



HAL
open science

Trajectoires d'évolution des communautés phytoplanctoniques au cours du processus de restauration écologique des milieux lagunaires méditerranéens

Amandine Leruste

► **To cite this version:**

Amandine Leruste. Trajectoires d'évolution des communautés phytoplanctoniques au cours du processus de restauration écologique des milieux lagunaires méditerranéens. Biodiversité et Ecologie. Université Montpellier, 2016. Français. NNT : 2016MONTT143 . tel-01661492

HAL Id: tel-01661492

<https://theses.hal.science/tel-01661492>

Submitted on 12 Dec 2017

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.



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivrée par l'UNIVERSITE DE MONTPELLIER

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA

Et de l'unité de recherche UMR 9190 MARBEC

Spécialité : Ecologie Fonctionnelle et Sciences Agronomiques

Présentée par Amandine LERUSTE

Trajectoires d'évolution des communautés
phytoplanctoniques au cours du processus de
restauration écologique des milieux lagunaires
méditerranéens

Soutenue le 22 avril 2016 devant le jury composé de

M. Cédric BACHER, Cadre de Recherche, Ifremer Plouzané	Rapporteur
Mme Béatrice BEC, Maître de conférence, Université de Montpellier	Co-encadrante
M. Marc BOUVY, Directeur de Recherche, IRD Montpellier	Examineur – Président du Jury
M. Rutger DE WIT, Directeur de Recherche, CNRS, Montpellier	Directeur de thèse
Mme Nathalie MALET, Cadre de Recherche, Ifremer Bastia	Co-encadrante invitée
Mme Vanina PASQUALINI, Professeur, Université de Corte	Rapporteur
M. Philippe SOUCHU, Cadre de Recherche, Ifremer Nantes	Examineur



Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Rutger, Béatrice, et Nathalie, sans qui cette thèse n'aurait jamais vu le jour. C'est grâce à vous si ce sujet aura été si passionnant, si diversifié, et si prenant. Je vous remercie également de m'avoir donné l'opportunité de la réaliser, et de m'avoir soutenu durant tous les moments difficiles que j'ai pu traverser. Merci enfin de m'avoir permis de participer aux congrès internationaux, qui ont été très enrichissants pour moi, et de m'avoir donné l'occasion de m'essayer à de nombreuses techniques et méthodes qui ont rendu ce travail aussi intéressant.

Je remercie par la même occasion les membres du jury pour le temps qu'ils auront consacré à l'évaluation de ce travail. Merci à Vanina Pasqualini et Cédric Bacher d'avoir accepté de lire et d'évaluer mon travail. Merci à Philippe Souch et Marc Bouvy d'être examinateurs de ma soutenance de thèse.

Je voudrais également remercier les membres de la direction de l'UMR, anciennement ECOSYM et plus récemment MARBEC, pour m'avoir accueilli dans leurs locaux. Merci notamment à l'équipe des gestionnaires du laboratoire, Solange, Zo, Yann, Anne-Catherine, et tous les autres pour leur aide dans toutes les démarches administratives que j'ai dû effectuer, et pour leur patience.

Je remercie toutes les personnes avec qui j'ai pu interagir et qui m'ont permis de pousser plus loin mes questions et mes raisonnements. Merci à François, Sébastien et Fabien pour leur aide méthodologique, statistique et pour leur participation à certaines des parties de cette thèse. Je n'aurais pas été aussi loin sans vous. Merci enfin pour la patience dont vous avez fait preuve malgré mes fréquentes apparitions furtives dans vos bureaux.

Merci à Philippe, Claire, aux membres de mes comités de thèse, à Thierry pour son avis éclairé :), aux membres du LER/LR, et à tous ceux avec lesquels j'ai pu discuter et qui m'ont permis d'enrichir mes connaissances sur le phytoplancton ou l'écologie des systèmes lagunaires, ou qui m'ont simplement permis d'avoir une autre vision des choses. Une mention spéciale à Yves ; j'aurais beaucoup appris, et aimé apprendre tellement plus auprès de toi.

Merci également à toutes les personnes qui ont travaillé avec moi, sur le terrain ou au laboratoire, et sans qui je n'aurais pas eu autant de résultats ! Merci à Fabien, Bernard, Elise, Daniel, aux membres du LER/LR avec qui j'ai fait les sorties bateau, Vincent qui m'a aidé à faire les prélèvements dans une eau à 6°C, ainsi qu'à tous les stagiaires : Mélanie, Claire, Nada, Vincent, Audrey, qui m'ont tenu compagnie sur le terrain ou ont démêlé une partie de mes résultats. Merci également à l'équipe Corse, Vanina, Marie, Yoann, et au personnel de la SMEL, dont Sébastien pour leur aide pour les manips. J'ai vraiment apprécié à ces moments de terrain. Même si les conditions étaient parfois compliquées, vous avez toujours gardé le sourire et la

bonne humeur, et je vous en remercie. Fab je n'oublierais jamais nos concours de vitesse de fixation du canoë à la voiture, les sangles n'ont plus de secrets pour moi désormais !

Je voudrais aussi remercier les enseignants-chercheurs et les personnels UM avec qui j'ai réalisé le monitorat : Audrey, Serge, Thomas, Christophe, Christine, Colin, Olivier, et tous les autres. J'ai beaucoup aimé préparer les TP avec vous, et ça m'a conforté dans l'idée que l'enseignement, c'est cool !

Merci aussi à toutes les personnes du laboratoire qui m'ont entourées tout ce temps : Sandrine, Jennifer, Marlène, Laure, Charlotte, Gaëtan, Fabien, et tous les autres. Merci pour les pauses thé, et les discussions ne portant pas sur le phytoplancton, mais sur le tricot, la couture, la cuisine et les voyages. Merci aussi pour les soirées Just Dance ^^ . Merci surtout à Cécile, qui m'aura supporté dès mon stage de master 1, merci pour les séances de sport, les sorties shopping (et les mojitos !!!) quand j'avais besoin de prendre l'air. Thank you Hanh, for our cooking time, for your energy, your smile and your continuously good mood. Even if you're living far away, you're still here with your emails, and I'm so happy every time you send me a picture of you, Amar and Lily!

Merci à mes amis, pour les moments de bonheur, d'amitié et de franche rigolade. Merci d'être restés présents même quand moi je ne l'étais pas. Merci pour les week-ends de folie et les parties de jeux de sociétés. Merci enfin pour vos relectures à la chasse aux fautes d'orthographe. Vous êtes les meilleurs !!!

Merci enfin à ma famille, mon papa, ma sœur, et Romain qui m'ont aidé à tenir le cap. Malgré les épreuves traversées, puissions-nous rester toujours unis. Merci Romain d'être resté présent et à l'écoute, de t'être occupé de moi quand j'en avais besoin, en toute circonstance. Je t'aime.

A tout ceux que j'ai pu oublier - ne m'en veuillez pas - merci aussi.

Je dédie cette thèse à ma maman, ma plus fidèle supportrice, qui n'aura pas pu voir l'aboutissement de ce travail. Tu restes toujours auprès de moi, et je n'aurais jamais eu le courage de faire tout ça si tu ne m'avais pas toujours soutenue.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	III
TABLE DES MATIERES.....	V
TABLE DES FIGURES.....	IX
TABLE DES TABLEAUX.....	XIII
LISTE DES ABREVIATIONS.....	XV
PUBLICATIONS ACCEPTEES, SOUMISES OU EN PREPARATION.....	XVII
PARTICIPATIONS ORALES A DES CONGRES.....	XVII
1 INTRODUCTION.....	1
1.1 LES LAGUNES COTIERES.....	3
1.1.1 Définition et origine.....	3
1.1.2 Des écosystèmes d'intérêt menacés par l'eutrophisation.....	5
1.2 MODELE BIOLOGIQUE : LE PHYTOPLANCTON.....	8
1.2.1 Définition générale.....	8
1.2.2 Diversité morphologique, spécifique et fonctionnelle.....	9
1.2.3 Approche basée sur les traits fonctionnels.....	10
1.2.4 Diversité taxonomique et relation avec les caractéristiques du milieu.....	23
1.2.5 Groupes fonctionnels adaptés au niveau d'eutrophisation.....	24
1.3 RESTAURATION ECOLOGIQUE ET REPOSE DES ECOSYSTEMES.....	25
1.4 UN SITE MODELE POUR ETUDIER LA RE-OLIGOTROPHISATION.....	27
1.4.1 Un écosystème très dégradé.....	27
1.4.2 Une restauration écologique engagée.....	28
1.4.3 Le complexe des étangs palavasiens.....	29
1.5 OBJECTIFS ET ORGANISATION DE LA THESE.....	32
2 MATERIELS ET METHODES.....	37
2.1 SITES D'ETUDES.....	39
2.1.1 Méjean ouest, Méjean est et Grec.....	40
2.1.2 Arnel, Prévost, et Pierre-Blanche.....	41
2.1.3 Vic, Ingril nord et sud.....	42
2.1.4 Ayrolle, lagune de « référence ».....	43
2.2 PRELEVEMENTS <i>IN SITU</i>	44
2.2.1 Prélèvements dans le cadre du RSL.....	44
2.2.2 Prélèvements mensuels dans le cadre de la thèse.....	44
2.2.3 Prélèvements dans le cadre des expériences d'enrichissement nutritif.....	45

2.3	PARAMETRES ABIOTIQUES	45
2.4	PARAMETRES BIOTIQUES.....	46
2.4.1	<i>Classe de taille</i>	46
2.4.2	<i>Abondances et diversité taxonomique du micro- et nanophytoplancton</i>	48
2.4.3	<i>Régime trophique</i>	49
2.4.4	<i>Croissance en condition nutritives saturantes et limitantes</i>	51
2.4.5	<i>Diversité pigmentaire</i>	57
2.4.6	<i>Indices de diversité fonctionnelle</i>	83
3	FIRST STEPS OF ECOLOGICAL RESTORATION IN MEDITERRANEAN LAGOONS: SHIFTS IN PHYTOPLANKTON COMMUNITIES	87
3.1	CONTEXTE DE L'ETUDE	89
3.2	VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	90
4	VARIABILITE DES COMMUNAUTES PHYTOPLANKTONIQUES DE TROIS LAGUNES AUX NIVEAUX TROPHIQUES CONTRASTES - ANALYSE DE DEUX ANS DE SUIVIS MENSUELS.....	141
4.1	CONTEXTE DU SUIVI MENSUEL ET DES EXPERIMENTATIONS <i>IN SITU</i>	143
4.2	PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES	145
4.3	VARIABILITE DE LA BIOMASSE PHYTOPLANKTONIQUE.....	147
4.4	DIVERSITE TAXONOMIQUE ET FONCTIONNELLE DU PHYTOPLANKTON	152
4.5	RELATION ENTRE VARIABILITE ENVIRONNEMENTALE ET COMPOSITION DU PHYTOPLANKTON	156
4.5.1	<i>Composition phytoplanctonique spécifique aux lagunes et à leur fonctionnement</i>	156
4.5.2	<i>Saisonnalité</i>	158
4.6	DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	163
5	MULTIDIMENSIONAL FUNCTIONAL DIVERSITY INDICES IMPROVE UNDERSTANDING OF PHYTOPLANKTON ECOLOGY IN COASTAL LAGOONS.....	167
5.1	CONTEXTE DE L'ETUDE	169
5.2	VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	171
6	PHYTOPLANKTON STRATEGIES TO EXPLOIT NUTRIENTS IN THREE COASTAL LAGOONS WITH DIFFERENT TROPHIC STATES, AND DURING RE-OLIGOTROPHICATION PROCESSES?.....	221
6.1	CONTEXTE DE L'ETUDE	223
6.2	VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	225
	<i>NUTRIENT LIMITATION AND RESOURCES USE</i>	233
	<i>CHARACTERISTICS OF PHYTOPLANKTON COMMUNITIES</i>	237

<i>GROWTH AND MORTALITY RATE UNDER NATURAL NUTRIENT CONDITIONS</i>	241
<i>INTERNAL, EXTERNAL AND RECYCLED RESOURCES EXPLOITATION DURING NUTRIENT DEPLETION</i>	244
7 DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	263
7.1 DISCUSSION GENERALE	265
7.1.1 <i>Quelles trajectoires suivent les communautés phytoplanctoniques de lagunes côtières soumises à des processus de re-oligotrophisation ?</i>	265
7.1.2 <i>Quelle est la diversité fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques de lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés ?</i>	266
7.1.3 <i>Quelle est la réactivité des communautés phytoplanctoniques de lagunes côtières en re-oligotrophisation à un enrichissement nutritif ponctuel ?</i>	271
7.1.4 <i>Quelles sont les stratégies d'exploitation des ressources des communautés phytoplanctoniques en réponse à la limitation nutritive, accrue lors des processus de re-oligotrophisation ?</i>	272
7.2 CONCLUSION GENERALE	273
7.3 PERSPECTIVES	278
7.3.1 <i>La restauration écologique des lagunes – Quelle évolution ?</i>	278
7.3.2 <i>Perspectives de recherche</i>	283
8 BIBLIOGRAPHIE	293

Table des figures¹

Figure 1. Lagunes du complexe des étangs palavasiens et leur lido. (a) Les deux lagunes (Méjean et Grec) sont traversées par le Canal du Rhône à Sète. (b) Prévost est connectée à la mer Méditerranée par un grau.....	4
Figure 2. Traits fonctionnels reliés aux fonctions écologiques de reproduction, d'acquisition des ressources et de prédation (Litchman and Klausmeier, 2008).....	12
Figure 3. Marée rouge à Xiamen, dans la province du Fujian (Chine). http://www.wri.org/our-work/project/eutrophication-and-hypoxia/impacts	23
Figure 4. Localisation du complexe des étangs palavasiens et de la lagune d'Ayrolle, sur le littoral Méditerranéen.	31
Figure 5. Cascaïls émergés de <i>Ficopomatus enigmatus</i> , étang palavasion. Crédit : Pôle-relais lagunes Méditerranée.....	41
Figure 6. Schéma récapitulatif des incubations en dilution menées pour chaque lagune à chaque saison. 32 bouteilles sont incubées au total : deux réplicats témoins contenant 100 % des échantillons non enrichis, et trois séries d'enrichissements en dilution, une enrichie en N et P, une enrichie sans N et une enrichie sans P.....	54
Figure 7. Incubation des 32 bouteilles au ponton de la SMEL dans l'étang de Thau, échantillons provenant d'Ayrolle, Avril 2014.....	55
Figure 8. Schéma bilan n°1. Réponses des communautés phytoplanctoniques à la réduction des apports en nutriments inorganiques dissous dans les lagunes côtières – parallèle avec les résultats observés sur les étangs palavasiens.....	139
Figure 9. Variation des moyennes des concentrations cumulées en nutriments inorganiques dissous durant les saisons hivernales, printanières, estivales et automnales 2013 et 2014 dans les trois lagunes AYR, IN, et MW.	146
Figure 10. Indice de variabilité annuel des paramètres environnementaux, basé sur les valeurs salinité, température, concentrations en azote total, phosphore total et Chl <i>a</i> ; de février 2013 à décembre 2014, pour les lagunes AYR, IN, et MW.....	147
Figure 11. Biomasse phytoplanctonique totale et fractionnée par classe de taille dans les lagunes oligo- (AYR, fig. A), meso- (IN, fig. B) et hypereutrophe (MW, fig. C), associée au signal de Phéophytine <i>a</i> , de février 2013 à décembre 2014.	148

9_____

¹ Ne prend pas en compte les figures intégrées dans les parties rédigées sous forme de publication scientifique (*cf.* Manuscrits A, B, C, D)

Figure 12. Abondances cellulaires des organismes autotrophes inférieurs à 6 µm dans les lagunes oligo- (AYR, Fig. A), méso- (IN, Fig. B), et hypereutrophes (MW, Fig. C), de février 2013 à décembre 2014.....	151
Figure 13. Contribution des pigments accessoires marqueurs de groupes phytoplanctoniques dans les lagunes oligo- (AYR, fig. A), meso- (IN, fig. B) et hypereutrophe (MW, fig. C), de février 2013 à décembre 2014.	155
Figure 14. Diagramme d'ordination des deux premiers axes de l'analyse canonique des correspondances (ACC) entre les variables environnementales explicatives et la composition pigmentaire mensuelle dans les trois lagunes oligo- (AYR, fig. A), méso- (IN, fig. B), et hypereutrophes (MW, fig. C). Les flèches représentent les paramètres environnementaux, les losanges représentent la composition pigmentaire des échantillons mensuels.....	157
Figure 15. Diagramme d'ordination des deux premiers axes de l'analyse canonique des correspondances (ACC) entre les variables environnementales explicatives et la composition pigmentaire mensuelle dans les trois lagunes oligo- (AYR, bleu), méso- (IN, vert), et hypereutrophes (MW, rouge) au printemps (A) et été (B) 2013 et 2014. Les flèches représentent les paramètres environnementaux, les losanges représentent le positionnement des échantillons mensuels.....	160
Figure 16. Diagramme d'ordination des deux premiers axes de l'analyse canonique des correspondances (ACC) entre les variables environnementales explicatives et la composition pigmentaire mensuelle dans les trois lagunes oligo- (AYR, bleu), méso- (IN, vert), et hypereutrophes (MW, rouge) au automne (A) et hiver (B) 2013-2014. Les flèches représentent les paramètres environnementaux, les losanges représentent le positionnement des échantillons mensuels.....	162
Figure 17. Schéma bilan de la variabilité intrinsèque des communautés phytoplanctoniques dans des lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés. Les biomasses, la composition et la dynamique temporelle de ces paramètres dépendent du fonctionnement nutritif des lagunes, et donc de leur niveau d'eutrophisation.....	166
Figure 18. Schéma bilan des processus mis en évidence au travers l'étude de la diversité fonctionnelle du phytoplancton : a. la richesse fonctionnelle et le nombre d'entités fonctionnelles identifiées dans les trois lagunes au cours des trois saisons témoignent de la différence de fonctionnement lagunaire entre les étangs palavasiens et Ayrolle ; b. la divergence fonctionnelle a montré une forte spécialisation dans Méjean ouest et Ayrolle au cours des saisons, jusqu'à une forte spécialisation par la taille en été, liée à la disponibilité et à la forme des nutriments.....	219

Figure 19. Schéma bilan des processus mis en évidence au travers de la comparaison entre les indices de diversité taxonomique (Indice de Shannon H') et fonctionnelle (Richesse fonctionnelle, nombre d'entités fonctionnelles) dans les lagunes Méjean ouest et Ingril nord entre le printemps et l'été 2014.....	220
Figure 20. Evolution de l'état des lagunes palavasiennes au cours des processus d'eutrophisation (représenté par la perturbation I) et de restauration (représentée ici par la perturbation II), selon Scheffer and Carpenter (2003).....	270
Figure 21. Schéma bilan – Impact de la réduction des apports nutritifs diffus sur les trajectoires des communautés phytoplanctoniques d'une lagune très dégradée. Analogie entre cette trajectoire et la composition des communautés de trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés.....	277
Figure 22. Succession des compartiments autotrophes phytoplanctoniques et macrophytiques. Adapté de Schramm 1999 et de Bec et al., ICES 2011.....	289
Figure 23. Interactions et transferts d'énergie entre le phytoplancton et les métazoaires benthiques et pélagiques, en fonction de leur taille et de leur mode de nutrition. Tiré de Cloern and Dufford (2005).....	291

Table des tableaux²

Tableau 1. Classification du phytoplancton par classe de taille selon Sieburth et al., 1978, adaptée dans Reynolds (2006) *et complétée par Robineau et al., 1994.....	9
Tableau 2. Mesures prises pour réduire les intrants en nutriments sur les lagunes côtières de Languedoc-Roussillon et de Corse.	29
Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques des lagunes du complexe des étangs palavasiens. Les températures, salinités et concentrations en Chlorophylle a (Chl a) sont calculées par des moyennes des données mensuelles estivales (juin, juillet, août) acquises par le biais du RSL entre 2000 et 2005.	39
Tableau 4. Caractéristiques environnementales de la lagune Ayrolle. Les valeurs de salinité, température et chlorophylle a ont été calculées sur la base de moyennes de valeurs estivales de 1999 à 2013 (RSL).	43
Tableau 5. Caractéristiques environnementales des lagunes oligo- (AYR), méso- (IN) et hypereutrophe (MW) au cours des 23 mois de suivi. Valeurs moyennes, minimales et maximales de février 2013 à décembre 2014.....	145
Tableau 6. Exemples de l'utilisation de stratégies d'acquisition des ressources alternatives à la phototrophie en réponse à la ré-oligotrophisation.	286

² Ne prend pas en compte les tableaux intégrés dans les parties rédigées sous forme de publication scientifique (*cf.* Manuscrits A, B, C, D)

Liste des abréviations

- 19'-Butfuco : 19'-Butanoyloxyfucoxanthin
- 19'-Hexfuco : 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin
- AICc : corrected Akaike's Information Criterion
- AN : Arnel
- Anth : Anthéroxanthine
- ASP : Amnesic Shellfish Poisoning
- CCA : *Canonical correlation analysis* – Analyse canonique des corrélations
- Chl *a* : Chlorophylle a
- Chl *b* : Chlorophylle b
- Chl *c* : Chlorophylle c
- Chl *c2* : Chlorophylle *c2*
- Chl *c3* : Chlorophylle *c3*
- COD : Carbone organique dissous
- DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole
- Diadino : Diadinoxanthine
- Diato : Diatoxanthine
- DSP : Diarrhetic Shellfish Poisoning
- FE : *Functional Entity* - Entité Fonctionnelle
- FDiv : *Functional divergence* – Divergence fonctionnelle
- FEve : *Functional Evenness* – Régularité fonctionnelle
- Fuco : Fucoxanthine
- FRic : *Functional Richness* – Richesse fonctionnelle
- FSpe : *Functional specialization* – Spécialisation fonctionnelle
- GC : Grec
- HAB : Harmful Algal Species
- HPLC : Chromatographie Liquide à Haute Performance
- IN : Ingril nord
- IS : Ingril sud
- ME : Méjean est
- MgDVP : Magnésium 2,4-divinylpheoporphyrin a_5 monoethyl ester
- MW : Méjean ouest
- NID : *DIN*: Azote inorganique dissous
- Neo : Néoxanthine

- NH_4^+ : Ammonium
- NO_3^- : Nitrate
- NO_2^- : Nitrite
- NOD : Azote organique dissous
- NOP : Azote organique particulaire
- Nt : Azote total
- PAR : Rayonnement photosynthétiquement actif
- PB : Pierre Blanche
- PC : Polycarbonate
- PC-Cyan : Cyanobactérie riche en phycocyanine
- PCoA : Analyse en coordonnées principales
- PE : Prévost est
- PE-Cyan : Cyanobactérie riche en phycoérythrine
- Peri : Péridinine
- PEUK : Picoeucaryotes
- PID : Phosphore inorganique dissous
- PO_4^{3-} : Phosphate
- POD : Phosphore organique dissous
- Prasino : Prasinolaxanthine
- PSP : Paralytic Shellfish Poisoning
- Pt : Phosphore total
- PW : Prévost ouest
- ROS : *Reactive Oxygen Species* – Espèces réactives de l’oxygène
- Rpm : rotation per minute
- RSL : Réseau de Suivi Lagunaire
- SMEL : Station Méditerranéenne de l’Environnement Littoral
- STEP : Station d’épuration
- VC : Vic
- Viola : Violaxanthine
- Zea : Zéaxanthine
- Z.I.C.O : Zone d’Importance pour la Conservation des Oiseaux
- Z.N.I.E.F.F. : Zone Naturelle d’Intérêts Ecologique, Faunistique et Floristique
- Z.P.S. : Zone de Protection Spéciale

Publications acceptées, soumises ou en préparation

Leruste A., Hatey E., Bec B., De Wit R. 2015. Selecting an HPLC method for chemotaxonomic analysis of phytoplankton community in Mediterranean coastal lagoons. *Transitional Waters Bulletin*. 9.1 (2015): 20-41 (MANUSCRIT A).

Leruste A., Malet N., Munaron D., Derolez V., Hatey E., Collos Y., De Wit R., Bec B. First steps of ecological restoration in Mediterranean lagoons: shifts in phytoplankton communities – Submitted to ECSS in August 2015 (MANUSCRIT B).

Leruste A., Villéger S., Malet N., De Wit R., Bec B. Multidimensional functional diversity indices improve understanding of phytoplankton ecology in coastal lagoons (MANUSCRIT C).

Leruste A., Guilhaumon S., Malet N., De Wit R., Collos Y., Bec B. Phytoplankton strategies to exploit nutrients in three coastal lagoons with different trophic states and during two blooming seasons – Which adaptation to re-oligotrophication processes? – In preparation, for *Journal of Plankton Research* (MANUSCRIT D).

Participations orales à des congrès

Leruste A., Villéger S., Malet N., de Wit R., Bec B. (2016). Multidimensional functional diversity indices improve understanding of phytoplankton ecology in coastal lagoons. Submitted for the 7th European Coastal Lagoon Symposium (Eurolag), 1-4th March 2016, Murcia – Spain.

Leruste A., Malet N., Garrido M., Pasqualini V., De Wit R., Bec B. (2015). Phytoplankton responses to nutrient enrichment and limitation in two Mediterranean lagoons under contrasting trophic status and nutrient discharge reduction for 9 years. ECSA 55th: "Unbounded boundaries and shifting baselines - Estuaries and coastal seas in a rapidly changing world" 6-9th September 2015 London – UK.

And to the « National Colloque Resomar » Montpellier-Sète 16-19th November 2015.

Leruste A., Malet N., Munaron D., De Wit R., Collos Y., Bec B. (2013). First steps of the Mediterranean lagoon restoration process: shifts in phytoplankton communities. VI EUROLAG Conference: "COASTAL LAGOON DOMAIN AND PROPERTIES: from fundamental research to policy implementation" 16-19th December 2013 Lecce – Italy.

Leruste A., Ouisse V., Žilius M., Bec B., Fiandrino A., Malet N., Le Noc S., Pilkaitytė R., Razinkovas-Baziukas A., **De Wit R.** (2013). Impact of nutrient reduction on phytoplankton and benthic metabolism in coastal lagoons; a first comparison between Mediterranean and Baltic lagoons. 9th Baltic Sea Science Congress, 6-30th August 2013, Klaipėda - Lithuania.

1 Introduction



Etangs de Pierre Blanche, Vic, Arnel et Prévost, Crédit : Pôle-relais lagunes méditerranéennes

1.1 Les lagunes côtières

1.1.1 Définition et origine

Les lagunes côtières sont des écosystèmes situés à l'interface entre le milieu continental et le milieu marin. Elles résultent généralement d'une élévation du niveau de la mer (ou transgression marine) durant l'Holocène ou le Pléistocène, puis de l'isolement d'une masse d'eau suite à la formation d'une barrière sédimentaire lors de dépôts fluviaux, ensuite façonnés par la houle et les courants marins côtiers (Kjerfve, 1994). Certaines lagunes peuvent aussi provenir d'anciens marais aménagés par l'homme (marais salants, bassins d'aquaculture, etc.) (Bioret et al., 2004), ou bien résulter de mouvements tectoniques. Elles sont alors plus profondes et d'une surface supérieure, comme c'est le cas de la lagune de Thau, qui est la lagune la plus grande (75 km²) et la plus profonde (jusqu'à 10 m) de l'ensemble des lagunes de la région Languedoc-Roussillon.

Les lagunes côtières sont généralement caractérisées par des plans d'eau peu profonds, parallèles à la côte, et séparés du milieu marin par une barrière physique appelée lido (Figure 1). La constitution du lido peut varier du cordon sableux au pan de terre, jusqu'à la barrière rocheuse, impliquant une porosité variable induisant des échanges plus ou moins diffus avec la mer. Ces systèmes peuvent également communiquer avec le milieu marin par le biais de canaux ouverts de façon permanente ou non, et d'une profondeur n'excédant pas quelques mètres (Grau). Néanmoins ces échanges restent souvent limités (Boynton et al., 1996; Tagliapietra and Ghirardini, 2006). Si leur surface est très variable (de quelques ha, jusqu'à 10 200 km² pour la lagune de *Lagoa dos Patos* au Brésil), leur profondeur moyenne est généralement inférieure à 5 m (Kjerfve, 1986).

Le terme « lagune » abrite une grande diversité d'écosystèmes dont les caractéristiques morphologiques (surface, profondeur, forme) et hydrodynamiques (équilibre entre les apports du bassin versant et du milieu marin côtier, pertes par évaporation et conditions climatiques) sont liées à différents paramètres tels que l'origine de la lagune, sa localisation, la nature du lido, et le régime hydrologique du système. Caractériser le régime hydrologique d'une lagune renseigne sur la dominance des régimes marins ou continentaux et donne une indication de l'échelle temporelle de la variabilité hydrologique. Ces informations sont d'une grande importance pour comprendre la variabilité temporelle des communautés peuplant ces écosystèmes, car le temps de résidence et des masses d'eau et ses caractéristiques physico-chimiques définissent la stabilité du système pour les organismes qui y résident, et plus particulièrement les organismes planctoniques tributaires des courants (Kennish et al., 2014).



Figure 1. Lagunes du complexe des étangs palavasiens et leur lido. (a) Les deux lagunes (Méjean et Grec) sont traversées par le Canal du Rhône à Sète. (b) Prévost est connectée à la mer Méditerranée par un grau.

Le fonctionnement hydrodynamique d'une lagune côtière dépend de trois processus majeurs :

- **Les apports d'eau issus du bassin versant.** Ils se traduisent par des entrées d'eau douce dans la lagune, provenant des eaux pluviales drainées sur la surface du plan d'eau, et des eaux continentales telles que les eaux fluviales et souterraines. Ils peuvent alors être permanents et diffus (embouchure de cours d'eau), ou limités dans le temps et intenses, tels que le ruissellement et les crues lors d'épisodes pluvieux.

- **Les échanges et le renouvellement des eaux avec le milieu marin côtier.** En Méditerranée ce mécanisme est principalement contrôlé par le vent, les effets de marées barométriques, la porosité du lido et la présence et l'ouverture des canaux. Les marées diurnes

et semi-diurnes peuvent aussi jouer un rôle prépondérant, particulièrement dans le cas de lagunes possédant peu d'ouvertures sur la mer. Le temps de résidence des eaux dans la lagune peut alors être très variable, d'un jour à plus d'un an (Umgiesser et al., 2014).

- **La circulation des eaux à l'intérieur de la lagune.** Elle se met généralement en place sous l'effet du vent (Millet, 1989).

L'ensemble de ces caractéristiques reste étroitement liées à la configuration de la lagune (surface, profondeur, forme). Par ailleurs, certaines lagunes peuvent être traversées par des canaux, comme c'est le cas des étangs palavasiens avec le canal du Rhône à Sète, ce qui impacte profondément les caractéristiques hydrologiques du système (Figure 1).

Les écosystèmes lagunaires côtiers constituent une part importante de la surface terrestre, soit 13% du littoral (Boynton et al., 1996), et leur répartition à toutes les latitudes (excepté dans les régions polaires) les place sous l'influence de divers climats, impliquant une variété importante de régimes hydrologiques et de variations saisonnières (Nixon, 1982). Les lagunes les plus sensibles aux conditions climatiques et hydrologiques et plus particulièrement aux variations saisonnières (température, éclaircissement, pluviométrie) sont celles de faible profondeur, aux échanges très limités avec la mer, et donc de faible inertie. En fonction de ces caractéristiques, elles peuvent présenter une large grande gamme de température et de salinité, de l'eau douce à l'hypersalinité (Nixon, 1982 ; Kjerfve, 1994).

1.1.2 Des écosystèmes d'intérêt menacés par l'eutrophisation

Le positionnement des lagunes à l'aval des bassins versants (soumises à d'importants apports d'eau douce (Pecqueur et al., 2011)), leur faible profondeur, ainsi que le faible renouvellement de l'eau leur confèrent une capacité naturelle à concentrer les nutriments, leur permettant de figurer parmi les milieux les plus productifs (en moyenne $300 \text{ g C m}^{-2} \text{ an}^{-1}$, parfois plus de $400 \text{ g C m}^{-2} \text{ an}^{-1}$ (Knopper, 1994; Cloern, 2001; Mouillot et al., 2005)). Cette forte productivité primaire constitue la base d'un réseau trophique dynamique et diversifié au travers duquel un grand nombre d'espèces (dont certaines espèces migratrices démersales) se maintiennent (Dupuy et al., 2000). Pour ces espèces, les lagunes constituent des zones idéales de reproduction et d'alevinages (Amilhat et al., 2008; Franco et al., 2010). Les lagunes côtières participent également à la stabilité des stocks de poissons et crustacés d'intérêt économique en constituant des réserves nutritives et des zones refuges pour les juvéniles (Rochette et al., 2010). Ces écosystèmes constituent de ce fait des réservoirs de biodiversité et de productivité écologique (Boynton et al., 1996; Pérez-Ruzafa et al., 2013) et contribuent au transfert des nutriments du milieu continental au milieu marin, et vers des niveaux trophiques supérieurs.

Grâce à ces caractéristiques, les lagunes procurent de nombreux biens et services à l'humanité, tels que la production de ressources alimentaires via les pêcheries et la conchyliculture (Dupuy et al., 2000; Amilhat et al., 2008; Franco et al., 2010; Pernet et al., 2012)

et participent ainsi au bien-être des populations humaines (Costanza et al., 1997 ; Barbier et al., 2011). Parmi les nombreux autres services écosystémiques offerts par les lagunes, on dénombre également (i) la production de biens via l'extraction de matières premières et de sel, (ii) le maintien et l'amélioration de la qualité des écosystèmes à travers la protection du littoral contre des événements climatiques extrêmes, (iii) la lutte contre l'érosion et le recyclage des nutriments (Collos et al., 2003), (iv) la purification de l'eau et la séquestration du carbone, notamment grâce à la présence d'herbiers et de zones humides (Kjerfve, 1994; Costanza et al., 1997; Barbier et al., 2011). Ces milieux participent également à façonner l'économie et la culture locale et régionale (conchyliculture et pêcheries traditionnelles) (Carlier et al., 2008), l'éducation, le paysage, et la recherche scientifique. Ils produisent notamment des services « intermédiaires » à travers les activités récréatives et le tourisme (Barbier et al., 2011).

La multitude de biens et services produits par ces environnements ainsi que leur localisation ont induits leur utilisation intensive. Cette surexploitation couplée à la morphologie des lagunes ainsi qu'aux conditions météorologiques rendent ces milieux très sensibles aux contraintes anthropiques (Souchu et al., 1998; La Jeunesse et al., 2002). Ces contraintes sont d'autant plus accentuées par l'expansion démographique qui s'est déroulée depuis les années 1960, particulièrement sur les littoraux (Demery, 1990; Nixon, 1995; Vitousek et al., 1997; Cloern, 2001; Nishikawa et al., 2010).

Globalement, les milieux lagunaires font aujourd'hui partie des écosystèmes les plus menacés par les pressions anthropiques (Nixon, 2009; Pereira Coutinho et al., 2012). La détérioration de ces systèmes du fait de l'eutrophisation, la surpêche, l'urbanisation littorale et les changements climatiques (hausse de la température, acidification, élévation du niveau des eaux etc.) affecte *in fine* leur participation à la production de services écosystémiques, tels que le maintien de pêcheries viables, d'habitats nourriciers, et les services de filtration et détoxification de l'eau (par les suspensivores, les zones humides et les herbiers). Par ailleurs, la fragilisation de ces milieux contribue à faciliter les invasions biologiques, l'altération de la qualité de l'eau, et la réduction de la protection côtière contre les inondations et les tempêtes (Barbier et al., 2011).

