédér *et al.*, 2007). Because no sediment was added in our experiments, motile epipelon diatoms were not able to position themselves in a light/salinity gradient, hence incapacitating their behavioural response to their treatment conditions.

The photosynthesis of the three species indeed responded differently. The photosynthetic efficiency in *N. phyllepta* and *B. lucens* was not impaired by the excess light treatment alone (i.e. changes in photophysiological parameters at a salinity of 33 ‰ were no more than 10 %). While the photosynthetic efficiency of *N. phyllepta* was virtually not affected by the combined high light-salinity conditions, it was impaired for *B. lucens* and *P. vanheurckii* but to a different extent. In *B. lucens*, the decrease in α and the increase in E_k which is sometimes associated with higher light exposure (Perkins *et al.*, 2006, Cruz et Serôdio, 2008, Lefebvre *et al.*, 2011), and which was observed here for a salinity of 33‰, were abolished by increasing salinities (from 37 ‰ on). In parallel, $rETR_m$ decreased by about 25 %. *P. vanheurckii* photophysiology was affected in a different and more complex way. First, it was more sensitive to the excess light treatment alone, confirming its adaptation to a low light environment (Barnett *et al.*, Submitted). Second, compared to *N. phyllepta* and *B. lucens* Φ_{PSII} drastically decreased with salinities from 41 ‰ on. The decrease in α and the increase in E_k during the high light treatment was not abolished by increasing salinities but it was also observed for LL acclimated cells at all salinities above 33 ‰. Third, $rTER_m$ increased for salinities above 33 ‰ whatever the light treatment. *P. vanheurckii* photosynthetic efficiency obviously already negatively reacted to increasing salinities similar to an excess light exposure by decreasing the excitation pressure on PSII via α decrease, E_k increase and by increasing the photosynthetic electron transport rate possibly through a stronger activation of the Calvin cycle enzymes to increase the potential for energy acceptor after PSI (Nymark *et al.*, 2009). When an excess light treatment was added to the salinity stress, the cells reacted in an even stronger way so that high salinity did not abolish photoacclimation as in *B. lucens*. In parallel to modification in photophysiological parameters, all species exerted a photoprotective response to the combined high light-salinity conditions as illustrated by the

increase in NPQ and in DES. At the light intensity used to grow the cells ($60 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), there was already DT synthesized so that DES was not null: on average 7 % to 12 % in *N. phyllepta* and *B lucens*, respectively and 40 % in *P. vanheurckii* confirming that this light intensity is already relatively high for this species (see also (Barnett *et al.*, Submitted). As expected, when exposed to the high light treatment, DES increased in all species but to a different extent: on average 31 % in *N. phyllepta*, 39 % in *B lucens* and up to 58 % in *P. vanheurckii* again illustrating the higher light sensitivity of this species. Interestingly, high salinity did not impair or enhanced DES, as previously observed (Rijstenbil, 2005), so that the de-epoxidase enzyme which is responsible for the light-dependent conversion of DD to DT does not seem to react in any way to salinity. DT is well-known to i) scavenge reactive oxygen species and to help preventing the peroxidation of lipids of the thylakoid membrane (Lepetit *et al.*, 2010), ii) participate to NPQ (Goss et Jakob, 2010, Lavaud *et al.*, 2012, Lavaud et Lepetit, 2013). As previously reported (Barnett *et al.*, Submitted), NPQ_m was higher in *B lucens* than in *N. phyllepta* as expected from the different DES between the two species. In contrast to previous report (Barnett *et al.*, Submitted), it was higher in *P. vanheurckii*. This was probably due to different light growth conditions which generated a high DES in *P. vanheurckii* and to the different ways of measuring NPQ (RLCs in this study and Non-Sequential Light Curves-NSLCs in (Barnett *et al.*, Submitted). As expected, when exposed to the high light treatment, NPQ increased in all species but to different extents. While it increased to the same extent (about 1.6x) for all salinities above 33 ‰ in *P. vanheurckii*, its increase was higher (about 2.2x) in *B lucens*, and it reached that level and even higher (2.5x) only for 45 ‰ in *N. phyllepta*. These observations well illustrate how i) NPQ helped to dissipate the excess of light excitation energy in the PSII when the photosynthetic machinery was slowed-down by other environmental stresses as observed in *B lucens* for all salinities above 33 ‰, ii) *N. phyllepta* appeared to be insensitive to salinities lower than 45 ‰. Furthermore, although it increased during the high light treatment, NPQ in *P. vanheurckii* decreased linearly (-0.018 ± 0.001 NPQ unit per ‰ salinity) with salinities above 33 ‰. Hence, in this species NPQ development was inhibited by high salinities although it synthesised a high amount of DT (i.e. the highest DES of the three species). Such partial inhibition of NPQ induction and discrepancy between DES and NPQ may be due to either a lesser effective involvement of DT in NPQ, or to an uncoupling between the light-dependent built-up of the transthylakoidal proton gradient (i.e. ΔpH , which is involved in both the activation of the DD de-epoxidase and the molecular control of NPQ) and the onset of NPQ

(Lavaud *et al.*, 2012, Lavaud et Lepetit, 2013). Most probably NPQ decrease might be due to a stronger involvement of DT in other photoprotective processes than NPQ such as the prevention of lipid peroxidation by reactive oxygen species (ROS) (Lepetit *et al.*, 2010).

The photophysiological response of *N. phyllepta*, *B. lucens* and *P. vanheurckii* to the combined high light-salinity conditions fitted well with their respective growth form and original habitat. The relationship between photophysiology and the different growth forms of MPB diatoms to excess light alone was already documented before (Barnett *et al.*, Submitted). *N. phyllepta* photosynthesis was not affected neither by the excess light alone or by the salinity stress alone or by the combination of both which illustrated an adaptation to potentially extreme conditions of light and salinity at the surface of cohesive (muddy) sediment. Indeed, as shown here and elsewhere (Paterson et Hagerthey, 2001), large and fast changes in the upper layer of cohesive sediment often occur because of desiccation of the surface pore-water (Sauer *et al.*, 2002) or because of rain, and in the case of desiccation high salinity is always combined with high light and/or temperature, and/or with wind (Williams, 1964, Sauer *et al.*, 2002, Coelho *et al.*, 2009). The apparent insensitivity of *N. phyllepta* is in agreement with previous reports on the high tolerance to salinity changes by several representatives of the epipelton (Williams, 1964, Admiraal, 1977, Admiraal et Peletier, 1980, Clavero *et al.*, 2000), and especially representatives of the *Navicula* genus (Underwood et Provot, 2000, Scholz et Liebezeit, 2012a). The adaptation of epipellic diatoms to changes in salinity appears to be mainly supported by their motility. It is known that epipellic diatoms use both vertical motility in the sediment and physiology in response to excess light (Mouget *et al.*, 2008, van Leeuwe *et al.*, 2009, Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011, Serôdio *et al.*, 2012) although they use physiology to a lesser extent (Barnett *et al.*, Submitted). The response of *N. phyllepta* to increasing salinities with and without excess light confirms the likeliness of an equivalent balance to respond to salinity. Indeed, DES and NPQ were similar over a salinity range from 33 ‰ to 41 ‰, it is only at 45 ‰ that NPQ was stronger. Although in our experiments motility was abolished, *N. phyllepta* did not deploy a strong photophysiological response pointing out to other means to protect from high salinity. They were proven to use amino acids, taurine ((Jackson *et al.*, 1992) and proline (Natana Murugaraj et Jeyachandran, 2007) which are known for their role in osmotic adjustment. Most importantly, cells surround themselves with exopolysaccharides (EPS) to minimize the negative impact of dessication and high salinity (Sauer *et al.*, 2002). High salinity enhances the synthesis of EPS which are responsible for cell attachment which is prerequisite for cell motility (Apoya-Horton *et al.*,

2006). In field conditions, EPS indeed support the vertical migration in the sediment to apparently escape extreme salinities. It was shown on a natural epipellic assemblage that a shift in salinity from 35 ‰ to 45 ‰ generated a -30 % migration of the cells at the surface of sediment (Sauer *et al.*, 2002). In controlled laboratory conditions, motility can be even abolished at 50 ‰ (Apoya-Horton *et al.*, 2006). This phenomenon is based on the decrease of the gliding speed of the cells (Apoya-Horton *et al.*, 2006). It was suggested that the rapidity of the phenomenon (5 s, (Apoya-Horton *et al.*, 2006) might be related to intracellular calcium responses (Falciatore *et al.*, 2000, Apoya-Horton *et al.*, 2006). Therefore, the motility response of epipellic diatoms was speculated to be part of an adaptive strategy to respond the sometimes highly changing salinity at the surface of cohesive sediment together with light and temperature (Admiraal, 1984).

The same holds for tychoplankton when it is buried in sediment at low tide (Roncarati *et al.*, 2008): its movement modalities, which is not restricted to gliding, is strongly influenced by salinity changes (Apoya-Horton *et al.*, 2006). Additionally, high salinity generates the detachment of cells from their substratum which could be a strategy to avoid longer exposure (Apoya-Horton *et al.*, 2006) for this amphibious group of benthic diatoms. Nevertheless, as reported before (Roncarati *et al.*, 2008) and here, the physiological response to salinity and to a combined high light-salinity stress of representatives of the tychoplankton seems to be more complex as they appear highly sensitive to salinities above 35 ‰ (Underwood et Provot, 2000) including drastic growth limitation at salinities above 40 ‰ (Rijstenbil, 2003, Scholz et Liebezeit, 2012a). Such observations fits well with a group adapted to salinities close to 33 ‰ as it is mostly the case in the water column (when cells are resuspended at high tide) or buried in sediment (when cells settled down at low tide) as observed here from 500 µm down. Indeed, even under low light increasing salinities over 33 ‰ generated a drastic photophysiological response in *P. vanheurckii*: it acclimated its photochemical machinery to reduce the light excitation pressure on PSII just like high salinities would render it even more light sensitive (see above). This general response was likely due to the linear lowering of NPQ with high salinities. The same hold during the excess light treatment but the response was partly overflowed when salinity reached 41 ‰: the PSII photochemical efficiency (Φ PSII) largely dropped down. In addition to photophysiological response to high salinity and excess light, there was a sign of a response to an oxidative stress (i.e. the strong DES and DT molecules likely to be involved in ROS scavenging, see above) which strengthens the obvious salinity and light sensitivity of *P. vanheurckii*. This is confirmed by previous studies on

another tychoplankton representative (*Cylindrotheca closterium*) (Rijstenbil, 2003, Rijstenbil, 2005, Roncarati *et al.*, 2008). They demonstrated that high salinity and/or excess light (including UV radiations) generate ROS and the increase of the intracellular pools and activity of important players of the oxidative stress response (i.e. the reduced glutathione-GSH, the superoxide dismutase-SOD enzyme). Albeit such protective response, the cells could not avoid significant lipid peroxidation although no protein damage apparently occurred (Roncarati *et al.*, 2008). Peroxidation of lipids of the thylakoid membrane is well-known to disturb osmoregulation (Rijstenbil, 2003, Rijstenbil, 2005) which might explain the synthesis of intracellular osmoregulators like free sugars (mannose, (Paul, 1979) as well as amino acids (see above) in high salinity conditions. Moreover, leakage of the thylakoid membrane can impair the build-up of the transthylakoid ΔpH (i.e. loss of membrane potential, (Rijstenbil, 2005), as shown before with uncouplers (Lavaud *et al.*, 2002a, Lepetit *et al.*, 2013), which would well explain the NPQ decrease with increasing salinities (see above) (Lavaud *et al.*, 2013, Lavaud *et al.*, 2014).

The response of representative of epipsammon to salinity changes is much less documented. To our knowledge, only (Scholz *et al.*, 2012a) investigated the negative impact of low and high salinity on the growth of epipsammon species like *Achnantes* spp. and *Amphora* spp. illustrating their sensitivity to salinity changes. Because it lives attached to sediment particles and the light penetration is deeper in sandy sediment, the physiological response of epipsammon to excess light is performant (Barnett *et al.*, Submitted). Here, under low light, *B. lucens* was insensitive to high salinity. Nevertheless, and although DES and NPQ were high and not impaired by high salinity, the ability to decrease the excitation pressure on PSII during excess light exposure was abolished by salinities above 37 ‰. As a consequence, $rTER_m$ decreased, thus potentially impairing the photosynthetic productivity of cells. While *B. lucens* is well adapted to cope with excess light (Barnett *et al.*, Submitted) and with high salinity (this study), it is not well adapted to the combination of the two. This fits well with the fact that in its natural habitat, even if the light climate can be extreme, changes in salinity remain moderate i) even in the first 500 mm of sediment, and ii) especially deeper where a significant part of the epipsammon biomass inhabits, as reported here and elsewhere (Cartaxana *et al.*, 2011).

V. Conclusion

The photophysiology of representatives of the three main groups of intertidal microphytobenthic diatoms (i.e. epipelon, epipsammon and tychoplankton) differentially responded to a combined high light-salinity stress. While the representative of epipelon was insensitive to high salinity alone and combined with excess light, the tychoplankton representative was highly sensitive to both, and the epipsammon representative was sensitive only to the stress combination. These specific responses of the three species examined fitted well with i) their natural habitat (i.e. more or less cohesive sediment) for which light climate and changes in salinity is different, ii) their growth form (i.e. motile, immotile and amphibious) which determines their probability to be confronted to a combined high light-salinity stress. Although light and temperature are regarded as major drivers of the photosynthetic productivity of microphytobenthos in Western Europe intertidal mudflats, salinity changes obviously can non-negligibly modulate the microphytobenthos photosynthesis when it is combined with these drivers by the weather conditions.

Partie 5B-1

This authors' personal copy may not be publicly or systematically copied or distributed, or posted on the Open Web, except with written permission of the copyright holder(s). It may be distributed to interested individuals on request.

Vol. 67: 161–175, 2012
doi: 10.3354/ame01591

AQUATIC MICROBIAL ECOLOGY
Aquat Microb Ecol

Published online October 18

Efficiency of photoprotection in microphytobenthos: role of vertical migration and the xanthophyll cycle against photoinhibition

João Serôdio^{1,2,*}, João Ezequiel¹, Alexandre Barnett², Jean-Luc Mouget³,
Vona Méléder^{2,4}, Martin Laviale^{1,4}, Johann Lavaud²

¹Departamento de Biologia and CESAM (Centro de Estudos do Ambiente e do Mar), Universidade de Aveiro, Campus de Santiago, 3810-193 Aveiro, Portugal

²UMR 7266 'LIENSs', CNRS-University of La Rochelle, Institute for Coastal and Environmental Research (ILE), 2 Rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

³Mer Molécules Santé (MMS) EA 2160, Université du Maine, Av. O. Messiaen, 72085 Le Mans Cedex 9, France

⁴Mer Molécules Santé (MMS) EA 2160, Université de Nantes, BP 92 208, 44322 Nantes Cedex 3, France

ABSTRACT: The capacity of microphytobenthos to withstand the variable and extreme conditions of the intertidal environment, prone to cause photoinhibition, has been attributed to particularly efficient photoprotection. However, little is known regarding the capacity of this protection against photoinhibition or the mechanisms responsible for it. The present study quantified the photoprotective capacity and the extent of photoinhibition under excess light, estimated the contribution of vertical migration and the xanthophyll cycle to overall photoprotection, and evaluated the effects of photoacclimation. A new experimental protocol combined (1) chlorophyll fluorescence imaging, for the simultaneous measurement of replicates and experimental treatments, (2) specific inhibitors for vertical migration and for the xanthophyll cycle, to quantify the relative contribution of each process, and (3) recovery kinetics analysis of photosynthetic activity during light stress-recovery experiments, to distinguish rapidly reversible photochemical down-regulation from photoinhibition. The results show a high photoprotective capacity in 2 study periods, May and October, with photoinhibition rates below 20%. A clear change in photoacclimation state was observed, with acclimation to lower irradiances in autumn associated with higher susceptibility to photoinhibition. In May, vertical migration and the xanthophyll cycle provided comparable protection against photoinhibition; in October, the former predominated. The sum of their contributions was ~20% in both months, suggesting that other processes also contribute to photoprotection.

KEY WORDS: Microphytobenthos · Photoinhibition · Photoprotection · Xanthophyll cycle · Vertical migration · Non-photochemical quenching · Chlorophyll fluorescence · Diatoms

Resale or republication not permitted without written consent of the publisher

INTRODUCTION

Benthic microalgae inhabiting estuarine intertidal flats are exposed to extreme and highly variable environmental conditions. Particularly during low tide, the sedimentary environment is characterized by exposure to high levels of solar irradiance (Serôdio &

Catarino 1999)—including UV radiation (Waring et al. 2007, Mouget et al. 2008)—extreme temperatures and salinities (Brotas et al. 2003, Rijstenbil 2005), intense rates of desiccation (Coelho et al. 2009), super-saturated oxygen concentrations (Chevalier et al. 2010), and nutrient and carbon depletion (Miles & Sundbäck 2000, Cook & Roy 2006). Being potentially

*Email: jserodio@ua.pt

damaging to the photosynthetic apparatus when acting individually, the combined effects of all of these factors likely coalesce in the photoinhibition of photosynthesis of benthic microalgae. Of particular importance is the exposure to direct sunlight, which can result in excessive reductant pressure and in the formation of intracellular reactive oxygen species (ROS; Roncarati et al. 2008, Waring et al. 2010). High levels of ROS cause the permanent inactivation of photosystem II (PSII) protein D1, negatively impacting photosynthetic yield and primary productivity (Nishiyama et al. 2006).