L'eutrophisation, c'est-à-dire « l'augmentation du taux d'apport de matière organique à un écosystème » (Nixon, 1995), représente cependant la principale menace pour les écosystèmes marins côtiers (Vitousek et al., 1997 ; Schramm, 1999) depuis les années 1960. Cette menace est d'autant plus forte pour les lagunes côtières dont le renouvellement de l'eau est faible (Kennish et al., 2014). La forte croissance démographique ces dernières décennies a entraîné un changement drastique d'usage des sols. Les zones urbaines et industrielles sur les littoraux se sont développées, de même que les zones agricoles pour répondre à une demande alimentaire croissante. Le développement des activités anthropiques et des densités de population a engendré une production excessive de nutriments, en particulier des formes

inorganiques de l'azote et du phosphore (Boesch, 2002). Cette production issue des zones urbaines, industrielles et agricoles a accéléré de façon notable les flux de nutriments de la lithosphère vers l'hydrosphère, et du milieu continental vers les zones côtières, via les eaux de ruissellement et les effluents d'eaux usées (Donald et al., 2013). L'excès de nutriment couplé à des conditions de température et de luminosité favorables a ainsi levé la limitation nutritive et stimulé la production primaire (phytoplanctonique et macrophytique). La hausse massive de la production et l'accumulation de biomasse algale ont en premier lieu induit une augmentation de la quantité de matière organique sédimentaire et donc de l'eutrophisation dans les milieux marins côtiers.

Cette forte productivité primaire a également provoqué une hausse de la turbidité, accentuant la compétition pour la lumière, favorisant dominance des organismes phytoplanctoniques au détriment des organismes autotrophes benthiques, et notamment macrophytiques (Bricker et al., 2008; Cebrian et al., 2014). Ces changements ont causé une perte de biodiversité des producteurs primaires associé à la disparition des herbiers (Howarth, 1998), au profit des communautés phytoplanctoniques qui constituent le premier compartiment autotrophe à répondre aux apports nutritifs (Schramm, 1999). Outre les conséquences sur l'ensemble des organismes photosynthétiques, le maintien de la diversité est un enjeu majeur dans ces écosystèmes car elle permet de maintenir la stabilité des services écosystémiques (Bullock et al., 2011), et favorise la résistance et la résilience face aux perturbations (Heemsbergen et al., 2004; Worm and Lotze, 2006). Les conséquences néfastes de l'altération de la composition des communautés autotrophes et de la biodiversité sur le fonctionnement des écosystèmes ont par ailleurs déjà été mises en évidence (Tilman et al., 1997; Danovaro et al., 2008). L'eutrophisation a ainsi entraîné la destruction d'habitats qui, couplée à ces modifications écologiques (disparition des herbiers, modification de l'équilibre entre le phytoplancton et les macroalgues), ont altéré la structure et le fonctionnement des milieux marins côtiers, et causé une perte des services écosystémiques (Smith, 2006; Carlier et al., 2008).

Les conséquences de l'eutrophisation s'illustrent notamment dans les lagunes côtières par des crises dystrophiques plus régulières et soutenues. Elles interviennent de manière saisonnière, en particulier en période estivale, lorsque les températures élevées favorisent la reminéralisation des stocks sédimentaires (Cloern, 2001). Durant cette période, lorsque le vent diminue et la température augmente, la circulation de l'eau à l'intérieur du bassin est réduite, provoquant une stratification verticale et réduisant les échanges dans la colonne d'eau. La stratification peut s'établir sur une longue période dans des écosystèmes relativement profonds (>5 m). En revanche, dans les écosystèmes peu profonds tels que les lagunes méditerranéennes, ce processus est généralement de courte durée et associé à un temps calme et ensoleillé et des températures élevées. Ces caractéristiques créent un gradient thermique dans la colonne d'eau

et conduisent à de rapides épisodes anoxiques (Zilius et al., 2013). En effet, dans les écosystèmes présentant des stocks sédimentaires importants, la demande en oxygène dans les sédiments (résultant d'une reminéralisation de la matière organique) augmente fortement, causant une anoxie en profondeur (Souchu et al., 1998). Les crises dystrophiques altèrent la structure des communautés et des réseaux trophiques, à travers plusieurs impacts. En premier lieu, elles contribuent à la disparition des espèces les plus sensibles au stress anoxique, généralement d'un niveau trophique supérieur, tel que les crustacés, mollusques, et poissons. Dans un second temps, les bactéries sulfato-réductrices capables de reminéraliser la matière organique en absence d'oxygène vont favoriser l'emploi des sulfates (oxydant majoritaire dans l'eau de mer) pour la minéralisation de la matière organique, et produire des molécules toxiques telles que le sulfure de dihydrogène néfaste pour les organismes avoisinants. La saisonnalité des lagunes se répercute donc également sur leurs capacités trophiques, et donc sur la composition des communautés qu'elles abritent.

1.2 Modèle biologique : le phytoplancton

1.2.1 Définition générale

Du grec « *phyton* » signifiant plante, et « *planktos* » signifiant errer, le phytoplancton désigne les organismes aquatiques photosynthétiques dont la mobilité est nulle ou négligeable par rapport aux mouvements des masses d'eau. Localisé dans la zone euphotique de la colonne d'eau, le phytoplancton appartient au monde pélagique et se dissocie donc des organismes benthiques colonisant les substrats, bien que certains organismes classés parmi le phytoplancton passent la majorité de leur vie sur le benthos (Woelfel et al., 2014). Leur mode de déplacement « passif » ou restreint les oppose également aux organismes du necton, dont la mobilité active leur permet de s'affranchir des mouvements liés aux courants.

Le phytoplancton est généralement associé à une production de matière organique par un mécanisme de photosynthèse appelée production primaire (Andersen, 1992), bien que certains organismes possédant d'autres types de régime trophique sont pris en compte dans ce groupe. Cette productivité les place à la base des réseaux trophiques (David et al., 2012), puisqu'ils constituent les majeurs producteurs de matière organique dans tous les écosystèmes aquatiques (Morais et al., 2003; Reynolds, 2006), participant activement à la fixation du carbone atmosphérique (Alvain et al., 2008). Leur production primaire représente en effet la moitié de la production primaire mondiale (Litchman and Klausmeier, 2008). Leur position à la base du réseau trophique et les besoins nutritifs que demande la photosynthèse les rendent particulièrement sensibles à la disponibilité en nutriments dans la colonne d'eau. Ce positionnement implique qu'ils soient les premiers à répondre à une modification de ces

apports, leur permettant de dominer les systèmes les plus eutrophisés (Schramm, 1999; Bricker et al., 2008).

1.2.2 Diversité morphologique, spécifique et fonctionnelle

Le phytoplancton est un groupe polyphylétique dont on estime le nombre d'espèces recensées entre 4000 et 5000, présentant une grande diversité (Reynolds, 2006). Ces espèces sont réparties au sein de deux domaines : les Bactéries et les Eucaryotes. Les organismes phototrophes oxygéniques au sein des Bactéries forment les Cyanobactéries et les Prochlorophytes. A l'intérieur du groupe des Eucaryotes, douze phylums sont distingués, selon le cortège pigmentaire, la forme de la cellule, la présence de flagelles, etc.

Plusieurs critères permettent de caractériser les organismes phytoplanctoniques. La diversité morphologique a été utilisée très tôt pour caractériser les organismes, mais elle a rapidement été associée à une classification plus globale, telle que la classification par classe de taille qui constitue un critère discriminant pertinent puisqu'il se base sur un aspect fonctionnel. En effet, la taille cellulaire et plus particulièrement le rapport surface/volume déterminent la majorité des caractéristiques écologiques du phytoplancton, notamment l'affinité de la cellule pour les nutriments présents dans la colonne d'eau (Raven, 1998), ainsi que la vulnérabilité vis-à-vis des prédateurs. Dans les années 70, un fractionnement en plusieurs classes de tailles permettant de classer les organismes planctoniques (Tableau 1) est proposé et rapidement utilisé en routine par une majorité des phytoplanctologues (Sieburth et al., 1978; Reynolds, 2006).

Tableau 1. Classification du phytoplancton par classe de taille selon Sieburth et al., 1978, adaptée dans Reynolds (2006) *et complétée par Robineau et al., 1994.

Nom de la classe	Echelle de taille
Picophytoplancton	0,2 – 2 μm
Ultraphytoplancton*	<5 μm
Nanophytoplancton	5 – 20 μm
Microphytoplancton	20 – 200 μm
Mesophytoplancton	200 μm – 2 mm
Macrophytoplancton	>2 mm

Ce critère a ensuite été pris en compte dans des classifications plus complexes, telles que dans l'approche basée sur la diversité fonctionnelle. La diversité fonctionnelle se différencie de la diversité spécifique par l'attribution d'un poids différent aux espèces selon qu'elles représentent une ou plusieurs fonctions participant au maintien de l'intégrité d'un écosystème.

Plusieurs espèces peuvent ainsi réaliser la même fonction, ce qu'on appelle la redondance fonctionnelle. Dans un écosystème abritant une biodiversité élevée, la redondance fonctionnelle permet aux communautés de maintenir les fonctions assurant la résistance et la résilience face aux perturbations même si certains organismes portant ces fonctions redondantes sont perdus (Rosenfeld, 2002). La présence de fonctions diverses et variées permet à l'inverse aux organismes de remplir des niches écologiques distinctes et de participer à une productivité élevée en utilisant plusieurs types de ressources. Cet autre aspect de la diversité est nommé complémentarité fonctionnelle (Gross et al., 2007; Blüthgen and Klein, 2011).

La diversité fonctionnelle des organismes est donc plus à même d'illustrer le fonctionnement d'un écosystème que la diversité spécifique qui affecte un poids identique à tous les organismes. Elle est également appliquée à l'étude de communautés végétale et leur rôle dans le fonctionnement des écosystèmes (Díaz and Cabido, 2001). Elle constitue donc un critère pertinent pour caractériser les communautés phytoplanctoniques. Cette approche présente l'intérêt de relier la structuration et la composition des communautés à la variabilité environnementale. En effet, les caractéristiques écologiques et physiologiques du phytoplancton sont contrôlées par des facteurs extérieurs tels que la disponibilité en nutriment, la température, l'ensoleillement, la salinité, la prédation (Margalef, 1978). Plus précisément, la croissance est par exemple contrôlée par des facteurs dit « *bottom-up* », tels que l'intensité lumineuse, la température, la salinité, la disponibilité en nutriments, tandis que la biomasse est davantage régulée par des effets dit « *top-down* », c'est-à-dire de la prédation et d'autres types d'interactions, tels que la compétition, l'allélopathie ou le parasitisme (Morais et al., 2003). L'approche basée sur la diversité fonctionnelle permet donc d'une part de définir la diversité des organismes en prenant en compte différents aspects fonctionnels et leur redondance, mais également d'évaluer les caractéristiques écologiques d'un milieu puisqu'elle joue un rôle majeur dans la stabilité du système face aux perturbations. Elle témoigne ainsi de l'altération d'un écosystème à travers son érosion et d'un changement des fonctions portées par les organismes selon l'état du milieu (Lotze et al., 2006; Worm et al., 2006).

1.2.3 Approche basée sur les traits fonctionnels

Pour illustrer ces changements, les organismes peuvent être classés par groupes fonctionnels, selon des traits qui témoignent de fonctions adaptées au milieu de vie. Les traits fonctionnels sont considérés comme des unités qui définissent la diversité fonctionnelle d'une communauté. Ils sont déterminés à partir de caractéristiques morphologiques, physiologiques ou phénologiques illustrant une sensibilité vis-à-vis des paramètres environnementaux, et qui sont susceptibles d'avoir un impact sur les performances et donc la survie d'un organisme (Violle et al., 2007). Parmi ces traits, le choix doit se porter également sur les plus judicieux par rapport à la variabilité environnementale étudiée. Dans le cas d'un gradient d'eutrophisation, les

traits les plus pertinents sont liés à la compétitivité pour les ressources, leur type d'acquisition, et leur utilisation (stockage ou croissance), c'est-à-dire la taille cellulaire, les taux de croissance, les taux d'absorption des ressources, et le régime trophique (Litchman et al., 2007).

L'approche basée sur les traits fonctionnels peut donc être utilisée pour expliquer l'organisation des communautés le long des gradients environnementaux, des interactions entre espèces, etc. Mais elle peut également mettre en évidence une variabilité environnementale à travers l'observation de changements dans l'organisation des communautés en termes de structure et de composition (Litchman and Klausmeier, 2008; Costa et al., 2009). Du fait de la rapidité de sa réponse, de sa forte sensibilité à des perturbations même faibles, et de la diversité des réponses spécifiques aux caractéristiques environnementales d'un système, le phytoplancton constitue un bon indicateur de l'état du milieu, particulièrement vis-à-vis de l'eutrophisation (Paerl et al., 2003).

Cette approche est couramment utilisée en écologie végétale et depuis une trentaine d'années seulement en écologie du phytoplancton (Litchman et al., 2010), notamment pour caractériser les communautés phytoplanctoniques au sein d'écosystèmes présentant des gradients environnementaux ou une variabilité spatio-temporelle (Padisak and Reynolds, 1998; Kruk et al., 2002; Reynolds et al., 2002; Smayda, 2002; Litchman et al., 2007; Costa et al., 2009; David et al., 2012). De ce fait, plusieurs traits et groupes fonctionnels adaptés à divers caractéristiques écologiques ont été proposés dans la littérature scientifique, dont les plus fréquemment utilisés et plus particulièrement ceux qui ont été pris en compte dans le cadre de ce travail de thèse sont décrits succinctement ci-dessous (Figure 2). Nous détaillerons également pour quelques groupes phytoplanctoniques les spécificités relatives à certains groupes fonctionnels.

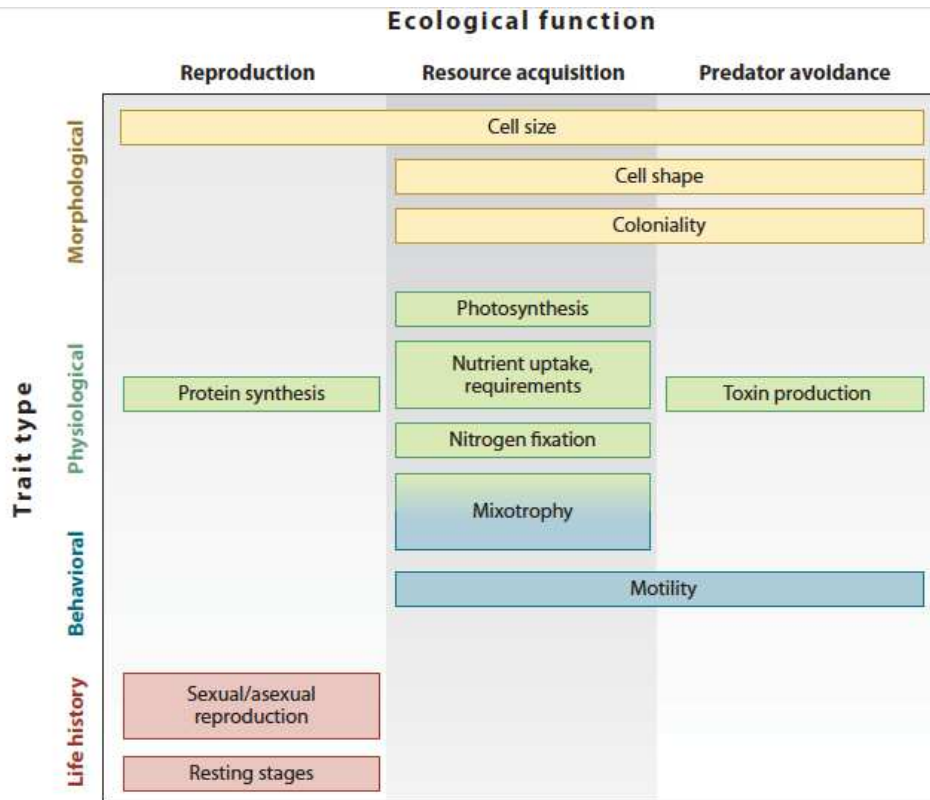


Figure 2. Traits fonctionnels reliés aux fonctions écologiques de reproduction, d’acquisition des ressources et de prédation (Litchman and Klausmeier, 2008).

Parmi les traits fonctionnels sélectionnés pour ce travail, les traits morphologiques, puis les traits physiologiques en relation avec les principales ressources et les caractéristiques environnementales (disponibilité et qualité lumineuse, disponibilité nutritive, salinité) sont décrits ci-dessous.

1.2.3.1 Taille cellulaire

La taille des cellules phytoplanctoniques constitue le critère discriminant majeur, car elle influence l’ensemble de leurs fonctions écologiques, et donc conditionne indirectement une majorité des autres traits fonctionnels (Figure 2) (Chisholm, 1992; Litchman et al., 2009, 2010). En premier lieu, les cellules plus petites sont plus facilement assimilables par les prédateurs qui peuvent les sélectionner en fonction de ce critère (Legrand et al., 1998), bien qu’à partir d’un certain seuil certaines cellules sont trop petites pour être consommées par les organismes filtreurs puisqu’elles ne sont pas retenues par les branchies (Caroppo, 2000). La relation proie-prédateur dépend donc fortement de la taille des proies de même que de la taille des prédateurs. En second lieu, la taille détermine la vitesse de sédimentation. Le phytoplancton autotrophe doit se maintenir dans la zone euphotique de la colonne d’eau pour recevoir une quantité de lumière suffisante à sa photosynthèse. Pour cette raison, des organismes de taille importante tels que certaines diatomées ont développé des appendices, des soies ou un agencement en colonies

filamenteuses pour augmenter leur portance et ralentir leur sédimentation, quand les organismes de taille réduite sont remis en mouvement plus facilement au moindre mouvement d'eau (voir paragraphe suivant). La taille détermine également l'affinité pour les ressources, lumineuses et nutritives. En effet, selon le rayon des cellules, la couche de diffusion passive des nutriments sera proportionnellement réduite, facilitant l'acquisition des nutriments pour les cellules dont la taille est réduite et le rapport surface/volume élevé (Chisholm, 1992; Raven, 1998). Les cellules de petite taille sont également avantagées en conditions de faible éclaircissement du fait d'une forte efficacité photosynthétique associée à un faible effet « package »³, ce qui représente un avantage en cas de forte biomasse impliquant une turbidité élevée (Raven, 1998; Litchman et al., 2010). Enfin, le taux de croissance maximal a montré une relation significativement corrélée négativement à la taille cellulaire, bien qu'il dépende du groupe taxonomique (Chisholm, 1992; Litchman et al., 2009).

Globalement, la structuration en classe de taille constitue une réponse aux pressions environnementales (prédation, limitation nutritive) et témoigne donc du fonctionnement du milieu (Litchman et al., 2010). Son impact sur les autres traits fonctionnels doit également être pris en compte dans les réponses phytoplanctoniques aux changements environnementaux.

1.2.3.2 Forme des cellules, colonialité et mobilité

Ces trois caractéristiques déterminent en partie la vitesse de sédimentation des organismes phytoplanctoniques, ainsi que la capacité d'acquisition des ressources et la vulnérabilité à la prédation.

Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, la taille des cellules conditionne leur efficacité d'acquisition des ressources. Les cellules dont la taille ne facilite pas l'absorption passive des nutriments ont développé des particularités morphologiques afin de réduire cette limitation. Par exemple, la forme cellulaire joue sur les capacités d'acquisition des nutriments : Les cellules de forme ovoïdes ou allongées ont plus de facilités d'acquisition des nutriments que les cellules sphériques (Chisholm, 1992).

La forme des cellules et la capacité à former des colonies sont également des facteurs impactant d'une part la vulnérabilité à la prédation, d'autre part la flottabilité et donc la disponibilité de la ressource lumineuse (Sournia, 1982), influençant la survie des organismes et leur compétitivité. La flottabilité des cellules est en effet un trait fonctionnel important puisqu'il détermine la capacité du phytoplancton dont la densité est généralement supérieure à celle de

³ L'effet « package » consiste en une diminution de l'efficacité d'absorption spécifique des pigments du fait de l'augmentation de leur concentration cellulaire (Kirk, 1983; Nelson et al., 1993)

l'eau à se maintenir dans la zone euphotique où il peut capter la lumière nécessaire à la photosynthèse (Huisman et al., 2002). Ce trait est cependant plus pertinent dans les écosystèmes marins que dans les lagunes côtières. Dans les écosystèmes lagunaires, la faible profondeur permet de s'affranchir de cette zone euphotique, bien que les fortes turbidités associées à des biomasses phytoplanctoniques élevées puissent néanmoins produire une limitation lumineuse en profondeur. Par ailleurs, les cellules présentant des formes aplaties, allongées, des épines, ou s'organisant en colonie sédimentent moins rapidement selon leur densité, et sont également plus difficiles à consommer que les cellules sphériques libres (Van Donk et al., 2011). Pour les cellules sphériques, la vitesse de sédimentation dépend exclusivement de la taille et de la densité cellulaire. Cette caractéristique a donné lieu à des adaptations chez les organismes immobiles afin d'augmenter leur flottabilité, telles que l'apparition d'une vessie gazeuse chez certaines cyanobactéries (Walsby et al., 1997). Pour les eucaryotes, qui ne possèdent pas de vessie gazeuse, la flottabilité est facilitée par la régulation des stocks internes de certains osmolytes, comme le nitrate et certains carbohydrates (Boyd and Gradmann, 2002), notamment chez certaines diatomées dont la flottabilité est négativement impactée par la densité du frustule (Moore and Villareal, 1996).

La présence d'une enveloppe protectrice externe en cellulose (thèque des Dinophytes et lorica des Chrysophytes), en silice (diatomées) ou en carbonate de calcium (Haptophytes) représente également une défense contre la prédation, rendant les cellules difficilement ingérables et digestes (Kruse et al., 2009). En revanche, si les cellules présentent des avantages à s'agréger en colonie, elles subissent une compétition supérieure pour les ressources que des cellules isolées puisque leur densité par unité de volume augmente, selon le type de colonie. Ainsi, les colonies mucilagineuses formées par certains groupes phytoplanctoniques tels que les Cyanobactéries, les Chlorophytes et les Chrysophytes se caractérisent souvent par une faible densité cellulaire au sein du mucilage, réduisant la compétition pour les ressources et le risque de prédation (Reynolds, 2006).

Les organismes possédant des organes locomoteurs (flagelles) présentent l'avantage de pouvoir se déplacer dans la zone euphotique pour bénéficier de l'ensoleillement optimal pour leur photosynthèse (Chang et al., 2003). Un grand nombre de groupes phytoplanctoniques sont dotés de flagelles (Reynolds, 2006), voir la majorité pour les communautés marines excepté les diatomées et les cyanobactéries qui ont plus tendance à s'associer en colonies. Suivant le nombre de flagelles et leur implantation, divers types de déplacement peuvent être observés, facilitant l'identification des organismes (Sournia, 1982). Cette mobilité accroît les chances de rencontre des proies et des particules et donc leur ingestion dans le cas des organismes mixotrophes ou hétérotrophes stricts (Reynolds, 2006). La mobilité et la flottabilité impactent également la facilité d'absorption des nutriments dissous dans la colonne d'eau à travers la

couche de diffusion passive qui entoure les cellules (Litchman et al., 2010). La présence de cellules agrégées en colonies, ou dotées de flagelles renseigne donc également sur les caractéristiques du milieu.

La mobilité, la colonialité et la forme ont également un impact sur le mode de vie phytoplanctonique. En effet, même si certains organismes sont qualifiés de phytoplanctoniques, ils peuvent être benthiques ou épiphytiques une grande majorité de leur vie, comme ce peut être le cas de certaines diatomées (Coleman and Burkholder, 1994; Agatz et al., 1999).

1.2.3.3 Régime trophique

Le régime trophique est une caractéristique déterminant le rôle des organismes phytoplanctoniques dans l'écosystème et dans la structuration des communautés par rapport au niveau trophique du milieu. Si la plupart des organismes phytoplanctoniques sont des autotrophes au sens strict, c'est-à-dire utilisant la photosynthèse pour produire de la matière organique et de l'énergie, certains ont développé des modes de nutrition alternatifs pour s'adapter à des conditions où l'autotrophie n'est pas favorisée (Navarro et al., 2011). Au sein du phytoplancton, le groupe des Dinophytes compte le plus grand nombre de cas de cellules présentant une absence de plastes. On considère qu'environ la moitié des espèces de Dinophytes sont des hétérotrophes stricts (Granéli and Turner, 2007). Ces cellules ont donc acquis des modes de nutrition par osmotrophie, ou phagotrophie (Hansen, 1991). L'osmotrophie consiste à absorber directement des molécules organiques ou des substances dissoutes (acides nucléiques, polysaccharides, ions) par diffusion à travers la membrane cytoplasmique. Ce type de nutrition permet aux organismes d'être particulièrement compétitifs dans les milieux limitants, notamment pour acquérir du phosphore. Cette capacité dépend notamment de l'affinité de la cellule pour la molécule ciblée (Tambi et al., 2009). La phagotrophie consiste en l'ingestion de petites particules ou de proies par phagocytose, digérées ensuite intracellulairement (Navarro et al., 2011). Elle peut également se produire par le biais de structures particulières telles que des pseudopodes (Hansen and Calado, 1999). Ces modes de nutrition contrôlent la structuration des communautés, en particulier l'abondance des organismes préférentiellement ingérés. Plus précisément, un grand nombre de ces organismes est capable d'alterner entre autotrophie et hétérotrophie en fonction des conditions environnementales, ce qu'on appelle la mixotrophie (Bockstahler and Coats, 1993; Stoecker, 1999). Parmi ces organismes, on dénombre des Chrysophytes, des Prasinophytes, des Euglénophytes, des Dinophytes, tous représentés dans les lagunes côtières eutrophisées. Cette particularité peut également leur conférer des taux de croissance supérieurs à ceux des organismes uniquement photolithotrophes (Raven et al., 2009). Par ailleurs, certains Dinophytes hétérotrophes ont également acquis une adaptation supplémentaire, appelée cleptoplastidie, qui leur permet de conserver les plastes de leur proie

dans un état fonctionnel sur une certaine durée afin de réaliser la photosynthèse (Lewitus et al., 1999; Raven et al., 2009).

Les organismes possédant des capacités mixotrophiques sont donc particulièrement compétitifs lorsque la disponibilité en ressources nécessaires à la photosynthèse diminue, et leur présence en proportion élevée peut témoigner d'un milieu pauvre en nutriment ou limité en lumière (Legrand et al., 1998; Litchman et al., 2010), bien que la mixotrophie soit également observée dans des milieux eutrophisés et chargés en matière organique particulière (Burkholder et al., 2008).

1.2.3.4 Taux de croissance et utilisation des ressources

Les organismes autotrophes nécessitent d'absorber certains nutriments pour produire leur matière organique, telle que le phosphore entrant notamment dans la composition des acides nucléiques et de l'ATP, et l'azote entrant notamment dans la composition des protéines. Les capacités d'acquisition de ces ressources (et d'autres, tels que la silice ou les micronutriments, le carbone, l'oxygène, etc.), influencent la production de biomasse, les taux de croissance et la compétitivité des organismes (Reynolds, 2006).

Le taux de croissance maximal en conditions optimales représente un trait fonctionnel qui témoigne de la compétitivité des organismes pour produire leur biomasse et se maintenir dans l'écosystème. Si les cellules de taille réduite possèdent une forte affinité pour les nutriments disponibles dans la colonne d'eau, elles possèdent également des taux de croissance maximaux élevés lorsque les conditions de lumière et de température sont favorables (Bec et al., 2005). Ces caractéristiques les rendent particulièrement compétitives par rapport aux organismes plus gros, en particulier dans les milieux faiblement eutrophisés ou très variables (Chisholm, 1992; Agawin et al., 2000; Collos et al., 2009; Bec et al., 2011). Globalement, des études ont montré que les différentes formes d'azote stimulaient la croissance de groupes phytoplanctoniques variés. Plus précisément, l'ammonium stimulerait davantage la croissance des petites cellules telles que les cyanobactéries, tandis que le nitrate favoriserait davantage celle des grosses cellules et plus précisément des eucaryotes (Chisholm, 1992; Donald et al., 2011), les taux d'acquisitions étant variables selon les organismes.

Parmi les organismes de petite taille possédant une croissance rapide, les algues vertes et les cyanobactéries sont particulièrement représentées. Ces groupes possèdent l'avantage d'être capable d'utiliser plusieurs formes d'azote dont l'ammonium, couplé à une tolérance supérieure aux autres organismes phytoplanctoniques vis-à-vis de la teneur en azote dans l'eau (Donald et al., 2011, 2013). En effet, la consommation d'ammonium présente un coût énergétique inférieur à celui du nitrate et permet une plus forte productivité. De plus, l'assimilation du nitrate est un processus dépendant de l'intensité lumineuse disponible, et nécessitant la réduction de la molécule avant de pouvoir être assimilable (Reynolds, 2006;

Domingues et al., 2011). A l'inverse, certains groupes n'utilisent pas l'ammonium et sont à plus forte raison inhibés à partir de seuils parfois relativement faibles, comme ce peut être le cas pour les diatomées et les Dinophytes (Domingues et al., 2011). Certaines cyanobactéries présentent également des capacités de fixation du diazote atmosphérique en azote organique grâce à une spécialisation cellulaire, et qui offre un avantage compétitif lorsque l'azote est limitant dans le milieu (Chisholm, 1992). D'autres encore sont capables de stocker de l'azote sous forme de protéines et d'acides aminés dans des vésicules appelées cyanophycines (Simon, 1971).

Les diatomées présentent au contraire une forte affinité pour le nitrate couplée à des taux de croissance élevés, les rendant particulièrement compétitives lorsque les conditions de température et d'ensoleillement sont optimales ou non, grâce à une efficacité photosynthétique élevée (Parsons et al., 1978; Chisholm, 1992; Chang et al., 2003; Donald et al., 2011). Les diatomées sont d'autant plus compétitives puisqu'elles ne sont pas sensibles aux turbulences qui peuvent intervenir lors d'épisodes pluvieux entraînant le lessivage du bassin versant et un apport d'eau douce et de nitrate. En revanche, leur croissance peut être limitée par un déficit en silice nécessaire à la production de leur frustule (Donald et al., 2013), et les fortes biomasses produites lors de pulses nutritifs ne se maintiennent généralement pas dans le milieu lorsque les nutriments sont épuisés. C'est plus particulièrement le cas lorsque la concentration en phosphate disponible devient limitante, car les diatomées ne peuvent pas le stocker en grande quantité dans le cytoplasme, au contraire du nitrate qu'elles peuvent potentiellement stocker dans des vacuoles dont le volume peut s'ajuster dans une certaine mesure (Litchman et al., 2009).

Les Dinophytes ne présentent globalement pas de taux croissance très compétitifs, mais leurs capacités mixotrophiques leur permettent de se maintenir lorsque les concentrations en nutriments diminuent. En revanche, leur croissance n'est pas nécessairement stimulée par des apports en azote, et au contraire, des concentrations élevées en ammonium provoquent une inhibition de ces organismes (Collos and Harrison, 2014). De plus, ce groupe est très sensible aux turbulences de la colonne d'eau qui limitent sa croissance et sa compétitivité (Margalef, 1978; Berdalet et al., 2007). Par ailleurs, les Dinophytes ont montré une compétitivité inférieure à celle des diatomées ou des algues vertes lorsque les conditions nutritives sont saturantes (Piehler et al., 2004). Les taux de croissance ne sont pas directement liés aux taux d'acquisition des ressources, car les organismes peuvent privilégier le stockage de réserve au détriment de la croissance (Reynolds, 2006). Ces caractéristiques ont été généralisées au sein de plusieurs types de stratégies de survie face aux conditions environnementales, résumées dans l'encart n°1.

Encart n°1 : Stratégies globales C, R, S, et stratégies spécifiques r et K

Les traits fonctionnels ont été utilisés dans la littérature scientifique pour décrire des « stratégies » adaptatives du phytoplancton selon différents degrés de stabilité, perturbation et stress nutritif dans le milieu. Ces stratégies témoignent des adaptations du phytoplancton aux conditions environnementales, afin d'y survivre soit en étant très compétitif, soit en étant tolérant au stress ou aux perturbations (Reynolds, 1988). Démontrées en premier lieu dans les écosystèmes aquatiques continentaux, ces stratégies se sont également vérifiées dans les milieux saumâtres à marins (Smayda and Reynolds, 2001).

- **Stratégie C, ou stratégie « Colonisatrice » ou « compétiteurs »,** généralement utilisée par les organismes possédant une forte compétitivité, et pouvant répondre à un changement environnemental très rapidement par une production de biomasse soutenue. Ces organismes se définissent par une taille réduite, des taux de croissance et de reproduction élevés, un ratio Surface/Volume élevé (Huzar and Caraco, 1998).

- **Stratégie R, ou stratégie « Rudérale », tolérantes aux perturbations physiques,** associée aux organismes capables de tolérer des perturbations physiques ou nutritives. Ce sont généralement des organismes possédant des capacités d'adaptations marquées, aussi bien au niveau des structures permettant la photosynthèse que celles permettant la mobilité ou la flottabilité. Ils peuvent conserver un rapport S/V élevé malgré une taille plus importante.

- **Stratégie S, ou tolérantes au Stress (notamment nutritif),** généralement associée à des organismes dont la croissance est plus lente mais possédant des capacités de stockage leur permettant de survivre en condition d'épuisement des ressources nutritives, par exemple au travers d'autres régimes trophiques. Ils sont généralement de taille importante, souvent ornementés, capable de mouvement, notamment verticaux par l'utilisation de flagelles ou par une régulation de la flottabilité.

Au sein des groupes phytoplanctoniques, les trois stratégies peuvent être utilisées, comme c'est le cas au sein des Dinophytes, et certaines espèces peuvent montrer des caractéristiques intermédiaires aux trois groupes (Smayda and Reynolds, 2003). Globalement, dans les écosystèmes enrichis en nutriments (eutrophisés), de faibles profondeurs et dont la stratification peut être élevée saisonnièrement, les organismes prédominants sont généralement des espèces à stratégie C. Dans les écosystèmes oligotrophes, fortement stratifiés, les espèces dominantes sont au contraire des espèces S tolérantes au stress.

Espèces r et K

A l'intérieur des groupes utilisant ces trois stratégies, on peut observer différentes réponses selon les espèces face à des changements environnementaux. Ces différences se traduisent plus particulièrement par des taux de croissance plus ou moins élevés. On peut ainsi distinguer deux principaux types d'espèces, les **espèces r** et les **espèces K** (Margalef, 1978; Smayda and Reynolds, 2001). Les espèces r sont capables de répondre rapidement à un changement environnemental et de produire des taux de croissance élevés, mais dont la biomasse chutera à l'épuisement des ressources. A l'inverse, les espèces K possèdent un taux de croissance faible, qui sature à une faible concentration en nutriment, et qui permet de ce fait à ces organismes d'être plus tolérant à des périodes de stress nutritifs et donc de se maintenir même lorsque les ressources sont limitantes.

1.2.3.5 Cortège pigmentaire : Adaptation à l'intensité lumineuse et photoprotection

Au même titre que les ressources nutritives, la lumière constitue une ressource indispensable au phytoplancton pour effectuer la photosynthèse. Dans les écosystèmes aquatiques, les radiations lumineuses sont absorbées et leur intensité diminue avec la profondeur, modifiant la quantité et la qualité du spectre disponible pour les organismes (Kirk, 1983). Plus précisément, les molécules d'eau provoquent principalement une atténuation dans la plage spectrale du rouge. Dans les milieux eutrophisés, la présence de phytoplancton ou de matière organique en suspension conduit quant à elle à un affaiblissement de la plage spectrale du bleu à l'ultraviolet. Cette variabilité de la qualité et de la quantité lumineuse peut être un facteur de contrôle de la productivité et de la structure des communautés phytoplanctoniques. Dans ce sens, ces organismes ont mis en place des cortèges pigmentaires leur permettant de s'adapter à ces conditions lumineuses variables (Vörös et al., 1998).

Les cellules photosynthétiques possèdent des organites spécialisés dans la capture et l'utilisation de la lumière pour produire de la matière organique, appelés plastes. Leur forme, leur taille ainsi que leur nombre peuvent être spécifiques et constituer des critères de détermination taxonomique (Roy et al., 2011). Ces organites peuvent contenir au sein de leurs thylakoïdes différents cortèges pigmentaires aux rôles variés. Les chlorophylles et les caroténoïdes sont présents chez tous les organismes photosynthétiques, tandis que les biliprotéines sont plus spécifiques et sont présents chez les Cyanobactéries, les Cryptophytes et les algues rouges (Kirk, 1983).

Parmi les chlorophylles, la chlorophylle *a* joue le rôle majeur de donneur d'électron initial dans la chaîne respiratoire, à la base des photosystèmes. La présence de Chl *a* conditionne la capacité photosynthétique et donc de production des organismes. Les autres pigments sont « accessoires », et leur rôle principal est d'absorber l'énergie lumineuse et de la transmettre à la Chl *a* par le biais de photosystèmes (PSI et PSII). La présence de chlorophylle *b* permet d'accroître le spectre d'absorption dans le bleu et le rouge afin d'augmenter la quantité énergétique absorbée. Ce pigment est très représenté chez les Algues vertes, dont les Chlorophytes, les Euglénophytes mais également chez les Prochlorophytes, tandis que la chlorophylle *c* est plus représentée chez les Algues brunes (Hétérocontes⁴, Dinophytes et

19_____

⁴ Les Hétéroncontes ou Straménopiles sont des organismes dont les cellules possèdent au moins un stade mobile avec deux flagelles dissemblables (gamète, ou spore). Cet ensemble regroupe notamment les Phaéophytes, les Xanthophytes, les Diatomophytes, et les Oomycètes. Les Hétérokontes autotrophes sont regroupés sous le terme Ochrophytes, et on distingue à l'intérieur de cet ensemble les Phaéophytes (Algues brunes), les Diatomophytes (Diatomées), les Xanthophytes.

Haptophytes) (Palfy et al., 2013). Les biliprotéines généralement rouges (phycoérythrine) ou bleues (phycocyanine), sont largement représentées chez les Cyanobactéries.

Les caroténoïdes possèdent également des photorécepteurs permettant de capter l'énergie lumineuse généralement dans le spectre bleu, qui peut être soit transférée à un autre pigment du photosystème, soit dissipée sous forme de chaleur. Ce mécanisme permet de protéger les photosystèmes du stress photo-oxydatif dans le cas où l'intensité lumineuse est trop forte. En effet, lorsque l'énergie lumineuse excède la quantité utilisable par la machinerie photosynthétique, la chl *a* excitée par l'énergie lumineuse peut réagir avec l'oxygène moléculaire et former une des espèces réactives de l'oxygène (ROS⁵), telle que l'oxygène singulet, à l'origine d'un stress photo-oxydatif. Les ROS ont un impact négatif sur les constituants cellulaires, et elles peuvent notamment oxyder les lipides, les protéines, les pigments, l'ADN, etc. Le stress photo-oxydatif provoque une dégradation du photosystème II, conduisant à une réduction de l'efficacité photosynthétique (Keren et al., 1997; Niyogi et al., 1997). Ce mécanisme peut avoir lieu près de la surface où la lumière incidente est peu atténuée lorsque l'eau est peu turbide, notamment lorsque la température de l'eau est élevée (Kirk, 1983). Pour cette raison, des concentrations élevées en pigments caroténoïdes photoprotecteurs tels que la diadinoxanthine, la diatoxanthine et la zéaxanthine peuvent être mesurées dans le phytoplancton de milieux oligotrophes (Staehr et al., 2004).

La photoprotection en réponse à une intensité lumineuse trop forte peut être visualisée à travers le cycle des xanthophylles. Les xanthophylles répondent via deux cycles à ce stress par la conversion de pigments d'une forme à une autre, par une réaction de dé-époxydation permettant d'augmenter la capacité photoprotective des plastes (Roy et al., 2011). On observe alors les transformations suivantes :

- (1) Violaxanthine (Viola) -> Zéaxanthine (Zéa) -> Anthéroxanthine (Anth)
- (2) Diadinoxanthine (Diadino) -> Diatoxanthine (Diato)

La transformation de ces pigments est utilisée différemment selon les groupes phytoplanctoniques. Plus précisément, les diatomées utilisent majoritairement le cycle de la diadinoxanthine, tandis que d'autres algues brunes telles que les Chrysophytes privilégient le cycle de la violaxanthine. D'autres caroténoïdes permettent à l'inverse d'absorber les radiations lumineuses, et d'augmenter les capacités d'absorption dans les longueurs d'ondes vertes, telles que la fucoxanthine chez les Diatomées et la péridinine chez les Dinophytes, améliorant les capacités photosynthétiques de ces organismes dans les eaux peu turbides. On dénombre

⁵ ROS : « Reactive Oxygen Species » : Ce groupe comprend notamment l'ozone, l'oxygène singulet, le super-oxyde, le peroxyde d'hydrogène, etc.

également parmi les pigments capteurs de lumière, tels que la prasinoxanthine et la violaxanthine.

En fonction de la luminosité, le phytoplancton va disposer d'une certaine plasticité phénotypique lui permettant de s'adapter au niveau cellulaire (forme, volume cellulaire) et morphologique (densité des membranes thylakoïdiennes au sein des plastes, concentration en pigments, coefficient d'absorption spécifique de la Chl *a*). Par exemple, la concentration en Chl *a* dans une cellule peut varier selon le besoin d'absorption lumineuse : si la quantité de lumière incidente est faible, la concentration en Chl *a* va augmenter pour optimiser l'absorption de la lumière et inversement. Ce phénomène appelé photoacclimatation permet d'adapter la croissance aux conditions lumineuses (Staehr et al., 2004; Roy et al., 2011).

Selon leur cortège pigmentaire, les cellules phytoplanctoniques vont pouvoir réaliser efficacement la photosynthèse en utilisant des longueurs d'ondes différentes, selon la qualité de l'intensité lumineuse et de l'absorption de la lumière par l'eau. Par exemple, les cyanobactéries riches en phycoérythrine (PE-Cyan) utilisent ce pigment afin d'absorber la lumière verte. Elles sont de ce fait généralement abondantes dans les milieux aquatiques faiblement eutrophisés dans lesquels l'eau absorbe en priorité la lumière dans le rouge, conduisant à une forte pénétration de lumière verte. A l'inverse, les cyanobactéries riches en phycocyanine (PC-Cyan) utilisent ce pigment pour absorber la lumière dans le rouge et sont de ce fait davantage inféodées aux milieux eutrophisés ou turbides dans lesquels la lumière incidente est davantage rouge (Vörös et al., 1998; Stomp et al., 2007).

1.2.3.6 « Harmful Algal Bloom »

Certaines espèces phytoplanctoniques possèdent les capacités d'inhiber la croissance d'autres organismes, causant de fortes mortalités à tous les niveaux trophiques. Les organismes à l'origine de ces phénomènes sont appelés « *Harmful Algal Species* » ou « *Harmful algal bloom* » (HAB), et la majorité appartient au groupe des Cyanobactéries, des Dinophytes et des diatomées (Smayda and Reynolds, 2003). Cette inhibition peut être en premier lieu provoquée par la production d'une biomasse très élevée entraînant une diminution de la disponibilité en nutriments, en lumière et en oxygène pour tous les organismes de la colonne d'eau. Ces modifications des ressources entraînent un changement du réseau trophique associé à de fortes mortalités. Ces efflorescences sont connues sous le terme de marées rouges (Maso and Garces, 2006; Granéli and Turner, 2007; Yin et al., 2008) (Figure 3). L'inhibition peut également provenir d'un impact négatif sur les organismes filtreurs du fait de la production de mousse ou d'écume (Anderson et al., 2002). Mais elle peut également résulter d'une production de toxines lorsque les biomasses atteignent un certain seuil afin d'empêcher la survie des autres organismes (par une inhibition de croissance, ou des mécanismes d'acquisition des nutriments). Ce type d'interaction chimique entre organismes s'appelle l'allélopathie (Granéli and Turner,

2007). Ces molécules font l'objet d'une attention soutenue puisqu'elles ont des conséquences néfastes sur la santé humaine, à travers la consommation de poissons ou crustacés ayant accumulé ces toxines, la respiration d'aérosols d'eau contenant les toxines, ou des réactions allergiques cutanées. On dénombre notamment des toxines amnésiques (ASP), diarrhéiques (*Diarrhetic Shellfish Poisoning* ou DSP), des neurotoxines paralysantes (PSP), etc. (Backer and McGillicuddy, 2006; Maso and Garces, 2006). Le seuil de densité provoquant la production de ces toxines peut être relativement faible, comme dans le cas d'épisodes de DSP lié au genre *Dinophysis* (Maso and Garces, 2006). Parmi les HAB, un grand nombre d'espèces a montré des capacités leur permettant d'être très compétitives quel que soit la disponibilité des ressources dans le milieu, telles que la mixotrophie, la nage active ou un cycle de vie passant par un stade de dormance sous forme de kyste (Maso and Garces, 2006; Burkholder et al., 2008).

Ces trois types d'inhibitions façonnent la structure et la composition des communautés en termes de diversité au détriment des communautés inhibées, et ont un impact significatif sur le bon fonctionnement d'un écosystème et les services écosystémiques qu'il procure (Granéli and Turner, 2007). Le lien entre l'apparition des HAB et la disponibilité des ressources n'est pas clairement défini. En effet, si certaines HAB produisant des marées rouges ont été associées à un enrichissement excessif des zones côtières, ce lien est dans certains cas difficile à mettre en évidence, en particulier lorsque des organismes mixotrophes adaptés aux milieux oligotrophes sont à l'origine d'efflorescences en faibles biomasses associées à la production de toxines (Maso and Garces, 2006).



Figure 3. Marée rouge à Xiamen, dans la province du Fujian (Chine). <http://www.wri.org/our-work/project/eutrophication-and-hypoxia/impacts>.

1.2.4 Diversité taxonomique et relation avec les caractéristiques du milieu

La diversité taxonomique n'est pas basée sur des traits fonctionnels à proprement parler, mais elle a pourtant souvent été couplée à l'étude des traits fonctionnels des communautés afin d'appréhender les processus écologiques le plus finement possible (Díaz and Cabido, 2001; Litchman et al., 2007). La connaissance de certains taxons possédant des traits fonctionnels spécifiques permet ainsi de compléter la vision de la diversité fonctionnelle liée aux caractéristiques environnementales à un instant T. Aussi, 7 principaux groupes sont généralement utilisés pour caractériser la diversité : Les Cyanobactéries, les Chlorophytes, les Diatomées, les Chrysophytes, les Dinophytes, les Haptophytes et les Cryptophytes. Ces groupes possèdent diverses caractéristiques fonctionnelles qui leur permettent de dominer les écosystèmes selon leurs caractéristiques écologiques. De ce fait, leur présence explique les caractéristiques de l'écosystème en termes de salinité, luminosité, ressources nutritives (Huzar and Caraco, 1998). Globalement, l'ensemble des traits fonctionnels décrits ci-dessus s'exprime différemment au sein de ces groupes taxonomiques qui ont développé des capacités d'adaptations spécifiques reflétant les caractéristiques du milieu auxquelles elles répondent. Certaines de ces capacités ont déjà été évoquées ci-dessus, telles que la mixotrophie des Dinophytes, la phagotrophie des Euglénophytes, l'adaptation au spectre lumineux dans les

milieux eutrophisés des PC-Cyan. D'autres groupes d'organismes ont également développé des adaptations à l'utilisation et au stockage des ressources nutritives, telles que certaines cyanobactéries qui stockent l'azote dans des cyanophycines (Simon, 1971; Campbell, 1994). Enfin, certains ont également développé des réponses à la variabilité de salinité qui peut être très forte dans les lagunes côtières. C'est le cas notamment de l'algue verte unicellulaire *Dunaliella salina*. Cette microalgue est fortement tolérante aux variations de salinité, et particulièrement aux fortes salinités, dont elle s'affranchit en accumulant du glycérol et des protéines spécifiques afin d'équilibrer son osmolarité avec le milieu (Oren, 1993). Certaines diatomées pennées utilisent également ce processus afin de se maintenir lorsque la salinité augmente dans le milieu (Abid et al., 2008). Connaître ces spécificités par le biais d'observation *in situ* et de la littérature scientifique permet de compléter l'approche basée sur les traits fonctionnels qui bien souvent n'utilise que les traits les plus simples à mesurer. Cependant, la diversité spécifique doit être prise en compte avec précaution, car plusieurs espèces éloignées phylogénétiquement peuvent posséder des traits fonctionnels communs (due à la convergence évolutive), tandis que des espèces proches peuvent posséder des traits fonctionnels contrastés (divergence évolutive). De plus, du fait de cette redondance fonctionnelle, la diversité spécifique ne peut expliquer pleinement l'adaptation des communautés aux caractéristiques environnementales et à leur variabilité, d'autant plus que toutes les espèces ne répondent pas de la même manière à une perturbation du fait de leurs différences fonctionnelles (Mouillot et al., 2013).

La relation entre diversité et productivité phytoplanctonique a fait l'objet d'études qui ont montré une relation unimodale, indiquant que la diversité n'était pas linéairement proportionnelle à la production primaire et aux biomasses mesurées dans l'environnement. Généralement, la diversité augmente avec l'augmentation de la disponibilité des ressources (et donc avec l'augmentation de la production primaire), jusqu'à un certain seuil après lequel la biomasse continue d'augmenter mais la diversité sature puis diminue (Vallina et al., 2014). Le même type de relation unimodale est proposé pour expliquer la relation entre la diversité et les perturbations, impliquant que la diversité atteint son optimum dans des conditions intermédiaires de perturbations (Sommer et al., 1993). L'étude de la diversité fonctionnelle au sein d'un gradient environnementale doit donc se baser sur ces deux observations, en partant du principe que la diversité fonctionnelle maximale pourrait être observée dans les conditions intermédiaire du gradient.

1.2.5 Groupes fonctionnels adaptés au niveau d'eutrophisation

L'eutrophisation, par le biais des apports en matière organique particulière et en nutriments dissous, modifie significativement la disponibilité en nutriments et l'intensité lumineuse (hausse de la turbidité). Ces processus impactent fortement la biomasse et la

structuration des communautés phytoplanctoniques avec un temps de réponse très court (Van Nes and Scheffer, 2007; Leston et al., 2008). Cette réponse rapide a poussé la communauté scientifique à utiliser le phytoplancton comme un indicateur de l'état trophique des milieux aquatiques (Paerl et al., 2010).

Selon les caractéristiques écologiques des lagunes et les traits fonctionnels définis ci-dessus, les communautés s'organisent pour répondre spécifiquement à leur environnement, et notamment au niveau d'eutrophisation. Cette structuration a fait l'objet d'un nombre croissant d'études, et certaines associations d'organismes ont été définies selon des caractéristiques écologiques très spécifiques. Par exemple, dans les eaux douces, des associations d'espèces en groupes fonctionnels ont été définies par Reynolds et al. (2002) puis par Salmaso and Padisák (2007). Certaines associations représentent les différents états par lesquels les communautés transitent lors de la variabilité saisonnière, et selon le niveau d'eutrophisation des masses d'eau (Reynolds et al., 2002). Ces groupes constituent un point de départ pour l'étude des assemblages phytoplanctoniques dans les lagunes côtières dont la salinité peut varier très fortement selon l'influence du bassin versant. Dans notre cas, l'influence continentale peut être très majoritaire selon les saisons, particulièrement pour les lagunes confinées. Le même type de résultat a été formulé pour les écosystèmes marins et marins côtiers, et plus spécifiquement pour les Dinophytes, par Smayda et Reynolds (2001). Cette approche a également été utilisée par David et al. (2012) pour caractériser des groupes fonctionnels phytoplanctoniques dans les écosystèmes marins côtiers de la côte Atlantique française.

En conclusion, ces diverses approches permettent de caractériser finement les communautés phytoplanctoniques, et représentent de ce fait des outils pertinents pour évaluer les caractéristiques écologiques des lagunes côtières ainsi que leur état d'eutrophisation. Elles permettent également d'évaluer les processus de réponses des écosystèmes aquatiques à une modification de la disponibilité en nutriments, et par ce biais, d'estimer à quel stade se trouve le milieu vis-à-vis des processus de ré-oligotrophisation. Ces études ont notamment servi de point de départ aux hypothèses travail formulées dans le contexte de ré-oligotrophisation lagunaire sur lequel s'est articulé ce travail de thèse.

1.3 Restauration écologique et réponse des écosystèmes

En 2000, la mise en place à l'échelle européenne de la Directive Cadre sur l'Eau (2000/60/CE) fixe des objectifs pour la préservation et la restauration de l'état des masses d'eaux douces, côtières et souterraines, dans le but d'atteindre d'ici 2015 un « bon état écologique et chimique » sur le territoire européen (depuis 2010, cette échéance a été repoussée à 2027). Ce bon état se définit comme étant proche d'un état de référence correspondant à un milieu peu ou pas anthropisé. Cet objectif implique la prévention de la détérioration des milieux

en bon état, ainsi que l'amélioration de l'état écologique et chimique, c'est-à-dire de la qualité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques actuellement dégradés (Roche et al., 2005).

La restauration écologique des écosystèmes marins côtiers représente un enjeu majeur compte tenu de leur importance écologique et économique (Smith, 2006). Mais si les processus d'eutrophisation des écosystèmes lagunaires sont largement étudiés dans la littérature scientifique, les réponses au processus inverse, c'est-à-dire d'oligotrophisation de systèmes fortement dégradés ont été très peu abordées (Nixon, 2009). Néanmoins, les lagunes côtières présentant de fortes similitudes écologiques avec les écosystèmes lacustres de faible profondeur, des hypothèses concernant leur réponse à la ré-oligotrophisation peuvent être formulées sur la base des études menées sur les écosystèmes lacustres (Phillips et al., 2005). En effet, ces milieux fortement eutrophisés par le passé font l'objet de nombreux programmes de restauration écologique depuis les années 70, notamment en Europe (Jeppesen et al., 1998, 2005, 2007; Søndergaard et al., 2007).

Globalement, la majorité des écosystèmes a répondu à la réduction nutritive par une diminution de la turbidité de l'eau, de la biomasse phytoplanctonique, accompagnées parfois d'une réduction des concentrations en phosphore et azote total. Cependant, ces réponses ne se sont pas déroulées exactement à l'inverse des processus intervenus lors de l'eutrophisation de ces milieux. Les écosystèmes ont par ailleurs réagi avec un certain décalage aux modifications environnementales. Ce phénomène de trajectoire non linéaire lié à un état écologique antérieur, nommé hystérésis, témoigne du fait que la trajectoire d'un écosystème en cours de restauration n'est pas l'identique inverse de celle d'un écosystème en cours d'eutrophisation (Scheffer et al., 1993). Parmi ces différentes trajectoires, les réponses à la réduction des apports ont pu montrer des durées bien plus longues, liées notamment à de forts relargages nutritifs provenant des stocks sédimentaires, ou à un temps d'adaptation des communautés autotrophes à la nouvelle disponibilité en nutriments (Phillips et al., 2005). Généralement, les lacs restaurés transitent par différents états d'équilibre entre la colonne d'eau et les sédiments, intermédiaires entre celui avant la dégradation du milieu et un état de référence (en très bon état) (Scheffer et al., 1993; Scheffer and Carpenter, 2003; Jeppesen et al., 2007). Au cours de ces états alternatifs, les communautés phytoplanctoniques se structurent différemment, selon divers groupes fonctionnels adaptés aux caractéristiques environnementales (Ruggiu et al., 1998). L'évolution de la structure des communautés illustre donc de manière pertinente la trajectoire de ces écosystèmes. En règle générale, la diminution de la biomasse chlorophyllienne s'accompagne d'une augmentation des abondances des cellules phytoplanctoniques de taille réduite, plus compétitives pour l'acquisition des nutriments (Callieri and Piscia, 2002; Kamenir and Morabito,

2009), ainsi que d'une occurrence plus régulière d'espèces mixotrophes, plus compétitives dans les écosystèmes limités en nutriments (Anneville and Pelletier, 2000).

Depuis les années 90, quelques écosystèmes marins côtiers ont été soumis à une réduction des apports nutritifs dans l'optique d'initier une restauration écologique (Cloern, 2001; Carstensen et al., 2006; Collos et al., 2009). Les premières études des processus de restauration montrent des réponses variables, suggérant qu'il est peu probable que ces écosystèmes puissent retourner à leur état d'origine historique (Elliott et al., 2007; Duarte et al., 2009). En effet, leurs réponses sont complexes et diverses du fait de la variabilité environnementale de ces milieux. Les études relatant l'évolution du compartiment phytoplanctonique sont rares et montrent également des réponses diverses (Philippart et al., 2007; Nishikawa et al., 2010). Par exemple, la réduction de la biomasse n'est pas nécessairement significative. En revanche, la structure et la composition des communautés évoluent conjointement à la modification de la disponibilité nutritive, notamment à travers une réduction de la taille cellulaire (Silva et al., 1997; Collos et al., 2009; Mozetic et al., 2010). Si certaines de ces réponses sont cohérentes avec celles des écosystèmes lacustres à la restauration, les trajectoires globales des lagunes côtières lors de ce processus restent méconnues, notamment l'impact du niveau d'eutrophisation lors de la réduction nutritive, ainsi que l'échelle temporelle à laquelle ce processus se déroule.

Afin d'apporter des éléments de réponse à ces questions, l'objectif de ce travail de thèse a été en premier lieu d'étudier les réponses des lagunes côtières à la réduction des apports de nutriments, à travers l'étude du compartiment phytoplanctonique qui représente un modèle biologique pertinent puisqu'il témoigne avec un temps de réponse rapide de l'état trophique du milieu.

1.4 Un site modèle pour étudier la ré-oligotrophisation

1.4.1 Un écosystème très dégradé

La problématique de l'eutrophisation concerne le littoral méditerranéen français, et particulièrement la région Languedoc-Roussillon. En effet, cette région, dont 50% du trait de côte est recouvert par des lagunes côtières, a vu sa population croître de façon importante ces dernières décennies (Deslous-Paoli et al., 1998). Cette hausse s'accroît d'autant plus en période touristique depuis la mise en place de la Mission interministérielle d'aménagement touristique du littoral du Languedoc-Roussillon (ou Mission Racine), le 18 juin 1962. L'objectif de cette mission étant de créer une importante région touristique européenne afin de diversifier l'économie régionale, de nombreuses infrastructures ont été mises en place. La population estivale a évolué de 350 000 touristes en 1962 à environ 10 millions en 2007 sur l'agglomération montpelliéraine (Jouvin, 2008), et en quarante ans, la population permanente

du littoral de cette région a été multipliée par deux. Durant cette période, les littoraux ont été profondément urbanisés (hausse de 15,4% de la surface des espaces artificiels) (Commission Aménagement du Territoire, 2010). L'accroissement des volumes de fertilisants utilisés et des déchets organiques produits ont significativement augmenté les quantités d'azote et de phosphore inorganiques et organiques apportées aux lagunes côtières, accélérant leur eutrophisation depuis le milieu du 20^e siècle (Nixon, 1995; Cloern, 2001).

La qualité écologique des lagunes de la région Languedoc-Roussillon a donc été fortement dégradée, et certaines ont montré des niveaux de biomasse phytoplanctonique très élevés à partir des années 2000, atteignant dans certaines lagunes plus de 400 $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$. Cette accumulation de biomasse témoigne de la forte eutrophisation de ces écosystèmes. De tels niveaux de biomasse ne sont jamais observés dans des eaux côtières, qui sont caractérisées comme étant hypereutrophe à partir de biomasses beaucoup plus faibles (supérieures à 5 mg $\text{Chl}a.m^{-3}$). Ces niveaux correspondent davantage à ceux qui peuvent être observés dans des lacs très eutrophisés. Ils dépassent largement les gammes de concentration en chlorophylle *a* sur lesquels sont basées les classifications trophiques des écosystèmes aquatiques (Smith et al., 1999 ; Smith, 2003). Dans ces classifications, qui dépendent des types d'écosystèmes étudiés, les niveaux de biomasses observés dans les lagunes correspondent à des écosystèmes très eutrophisés, la limite pour classer les lacs en état hypertrophique étant fixée à 25 mg $\text{Chl}a.m^{-3}$ (Smith et al., 1999). Sur la base de ces valeurs, ainsi que sur les concentrations en azote et en phosphore totales, les lagunes de la région Languedoc-Roussillon présentaient en 2006 un gradient d'eutrophisation de l'oligo- à l'hypertrophie (Souchu et al., 2010). Les crises dystrophiques liées à la reminéralisation estivale des stocks sédimentaires ont notamment eu des conséquences préjudiciables sur l'économie locale, du fait de la diminution de l'attractivité touristique et de fortes mortalités des cheptels de coquillages telles que les huîtres durant les malaïgues (Mazouni et al., 1996).

1.4.2 Une restauration écologique engagée

L'objectif de la DCE, d'atteindre un « bon état écologique des masses d'eau » est relayé au niveau régional depuis 2000 par le Réseau de Suivi Lagunaire (RSL). Instauré par la Région Languedoc-Roussillon, l'Agence de l'Eau Rhône Méditerranée et Corse, et l'Ifremer, le RSL avait pour mission jusqu'en Décembre 2013 d'évaluer et suivre l'évolution de l'état des lagunes du Languedoc-Roussillon et de Corse vis-à-vis de l'eutrophisation. Ces diagnostics ont abouti à une prise de conscience par les acteurs locaux des risques liés à la dégradation des milieux lagunaires. L'amélioration de l'état écologique des eaux côtières nécessitant une réduction des apports nutritifs provenant des bassins versants, des efforts de gestion ont été mis en œuvre sur certaines lagunes depuis 2003 afin de réduire drastiquement les concentrations en nutriments leur parvenant (Tableau 2). Parmi ces aménagements, le complexe des étangs palavasiens a fait

l'objet en Décembre 2005 d'une réduction de 70% à 83% des apports nutritifs suite à la déviation des rejets de l'émissaire de la station de traitement des eaux de l'agglomération de Montpellier à 11 km au large en mer Méditerranée (Tableau 2) (De Wit et al., 2015).

Tableau 2. Mesures prises pour réduire les intrants en nutriments sur les lagunes côtières de Languedoc-Roussillon et de Corse.

Année	Lagune	Aménagement
2003	Bages-Sigean	Mise aux normes de la STEP de Narbonne
2005	Gruissan	Gestion des flux hydriques pour stabiliser la colonne d'eau
2006	Etangs palavasiens	Nouvelle station de traitement des eaux usées de l'agglomération montpellieraine Maera, et diversion de son émissaire à 11 km en
2009	Grec	Raccordement de la station de traitement des eaux usées de Palavas-Les-Flots à l'émissaire de MAERA
	Vendres	Mise aux normes de la Station d'épuration des eaux de la commune de Vendres
2013	Etangs palavasiens	Raccordement de Pérols et Carnon à MAERA

1.4.3 Le complexe des étangs palavasiens

A l'origine, ce complexe n'était constitué que d'une seule lagune, nommée lagune de « Melgueil », s'étendant du bassin de Thau au sud-ouest à l'étang de l'Or (Rapport RSL 2013, De Wit et al., 2015). Cet écosystème a subi au cours des années 70 de profondes modifications structurelles, en premier lieu à travers un drainage intensif des zones humides dans le but de les « assainir » et de créer une zone de tourisme attractive. Dans un deuxième temps, de nombreuses voies routières et fluviales ont été mises en place afin de faciliter les échanges et le commerce, fragmentant cette lagune en plusieurs sous-parties qui ont acquis des caractéristiques propres. Le complexe des étangs palavasiens regroupe aujourd'hui huit lagunes côtières, parallèles à la côte méditerranéenne sur une trentaine de kilomètres, au sud de l'agglomération de Montpellier entre Carnon et Frontignan (Fig. 4). Ce complexe est traversé d'est en ouest par le canal du Rhône à Sète avec lequel toutes les lagunes communiquent. Le canal a montré depuis la mise en place du RSL un niveau d'eutrophisation très élevé et relativement stable, le classant parmi les eaux littorales les plus dégradées de la région (rapports RSL 2001 à 2013). De par sa localisation, il isole 4 lagunes de toute communication

directe avec le milieu marin et les 4 autres de tout apport direct des bassins versants, et constitue un apport d'eau douce et de nutriments aux lagunes du complexe. Ces lagunes possèdent environ 600 km² de bassin versant, divisé en deux principales sous parties qui drainent différents degrés d'apports nutritifs. Les étangs les plus à l'ouest, c'est-à-dire Ingril nord et sud, Vic et Pierre-Blanche sont sous l'influence du massif karstique de la Gardiole. Ce massif produit très peu d'écoulements superficiels, emmagasine une grande partie des précipitations dans un réseau souterrain, qu'il restitue sous forme de résurgences d'eau douce. La faible densité de population sur ce bassin versant implique des eaux assez peu chargées en nutriments. Les lagunes plus à l'est, c'est à dire Arnel, Prévost, Méjean et Grec sont sous l'influence des apports d'eau douce de deux cours d'eau, le Lez et la Mosson. Le Lez constitue le principal apport d'eau douce aux lagunes palavasiennes, son débit mensuel ayant varié entre 2008 et 2014 entre 0,139 m³.s⁻¹ en avril 2014 et 13,50 m³.s⁻¹ en novembre 2011 en dehors des crues, qui ont pu dépasser 700 m³.s⁻¹ en octobre 2014 (hydroweb, site eaufrance.fr). Ce cours d'eau traverse le complexe des palavasiens dans sa largeur entre Méjean avec lequel il communique via une canalette, Arnel, croise le canal du Rhône à Sète, puis passe entre le Grec et Prévost et débouche dans la mer Méditerranée au niveau de Palavas-les-Flots. La Mosson débouche dans l'Arnel. Jusqu'à Décembre 2005, le Lez était fortement eutrophisé par l'émissaire de la station de traitement des eaux de l'agglomération de Montpellier (la Céréide), dégradant fortement l'état des lagunes de l'ensemble du complexe, et enrichissant fortement le canal du Rhône à Sète. Les lagunes ne possédant pas les capacités d'autoépuration suffisantes pour assimiler ces flux de nutriments ont accumulé des stocks sédimentaires très importants et se sont dégradées (Ouisse et al., 2013), allant jusqu'à l'hypertrophie pour les lagunes les plus proche du Lez. De par la structuration du complexe et la localisation des lagunes par rapport aux apports d'eau douce et de nutriments, un gradient de salinité et d'eutrophisation d'est en ouest a été mis en évidence (Souchu et al., 2010).

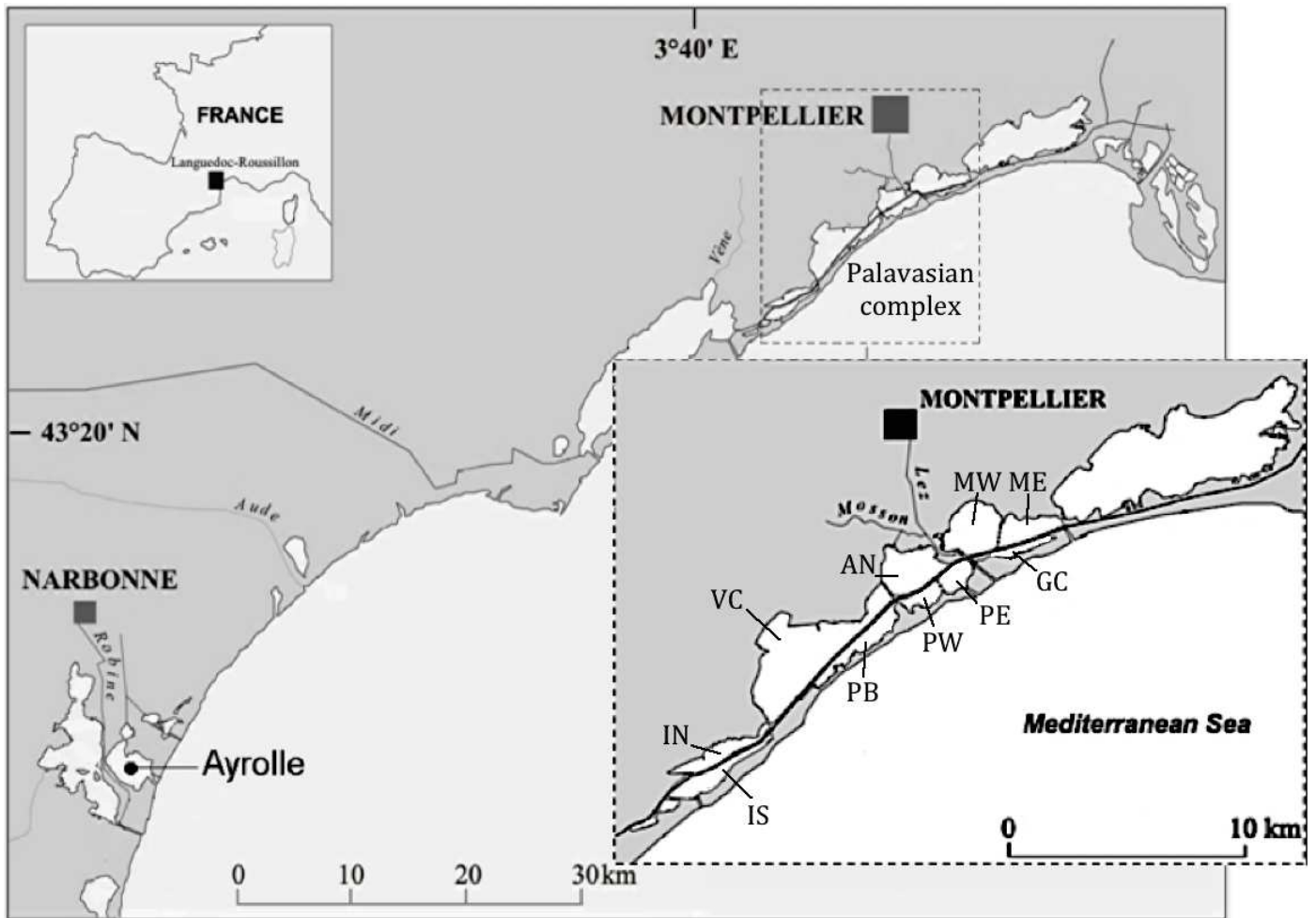


Figure 4. Localisation du complexe des étangs palavasiens et de la lagune d'Ayrolle, sur le littoral Méditerranéen.

En décembre 2005, l'émissaire de la station de traitement des eaux usées (Maera) a été dévié à 11 km au large dans la mer Méditerranée, permettant une réduction de 70 à 83% des apports en phosphore et en azote aux lagunes palavasiennes (De Wit et al., 2015). Cette première mesure a permis de stopper la production en flux tendu de matière organique au sein des étangs. En juin 2009, le raccordement de la station de traitement des eaux de la commune de Palavas-les-Flots (qui rejetait auparavant ses eaux dans l'étang du Grec) à cet émissaire (Tableau 2) a accru la réduction des apports et la modification du fonctionnement des lagunes, en particulier celles au nord-est du complexe. En effet, les effluents de Maera se déversaient auparavant dans le Lez, qui traverse le complexe lagunaire et est directement relié à certaines lagunes par le biais de canaux. Ces écosystèmes soumis pendant des décennies à des apports permanents dépassant leurs capacités d'assimilation sont aujourd'hui entrés dans une nouvelle dynamique. Le compartiment phytoplanctonique a notamment montré une réponse rapide à cette réduction des apports diffus, illustrée par une forte diminution de la biomasse (Bec et al.,

ICES 2011). Ces réductions ont notamment provoqué une amélioration rapide de la qualité de la colonne d'eau des lagunes les plus impactées (Rapports RSL 2011, 2013).

Pour conclure, la localisation des lagunes vis-à-vis d'une source nutritive localisée, leur gradient trophique, et le contexte de restauration écologique induite par la réduction drastique des apports constituent des arguments de poids qui nous ont poussés à choisir ce site pour étudier les réponses des écosystèmes dégradés à la ré-oligotrophisation. Leurs caractéristiques physico-chimiques ont permis de mieux appréhender les facteurs qui influent sur les réponses des lagunes engagées dans cette nouvelle dynamique, et notamment le niveau d'eutrophisation, à travers les changements de biomasse et de structuration des communautés phytoplanctoniques.