Despite these harsh conditions, microphytobenthos of intertidal flats typically exhibit high growth rates, forming dense and diverse sedimentary biofilms, and are recognized as a major contributor to ecosystem-level carbon fixation and primary productivity (Underwood & Kromkamp 1999). Furthermore, an apparent lack of photoinhibition in microphytobenthic biofilms has been repeatedly reported (Blanchard & Cariou-LeGall 1994, Kromkamp et al. 1998, Underwood 2002, Blanchard et al. 2004, Underwood et al. 2005, Van Leeuwe et al. 2008). This success in coping with high light stress may be explained by the combined operation of 2 processes, the xanthophyll cycle and vertical migration, which could result in overall particularly efficient photoprotection (Seródio et al. 2008, Perkins et al. 2010b). In diatoms, the group of microalgae that typically dominate in microphytobenthic assemblages, the xanthophyll cycle provides an exceptionally high photoprotective capacity (Lavaud 2007, Brunet & Lavaud 2010, Goss & Jakob 2010). This is particularly true for microphytobenthos *in situ* (Seródio et al. 2005, Van Leeuwe et al. 2008, Chevalier et al. 2010, Jordan et al. 2010). This high photoprotective capacity may also result from the activation of the xanthophyll cycle in the dark due to chlororespiratory activity, a process considered as potentially advantageous during prolonged periods of darkness (Jakob et al. 2001, Cruz et al. 2011) — a situation common in the sedimentary environment. In contrast, the negative phototactic behavior of benthic diatoms, mostly raphid pennates, under high light has long been interpreted as a form of avoidance of excessive light levels that would otherwise cause pho-

toinhibition (Admiraal 1984, Underwood et al. 1999, Consalvey et al. 2004, Waring et al. 2007).

This subject has attracted substantial attention in recent years, particularly centered on the effects of vertical migration on biofilm photophysiology (Consalvey et al. 2004, Jesus et al. 2006, Waring et al. 2007, Mouget et al. 2008, Perkins et al. 2010, Cartaxana et al. 2011), and has been facilitated by the introduction of a diatom motility inhibitor (Cartaxana et al. 2008). However, these studies have been focused on the response of photosynthetic activity during (Waring et al. 2007, Perkins et al. 2010) or shortly after (Mouget et al. 2008) light stress, mostly through *in vivo* measurements of electron transport rate of PSII (ETR) or non-photochemical quenching (NPQ) of chlorophyll fluorescence (PAM fluorometry, see 'Fluorescence measurements'; Table 1) (Perkins et al. 2010a). Perhaps surprisingly, none of these studies have actually evaluated the efficiency of the photoprotection provided by the xanthophyll cycle and vertical migration or compared their action against photoinhibition in microphytobenthic biofilms. The distinction between photoprotection and photoinhibition processes from chlorophyll fluorescence cannot be inferred from the decrease in ETR or formation of NPQ under excess light but requires an analysis of

Table 1. Definition of terms

Notation	Definition
α	Initial slope of the ETR vs. E curve
a, b, c	Parameters of the Ellers & Peeters (1988) model
DTT	Dithiothreitol
$\Delta F/F_m'$	Effective quantum yield of PSII
DD	Diadinoxanthin
DT	Diatoxanthin
DDE	Diadinoxanthin de-epoxidase
E	PAR irradiance
E_{50}	Irradiance level corresponding to 50% of NPQ_m in a NPQ vs. E curve
E_k	Photoacclimation parameter of an ETR vs. E curve
ETR	PSII electron transport rate
ETR_m	Maximum ETR level in an ETR vs. E curve
F_0, F_m	Minimum and maximum fluorescence of a dark-adapted sample
F_w, F_m'	Steady state and maximum fluorescence of a light-adapted sample
Lat A	Latrunculin A
n	Sigmoidicity coefficient of the NPQ vs. E curve
NPQ	Non-photochemical quenching
NPQ_m	Maximum NPQ level in a NPQ vs. E curve
PAR	Photosynthetically active radiation
PSII	Photosystem II
q_E	Energy-dependent quenching
q_I	Photoinhibitory quenching
q_T	State-transition quenching
t	Time during recovery following light stress
XC	Xanthophyll cycle

the recovery kinetics of photosynthetic activity following exposure to light stress (Horton & Hague 1988, Walters & Horton 1991, Müller et al. 2001). In diatoms, a rapid (within minutes) component of this recovery can be attributed to the reversal of the xanthophyll cycle (q_{E} , or 'energy-dependent quenching'), while photoinhibitory effects (q_{I} , or 'photoinhibitory quenching') can be quantified from a second, much slower (within hours) component (Müller et al. 2001, Lavaud 2007). The q_{T} (state-transition related quenching) component of NPQ recovery, which shows intermediate relaxation kinetics, does not exist in diatoms (Owens 1986). As such, the following questions are mostly unanswered. How efficient are photoprotective processes in preventing photoinhibition in microphytobenthic biofilms? What is the relative contribution of migration and the xanthophyll cycle for overall photoprotection? To what extent does photoinhibition occur in microphytobenthos?

The present study was designed to address these questions, for which a new experimental protocol was designed, based on the combination of (1) chlorophyll fluorescence imaging, to allow the simultaneous measurement of a large number of samples and experimental treatments, (2) the use of specific inhibitors for vertical migration and for the xanthophyll cycle, to quantify the relative contribution of each process to overall photoprotection, and (3) the analysis of the recovery kinetics of photosynthetic activity following light stress, to distinguish down regulation due to the xanthophyll cycle from down regulation due to photoinhibition. This protocol was further used to test the influence of photoacclimation state on photoprotection capacity and susceptibility to photoinhibition in microphytobenthic biofilms inhabiting a temperate intertidal mudflat.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and sample preparation

Sediment samples were collected in the upper zone (500 m from the shore, ca. 4 m above the marine chart datum) of an intertidal mudflat in the Baie de l'Aiguillon (46° 15.36' N, 1° 8.55' W), France. Samples were collected in late spring (May) and autumn (October) 2010 and were expected to show contrasting photoacclimation states following the seasonal variation in solar radiation (see end of this section). The sampling site is composed of fine muddy sediments (<63 μm) where microphytobenthic biofilms are largely dominated by diatoms (Herlory et al. 2004). During low

tide, samples of the surface layers of sediment (the top ~1 cm) were collected using a spatula. In the laboratory, the sediment was sieved through a 500 μm mesh, to remove the mud snails *Hydrobia* sp. and other meio- and macrofauna, and was thoroughly mixed and spread in 4 cm deep plastic trays. The sediment was covered with water collected in the sampling site and left undisturbed overnight. During the next morning, at the start of the photoperiod, the slurries were again homogenized, and identical portions of the resulting slurry were transferred to 24-well plates using a small spatula, filling the wells completely (ca. 3 ml). The well plates were exposed to a homogeneous light field provided by 2 LED panels (equal contribution of red, far-red, blue, and white LEDs; FloraLEDs panels, Plant Climatics), delivering a constant irradiance of 70 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ at the sample surface, to induce the upward migration of microalgae and the formation of the biofilm. Daily global solar radiation data were obtained from a Meteo-France weather station located ~9 km southwest from the sampling site for 2 wk periods preceding the sampling dates, 15–30 May and 5–20 October 2010.

Fluorescence measurements

Chlorophyll fluorescence was measured using an imaging-PAM fluorometer (Maxi-PAM M-series, Walz). The measuring area of the fluorometer covered each entire well plate, so that up to a total of 24 sediment samples could be monitored simultaneously. All experiments were carried out after biofilm formation. This was determined by measuring the fluorescence level F_{s} , taken as a proxy for surface microalgal biomass, in a replicated set of samples exposed to constant low light of 55 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Experiments were started after F_{s} reached a plateau following the initial rise after the onset of the light period, which typically took 2 to 3 h of low light exposure. For each sample, the fluorescence signal was calculated by averaging the values of all pixels included in an area of ca. 63.6 mm^2 (area of interest), which corresponded to ca. 1500 pixels, centered inside each well. This area is smaller than the total area of each well (95.0 mm^2), the difference being due to the exclusion of the edge of each sample, often not representative of the rest of the biofilm. To minimize sample heating during prolonged exposure to high light, the experiments were carried out in a temperature-controlled room at 20°C, and the fluorometer Perspex hood was maintained open at all times.

Photoacclimation: light-response curves

The photoacclimation state of the samples was characterized by measuring the light-response curves of ETR and NPQ in the 2 sampling periods. Light-response curves were generated by sequentially exposing the samples to 7 levels of actinic light, up to 700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Samples were exposed to each light level for 3 min (a period previously confirmed to allow for reaching a steady-state), after which a saturation pulse was applied and fluorescence levels F_s and F_m' were recorded. A total of 6 replicated measurements (on 6 different wells) were made for each light level. For each irradiance level, E , the relative ETR was calculated from the product of E and the PSII effective quantum yield, $\Delta F/F_m'$ (Genty et al. 1989):

$$\text{ETR} = E \frac{F_m' - F_s}{F_m'} \quad (1)$$

ETR vs. E curves were quantitatively described by fitting the model of Eilers & Peeters (1988) and by estimating the parameters α (the initial slope of the curve), ETR_m (maximum ETR), and E_k (the light-saturation, or photoacclimation, parameter):

$$\text{ETR}(E) = \frac{E}{aE^2 + bE + c} \quad (2)$$

where

$$\alpha = \frac{1}{c}, \quad \text{ETR}_m = \frac{1}{b + \sqrt{ac}} \quad \text{and} \quad E_k = \frac{c}{b + \sqrt{ac}} \quad (3)$$

Due to the unavoidable confounding effects of vertical migration on the measurement of F_m , NPQ was calculated using the adapted index based on the relative difference between the maximum fluorescence measured during the construction of the light curve, $F_{m,m}'$, and upon exposure to light, F_m' (Seródio et al. 2005):

$$\text{NPQ} = \frac{F_{m,m}' - F_m'}{F_m'} \quad (4)$$

NPQ vs. E curves were described by fitting the model of Seródio & Lavaud (2011) and by estimating the parameters NPQ_m (maximum NPQ), E_{50} (irradiance corresponding to half of NPQ_m), and n (sigmoidicity parameter):

$$\text{NPQ}(E) = \text{NPQ}_m \frac{E^n}{E_{50}^n + E^n} \quad (5)$$

These models were fitted using a procedure written in MS Visual Basic and based on MS Excel Solver. Model parameters were estimated iteratively

by minimizing a least-squares function, forward differencing, and the default quasi-Newton search method. The model was fitted to individual light-response curves. Estimates of model parameters were compared using a Student's *t*-test. The standard errors of the parameter estimates were calculated following Ritchie (2008).

Photoprotection vs. photoinhibition: light stress-recovery experiments

The photoprotection capacity of microphytobenthic biofilms was estimated by quantifying the recovery of $\Delta F/F_m'$ following a prolonged exposure to super-saturating irradiance. Three replicates were sequentially exposed to (1) a low light level of 55 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, for a minimum of 15 min, to ensure full light-activation of the photosynthetic apparatus and to determine pre-stress reference levels of $\Delta F/F_m'$; (2) a supersaturating light level of 1200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 3 h, to potentially induce photoinhibitory effects; and (3) low light (55 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) for a minimum of 15 min to record the recovery kinetics. During the whole experiment, $\Delta F/F_m'$ was measured by applying saturating pulses every 90 s. The recovery of $\Delta F/F_m'$ upon the return to low light conditions was described by fitting an exponential function, adapted from a first-order kinetics model derived for describing the kinetics of NPQ (Olaizola & Yamamoto 1994, Seródio et al. 2005):

$$\Delta F/F_m'(t) = \Delta F/F_{m,rec}' + [\Delta F/F_m'(0) - \Delta F/F_{m,rec}'] e^{-kt} \quad (6)$$

where t is the time during recovery, $\Delta F/F_m'(0)$ and $\Delta F/F_{m,rec}'$ represent the PSII quantum yield levels at the start of the recovery period and after full recovery (associated to q_E), and k is the rate constant of the $\Delta F/F_m'$ recovery. The values of $\Delta F/F_m'$ estimated by the model for $t = 10.5$ min, expressed as a percentage of the pre-stress levels, were used for estimating the effective photoprotective capacity of the biofilm. The remaining relative difference between pre- and post-stress levels of $\Delta F/F_m'$ was used as an estimate of the photoinhibitory effects imposed by excess light (defined as supersaturating irradiance levels, above E_i).

The photoprotective roles of vertical migration and of the xanthophyll cycle were studied by applying specific inhibitors of the 2 processes. Vertical migration was inhibited by the diatom motility inhibitor latrunculin (Lat) A, shown to effectively inhibit cell motility without causing appreciable effects on the

photosynthetic activity (Cartaxana et al. 2008). To inhibit the activity of the xanthophyll cycle, the inhibitor of the diadinoxanthin de-epoxidase (DDE) dithiothreitol (DTT) was used. DTT is commonly used to inhibit the conversion of the pigment diadinoxanthin (DD) into the photoprotective form diatoxanthin (DT) (Lavaud et al. 2002a). DTT was applied in combination with Lat A to ensure that the cells with the xanthophyll cycle inhibited remained exposed to high light.

The contribution of vertical migration to the overall photoprotection capacity of the biofilm was estimated by the difference between the levels of $\Delta F/F_m'$ recovery in control (free moving cells) and Lat A-treated (vertical migration inhibited) samples. The contribution of the xanthophyll cycle was estimated by comparing the levels of $\Delta F/F_m'$ recovery in the samples treated with Lat A (only vertical migration inhibited) and in those treated with both Lat A and DTT (both vertical migration and the xanthophyll cycle inhibited). The inhibitor solutions were added after the biofilm was fully formed in a total of 200 μl for both the Lat A and the Lat A + DTT solutions. The same volume of filtered seawater was added to the control samples. The solutions were added carefully to minimize biofilm disturbance by pipetting small volumes onto the sediment surface. A minimum of 30 min was given for the inhibitors to diffuse and for the biofilms to stabilize before measurements were started.

Inhibitor preparation and effective dosage

Solutions of Lat A of different concentrations, ranging from 5 to 15 μM , were prepared from a concentrated solution (1 mM) prepared from dissolving purified Lat A (Sigma-Aldrich) in dimethylsulfoxide. The minimum effective dosage of Lat A to induce inhibition of vertical migration was determined following Cartaxana & Seródio (2008). Samples treated with different concentrations of Lat A (final volume 200 μl) were darkened close to the time expected for tidal flood, known to induce a rapid downward migration. The degree of migration inhibition was estimated from the decrease in surface biomass following darkening, as estimated from the dark-adapted fluorescence level, F_0 . Three replicate samples were tested for each Lat A concentration.

DTT (BDH-Prolabo) was prepared fresh as in Lavaud et al. (2002a). A stock solution of 300 mM (in ethanol) was diluted in filtered seawater to prepare working solutions of concentrations ranging from 3.3

to 15 mM. The minimum effective dosage of DTT was determined by measuring NPQ development upon exposure to 400 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ for 30 min in samples treated with increasing concentration of DTT (final volume 200 μl). Three replicated samples were tested for each DTT concentration. For the light stress experiments, samples were treated with 200 μl of a combined solution of Lat A and DTT, prepared using the concentration of each inhibitor determined from the effective dosage tests (see 'Results').

Taxonomic composition

In one of the trays, microalgae were collected by covering the sediment with 2 layers of a 100 μm mesh. The trays were exposed to low indirect light from a north facing window ($<200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) during the day following the sampling. The upper mesh was removed at the time of middle emersion period, and it was washed with filtered (0.2 μm) natural seawater. The samples were fixed in Lugol's solution and preserved at 4°C until analysis. Diatom species were identified and counted using definitive mounts in Naphrax after cleaning the cells by cremation (2 h, 450°C) (Méléder et al. 2007). Taxonomic determination was performed by microscope on the basis of morphological criteria (Ribeiro 2010). A total of ca. 300 diatom frustules were counted to determine specific abundances.

RESULTS

Photoacclimation

Significant differences were found between the light response of ETR measured in May and October. In comparison with the ETR vs. E curves measured in May, the ones measured in October presented significantly higher values of α (26.7%, t -test, $p < 0.001$) and lower values of ETR_m (-41.5%, t -test, $p < 0.001$) (Fig. 1A). As a consequence, the photoacclimation parameter E_k was significantly lower in October than in May (-53.5%; t -test, $p < 0.001$). Regarding NPQ, significant differences were found between the light-response curves measured in the 2 periods (Fig. 1B). The NPQ vs. E curves measured in May reached lower levels within the range of applied irradiances (on average, 2.19 and 3.25 at 700 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in May and October, respectively), although the values of NPQ_m were not significantly different (t -test, $p = 0.425$). The light-response curves were more

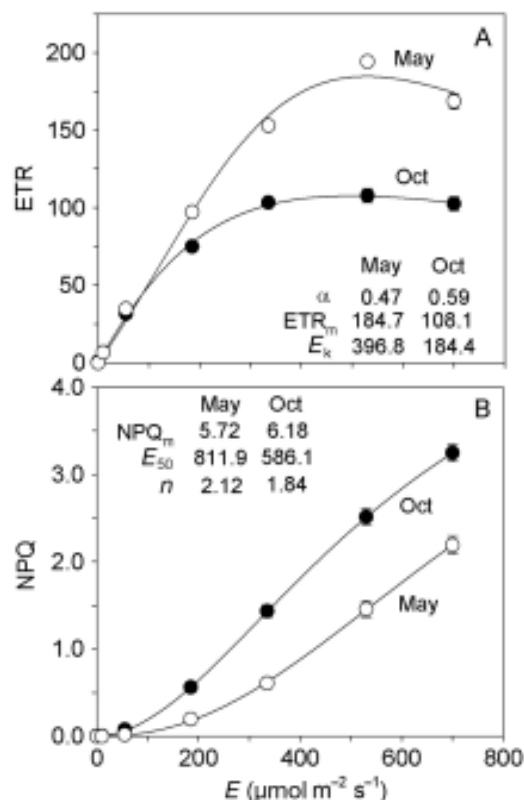


Fig. 1. Light-response curves of (A) PSII electron transport rate (ETR) and (B) non-photochemical quenching (NPQ) measured in May and October 2010. Mean of 6 replicates. Vertical bars are 1 SE. Numbers represent the mean values of model parameters estimated for light-response curves measured for each individual sample. See Table 1 for definition of parameters

sigmoid in May than in October (t -test, $p = 0.001$), the largest differences being found regarding the light level required for induction of NPQ, indicated by the parameter E_{50} , which was significantly lower in October than in May (-38.5% ; t -test, $p = 0.003$).

The light conditions in the region of the sampling area varied greatly between the 2 wk periods preceding the sampling periods, with global solar radiation reaching a daily average of 2369 J cm^{-2} in May, more than double the value observed in October, 1008 J cm^{-2} .

Inhibitor dosage

Vertical migration was strongly inhibited for most of the Lat A concentrations tested, with an inhibition level $>75\%$ being obtained with only $5 \mu\text{M}$ (Fig. 2). The inhibitory response to the increase in Lat A con-

centration presented a clear saturation-like pattern, with the increase from 10 to $15 \mu\text{M}$ resulting in an increase in inhibition of only 8.5% . Considering that $10 \mu\text{M}$ was enough to inhibit vertical migration by $>90\%$ and the small increase obtained by applying the higher concentrations, solutions of $10 \mu\text{M}$ Lat A were used in all experiments.