1.5 Objectifs et organisation de la thèse

Ce travail de thèse a été organisé en trois axes thématiques, subdivisés en 4 Chapitres. Avant d'aborder ces trois axes, le Chapitre 2 intitulé Matériels et Méthodes rassemble les méthodes employées pour caractériser les divers aspects des communautés phytoplanctoniques. Ce chapitre décrit les sites d'études, les protocoles de prélèvement sur le terrain et les différents types d'analyses. Il permet de compléter les parties matériel et méthodes plus succinctes des chapitres suivants.

Au cours de la thèse, l'analyse chimiotaxonomique de la diversité phytoplanctonique par HPLC a fait l'objet d'une modification afin d'améliorer son efficacité. Le développement méthodologique de cette technique a été valorisé par une publication acceptée dans *Transitional Waters Bulletin* en 2015. Cette publication est intégrée dans le Chapitre 2.

Leruste, A., Hatey, A., Bec, B., De Wit, R., 2015. Selecting an HPLC method for chemotaxonomic analysis of phytoplankton community in Mediterranean coastal lagoons. *Transitional Waters Bull.* 9, 20–41. (Manuscrit A)

Sur la base des résultats des études menées sur les lacs ou les écosystèmes marins côtiers en cours de ré-oligotrophisation, et sur la réponse des communautés phytoplanctoniques à une perturbation environnementale liée à la disponibilité en nutriments, nous avons cherché à comprendre les trajectoires d'évolution des communautés phytoplanctoniques dans le cas de lagunes méditerranéennes en cours de ré-oligotrophisation. L'objectif général de ce travail de thèse était d'explorer les liens entre la dynamique des communautés phytoplanctoniques des lagunes côtières et leur variabilité environnementale, notamment liée à leur niveau d'eutrophisation. Plus particulièrement, nous avons étudié les réponses du phytoplancton à la modification des ressources nutritives induite par la ré-oligotrophisation, en termes de

biomasse, de structure en classe de taille, de diversité spécifique et fonctionnelle, et de stratégie d'acquisition et d'utilisation des ressources. Ce travail s'est structuré en trois axes d'études :

Axe 1 : Trajectoires d'évolution des communautés phytoplanctoniques en réponse à la ré-oligotrophisation de lagunes côtières aux niveaux d'eutrophisation contrastés ;

Axe 2 : Variabilité naturelle des communautés phytoplanctoniques de lagunes côtières aux niveaux d'eutrophisation contrastés au cours d'un cycle annuel ;

Axe 3 : Caractéristiques fonctionnelles des communautés phytoplanctoniques de lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés, et adaptations à la variabilité saisonnière des ressources nutritives.

L'axe 1 s'est centré sur l'étude des **réponses des communautés phytoplanctoniques des lagunes côtières à une réduction drastique des apports diffus en nutriments**. Nous avons également cherché à évaluer **l'impact du niveau d'eutrophisation des lagunes sur cette réponse**. Deux hypothèses ont alors été développées : La réduction des apports engendre

- (i) une réduction de la biomasse plus ou moins forte selon le niveau d'eutrophisation de départ.
- (ii) une modification de la diversité phytoplanctonique, au profit de communautés possédant des stratégies d'acquisition et d'utilisation des ressources plus adaptées à une disponibilité réduite en nutriments inorganiques dissous.

Pour vérifier ces hypothèses, la biomasse et la structuration des communautés phytoplanctoniques ont fait l'objet d'un suivi estival de 2000 à 2013. Ces paramètres ont été évalués à travers les abondances du pico- et du nanophytoplancton, et la composition pigmentaire indicatrice des groupes taxonomiques et fonctionnels dominants. Ce suivi a englobé les dates d'aménagements ayant induits la réduction des apports en nutriments. Cette étude a ainsi permis de mettre en évidence le lien entre le niveau d'eutrophisation des lagunes et les réponses de leurs communautés phytoplanctoniques à la ré-oligotrophisation, tant sur les changements de biomasses que sur ceux intervenant sur la structuration selon divers traits fonctionnels tels que la classe de taille.

Ces travaux basés sur l'analyse des données estivales produites par le Réseau de Suivi Lagunaire (RSL) ont donné lieu à la rédaction d'une publication scientifique soumise le 28 août 2015 à *Estuarine Coastal and Shelf Science* (Manuscrit B). Ce manuscrit fait l'objet du Chapitre 3.

First steps of the Mediterranean lagoon restoration process: shifts in phytoplankton communities

A. Leruste, N. Malet, D. Munaron, V. Derolez, E. Hatey, Y. Collos, R. De Wit, B. Bec

L'axe 2 s'appuie sur une analyse du degré de variabilité temporelle du phytoplancton issu de lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés au cours du cycle annuel. La variabilité saisonnière de divers paramètres permettant de décrire finement les communautés phytoplanctoniques a été évaluée pendant 23 mois au sein de deux lagunes du complexe des étangs palavasiens présentant des niveaux d'eutrophisation contrastés (Méjean ouest hypereutrophe, Ingril nord mésotrophe), et dans une lagune de référence (Ayrolle oligotrophe). Les communautés phytoplanctoniques ont témoigné de spécificités en termes de biomasse, de structuration par classe de taille, et de composition en groupes fonctionnels, selon les caractéristiques écologiques et le niveau d'eutrophisation des lagunes. Ces travaux ont également orienté la sélection des saisons les plus représentatives de la variabilité saisonnière de la structuration des communautés phytoplanctoniques, au cours desquelles des expériences d'enrichissement *in situ* ont été mises en place afin de préciser certaines caractéristiques physiologiques et fonctionnelles du phytoplancton (Axe 3). Les résultats des deux ans de suivi des communautés phytoplanctoniques sont décrits brièvement dans le Chapitre 4, introduisant le troisième axe de cette thèse.

L'axe 3 a pour objectif d'améliorer la caractérisation des communautés phytoplanctoniques dans des lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés et soumises à des processus de re-oligotrophisation en termes d'adaptations fonctionnelles à la disponibilité des ressources nutritives et leur variabilité saisonnière.

Pour répondre à cette problématique, la diversité taxonomique et fonctionnelle du phytoplancton a été étudiée au cours de trois saisons contrastées en termes de disponibilité nutritive, de conditions de température et d'ensoleillement. Les saisons automnales, printanières et estivales ont été sélectionnées sur la base des observations mensuelles effectuées en 2013. A l'aide d'indices de diversité fonctionnelle multidimensionnels développés à l'origine pour l'ichtyofaune, nous avons mis en place un protocole permettant de caractériser finement la diversité phytoplanctonique des lagunes en tenant compte de toutes les classes de tailles cellulaires. Afin de souligner l'impact du gradient d'eutrophisation sur la diversité fonctionnelle, nous avons sélectionné des traits fonctionnels liés à l'acquisition et l'utilisation des ressources, tels que la classe de taille, le régime trophique, et la mobilité. A partir d'associations d'espèces partageant les mêmes combinaisons de traits, un espace multidimensionnel et des indices de diversité fonctionnels ont été déterminés. La bêta-diversité des communautés entre lagunes et entre saisons a permis d'évaluer la pertinence des indices de diversité taxonomique et fonctionnelle pour expliquer l'impact d'un gradient trophique et du fonctionnement écologique des lagunes sur les communautés phytoplanctoniques.

Les résultats de ces travaux ont été rédigés sous la forme d'une publication scientifique (Manuscrit C). Ce manuscrit constitue le Chapitre 5.

Multidimensional functional diversity indices improve understanding of phytoplankton ecology in coastal lagoons

Leruste, A., Villéger, S., Malet, N., De Wit, R., Bec, B.

En parallèle, des expériences *in situ* ont été menées au cours de ces trois saisons, afin de mettre en évidence les stratégies d'utilisation des ressources du phytoplancton dans le cadre d'un gradient d'eutrophisation, mais également dans le contexte du processus de re-oligotrophisation. Par le biais de ce travail, nous avons cherché à comprendre quelle réactivité les communautés phytoplanctoniques de lagunes soumises à une dynamique de re-oligotrophisation ont à l'égard d'un apport ponctuel de nutriments. Cette sensibilité a reflété le degré d'adaptation des communautés phytoplanctoniques à l'accroissement de la limitation nutritive, et de ce fait, la vulnérabilité des lagunes en cours de restauration écologique à un pulse nutritif. La ré-oligotrophisation intensifiant la limitation nutritive, quelles sont les stratégies d'exploitation et d'utilisation des ressources internes, externes et régénérées des communautés phytoplanctoniques lorsqu'elles sont limitées en azote et phosphore ? Pour répondre à ces questions, nous avons évalué les capacités de croissance du phytoplancton en condition saturantes, puis les stratégies adaptatives du phytoplancton en conditions nutritives limitantes, dans trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés, dont deux soumises à un processus de re-oligotrophisation. Cette étude a permis de mettre en évidence les spécificités adaptatives de certains groupes fonctionnels, illustrant les mécanismes de contrôle des communautés adaptées aux niveaux d'eutrophisation des lagunes.

Les résultats de cette étude sont présentés sous la forme d'une publication scientifique en vue d'une soumission à *Journal of Plankton Research* (Manuscrit D). Ce manuscrit fait l'objet du Chapitre 6.

Phytoplankton strategies to exploit nutrients in coastal lagoons with different trophic states, and during re-oligotrophication processes

Leruste, A., Guilhaumon, F., Malet, N., De Wit, R., Collos, Y., Bec, B.

Les résultats des chapitres 4, 5 et 6 ont permis de définir des stratégies adaptatives des communautés phytoplanctoniques au sein de lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés. Ils reflètent les états par lesquels les communautés d'un écosystème lagunaire en cours de restauration écologique pourraient transiter. L'ensemble des résultats est discuté dans un chapitre de synthèse (Chapitre 7), dans lequel nous résumons les avancées que ce travail a permis de fournir concernant la compréhension des processus de re-oligotrophisation, les hypothèses quant à la durée de ces processus et leur succès, ainsi que les perspectives de recherches à développer. Ces résultats sont également replacés dans un contexte plus global de changements climatiques, et au sein de la problématique de l'usage multiple des lagunes.

2 Matériels et Méthodes



2.1 Sites d'études

L'observation des réponses des lagunes côtières à la restauration écologique s'est articulée autour de l'étude du phytoplancton des lagunes du complexe des étangs palavasiens (Figure 4). Parmi ces lagunes, trois sont elles-mêmes subdivisées selon leurs caractéristiques hydrologiques. L'Ingril étant traversé en son milieu par le canal du Rhône à Sète, on distingue Ingril nord (IN) d'Ingril sud (IS). L'étang du Méjean étant traversé par une structure en pierre surmontée de cascaïls (bioconstructions secrétées par un vers polychète), on distingue Méjean ouest (MW) de Méjean est (ME). Prévost est divisé en Prévost est (PE) et Prévost ouest (PW). Les caractéristiques principales (apports du bassin versant, communication avec le milieu marin) de chaque lagune de ce complexe sont développées succinctement ci-dessous, en les rassemblant en trois groupes selon leurs caractéristiques trophiques avant la mise en place de l'émissaire de Maera. Leurs caractéristiques physico-chimiques entre 2000 et 2005 sont détaillées dans le tableau 3.

Tableau 3. Caractéristiques physico-chimiques des lagunes du complexe des étangs palavasiens. Les températures, salinités et concentrations en Chlorophylle *a* (Chl *a*) sont calculées par des moyennes des données mensuelles estivales (juin, juillet, août) acquises par le biais du RSL entre 2000 et 2005.

Station	Niveau trophique	Surface (km ²)	Volume (10 ⁶ m ³)	Profondeur (m)	Salinité	Température (°C)	Chl <i>a</i> (µg.L ⁻¹)
Méjean est (ME)	Hypereutrophe	5,5	4,1	0,75	30,0 ± 3,4	25,9 ± 1,5	92,5 ± 70,8
Méjean ouest (MW)	Hypereutrophe				26,7 ± 4,0	26,0 ± 1,6	181,6 ± 122,6
Grec (GC)	Hypereutrophe	2,7	0,7	0,30	31,3 ± 2,6	25,7 ± 1,7	135,4 ± 84,9
Arnel (AN)	Hypereutrophe	4,7	1,9	0,40	36,0 ± 4,6	24,9 ± 1,9	103,0 ± 127,3
Prévost est (PE)	Eutrophe	3,8	2,9	0,75	36,1 ± 2,1	25,6 ± 1,6	31,2 ± 27,0
Prévost ouest (PW)	Eutrophe				36,9 ± 2,5	25,4 ± 1,8	22,7 ± 15,3
Vic (VC)	Eutrophe	11,5	13,8	1,2	39,1 ± 6,3	24,7 ± 1,8	16,3 ± 14,6
Pierre blanche (PB)	Eutrophe	3,7	1,5	0,4	38,2 ± 6,2	25,3 ± 2,1	34,4 ± 29,8
Ingril nord (IN)	Mésotrophe	3,2	2,2	0,6	38,8 ± 2,7	24,3 ± 1,7	8,0 ± 5,6
Ingril sud (IS)	Mésotrophe	3,6	1,9	0,6	38,7 ± 2,0	24,1 ± 1,6	5,8 ± 5,2

2.1.1 Méjean ouest, Méjean est et Grec

L'étang de Méjean se trouve au nord-est du complexe (Figure 4 p. 30). Il est le plus exposé à l'eutrophisation de par sa proximité avec l'agglomération de Montpellier, les apports directs de la station de traitement des eaux de Lattes, et la communication avec le Lez par une canalette. Il communique également avec le canal du Rhône à Sète par des passes, et reçoit côté ouest les eaux douces d'un cours d'eau mineur, la Robine. Il est bordé au nord par une zone humide d'un fort intérêt écologique puisqu'elle est répertoriée en tant que Z.N.I.E.F.F. I et II, Z.P.S., Z.I.C.O., zone Natura 2000, et zone d'importance nationale RAMSAR. D'un point de vue hydrologique, cette lagune a été subdivisée en deux parties, Méjean est (ME) et Méjean ouest (MW). En effet, ces deux masses d'eau sont séparées par des bioconstructions (ou cascaïls) produites par un vers polychète, *Ficopomatus enigmatus* (Figure 5) implantées sur les vestiges d'un muret (Rapport RSL 2001). ME est donc un peu plus isolé des apports du Lez que MW. L'ensemble de ces caractéristiques a favorisé la dégradation de ces deux masses d'eau, qui présentaient avant la mise en place de Maera les états les plus dégradés de toutes les lagunes du complexe, et des biomasses chlorophylliennes très élevées (jusqu'à $413 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ dans MW en juin 2004). Cette lagune se démarque également des autres par des salinités plus faibles ($30,0 \pm 3,4$ entre 2000 et 2005 en période estivale pour ME et $26,7 \pm 4,0$ pour MW, Tableau 3).

L'étang du Grec (GC) se situe en face du Méjean, en front de mer bien qu'il ne possède aucune connexion directe avec celle-ci (Figure 4). Il communique directement avec le canal du Rhône à Sète par des passes. D'une surface et d'une profondeur faible (en moyenne 30 cm, c'est l'étang le moins profond et le moins vaste du complexe), il a connu une forte dégradation jusqu'aux années 2000 de part l'impact du Lez et de l'émissaire de la station de traitement des eaux de la commune de Palavas-les-Flots. Il présentait un état hypereutrophe avant la diversion de l'émissaire de Maera en 2005 et le raccordement de l'émissaire de la STEP de Palavas à celui de Maera en 2009. La biomasse chlorophyllienne mesurée dans cette lagune est restée inférieure à celle observée dans ME et MW, mais a toutefois excédé les $200 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$, atteignant $248 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ en août 2003.



Figure 5. Cascaïls émergés de *Ficopomatus enigmatus*, étang palavasien. Crédit : Pôle-relais lagunes Méditerranée

2.1.2 Arnel, Prévost, et Pierre-Blanche

L'étang d'Arnel (AN) se trouve en front de bassin versant, et reçoit un volume d'eau douce important via l'embouchure de la Mosson, principalement lors de fortes pluies (Figure 4). Il est également connecté au canal du Rhône à Sète par des passes. Sa salinité estivale reste élevée, quoique variable (Tableau 3). La biomasse phytoplanctonique dans cette lagune a fortement varié entre 2000 et 2005, atteignant jusqu'à $393 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ en août 2013.

L'étang de Prévost se trouve en face de l'Arnel, en front de mer, auquel il est directement connecté via un grau dans la partie est de l'étang. Il communique également directement avec le Lez, et avec le canal du Rhône à Sète au nord, par le biais de passes. Il a donc été fortement impacté par les apports provenant de la Céréide. L'hydrologie de cette lagune est également divisée en deux sous parties, Prévost est et ouest (PE et PW), ayant entraîné des différences de niveau d'eutrophisation au cours du suivi du RSL. L'impact du Lez a été tempéré dans Prévost grâce au renouvellement de l'eau plus rapide par le grau, qui s'est illustré par des biomasses chlorophylliennes bien plus basses que dans les lagunes précédentes, avec des concentrations maximales de $46,2 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ dans PW en juillet 2005 et $103,8 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ dans PE en juillet 2004. Cet étang abrite des activités de conchyliculture développées.

L'étang de Pierre-Blanche (PB) se situe au sud du complexe, en front de mer, mais ne possède pas de connexion directe avec le milieu marin (Figure 4). Il communique en revanche avec le canal du Rhône à Sète par des passes. Bien qu'il ne soit pas directement impacté par des apports issu d'un bassin versant ou d'une station de traitement des eaux usées, PB a été fortement eutrophisé et présentait avant 2006 des stocks de phosphore sédimentaires non

négligeables. Les biomasses phytoplanctoniques estivales atteignant jusqu'à $100,8 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ en juillet 2005 dans cette lagune illustrent cet état eutrophisé.

2.1.3 Vic, Ingril nord et sud

L'étang de Vic (VC) situé en front de bassin versant possède la surface et la profondeur les plus élevées (Figure 4, tableau 3). Il reçoit directement les résurgences karstiques alimentées par l'eau douce des aquifères du massif de la Gardiole, ainsi que l'embouchure de divers cours d'eau temporaires (Ruisseau de la Madeleine, canal de la Bouffie des Salines en amont de l'étang), permanent (Ruisseau de la Robine) et les émissaires des stations de traitement des eaux des communes de Vic-la-Gardiole et Mireval. Il communique également avec le canal du Rhône à Sète par de nombreuses ouvertures. Ces caractéristiques hydrologiques très complexes provoquent une forte variabilité écologique à travers laquelle il est difficile de tirer des tendances particulières. La salinité témoigne de cette complexité en affichant la plus forte variabilité estivale par rapport aux autres lagunes ($39,1 \pm 6,3$). Globalement, les biomasses chlorophylliennes mesurées avant 2006 sont bien plus faibles que celles observées dans les lagunes présentées ci-dessus. La plus forte biomasse observée durant cette période n'a pas dépassé $50,8 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$.

L'étang d'Ingril nord (IN) est situé au sud du complexe des étangs palavasiens, côté bassin versant (Figure 4). Il est bordé en amont par une zone humide, aménagée en salin. Cette zone humide reçoit les apports d'eau douce du massif de la Gardiole, tamponnant ainsi les effets de dilution des apports directs d'eau douce et conférant à cette lagune une salinité estivale élevée et relativement stable ($38,8 \pm 2,7$). Cet étang ne communique pas directement avec la mer, et possède des passes avec le canal du Rhône à Sète. Il reçoit également l'émissaire de la station de traitement des eaux usées de Frontignan. L'étang d'Ingril sud (IS) possède également des passes avec le canal, situées en face de celle de la partie nord de l'étang (permettant des échanges entre les parties nord et sud). Cette lagune communique directement avec la mer Méditerranée par le grau du port de Frontignan-Plage. La lagune reçoit également des eaux de lagunage de cette commune. Cependant, IS est isolée des apports du bassin versant par le canal, ce qui limite son envasement conjointement à l'ouverture à la mer. Les différences de régime hydrodynamique ne semblent pas impacter différemment la salinité des deux parties, puisqu'IS enregistre une salinité estivale moyenne entre 2000 et 2005 de $38,7 \pm 2,0$ très proche de celle observée dans la partie nord. Ces deux lagunes sont les plus éloignées des apports du Lez, mais restaient jusqu'à 2005 sous son influence via les eaux du canal du Rhône à Sète. La présence du grau permet néanmoins une meilleure inertie de ces deux masses d'eau, grâce à un renouvellement de l'eau plus rapide en comparaison avec les lagunes plus confinées. Les biomasses estivales dans IN et IS illustrent leur éloignement vis-à-vis de la principale source

d'eutrophisation par des valeurs bien plus faibles, d'un facteur 10 par rapport à celles des autres lagunes du complexe (Tableau 3), et qui n'ont pas dépassé 20,8 µg Chl *a*.L⁻¹ entre 2000 et 2005.

Afin de mieux comprendre les changements écosystémiques impliqués par l'eutrophisation et leur impact sur les processus de ré-oligotrophisation, les processus de structuration des communautés phytoplanctoniques des lagunes du complexe des étangs palavasiens ont été comparés à ceux des communautés phytoplanctoniques d'une lagune de référence, Ayrolle.

2.1.4 Ayrolle, lagune de « référence »

Un milieu peut être qualifié d'état de référence s'il subit un impact anthropique très faible, soit très localisé, soit peu discernable de la variabilité naturelle. Plus précisément, les milieux de référence possèdent un très bon état écologique, physico-chimique et hydrologique (Buchet, 2010; Working Group 2.3 - REFCOND).

A l'échelle régionale, Ayrolle constitue la lagune la plus préservée des pressions anthropiques. Intégrée dans le complexe lagunaire du Narbonnais, cette lagune possède un bassin versant d'une surface relativement réduite (104 km²), peu urbanisé, et dont la majorité des eaux de ruissellement aboutissent dans deux lagunes situées plus en amont (Figure 4). Ces deux lagunes, Campagnol et Gruissan jouent un rôle tampon en concentrant les apports du bassin versant. La lagune d'Ayrolle reçoit principalement des eaux dessalées de la lagune de Campagnol. Elle possède également un grau au sud, permettant des échanges avec le milieu marin, facilités par de forts vents de sud-est. Ces caractéristiques font d'Ayrolle la lagune la plus marinisée du complexe des Narbonnais. La présence d'herbiers à *Zostera noltei* bien implantés sur une vaste surface conforte le choix de cette lagune en tant qu'état de référence. Tout au long du suivi par le RSL, elle n'a jamais présenté de forte dégradation anthropique, et a globalement oscillé entre bon et très bon état. Ses caractéristiques physico-chimiques de 2000 à 2013 sont résumées dans le tableau 4.

Tableau 4. Caractéristiques environnementales de la lagune Ayrolle. Les valeurs de salinité, température et chlorophylle *a* ont été calculées sur la base de moyennes de valeurs estivales de 1999 à 2013 (RSL).

Station	Niveau trophique	Surface (km ²)	Volume (10 ⁶ m ³)	Profondeur (m)	Salinité	Température (°C)	Chl <i>a</i> (µg.L ⁻¹)
Ayrolle (AYR)	Oligotrophe	13,2	9		30,6 ± 3,7	23,6 ± 2,7	1,1 ± 0,8

Pour conclure, la lagune Ayrolle possède des caractéristiques qui font d'elle un état de référence pertinent auquel nous avons pu comparer le fonctionnement écologique des lagunes

plus dégradées, afin de comprendre quels processus interviennent dans la structuration des communautés phytoplanctoniques le long d'un gradient d'eutrophisation.

Le Chapitre 3 s'est focalisé sur l'ensemble des lagunes du complexe des étangs palavasiens, puis en particulier sur trois lagunes possédant des niveaux d'eutrophisation contrastés : Méjean ouest (MW) hypereutrophe, Vic (VC) eutrophe, et Ingril nord (IN) mésotrophe. Les chapitres 4, 5 et 6 se sont basés sur l'étude du phytoplancton des deux lagunes du complexe des étangs palavasiens situées en front de bassin versant et possédant les niveaux d'eutrophisation extrêmes (MW et IN). Ces communautés ont été comparées avec celle de la lagune Ayrolle, oligotrophe.

2.2 Prélèvements *in situ*

Dans le cadre de cette thèse, différentes campagnes de prélèvement ont été effectuées, à l'aide de divers protocoles. Les différences entre ces protocoles sont décrites ci-dessous.

2.2.1 Prélèvements dans le cadre du RSL

Dans le cadre du RSL, un suivi mensuel des caractéristiques physico-chimiques et biologiques des lagunes du complexe des étangs palavasiens a été réalisé de 2000 à 2013. Dans le cadre de ma thèse, j'ai participé aux campagnes de terrain de l'année 2013. Les prélèvements mensuels ont été réalisés par bateau entre 10 h et 16 h à l'aide de flacons en propylène 2 l, puis de bouteilles Niskin, ensuite transvasés en flacons (préalablement rincés avec de l'acide chlorhydrique 1 M puis de l'eau déionisée). Les prélèvements ont été effectués en sub-surface (20 cm de profondeur en moyenne). Les échantillons relatifs à la spectrofluorimétrie pour l'estimation de la biomasse chlorophyllienne, à l'HPLC pour l'estimation des principaux groupes phytoplanctoniques, et à l'analyse microscopique pour la caractérisation de la diversité taxonomique et fonctionnelle ont ensuite été aliquotés au laboratoire. Les paramètres abiotiques tels que la température, la salinité, la disponibilité en oxygène ont été mesurés *in situ* à l'aide de sondes WTW LF 196 et LI-COR. Ces prélèvements ainsi que les analyses des paramètres physico-chimiques (turbidité, concentrations en sels nutritifs) ont été réalisés par le laboratoire IFREMER LER/LR du Languedoc-Roussillon (Souchu et al., 2010). L'analyse des paramètres biologiques a été réalisée au laboratoire MARBEC (anciennement ECOSYM) avant mon arrivée. Cette base de données a fait l'objet d'une publication présentée dans le Chapitre 3 (Manuscrit B).

2.2.2 Prélèvements mensuels dans le cadre de la thèse

Pour comprendre la variabilité saisonnière des communautés phytoplanctoniques en fonction du niveau d'eutrophisation lagunaire, nous avons réalisé un suivi mensuel des caractéristiques physico-chimiques et biologiques de février 2013 à décembre 2014 sur les deux lagunes Ingril nord et Méjean ouest du complexe des étangs palavasiens, ainsi que sur la lagune

Ayrolle du complexe des Narbonnais. Jusqu'à Décembre 2013, les prélèvements mensuels sur les deux lagunes du complexe des étangs palavasiens ont été réalisés conjointement avec ceux du RSL, par bateau. Les autres prélèvements ont été réalisés par canoë entre 9 h et 12 h, en sub-surface à l'aide d'une pompe. L'eau a été pré-filtrée sur une soie de 100 μm , et a ensuite été stockée dans des bidons en polypropylène 10 l jusqu'au laboratoire. En règle générale, 20 l d'eau ont été prélevés mensuellement. Un échantillon de 15 l d'eau concentré sur 20 μm (100 ml volume final) fixé à l'aide de glutaraldéhyde (1 % concentration finale) a également été prélevé mensuellement afin d'identifier les espèces microphytoplanctoniques présentes. Les valeurs de température, salinité et PAR (*Photosynthetically Active Radiation*)⁶ ont été mesurés *in situ* à l'aide d'un conductimètre et d'une sonde LI-COR. La température et la salinité ont été mesurées en sub-surface, tandis que le PAR a été prélevé en dehors de l'eau. Les données issues de ce suivi mensuel sur 23 mois ont fait l'objet du Chapitre 4.

2.2.3 Prélèvements dans le cadre des expériences d'enrichissement nutritif

Pour préciser certaines caractéristiques fonctionnelles témoignant de l'adaptation des communautés phytoplanctoniques à la disponibilité des ressources nutritives dans les lagunes, nous avons réalisé des expériences d'enrichissement nutritif saisonniers (automne 2013, printemps et été 2014). Dans chaque lagune, 70 l d'eau pré-filtrée sur 1000 μm ont été échantillonnés en sub-surface. La filtration sur 1000 μm nous a permis d'enlever les débris végétaux sans ôter la fraction zooplanctonique <1000 μm nécessaire pour observer la prédation dans les expériences de dilution. Un prélèvement supplémentaire pour l'analyse de l'activité photosynthétique phytoplanctonique a également été ajouté. Afin de quantifier un possible stress lié à l'échantillonnage et la conservation de l'eau en bidon, un échantillon d'1 l d'eau a été prélevé dans un bidon opaque afin de mesurer l'activité photosynthétique du phytoplancton à l'aide d'un fluorimètre Phyto-PAM (Garrido et al., 2013). Les données issues de ces expériences ont fait l'objet de deux publications scientifiques présentées dans les Chapitres 5 et 6 (Manuscrits C et D).

2.3 Paramètres abiotiques

Comme nous l'avons expliqué précédemment, la température, la salinité, et le PAR ont été mesurés *in situ*. Au laboratoire, deux échantillons de 80 ml d'eau filtrée sur 20 μm ont été prélevés à partir des 20 l, dans deux flacons en polypropylènes de 125 ml préalablement rincés

⁶ Le PAR, ou rayonnement photosynthétiquement actif correspond à un rayonnement généralement compris entre 400 et 700 nm, utilisé par les végétaux pour effectuer la photosynthèse (en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (McCree, 1972).

avec de l'HCl 1 M puis avec de l'eau distillée. Ces flacons ont ensuite été conservés à -20°C et analysés par le MIO (Marseille) pour le dosage de l'azote et du phosphore total (Nt et Pt), de l'ammonium, et des nitrates, nitrites, et phosphates (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-}) (Aminot and Chaussepied, 1983).

2.4 Paramètres biotiques

A partir du volume d'eau prélevé sur le terrain, des échantillons ont été réalisés pour chacune des analyses que nous allons détailler ci-dessous.

Les paramètres biotiques étudiés ont permis de caractériser différents aspects complémentaires de la diversité phytoplanctonique introduits dans le Chapitre 1. Globalement, les différents aspects étudiés sont : la répartition de la biomasse et des abondances par classe de taille, la diversité taxonomique, et la diversité fonctionnelle via l'étude de plusieurs traits. Des traits comportementaux tels que la mobilité liée à la présence de flagelle, le régime trophique, et des traits physiologiques tels que la composition pigmentaire, le taux de croissance maximal et l'exploitation des ressources internes, externes et régénérées en azote et phosphore comptent parmi les traits ciblés. Ces traits ont été étudiés à travers plusieurs types d'analyses afin d'avoir une vision globale des communautés quelque soit les caractéristiques des cellules. Par exemple, la spectrofluorimétrie permet d'avoir une vision globale de la biomasse phytoplanctonique et de la présence des algues vertes et brunes, par la mesure des concentrations en Chl *a*, *b*, et *c*. La cytométrie en flux différencie les cellules pico-, ultra- et nanophytoplanctoniques, mais ne permet pas de visualiser les grosses cellules. L'HPLC s'affranchit de cette limite puisqu'elle permet de quantifier les concentrations pigmentaires des cellules quelque soit leur taille afin d'obtenir une vision de l'ensemble des communautés phytoplanctoniques, mais elle ne permet ni de visualiser les organismes hétérotrophes ne possédant pas de pigments, ni de décrire la composition pigmentaire du phytoplancton à l'échelle des individus. L'analyse microscopique permet de compléter la quantification des organismes hétérotrophes et d'estimer les abondances de chaque organisme, en précisant les caractéristiques fonctionnelles à l'échelle des individus. Pour le microphytoplancton, la microscopie optique est utilisée, pour l'ultraphytoplancton c'est la microscopie à épifluorescence qui est privilégiée, bien que la visibilité soit réduite pour le picophytoplancton et que cette méthode soit très dépendante de l'observateur.

La caractérisation de ces traits est décrite ci-dessous :

2.4.1 Classe de taille

Afin d'étudier la relation entre le niveau trophique et la taille cellulaire qui est le trait fonctionnel majeur (Irwin et al., 2006 ; Litchman et al., 2010), la structuration du phytoplancton par classe de taille a été analysée pour certains des paramètres biologiques, tels que la biomasse

phytoplanctonique, la diversité pigmentaire et les proportions d'organismes autotrophes et hétérotrophes stricts. Pour cela, au laboratoire, des aliquotes d'eau ont été réalisés avec :

1. de l'eau brute (sans fractionnement) comprenant l'ensemble des classes de taille ;
2. de l'eau filtrée sur 20 μm (soie Millipore NY20) pour obtenir la fraction <20 μm comprenant l'ultra- et le nanophytoplancton ;
3. de l'eau filtrée sur 5 μm (Filtre Nucléopore de porosité 5 μm) pour obtenir la fraction ultraphytoplanctonique <5 μm ;

Les parts relatives au micro- et au nanophytoplancton ont ensuite été obtenues par soustraction (microphytoplancton = eau brute – fraction <20 μm , nanophytoplancton = fraction <20 μm – fraction <5 μm). Ce fractionnement a été mis en place pour plusieurs raisons. En premier lieu, les petits organismes eucaryotes entre 1 et 3 μm (appartement principalement aux Chlorophytes et Picocyanobactéries) et entre 3 et 6 μm (petites diatomées et flagellés) ont montré une forte dominance dans les lagunes méditerranéennes (Bec et al., 2011). Leur signal aurait été masqué si le fractionnement avait été placé à 2 μm (picophytoplancton) ou à 10 μm . En second lieu, les organismes dont la taille est inférieure à 5 μm montrent un rapport surface/volume important, indiquant une forte affinité pour les nutriments. Enfin, nous avons fractionné à 20 μm en nous basant sur l'hypothèse selon laquelle le microphytoplancton est moins vulnérable face à la prédation par le zooplancton (Palfy et al., 2013).

2.4.1.1 Estimation de la biomasse phytoplanctonique

La chlorophylle *a* étant un pigment ubiquiste chez tous les organismes autotrophes dont le phytoplancton (Falkowski and Kiefer, 1985), sa quantification est utilisée comme une estimation de la biomasse chlorophyllienne phytoplanctonique totale (Hunter and Laws, 1981). Dans le cadre de cette analyse, la biomasse phytoplanctonique a été estimée pour la totalité du phytoplancton et pour les trois classes de tailles décrites ci-dessus (micro-, nano-, et ultraphytoplancton). Les concentrations en chlorophylles *a*, *b*, *c* (Chl *a*, Chl *b*, Chl *c*) et en phéopigments *a* (Phe *a*) ont été mesurées par spectrofluorimétrie (Neveux and Lantoiné, 1993). Les chlorophylles *b* et *c* donnent une indication sur la présence respective d'algues vertes et brunes, tandis que les phéopigments qui sont des produits de dégradation des chlorophylles témoignent de la présence de cellules phytoplanctoniques dégradées ou de débris végétaux.

Au laboratoire, entre 60 et 1250 ml de chacune des fractions (selon la biomasse phytoplanctonique, le volume est déterminé pour éviter le colmatage du filtre) ont été filtrés sur des filtres Whatman GF/F 25 mm de diamètre et 0,7 mm de porosité sous un vide de moins de 10 cm Hg. Les filtres ont été séchés puis conservés dans des tubes en polypropylène 10 ml à -20°C jusqu'aux analyses. Les pigments ont ensuite été extraits 24 h à 4°C à l'obscurité dans 5 ml d'acétone 90 %. A la suite de l'extraction, le filtre a été broyé à l'aide d'un sonicateur puis centrifugé 30 minutes à 3500 rpm afin de séparer l'extrait des débris de filtres.

Les concentrations en Chl *a*, Chl *b*, Chl *c* et Phe *a* de l'extrait ont ensuite été mesurées par spectrofluorimétrie selon 30 paires de longueurs d'ondes encadrant les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission de chaque pigment. Pour chacune d'elles, l'échantillon a reçu une longueur d'onde d'excitation et réémit une longueur d'onde quantifiée par un capteur. Les concentrations pigmentaires ont ensuite été calculées à partir de ces 30 mesures de fluorescence par la résolution de 30 équations à 6 inconnues selon la méthode des moindres carrés, avec une précision de 5 %. Les biomasses sont exprimées en $\mu\text{g Chl } a \cdot \text{L}^{-1}$.

2.4.1.2 Détermination des abondances de pico- et nanophytoplancton

Les lagunes étudiées étant reconnues pour abriter une dominance de cellules de taille réduite (Bec et al., 2011), les abondances du pico- et nanophytoplancton ont été mesurées par cytométrie en flux. Cette technique, basée sur les propriétés optiques telles que la fluorescence et la taille des cellules permet de différencier les organismes entre eux et de quantifier leurs abondances avec une forte sensibilité et une rapidité d'analyse intéressante (Trask et al., 1982; Faber et al., 1997).

En laboratoire, des échantillons d'1 ml fixé au formaldéhyde filtré sur $0,2 \mu\text{m}$ (concentration finale 2 %) ont été placés rapidement dans l'azote liquide afin de réaliser un « *flash freeze* », améliorant la conservation des échantillons (Faber et al., 1997), puis conservés à -80°C jusqu'aux analyses. Le protocole d'analyse des échantillons en cytométrie en flux est détaillé dans Bec et al. (2011). Les cytogrammes ont été traités à l'aide du logiciel *Attractors* (Becton Dickinson). Plusieurs populations ont été différenciées selon leur classe de taille et leur fluorescence indiquant leur profil pigmentaire, et les abondances du pico- et du nanophytoplancton ont été calculées. A l'intérieur du picophytoplancton, les cyanobactéries riches en phycoérythrine (PE-Cyan) et phycocyanine (PC-Cyan) ont été différenciées des picoeucaryotes contenant de la chlorophylle *a* (PEUK) grâce à leurs différences de fluorescence. Les eucaryotes émettent une forte fluorescence rouge liée à la présence de Chl *a* (FL3) que l'on peut différencier en classes de tailles pico-, ultra- et nanoplanctoniques, tandis que les PE-Cyan émettent une forte fluorescence orange (FL2) et les PC-Cyan une faible fluorescence rouge associée à une faible taille cellulaire $<1 \mu\text{m}$. Les abondances des Cryptophytes à l'intérieur du nanophytoplancton ont également pu être mesurées. Les observations réalisées en cytométrie pour le nanophytoplancton ont été complétées par les analyses de diversité en microscopie optiques et en HPLC.

2.4.2 Abondances et diversité taxonomique du micro- et nanophytoplancton

Pour déterminer la diversité taxonomique du nano- et du microphytoplancton, la méthode Utermöhl a été modifiée afin de s'adapter à des abondances phytoplanctoniques très variables et parfois très faibles selon les saisons, notamment dans Ayrolle.

Au laboratoire, 950 ml d'eau ont été fixés au formaldéhyde (5 % concentration finale) dans un flacon Nalgène 1 l. Cet échantillon a ensuite été concentré à plusieurs reprises par sédimentation à l'obscurité pour obtenir un volume final entre 2 et 50 ml, selon les biomasses phytoplanctoniques, le but étant d'obtenir une densité cellulaire adéquate pour un comptage représentatif et un minimum de chlorophylle.

50 µl de l'échantillon concentré ont ensuite été placés après homogénéisation entre lame et lamelle d'une surface de 400 mm². Sur cette surface, le comptage a été effectué par balayage de champs ou de bandes diamétrales (transects) selon la densité cellulaire. Globalement, un nombre de 200 cellules minimum a été dénombré afin d'avoir une bonne représentativité de la diversité. Les cellules ont été identifiées de la famille à l'espèce. Les groupes ou espèces ont été classés par classes de taille pour différencier le micro- du nanophytoplancton. Le nombre de cellule de chaque taxon ou groupe taxonomique a ensuite été rapporté à la surface d'un champ ou d'un transect selon la formule :

$$N = \frac{\text{Nombre de cellules totales comptées}}{\text{Nombre de champs ou transects}}$$

Dans le cas de l'utilisation de transects, et selon le grossissement utilisé, cette valeur a été multipliée par un coefficient de 35,7 pour l'objectif x40, ou de 17,54 pour l'objectif x20, permettant de calculer l'abondance cellulaire dans 50 µl. Les coefficients correspondent au nombre de transects présents sur la surface d'une lamelle correspondant à 50 µl d'échantillon, et ont été calculés selon la formule :

$$\text{Coefficient} = \frac{\text{Diamètre objectif} \times \text{Largeur lamelle}}{\text{Surface lamelle}}$$

L'abondance a ensuite été ramenée par litre d'échantillon en tenant compte de la concentration et du facteur de dilution lié à l'ajout de formol ($d = 1,05$ soit $1000/950$) selon la formule :

$$\text{Abondance} = \frac{(N \times \text{Coefficient}) \times \text{Volume concentré}}{\text{Volume sur la lamelle}} \times d$$

Cette abondance, quantifiée en nombre de cellules par litre d'échantillon a également été corrigée selon le volume réel prélevé qui différait parfois d'1 L. Les cellules ont été identifiées jusqu'à l'espèce si possible, et la taxonomie a été vérifiée à l'aide du registre mondial des espèces marines (WoRMS) (Törnroos and Bonsdorff, 2012).

2.4.3 Régime trophique

Pour comprendre l'effet du niveau d'eutrophisation des lagunes sur le régime trophique des organismes, les proportions d'organismes autotrophes et hétérotrophes stricts ont été quantifiées, par l'observation de la fluorescence naturelle de la chlorophylle *a* dans les cellules. Cette observation s'est centrée sur deux types d'organismes : dans un premier temps, un

dénombrement des organismes flagellés autotrophes et hétérotrophes stricts a été effectué par classe de taille du picophytoplancton <3 µm au microphytoplancton >20 µm. Dans un second temps, au sein du microphytoplancton, un dénombrement des *Dinophytes* autotrophes et hétérotrophes stricts a complété cette analyse. Enfin, une synthèse bibliographique a permis de compléter ces observations, pour les aspects relatifs à la mixotrophie, la phagotrophie et l'osmotrophie.

Cette partie a fait l'objet de l'encadrement au cours de la deuxième et la troisième année de thèse de deux stagiaires de Master 1, Mélanie Larue et Arnaud Louchart, qui ont participé aux prélèvements de terrains et /ou aux traitements des échantillons et analyses des résultats.

2.4.3.1 Dénombrement des flagellés autotrophes et hétérotrophes stricts

A partir du prélèvement *in situ*, des échantillons de 30 ml ont été fixés à l'aide de 2,5 µl de formol filtré sur 0,2 µm (concentration finale 4 %) et placés à l'obscurité à 4°C. Ces échantillons ont été marqués avec un intercalant moléculaire fluorescent, le DAPI (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (2,5 µg.ml⁻¹ concentration finale) au moins 15 minutes à l'obscurité. Cette molécule fluorescente s'intercale entre les bases A et T, permettant de visualiser l'ADN par une coloration bleue en microscopie à épifluorescence sous lumière UV et donc d'observer les organismes eucaryotes et procaryotes (Jiao and Ni, 1997). En fonction de la biomasse, un volume de cet échantillon compris entre 0,25 et 20 ml a été filtré sur un filtre Whatman Nucleopore Trach-Etched (25 mm de diamètre, 0,8 µm de porosité) à une pression inférieure à 200 mm Hg. Le filtre a ensuite été monté entre lame et lamelle avec de l'huile à immersion, puis observé au microscope à épifluorescence Olympus AX70 PROVIS, sous un filtre dichroïque à 350 nm d'excitation et 450 nm d'émission permettant d'observer la fluorescence bleue du DAPI. Les organismes autotrophes stricts possédant de la Chl *a* ont été mis en évidence et différenciés des hétérotrophes stricts grâce à l'autofluorescence rouge de cette molécule sous lumière verte (Hansen, 1991; Verity et al., 1993; Santos et al., 2007). La présence de Chl *a* a été évaluée sous filtre dichroïque de 570 nm d'excitation et 630 d'émission. Les cellules ont été comptées sur un nombre de champs de 100 µm² dépendant de la densité cellulaire. Globalement, un nombre de 200 cellules minimum a été dénombré afin d'avoir une bonne représentativité de la diversité et des abondances. Les organismes ont été classés en 4 classes de tailles :

- les cellules <3µm ;
- l'ultraphytoplancton et le petit nanophytoplancton compris entre 3 et 10 µm ;
- le nanophytoplancton entre 10 et 20 µm ;
- le microphytoplancton >20 µm

A l'intérieur de ces classes de taille, la contribution des organismes autotrophes et hétérotrophes stricts à l'abondance totale a été quantifiée. Les abondances quantifiées en nombre de cellules par ml ont ensuite été calculées selon l'équation suivante :

$$Abondance = \frac{S_f \times n}{S} \times d$$

Avec S_f la surface utile du filtre, n le nombre total de cellules comptées, v le volume filtré, d la dilution par le formol (1,083) et S , la surface totale sur laquelle les cellules ont été dénombrées, obtenu selon la formule :

$$S = s_c \times n_c$$

s_c : la surface d'un champ (100 μm^2)

n_c : le nombre de champs comptés pour l'échantillon

2.4.3.2 Dénombrement des Dinophytes autotrophes et hétérotrophes stricts

Les *Dinophytes* étant représentés en moins forte abondance que les petits flagellés (d'après les observations préalablement effectuées lors de l'évaluation de la diversité taxonomique), la technique Utermöhl permettant d'observer un volume d'échantillon supérieur à 30 ml a été utilisée (Utermöhl, 1931; John et al., 2003). A partir des prélèvements *in situ*, 250 ml d'échantillon ont été fixés à l'aide d'1 ml de Glutaraldéhyde et conservés à l'obscurité à 4°C. Ces échantillons ont été sédimentés et 150 ml de surnageant ont été ôtés pour les concentrer à un volume final de 100 ml. Ces 100 ml ont sédimentés 24 h selon la méthode Utermöhl. Les cellules récupérées sur la chambre Utermöhl ont été observées dans les 24 h au microscope inversé Olympus IX70 (Verity et al., 1993; Verity and Borkman, 2009). Les cellules ont été identifiées jusqu'au genre voir jusqu'à l'espèce.

2.4.4 Croissance en condition nutritives saturantes et limitantes

2.4.4.1 Prérequis méthodologique

Afin de comprendre les paramètres écologiques qui structurent les communautés phytoplanctoniques en termes de biomasse, de composition, de fonction, et leur variabilité saisonnière, des expériences de dilution ont été réalisées au cours de trois saisons dans trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés. Plus précisément, ce travail avait pour but de mettre en évidence l'impact du niveau d'eutrophisation du milieu et la variabilité saisonnière des apports en nutriments sur les caractéristiques écologiques du phytoplancton. Cette étude s'est concentrée sur certains traits fonctionnels fortement soumis à la disponibilité et aux formes de nutriments disponibles (*cf.* introduction). Le taux de croissance maximal par exemple dépend fortement de la température, de la lumière et des ressources en nutriments. Il conditionne la compétitivité des organismes les uns par rapports aux autres et donc la structuration des communautés.

Pour estimer le taux de croissance maximal des organismes phytoplanctoniques, des expériences de dilution ont été mises en place selon la méthode de Landry and Hassett, (1982).

Cette technique est largement utilisée afin d'estimer à la fois le taux de croissance maximal et le taux de mortalité par broutage du phytoplancton. Les dilutions de l'échantillon avec de l'eau filtrée sur 0,2 µm permettent de diminuer la probabilité de rencontre entre le phytoplancton et ses prédateurs, et donc de favoriser sa croissance. Cette méthode repose sur trois hypothèses :

- la croissance du phytoplancton est indépendante de sa densité de population et n'est donc pas affectée par la dilution ;
- les prédateurs ne connaissent pas de saturation de la prédation en fonction de la densité des proies, donc le nombre de proies ingérées par un prédateur est une relation linéaire proportionnelle à la densité des proies ;
- l'évolution de la concentration du phytoplancton dans le temps peut être représentée par une équation exponentielle :

$$C_t = C_0 \times e^{(k-g)t} \quad (1)$$

Où C représente la concentration phytoplanctonique, exprimée en biomasse ou en abondance, k le coefficient de croissance instantané et g le taux de broutage.

Les concentrations initiales $C_{(x, 0)}$ et finales $C_{(x, t)}$ en chlorophylle a permettent de calculer le taux de croissance apparent $\mu(x,t)$ après une durée d'incubation t , pour chaque dilution x allant de 0 pour une dilution infinie à 1 pour un échantillon non dilué :

$$k(x, t) = \frac{1}{t} \times \ln \left(\frac{C_{x,t}}{C_{0,t}} \right) \quad (2)$$

La régression linéaire entre le taux de croissance apparent (k) et le facteur de dilution (x) permet de déterminer le taux de croissance maximum μ_{max} correspondant à l'ordonnée à l'origine et le taux de mortalité par broutage g correspondant à la pente de la droite :

$$k(x) = \mu_{max} - gx \quad (3)$$

2.4.4.2 Protocole expérimental

Ces expérimentations ont eu lieu en automne 2013 entre le 14 et le 22 novembre, au printemps 2014 entre le 14 et le 23 avril et en été 2014 entre le 25 août et le 04 septembre, à partir d'eau provenant de deux lagunes du complexe des étangs palavasiens, IN et MW mésotrophe et hypereutrophe, et d'Ayrolle, oligotrophe. Les expérimentations se sont déroulées à la Station Méditerranéenne de l'Environnement Littoral (SMEL) de Sète. Elles ont été menées en parallèle sur trois stations représentatives du gradient salin et d'eutrophisation de la lagune de Biguglia (Corse) pour lesquelles j'ai pu apporter ma contribution en automne 2013 et en été 2014.

Au laboratoire, les 70 l d'eau prélevés *in situ* (voir § 2.2.3) ont été homogénéisés dans un bidon en polypropylène. Une partie de l'eau (20 l) a été filtrée sur cartouche Acropack 0,2 µm (préalablement rincée à l'eau milli-Q et avec de l'échantillon) par gravité afin d'obtenir une eau vierge de tout organisme. Cette eau filtrée a ensuite été utilisée pour réaliser une série de

dilution de l'eau « brute » (non filtrée) en duplicat (A et B) dans des bouteilles en polycarbonate (PC) d'un litre (Figure 6). Cinq dilutions ont donc été effectuées afin de contenir : 10, 20, 45, 75, et 100 % d'eau brute (Landry and Hassett, 1982).

Dans le cas où les concentrations phytoplanctoniques sont élevées, la croissance peut être limitée par les nutriments au cours des 24 h d'incubation, notamment dans les bouteilles peu diluées. Cette limitation n'est pas cohérente avec les hypothèses formulées par Landry and Hassett, (1982), et aurait pour conséquence une surestimation du broutage. Afin d'éviter cette limitation nutritive, l'ajout d'un enrichissement est nécessaire dans les incubations (Landry et al., 1995). La forte gamme de biomasse phytoplanctonique observée dans les lagunes étudiées, et particulièrement élevée dans MW a déterminé l'utilisation d'un enrichissement nutritif concentré.

Trois séries de dilutions ont été préparées à chaque expérimentation afin d'ajouter l'étude de l'adaptation du phytoplancton aux ressources limitantes (voir ci-après § 2.4.4.4). Chacune des bouteilles a été enrichie à l'aide d'une solution contenant un milieu nutritif synthétique avec des traces métalliques, des vitamines et des nutriments (Guillard and Ryther, 1962). Une série a été enrichie en azote et en phosphore, la seconde uniquement en phosphore, la troisième uniquement en azote, selon la méthode de Andersen et al., (1991), permettant d'estimer l'utilisation des ressources externes, internes et régénérées en condition nutritives limitantes. Deux bouteilles témoins contenant 100 % d'eau brute non enrichie ont également été incubées.

Les enrichissements en phosphate ont été identiques au cours des trois saisons, mais les formes et les concentrations en azote ont été adaptées à chacune des saisons : Au printemps, les incubations ont été enrichies en nitrate correspondant au type d'azote apporté par le lessivage des bassins versants lors des pluies. En été les incubations ont été enrichies en ammonium correspondant à la forte reminéralisation des stocks sédimentaires lorsque la température est élevée et couplée à une absence de pluie. Enfin en automne, les températures potentiellement encore douces couplées aux fortes pluies apportant du nitrate, les deux formes d'azote ont été ajoutées (concentration finale en Phosphore 0,8 μM , concentration finale en Azote 20 μM). Les incubations ont été réalisées sur 24 h.

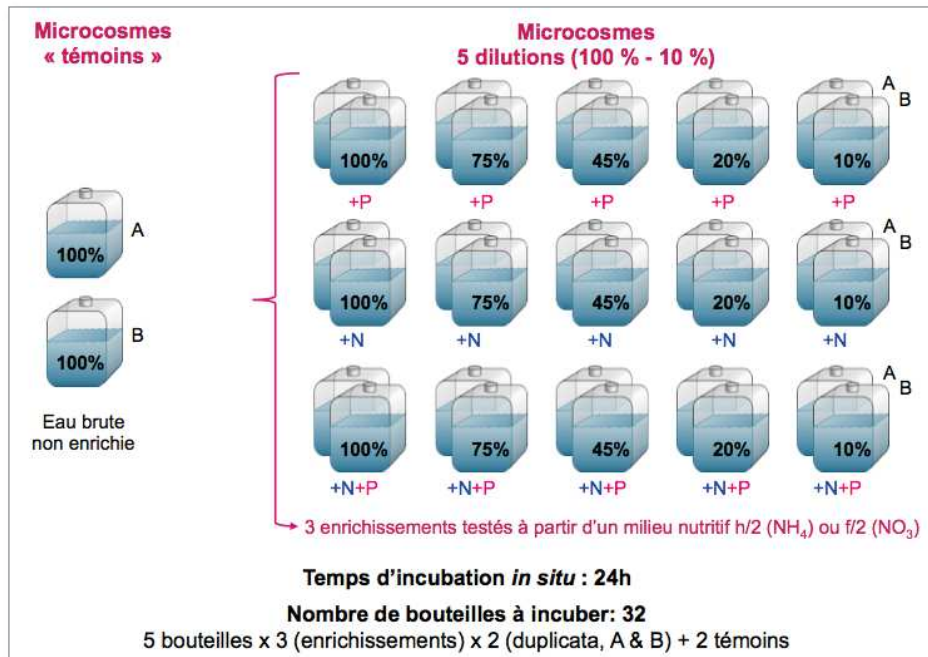


Figure 6. Schéma récapitulatif des incubations en dilution menées pour chaque lagune à chaque saison. 32 bouteilles sont incubées au total : deux réplcats témoins contenant 100 % des échantillons non enrichis, et trois séries d’enrichissements en dilution, une enrichie en N et P, une enrichie sans N et une enrichie sans P.

Au cours de la première expérimentation en automne 2013, les bouteilles ont été incubées dans des bacs hors sol en circulation ouverte avec l’étang de Thau pour limiter une variabilité de température trop élevée et trop différente du milieu lagunaire, et éviter de perdre des bouteilles du fait des fortes rafales de vent à cette période. Cependant, cette méthode ne s’est pas avérée pertinente car les bouteilles ont montré des différences de biomasses liées au masque d’un arbre sur les bacs, associé à des températures très basses. Les expériences suivantes ont été incubées à 60 cm de profondeur dans l’étang de Thau, au niveau du ponton de la SMEL (Figure 7).



Figure 7. Incubation des 32 bouteilles au ponton de la SMEL dans l'étang de Thau, échantillons provenant d'Ayrolle, Avril 2014.

2.4.4.3 Calcul des taux de croissance (Landry and Hassett, 1982)

Les taux de croissance apparent μ et de mortalité g ont été calculés à partir des biomasses mesurées par spectrofluorimétrie pour le phytoplancton total et par classes de taille de l'ultra- au microphytoplancton (voir § 2.4.1.1) à T0 et à T24 dans les incubations, selon l'équation (2). Le taux de croissance sans enrichissement a été calculé en ajoutant la valeur du taux de broutage g estimé en milieu enrichi au taux de croissance apparent (k_0) calculé à partir des biomasses mesurées à T24 dans les incubations témoins (non diluées et sans enrichissement) :

$$\mu_0 = k_0 + g \quad (4)$$

La différence entre μ_{\max} et μ_0 a permis de mettre en évidence l'effet de l'enrichissement sur la croissance phytoplanctonique, indiquant si l'enrichissement a permis la levée d'une limitation nutritive du phytoplancton.

2.4.4.4 Exploitation des ressources en conditions limitantes

Sur la base du protocole de Landry and Hassett (1982) modifié par Andersen et al. (1991), les expérimentations en dilution en enrichissement en azote et phosphore ont été complétées par deux séries de dilution enrichies soit en N soit en P (Figure 6). Dans ces conditions, le phytoplancton a potentiellement été limité par un épuisement des ressources internes et externes du nutriment non ajouté. L'hypothèse d'un taux de croissance linéaire en

fonction de la dilution n'est donc pas forcément respectée dans ce cas, puisqu'il a pu diminuer à mesure que les organismes ont été limités, et μ_Y ne peut donc pas être déduit d'une relation linéaire selon l'équation (3) (Andersen et al., 1991). Il a donc été estimé à partir du taux de croissance apparent k_Y :

$$\mu_{-Y} = k_{-Y}(x) + gx \quad (5)$$

Où Y correspond au nutriment qui n'a pas été ajouté et qui s'est avéré limitant (N ou P). Les taux de croissance μ_Y calculés à partir des taux de croissances apparents dans les bouteilles non diluées permettent d'évaluer la limitation de la croissance selon N ou P.

Les hypothèses formulées alors sont :

- le broutage est le seul processus densité-dépendant pendant l'incubation ;
- le broutage est linéaire et n'atteint pas de saturation quelque soit la dilution ;

Afin d'estimer la contribution des sources nutritives internes (réserves cellulaires), externes (présentes dans l'eau), et régénérées (liées au broutage, combinant plusieurs sources telles que l'excrétion et le relargage du contenu des cellules prédatées), Andersen et al. (1991) ont modifié l'équation (2) :

$$\tilde{\mu}(x) = \frac{1}{t} \ln \left(\frac{C(x, 0) + \Delta C(x, t)}{C(x, 0)} \right) \quad (6)$$

Où x représente le facteur de dilution, $\tilde{\mu}(x)$ le taux de croissance moyen et $\Delta C(x, t)$ la production potentielle.

La production potentielle peut alors être décomposée en trois composantes quantifiant les parts de production supportées par les ressources internes (C_I), externes (C_E) et régénérées (C_R), en supposant que dans le cadre d'une durée d'incubation relativement courte, les ressources externes diminuent avec le temps, et que si le taux de croissance diminue, alors les ressources internes diminuent conjointement :

$$\Delta C(x, t) = \Delta C_R(t)x^2 + \Delta C_I(t)x + \Delta C_E(t) \quad (7)$$

Les équations (6) et (7) peuvent alors être combinées pour donner :

$$\tilde{\mu}(x) = \frac{1}{t} \ln \left(1 + \frac{\Delta C_R(t)x^2 + \Delta C_I(t)x + \Delta C_E(t)}{xC(1,0)} \right) \quad (8)$$

Pour une source nutritive Z, si l'on introduit le coefficient de production :

$$K_Z = \frac{\Delta C_Z(x,t)}{C(1,0)} \quad (9)$$

Le taux de croissance moyen peut être réexprimé selon K_I , K_R et K_E correspondant aux rendements relatifs de chaque source nutritive :

$$\tilde{\mu}(x) = \frac{1}{t} \ln (1 + K_R x + K_I + K_E x^{-1}) \quad (10)$$

Les coefficients K_I , K_R et K_E peuvent alors être déduits de l'équation (10) :

$$\exp(\tilde{\mu}(x)t) - 1 = K_R x + K_I + K_E x^{-1} \quad (11)$$

Dans le cadre des expérimentations *in situ*, les taux de croissances apparent ont été calculés à partir des biomasses phytoplanctoniques totales, et pour chaque classe de taille de l'ultra- au microphytoplancton. Les coefficients K ont été estimés à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2013) par le biais de modèles linéaires multiples de la forme :

$$Y \sim x + I(x^{-1}) \quad (12)$$

Où $Y = \exp(\tilde{\mu}(x)t) - 1$ et $\tilde{\mu}(x) = k_{-Y}(x) + gx$

Afin de sélectionner le modèle le mieux ajusté aux données, le critère d'information d'Akaike corrigé (*corrected Akaike's information criterion* AICc) a été utilisé. Le critère d'AIC permet de déterminer quel modèle explique les données avec le plus de parcimonie (donc avec le moins de paramètres). Cette méthode permet également de savoir quels sont les paramètres qui expliquent le mieux la variabilité du paramètre étudié. L'utilisation de l'AICc est préconisée en cas d'échantillon de petite taille comme dans notre cas (Burnham and Anderson, 2004). Le modèle possédant le plus faible AICc est considéré comme le mieux ajusté aux données. Cependant, les modèles possédant un $\Delta AICc^7 < 2$ ne sont pas significativement différent en termes d'efficacité d'ajustement aux données, et peuvent donc également être sélectionnés (Cameron et al., 2013). La fonction « dredge » du package « MuMIn » (R Core Team, 2013) a été utilisée pour effectuer cette sélection de modèle, au sein desquels K_R était représenté par le coefficient de x , K_E était représenté par le coefficient de $1/x$, et K_I par l'ordonnée à l'origine. Le produit de la biomasse phytoplanctonique initiale $C_{(1,0)}$ et de ces trois coefficients permet d'estimer la production potentielle liée aux trois types de ressources.

2.4.5 Diversité pigmentaire

Lors de la mise en place du RSL, le suivi de la diversité pigmentaire par HPLC (Chromatographie Liquide à Haute Performance) avait été mis en place en routine afin d'avoir une vision des principaux groupes phytoplanctoniques présents dans la colonne d'eau. Cette technique d'analyse se basant alors sur le protocole de Wright et al. (1991) présentait de nombreux avantages. Elle permettait d'obtenir une bonne résolution d'un nombre important de pigments chlorophylliens, caroténoïdes et leurs dérivés, quelque soit la variabilité environnementale (qui est une caractéristique intrinsèque des lagunes côtières), et d'obtenir de manière rapide (29 minutes) et reproductible une image globale de la structuration des communautés phytoplanctoniques. Cette technique était notamment avantageuse par rapport à

57

⁷ Le $\Delta AICc$ correspond à la différence entre l'AICc du modèle en question et celui du modèle le plus parcimonieux.

l'analyse de la diversité par microscopie car elle s'affranchit de la taille cellulaire (les petits organismes étant difficilement observables et encore moins identifiables microscopiquement). Elle est également plus rapide et moins dépendante de l'opérateur (Schluter et al., 2000). Grâce à cette méthode, la dynamique des groupes phytoplanctoniques dominants a pu être étudiée de 2006 à 2013 au sein des lagunes de l'ensemble du Languedoc-Roussillon et de Corse. Ces observations se sont basées sur 5 groupes majoritaires : les Algues vertes indiquées par la présence de Chl *b*, les Cryptophytes par la présence d'alloxanthine (allox), les Diatomées par la présence de fucoxanthine (fuco), les Dinophytes la présence de péridinine (péri), et les Cyanobactéries par la présence de zéaxanthine (zea).

Cette technique présentait cependant quelques inconvénients. Elle ne permettait pas une bonne séparation de certains pics de pigments qui coéluent notamment au début du chromatogramme. Par exemple, le Magnésium 2,4-divinylpheoporphyrin *a*₅ monoethyl ester (MgDVP), un marqueur des Prasinophytes, coélut avec les chlorophylles *c*₁ et *c*₂, ce qui peut biaiser le calcul de leur concentration. La lutéine, marqueur des Algues vertes coélue en partie avec la zéaxanthine qui peut être marqueur des cyanobactéries, induisant des erreurs dans leur quantification. Deux pigments marqueurs des Haptophytes, les 19'-Butanoyloxyfucoxanthin (19'-Butfuco) et 19'-Hexanoyloxyfucoxanthin (19'-Hexfuco), des dérivés de la fucoxanthine marqueur des Diatomées coéluent avec la siphonaxanthine et la cis-néoxanthine, diluant le signal indiquant la présence de ce groupe dans celui des Prasinophytes et des Chlorophytes. La quantification des pigments marqueurs des Prochlorophytes (divinylchlorophylles *a* et *b*) n'est également pas permise par cette méthode, de même que certains caroténoïdes marqueurs de photoprotection et certains phéopigments marqueurs de processus de prédation et de sénescence du phytoplancton (Wright et al., 1991). De plus, cette méthode utilisait l'acétate d'ammonium dans la composition de la phase A du gradient ternaire (phase mobile). Cette molécule a montré dans le cas d'échantillons très concentrés - comme ce peut être le cas dans les lagunes côtières - une rétention anormale de la Chl *a*, induisant un biais d'analyse (Garrido and Zapata, 1996; Van Heukelem and Thomas, 2001).

Chaque méthode chromatographique présente des avantages et des inconvénients, qu'il faut prendre en considération pour choisir la plus adaptée au type d'analyse à réaliser. La méthode de Wright et al. (1991) correspondait aux critères de variabilité environnementale et était rapide, mais la coélution de la lutéine et la zéaxanthine posait un problème majeur. Une partie de ce travail de thèse a donc consisté en une amélioration de la technique d'analyse par HPLC de la diversité pigmentaire phytoplanctonique.

Dans un premier temps, une analyse bibliographique a aidé à sélectionner des pigments supplémentaires aux cinq pigments utilisés dans le cadre du RSL permettant d'accroître la précision de la quantification des groupes phytoplanctoniques dominants. La chlorophylle *c*₃

(chl *c*3), le 19'-butfuco et le 19'-Hexfuco marqueurs des Haptophytes (plus présents que les Pélagophytes dans les lagunes côtières) ont été ajoutés. Des pigments dominants chez certains groupes ont permis d'apporter des compléments d'information sur leur présence : les Chlorophytes *via* la lutéine (lut) et la néoxanthine (néo), les Prasinophytes *via* la prasinoxanthine (prasino), et les Chrysophytes *via* la violaxanthine (viola). Enfin, des pigments marqueurs de processus tels que la photoprotection *via* le cycle des xanthophylles (diadinoxanthine (diadino) et diatoxanthine (diato)), ou tels que la prédation (chlorophyllide *a*, *b*, phéopigments) ont également été ajoutés à l'analyse (Roy et al., 2014). A partir de cette sélection, les chromatogrammes réalisés dans le cadre du RSL ont été retraités et complétés de 2006 à 2013, pour être pris en compte dans l'étude du changement des communautés après la réduction nutritive instaurée par la diversion de l'émissaire de Maera (Chapitre 3).

Par la suite, le protocole d'analyse chimiotaxonomique mis en place par Wright et al. (1991) a fait l'objet d'ajustements afin d'améliorer l'identification et la quantification des pigments, et plus particulièrement de la lutéine et la zéaxanthine. Chaque étape du protocole, à savoir l'extraction des pigments et le gradient d'analyse ont fait l'objet de modifications basées sur des publications ayant déjà ajustées le protocole de Wright et al. (1991) (Hagerthey et al., 2006; Louda, 2008).

Concernant l'extraction des pigments, différents solvants d'extraction, volumes, durées d'extraction ont été testés, associés ou non à l'ajout d'un apparieur d'ions permettant d'améliorer la rétention et la séparation des pigments (Garrido and Zapata, 1996).

Le gradient d'analyse a également été modifié, en conservant un gradient ternaire et des phases B et C identiques. Seule la phase A a été légèrement modifiée en terme de composition, notamment par l'ajout de l'apparieur d'ions en remplacement d'une partie de l'acétate d'ammonium. En revanche, la durée d'analyse a été rallongée, passant de 29 à 53 minutes, afin de mieux séparer les pics.

Afin d'apprécier le degré d'amélioration du protocole, nous avons évalué si ces ajustements permettaient (i) d'augmenter le nombre de pigments identifiés, (ii) d'augmenter la résolution des pics, (iii) d'augmenter les concentrations en pigments mesurées dans les échantillons (sensibilité), à l'aide du logiciel R (R Core Team, 2013).

Globalement, l'augmentation de la durée d'analyse a amélioré la séparation des pics, et donc la discrimination des pics qui coéluent dans la méthode initiale, notamment en début et en fin de chromatogramme. Cette méthode a également montré une plus forte sensibilité pour certains pigments pour lesquels elle a permis une quantification plus importante : la fuco marqueur des Diatomées, l'allox marqueur des Cryptophytes, et la Chl *b* marqueurs des Algues vertes. Ce protocole a ensuite été utilisé pour l'ensemble des analyses chimiotaxonomiques réalisées dans le cadre de cette thèse.

Les résultats de cet ajustement du protocole d'analyse chémotaxonomique ont fait l'objet d'une publication scientifique.

MANUSCRIT A

Selecting an HPLC method for chemotaxonomic analysis of phytoplankton community in Mediterranean coastal lagoons

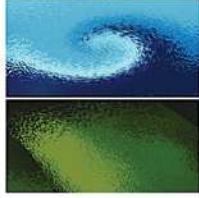
Amandine Leruste*, Elise Hatey, Beatrice Bec, Rutger De Wit

Centre of Marine Biodiversity, Exploitation and Conversation (MARBEC) UMR 9190, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Ifremer,

Place Eugène Bataillon, Université de Montpellier, Case 093, 34095 MONTPELLIER cedex 5, France

*Corresponding author: amandine.leruste@umontpellier.fr

Acceptée en 2015 dans *Transitional Water Bulletin*



RESEARCH ARTICLE

Selecting an HPLC method for chemotaxonomic analysis of phytoplankton community in Mediterranean coastal lagoons

A. Leruste*, E. Hatey, B. Bec, R. De Wit

*Centre for Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC).
UMR 9190. Université de Montpellier, CNRS, IRD, Ifremer
Place Eugène Bataillon, Université de Montpellier, Case 093,
F-34095 Montpellier Cedex 5*

*Corresponding author. Phone: +33 4 67 14 32 19;
E-mail address: amandine.leruste@umontpellier.fr

Abstract

- 1 - Phytoplankton observations are commonly used to contribute to the assessment of aquatic ecosystem health and their trophic status. Compared to other methods, chemotaxonomic analysis based on High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) presents many advantages (e.g., rapidity, reproducibility, and capacity to include pigments from all cell sizes), but its use in coastal lagoons studies is still not very common. The method of Wright *et al.*, (1991) recommended by the UNESCO (Jeffrey *et al.*, 1997) and most frequently used for phytoplankton analysis in coastal lagoons, so far, was selected and compared to the more novel method of Hagerthey *et al.* (2006).
- 2 - The two methods that differed slightly with respect to their solvent gradients during chromatography (mobile phase) and column (stationary phase), were tested using a pigment mix from DHI Water and Environment comprising 30 different pigments. Extraction methods were tested using replicates of 11 of sub-surface water from the Thau lagoon (South of France), sampled in June 2013. Optimization of the extraction was performed by testing different volumes of solvent (2 to 5 ml), different solvents based on a mix of methanol, acetone, dimethylformamide, water, compared to acetone 90% and pure methanol, as well as different extraction times (10 min to 2 h), and the addition of the ion-pairing agent tetrabutyl ammonium acetate hydroxide (TBAA).
- 3 - The second method of analysis allowed better separation and resolution of most of the pigments, especially of lutein and zeaxanthin. The early-eluting most polar pigments and the more hydrophobic pigments eluting in the end of the chromatogram (chlorophylls and carotenoids) showed also better separation and peak shapes. 5 mL of the mix of acetone/ methanol/ water (45:45:10) allowed the best extraction of the pigments. The use of TBAA showed negative effects.
- 4 - For pigment analysis in coastal lagoon, our final protocol used 1 h extraction with 5 mL of acetone/ methanol/ water, and analysis with the gradient from Hagerthey *et al.* (2006). On our analytical equipment it needed some adjustments. It uses a longer chromatography run and quantified the phytoplankton pigment markers better than the method of Wright *et al.* (1991).