The response of NPQ to the increase in DTT also showed a saturation-like pattern, characterized by a strong decrease for concentrations up to 5 mM and a virtually constancy for concentrations above this value (NPQ decreased by 19% between 5 and 15 mM ; Fig. 3). However, even when the highest DTT concentration was applied, NPQ was never completely eliminated, remaining above 1.0 . In all further experiments, a concentration of DTT of 10 mM was used.

Light stress exposure and recovery

Fig. 4 exemplifies the variation of $\Delta F/F_m'$ during a light stress-recovery experiment. On the control samples, exposure to excess light induced an immediate and marked decrease in $\Delta F/F_m'$ from ca. 0.63 to values slightly below 0.1 (Fig. 4). $\Delta F/F_m'$ further decreased to values close to zero during the first 15 min of exposure, after which it gradually recovered, stabilizing at values around 0.1 after 90 min and until the end of the high light period. On inhibitor-treated samples, $\Delta F/F_m'$ also decreased to values close to zero upon the start of high light exposure but, in contrast to control samples, never showed any appreciable recovery, remaining below 0.05 (Fig. 4). How-

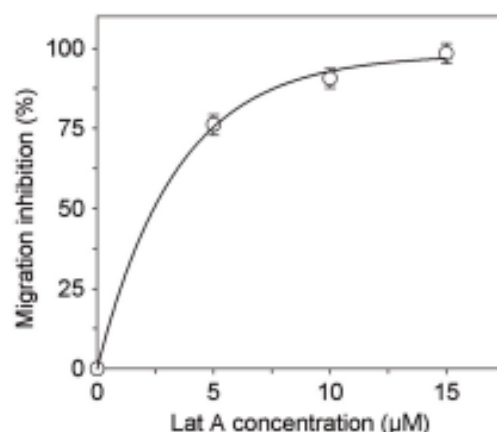


Fig. 2. Variation of migration inhibition with the concentration of added latrunculin A (Lat A) solution. Mean of 3 replicates. Vertical bars are 1 SE. Line represents the fit of the exponential decay model

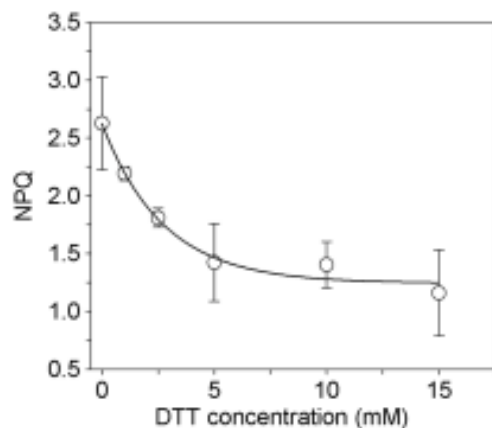


Fig. 3. Inhibition of non-photochemical quenching (NPQ) as a function of concentration of added dithiothreitol (DTT) solution. NPQ induced upon exposure to $400 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Mean of 3 replicates. Vertical bars are 1 SE. Line represents the fit of the exponential decay model

ever, $\Delta F/F_m'$ levels were usually higher in Lat A-treated samples than in those treated with both inhibitors (Figs. 4 & 5). Following the transition to low light, a clear recovery response was observed for all samples, with $\Delta F/F_m'$ reaching in all cases over 60% of initial values after 15 min. Treatment with Lat A effectively inhibited vertical migration during the whole experiment, as indicated by the small variation in F_v in Lat A-treated samples (on average, -12.1% for samples treated with Lat A and Lat A + DTT) compared to the controls (-43.5% ; Fig. 6). The effects of inhibitors were particularly evident during recovery

under low light, during which $\Delta F/F_m'$ followed the negative exponential pattern described by Eq. (6), the fit of which was very good in all cases ($r^2 > 0.91$; Fig. 7). Control samples recovered more rapidly than those treated with inhibitors, so that 3 min after the return to low light, the $\Delta F/F_m'$ of non-inhibited samples was over 70% and 60% higher than on samples treated with Lat A in May and October, respectively. In both periods, these differences were gradually reduced during exposure to low light, but after 10.5 min, the percentage of recovery was significantly different among treatments and sampling periods (2-way ANOVA, $p < 0.001$ for both factors). In both May and October, the recovery of $\Delta F/F_m'$ was higher in the controls than in the Lat A-treated samples (control vs. Lat A; Tukey's post-hoc test, $p = 0.043$ and $p = 0.010$, respectively), which was in turn higher than in samples treated with Lat A and DTT (Lat A vs. Lat A + DTT; Tukey's post-hoc test, $p = 0.042$ and $p = 0.030$, respectively). The percentage of recovery was in all cases significantly higher in May than in October (Tukey's post-hoc test, $p < 0.05$), with the exception of samples treated with both inhibitors (Tukey's post-hoc test, $p = 0.107$).

Photoprotection efficiency and extent of photoinhibition

Depending on the species, the full recovery of the xanthophyll cycle after a transition from high to low light generally occurs after 6 to 15 min (Goss et al.

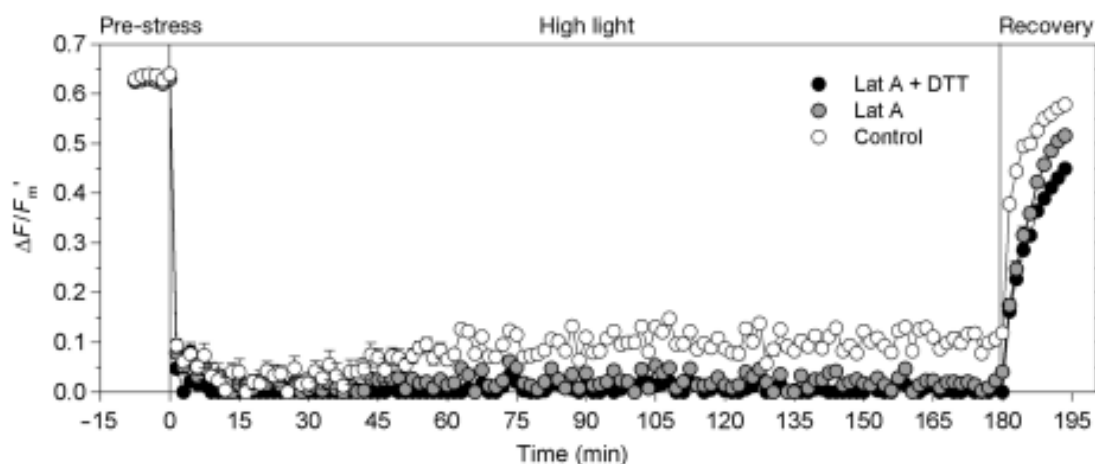


Fig. 4. Light stress-recovery experiment. Variation of PSII quantum yield, $\Delta F/F_m'$, during sequential exposure to low light (pre-stress, $55 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), light stress under high light (high light, $1200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 180 min) and recovery under low light (recovery, $55 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10.5 min) for controls and for samples treated with migration inhibitor latrunculin A (Lat A) and with migration and xanthophyll cycle inhibitors (Lat A + dithiothreitol [DTT]), collected in May 2010. Mean of 3 replicates. Vertical bars are 1 SE

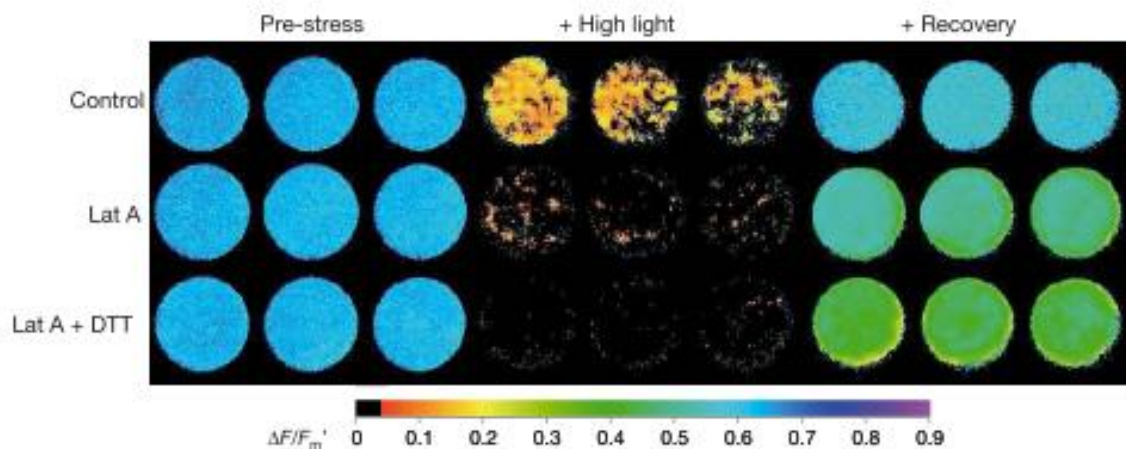


Fig. 5. PSII quantum yield, $\Delta F/F_m'$ (false color scale), as measured in the sediment samples used in the light stress experiment described in Fig. 4 at the end of first low light exposure (pre-stress, $55 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), at the end of high light exposure (high light, $1200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 180 min) and following recovery under low light (recovery, $55 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10.5 min). Three replicated areas of interest for each treatment

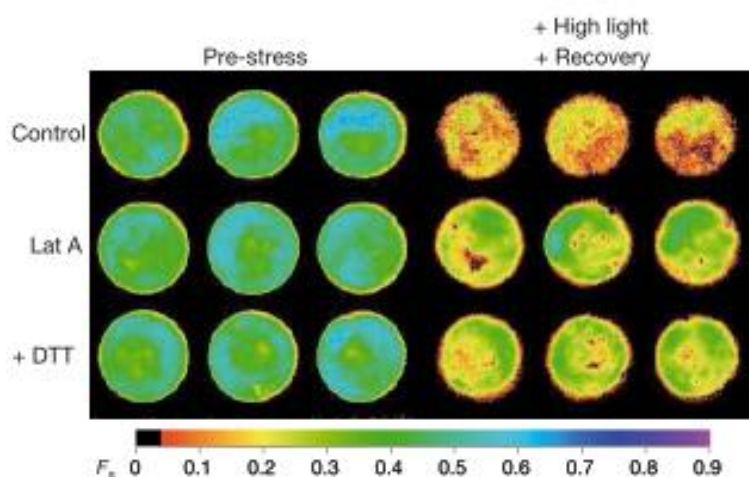


Fig. 6. Fluorescence level F_x (false color scale) as measured in the sediment samples used in the light stress experiment described in Fig. 4 at the end of first low light exposure (pre-stress, $55 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) and after recovery following end of high light exposure (high light, $1200 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 180 min; recovery, $55 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 10.5 min). Three replicated areas of interest for each treatment

2006, B. Lepetit & J. Lavaud pers. obs.). Considering the intermediate period of 10.5 min, the recovery of $\Delta F/F_m'$ at this time was used as an estimate of the photoprotection capacity and to calculate the extent of photoinhibition that occurred. The results indicate that the microphytobenthic biofilms had a large photoprotective capacity in both periods, with a correspondingly low percentage of photoinhibition below 25%, although higher in May than in October (87.7 and 78.0%; Fig. 8, Table 2). From the reduction in the

photoprotection capacity measured in samples treated with inhibitors, the contribution of vertical migration and of the xanthophyll cycle to overall photoprotection were estimated to reach a combined value only slightly above 20% (Table 2). While in May the 2 processes had a comparable contribution to photoprotection, the relative importance of the xanthophyll cycle was reduced to 7.2% in October.

Taxonomic composition

In both sampling periods, the microphytobenthic assemblages were dominated by long biraphid diatoms (length > 30 μm). In May, the assemblages were mainly dominated by *Navicula cf. spartinentensis* (61%, $n = 350$). *Staurophora salina* represented <20% of the assemblages, but this species was 2-fold longer than *N. cf. spartinentensis* (22 and 44 μm long, respectively). In October, the assemblages were co-dominated by *Plagiotropis seriata* (22%, $n = 335$) and *Staurophora salina* (19%); the size of *P. seriata* (190 μm long) was 4-fold greater than that of *S. salina* (44 μm long), strengthening its dominance in terms of biovolume. A third species, *Pleurosigma strigosum* (300 μm length), represented <10% of the assemblage abundance.

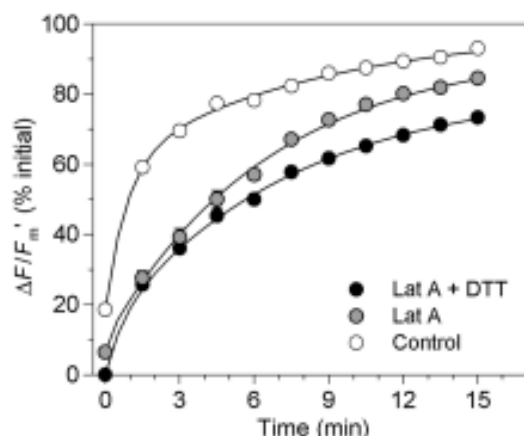


Fig. 7. Recovery of PSII quantum yield, $\Delta F/F_m'$, during relaxation following light stress for control samples and for samples treated with migration inhibitor latrunculin A (Lat A) and with migration and xanthophyll cycle inhibitors (Lat A + dithiothreitol [DTT]). Lines represent the exponential model described by Eq. (6) fitted to average $\Delta F/F_m'$ values. Detail of Fig. 4. Vertical bars are 1 SE

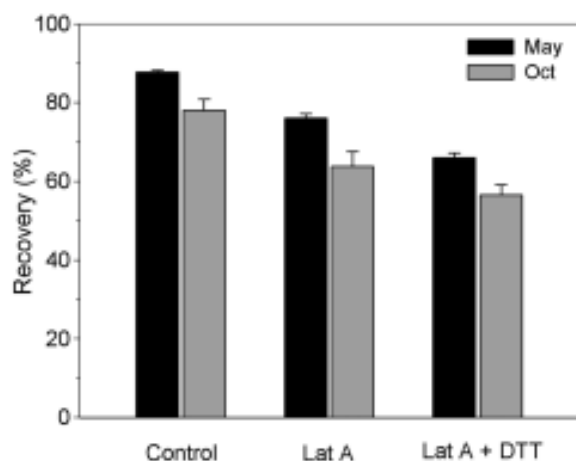


Fig. 8. Efficiency of photoprotection, as percentage of recovery after 10.5 min low light following high light exposure, in May and October for controls and inhibitor-treated samples. Mean of 3 replicates. Vertical bars are 1 SE

DISCUSSION

Photoacclimation and susceptibility to photoinhibition

Compared to those from May, samples collected in October appeared acclimated to lower light levels, showing the pattern typically associated to 'shade-acclimation': a combination of higher values of α and lower values of ETR_m , resulting in lower values of E_k , usually taken as an indication of photosynthesis saturating at lower irradiances. This change in photoacclimation state between May and October was consistent with that expected from the observed seasonal change in solar light conditions preceding the 2 sampling periods (global solar radiation >2-fold higher in May than in October). These results also are in agreement with previous observations on the seasonal variability of microphytobenthos photosynthetic performance, showing patterns of acclimation to higher light levels during spring/summer and to lower levels in autumn/winter (Blanchard et al. 1997, Migné et al. 2004, Seródio et al. 2006). In this context, seasonal variation of UV irradiance may have also played a role (Wulff et al. 2008). The results were also consistent with the photoacclimation response of benthic diatoms grown in culture exposed to low- and high-light regimes (Perkins et al. 2006, Schumann et al. 2007, Cruz & Seródio 2008). Increases of α , such as that observed from May to October, are commonly attributed to an increase in the cellular content of light-harvesting pigments, increasing the fraction of incident light that is intercepted and absorbed for photosynthesis; decreases in ETR_m are typically associated with the decrease in the activity of the electron transport chain or the Calvin cycle, limiting factors of light-saturated photosynthesis (Henley 1993, MacIntyre et al. 2002, Behrenfeld et al. 2004).

A change in light response was also noticeable regarding NPQ, with the samples collected in October showing NPQ activation starting at lower light

Table 2. Extent of photoinhibition and efficiency of photoprotection (%), calculated as percentage of $\Delta F/F_m'$ recovery after 10.5 min. Relative contributions of vertical migration and of the xanthophyll cycle to overall photoprotection (%), as calculated from the reduction of the $\Delta F/F_m'$ recovery in samples treated with latrunculin A (Lat A) and with Lat A and dithiothreitol, respectively, relative to control samples. Means \pm SE of 3 replicates are shown. Numbers within parentheses indicate results obtained when considering 6 and 15 min of recovery, respectively

	Photoinhibition	Recovery	Vertical migration	Xanthophyll cycle	Others
May	12.3 \pm 0.55 (16.6, 11.7)	87.7 \pm 0.55 (83.4, 88.3)	10.6 (24.0, 3.6)	10.1 (6.4, 13.2)	79.3 (69.5, 83.2)
October	22.0 \pm 2.79 (33.7, 17.0)	78.0 \pm 2.79 (66.3, 83.0)	14.3 (17.0, 11.7)	7.2 (7.3, 5.8)	78.5 (75.7, 82.5)

levels (lower E_{50}) and higher values of NPQ for most irradiances (higher NPQ_{max}). As with ETR, the observed variation in the NPQ vs. E curves was consistent with that previously reported for microphytobenthos (Seródio et al. 2006) or for benthic diatoms acclimated to different light regimes (Cruz & Seródio 2008).

However, while changes in the light-response of ETR may be interpreted and related to underlying physiological processes in a relatively straightforward manner, the physiological meaning of changes in NPQ levels is more difficult to ascertain. This is because the 2 components of NPQ, q_E (photoprotection) and q_I (photoinhibition), can only be distinguished through the analysis of the recovery kinetics after exposure to high light, but not from NPQ light curves. In the present study, the light stress-recovery experiments allowed the conclusion that the observed change in the NPQ light-response curves was due to a decrease in the q_E component and a concomitant increase in the q_I component. In the absence of information from NPQ recovery kinetics, similar increases in NPQ vs. E curves in autumn/winter periods have been, perhaps wrongly, interpreted as being due to an increase in photoprotective capacity (Seródio et al. 2005, 2006).