Keywords: HPLC, Chemotaxonomy, Phytoplankton Pigment analysis, C18, Ternary gradient, Coastal lagoon

Introduction

Phytoplankton constitutes a basis for aquatic food webs (Pace *et al.*, 1999), and in most of the coastal lagoons it represents a major source of energy and organic matter for the other trophic levels both in the pelagic and the benthic compartments (Bec *et al.*, 2005; Grami *et al.*, 2008). Coastal lagoons are vulnerable to eutrophication (Viaroli *et al.*, 2008; Zaldivar *et al.*, 2008; Cartaxana *et al.*, 2009) to a degree that depends on the nutrient loading from their watersheds, their hydro-morphological characteristics and water residence times. Nutrient over-enrichment has been a major problem during the last fifty years, due to strong demographic and economic developments in the coastal zone, which has resulted in a strong degradation of many of these ecosystems (Cloern, 2001; Bricker *et al.*, 2003; Paerl *et al.*, 2003; Carlier *et al.*, 2008). These environmental conditions are reflected by phytoplankton biomass (Souchu *et al.*, 2010) and biodiversity (Ptacnik *et al.*, 2008; Palffy *et al.*, 2013). Because of their rapid turnover compared to other autotrophic compartments, phytoplankton populations respond most quickly to environmental change, by variations of their biomass and taxonomic and functional diversity (Cloern, 2001; Paerl *et al.*, 2003; Cloern and Jassby, 2008; McQuatters-Gollop, 2008). Therefore, phytoplankton studies are of paramount importance for understanding aquatic ecosystem functioning and dynamics (Duarte and Cebrian, 1996), and many phytoplankton studies have been published in this journal. For these reasons, many monitoring programs and studies of eutrophication in coastal waters have focused on the phytoplankton compartment (Coelho *et al.*, 2007; Devlin *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2008). For the case of French Mediterranean coastal lagoons, a Lagoon Monitoring Network (Réseau de Suivi Lagunaire, RSL) operated a monitoring program from 2000-2013,

which included yearly monitoring during the summer periods of phytoplankton and water column chemistry of 24 lagoons in the Languedoc-Roussillon region. For this program, phytoplankton biomass was estimated by the chlorophyll *a* concentration (Souchu *et al.*, 2010), and flow-cytometry has been used for obtaining cell counts of nano- and picophytoplankton abundances (Bec *et al.*, 2011). Chemotaxonomic analysis of lipophilic pigments based on the use of High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) has been added in 2006 to gain more insight in the taxonomic diversity of the phytoplankton.

In oceanography, chemotaxonomic analysis with HPLC has been developed since the 1980's to assess phytoplankton pigment diversity in aquatic ecosystem. Frequently used for marine waters (Wright *et al.*, 1991; Mantoura and Llewellyn, 1983; Goericke and Repeta, 1993; Zapata *et al.*, 2000; Goericke, 2002; Vidussi *et al.*, 2011), it has been adopted and sometimes modified for phytoplankton studies in coastal, estuarine (Rodriguez *et al.*, 2003; Heil *et al.*, 2007; Carreto *et al.*, 2008; Seoane *et al.*, 2011), and lacustrine systems (Descy *et al.*, 2000; Schlüter *et al.*, 2000; Greisberger and Teubner, 2007). But except a few examples (Lohrenz *et al.*, 2003; Paerl *et al.*, 2003, 2007; Cartaxana *et al.*, 2009; De Wit *et al.*, 2012), so far HPLC pigment analysis has not been often applied in coastal lagoon ecosystems, and this is the first report published in this journal.

Chemotaxonomic analysis based on HPLC has numerous advantages. While microscopic analysis of phytoplankton samples is long, requires good skills and expertise, and is prone to subjectivity depending on the operator (Schlüter *et al.*, 2000), HPLC chemotaxonomic analysis presents a good compromise. First of all, this method is rapid, reproducible, and can be used in a routine procedure. It allows the identification of pigments that are specific biomarkers for some of the major taxonomic

groups, like Dinophytes, Chlorophytes, diatoms, Prasinophytes, and Cryptophytes. Hence, it provides us a good indication of phytoplankton community structure (Jeffrey *et al.*, 1997; Paerl *et al.*, 2003). HPLC analyses encompasses all the phytoplankton cell sizes in the sample, while microscopy does not allow the identification of the smallest cells, i.e. the picophytoplankton (Breton *et al.*, 2000), and flow cytometry can not count the largest cell sizes, i.e. the larger microplankton and the mesoplankton.

The aim of this study was to select an HPLC protocol that is both practical and performant for the pigment analysis in coastal lagoons. In addition, we wanted to optimize the pigment extraction protocol. In the first place, we considered the method described by Wright *et al.* (1991) because it was recommended by the Scientific Committee on Oceanic Research (SCOR) working group 78 on the Determination of photosynthetic pigments in seawater and described in detail in a UNESCO monograph (Jeffrey *et al.*, 1997). This method has been used for phytoplankton analysis in coastal lagoon in scientific studies (Lohrenz *et al.*, 2003; Paerl *et al.*, 2002, 2007), such as the Lagoon Monitoring Network. The method of Wright *et al.* (1991) offers numerous advantages, i.e. it provides a good resolution of 40 algal carotenoids and 12 chlorophylls and their derivatives, and it is simpler than most other methods (e.g., no need for adding a ion pairing reagent or a methylation reagent, cf. Zapata *et al.*, 2000; Airs *et al.*, 2001a), is less expensive, and allows the identification of biomarkers for many of the major taxonomic groups typical for marine waters, like Haptophytes, Dinophytes, Chlorophytes, diatoms (Wright *et al.*, 1991). This method has also been used for coastal waters where it has provided good results despite their environmental variability, as e.g. covering the entire range from oligotrophy to hypertrophy (Paerl *et al.*, 2003; Barocio-Leon *et al.*, 2006; Vilicic *et al.*, 2008 ; Paerl

et al., 2010). However, in comparison with more recently developed HPLC methods (Garrido and Zapata, 1996; Van Heukelem and Thomas, 2001; Hagerthey *et al.*, 2006; Louda, 2008), the method of Wright *et al.* (1991) presented some disadvantages. Some markers pigments, like lutein and zeaxanthin (Chlorophytes, Cyanobacteria), or some chlorophylls pigments co-elute (Metaxatos and Ignatiades, 2002). Carotenoids and phaeopigments are also not well identified. So, on the basis of the HPLC literature since 1991, we tried to select and optimize an HPLC protocol. Without fundamentally changing the chromatographic principle of the method (reverse phase chromatography on a C-18 column) we aimed to select a closely related method, which showed a better performance for the pigment analysis. Particular care was taken to maintain the same order of elution of the pigments as in the method of Wright *et al.* (1991). In addition, we aimed at optimizing all steps of the extraction protocol. The precision and the accuracy of pigment content are ultimately regulated by the method used to extract pigments from the cell. In addition, the extraction solvent needed to be compatible with the HPLC chromatography protocol. For this optimization, the differences in the composition of cell walls and in pigment polarity were considered, as well as the toxic or flammable properties of some solvents. The aim of optimizing the extraction protocol was to use an efficient solvent, mechanical disruption and extraction time to produce a solvent matrix that minimizes the formation of degradation products and stabilize pigments, while being the least toxic for users (Hagerthey *et al.*, 2006).

Materials and methods

Equipment and Software

We used a Waters D600 equipment, including

a quaternary solvent delivery system (600 controller 600 pump), an in-line degasser AF, a 717 plus Autosampler with autoinjector. Chlorophylls and carotenoids were detected by a Waters 2996 photo-diode array detector (optic resolution 1.2 nm) from 400 to 700 nm. Chromatography software (Empower Pro3) allowed the monitoring and the extraction of chromatograms at any selected wavelength. We have chosen 440 nm as a compromise for detecting chlorophylls and xanthophylls as well as their derivatives. However, "a posteriori" the spectral signature of each peak can be obtained at each selected retention time. Each peak was checked and readjusted to minimize errors due to noise. A preliminary identification of the pigments was based on an automated comparison with a spectral library previously created from pigment standards. The HPLC system was regularly calibrated with external standards (pigment standards from DHI Water and Environment, Hørsholm, Denmark) and pigments were quantified by using pigment response factors (Mantoura and Repeta, 1997). Finally, the pigment identification was controlled by (i) checking its position in the elution order, and (ii) comparing its absorption spectra with that observed for the corresponding standard and described by Roy *et al.* (2011).

Field samples

Lagoon water was obtained from the Thau lagoon, in the South of France (N 43° 26' 412; E 003° 39' 742; 3 m depth). Three hundred liters of water were collected at sub-surface (20 cm depth) on 12 June 2013. Samples were obtained by filtration of 1l water through 47 mm diameter Whatman GF/F filter (0.7 µm nominal pore size). Filters were blotted from below to absorb water while the filtrate on top remains in place, folded with precision wipes (Kimtech Science) (Wright, 2005). They were then stored in 10 ml polypropylene tubes at -80°C prior to HPLC analysis.

Extraction protocols and tests for optimizing extraction yield

The extraction solvent was added to the polypropylene tubes with the filters (see above). The filters soaked in the extraction solvent were sonicated 5 times, by immersing the tip of a sonic probe below the surface of the liquid 10 sec (20 Watts). Each sonication was followed by 10 sec of storage on ice to avoid excessive heating of the extract. These manipulations were performed in very dim light to prevent pigment degradation. Subsequently, these extracts were stored in darkness at 4°C for the different durations listed below (Table 1. Factor 4 = extraction time).

The extracts were filtered on 0.45 µm cellulose acetate filters, and the filtrates were stored in 1.5 ml eppendorf, at 4°C before the injection. 1 ml of extract were then pipetted to HPLC vials with 125 µL of Milli-Q water, to increase the affinity of pigments for the column, resulting in sharper peaks (Wright *et al.*, 1991). 150 µl of these extracts were injected to the HPLC system. We studied how to enhance the extraction efficiency by optimizing the yield of the pigments obtained in the organic extraction solvent. Therefore, we studied the impact of four different factors (Table 1) according a factorial design. One of the factors was the volume of the extraction solvent added (factor 1). It has been argued that lower extraction volumes, as e.g. 2 ml (Zapata *et al.*, 2000), may be useful to concentrate the extract (Wright *et al.*, 1991). It was compared to 2.5 ml as used for the Lagoon Monitoring Network method, and a higher extraction volume i.e. 5 mL (Eker-Develi *et al.*, 2012). The type of solvent and the addition of the ion-pairing reagent were the two factors related to the composition of the extraction solvent. Therefore, we studied the impact of four different factors (Table 1) according a factorial design. One of the factors was the

Table 1. Factors tested for improving pigment extraction (factors 1-4) compared to the extraction treatments that have been used most often in combination with the HPLC protocol according Wright *et al.* (1991). The tested extraction treatments have been tested both in combination with the selected HPLC protocols of Wright *et al.* (1991) and Hagerthey *et al.*, (2006). In addition, the impact of addition of the ion-pairing

Factors	Parameters	Initial treatment	Tested treatments
1	Volume	2.5 ml	2 ml – 5 ml
			Acetone / methanol / water (45:45:10) (solvent 2)
2	Composition (mixture) of the Extraction solvent	Methanol (100%) (solvent 1)	Methanol / acetone / <i>N-N</i> -dimethylformamide / water (30:30:30:10) (solvent 3)
			Acetone 90%, water 10 % (solvent 4)
3	TBAA addition in extraction solvent	No	Yes – in the extract (+ 125 μ l)
4	Extraction time	15 min	10 min – 2 hours
5	TBAA addition in the mobile phase	No	Addition of 28 mM final conc. of TBAA instead of Ammonium acetate

volume of the extraction solvent added (factor 1). It has been argued that lower extraction volumes, as e.g. 2 ml (Zapata *et al.*, 2000), may be useful to concentrate the extract (Wright *et al.*, 1991). It was compared to 2.5 ml as used for the Lagoon Monitoring Network method, and a higher extraction volume i.e. 5 mL (Eker-Develi *et al.*, 2012). The type of solvent and the addition of the ion-pairing reagent were the two factors related to the composition of the extraction solvent. Thus, we compared different extraction solvents (factor 2), and studied the impact of adding the ion-pairing agent tetrabutyl ammonium acetate hydroxide (TBAA) to the extraction solvent, compared to the non-amended control (factor 3). Hence, four extractions solvents were compared (Table 1, factor 2), i.e. (1) methanol, (2) acetone/ methanol/ water (45:45:10), (3)

methanol/ acetone/ *N-N*-dimethylformamide/ water (30:30:30:10) and (4) acetone/ water (90:10) (Jeffrey *et al.*, 1997; Hagerthey *et al.*, 2006; Louda, 2008). For the TBAA treatment, the sample was prepared using 1.0 ml of filtered extract with 125 μ l of the ion-pairing solution (Table 1, factor 3). The TBAA was added in the extraction solvent only, without adding it to the mobile phase used for the chromatography (Louda *et al.*, 2000; Hagerthey *et al.*, 2006; Louda, 2008). Finally, the impact of extraction duration (factor 4) was studied by comparison between 2 hours extraction time as initially proposed by Hagerthey *et al.*, (2006) with 10 min as a simplified extraction protocol.

Chromatography, comparison of two methods
We compared the performance of the HPLC protocols described by Wright *et al.* (1991)

and Hagerthey *et al.* (2006). Both are based on the same chromatographic principles (reverse phase chromatography, use of ternary gradient) but differ slightly in their stationary and mobile phases, which are specified below.

Stationary phase

For testing the protocol of Wright *et al.* (1991) we used a C18 pre-column (3.9 x 20 mm, 5 µm particle size), coupled to a reversed phase ODS2 C18 Waters Spherisorb column (4.6 x 250 mm, 5 µm particle size). For testing the protocol of Hagerthey *et al.* (2006), we used a NovaPak C18 guard column 2/PK coupled to a reversed phase Waters NovaPak C18 column (3.9 x 300 mm, 4 µm particle size), according to (Louda, 2008). For both protocols, the temperature of the column was controlled at 24°C (560-CIL oven).

Mobile phases

Both methods, i.e., Wright *et al.* (1991) and Hagerthey *et al.* (2006), use ternary gradients specified in Tables 2 and 3. The latter uses a longer time-span for the gradient, and a slightly different A phase (0.5 M ammonium acetate in methanol/water 85:15), as adopted earlier by Louda *et al.* (2000). In addition, we

tested the impact of addition of the ion-pairing agent TBAA in the mobile phase (Table 1). Therefore, we replaced the solvent A1 and A2 (Tables 2 and 3), by a modified solvent composed of 70:30 28 mM TBAA:Methanol as is used for the CSIRO method (Hooker *et al.*, 2009). This modification was considered as an independent factor when comparing the two different chromatography protocols and also taken into consideration in the factorial design as factor 5, together with the four factors (Table 1). The composition of the extraction solvent that is injected on the column is expected to interact strongly with the mobile phase particularly during the early phase of pigment elution.

Both methods were calibrated with pigment standards from DHI using four different masses for injections to obtain calibration curves. To compare the separation performances of the two protocols, we analyzed a mixed pigment set from DHI in triplicate for each method (mix-112, DHI, Denmark). The qualitative composition of this pigment mixture was known and described in a certificate by DHI; however, the concentrations of the different pigments were not specified.

Table 2. Solvent profile used with RP-HPLC from Wright *et al.* (1991).

Time (min)	Flow rate (ml min ⁻¹)	% Solvent A1	% Solvent B	% Solvent C
0	1.0	100	0	0
2	1.0	0	100	0
18	1.0	0	20	80
21	1.0	0	100	0
24	1.0	100	0	0
29	1.0	100	0	0

Table 3. Solvent profile used with RP-HPLC from Hagerthey *et al.*, (2006).

Time (min)	Flow rate (ml min ⁻¹)	% Solvent A2	% Solvent B	% Solvent C
0	1.0	60	40	0
5	1.0	60	40	0
10	1.0	0	100	0
40	1.0	0	30	70
45	1.0	0	30	70
46	1.0	0	0	100
47	1.0	0	100	0
48	1.0	60	40	0

The resolution of separation between two adjacent peaks (e.g., lutein and zeaxanthin) was calculated using the formula below:

$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{R1} - t_{R2}}{\omega_1 + \omega_2}$$

Where t_{R1} and t_{R2} were the retention time of the two pigments analyzed, and ω_1 and ω_2 the peak width at their basis. The peak width was determined as recommended by GXP laboratories, by the Empower software, which calculated the best value, using the *V3.0.X Style Peak and Threshold Determination routine*.

The selectivity of the two methods for the lutein and the zeaxanthin was determined using the formula below:

$$\alpha = \frac{t_{R1} - t_0}{t_{R2} + t_0}$$

Where t_{R1} and t_{R2} were the retention time of the two pigments analyzed and t_0 the difference in time between injection and detection of system peak, i.e. the time taken

for the mobile phase to pass through the column.

The higher is the selectivity and resolution of a method for a couple of two pigments, the better is the separation and the quality of their quantification.

Statistical analysis

The software R (R Core Team, 2013) and its specific packages were used for statistical analyses. The student test was used for comparing selectivity and resolution for pigment couples in two methods i.e. Wright *et al.* (1991) and Hagerthey *et al.* (2006). To compare the analysis efficiency of the two methods, the concentrations of the pigments in the mixture obtained with the two protocols were compared, and we considered the one that gave the highest values as the best (Student test, R).

The factorial experiments for optimization of the extraction protocols were analyzed according a step-wise approach. Taking into account the whole pool of pigment concentrations measured (chl *a*, chl *b*, chl

c2, alloxanthin (allo), fucoxanthin (fuco), peridinin (peri), diadinoxanthin (diadino), prasinoxanthin (prasino), lutein (lut), neoxanthin (neo), zeaxanthin (zea)), we used a non-parametric multifactorial analysis of variance i.e. PERMANOVA (Anderson, 2001). This first analysis allowed us to specify those factors whose levels had a significant effect on the pigment concentrations. Secondly, we then tested the effect of these parameters separately on every pigment concentration, using a parametric multifactorial ANOVA, after checking the conditions of application of this method (normal distribution, homoscedasticity and independence of residuals). Thirdly, when some effects were significant, ANOVA were completed by Tukey posthoc tests to determine significant differences in pairwise comparisons. When the conditions of application of ANOVA were not satisfied, we first used logarithm transformation of the pigment concentration. When conditions were still not satisfied, non-parametric ANOVA were applied to test the effect of every modification of the protocol on the measured pigment concentrations (Kruskal test and posthoc Kruskalmc, R). This sequence was performed for the analysis of the results obtained both with the protocols of Wright *et al.* (1991) and Hagerthey *et al.* (2006), independently.

Results

Choice of a chromatography method for pigment analysis in coastal lagoons

We selected a method that will allow us to easily compare the chromatograms with those earlier obtained by using the method described by Wright *et al.* (1991), and that does not introduce specific problems in the laboratory. Hence, some methods have been discarded because of the use of very toxic or explosive chemicals as e.g. pyridine (Zapata *et al.*, 2000) and diazomethane (Airs *et al.*, 2001a; de Wit *et al.*, 2012), respectively. All protocols that use a column that differs from

the C18 column, like a C8 column (Barlow *et al.*, 1998; Zapata *et al.*, 2000; Van Heukelem and Thomas, 2001), or employ a very long chromatography (Airs *et al.*, 2001a) were also discarded. We finally selected the protocol described by Hagerthey *et al.* (2006) as it is based on the same chromatographic principles and showed the same elution order for the pigments as the method of Wright *et al.* (1991). However, before selecting a final protocol, we compared the addition of 0.125 mL TBAA solution (in 1 ml of extract prior to analysis) with a simplified extraction protocol without adding ion-pairing agent in the extract.

The performances of both methods, i.e., Wright *et al.* (1991) and Hagerthey *et al.* (2006), were compared using the same pigment mixture from DHI (Fig. 1). Firstly, while the elution order was indeed the same for both methods (Table 4), the number of identified pigments was slightly different. Hence, we did not observe 19'Hex-fucoxanthin and dihydrolutein with the method from Wright *et al.* (1991) (Fig. 1, Table 4). Secondly, the method of Hagerthey *et al.* (2006) showed a better quality of the chromatogram for early-eluting compounds and thus improved the recognition and peak-shape of the most polar pigments (Fig. 1). Thirdly, the method of Hagerthey *et al.* (2006) also showed better results for lutein and zeaxanthin. It particularly increased the resolution ($R_s = 1.34 \pm 0.01$) and selectivity ($\alpha = 1.02 \pm 6.7 \times 10^{-5}$) for these two pigments compared to those obtained by Wright *et al.* (1991), which suffered from partial co-elution of both pigments, showing values of $RS = 1.26 \pm 0.05$ and $\alpha = 1.01 \pm 2.1 \times 10^{-3}$ (p-value = 0.036 and p-value = 0.049 for resolution and selectivity respectively, Wilcoxon test, R). Finally, we observed a significant difference between the measured concentrations of fucoxanthin, alloxanthin, and chl *b*, which were more concentrated with the method of Hagerthey *et al.* (2006)

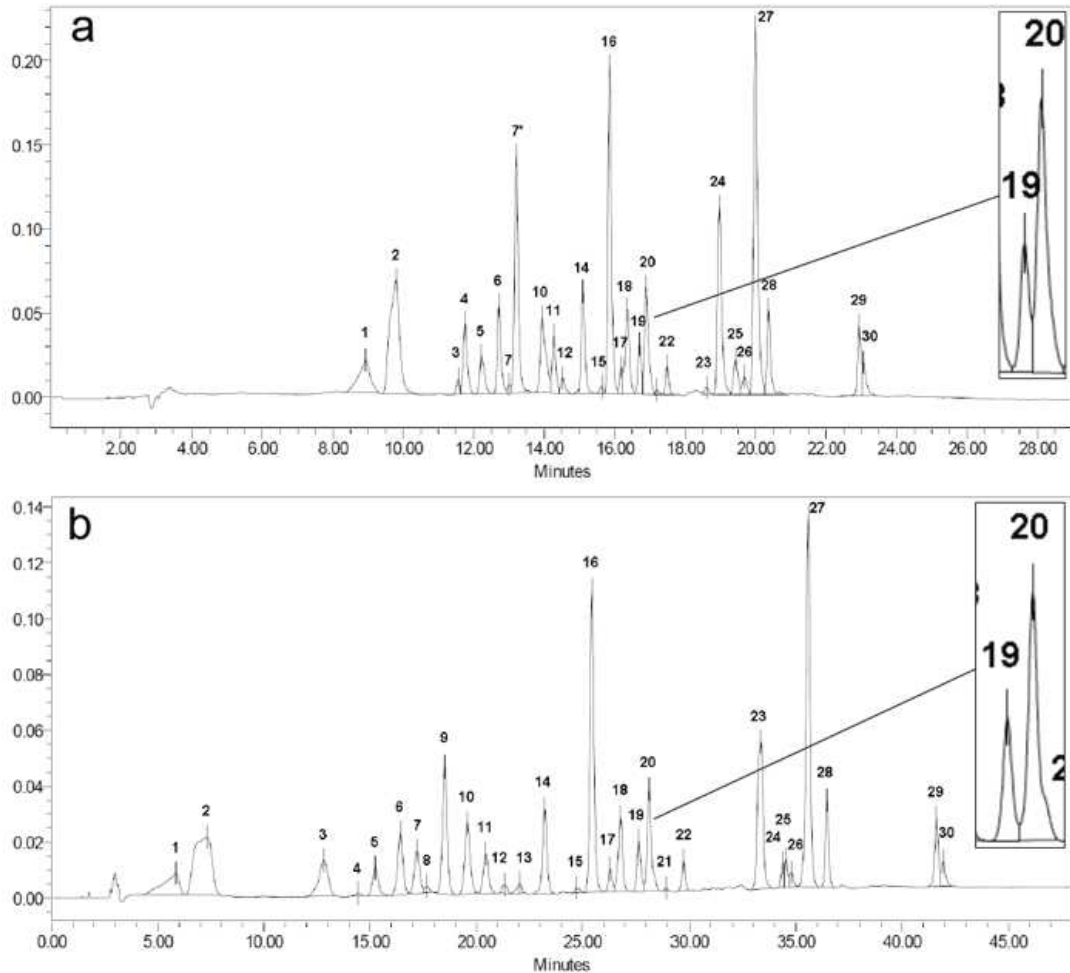


Fig. 1. HPLC chromatogram of a mixed pigment from DHI (DHI reference: mix-112, plant pigment in 90% acetone) analyzed with the Wright *et al.*, 1991 method (a) and the Hagerthey *et al.*, 2006 method (b). Each number corresponds to a pigment, detailed in Table 4.

The peak shape for alpha and beta-carotenes at the end of the chromatogram showed an improvement with the method from Hagerthey *et al.* (2006). Surprisingly, when analyzing the pigment mix, both methods showed co-elution of chl *c*2, Mg-DVP and chlorophyllid a (peak n°2, fig.1 a and b), while in most of our samples we observed a clear separation of these pigments. However, these three compounds also co-eluted with the analysis method from Van Heukeulem

and Thomas (1991) used in the certificate of analysis of this mix. The addition of the TBAA in the solvent A or in the extract prior to injection had no significant effect on the chromatography of most of the pigments (e.g., chl *a*, *b*, peri, zea, Tukey posthoc p-adj. > 0.05), but it showed a clear and significant negative impact on the concentration of other pigments including allo, fuco, lut, neo and prasino (Tukey posthoc p-adj.: allo= 0.044; fuco= 0.0010; lut= 0.0025; neo= 1.18×10^{-5} ,

Table 4. Elution order (peak number) of pigments from the DHI mix (analyzed with two different methods, i.e. Wright *et al.* (1991) and Hagerthey *et al.*, (2006). Retention times (Rt) and wavelengths of the in-line absorption maxima (λ_{max}) for the different pigments according the two methods.

Peak number	Name	Rt Wright	Rt Hagerthey	Hagerthey			Wright		
				Amax1	Amax2	Amax3	Amax1	Amax2	Amax3
1	Chlorophyll <i>c</i> 3	8.933	5.856	453.5	586.1		453.5	583.7	
2	Chlorophyll <i>c</i> 2*	9.796	7.336	445	581.2	632.6	443.8	580	630
3	Peridinin	11.755	12.816	476.5			472.9		
4	Siphonaxanthin		14.415	448.7	471.7				
5	19'But-fucoanthin	12.225	15.246	446.3	471.7		446.3	471.7	
6	Fucoanthin	12.715	16.425	448.7	467.9		448.7	469.6	
7	Cis-Neoxanthin	13.016	17.207	413.6	439	466.8	417.6	442.6	471.7
8	Trans-Neoxanthin		17.677	444.3	470.5				
9	19'Hex-fucoanthin	n.d.	18.519	446.3	472.9				
10	Prasinolanthin	13.943	19.578	455.9			453.5		
11	Violaxanthin	14.276	20.453	417.7	441.4	470.5	418	442.6	471.7
12	Unknown		21.313	439	463.2				
13	Unknown	14.522	22.045	421	442.6	471.7	421	442.6	471.7
14	Diadinoxanthin	15.104	23.224	425	448.7	479	426	448.7	479
15	Dinoxanthin	15.627	24.723	418.5	442.6	471.7	421	446.5	472.9
16	Alloxanthin	15.857	25.450	430.5	454.7	483.8	432	454.7	483.8
17	Monadoxanthin	16.193	26.311	426.4	447.5	477.8	427	448.7	477.8
18	Diatoxanthin	16.367	26.799	429.3	454.7	481.4		453.5	481.4
19	Lutein	16.708	27.655	425.7	448.7	475.3	425	447.5	476.5
20	Zeaxanthin	16.893	28.139	454.7	481.4	481.4	454.7	481.4	481.4
21	Dihydrolutein	n.d.	28.937	406.1	429.3	455.3	405.4	428.7	455.7
22	Canthaxanthin	17.491	29.714	475.3			477.8		
23	Chlorophyll <i>b</i>	18.612	33.360	466.8	650.9		460.8	649.8	
24	Chlorophyll <i>b</i>	18.975	34.394	458.4	646		464.4	650.9	
25	Chlorophyll <i>b</i>	19.443	34.525	466.8	650.9		464.4	650.9	
26	Chlorophyll <i>a</i>	19.680	34.782	430.5	660.7		429.3	660.7	
27	Chlorophyll <i>a</i>	19.994	35.584	431.7	660.7		431.7	660.7	
28	Chlorophyll <i>a</i>	20.372	36.467	431.7	660.7		431.7	660.7	
29	β - ϵ Caroten (α)	22.936	41.627	449.9	477.8		448.7	476.5	
30	β - β Caroten (β)	23.052	41.937	455.9	480.2		452.3	477.8	

* coelutes with Mg-DVP and Chlorophyllid *a*

Table 5. Statistics of mean comparison results under two hypotheses: (A) concentrations obtained with the two methods are equal; (B) concentration obtained with the new method is higher than those from the method from Wright *et al.* (1991). Student test on R were used after checking normality and homoscedasticity. Mean comparison of the number of identified pigments has been assessed with non-parametric Wilcoxon test. Stars precise significativity of P-value (*P-value < 0.01, **P-value < 0.001)

Pigments	HP	<i>t</i>	P-value
Alloxanthin	A	-9.13	0.010*
	B	9.13	0.005*
Chl <i>a</i>	A	0.70	0.554
Chl <i>b</i>	A	-9.53	6.757 x 10 ⁻⁴ **
	B	9.53	3.378 x 10 ⁻⁴ **
Fucoxanthin	A	-36.62	7.418 x 10 ⁻⁴ **
	B	36.62	3.709 x 10 ⁻⁴ **
Lutein	A	1.11	0.379
Peridinin	A	1.99	0.184
Zeaxanthin	A	-0.65	0.552
N° identified pigments	A	W = 5.5	0.814

prasino = 0.045).

Concerning the use of the protocol of Hagerthey *et al.* (2006) some problems occurred with the first samples from each injection series. We suspected this to be related to insufficient pre-conditioning and/or equilibration of the chromatography (conditioning of the column 48 min, followed by the following steps (i) equilibrate 5 min, (ii) purge of the injector 10 min, and (iii) 5 min equilibrate, before the first injection). Thus, the first sample showed some irregularities of retention time and its baseline, causing some problems of pigments identification. Therefore, we adapted the protocol, by adding in the beginning of the run the injection of 150 µl of a blank sample

and eluting during 10 min, using the solvent gradient that corresponded to the first 10 min of the solvent profile, until 100% of solvent B (Table 3). This additional step solved the problems mentioned above and thus contributed to optimize the equilibration of the column prior to analysis. With this modification the method of Hagerthey *et al.* (2006) was adopted by us for further analyses.

Choice of an extraction protocol

Preliminary tests followed by chromatographic separation according Wright *et al.* (1991) had shown that a reduction of the extraction volume to 2 ml resulted in a

severe decrease of pigment extraction yield, and this lowest extraction volume was, therefore, abandoned in our tests. After the choice of the method by Hagerthey *et al.* (2006), we tested which changes with respect to the extraction protocol initially used, improved the pigment quantification with this chromatography method. On some of the pigments, including those that were the most important for our analysis and which concentrations were measured (Table 6), we observed a significant effect of the extraction solvent, extraction volume and extraction time (PERMANOVA, p-value < 0.05). There was a significant interaction between the extraction solvent and the volume (Table 7). All the other couples of tested factors showed no significant interaction terms for this pool of calculated pigment concentrations, so they were not studied further.

Table 6 shows the results of multifactorial ANOVA's and non-parametric tests (for those cases where conditions for parametric ANOVA were not fulfilled) for the different pigments. Firstly, the use of 5 ml of solvent significantly increased the mass of most of the extracted pigments compared to use of 2.5 mL (pairwise comparison of Tukey posthoc on ANOVA results, p-adj. < 0.05) (Fig. 2). Secondly, the solvent 2 resulted in a significant increase of the extracted pigment mass, except for alloxanthin, fucoxanthin and lutein for which we did not observe significant differences between the 4 solvents (pairwise comparison of Tukey posthoc p-adj. > 0.05). Extraction using acetone (solvent 4) had a negative impact on the quality of the chromatography, as it did not allow the separation of the polar pigments peak at the beginning of the analysis (chlorophyll c3, c2, chlorophyllid a) and created distortions of the baseline and peaks. Thirdly, between the simplified method (10 min of extraction, without ion-pairing agent in the extract), and the complete one, we observed some significant differences. For allo, chl a,

b, and prasino, the complete protocol showed slightly higher values compared to the simplified one that were significant (pairwise comparison of Tukey posthoc on ANOVA results, p-adj.: allo = 0.04; chl a = 4.6×10^{-3} ; chl b = 3.5×10^{-4} ; pras = 1.37×10^{-5}). In contrast, for lutein we observed the opposite (p-adj. = 1.35×10^{-2}), while fuco, peri and zea showed no significant difference between the two protocols (p-adj. > 0.05). The yield of chl a and b increased when the volume of solvents increased from 2.5 to 5 mL, with the solvent 2 and with 2 h extraction. Chl b showed a lower yield with solvent 3 compared to the solvent 2 (pairwise comparison of Tukey Posthoc, p-adj. < 0.05). The measured peridinin concentration increased significantly with the use of the solvents 2 and 3 (pairwise comparison of Tukey Posthoc, p-adj. < 0.05). However, Fig. 2 (a) shows that solvent 2 seems to extract significantly more with 5 ml than solvents 1 and 3. Thus, we observed a synergy between these two factors, with the highest pigment yields observed with 5 ml of solvent 2 (pairwise comparison of Tukey posthoc, p-adj. < 0.05). Globally, the solvent 4 differed from the others by a higher variability of pigment concentrations between replicates. The other pigments have not fulfilled the conditions of validity for the multifactorial ANOVA. To conclude, the solvent that allowed the highest extraction yields (most of pigments significantly most extracted) was the second one (methanol/acetone/ water). The best volume of solvent seems to be 5 ml.

We also tested which changes of the extraction protocol improved the pigment quantification with the protocol of chromatography from Wright *et al.* (1991), which is still widely used by the scientific community for phytoplankton chemotaxonomic studies and recommended SCOR Working group 78 (Jeffrey *et al.*, 1997). We followed a similar procedure. First, collectively the data set

Table 6. Pigment extraction yields analyzed by using the HPLC protocol of Hagerthey *et al.* (2006): Results of the multifactorial ANOVA, and non-parametric tests (for those cases where conditions for parametric ANOVA were not fulfilled), comparing yields of chlorophyll *a*, *b*, alloxanthin, fucoxanthin, lutein, peridinin, prasinoxanthin and zeaxanthin, obtained with four different solvents (90% acetone, methanol, methanol/acetone, and MAD), with two different volumes, two different solvents A, and with the classical method of extraction or an adaptation. The star (*) indicates which pigment needed a log-transformation.

	Chl <i>a</i>	Chl <i>b</i>	Allo*	Fuco*	Lut	Pert	Prasino	Zea																
Source	df	F-ratio	P-value	df	F-ratio	P-value	df	F-ratio	P-value	df	F-ratio	P-value												
Volume	1	50.19	6.8×10^{-9}	1	40.84	8.2×10^{-8}	1	19.82	5.4×10^{-5}	1	4.63	3.7×10^{-2}	1	0.32	5.8×10^{-1}	1	3.53	6.7×10^{-2}	1	5.42	4.2×10^{-2}			
Solvent	3	4.76	5.6×10^{-3}	3	5.97	1.6×10^{-3}	1	2.00	1.3×10^{-1}	3	1.89	1.4×10^{-1}	3	3.04	4.0×10^{-2}	3	6.62	8.7×10^{-4}	3	0.84	4.8×10^{-1}	3	0.82	5.1×10^{-1}
Classic / simplifie	1	12.22	1.1×10^{-3}	1	20.82	3.9×10^{-5}	1	6.12	1.7×10^{-2}	1	4.11	4.9×10^{-2}	1	34.53	6.5×10^{-7}	1	0.17	6.8×10^{-1}	1	32.15	1.2×10^{-6}	1	0.69	4.2×10^{-1}
Solv. A + TBAA	1	14.61	3.9×10^{-4}	1	4.56	3.8×10^{-2}	3	1.57	2.2×10^{-1}	1	6.11	1.7×10^{-2}	1	26.41	7.2×10^{-6}	1	1.64	2.1×10^{-1}	1	28.86	3.2×10^{-6}	1	0.05	8.3×10^{-1}
Interactions																								
V x solv.	3	4.25	9.8×10^{-3}	3	2.50	7.2×10^{-2}	3	2.41	7.9×10^{-2}	3	2.12	1.1×10^{-1}	3	3.13	3.6×10^{-2}	3	0.03	9.9×10^{-1}	3	1.00	4.0×10^{-1}	2	0.65	5.4×10^{-1}
V x solv. A	1	2.75	1.0×10^{-1}	1	1.26	2.7×10^{-1}	1	3.34	7.4×10^{-2}	1	1.83	1.8×10^{-1}	1	9.63	3.5×10^{-3}	1	0.67	4.2×10^{-1}	1	0.08	7.8×10^{-1}	1	0.28	6.1×10^{-1}
V x c/s	1	0.12	7.3×10^{-1}	1	7.71	8.0×10^{-3}	1	8.24	6.2×10^{-3}	1	0.04	8.3×10^{-1}	1	4.76	3.5×10^{-2}	1	0.36	5.5×10^{-1}	1	7.62	8.5×10^{-3}	1	0.63	4.5×10^{-1}
Solv. x solv. A	3	1.46	2.4×10^{-1}	3	1.51	2.2×10^{-1}	3	0.37	7.7×10^{-1}	3	0.74	5.3×10^{-1}	3	0.18	9.1×10^{-1}	3	0.26	8.5×10^{-1}	3	1.09	3.6×10^{-1}			
Solvent x c/s	3	0.27	8.5×10^{-1}	3	0.79	5.1×10^{-1}	3	0.49	6.9×10^{-1}	3	0.21	8.9×10^{-1}	3	3.66	2.0×10^{-2}	3	0.76	5.2×10^{-1}	3	1.72	1.8×10^{-1}			
*	Log-transformation																							

Table 7. Pigment extraction yields analyzed by using the HPLC protocol of Hagerthey *et al.* (2006): Results of the PERMANOVA with 999 permutations comparing the pigments concentrations yields (chlorophyll *a*, *b*, alloxanthin, fucoxanthin, lutein, peridinin, prasinoxanthin, zeaxanthin), for the five factors of the factorial experiment (see method). Signification codes: 0 ‘***’ 0.001 ‘**’ 0.01 ‘*’.

Fact. Number	Factors	df	F ratio	p-value
1	Extraction volume	1	37.510	0.001 **
2	Composition of the extraction solvent	3	4.94	0.001 **
3	TBAA addition in extraction solvent	1	16.864	0.001 **
4	Extraction time	1	16.710	0.001 **
5	Solvent A with TBAA	1	2.720	0.063
Interactions				
1 x 2	Extraction volume x Extraction solvent	3	2.580	0.030 *
1 x 4	Extraction volume x Time	1	0.760	0.465
1 x 5	Extraction volume x Solvent A	1	1.720	0.142
2 x 4	Extraction solvent x Time	3	0.840	0.519
2 x 5	Extraction solvent x Solvent A	3	0.760	0.589

was analyzed by PERMANOVA (Table 8) and the significant factors (the extraction solvent, it's volume and the addition of ion pairing reagent, PERMANOVA, p-value < 0.05) were further analyzed. Therefore, we used parametric and multifactorial ANOVA applied on each pigment concentration, when the conditions of application of ANOVA were fulfilled. Otherwise, non-parametric tests were chosen. As observed when analyzed in combination with the protocol by Hagerthey *et al.* (2006), the addition of the ion-pairing agent (Tetrabutyl ammonium acetate) in the solvent A had a negative impact on a large number of pigments (PERMANOVA p-value < 0.05; chlorophyll *c*2, fucoxanthin, lutein, neoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin, ANOVA, p-values < 0.05). The extraction solvent had a clear significant impact (PERMANOVA, p-value < 0.01) as extraction volume (PERMANOVA, p-value <

0.001). As observed for pigment extractions in combination with the HPLC-protocol of Hagerthey *et al.* (2006), we observed that the two solvents allowing the highest extraction yields were solvent 2, a mix of methanol/ acetone / water (45:45:10), and the solvent 3, a mix of methanol/ acetone/ dimethylformamide / water (30:30:30:10). Again, 5 ml extraction solvent often resulted in higher extraction yields than using 2 ml or 2.5 ml (all pigments except chlorophyll *b* and prasinoxanthin).

Discussion

For the purpose of our analyses of the phytoplankton community composition, we need to detect and identify most efficiently the pigments which are markers of phytoplankton groups, i.e., alloxanthin for Cryptophytes, fucoxanthin for fucoxanthin-rich diatoms, peridinin for Dinophytes (Bustillos-

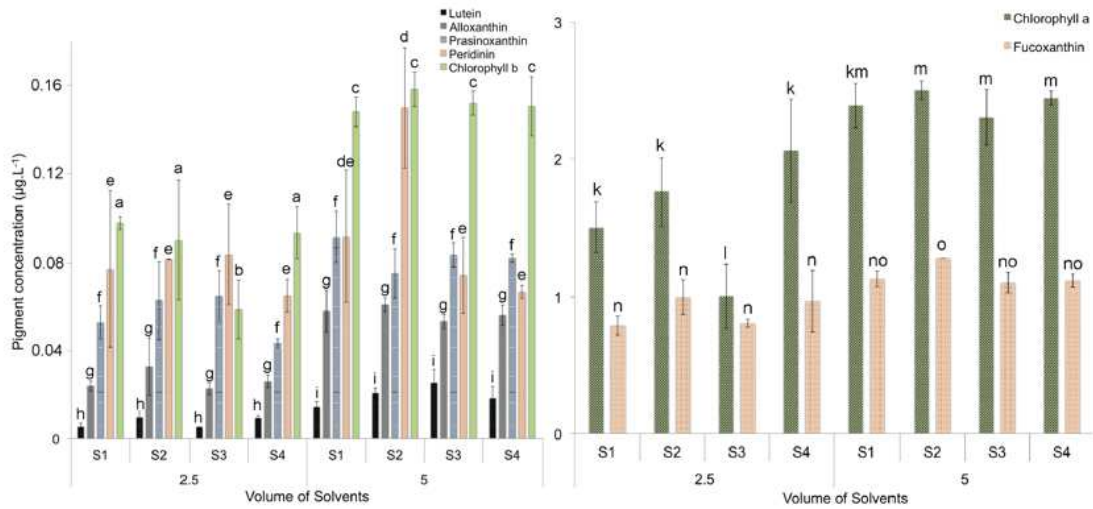


Fig. 2. Pigment yield with the four solvents (see Table 1) and their two different volumes for (a) lutein, alloxanthin, prasinoxanthin, peridinin, chlorophyll *b*, (b) chlorophyll *a* and fucoxanthin. For each pigment, the significant differences between groups are illustrated with letters (a to c for chlorophyll *b*, d to e for peridinin, f for prasinoxanthin, g for alloxanthin, h to i for lutein, k to m for chlorophyll *a*, and n to o for fucoxanthin).

Table 8. Pigment extraction yields analyzed by using the HPLC protocol of Wright *et al.* (1991). Results of the PERMANOVA with 999 permutations comparing the pigments concentrations yields (chlorophyll *a*, *b*, *c*2, alloxanthin, diadinoxanthin, fucoxanthin, 19’Hex-fucoxanthin, lutein, neoxanthin, peridinin, prasinoxanthin, violaxanthin, zeaxanthin, for the four factors of the factorial experiment (see method). Stars precise significativity of P-value (*P-value < 0.05, **P-value < 0.005).

Fact. Number	Factors	df	F ratio	p-value
1	Extraction volume	1	107.820	0.001 ***
2	Composition of the Extraction solvent	1	5.568	0.004 **
3	TBAA addition in the extraction solvent	1	4.518	0.011 *
4	Extraction time	1	2.698	0.055
2 x 1	Extraction solvent x Extraction volume	1	2.133	0.112
2 x 4	Solvent x Extraction time	1	2.493	0.060
1 x 4	Extraction volume x Time	1	1.187	0.283
4 x 3	Extraction time x TBAA	1	6.631	0.002 **
1 x 3	Extraction volume x TBAA	1	1.827	0.128

Guzmán *et al.*, 2004), prasinoxanthin for Prasinophytes, neoxanthin, lutein, violaxanthin, chlorophyll *b* for Green algae, zeaxanthin for Cyanobacteria and Chlorophytes, echinenone for Cyanobacteria (Wright *et al.*, 1991; Schlüter *et al.*, 2006; Cartaxana *et al.*, 2009), 19'-But-Fucoxanthin and 19'-Hex-Fucoxanthin for Haptophytes (Zapata *et al.*, 2000; Goericke, 2002).

While the two methods of chromatography we tested showed little differences in the number of identified pigments, some supplementary pigments seem to be more efficiently observed with the protocol from Hagerthey *et al.* (2006), as 19'Hex-fucoxanthin and dihydrolutein. Globally, thanks to the longer analysis time (48 minutes instead of 29 (Table 2 and 3)), which helped to spread peaks along the gradient, the chromatograms obtained with this method visually show a better peak shape and separation than in the chromatograms obtained with Wright *et al.* (1991). This is especially the case for the early eluting most polar compounds as well as for the final eluting hydrophobic compounds. More particularly, the selectivity and the resolution of the lutein and the zeaxanthin showed better results with the protocol from Hagerthey *et al.* (2006). These two pigments need to be separated as best as possible because they can be used as markers of different phytoplankton groups (Chlorophytes versus Cyanobacteria). Finally, the longer protocol of Hagerthey *et al.* (2006) helped to improve the peak shapes for fucoxanthin, alloxanthin, and chl *b* that facilitated better quantification of their concentrations. With the modifications that we adopted to improve the equilibration prior to analysis, the protocol of Hagerthey *et al.* (2006) has yielded satisfactory results for the pigments usually used to estimate phytoplankton diversity in coastal lagoons. We tested different extraction protocols, to take the characteristics of our samples and their variations during the monitoring period

into account. Indeed, we had to consider a strong variability of pigment concentration, from low (< 0.05 µg/L) to very high values (412.6 µg/L). We first tried to increase the extraction time, because after sonication we extracted only during 15 min, while bibliography showed much longer extraction times, ranging from 1 h - 3 h (Louda, 2008; Vidussi *et al.*, 2011) to 24 h (Schlüter *et al.*, 2000). Thus after sonication, we compared an extraction time of 15 min with that of 1 h and 2 h. The extraction yield of the pigments in the sample from Thau lagoon was clearly improved by the use of extraction solvents 2 and 3 that both comprised a mixture of methanol, acetone and water, with or without N-N-dimethylformamide which showed the better results when coupled with a high-powered probe sonicator (Furuya *et al.*, 1998; Wright, 2005), unlike the use of pure or diluted acetone or methanol preconized in many references of phytoplankton chemotaxonomic analysis (Wright *et al.*, 1991; Goericke and Repeta, 1993; Schlüter *et al.*, 2000; Zapata *et al.*, 2000; Airs *et al.*, 2001a, 2001b; Van Heukelem and Thomas, 2001; Hooker *et al.*, 2009; Seoane *et al.*, 2011; Eker-Develi *et al.*, 2012). The solvent with dimethylformamide added seems to be a very efficient extraction solvent, and it does not need a too long extraction time, since Hagerthey and his colleagues (2006) showed that more than 98% of the chl *a* content was extracted after 2 hours. Moreover, dimethylformamide has been shown to decrease the degradation of chlorophyll *a* during the extraction (Furuya *et al.*, 1998). We also observed an improvement of the number of identified pigments with 5 ml. There was a synergetic effect between the factors 1 and 2 (extraction volume and composition of the solvent), resulting in the highest pigment yields with 5 ml of the solvent 2. Using a higher extraction volume results in proportionally lower concentrations in the pigment extract. With the same injection volume this results

in proportionally lower pigment masses injected on the column resulting in lower peak areas for all pigments, which may be a drawback. However, this drawback is largely compensated by the fact that some of the pigments were only detected on the HPLC when we used 5 ml extraction volume. Hence, the extraction with 5 ml of solvent 2 (Table 1), allowed the detection of alpha and beta carotenoids, and peaks shape enhancement, with the typical three peak carotenoid absorption spectra (Wright, 2005). The filter contains a small but unknown amount of water. A larger volume of extraction solvent is useful to dilute this small amount, which minimizes the proportion of water in the sample extract, and thus the dilution effects (Latasa, 2014).

The protocol initially used for the Lagoon Monitoring Network was a 5 min extraction in 2.5 ml of methanol in obscurity at 4°C, followed by 5 sonications, by immersing the tip of a sonic probe below the surface of the liquid 10 sec (20 Watts), each followed by 10 sec of storage on ice to avoid excessive heating of the extract. The increase of the extraction time, initially about 10 minutes, to at least one hour (we observed a decrease of the prasinoxanthin content after two hours of extraction time) enhances the extraction efficiency too. The length of extraction time is an important factor to define, because it impacts the diversity of pigments identified and their concentration, that increase with the optimum extraction time (Hagerthey *et al.*, 2006). But they may also decrease if the extraction time is too long, because of the formation of degradation products, depending on the composition of the extraction solvent (Latasa *et al.*, 2001). We decided that extracting 1 h was a good compromise between a better extraction of many pigments and a reasonable time-frame for the analyses.

The addition of the TBAA in the extract before the injection did not improve the separation,

the peak shape, or their resolution. Moreover, the use of solid TBAA from Aldrich as ion-pairing agent in the mobile phase have already resulted in some problems, like unstable retention times, pressure increase in the column, or suboptimal pigment separation (Hooker *et al.*, 2009). Therefore, we decided to totally abandon the use of TBAA as other researchers have already adopted (Wright *et al.*, 1991; Van Heukelem and Thomas, 2001). To conclude, the best extraction was obtained with 5 ml of methanol/ acetone/ water (45:45:10), and 1 h duration. This extraction allows a good compromise between the number of identified pigment of interest, their concentration, and a good quality of the chromatogram, without complicating or excessively increasing the time needed for these analyses. The best analysis method for our pool of pigment was the one proposed by Hagerthey and his colleagues (2006), without adding ion-pairing reagent before injection, which allow a better concentration measurement of several pigments, and a better separation of lutein/zeaxanthin, and chlorophyll *c3/c2* couples. This method still does not chromatographically separate chlorophylls *a* and *b* from their divinyls forms. A specific method for separating these compounds has been proposed, using a C8 column (Barlow *et al.*, 1998). However, the presence of prochlorophytes has never been demonstrated in European coastal lagoons, so we do not consider this failure as problematic for a routine analysis of phytoplankton diversity in these ecosystems. We conclude that we have now an efficient protocol that is appropriate for performing large-scale surveys of photosynthetic lipophilic pigments in coastal lagoons. In the near future, when these pigment data can be confronted with microscopic observations of micro- and nanophytoplankton, and flow cytometry for picophytoplankton, particularly abundant in coastal lagoons, we will have the possibility to apply the CHEMTAX program (Mackey *et*

al., 1996). For efficient data interpretation CHEMTAX still needs to be calibrated specifically for coastal lagoons.

Acknowledgements

We would like to thank J. William Louda for his sustained correspondence he had with us during the various attempts to improve our protocol of chemotaxonomic analysis for his valuable tips and informations. We also thank Simon Wright for all his precisions about the CHEMTAX software, we'll be sure to test when we will have gathered all the necessary data (particularly on microscopy observations). Thanks also to Francesca Vidussi for her help concerning HPLC comprehension. To finish, thank to Mikel Latasa for sharing publications with me.

References

- Airs RL, Atkinson JE, Keely BJ 2001a. Development and application of a high resolution liquid chromatographic method for the analysis of complex pigment distributions. *Journal of Chromatography A* 917: 167–177.
- Airs RL, Borrego CM, Garcia-Gil J, Keely BJ 2001b. Identification of the bacteriochlorophyll homologues of Chlorobium phaeobacteroides strain UdG6053 grown at low light intensity. *Photosynthesis Research* 70: 221–230.
- Anderson MJ 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecology* 26: 32–46.
- Barlow RG, Cummings DG, Gibb SW 1998. Improved resolution of mono- and divinyl chlorophylls a and b and zeaxanthin and lutein in phytoplankton extracts using reverse phase C-8 HPLC. *Marine Ecology Progress Series* 161:303-307.
- Barocio-Leon OA, Millan-Nunez R, Santamaria-Del-Angel E, Gonzalez-Silvera A, Trees CC 2006. Spatial variability of phytoplankton absorption coefficients and pigments off Baja California during November 2002. *Journal of Oceanography* 62: 873–885.
- Bec B, Husseini-Ratrema J, Collos Y, Souchu P, Vaquer A 2005. Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *Journal of Plankton Research* 27: 881–894.
- Bec B, Collos Y, Souchu P, Vaquer A, Lautier J, Fiandrino A, Benau L, Orsoni V, Laugier T 2011. Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquatic Microbial Ecology* 63: 29–45.
- Breton E, Brunet C, Sautour B, Brylinski JM 2000. Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *Journal of Plankton Research* 22: 1423–1440.
- Bricker S, Ferreira J, Simas T 2003. An integrated methodology for assessment of estuarine trophic status. *Ecological Modelling* 169: 39–60.
- Bustillos-Guzmán J, Gárate-Lizárraga I, López-Cortés D, Hernández-Sandoval F 2004. The use of pigment “fingerprints” in the study of harmful algal blooms. *Revista de Biología Tropical* 52 Suppl 1: 17–26.
- Campbell PE, Phil M, Janette AM, Webber MK, Webber DF 2008. Planktonic communities as indicators of water quality in mangrove lagoons; a Jamaican case study. *Transitional Waters Bulletin* 2: 39–63.

- Carlier A, Riera P, Amouroux JM, Bodiou JY, Desmalades M, Gremare A 2008. Food web structure of two Mediterranean lagoons under varying degree of eutrophication. *Journal of Sea Research* 60: 287–298.
- Carreto JI, Montoya N, Akselman R, Carignan MO, Silva RI, Cucchi Colleoni DA 2008. Algal pigment patterns and phytoplankton assemblages in different water masses of the Rio de la Plata maritime front. *Continental Shelf Research* 28: 1589–1606.
- Cartaxana P, Mendes CR, Brotas V 2009. Phytoplankton and ecological assessment of brackish and freshwater coastal lagoons in the Algarve, Portugal. *Lakes & Reservoirs Research and Management* 14: 221–230.
- Cloern JE 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Marine Ecology Progress Series* 210: 223–253.
- Cloern JE, Jassby AD 2008. Complex seasonal patterns of primary producers at the land-sea interface. *Ecology Letters* 11: 1294–1303.
- Coelho S, Gamito S, Perez-Ruzafa A 2007. Trophic state of Foz de Almargem coastal lagoon (Algarve, South Portugal) based on the water quality and the phytoplankton community. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 71: 218–231.
- Descy JP, Higgins HW, Mackey DJ, Hurley JP, Frost TM 2000. Pigment ratios and phytoplankton assessment in northern Wisconsin lakes. *Journal of Phycology* 36: 274–286.
- Devlin M, Best M, Coates D, Bresnan E, O’Boyle S, Park R, Silke J, Cusack C, Skeats J 2007. Establishing boundary classes for the classification of UK marine waters using phytoplankton communities. *Marine Pollution Bulletin* 55: 91–103.
- De Wit R, Troussellier M, Courties C, Buffan-Dubau E, Lemaire E 2012. Short-term interactions between phytoplankton and intertidal seagrass vegetation in a coastal lagoon (Bassin d’Arcachon, SW France). *Hydrobiologia* 699: 55–68.
- Duarte CM, Cebrian J 1996. The fate of marine autotrophic production. *Limnology and Oceanography* 41: 1758–1766.
- Eker-Develi E, Berthon JF, Canuti E, Slabakova N, Moncheva S, Shtereva G, Dzhurova B 2012. Phytoplankton taxonomy based on CHEMTAX and microscopy in the northwestern Black Sea. *Journal of Marine Systems* 94: 18–32.
- Furuya K, Hayashi M, Yabushita Y 1998. HPLC determination of phytoplankton pigments using N,N-dimethylformamide. *Journal of Oceanography* 54: 199–203.
- Garrido JL, Zapata M 1996. Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of algal chlorophylls. *Journal of Chromatography A* 738: 285–289.
- Goericke R 2002. Top-down control of phytoplankton biomass and community structure in the monsoonal Arabian Sea. *Limnology and Oceanography* 47: 1307–1323.
- Goericke R, Repeta D 1993. Chlorophyll-a and Chlorophyll-b and Divinyl Chlorophyll-a and Chlorophyll-b in the Open Subtropical North-Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 101: 307–313.
- Grami B, Niquil N, Sakka Hlaili A, Gosselin M, Hamel D, Hadj Mabrouk H 2008. The plankton food web of the Bizerte Lagoon (South-western Mediterranean): II. Carbon steady-state modelling using inverse analysis.

- Estuarine Coastal and Shelf Science* 79: 101–113.
- Greisberger S, Teubner K 2007. Does pigment composition reflect phytoplankton community structure in differing temperature and light conditions in a deep alpine lake? An approach using HPLC and delayed fluorescence techniques. *Journal of Phycology* 43: 1108–1119.
- Hagerthey SE, Louda JW, Mongkronsri P 2006. Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton Chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment. *Journal of Phycology* 42: 1125–1136.
- Heil CA, Revilla M, Glibert PM, Murasko S 2007. Nutrient quality drives differential phytoplankton community composition on the southwest Florida shelf. *Limnology and Oceanography* 52: 1067–1078.
- Hooker SB, Van Heukelem L, Thomas CS, Claustre H, Ras J, Schlüter L, Clementson L, vanderLinde D, Eker-Develi E, Berthon JF, Barlow R, Sessions H, Ismail H, Perl J 2009. The Third SeaWiFS HPLC Analysis Round-Robin Experiment (SeaHARRE-3). *NASA Technical document*.
- Jeffrey SW, Mantoura RFC, Wright SW, International Council of Scientific Unions, Scientific Committee on Oceanic Research, and Unesco 1997. Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods. *UNESCO Publishing*, Paris.
- Latasa M 2014. A simple method to increase sensitivity for RP-HPLC phytoplankton pigment analysis. *Limnology and Oceanography: Methods* 12: 46–53.
- Latasa M, van Lenning K, Garrido JL, Scharek R, Estrada M, Rodriguez F, Zapata M 2001. Losses of chlorophylls and carotenoids in aqueous acetone and methanol extracts prepared for RPHPLC analysis of pigments. *Chromatographia* 53: 385–391.
- Lohrenz SE, Carroll CL, Weidemann AD, Tuel M 2003. Variations in phytoplankton pigments, size structure and community composition related to wind forcing and water mass properties on the North Carolina inner shelf. *Continental Shelf Research* 23: 1447–1464.
- Louda JW 2008. HPLC-based chemotaxonomy of Florida Bay phytoplankton: Difficulties in coastal environments. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31: 295–323.
- Louda JW, Loitz JW, Rudnick DT, Baker EW 2000. Early diagenetic alteration of chlorophyll-a and bacteriochlorophyll-a in a contemporaneous marl ecosystem; *Florida Bay*. *Organic Geochemistry* 31: 1561–1580.
- Mackey MD, Mackey DJ, Higgins HW, Wright SW 1996. CHEMTAX - A program for estimating class abundances from chemical markers: Application to HPLC measurements of phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 144: 265–283.
- Mantoura RF, Repeta DJ 1997. Calibration methods for HPLC. In Jeffrey SW, Mantoura, RFC, Wright SW (eds.) *Phytoplankton pigments in oceanography: Guidelines to modern methods*. pp. 407–428.
- Mantoura R, Llewellyn C 1983. The Rapid-Determination of Algal Chlorophyll and Carotenoid-Pigments and Their Breakdown Products in Natural-Waters by Reverse-Phase High-Performance Liquid-Chromatography. *Analytica Chimica Acta* 151: 297–314.
- McQuatters-Gollop A 2008. Phytoplankton

- as indicators for eutrophication in Europe's regional seas. Ph.D. Thesis, University of Plymouth, United Kingdom, unpublished.
- Metaxatos A, Ignatiades L 2002. Seasonality of Algal Pigments in the Sea Water and Interstitial Water/Sediment System of an Eastern Mediterranean Coastal Area. *Estuarine Coastal and Shelf Science* 55: 415–426.
- Pace ML, Cole JJ, Carpenter SR, Kitchell JF 1999. Trophic cascades revealed in diverse ecosystems. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 483–488.
- Paerl HW, Dyble J, Twomey L, Pinckney JL, Nelson J, Kerkhof L 2002. Characterizing man-made and natural modifications of microbial diversity and activity in coastal ecosystems. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 81: 487–507.
- Paerl HW, Valdes LM, Pinckney JL, Pehler MF, Dyble J, Moisaner PH 2003. Phytoplankton Photopigments as Indicators of Estuarine and Coastal Eutrophication. *BioScience* 53: 953–964.
- Paerl HW, Valdes-Weaver LM, Joyner AR, Winkelmann V 2007. Phytoplankton indicators of ecological change in the eutrophying Palmico sound system, North Carolina. *Ecological Applications* 17: S88–S101.
- Paerl HW, Rossignol KL, Hall NS, Peierls BL, Wetz MS 2010. Phytoplankton Community Indicators of Short- and Long-term Ecological Change in the Anthropogenically and Climatically Impacted Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Estuaries and Coasts* 33: 485–497.
- Palfy K, Presing M, Voerles L 2013. Diversity patterns of trait-based phytoplankton functional groups in two basins of a large, shallow lake (Lake Balaton, Hungary) with different trophic state. *Aquatic Ecology* 47: 195–210.
- Ptacnik R, Solimini AG, Andersen T, Tamminen T, Brettum P, Lepisto L, Willen E, Rekolainen S 2008. Diversity predicts stability and resource use efficiency in natural phytoplankton communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105: 5134–5138.
- R Core Team 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Rodriguez F, Pazos Y, Maneiro J, Zapata M 2003. Temporal variation in phytoplankton assemblages and pigment composition at a fixed station of the Ria of Pontevedra (NW Spain). *Estuarine Coastal and Shelf Science* 58: 499–515.
- Roy S, Llewellyn CA, Egeland ES 2011. Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography. *Cambridge University Press*, United Kingdom.
- Schlüter L, Mohlenberg F, Havskum H, Larsen S 2000. The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Marine Ecology Progress Series* 192: 49–63.
- Schlüter L, Lauridsen TL, Krogh G, Jørgensen T 2006. Identification and quantification of phytoplankton groups in lakes using new pigment ratios – a comparison between pigment analysis by HPLC and microscopy. *Freshwater Biology* 51: 1474–1485.

Seoane S, Garmendia M, Revilla M, Borja A, Franco J, Orive E, Valencia V 2011. Phytoplankton pigments and epifluorescence microscopy as tools for ecological status assessment in coastal and estuarine waters, within the Water Framework Directive. *Marine Pollution Bulletin* 62: 1484–1497.

Souchu P, Bec B, Smith VH, Laugier T, Fiandrino A, Benau L, Orsoni V, Collos Y, Vaquer A 2010. Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67: 743–753.

Van Heukelem L, Thomas CS 2001. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A* 910: 31–49.

Viaroli P, Bartoli M, Giordani G, Naldi M, Orfanidis S, Zaldivar JM 2008. Community shifts, alternative stable states, biogeochemical controls and feedbacks in eutrophic coastal lagoons: a brief overview. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 18: S105–S117.

Vidussi F, Mostajir B, Fouilland E, Le Floc'h E, Nouguier J, Roques C, Got P, Thibault-Botha D, Bouvier T, Troussellier M 2011. Effects of experimental warming and increased ultraviolet B radiation on the Mediterranean plankton food web. *Limnology and Oceanography* 56: 206–218.

Vilicic D, Terzic S, Ahel M, Buric Z, Jasprica N, Caric M, Mihalic KC, Olujić G 2008. Phytoplankton abundance and pigment biomarkers in the oligotrophic, eastern Adriatic estuary. *Environmental Monitoring*

Assessment 142: 199–218.

Wright S, Jeffrey S, Mantoura R, Llewellyn C, Bjornland T, Repeta D, Welschmeyer N 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Marine Ecology Progress Series* 77: 183–196.

Wright S 2005. Analysis of phytoplankton populations using pigment markers. Course note for the workshop “Pigment Analysis Of Antarctic Microorganisms”, *University of Malaya*, unpublished.

Zaldivar JM, Cardoso AC, Viaroli P, Newton A, De Wit R, Ibanez C, Reizopoulou S, Somma F, Razinkovas A, Basset A, Holmer M, Murray N 2008. *Eutrophication of transitional waters*. Transitional Water Monographs 2.

Zapata M, Rodriguez F, Garrido JL 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases. *Marine Ecology Progress Series* 195: 29–45.

2.4.6 Indices de diversité fonctionnelle

2.4.6.1 Théorie

Connaitre les facteurs qui structurent les communautés et leur composition en termes de diversité le long de gradients environnementaux est crucial pour la compréhension des réponses des écosystèmes aux pressions extérieures, et nécessite de définir la variabilité spatiale et temporelle de la diversité (Mason and de Bello, 2013; Mason et al., 2013). La diversité fonctionnelle illustre les stratégies adaptatives des organismes par rapport aux caractéristiques de l'écosystème (par exemple la disponibilité des ressources), et permet donc de comprendre les réponses des communautés face à la variabilité environnementale, d'une manière bien plus précise que l'étude de la diversité spécifique (Mouillot et al., 2012; Mason et al., 2013). L'étude de la diversité alpha (α -diversité), et de la diversité bêta (β -diversité) est alors un moyen judicieux de répondre à cette problématique. L'alpha diversité est une mesure de la diversité locale dans une communauté. La β -diversité est une mesure de la dissimilarité de la diversité entre plusieurs communautés (Villéger et al., 2012; Mason and de Bello, 2013). La diversité fonctionnelle est généralement décomposée en plusieurs indices prenant en compte les divers aspects de la diversité (Mouillot et al., 2005), à travers une approche multidimensionnelle utilisant plusieurs traits fonctionnels (Mason et al., 2005). Nous avons choisi de nous intéresser à cette méthode parce qu'elle regroupe de nombreux avantages, à l'inverse des méthodes appliquées conventionnellement pour caractériser la diversité fonctionnelle du phytoplancton. Cette méthode est applicable à tous les écosystèmes et à tous les organismes vivants, puisqu'elle caractérise des valeurs de traits sélectionnés préalablement à l'échelle des individus. Elle introduit la notion de niche fonctionnelle des communautés à l'aide de la multidimensionnalité (Margalef, 1978) et elle décrit la diversité fonctionnelle des organismes selon de nombreux indices apportant des informations toutes complémentaires et qui permettent de comprendre divers processus écologiques structurant les communautés (Villéger et al., 2008 ; Mouillot et al., 2013).

Parmi ces indices, trois d'entre eux sont fréquemment utilisés et sont particulièrement adaptés à l'étude de la diversité fonctionnelle pour comprendre l'impact d'une perturbation sur le fonctionnement de l'écosystème (Mouchet et al., 2010) : la richesse fonctionnelle, la régularité fonctionnelle et la divergence fonctionnelle (Mason et al., 2013). La richesse fonctionnelle (FRic) représente l'espace fonctionnel regroupant l'ensemble des entités fonctionnelles (ou EF, regroupant les taxons présentant les mêmes combinaisons de traits fonctionnels) présentes dans la communauté. Cet indice correspond à un volume compris dans l'enveloppe convexe occupé par l'ensemble des entités fonctionnelles d'une communauté (Villéger et al., 2008). Il ne

prend pas en compte les abondances mais seulement la présence/absence des différentes entités fonctionnelles.

La régularité ou équitabilité fonctionnelle (FEve) décrit la régularité de la distribution des abondances relatives des entités fonctionnelles au sein de l'espace fonctionnel. Cet indice permet notamment d'évaluer l'uniformité de la fréquence de distribution des abondances relative à chacun des traits dans l'espace fonctionnel (Villéger et al., 2008). Il prend en compte les abondances des entités fonctionnelles.

La divergence fonctionnelle (FDiv) correspond à la proportion de l'abondance totale des entités fonctionnelles supportée par des EF possédant des valeurs extrêmes de traits au sein d'une communauté. Elle traduit la déviation des entités fonctionnelles pondérées par leurs abondances, par rapport au centre de l'enveloppe convexe occupée par les EF de la communauté (Villéger et al., 2008). La divergence fonctionnelle et la richesse fonctionnelle peuvent également être caractérisées par le calcul de l'entropie quadratique fonctionnelle Q. Cette valeur représente la distance moyenne (ou dissimilarité) entre deux individus tirés au hasard dans une communauté (Mason et al., 2013).

La diversité fonctionnelle peut enfin se décomposer en plusieurs autres indices, tels que la spécialisation (Devictor et al., 2010) et l'originalité fonctionnelle (Mouillot et al., 2013) qui apportent des informations complémentaires sur les mécanismes de structuration fonctionnelle des communautés.

2.4.6.2 Mise en pratique

Dans le cadre de la publication faisant l'objet du Chapitre 5, la diversité fonctionnelle au sein de trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés (MW, IN, AYR) et au cours des saisons automnale, printanière et estivale a été étudiée. Dans ce cadre, 107 taxons ont été dénombrés au sein des trois lagunes et des trois saisons (104 taxons identifiés et 3 morphotypes). Pour tous ces taxons, 5 traits fonctionnels ont été évalués : la taille (micro-, nano-, ultraphytoplancton), le régime trophique au moment du prélèvement (autotrophe ou hétérotrophe strict), la mobilité (présence de flagelle ou non), l'agrégation en colonie, et le mode de vie benthique, pélagique ou benthopélagique. A partir des combinaisons de ces traits fonctionnels, 19 entités fonctionnelles (EF) ont pu être identifiées. La valeur de ces traits peut être utilisée comme des coordonnées indiquant la localisation des EF dans l'espace fonctionnel dont les axes représentent les traits fonctionnels (Mouillot et al., 2012) et qui peut être assimilé à la représentation de la niche écologique occupée par l'ensemble des espèces d'une communauté selon la vision de Hutchinson (Hutchinson, 1961).

Les traits fonctionnels étant des facteurs catégoriels ordonnés ou non, une matrice de distance entre les EF des communautés a été calculée à l'aide de la méthode de Gower (Mouillot et al., 2012). A l'aide de cette matrice de distance, une analyse en coordonnées principales

(PCoA) a permis de représenter graphiquement la position des EF les unes par rapport aux autres dans un espace fonctionnel dont les axes ne représentent pas un trait mais une combinaison de plusieurs traits (Mouillot et al., 2012). L'espace fonctionnel le plus significatif pour représenter les positions des entités fonctionnelles a été sélectionné en évaluant la qualité de l'ensemble des espaces fonctionnels possibles (Maire et al., 2015). Dans le cadre de notre étude, il s'agissait d'un espace tridimensionnel. Au sein de cet espace, nous avons recalculé les coordonnées des EF à l'aide desquelles les indices de diversité ont été obtenus. Ainsi, les indices fonctionnels tiennent compte de la distribution des points et de leur poids (abondances) dans l'espace fonctionnel. Ils apportent des informations complémentaires pour caractériser précisément la diversité fonctionnelle d'une communauté et comparer la diversité fonctionnelle de deux communautés, soit visuellement en comparant les espaces fonctionnels occupés par les communautés, soit par le calcul d'indice de β -diversité fonctionnelle, à travers des matrices de distance. Le calcul des β -diversités taxonomique et fonctionnelle a également été effectué afin d'évaluer l'efficacité de la diversité taxonomique à mettre en évidence l'impact des niveaux trophiques contrastés sur les communautés phytoplanctoniques, par rapport à la β -diversité fonctionnelle. Les relations entre la diversité taxonomique, pigmentaire ou fonctionnelle, et la variabilité environnementale ont été mises en évidence à travers des Analyses Canoniques des Correspondances (ACC) avec le logiciel R, à l'aide des packages ade4 et Vegan (R Core Team, 2013; Roselli and Basset, 2015).