Furthermore, the results from the light stress-recovery experiments revealed an association between photoacclimation status and photoprotection efficiency, not shown before for these communities. Whatever the cause, the acclimation to high light observed in May was associated with a high photoprotection capacity, while the acclimation to low light observed in October coincided with a loss of photoprotection and a higher susceptibility to photoinhibition.

Photoprotection vs. photoinhibition

A central finding of the present study is that photoinhibition was in all cases considerably low (ca. 20%), indicating photoprotection to be particularly efficient in the studied microphytobenthic biofilms. Despite the general view that these assemblages hardly show any photoinhibition (Blanchard et al. 2004, Waring et al. 2007, Mouget et al. 2008), this process has been shown to occur under *in situ* conditions (Seródio et al. 2008). Curiously, the rates of photoinhibition estimated in Seródio et al. (2008), reaching up to ca. 18%, are similar to the values reported here, despite the fact that the previous values were estimated from hysteresis patterns ob-

served during complete periods of low tide exposure. The results of the present study therefore confirm that the photoprotective mechanisms available to benthic diatoms are not completely efficient in preventing some degree of photoinhibitory damage. However, the difficulty in comparing the measured rates of photoinhibition with results published for other habitats or for other estuarine primary producers, such as phytoplankton, seagrasses or macroalgae, should be stressed. Apart from the light history and the species-specific differences, the extent of photoinhibition is directly related to light dosage, determined by light intensity and duration of exposure, both largely variable among the different experimental protocols used in different laboratory and field studies.

A number of unaccounted for factors may have contributed to the measured low values of q_I . First, the well-known effect of depth-integration of subsurface fluorescence (Forster & Kromkamp 2004, Seródio 2004). This effect is caused by the fact that only the cells at or near the surface are actually exposed to the high light levels measured incident to the sediment surface, while the fluorescence signal measured above the surface also accounts for fluorescing cells positioned deeper in the photic zone, which are actually exposed to lower light levels in their microhabitat.

The expected effect is a light-dependent overestimation of biofilm-level $\Delta F/F_m'$ relative to the inherent, physiological values of the cells at the surface, which is then expected to cause a systematic overestimation of q_E and underestimation of q_I (Seródio 2004). However, besides this static effect, dynamic effects can also be expected. During prolonged exposure to high light, the downward migration of microalgae to less illuminated layers is likely to induce a gradual increase of $\Delta F/F_m'$ (as measured at the surface) independently of any photophysiological changes, thus causing the overestimation of q_E . It is also conceivable that these types of effects may affect the measurement of $\Delta F/F_m'$ during the recovery under low light due to upward migration as a response to the decrease in incident irradiance. This, however, seems less likely due to the relatively short time of this period and to the fact that a transition from high to low light is a weaker stimulus for vertical migration, especially if the transition coincides with the end of the low tide period (Coelho et al. 2011).

A second factor that might explain the low values of q_I is the light doses applied during the light stress-recovery experiments in the laboratory.

Because these doses (3 h, 1200 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were likely lower than the ones received during a typical period of exposure at low tide (up to 8–10 h, 1500–2000 $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$), larger, but still ecologically relevant, light doses could have been applied that would likely induce larger cumulative photoinhibitory effects. The light exposure conditions applied in the present study, both regarding light intensity and duration, resulted from a compromise among inducing measurable effects, addressing instrument limitations (maximum PAR irradiance provided by the imaging fluorometer), and minimizing uncontrollable experimental conditions (excessive sample heating and desiccation caused by the fluorometer LED panel). Despite these limitations, mostly instrument-related, the laboratory experimental approach used in the present study has the advantage over studies carried out under *in situ* conditions (e.g. Seródio et al. 2008, Perkins et al. 2010) of allowing the application of controlled and reproducible conditions, making it possible to directly compare the migratory and physiological responses of samples collected in different places and occasions.

The estimation of q_E and q_I is also directly affected by the type of analysis made of the recovery kinetics to distinguish the 2 components of NPQ. For higher plants, q_E and q_I are distinguished on the basis of the recovery rate of F_v/F_m , typically 10 to 15 min, which is assumed to correspond to the full reversal of the xanthophyll cycle (Horton & Hague 1988, Ruban & Horton 1995). Following the common practice for the distinction of q_E and q_I , in the present study, these 2 components of NPQ were estimated based on a relaxation time of the xanthophyll cycle of 10.5 min. However, to evaluate the possible effects of considering different times for the reversal of the xanthophyll cycle on the relative magnitude of q_E and q_I , a sensitivity analysis was performed consisting of the recalculation of these estimates when considering 6 and 15 min, values matching the range of relaxation times of the xanthophyll cycle expectable for diatoms (Goss et al. 2006, B. Lepetit & J. Lavaud pers. obs.). The use of these different recovery periods did not alter significantly the general findings of the present study, including high levels of recovery and low photoinhibition rates, the increase in photoinhibition levels from May to October, and a relatively low (<30%) combined contribution of vertical migration and xanthophyll cycle to overall photoprotection (Table 2). Nonetheless, this analysis shows some effects, although largely expected from the asymptotic pattern of $\Delta F/F_m'$ recovery during the con-

sidered period: the use of a shorter period resulted in the estimation of lower rates of recovery, leading to a likely overestimation of photoinhibition rates; conversely, longer periods resulted in larger rates of recovery and probably overestimated levels of photoprotection (Table 2). Moreover, due to the different relaxation patterns of samples exposed to different treatments, the evaluation of the relative importance of vertical migration and the xanthophyll cycle was also affected by the time period considered, with shorter and longer recovery periods resulting in a higher apparent contribution of vertical migration and of the xanthophyll cycle, respectively. These effects, however, did not substantially affect the overall pattern of variation of the role of the 2 photoprotective processes between the 2 sampling periods.

Recently, a more sophisticated method, based on the mathematical modeling and deconvolution of the recovery curve, was proposed to trace the recovery of each individual component of NPQ (Roháček 2010). This method could not be applied in the present study because of the particularities of the xanthophyll cycle in diatoms, which may not verify the assumptions of the method. First, diatoms lack q_T (the state-transition quenching) (Owens 1986, Lavaud 2007, Goss & Jakob 2010), which called for the modification of this model to a 2-component NPQ. Second, it is impossible to use changes in F_v/F_m in biofilms as an indication of photoinhibition because this requires the darkening of the samples, known to induce changes in F_m levels due to vertical migration. Furthermore, in benthic diatoms, dark adaptation often causes the F_m level to decrease to values below F_m' levels measured under low light (Seródio et al. 2006). These reasons also prevented the use of other recently proposed methods to quantify the components of NPQ (Ahn et al. 2009, Guadagno et al. 2010).

The formation of DT in the dark and thus anoxic subsurface layers of the sediment, known to occur in diatoms (Jakob et al. 2001) and especially in benthic assemblages (Seródio et al. 2006), is a likely explanation for the apparent impossibility to completely eliminate NPQ by applying the xanthophyll cycle inhibitor DTT (Fig. 3). The DT thus formed would remain present despite the treatment with DTT, which prevents new conversion of DD to DT but does not induce the reversed reaction. Upon exposure to high light, the oxygenation of DT-rich subsurface layers would allow for the observed rise in NPQ, as the formation of NPQ from DT is known to be inhibited by anoxia (Cruz et al. 2011).

Photoprotection: vertical migration vs. xanthophyll cycle

The use of specific inhibitors for vertical migration and for the operation of the xanthophyll cycle allowed estimation of the relative contribution of each of these processes to overall photoprotection of the biofilm. The results showed a change with season and photoacclimation state of their relative importance. While in May the 2 processes seemed to contribute similarly to biofilm photoprotection, the loss of photoprotection capacity from May to October was associated with a decrease in the contribution of the xanthophyll cycle, so that vertical migration became the dominant photoprotective process. The observed change in the species composition of the microphytobenthic assemblage may explain this difference because the activity of the xanthophyll cycle can differ among species (Lavaud et al. 2004, Goss et al. 2006). It may also be hypothesized that this difference is related to the decrease in rates of enzymatic conversion between DD and DT associated with photoacclimation or due to acclimation to lower temperatures (Van Leeuwe et al. 2008), an effect that is also species-related (Salleh & McMinn 2011). Nevertheless, these results indicate that behavioral photoprotection seems able to maintain the overall photoprotection capacity, compensating for the decrease in the contribution of the xanthophyll cycle during the winter season.

The change in species composition, involving a dominance of larger cells in October, could also have affected the migratory response of the assemblages to high light. However, although some studies have shown a relation between migratory cell size and migratory behavior in sediments (Hay et al. 1993, Underwood et al. 2005), there is no evidence that cell size is an important factor regarding the migratory response to light stress. Also, the selective nature of the sampling method used may have resulted in an underestimation of the true variability in species composition at the surface.

Vertical migration and the xanthophyll cycle have been considered as the main photoprotective mechanisms in microphytobenthic biofilms (Seródio et al. 2005, Jesus et al. 2006, Mouget et al. 2008, Seródio et al. 2008, Perkins et al. 2010). A perhaps surprising result of the present study is the relatively low contribution of these 2 processes to overall photoprotection. This suggests the potential role of other processes responsible for the observed low rates of photoinhibition. Likely candidates include the cyclic electron flow around PSII (Lavaud et al. 2002b,

Lavaud 2007), the efficient scavenging of reactive oxygen species (Roncarati et al. 2008, Waring et al. 2010), or high turnover rates of the PSII protein D1 (Wu et al. 2011).

Use of inhibitors on microphytobenthic biofilms

An aim of the present study was the introduction of a new experimental protocol to estimate photoprotection efficiency and the extent of photoinhibition in microphytobenthic biofilms. This involved the combination of (1) the use of specific inhibitors for different photoprotective processes, applied alone and in combination with each other, allowing the estimation of the relative contribution of each process to overall photoprotection, and (2) the use of imaging fluorometry on replicated samples in well plates, taking advantage of the self-forming nature of microphytobenthic biofilms from homogenized sediments, which allowed for adequate replication and low variability among replicates and for the simultaneous testing of different treatments.

Some potential pitfalls exist regarding the use of inhibitors on biofilms and the interpretation of results. First, it must be noted that when comparing controls (no inhibitor added) with Lat A-treated samples, it is likely that the differences in fluorescence parameters observed over time may be attributed not only to changes in cell physiological conditions but also to changes in cell composition in the upper layers of the sediment. This is because in the controls, as opposed to Lat A-treated samples, cells initially at the surface likely migrated down into layers below the photic zone, therefore changing the contribution to the fluorescence signal measured at the surface. As a consequence, any observed differences are expected to represent mainly changes at the biofilm (i.e. community) level and not only changes in the physiology of individual cells. This also explains the need to combine Lat A and DTT if the effect of inhibiting the xanthophyll cycle is to be evaluated in the same microalgal assemblage. By adding DTT to samples treated with Lat A, it is ensured that the same cells remain in the photic zone of the sediment and that measured changes in fluorescence are due to changes in their physiological status and not to changes in community composition. If only DTT is applied (Perkins et al. 2010), only biofilm-level effects can be evaluated, as many cells will likely respond to high light by migrating downward and become unobservable (Oxborough et al. 2000).

Acknowledgements. We thank Dr. C. Vincent and M. France and J. F. Breilh for providing solar radiation data and geographical data, respectively. The present study was supported by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia through grants SFRH/BSAB/962/2009 (J.S.), SFRH/BD/44860/2008 (J.E.), and project MigROS (PTDC/MAR/112473/2009) and by the Centre National de la Recherche Scientifique ('chercheurs invités' program, J.S. and J.L.), the regional Charente-Maritime/CG17 (A.B. PhD grant), and by the French consortium CPER-Littoral. We thank 3 anonymous reviewers for their critical comments on the manuscript.

LITERATURE CITED

- Admiraal W (1984) The ecology of estuarine sediment-inhabiting diatoms. *Prog Phycol Res* 3:269–322
- Ahn TK, Avenson TJ, Peers G, Li Z and others (2009) Investigating energy partitioning during photosynthesis using an expanded quantum yield convention. *Chem Phys* 357: 151–158
- Behrenfeld MJ, Prasil O, Babin M, Bruyant F (2004) In search of a physiological basis for covariations in light-limited and light-saturated photosynthesis. *J Phycol* 40: 4–25
- Blanchard GF, Cariou-Le Gall V (1994) Photosynthetic characteristics of microphytobenthos in Marennes-Oléron Bay, France: preliminary results. *J Exp Mar Biol Ecol* 182:1–14
- Blanchard GF, Guarini JM, Gros P, Richard P (1997) Seasonal effect on the relationship between the photosynthetic capacity of intertidal microphytobenthos and temperature. *J Phycol* 33:723–728
- Blanchard GF, Guarini JM, Dang C, Richard P (2004) Characterizing and quantifying photoinhibition in intertidal microphytobenthos. *J Phycol* 40:692–696
- Brotas V, Risgaard-Petersen N, Ottosen L, Seródio J, Ribeiro L, Dalsgaard T (2003) *In situ* measurement of photosynthetic activity and respiration of intertidal benthic microalgal communities undergoing vertical migration. *Ophelia* 57:13–26
- Brunet C, Lavaud J (2010) Can the xanthophyll cycle help extract the essence of the microalgal functional response to a variable light environment? *J Plankton Res* 32: 1609–1617
- Cartaxana P, Seródio J (2008) Inhibiting diatom motility: a new tool for the study of the photophysiology of intertidal microphytobenthic biofilms. *Limnol Oceanogr Methods* 6:466–476
- Cartaxana P, Brotas V, Seródio J (2008) Effects of two motility inhibitors on the photosynthetic activity of the diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Pleurosigma angulatum*. *Diatom Res* 23:65–74
- Cartaxana P, Ruivo M, Hubas C, Davidson I, Seródio J, Jesus B (2011) Physiological versus behavioural photoprotection in intertidal epipellic and epipsamic benthic diatom communities. *J Exp Mar Biol Ecol* 405:120–127
- Chevalier EM, Gévaert F, Créach A (2010) *In situ* photosynthetic activity and xanthophylls cycle development of undisturbed microphytobenthos in an intertidal mudflat. *J Exp Mar Biol Ecol* 385:44–49
- Coelho H, Vieira S, Seródio J (2009) Effects of desiccation on the photosynthetic activity of intertidal microphytobenthos biofilms as studied by optical methods. *J Exp Mar Biol Ecol* 381:98–104
- Coelho H, Vieira S, Seródio J (2011) Endogenous versus environmental control of vertical migration by intertidal benthic microalgae. *Eur J Phycol* 46:271–281
- Consalvey M, Paterson DM, Underwood GJC (2004) The ups and downs of life in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. *Diatom Res* 19:181–202
- Cook PLM, Roy H (2006) Advective relief of CO₂ limitation in microphytobenthos in highly productive sandy sediments. *Limnol Oceanogr* 51:1594–1601
- Cruz S, Seródio J (2008) Relationship of rapid light curves of variable fluorescence to photoacclimation and non-photochemical quenching in a benthic diatom. *Aquat Bot* 88: 256–264
- Cruz S, Goss R, Wilhelm C, Leegood R, Horton P, Jakob T (2011) Impact of chlororespiration on non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and on the regulation of the diadinoxanthin cycle in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J Exp Bot* 62:509–519
- Eilers PHC, Peeters JCH (1988) A model for the relationship between light intensity and the rate of photosynthesis in phytoplankton. *Ecol Modell* 42:199–215
- Forster RM, Kromkamp JC (2004) Modelling the effects of chlorophyll fluorescence from subsurface layers on photosynthetic efficiency measurements in microphytobenthic algae. *Mar Ecol Prog Ser* 284:9–22
- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta* 990:87–92
- Goss R, Jakob T (2010) Regulation and function of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in algae. *Photosynth Res* 106:103–122
- Goss R, Pinto AE, Wilhelm C, Richter M (2006) The importance of a highly active and ΔpH-regulated diatoxanthin epoxidase for the regulation of the PS II antenna function in diadinoxanthin containing algae. *J Plant Physiol* 163: 1008–1021
- Guadagno CR, Virzo De Santo A, D'Ambrosio N (2010) A revised energy partitioning approach to assess the yields of non-photochemical quenching components. *Biochim Biophys Acta* 1797:525–530
- Hay SI, Maitland TC, Paterson DM (1993) The speed of diatom migration through natural and artificial substrata. *Diatom Res* 8:371–384
- Henley WJ (1993) Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in algae in the context of photoinhibition and diel changes. *J Phycol* 29:729–739
- 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). *Mar Ecol Prog Ser* 282:33–44
- Horton P, Hague A (1988) Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in isolated barley protoplasts. 4. Resolution of non-photochemical quenching. *Biochim Biophys Acta* 932:107–115
- Jakob T, Goss R, Wilhelm C (2001) Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricoratum*. *J Plant Physiol* 158: 383–390
- Jesus B, Perkins RG, Consalvey M, Brotas V, Paterson DM (2006) Effects of vertical migrations by benthic microalgae on fluorescence measurements of photophysiology. *Mar Ecol Prog Ser* 315:55–66

- Jordan L, McMinn A, Thompson P (2010) Diurnal changes of photoadaptive pigments in microphytobenthos. *J Mar Biol Assoc UK* 90:1025–1032
- Kromkamp J, Barranguet C, Peene J (1998) Determination of microphytobenthos PSII quantum efficiency and photosynthetic activity by means of variable chlorophyll fluorescence. *Mar Ecol Prog Ser* 162:45–55
- Lavaud J (2007) Fast regulation of photosynthesis in diatoms: mechanisms, evolution and ecophysiology. *Funct Plant Sci Biotechnol* 1:267–287
- Lavaud J, Rousseau B, Etienne AL (2002a) In diatoms, a transthylakoidal proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching. *FEBS Lett* 523:163–166
- Lavaud J, Gorkom HJV, Etienne AL (2002b) Photosystem II electron transfer cycle and chlororespiration in planktonic diatoms. *Photosynth Res* 74:51–59
- Lavaud J, Rousseau B, Etienne AL (2004) General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *J Phycol* 40:130–137
- MacIntyre HL, Kana TM, Anning T, Geider RJ (2002) Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J Phycol* 38:17–38
- Méléder V, Rincé Y, Barillé L, Gaudin P, Rosa P (2007) Spatio-temporal changes in microphytobenthos assemblages in a macrotidal flat (Bourgneuf Bay, France). *J Phycol* 43:1177–1190
- Migné A, Spilmont N, Davoult D (2004) In situ measurements of benthic primary production during emersion: seasonal variations and annual production in the Bay of Somme (eastern English Channel, France). *Cont Shelf Res* 24:1437–1449
- Miles A, Sundbäck K (2000) Diel variation in microphytobenthic productivity in areas of different tidal amplitude. *Mar Ecol Prog Ser* 205:11–22
- Mouget JL, Perkins R, Consalvey M, Lefebvre S (2008) Migration or photoacclimation to prevent high irradiance and UV-B damage in marine microphytobenthic communities. *Aquat Microb Ecol* 52:223–232
- Müller P, Li XP, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125:1558–1566
- Nishiyama Y, Allakhverdiev SI, Murata N (2006) A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 1757:742–749
- Olaizola M, Yamamoto HY (1994) Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 30:606–612
- Owens TG (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricoratum* II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol* 80:732–738
- Oxborough K, Hanlon ARM, Underwood GJC, Baker NR (2000) In vivo estimation of the photosystem II photochemical efficiency of individual microphytobenthic cells using high-resolution imaging of chlorophyll a fluorescence. *Limnol Oceanogr* 45:1420–1425
- Perkins RG, Mouget JL, Lefebvre S, Lavaud J (2006) Light response curve methodology and possible implications in the application of chlorophyll fluorescence to benthic diatoms. *Mar Biol* 149:703–712
- Perkins RG, Kromkamp J, Seródio J, Lavaud J and others (2010a) The application of variable chlorophyll fluorescence to microphytobenthic biofilms. In: Suggat D, Prasil O, Borowitzka MA (eds) *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*, Series: developments in applied phycology, Vol 4. Springer, Dordrecht, p 237–276
- Perkins RG, Lavaud J, Seródio J, Mouget JL and others (2010b) Vertical cell movement is the primary response of intertidal benthic biofilms to increasing light dose. *Mar Ecol Prog Ser* 416:93–103
- Ribeiro L (2010) Intertidal benthic diatoms of the Tagus estuary: taxonomic composition and spatial-temporal variation. PhD thesis, University of Lisbon
- Rijstenbil JW (2005) UV- and salinity-induced oxidative effects in the marine diatom *Cylindrotheca closterium* during simulated emersion. *Mar Biol* 147:1063–1073
- Ritchie RJ (2008) Fitting light saturation curves measured using modulated fluorometry. *Photosynth Res* 96:201–215
- Roháček K (2010) Method for resolution and quantification of components of the non-photochemical quenching (q_N). *Photosynth Res* 105:101–113
- Roncarati F, Rijstenbil JW, Pistocchi R (2008) Photosynthetic performance, oxidative damage and antioxidants in *Cylindrotheca closterium* in response to high irradiance, UVB radiation and salinity. *Mar Biol* 153:965–973
- Ruban AV, Horton (1995) An investigation of the sustained component of nonphotochemical quenching of chlorophyll fluorescence in isolated chloroplasts and leaves of spinach. *Plant Physiol* 108:721–726
- Salleh S, McMinn A (2011) The effects of temperature on the photosynthetic parameters and recovery of two temperate benthic microalgae, *Amphora cf. coffeaeformis* and *Cocconeis cf. sublitoralis* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 47:1413–1424
- Schumann A, Goss R, Jakob T, Wilhelm C (2007) Investigations on the quenching efficiency of diatoxanthin in cells of *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae) with different pool sizes of xanthophyll cycle pigments. *Phycologia* 46:113–117
- Seródio J (2004) Analysis of variable chlorophyll fluorescence in microphytobenthos assemblages: implications of the use of depth-integrated measurements. *Aquat Microb Ecol* 36:137–152
- Seródio J, Catarino F (1999) Fortnightly light and temperature variability on estuarine intertidal sediments and implications for microphytobenthos primary productivity. *Aquat Ecol* 33:235–241
- Seródio J, Lavaud J (2011) A model for describing the light response of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence. *Photosynth Res* 108:61–76
- Seródio J, Cruz S, Vieira S, Brotas V (2005) Non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence and operation of the xanthophyll cycle in estuarine microphytobenthos. *J Exp Mar Biol Ecol* 326:157–169
- Seródio J, Vieira S, Cruz S, Coelho H (2006) Rapid light-response curves of chlorophyll fluorescence in microalgae: relationship to steady-state light curves and non-photochemical quenching in benthic diatom-dominated assemblages. *Photosynth Res* 90:29–43
- Seródio J, Vieira S, Cruz S (2008) Photosynthetic activity, photoprotection and photoinhibition in intertidal microphytobenthos as studied in situ using variable chlorophyll fluorescence. *Cont Shelf Res* 28:1363–1375

- Underwood GJC (2002) Adaptations of tropical marine microphytobenthic assemblages along a gradient of light and nutrient availability in Suva Lagoon, Fiji. *Eur J Phycol* 37:449–462
- Underwood GJC, Kromkamp J (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Adv Ecol Res* 29:93–153
- Underwood GJC, Nilsson C, Sundbäck K, Wulff A (1999) Short-term effects of UVB radiation on chlorophyll fluorescence, biomass, pigments, and carbohydrate fractions in a benthic diatom mat. *J Phycol* 35:656–666
- Underwood GJC, Perkins RG, Consalvey MC, Hanlon ARM, Oxborough K, Baker NR, Paterson DM (2005) Patterns in microphytobenthic primary productivity: species-specific variation in migratory rhythms and photosynthetic efficiency in mixed-species biofilms. *Limnol Oceanogr* 50:755–767
- Van Leeuwe MA, Brotas V, Consalvey M, Forster RM and others (2008) Photoacclimation in microphytobenthos and the role of xanthophyll pigments. *Eur J Phycol* 43: 123–132
- Walters RG, Horton P (1991) Resolution of components of non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching in barley leaves. *Photosynth Res* 27:121–133
- Waring J, Baker NR, Underwood GJC (2007) Responses of estuarine intertidal microphytobenthic algal assemblages to enhanced ultraviolet B radiation. *Glob Change Biol* 13:1398–1413
- Waring J, Klenell M, Bechtold U, Underwood GJC, Baker NR (2010) Light-induced responses of oxygen photoreduction, reactive oxygen species production and scavenging in two diatom species. *J Phycol* 46:1206–1217
- Wu H, Cockshutt AM, McCarthy A, Campbell DA (2011) Distinctive photosystem II photoinactivation and protein dynamics in marine diatoms. *Plant Physiol* 156: 2184–2195
- Wulff A, Roleda MY, Zacher K, Wiencke C (2008) UV radiation effects on pigments, photosynthetic efficiency and DNA of a semi-natural Antarctic marine benthic diatom community. *Aquat Biol* 3:167–177

Editorial responsibility: Rutger de Wit, Montpellier, France

*Submitted: January 17, 2012; Accepted: July 30, 2012
Proofs received from author(s): September 30, 2012*

Partie 5B-2 : Martin Laviale, Alexandre Barnett, João Ezequiel, Bernard Lepetit, Silja Frankenbach, Catarina Pais, Vona Méléder, João Serôdio and Johann Lavaud (in prep.). Response of intertidal benthic microalgal biofilms to a coupled light-temperature stress: evidence for latitudinal adaptation along the Atlantic coast of Southern Europe.

I. Introduction

In marine intertidal habitats, photosynthetic organisms have to cope with largely variable and sometimes extreme conditions of the main forcing environmental factors such as light and temperature (Admiraal, 1984, MacIntyre *et al.*, 1996, Underwood et Kromkamp, 1999, Paterson et Hagerthey, 2001). This is the case of benthic microalgae communities (or microphytobenthos) inhabiting estuarine tidal flats which are often dominated by diatoms under temperate latitudes (Haubois *et al.*, 2005, Méléder *et al.*, 2007, Ribeiro *et al.*, 2013). Intertidal microphytobenthos is periodically exposed to air at low tides during which light and temperature changes are the result of complex interplay of tide-timing, weather conditions and sediment composition (and hence light penetration) (Admiraal, 1984, Underwood et Kromkamp, 1999, Paterson et Hagerthey, 2001). As a result, microphytobenthos photosynthesis has to operate often under the combined action of extreme light and temperature, conditions potentially limiting of photosynthetic activity and of primary productivity (Blanchard *et al.*, 1997, Blanchard et Guarini, 1998a, Guarini *et al.*, 1998, Guarini *et al.*, 2006). Light levels exceeding the photosynthetic capacity result in photooxidative stress driven by the accumulation of intracellular reactive oxygen species (ROS; (Janknegt *et al.*, 2008); (Roncarati *et al.*, 2008); (Van de Poll *et al.*, 2009); (Waring *et al.*, 2010)). Ultimately, this can lead to photoinhibition, the slowly-reversible deleterious effects on key components of the photosynthetic apparatus, such as the photosystem II (PSII) protein D1 (Wu *et al.*, 2012, Cartaxana *et al.*, 2013).

Intertidal flats are one of the most productive ecosystems on Earth, largely owing to the photosynthetic productivity of microphytobenthos (Underwood et Kromkamp, 1999). The actual photoinhibitory effects on the photosynthetic productivity depend on the photoadaptive strategy of microphytobenthos, i.e. the operating efficiency of a range of protective mechanisms which consist of ‘physiological’ and ‘behavioural’ photoprotection. For benthic diatoms, ‘physiological photoprotection’ mainly includes the non-photochemical quenching of chlorophyll (Chl) *a* fluorescence (NPQ) and the xanthophyll cycle (XC), while the ‘behavioural photoprotection’ consists of a strong negative phototaxis (Mouget *et al.*,

2008, Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011, Serôdio *et al.*, 2012). In diatoms, XC consists of the reversible light-dependent conversion of pigment diadinoxanthin (DD) into an excess energy-dissipation form, diatoxanthin (DT) (Goss et Jakob, 2010). NPQ is partially controlled by the presence of DT and of specific light-harvesting proteins (Lhcx) (Lavaud, 2007, Depauw *et al.*, 2012). NPQ and XC have been hypothesized to be essential for the response of diatoms to excessive fluctuating light regimes, especially in field situations (Lavaud, 2007, Depauw *et al.*, 2012) (Brunet et Lavaud, 2010, Lepetit *et al.*, 2013). Nevertheless, diatom XC-NPQ have only scarcely been studied in intertidal flats showing a relation to diurnal and tidal cycles, season, latitude (Serôdio *et al.*, 2005a, van Leeuwe *et al.*, 2009, Chevalier *et al.*, 2010) and to position of diatoms within the sediments and along the intertidal elevation gradient (Jesus *et al.*, 2009, Cartaxana *et al.*, 2011). Motile benthic diatom species display vertical '(micro-)migration' in the sediment following endogenous tidal/dial rhythms and environmental stimuli (Saburova et Polikarpov, 2003, Consalvey *et al.*, 2004b, Coelho *et al.*, 2011): during daylight emersion, they migrate to the sediment surface and form a photosynthetic biofilm, while during immersion they migrate to deeper sediment layers. The negative phototaxis they exhibit under high light lead to the so-called 'behavioural photoprotection' hypothesis (Admiraal, 1984, Kromkamp *et al.*, 1998, Consalvey *et al.*, 2004b), under which diatoms regulate their light exposure by vertically migrating within the steep light gradients of the sedimentary photic zone (Paterson et Hagerthey, 2001, Cartaxana *et al.*, 2011). Using the motility inhibitor Latrunculin A (Lat-A, Cartaxana and Serôdio, 2008), this behaviour was recently confirmed to have a clear role in increasing the photoprotective capacity of intertidal diatom-dominated biofilms (Perkins *et al.*, 2010a, Cartaxana *et al.*, 2011, Serôdio *et al.*, 2012).

Whilst effects of excess light have been a central subject of studies on diatom physiology (Lavaud, 2007, Depauw *et al.*, 2012), effects of high temperature have received less attention, especially for benthic species, both at population and community levels (Vieira *et al.*, 2013b)(and references therein). Published studies are limited on effects on growth rates (Admiraal, 1977, Scholz et Liebezeit, 2012a), on short-term effects on photosynthetic rates (Blanchard *et al.*, 1996, Blanchard *et al.*, 1997, Hancke et Glud, 2004) or Chl fluorescence-based indices of photosynthetic activity (Yun *et al.*, 2010, Salleh et McMinn, 2011, Vieira *et al.*, 2013b) and on cell motility and adhesion (Cohn *et al.*, 2003, Du *et al.*, 2012).

This work intended to study the combined effects of excess light and high temperature on intertidal diatom-dominated microphytobenthos photophysiology. It was carried out in

intertidal microphytobenthos communities from two locations, Baie de l'Aiguillon (Esnandes, France) and Ria de Aveiro (Aveiro, Portugal), having different solar exposure and temperature regimes, and likely to support microphytobenthos communities of contrasting photo- and thermo-adaptative strategies determining their potential response to light and temperature stress. Light stress-recovery experiments (LSE) were performed in order to distinguish physiological photoprotection efficiency from photoinhibitory effects, as well as to quantify the role of negative phototaxis (Serôdio *et al.*, 2012). Two experimental temperature conditions, 25°C and 40°C, were chosen based on a previous (Blanchard *et al.*, 1997) which defined 25°C as an optimum and 35-40°C as an extreme maximum for the photosynthetic productivity of microphytobenthos. Light and temperature conditions, as well as photosynthetic and protective indices were further compared with field situation at the two sites during a typical summer diurnal emersion.

II. Results

The measured parameters and measurement conditions are summarised in Table 14.

Table 14 : The measured parameters and measurement conditions

Experiment	Parameters/endpoints	Site	Timing for sampling/measurement
In situ over a diurnal emersion period	NPQ _{max} , ϕ PSII	PT, FR	Every 10-15 min
	Surface PAR Temperature vertical profile (0 cm to -10 cm)	PT, FR	Every 30 s
LSE at 25 and 40°C	NPQ, ϕ PSII	PT, FR	At the beginning of the experiment (T0) After 3 h under low light (LL, 50 μ mol quanta m ⁻² s ⁻¹) or high light (HL, 1200 μ mol m ⁻² s ⁻¹) After 15 min of recovery under LL following HL (Recov)
	Pigments	FR only	
	Lhcx	FR, PT	
	TBARS	FR, PT	
	Microphytobenthos surface biomass	FR, PT	

Environmental conditions, in situ photosynthetic activity and taxonomic composition of microphytobenthos in PT and FR sites

Environmental conditions and microphytobenthic photosynthetic activity were assessed during characteristic summer diurnal emersion at both studied Portuguese (PT-Ria de Aveiro, Vista Alegre) and French (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) intertidal flats. The Photosynthetic Active Radiation (PAR) was close to its daily maximum ($2000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) at both sites (Figure 100A-B) with a comparable, light dose over the emersion ($\sim 21 \text{ mol photons m}^{-2}$, Table S14). From the beginning of emersion, it took 2 h 53 min and 3 h 34 min to reach the same light dose in PT and FR sites, respectively; values close to the chosen experimental light conditions, i.e. 3 h of $1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, which corresponds to a $12.96 \text{ mol photons m}^{-2}$ light dose (see (Serôdio *et al.*, 2012)). Overall, temperature was higher at PT site (Figure 100A-B). Average temperatures reached at the surface of sediment during the emersion were 37°C and 27°C for PT and FR sites, respectively, which corresponded well to the chosen experimental temperatures (40°C and 25°C). Temperature decreased with sediment depth with a stronger depth effect in PT site (-7°C and -5°C in the first 0.5 cm for PT and FR sites, respectively, Table S14).

Table S14 : In situ light and temperature parameters during a summer diurnal emersion in the studied Portuguese (PT-Ria de Aveiro, Vista Alegre) and French (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) intertidal flats. The experimental light dose was $12.96 \text{ mol photons m}^{-2}$ (i.e. 3 h of $1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$).

	PT	FR
Light dose over emersion (mol photons m ⁻²)	19.47	22.96
Time for experimental light dose (hh : mm : ss)	02 : 53 : 26	03 : 34 : 35
Average surface temperature over emersion (°C)	37.28	26.93
Average -0.5 cm temperature over emersion (°C)	30.15	21.92

At the beginning of emersion, the effective PSII quantum yield (ϕ PSII) was close to its optimum (~ 0.70) at both sites (Figure 100C-D, open squares). It decreased/increased according to the PAR evolution over the emersion reaching values as low as ~ 0.40 at both sites. The maximal non-photochemical quenching of Chl *a* fluorescence (NPQ_{max} , an index of photoprotection) was about 2 at the beginning of emersion at both sites (Figure 100C-D, closed circles). It remained stable at FR site, while it covaried with PAR at PT site, reaching a value of about 5.5 and then decreased.

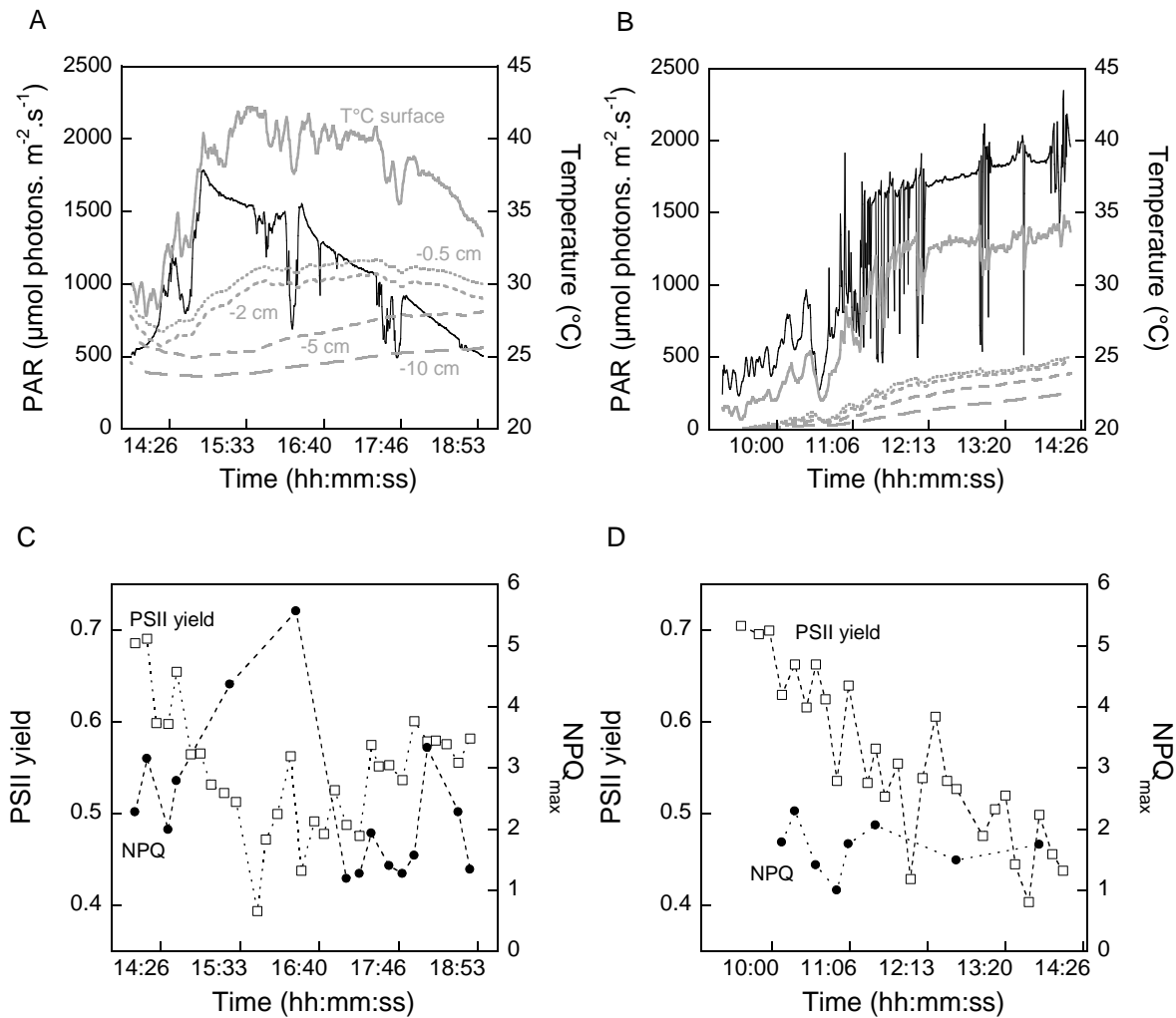


Figure 100: *In situ* environmental conditions and photosynthetic activity of microphytobenthos during a summer diurnal emersion in Portuguese (Ria de Aveiro, Vista Alegre, A- and C-) and French (Baie de l'Aiguillon, Esnandes, B- and D-) intertidal flats. A- and B- Photosynthetic Active Radiation (PAR, $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) at the surface of the sediment and temperature ($^{\circ}\text{C}$) at five depths (surface, -0.5 cm, -2 cm, -5 cm, -10 cm); C- and D- effective PSII quantum yield (PSII yield: open squares) and maximum non-photochemical quenching of Chl *a* fluorescence (NPQ_{max}: closed circles).

LSE-induced photoinhibition and NPQ in sediment from FR site

ϕPSII and NPQ were significantly affected by light ($P < 0.001$), temperature ($P < 0.001$) and chemical ($P < 0.01$) (Figure 101 and Figure 102). For both parameters, the interaction between light and temperature was highly significant ($P < 0.001$). The two parameters remained constant in samples maintained under LL throughout the experiment (0.66 ± 0.02 and 0.38 ± 0.04 , respectively). ϕPSII was higher at 40°C Lat-A treated samples, with values between $0.13. \pm 0.03$ (40°C +Lat-A) and 0.34 ± 0.02 (25°C Ctrl) after 3h of HL, and it increased during the recovery period remaining lower than at the beginning of the experiment

with values between 0.46 ± 0.05 (40°C +Lat-A) and 0.61 ± 0.01 (25°C Ctrl). NPQ exhibited an opposite pattern, with an increase under HL (between 4.4 ± 0.5 and 3.4 ± 0.4 from 40°C +Lat-A and 25°C Ctrl treatments, respectively) followed by an incomplete recovery (between 1.9 ± 0.1 and 1.1 ± 0.1).

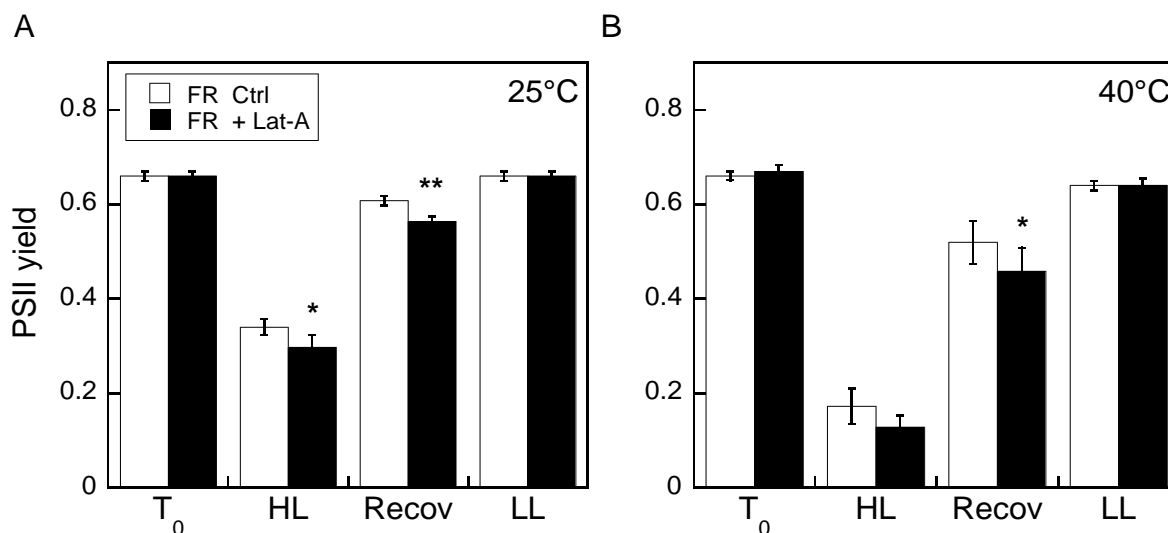


Figure 101 : Index of photoinhibition (decrease in the effective PSII quantum yield: PSII yield) of microphytobenthos harvested at the French site (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C , A- or 40°C , B-) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). T_0 , beginning of the experiment; HL, after 3 h high light ($1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. Values are mean \pm SD (n=6).

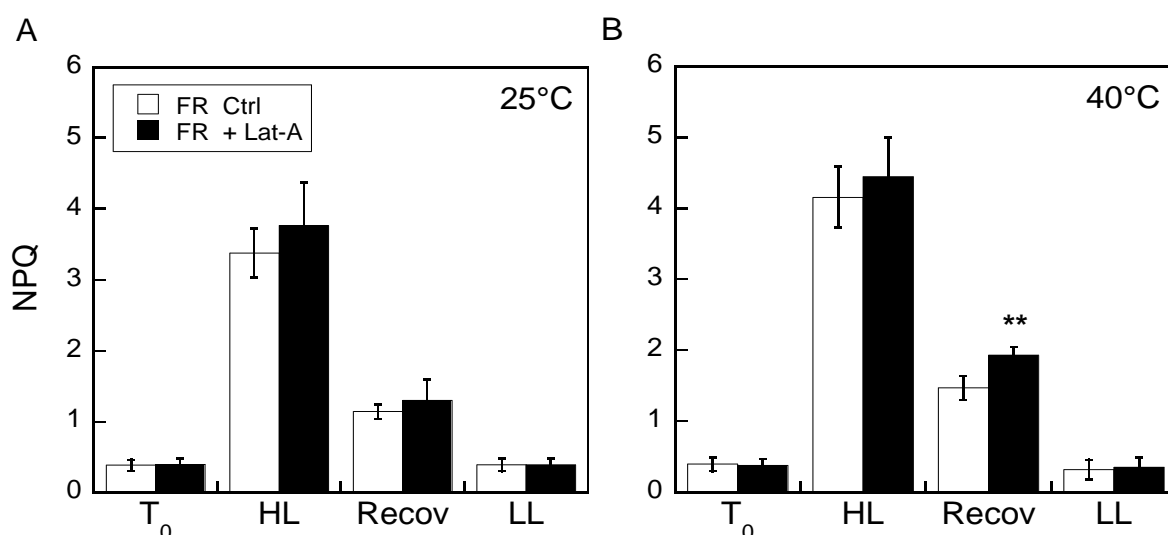


Figure 102 : Index of photoprotection (Non-photochemical quenching of Chl *a* fluorescence: NPQ) of microphytobenthos harvested at the French site (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C , A- or 40°C , B-) and with an inhibitor of cell motility

(+ Lat-A) or without (Ctrl). T₀, beginning of the experiment; HL, after 3 h high light (1200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. Values are mean \pm SD (n=6).

LSE-induced allomerization of Chl *a* and xanthophyll cycle in sediment from FR site

All samples exhibited typical diatom pigment signatures: Chls *a* including epimer and allomer forms (Chl *a*, Epi *a* and Chl *a'*, respectively), Chls *c*, fucoxanthin, the carotenoid β , β carotene and the xanthophyll cycle pigments (DD and DT). Chl *a'*, DD and DT responded to the different treatments (light, temperature and Lat-A). Chl *a'* accumulated during the LSE, as illustrated by the observed changes of the Chl *a* allomerization molar ratio (AR= Chl *a'* / tot Chl *a* \times 100, Figure 103A). AR increased \sim 2-fold under HL and remained stable thereafter ($P < 0.001$). No significant changes were observed with temperature ($P = 0.28$), whereas AR was significantly higher in Lat-A samples than in Ctrl ($P < 0.01$), with mean maximum values of 8.4 ± 2.1 and 11.9 ± 5.0 , respectively (Figure S6). AR did not significantly change in samples maintained in LL during 3 h (5.9 ± 2.7 on average).

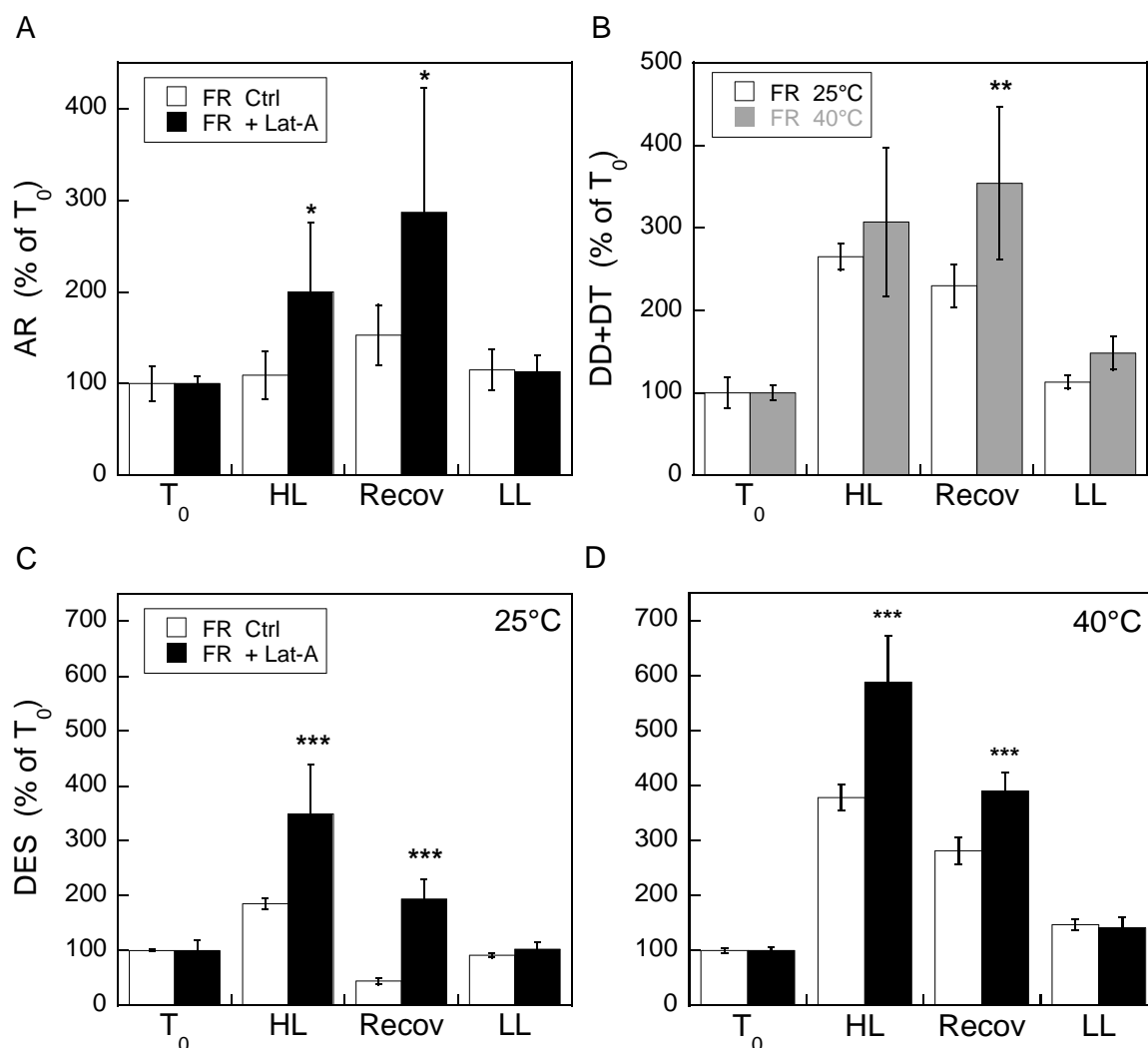


Figure 103 : Pigment content makers of photooxidative stress (Chl *a* allomerization ratio: AR) and of photoprotection (DD+DT pool; DD de-epoxidation state: DES) of microphytobenthos harvested at the French site (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). T₀, beginning of the experiment; HL, after 3 h high light (1200 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light (50 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. A- AR, data from 25 and 40°C experiments were pooled, * significant difference from Ctrl at the same time ($P < 0.05$, Tukey HSD); B- pool DD+DT (in $\text{mol.100 mol Chl } a^{-1}$), data from Ctrl and Lat A-treated samples were pooled, ** significant difference from 25 °C at the same time ($P < 0.01$, Tukey HSD); C- and D- DES, * significant difference from Ctrl at the same time ($P < 0.001$, Tukey HSD). Values are mean \pm SD ($n=12$: A,B or $n =6$: C,D) expressed as %T₀.**

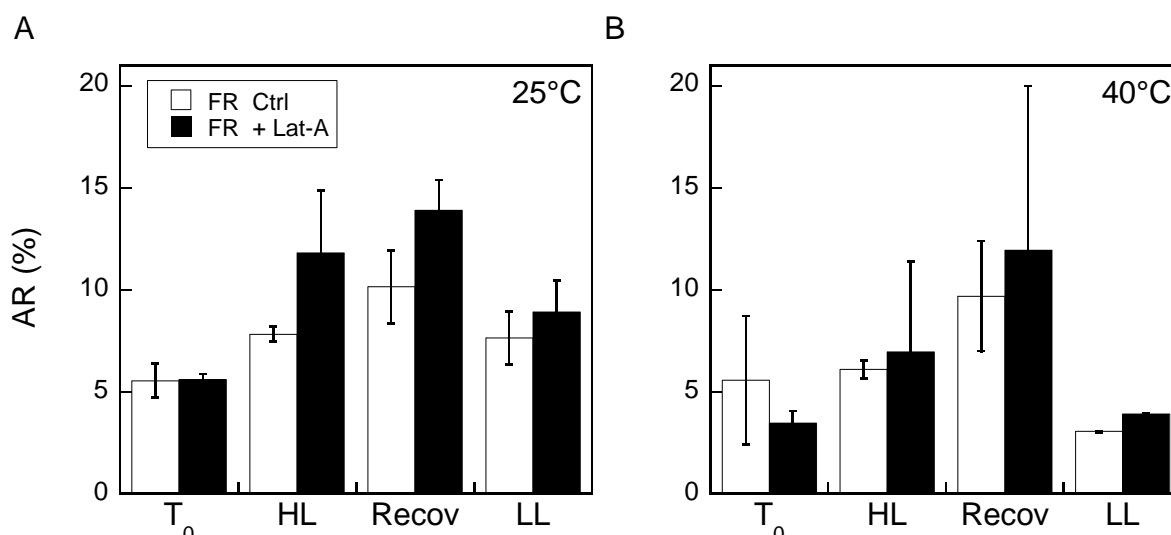


Figure S6 : Pigment content makers of photooxidative stress (Chl *a* allomerization ratio, AR) of microphytobenthos harvested at the French site (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C, A- or 40°C, B-) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). HL, after 3 h high light (1200 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light (50 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. Values are mean \pm SD (n=6)

The pool of DD+DT (in mol. 100 mol Chl *a*⁻¹) increased \sim 3-fold under HL ($P < 0.001$) and remained stable during the recovery (Figure 103B). Overall, it reached higher values at 40°C than at 25°C ($P < 0.01$) but it was comparable in Ctrl and Lat-A samples ($P = 0.62$). At 40°C, DD+DT increased even in the samples maintained under LL for 3 h (from 15.0 ± 4.0 to 23.8 ± 6.6 mol. 100 mol Chl *a*⁻¹, Tukey HSD: $P < 0.05$) (Figure S7). DD de-epoxidation ($\text{DES} = \text{DT} / \text{DD+DT} \times 100$) correlated well with light whatever the temperature in both Ctrl and Lat-A-treated samples ($P < 0.001$) (Figure 103C-D). DES increased under HL and decreased after 15 min LL while it remained stable in samples maintained in LL for 3 h (14.0 ± 3.2 on average) (Figure S8). DES was significantly higher in Lat-A samples than in Ctrl ones ($P < 0.001$), and at 40°C than at 25°C ($P < 0.001$). This is illustrated by maximum values, reached after 3 h HL in Lat-A treated samples which were 67.2 ± 7.5 and 33.8 ± 7.5 at 40 °C and 25 °C, respectively (Figure S8). DES recovers much faster at 25°C than at 40°C, especially for Ctrl samples which exhibited values even lower than at T₀ (8.6 ± 1.1 , Tukey HSD: $P < 0.001$). In contrast to AR and the pool DD+DT, interaction between light and temperature was significant for DES ($P < 0.001$). Moreover, NPQ and DES were significantly (positively) correlated according to the chemical treatment (+/- Lat-A), *i.e.* the slope of the NPQ vs. DES linear regression was 2.5 lower in +Lat-A samples (Figure S9) while for both treatments the

origin of the regression was similar and non-nul (-Lat-A: 17.6 ± 0.4 ; +Lat-A: 16.4 ± 0.4), i.e. some DT was synthesized without NPQ development.

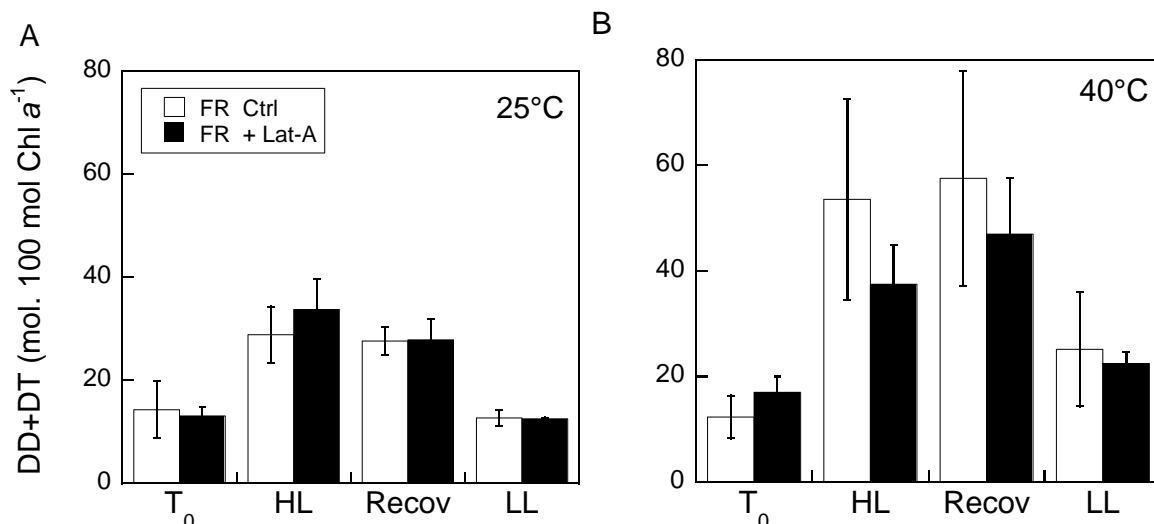


Figure S7 : Pigment content markers of photoprotection (DD+DT pool normalized to total Chl *a*) of microphytobenthos harvested at the French site (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). T₀, beginning of the experiment; HL, after 3 h high light ($1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. Values are mean \pm SD (n=6).

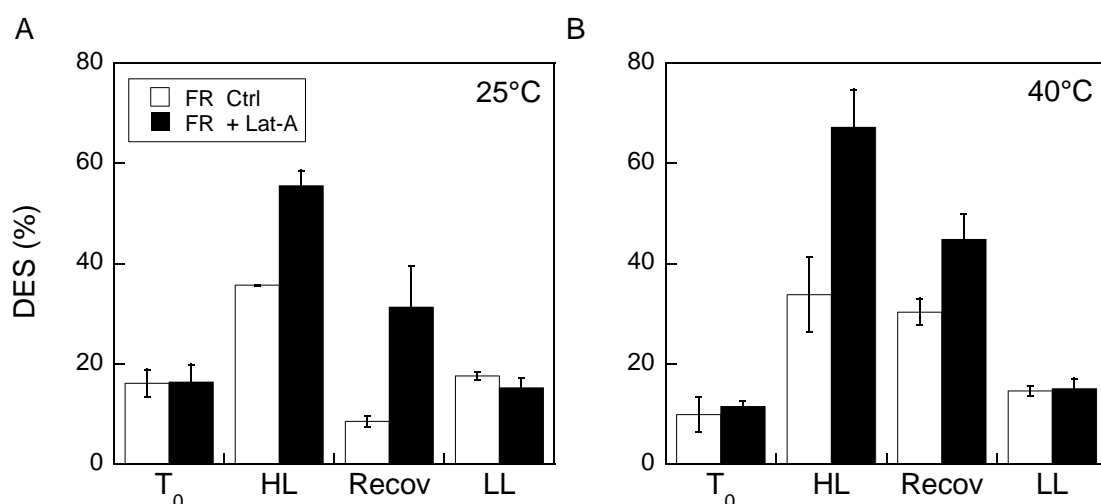


Figure S8 : Pigment content markers of photoprotection (DD de-epoxidation state, DES, in mol 100 mol Chl *a*⁻¹) of microphytobenthos harvested at the French site (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) on sediment exposed at two temperatures (25°C, A- or 40°C, B-) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). T₀, beginning of the experiment; HL, after 3 h high light ($1200 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. Values are mean \pm SD (n=6).

photons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light ($50 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. Values are mean \pm SD (n=6).

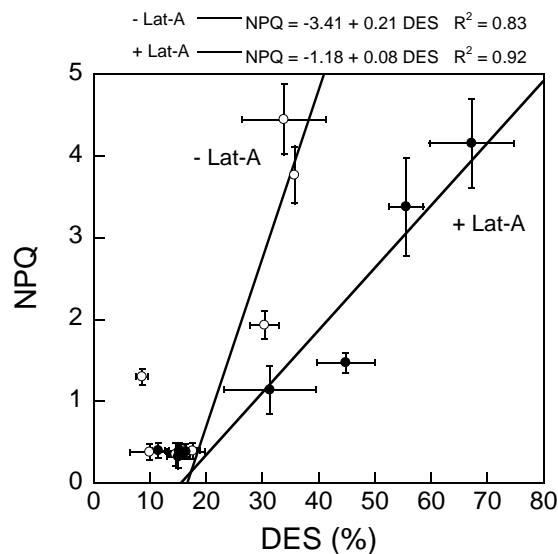


Figure S9 : DES (DD de-oxidation state, DES, in mol. $100 \text{ mol Chl } a^{-1}$) versus NPQ (non-photochemical quenching of Chl a fluorescence, an index of photoprotection) relationship for microphytobenthos harvested at the French site (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). Data are from Figures S8 and Figure 102.

LSE-induced Lhcx synthesis in sediment from FR site

The anti-FCP6 (i.e. Lhcx1) revealed one Lhcx isoform in FR samples (Figure 104A). Its size of about 24 kDa was slightly higher than Lhcx 3 in *Phaeodactylum tricornutum* and its amount increased after 3 h HL exposure especially in +Lat-A samples. The anti-Lhcx6 from *Thalassiosira pseudonana* revealed two Lhcx isoforms which size was different from Lhcx6 and which was neither present in HL exposed *P. tricornutum* cells (Figure 104B). Nevertheless, the isoform which was present in the largest amount showed a size similar to Lhcx 1 in *P. tricornutum*. The other isoform ranged between 33-50 kDa which could be the size of a hypothetical Lhcx dimer but different than in *P. tricornutum*. Interestingly, the two isoforms reacted to light, temperature and Lat-A in different ways: while the 17-23 kDa isoform appeared not to react to any of the treatments, the 33-50 kDa isoform positively reacted to HL and high temperature exposure with an effect enhanced by Lat-A at 40°C (Figure 104C).

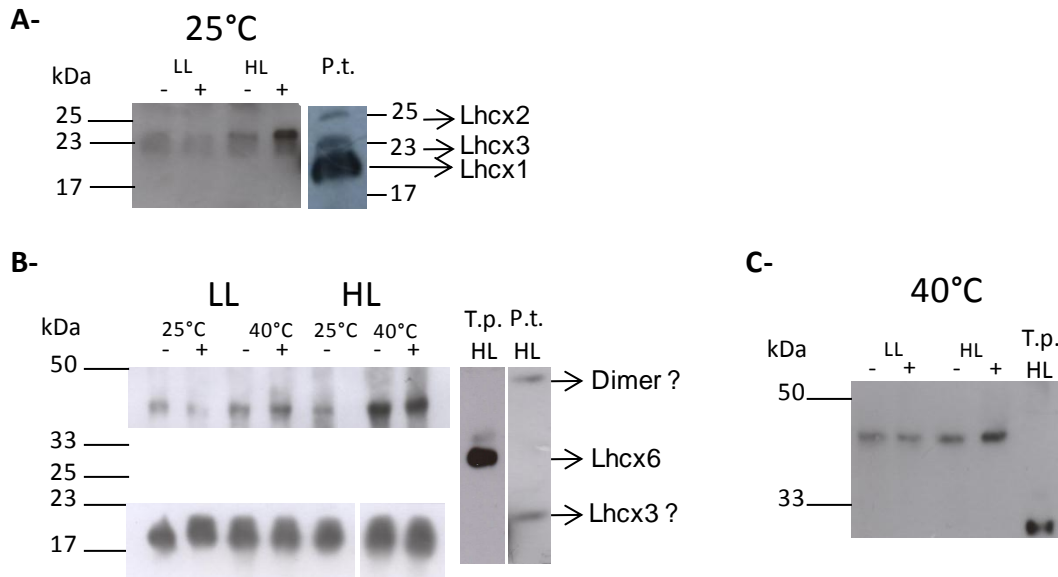


Figure 104 : Western-blot of the LhcX proteins of microphytobenthos harvested at the French site (Baie de l'Aiguillon, Esnandes) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). HL, after 3 h high light (1200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) treatment; LL, after 3 h of low light exposure. All samples were normalized to the same Chl *a* concentration (15 $\mu\text{g Chl } a \text{ mL}^{-1}$). A- LhcX proteins were detected using a monoclonal anti-FCP6 (LhcX1). This antibody also detects LhcX2 and LhcX3 in *P. tricornutum* (strain 'P.t.1') used here as a control (see Lepetit *et al.*, 2013). B- and C- LhcX proteins were detected using a monoclonal anti-LhcX6 from *Thalassiosira pseudonana* (T.p.) (Zhu and Green, 2010) which also potentially detect LhcX3 and an LhcX dimer in *Phaeodactylum tricornutum* (strain 'P.t.1') used here as a control; C- is a special focus on the band between 33-50 kDa in 40°C exposed samples. Revelation times were: A- 30 s; B- 15 s for the bands between 17-23 kDa, 45s for the band between 33-50 kDa; C- 30 s;. Note that for A- all samples exposed at 40°C did not yield satisfying signal for an unknown reason; and for B-, the sample HL+ 25°C was lost.

LSE-induced lipid peroxidation in sediment from FR site

Common markers of membrane lipid peroxidation (TBARS-thiobarbituric acid reactive substances) were quantified. In Lat-A treated samples, TBARS content normalized to the surface microphytobenthos biomass (I_{diat} biomass index) was not significantly affected either by light ($P = 0.50$), temperature ($P = 0.82$) or chemical ($P = 0.39$), exhibiting a mean value of $1.19 \pm 0.29 \cdot 10^{-6} \text{ nmol eq MDA mL}^{-1}$. (Figure S10)

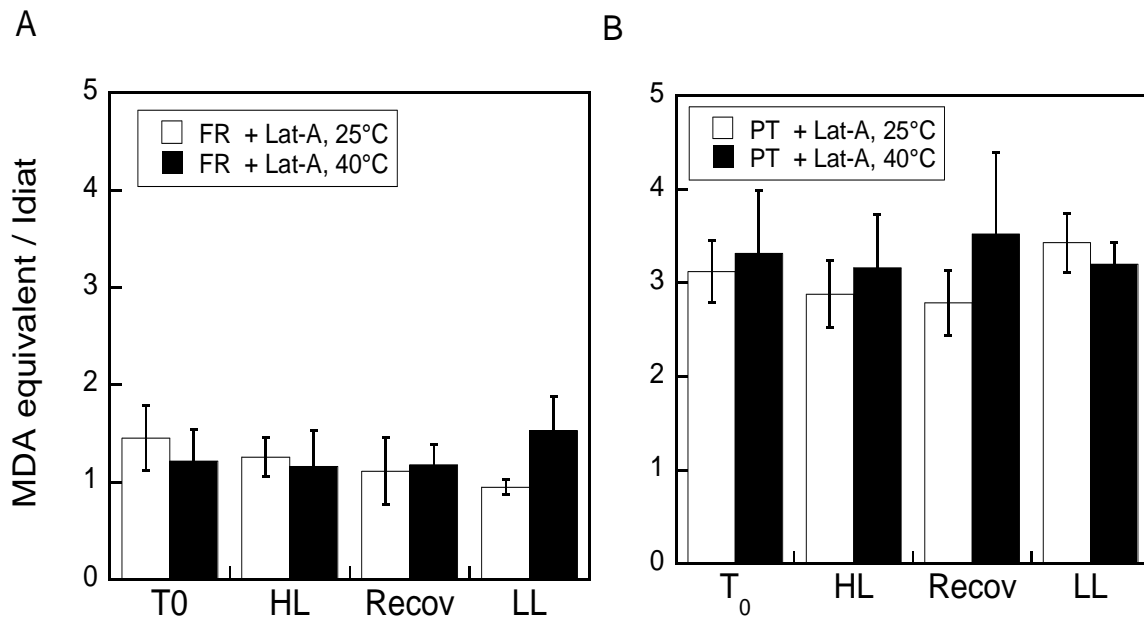


Figure S10 : Amount of lipid peroxidation marker (TBARS content in 10^{-6} nmol MDA equivalent mL^{-1}) in microphytobenthos harvested at the French (LR- Baie de l'Aiguillon, Esnandes) (A) and the Portuguese site (PT-Ria de Aveiro, Vista Alegre) (B) during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) with an inhibitor of cell motility (Lat-A). T₀, beginning of the experiment; HL, after 3 h high light ($1200 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) treatment; Recov, after 3 h high light treatment followed 15 min low light ($50 \mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) recovery; LL, after 3 h of low light exposure. Values are mean \pm SD (n=6) normalized to surface biomass (I_{diat} biomass index).

Comparison between FR and PT sites: photoinhibition, NPQ, lipid peroxidation and Lhcx.

ϕPSII and NPQ measured on PT samples exhibited the same general trend than for FR samples. However, higher ϕPSII ($P < 0.001$) values obtained after recovery (Figure 105A) showed that PT samples were less affected by the 3 h HL treatment than FR. In parallel, NPQ recovery was higher ($P < 0.01$) in PT samples, although post-hoc multiple comparison tests did not show any statistical differences between sites (Tukey HSD: $P > 0.05$; Figure 105B).

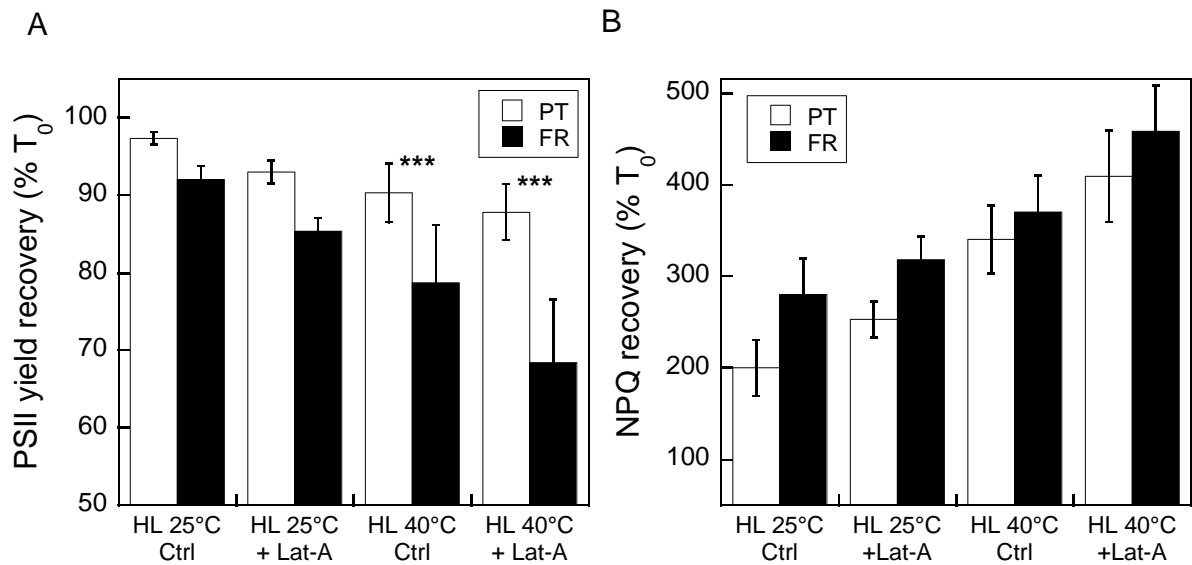


Figure 105 : Comparison of photoinhibition level (decrease in the effective PSII quantum yield: PSII yield) and photoprotection (Non-photochemical quenching of Chl *a* fluorescence: NPQ) in microphytobenthos harvested at the Portuguese (PT-Ria de Aveiro, Vista Alegre) and the French (FR-Baie de l'Aiguillon, Esnandes) sites during light stress experiments (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C or 40°C) and with an inhibitor of cell motility (+ Lat-A) or without (Ctrl). A- PSII yield recovery after 3 h of high light (1200 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) exposure followed by 15 min of low light (50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) exposure, * significant difference between sites ($P < 0.001$, Tukey HSD); B- NPQ recovery after 3 h of high light exposure ($P > 0.05$, Tukey HSD). Values are mean \pm SD ($n=6$) expressed as %T₀.**

In Lat-A treated samples, TBARS content normalized to surface biomass did not change significantly during the PT experiments, whatever the tested temperature (Figure S10). Mean value was $3.26 \pm 0.66 \cdot 10^{-6} \text{ nmol eq MDA mL}^{-1}$, which was significantly higher than for FR samples (t-test: $P < 0.001$).

The anti-FCP6 (i.e. Lhcx1) revealed two clear Lhcx isoforms in PT samples (Figure 106). Their respective size were close with one at about 23 kDa, the size of Lhcx 3 in *P. tricornutum*, and the other one slightly higher (about 24 kDa) which was also present in FR samples (Figure 104A). Both isoforms (although the 24 kDa reacted in a stronger way) were enhanced after 3 h of HL exposure as well as by the higher temperature; this effect was increased by the addition of Lat-A. Interestingly, at 25°C, the 24 kDa isoform was not present under LL and HL exposure, it appeared with the addition of Lat-A solely (LL 25°C +) and its content was increased by HL exposure (HL 25°C +). Similarly, the 23 kDa isoform positively reacted to Lat-A to a level even similar to HL exposure without Lat-A (compare 25°C LL+ and 25°C HL-).

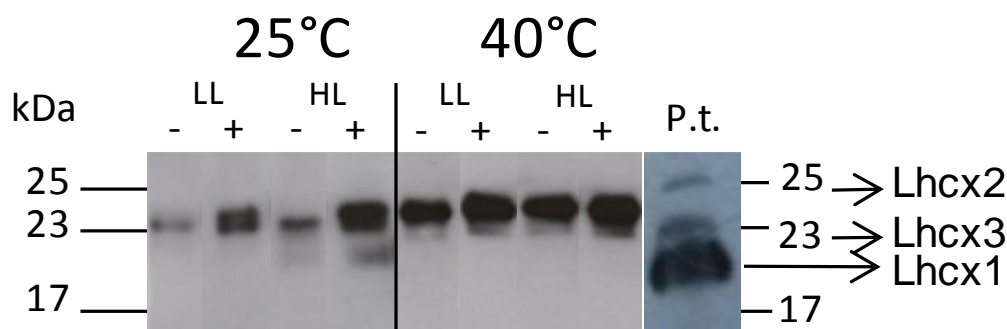


Figure 106 : Western-blot of the Lhcx proteins of microphytobenthos harvested at the Portuguese site (Ria de Aveiro, Vista Alegre) during a light stress experiment (LSE) performed on sediment exposed at two temperatures (25°C, A- or 40°C, B-) and with (+) or without (-) an inhibitor of cell motility (Lat-A). HL, after 3 h high light (1200 $\mu\text{mol photons. m}^{-2}. \text{s}^{-1}$) treatment; LL, after 3 h of low light exposure. All samples were normalized to the same Chl *a* concentration (15 $\mu\text{g Chl } a \text{ mL}^{-1}$). Lhcx proteins were detected using a monoclonal anti-FCP6 (Lhcx1). This antibody also detects Lhcx2 and Lhcx3 in *P. tricornutum* (strain ‘P.t.1’) used here as a control (Lepetit *et al.*, 2013). Note that i) the 25°C and 40°C samples were not loaded on the same gel but the revelation time was the same (30 s), ii) the use of the monoclonal anti-Lhcx6 from *T. pseudonana* did not yield any signal with these samples.

III. Discussion

The study involved a comprehensive set of well established techniques (chlorophyll fluorescence, spectral reflectance, pigment analysis) but also a number of methodological novelties in microphytobenthos research: i) the use of a new cryo-sampling method (Laviale *et al.*, unpublished), that enables sediment sampling in the top 500 μm , a depth range close to the actual photic depth of studied sediments (Paterson et Hagerthey, 2001, Cartaxana *et al.*, 2011); ii) the evaluation of the effects of photooxidative stress, by quantifying common markers of membrane lipid peroxidation (TBARS-thiobarbituric acid reactive substances); iii) the immunodetection by Western-blotting of Lhcx proteins, a key player in the regulation of the physiological photoprotection of diatoms (Bailleul *et al.*, 2010, Zhu et Green, 2010, Wu *et al.*, 2012, Lepetit *et al.*, 2013)

Microphytobenthos response to a coupled light-temperature stress: respective importance of the ‘physiological and behavioural photoprotection’

Differential photoinhibition between 25/40: yield/AR/TBARS.

Physiological photoprotection: NPQ/XC/Lhcx.

Behavioural photoprotection: effect of Lat-A.

Evidence for a latitudinal adaptation in the microphytobenthos response to a coupled light-temperature stress

Comparison of photoinhibition (yield/AR/TBARS) and photoprotection (NPQ/XC/Lhcx) between FR and PT.

New tools to investigate the photobiology of microphytobenthos in the sediment and potential in situ applications

Photosynthesis imaging: Imaging-PAMs, well-plates and mini-cores

Photooxidative stress markers: AR and TBARS

Lhcx

IV. Experimental procedures

Study areas and experimental design

Two sampling sites were selected along the Atlantic Coast of Southern Europe, in France and Portugal (thereafter called FR and PT sites, respectively): an intertidal mudflat in the Baie de l'Aiguillon near Esnandes (FR, 46°15.36'N, 1°8,55'W) and a mesotidal estuary in Ria de Aveiro near Vista Alegre (PT, 40°35' N, 8°41' W). Both sites are composed of fine muddy sediments (dominant particle size <63 µm) known to be colonized by diatom-dominated biofilms throughout the year (Herlory *et al.*, 2004, Serôdio *et al.*, 2007, Serôdio *et al.*, 2012).

All experiments were performed consecutively in early summer (Weeks 26-27, June-July 2012). For each site, natural migratory biofilms were studied *in situ* over one diurnal emersion period. In parallel, two light stress-recovery experiments (LSE, (Serôdio *et al.*, 2012)) were carried out in controlled conditions in the lab, one at 25°C and the other at 40°C, with freshly collected mud samples containing migratory biofilm. During LSE, samples were sequentially exposed to (i) low light level to determine pre-stress reference state; (ii) excess light intensity to induce photoinhibitory effects; (iii) low light to monitor recovery from potential photoinhibition.

In situ experiments

For each site, the day of experiment was selected so that the emersion period matched with maximum light and temperature exposure, i.e. noon/early afternoon low tides. PAR and

temperature at the surface of the sediment were assessed every 30 s over the emersion period with a universal light-meter and data logger (ULM-500, Walz Effeltrich Germany) equipped with a plane light/temperature sensor (accessory of the ULM-500) and a plane cosine quantum sensor (Li-COR). Depth temperature profiles were measured with Hobo sensors (Hobo Pro V2, Massachusetts, USA) fixed on a home-made stick that was vertically pushed in sediment to stabilize the sensors at 4 depths (-0.5 cm, -2 cm, -5 cm, -10 cm). The photosynthetic and NPQ capacity of microphytobenthos was assessed with a Water-PAM (micro-fiber version, Walz GmbH, Effeltrich, Germany) as described in Lefebvre *et al.* (2011). The actual effective PSII quantum yield (ϕ PSII) was calculated as $\Delta F / F_m' = (F_m - F) / F_m'$. Rapid light curves (RLCs) with 30 s light steps were used to measure NPQ vs. light intensity (NPQ-E) curves (as recommended in (Lefebvre *et al.*, 2011)). NPQ-E curves were fitted with the model by Serôdio and Lavaud (2011) in order to estimate NPQ_{max} where NPQ = $(F_m - F_m') / F_m$. F_m and F_m' are the maximum Chl *a* fluorescence levels measured in dark-adapted and illuminated (at the end of each RLCs light steps) microphytobenthos, respectively, while F is the steady-state Chl *a* fluorescence level measured at the end of each RLC light step, just before F_m' was assessed. F was measured with the application of a non-actinic modulated beam of 455 nm, and F_m and F_m' with the application of over-saturating (about 4000 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) light pulses (800 ms). Because in in situ as well as in laboratory (see below) conditions (i.e. light-responsive migratory biofilm) it is virtually impossible to measure a true F_m level, for the calculation of NPQ, F_m was in reality the maximum F_m' of the respective RLC (i.e. $F_m'_{\text{max}} \sim F_m$, see (Lefebvre *et al.*, 2011)).

Light stress-recovery experiments (LSE)

LSE were carried out following a protocol adapted from Serôdio *et al.* (Serôdio *et al.*, 2012). The top 1 cm of sediment was collected at the beginning of low tide and immediately transported to the laboratory where it was sieved (0.5 mm mesh) to remove debris and macrofauna. Sediment was thoroughly mixed and spread in trays, forming a 2-4 cm thick slurry, and it was covered with seawater from the sampling site and left undisturbed overnight in the dark at room temperature (~20-25°C). The next morning, the slurry was homogenized and transferred to 24-well plates using a 100 mL syringe, filling the wells completely (ca. 3 mL). The well plates were then exposed to constant low light (LL) of 50 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, provided by two slide projectors (Reflecta Diamator AF, Reflecta GmbH, Rottenburg, Germany containing halogen lamps (Quartzline DDL 150W, General Electric, USA) to

induce the upward migration of microphytobenthos. Once the biofilm was formed (typically after 3 h), the plates were transferred to a water bath with a temperature fixed at 25°C or 40°C and exposed to constant LL for 30 min. 200 µL of Lat-A solution (10 µM final concentration) or of filtered sea water (Control samples: Ctrl) was added to each well. Lat-A solution was freshly prepared daily from a 1 mM stock solution of purified Lat-A (Sigma-Aldrich) dissolved in dimethylsulfoxide and stored at -20°C. After waiting 15 min for the inhibitor to diffuse, the plates were exposed to excess light of 1200 µmol photons m⁻² s⁻¹ (high light: HL) for 3 h. After 3 h, samples were placed under LL for 15 min. In parallel, additional samples (for both Ctrl and Lat-A treatments) were maintained during 3 h under continuous LL. Temperature of the sediment in the first half centimeter was regularly checked using the same sensor previously described (27.4 ± 1.2°C and 37.3 ± 0.7°C on average). The duration of each step described above was always the same, but the timing was adjusted so that HL period always started at the low tide maximum expected *in situ*.

For each chemical and light treatment (Ctrl and Lat-A; HL or continuous LL), several endpoints were assessed on 3-6 independent samples at three times: just before the light stress (T0), at the end of the light stress period (HL) and after 15 min of LL recovery (Recov). For FR experiments, chlorophyll fluorescence parameters (ϕPSII and NPQ) were estimated using an Imaging-PAM fluorometer (Maxi-PAM M-series, Walz GmbH, Effeltrich, Germany) and samples were collected for further quantification of photosynthetic pigments, lipid peroxidation, and Lhcx . In PT experiments, fluorescence was measured with a FluorCAM 800MF, open version (PSI, Brno, Czech Republic, see (Serôdio *et al.*, 2013)) and the same analyses but pigments were performed. For the sediment sampling in wells, a contact-corer specially designed was used to collect rapidly (< 30 s) the uppermost layer of sediment (0.5 mm thick, 1.5 cm² area) in each well. It is based on the cryo-sampling of the biofilm, through the contact of the sediment surface with a metal cylinder of known length previously cooled in liquid nitrogen (Laviale *et al.*, submitted). Each core was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until further analysis.

Pigment analysis

Pigment extraction and HPLC analysis were carried out following Lepetit *et al.* (2013) with the exception of the first extraction step which was performed after 24 h lyophilisation of the sediment cores (3 mL of 4°C mixture extraction buffer: 90% methanol/0.2 M ammonium acetate (90/10 vol/vol) + 10% ethyl acetate). Extracted samples were analyzed with a Hitachi

LaChrom Elite HPLC system equipped with a 10°C-cooled autosampler and a Nucleosil 120-5 C18 column (Macherey-Nagel). The allomerization of Chl *a* was illustrated by calculating the ratio $AR = \text{Chl } a' / \text{tot Chl } a \times 100$ where $\text{tot Chl } a = (\text{Chl } a' + \text{Epi } a + \text{Chl } a)$ and Chl *a'* and Epi *a* are the allomer and epimer forms of Chl *a*, respectively. The Chl *a* molar concentrations (expressed as mol. 100 mol Chl *a*⁻¹) for the XC pigments DD and DT were used to calculate the xanthophyll cycle de-epoxidation ratio (DES) as follows: $DES = DT / (DD + DT) \times 100$.

Lipid peroxidation

Lipid peroxidation generated by oxidative stress was estimated by quantifying thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), according to Kwon and Watts (1964). Each sediment core was resuspended in 0.8 mL of 10% trichloroacetic acid (TCA, Sigma-Aldrich) and 500 mg. L⁻¹ butylated hydroxytoluene (BHT, Sigma-Aldrich) and sonicated (U200S control; IKA Labortechnik, Ika-Werke GmbH, Staufen, Germany) on ice 5 times during 30 s (cycle: 1, amplitude: 30%) with intervals of 30 s to prevent overheating. After extraction, 0.8 mL of 0.5% thiobarbituric acid (TBA, Sigma-Aldrich) in 10% TCA was added, the mixture was heated for 30 min at 90 °C and immediately put on ice to stop the reaction. Samples were then centrifuged (15 min, 10000 g) and 250 µL of supernatant were transferred in a 96 well-plate (Sarsted). TBARS were measured by subtracting the nonspecific turbidity (at 600 nm) from the TBARS absorption maximum (532 nm) using a Synergy HT absorbance microplate reader (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA). Blanks consisted of the same mixture without sediment sample. TBARS concentration was expressed in malondialdehyde (MDA) equivalent (nmol mL⁻¹) using an extinction coefficient of 155 mM⁻¹ cm⁻¹. As it was not possible to obtain paired measurements of Chl *a* and MDA concentrations, values were normalized to the microphytobenthos biomass present at the sediment surface (measured by spectral reflectance: see below). As migration was susceptible to occur in Ctrl samples, only Lat A-treated samples could be compared.

Microphytobenthic surface biomass

A compléter

Lhcx protein analysis

Protein extraction from sediment cores, SDS-PAGE, Western-blot and ECL immunodetection were carried out following Lepetit *et al.* (2013) with the exception of the extraction which included a 90 min (instead of 45 min) exposure to the extraction buffer (500 μ L lysis buffer + 500 μ L protease inhibitor, Sigma-Aldrich) followed by a series of 8 heat-shocks (instead of 4). All samples were normalized to the same Chl *a* concentration extracted from sediment (15 μ g Chl *a.* mL⁻¹) and measured with the spectroscopic method by Jeffrey and Humphrey (1975). Anti-FCP6 (Lhcx1) from *Cyclotella cryptica* (Westermann et Rhiel, 2005) and anti-Lhcx6 from *Thalassiosira pseudonana* (Zhu et Green, 2010) were applied in a 1:1000 dilution for LR samples (respective incubation with the secondary antibody were 2 h and 1 h). For PT samples, the anti-Lhcx6 antibody did not yield a good signal; anti-FCP6 was used at a dilution of 1:1000 (incubation with the secondary antibody, 1 h).

Taxonomic composition A compléter

For each site, the first cm of sediment was collected, fixed with Lugol and stored at 4 °C until analysis.

Statistics

Data presented are mean \pm one standard deviation (SD). Each LSE experiment was performed twice. Analyses of variance (ANOVA), Tukey's honestly significant difference (HSD) tests, Student's t-tests and linear regressions were performed using the R statistical computing environment (v 2.15.1, (Ihaka et Gentleman, 1996)). In particular, linear mixed effects models were used considering light (HL, LL), time (T₀, after 3 h, after recovery) and chemical (Ctrl or +Lat-A) as fixed factors and temperature (25°C and 40°C) as random effect (lme function of the nlme package: (Pinheiro et Bates, 2000)). The fact that fluorescence measurements were made on the same samples over the experiment (both in situ and in the lab) was also taken into account (i.e. related samples). Values were expressed as % of T₀ when appropriate and data normality (Shapiro-Wilk test) and homoscedasticity (Bartlett test) were checked using the residuals.



Résumé

Le microphytobenthos (MPB) des latitudes tempérées est dominé par les diatomées. Deux grands groupes se distinguent, les épipéliques (mobiles) des sédiments vaseux, et les épipsammiques (fixées) des sédiments sablo-vaseux. Afin de mieux comprendre la production des vasières, le MPB a été étudié par des approches du niveau physiologique au niveau écologique.

Dans un premier temps, l'étude s'est focalisée sur des expérimentations en laboratoire. La réponse des différents groupes à la lumière a montré que la forme de vie et la mobilité sont en lien étroit avec la capacité de photoprotection physiologique. Ainsi, les diatomées non-mobiles présentent une meilleure photoprotection physiologique que les diatomées mobiles qui peuvent fuir les excès de lumière.

Dans une deuxième partie, le travail s'est effectué sur des échantillons ramenés en laboratoire. Des profils de migrations ont été réalisés par mesure continue de la fluorescence. Il a été établi que le MPB présente un rythme de migration interne pouvant être modulé par la lumière. De plus la qualité de la lumière modifie les profils de migration. Il est communément admis que les phases de division cellulaire se dérouleraient en profondeur. La cytométrie en flux permet de vérifier cette hypothèse.

Finalement les mesures effectuées en laboratoire ont été comparées à des mesures effectuées directement sur le terrain à l'échelle de la communauté. Il a ainsi pu être vérifié que la photoprotection sous lumière fluctuante est fonction de la population. Pour les populations épipélique, la photoprotection physiologique ne varie pas au cours des fluctuations lumineuses, laissant supposer que la migration module ces fluctuations. Les populations épipsammiques, quant à elles modifient leur réponse physiologique en fonction des fluctuations lumineuses.

Mots-clés : vasière intertidale – diatomée épipélique – diatomées épipsammiques – migration – cycle cellulaire – photosynthèse – NPQ – fluorimétrie PAM

Abstract

Microphytobenthos (MPB) from temperate latitude is mainly composed of diatoms. Those microorganisms can be separated in two groups: the epipellic one from muddy sediments (composed of mobile diatoms) and the epipsammic one from sandy-muddy sediments (composed of diatoms living attached to their substrate). In order to investigate mudflats' primary production, the MPB compartment was studied through diverse approaches from the physiological level to the ecological one.

In the first place, laboratory experiments (*in vitro* experiments), focusing on light reaction of epipellic and epipsammic diatoms, showed that their life form and their mobility were strongly connected to their physiological photoprotection ability. Thereby, the motionless diatoms were characterized by higher physiological photoprotection abilities than the mobile ones, which could avoid excess of light.

In the second place, the fluorescence of collected samples (*in vivo* experiments) was measured to acquire diatoms' migration profiles. The results pointed out an internal and light-regulated migration pattern of the MPB and furthermore highlighted the effect of light quality on migration profiles. Besides, the commonly accepted hypothesis of deep cell division phases was tested and confirmed through flow cytometry experiments.

Eventually, laboratory measurements were compared to *in situ* ones realized at the scale of the whole community. These comparisons revealed that diatoms photoprotection in fluctuating light depended on the targeted populations. Epipellic organisms were indeed characterized by an unvarying photoprotection, diatoms migration regulating alone the effect of light fluctuations. On the contrary, motionless epipsammic populations required a light-regulated photoprotection.

Key words: Intertidal mudflat – epipellic diatoms – epipsammic diatoms – migration – cell cycle – photosynthesis – NPQ – PAM fluorimetry