Pour conclure ce chapitre, il est important de rappeler que chaque méthode présente des avantages et des faiblesses, dont on peut s'affranchir en couplant plusieurs types d'analyses. Ainsi, la microscopie ne permet pas de visualiser les organismes de petite taille, mais l'HPLC et la cytométrie complètent cet aspect. Si l'HPLC ne permet pas d'identifier les organismes hétérotrophes stricts, la microscopie à épifluorescence permet de les quantifier. La pluridisciplinarité de l'approche utilisée lors de ce travail de thèse a permis d'obtenir une vision précise de la composition des communautés phytoplanctoniques et de leurs caractéristiques écologiques.

3 First steps of ecological restoration in Mediterranean lagoons: shifts in phytoplankton communities



Malaigue sur l'étang du Prévost – Pôle-relais lagunes méditerranéennes. Crédit : M. Wike

3.1 Contexte de l'étude

Lors de l'initiation du Réseau de Suivi Lagunaire (RSL), un suivi des caractéristiques environnementales et phytoplanctoniques de la colonne d'eau en période estivale a été mis en place sur les 24 lagunes du Languedoc-Roussillon et de Corse⁸. Dans le cadre de cette thèse, nous avons sélectionné un site particulièrement adapté à l'étude des réponses des lagunes côtières à la ré-oligotrophisation : Le complexe des étangs palavasiens (*cf.* Chapitre 2).

La ré-oligotrophisation des lagunes du complexe des étangs palavasiens a été initiée en Décembre 2005, lorsque l'émissaire de la station de traitement des eaux usées de l'agglomération montpelliéraine (Maera) a été dévié à 11 km au large dans la mer Méditerranée. Cette réduction des apports de 70 à 83 % en phosphore et azote (De Wit et al., 2015) a été complétée par le raccordement de la station de traitement des eaux usées de Palavas-les-Flots à l'émissaire de Maera en 2009. Ces mesures ont drastiquement réduit les apports nutritifs, en particulier dans la lagune du Grec dans laquelle la STEP de Palavas déversait directement ses effluents.

La première partie de ce travail de thèse a consisté en l'étude de la base de données estivales du RSL concernant la colonne d'eau des lagunes du complexe des étangs palavasiens. La base de donnée du RSL incluait les caractéristiques environnementales et phytoplanctoniques de la colonne d'eau acquises pour la période estivale, lors d'un suivi pluriannuel pour une période de 5 ans avant la diversion de l'émissaire et 8 ans après. La première partie du suivi était importante puisqu'elle permettait d'observer la manière dont les communautés phytoplanctoniques se répartissent en termes de biomasse et de composition en pico- et nanophytoplancton grâce à des analyses en cytométrie en flux le long d'un gradient trophique de l'oligotrophie à l'hypertrophie. La seconde partie du suivi apportait des informations bien plus rarement connues pour les milieux lagunaires. En effet, grâce à l'addition de l'analyse de la composition pigmentaire par HPLC à partir de l'été 2006, nous pouvions non seulement suivre l'évolution de la biomasse et des abondances de pico- et nanophytoplancton après l'initiation d'un processus de ré-oligotrophisation, mais également caractériser les modifications de composition taxonomique et fonctionnelle à partir de la mise en place de cette réduction des apports (Paerl et al., 2003).

Le but de cette étude était dans un premier temps de mettre en évidence un impact de la diversion de l'émissaire de Maera sur le niveau d'eutrophisation (concentration en Nt, Pt, 89

⁸ Parmi d'autres types de métriques permettant d'approfondir les connaissances sur l'état de ces écosystèmes (compartiments macrophytiques et sédimentaires)

biomasse chlorophyllienne), sur les abondances pico- et nanophytoplanktoniques, classes largement dominantes dans les lagunes avant la diversion de l'émissaire (Bec et al., 2011). Dans un deuxième temps, grâce aux données plus détaillées caractérisant la diversité des communautés phytoplanktoniques à partir de 2006, nous avons étudié l'évolution de la composition pigmentaire reflétant la structuration en principaux groupes phytoplanktoniques. Nous avons également pu mettre en évidence l'impact du gradient d'eutrophisation sur la réponse taxonomique et fonctionnelle des communautés à la réduction des apports. Cette étude permet de mieux appréhender les processus de restauration des lagunes côtières selon leur niveau d'eutrophisation initial, notamment l'impact de ce niveau d'eutrophisation sur la durée des processus de restauration.

3.2 Valorisation scientifique

Les résultats de ces travaux ont été présentés lors d'une communication orale au **6th EUROLAG Conference "COASTAL LAGOON DOMAIN AND PROPERTIES: from fundamental research to policy implementation" 16-19th December 2013 LECCE – ITALY:**

« First steps of the Mediterranean lagoon restoration process: shifts in phytoplankton communities »

Ils ont également fait l'objet d'une publication **soumise le 28 août 2015 à *Estuarine Coastal and Shelf Science***.

MANUSCRIT B

First steps of the Mediterranean lagoon restoration process: shifts in phytoplankton communities

Amandine Leruste¹, Nathalie Malet², Dominique Munaron³, Valérie Derolez³, Elise Hatey¹, Yves Collos¹, Rutger De Wit¹, Béatrice Bec^{1*}

¹ Centre of Marine Biodiversity, Exploitation and Conversation (MARBEC) UMR 9190, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Ifremer, Place Eugène Bataillon, Université de Montpellier, Case 093, 34095 MONTPELLIER cedex 5, France

² Ifremer, Ifremer LEPAC-Corse, ZI Furiani, Im Agostini, 20600 Bastia, France

³ Centre of Marine Biodiversity, Exploitation and Conversation (MARBEC) UMR 9190, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Ifremer, LER-LR, BP 171, Avenue Jean Monnet, 34203 Sète, France

*Corresponding author: beatrice.bec@univ-montp2.fr

Acceptée dans *Estuarine Coastal and Shelf Sciences* en février 2016 sous révisions mineures

1 **First steps of ecological restoration in Mediterranean lagoons: shifts in phytoplankton**
2 **communities**

3 A. Leruste ^a, N. Malet ^b, D. Munaron ^c, V. Derolez ^c, E. Hatey ^a, Y. Collos ^a, R. De Wit ^a, B.
4 Bec ^a

5

6 ^aUMR MARBEC, IRD, Ifremer, Université de Montpellier, CNRS. Bât. 24 – CC 093, Place
7 Eugène Bataillon, 34095 Montpellier cedex 5, France,

8 ^b Ifremer, Ifremer, LEPAC-Corse, ZI Furiani, Im Agostini, 20600 Bastia, France,

9 ^c UMR MARBEC, IRD, Ifremer, Université de Montpellier, CNRS. LER-LR, BP 171,
10 Avenue Jean Monnet, 34203 Sète cedex, France

11

12 Corresponding author: beatrice.bec@univ-montp2.fr

13 **Abstract**

14 Along the French Mediterranean coast, a complex of eight lagoons underwent intensive
15 eutrophication over four decades, mainly related to nutrient over-enrichment from continuous
16 sewage discharges. The lagoon complex displayed a wide trophic gradient from mesotrophy
17 to hypertrophy and primary production was dominated by phytoplankton communities. In
18 2005, the implementation of a 11 km offshore outfall system diverted the treated sewage
19 effluents leading to a drastic reduction of anthropogenic inputs of nitrogen and phosphorus
20 into the lagoons. Time series data have been examined from 2000 to 2013 for physical,
21 chemical and biological (phytoplankton) variables of the water column during the summer
22 period. Since 2006, total nitrogen and phosphorus concentrations as well as chlorophyll
23 biomass strongly decreased revealing an improvement in lagoon water quality. In
24 summertime, the decline in phytoplankton biomass was accompanied by shifts in community
25 structure and composition that could be explained by adopting a functional approach by
26 considering the common functional traits of the main algal groups. These phytoplankton
27 communities were dominated by functional groups of small-sized and fast-growing algae
28 (diatoms, cryptophytes and green algae). The trajectories of summer phytoplankton
29 communities displayed a complex response to changing nutrient loads over time. While
30 diatoms were the major group in 2006 in all the lagoons, the summer phytoplankton
31 composition in hypertrophic lagoons has shifted towards green algae, which are particularly
32 well adapted to summertime conditions. All lagoons showed increasing proportion and
33 occurrence of peridinin-rich dinophytes over time, probably related to their capacity for
34 mixotrophy. The diversity patterns were marked by a strong variability in eutrophic and
35 hypertrophic lagoons whereas phytoplankton community structure reached the highest
36 diversity and stability in mesotrophic lagoons. We observe that during the re-
37 oligotrophication process in coastal lagoons, phytoplankton shows complex trajectories with
38 similarities with those observed in freshwater lake systems.

39

40 Keywords : Phytoplankton, coastal lagoons, nutrient, sewage effluents, re-oligotrophication

41

42 **1. Introduction**

43 Eutrophication has been defined as an increase of the rate of organic matter inputs, principally
44 due to nutrient enrichment, which stimulates primary production (Nixon, 1995). High
45 biomass decreases light availability, favoring among the primary producers the community
46 that is most competitive for light, *i.e.*, phytoplankton at the expense of macrophytes (Cebrian
47 et al., 2014). This over-production causes a loss of diversity (Schramm, 1999; de Jonge and
48 de Jong, 2002), habitat destruction and mortalities due to anoxia (Smith, 2006; Carlier et al.,
49 2008). These phenomena negatively impact ecosystem health, result in increased vulnerability
50 to disturbances (Heemsbergen et al., 2004; Worm and Lotze, 2006) and loss of ecosystem
51 services (Bullock et al., 2011). In coastal areas, which are characterized by strong
52 demographic growth, eutrophication has become a serious threat since the 1950s (Nixon,
53 1995). Coastal lagoons are particularly sensitive to eutrophication, since these systems tend to
54 concentrate anthropogenic nutrient inputs (Knopper, 1994; Cloern, 2001; Kennish and Paerl,
55 2010) due to restricted exchanges with the sea and long water residence time (Boesch, 2002;
56 Kennish and Paerl, 2010; Glibert et al., 2011).

57

58 In 2000, The Water Framework Directive (WFD) was established in Europe requiring
59 member states to monitor the ecological and chemical quality state of water bodies and
60 implement ways to achieve good status by 2021 (Sherrard et al., 2006; Cartaxana et al.,
61 2009). Efforts have been made in many parts of the world to combat eutrophication by
62 reducing nutrient inputs from watersheds and initiate ecological restoration. Ecological
63 restoration is well documented in lakes which have been subjected to water quality
64 improvement programs since the 70s (Jeppesen et al., 2005; 2007). Studies on lake restoration
65 have shown that the response trajectories during re-oligotrophication are not simply the
66 inverse of the previous eutrophication processes and are characterized by hysteresis.

67 Accordingly, the recovery of ecosystem functions often lagged behind the reduction of
68 external nutrient loadings, due to nutrient regeneration from sediments or the persistence of
69 turbid alternative states because of dense blooms of phytoplankton or the presence of a pool
70 of easily resuspendable organic matter (Scheffer et al., 1993; Scheffer and Carpenter, 2003;
71 Sondergaard et al., 2003; Ibelings et al., 2007). Because of these phenomena, re-
72 oligotrophication processes are difficult to understand and predict for degraded systems (Van
73 Donk et al., 2008). Hence, ecological restoration generally takes much longer than water
74 degradation due to eutrophication. At first, it results in modifications of the composition and
75 structure of primary producers communities. Phytoplankton is generally the first autotrophic
76 compartment responding to the change of nutrient availability and other anthropogenic
77 pressures (Livingston, 2000; Paerl et al., 2003). In restored lakes, this response has resulted in
78 considerable changes of phytoplankton biomass, community structure and functional diversity
79 (Ruggiu et al., 1998, Anneville and Pelletier, 2000; Katsiapi et al., 2013).

80

81 A functional approach to phytoplankton ecology appears particularly useful to study the
82 adaptive responses of phytoplankton communities to re-oligotrophication. This approach is
83 based on defining the functional traits of species that impact on their performance and
84 survival (Violle et al., 2007) and, thus provides a better understanding of how phytoplankton
85 communities respond to environmental changes. The functional approach has been used to
86 understand how environmental changes or gradients drive phytoplankton community structure
87 (Litchman et al., 2010). Some morphological and physiological traits particularly reflect the
88 phytoplankton adaptations to nutrient availability, such as cell size, maximum growth rate and
89 trophic regime (Litchman and Klausmeier, 2008; Litchman et al., 2010). During re-
90 oligotrophication, the reduction of nutrient inputs could thus favor small cells, which compete
91 more effectively for nutrient uptake and show high growth rates (Chisholm, 1992; Kamenir

92 and Morabito, 2009; Litchman et al., 2010), and mixotrophic species that present some
93 advantages over strictly autotrophic cells (Anneville and Pelletier, 2000). These functional
94 traits highlight phytoplankton adaptations to the reduction of nutrient availability and
95 represent an interesting tool to evaluate the impact of changing eutrophication status.

96

97 Since the implementation of the WFD, coastal waters represent a major issue for management
98 and ecological restoration which has been used to reestablish ecosystems services. So far,
99 little is known about the responses of coastal ecosystems to ecological restoration (Vidal et
100 al., 1999; Duarte et al., 2009; Nixon, 2009). The recent literature describes a diversity of
101 responses to restoration (Boesch, 2002; Elliott et al., 2007; Ho et al., 2008; Duarte et al.,
102 2009), including a decrease of primary production while phytoplankton biomass remained
103 stable (Philippart et al., 2007), reappearance of macrophyte communities (de Jonge and de
104 Jong, 2002), and decrease of biomass and frequency of bloom occurrence (Lie et al., 2011).
105 As shallow lakes, coastal lagoons have been particularly subjected to cultural eutrophication
106 process due to nutrient over-enrichment from watersheds and long residence time (Kennish
107 and Paerl, 2010; Glibert et al., 2011). Ecological restoration of coastal lagoons has started
108 recently and studies of this process are still scarce. Given the high variability and dynamics of
109 these systems, we can expect variable and complex restoration trajectories. During the re-
110 oligotrophication process in a Mediterranean coastal lagoon (Collos et al., 2009),
111 phytoplankton community changes were similar to those observed in some freshwater lakes,
112 *i.e.* characterized by the appearance of dinophytes species and small-sized cyanobacteria
113 (Ruggiu et al., 1998, Kamenir and Morabito, 2009). The results suggest some similar
114 responses of lakes and coastal lagoons to re-oligotrophication process.

115

116 In the South of France, to improve the ecological quality of eight eutrophied coastal lagoons
117 close to Montpellier, a drastic and persistent reduction of anthropogenic nutrient inputs has
118 been achieved since December 2005, leading to a dynamic of ecological restoration. In the
119 framework of a monitoring network, these lagoons and sixteen other lagoons have been
120 monitored from 2000 to 2013 to assess their eutrophication status. These 24 lagoons
121 presented a large eutrophication gradient ranging from oligotrophy to hypertrophy (Souchu et
122 al., 2010), the most eutrophied lagoons showed phytoplankton dominance with high
123 biomasses ($>100 \mu\text{gChla.L}^{-1}$). The phytoplankton size structure was dominated by small
124 eukaryotic algae (3-6 μm) with relatively high growth rates (Bec et al., 2008; 2011).
125 Prior to the reduction in nutrient loadings, the complex of eight lagoons represented a
126 eutrophication gradient ranging from mesotrophic to hypertrophic, including the most
127 hypertrophic lagoons of the region. This context offered us a unique opportunity to study how
128 the initial eutrophication status of lagoons influences the re-oligotrophication trajectories and
129 to assess the success of ecological restoration in these highly degraded systems. We focused
130 on phytoplankton community shifts to investigate the impact of ecological restoration in
131 coastal lagoons for this range of eutrophication levels. Using data from a 13-year monitoring
132 program, we describe changes of phytoplankton biomass and structure (i.e., size class
133 structure and community composition), by comparing two periods: before and after the
134 nutrient reduction. In addition, after implementation of the nutrient reduction, HPLC pigment
135 analyses were added to the monitoring program. This allowed us to study the dynamics of
136 functional and taxonomic groups as well as phytoplankton diversity, based on pigment
137 biomarkers, during re-oligotrophication trajectories.

138

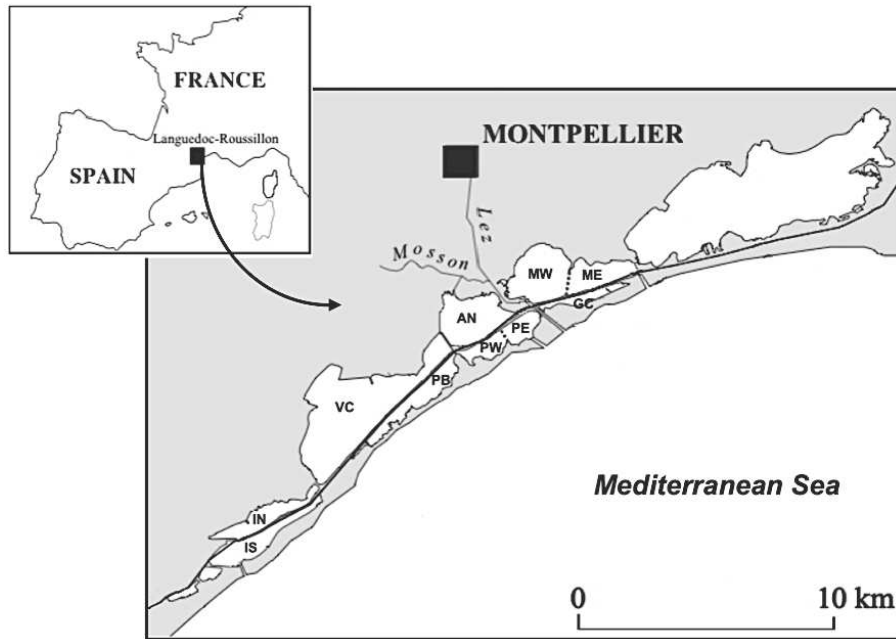
139

140

141 **2. Materials and methods**

142 *2.1. Studied sites*

143 The Palavasian lagoon complex is located on the French Mediterranean coast, near
144 Montpellier city (urban population 250 000 inhabitants). Since the 17th century, infilling and
145 human constructions have compartmentalized a large natural lagoon to give rise to the current
146 complex of eight interlinked shallow lagoons covering 38.8 km² (Fig. 1). A major human
147 intervention was the building of a navigation canal through the natural lagoon oriented NE-
148 SW, named the Rhône-to-Sète canal which divided the complex into two parts (inland and
149 seafront lagoons). As a result, four of the eight lagoons (i.e., the inland lagoons North Ingril,
150 Vic, Arnel, and Méjean lagoons) are bordered by wetland or salt marshes, which can act as a
151 buffer zone and regulate freshwater inputs from the watershed. Four seafront lagoons (South
152 Ingril, Pierre Blanche, Prévost, and Grec lagoons) are located between the Rhône-to-Sète
153 canal and the lido. Among them, South Ingril and Prévost lagoons are connected to the sea
154 through artificial permanent inlets. The inland lagoons are not directly connected to the sea,
155 but receive seawater indirectly by flow through the adjacent seafront lagoons and the Rhône-
156 to-Sète canal, which has many openings. In addition, canalization of the Lez River oriented
157 perpendicular to the Rhône-to-Sète canal has completed the compartmentalization of lagoon
158 complex. The Lez River, the main freshwater source of the Palavasian lagoons, interacts with
159 some lagoons (Arnel, Méjean, Prévost and Grec) through small channels. These multiple
160 canalizations do not account for sufficient water renewal of lagoon waters. The trophic status
161 and main characteristics of the lagoons as well as the sampling stations are listed in Table 1.
162 For Méjean and Prévost lagoons, two zones corresponding to empirically defined
163 hydrodynamic compartments (Souchu et al., 2010), have been considered for sampling
164 stations (see Table 1).



165

166 Figure 1: Location of the sampling stations, into the eight lagoons of the Palavasian complex,
 167 next to the Montpellier city agglomeration. The dark line is represents the Rhône-to-Sète
 168 canal.

169

170 Table 1. Characteristics of the 10 stations of the 8 coastal lagoons from the Palavasian
 171 complex. Trophic status, freshwater inputs and seawater exchanges are specified, from
 172 Souchu et al., 2010 and Bec et al., 2011.

Lagoon	Trophic status	Area (km ²)	Volume (10 ⁶ m ³)	Mean depth (m)	Main freshwater	Connections to the sea	Station	Label of the Station
Méjean	Hypertrophic	5.5	4.1	0.75	Channel	Indirect	East Méjean	ME
							West Méjean	MW
Grec	Hypertrophic	2.7	0.7	0.30	Channel	Indirect	Grec	GC
Arnel	Hypertrophic	4.7	1.9	0.40	River	Indirect	Arnel	AN
Prévost	Eutrophic	3.8	2.9	0.75	Channel	Direct	East Prévost	PE
							West Prévost	PW
Vic	Eutrophic	11.5	13.8	1.2	Channel	Indirect	Vic	VC
Pierre blanche	Eutrophic	3.7	1.5	0.4	Channel	Indirect	Pierre blanche	PB
North Ingril	Mesotrophic	3.2	2.2	0.6	Channel	Indirect	North Ingril	IN
South Ingril	Mesotrophic	3.6	1.9	0.6	Channel	Direct	South Ingril	IS

173

174

175 Effluents from the wastewater treatment plant of the Montpellier city district were discharged
176 into the Lez River until 2005. Through the many channels described above, the nutrients from
177 these effluents have propagated into the different lagoons, which has resulted in on-going
178 eutrophication from 1965 to 2005. The eutrophication gradient ranged from hypertrophy in
179 lagoons close to the Lez river to mesotrophy in the southwestern lagoons (Souchu et al.,
180 2010). In December 2005, the implementation of a new wastewater treatment plant (Maera),
181 and a diversion of its effluents through an outfall located 11 km off-shore in the
182 Mediterranean Sea has led to a sudden and drastic reduction of the anthropogenic inputs of
183 nitrogen and phosphorus into the lagoons. This has been estimated as a reduction of 83 % of
184 N and 70 % of P (Meinesz et al., 2013).

185

186 *2.2. Data collection*

187 We exploited the database developed by the Lagoon Monitoring Network (*Réseau de Suivi*
188 *Lagunaire*), which comprises data from 2000 to 2013 to assess the eutrophication status of
189 lagoons in the Languedoc-Roussillon region (Souchu et al., 2010). Sampling was carried out
190 during summer periods, when temperature and irradiance are optimal and allow maximal
191 primary production. For the Palavasian lagoon, the ten stations (Table 1) were sampled
192 monthly in June, July, and August from 2000 to 2013. On each date, subsurface water
193 samples were collected with 2 L polypropylene bottles. Temperature and salinity were
194 recorded with a WTW LF 197 field sensor. This database comprised the concentrations of
195 dissolved inorganic nitrogen ($\text{DIN} = \text{NO}_3 + \text{NH}_4 + \text{NO}_2$, μM) and phosphorus (DIP, μM),
196 total nitrogen and phosphorus (TN and TP, μM). It also included water column chlorophyll a
197 concentrations (Chl *a*, $\mu\text{gChla.L}^{-1}$) as a proxy for phytoplankton biomass. Chl *a* concentration
198 were measured by spectrofluorimetry (Neveux and Lantoiné, 1993) with a Perkin-Elmer LS50
199 B and pico- and nano-phytoplankton abundances (10^6 cells.L⁻¹) counted with a FACSCalibur

200 flow cytometer (Bec et al., 2011). Based on cytometric analysis, different size classes of
201 phytoplankton were identified: Phycoerythrin-rich picocyanobacteria ($\leq 1 \mu\text{m}$, PE-CYAN),
202 autotrophic picoeukaryotes ($\leq 3 \mu\text{m}$, PEUK), nanoeukaryotes ($> 3 \mu\text{m}$). The analytical
203 protocols have been described in detail by Souchu et al., (2010) and details on filtration,
204 conservation and analysis of phytoplankton samples have been described by Bec et al.,
205 (2011). Rainfall data were obtained from Météo France (Fréjorgues station, data publicly
206 available online at *Comparaison climatologique annuelle - Infoclimat*).

207

208 2.3. HPLC determination of pigment diversity

209 Since 2006, phytoplankton pigment diversity based on HPLC pigment analysis have
210 complemented the database, to investigate on phytoplankton composition by
211 chemotaxonomic identification of main groups. In the laboratory, exact volumes between 250
212 to 500 ml of water, depending on phytoplankton biomass, were filtered onto Whatman GF/F
213 filters (47 mm diameter) and stored at -80°C until analysis.

214 Pigments were extracted with 2.5 mL of 100% methanol in the dark at 4°C for 5 min.
215 Samples were then sonicated 5 times for 10 sec (20 Watts) and spaced by 10 sec in ice to
216 avoid an excessive heating of the extract. After 10 min in the dark at 4°C , extracts were
217 filtered on cellulose acetate filters (0.45 μm pore size) to remove filters and cell debris. An
218 aliquot of 600 μL was diluted with 150 μL of Milli-Q water. A volume of 150 μL of this mix
219 was injected to the HPLC system, a Waters D600 equipment. Chlorophylls and carotenoids
220 were detected by a Waters 2996 photo-diode array detector (optic resolution 1.2 nm), from
221 400 to 700 nm. Chlorophylls and their derivatives were also detected by a 2475 Multi λ
222 fluorescence detector, from two canals, to optimize the chlorophyll *a* (canal A: 412 nm
223 Excitation – 650 Emission) and the chlorophyll *b* and *c2* detection (canal B: 440 nm
224 excitation – 650 emission). Pigment extracts were analyzed using the method of Wright et al.,

225 (1991) with a flow rate of 1 ml.min⁻¹ and a run duration of 29 min. Solvent delivery was
226 programmed following a sequence of three linear gradients as follows (minutes, % solvent A,
227 % solvent B, % solvent C): (0,100,0,0) (2,0,100,0) (18,0,20,80) (21,0,100,0) (24,100,0,0)
228 (29,100,0,0). Solvent A consisted of 80:20 (v/v) methanol: ammonium acetate (0.5 M),
229 solvent B consisted of 90:10 (v/v) acetonitrile: water and solvent C consisted of ethyl acetate.
230 The HPLC system was calibrated with external standards (DHI Water and Environment,
231 Hørsholm, Denmark). Chromatograms were extracted at 440 nm, and pigments were
232 identified by comparison with a spectral library established from the pigments standards basis
233 and by checking elution order and absorption spectra (Roy et al., 2011), using the software
234 Empower Pro 3. Each peak was checked and the baseline readjusted to minimize errors due to
235 noise. They were then quantified by using peak area, compared to standard calibration curves
236 ($\mu\text{g.L}^{-1}$). Pigments dominant in phytoplankton groups were used as markers of these groups.
237 We used fucoxanthin (fuco) as biomarker for fucoxanthin-rich diatoms, peridinin (peri) for
238 dinophytes, and alloxanthin (allo) for cryptophytes (Bustillos-Guzmán et al., 2004). In
239 addition, prasinoxanthin (pras) was used as a biomarker for prasinophytes, while chlorophyll
240 *b* (chl *b*), lutein (lut), violaxanthin (vio), neoxanthin (neo) and zeaxanthin (zea) were
241 considered as characteristic for green algae (Chlorophyta). In the lagoons, the Chlorophyta are
242 mainly represented by chlorophytes and prasinophytes. Zeaxanthin is, however, also present
243 in cyanobacteria (Wright et al., 1991; Sherrard et al., 2006; Eker-Develi et al., 2012). 19'But-
244 fucoxanthin (but-fuco) and 19'Hex-fucoxanthin (hex-fuco) have been used for haptophytes
245 (Wright et al., 1991; Zapata et al., 2000; Paerl et al., 2003).

246

247 *2.4. Statistical analysis*

248 Non-parametric comparisons of Chl *a*, TP, TN concentrations have been performed by
249 Wilcoxon test (R) to compare before (2000-2005) and after (2006-2013) the diversion of the

250 effluents of the wastewater treatment. Spearman's rank correlation has been used to describe
251 the links between environmental parameters and biological variables.

252 The effects of the pre-eutrophication status of the lagoon for its response to the sewage
253 diversion were tested by using two ways ANOVAs (lagoon and time effects for the tested
254 variables: Chl *a* concentration, pico- and nano-eukaryotes abundances). When data did not
255 satisfy the conditions of applications (normality, homoscedasticity and independence of
256 residuals), they were log-transformed. If they still did not satisfy conditions, we used
257 Permanova (Anderson, 2001). Pairwise comparison with post-hoc Tukey tests helped to
258 separate lagoons into groups. To assess differences of diversity between lagoon and changes
259 in time, diversity index of Shannon (Ds), and evenness using the number of main
260 phytoplankton groups were estimated, from the annual median of summer pigment
261 concentrations. It represented diversity of main phytoplanktonic groups. Two ways ANOVAs
262 were then performed on these indexes to assess if there were differences between lagoons or
263 between years for these two parameters.

264 To characterize lagoons, spatio-temporal differences in pigment diversity and concentrations
265 were described using non-parametric multivariate analysis of variance (Permanova) and two
266 between-class principal component analyses (between-class PCA), which considers one
267 qualitative variable (here, either the year or the lagoon) (Pélissier et al., 2003). Then, Monte-
268 Carlo tests were used to check significances of differences between groups (Tournois et al.,
269 2013). These PCA were operated on most of the pigments identified, except those rarely
270 identified, with low concentrations, and which did not provide any additional information to
271 this analysis, *e.g.* phaeophorbid *a*, and 19'but-fucoxanthin. All the statistical analyses were
272 operated with the R software (R Core Team, 2013).

273

274

275 **3. Results**

276 *3.1 Characterization of the lagoons for the entire monitoring period (2000-2013)*

277 During summer, both the average temperature and their variations in the lagoons were very
 278 similar, *i.e.* around 25 °C with a range between 20 and 31 °C, respectively. A salinity gradient
 279 was observed from MW, the less saline lagoon station subject to recurrent freshwater inputs
 280 from the Lez River, to IS without freshwater tributaries and connected with the sea by an inlet
 281 (Table 2). The lagoons also presented a trophic gradient, from mesotrophy (IN, IS) to
 282 hypertrophy (MW) based on the Chl *a* and total nitrogen and phosphorus concentrations (TN,
 283 TP). Based on the entire period (2000-2013), median values of chlorophyll ranged from 3.7
 284 $\mu\text{gChl}a.L^{-1}$ at IS to 83.1 $\mu\text{gChl}a.L^{-1}$ at MW, and median values of TN and TP ranged from
 285 30.7 and 0.9 μM , respectively at IS to 196 and 12.4 μM , respectively in MW (Table 2). The
 286 trophic and salinity gradients appeared inverse in the lagoons as illustrated by significant
 287 negative correlations of the three eutrophication indicators (Chl *a*, TN and TP) with salinity
 288 ($\rho_{\text{salinity}} = -0.15$; $\rho_{\text{TN}} = -0.32$; $\rho_{\text{TP}} = -0.31$; p-values < 0.05, Spearman correlation, R).

289

290 Table 2. Median values and ranges (minimum and maximum values between brackets) of
 291 salinity, temperature, chlorophyll *a*, total nitrogen and total phosphorus concentrations, during
 292 summer periods, from 2000 to 2013.

Station	Salinity	TN (μM)	TP (μM)	Chl <i>a</i> ($\mu\text{gChl}a.L^{-1}$)	PE-CYAN (10^6 cell/L^{-1})	PEUK (10^6 cell/L^{-1})	NANO (10^6 cell/L^{-1})
MW	26.8 (13.9 – 38.1)	196 (42.7 – 527)	12.4 (2.8 – 30.0)	83.1 (1.6 – 413)	0 (0-267)	1000 (0-9158)	6.9 (0-16303)
ME	30.0 (19.9 – 36.5)	108 (37.6 – 296)	5.6 (1.2 – 17.7)	42.2 (0.7 – 274)	1.3 (0-333)	280 (0.5-4567)	5.1 (0-4300)
GC	32.0 (22.1 – 39.8)	149 (36.1 – 432)	8.0 (1.5 – 32.4)	73.2 (0.9 – 361)	3.6 (0-72.9)	257 (3.7-6526)	13.1 (0-455)
AN	35.7 (16.9 – 45.9)	86.3 (34.5 – 298)	4.6 (1.5 – 27.0)	47.6 (1.0 – 393)	0.5 (0-57)	49.4 (1.3-22000)	7.6 (0.8-1660)
PW	36.8 (27.1 – 44.0)	56.0 (25.4 – 137)	2.4 (0.7 – 6.1)	12.7 (0.7 – 54.0)	1.2 (0-18.9)	10.4 (0.2-1900)	5.8 (0.5-128)
PE	36.5 (30.7 – 40.5)	53.0 (15.4 – 188)	2.3 (0.8 – 8.8)	15.2 (0.8 – 104)	2.7 (0-79.4)	32 (0.4-725)	10.5 (0.2-627)
VC	38.1 (21.4 – 51.0)	65.2 (38.2 – 166)	3.0 (0.8 – 13.0)	9.9 (1.2 – 50.8)	0 (0-10.6)	15.4 (0.4-3200)	3.5 (0-63.4)
PB	37.3 (23.3 – 48.1)	69.6 (37.1 – 132)	3.8 (1.4 – 8.2)	20.9 (1.3 – 101)	0.2 (0-32)	15.8 (1-1975)	4.3 (0-157)
IN	38.8 (31.9 – 44.1)	34.5 (16.0 – 80.0)	1.2 (0.4 – 4.9)	4.8 (0.1 – 20.8)	1.7 (0-43)	16.2 (0.7-1081)	2.3 (0-18.6)
IS	38.9 (33.8 – 44.5)	30.7 (9.6 – 75.6)	0.9 (0.5 – 1.9)	3.7 (0.2 – 20.5)	5 (0-237)	5 (0-237)	1.7 (0-24.8)

293

294

295 Within the phytoplankton community, the highest values of biomasses and abundances were
296 generally observed before the diversion. Thus, the maximum Chl *a* concentration was 413
297 $\mu\text{g.L}^{-1}$ observed in June 2004 at MW, in the most hypertrophic lagoon, although a strikingly
298 low value of $0.09 \mu\text{g.L}^{-1}$ was observed in July 2002 at IN, the inland mesotrophic lagoon
299 (IN). Picoeukaryote abundances ranged from $2.9 \times 10^6 \text{ cells.L}^{-1}$ in the inland mesotrophic
300 lagoon (IN) in June 2004 to $2.2 \times 10^{13} \text{ cells.L}^{-1}$ in an inland eutrophic lagoon (AN) in July
301 2004. Nanoeukaryote abundances ranged from no detected cells in several lagoons (GR, IN,
302 IS, MW) in summer 2001 to $2.4 \times 10^9 \text{ cells.L}^{-1}$ at ME in June 2003. Phycoerythrin-rich
303 picocyanobacteria were present in low abundances compared to picoeukaryotes. Their
304 abundances ranged from no detected cells in several lagoons (MW, VC and PB), during the
305 summers of 2001 and 2002, to $1.1 \times 10^8 \text{ cells.L}^{-1}$ at MW in June 2004.

306

307 *3.2. Changes in eutrophication indicators before and after effluent diversion*

308 The TN, TP and chlorophyll *a* concentrations showed strong variations during the entire
309 period, which were partly related to the changes before and after effluent diversion. These
310 three variables decreased significantly after the nutrient diversion for all the lagoons (Table
311 S1), showing a decrease of the eutrophication permitted by the implementation of the
312 diversion. Median values of TN, TP and Chl *a* decreased for the period 2006-2013
313 (respectively, $47 \mu\text{M}$, $1.9 \mu\text{M}$ and $3.4 \mu\text{gChl}a.\text{L}^{-1}$) in comparison to the period 2000-2005
314 (respectively, $84 \mu\text{M}$, $3.8 \mu\text{M}$ and $23 \mu\text{gChl}a.\text{L}^{-1}$). In contrast to the three variables, there was
315 no general trend for the three forms of dissolved inorganic nitrogen (NO_3 , NO_2 , NH_4) since
316 the concentrations were not systematically different before and after effluent diversion. NH_4
317 represented the main source of DIN before (77%) and after (71%) the effluent diversion.
318 Phosphate concentrations (PO_4^{3-}) showed no significant differences between the two periods.

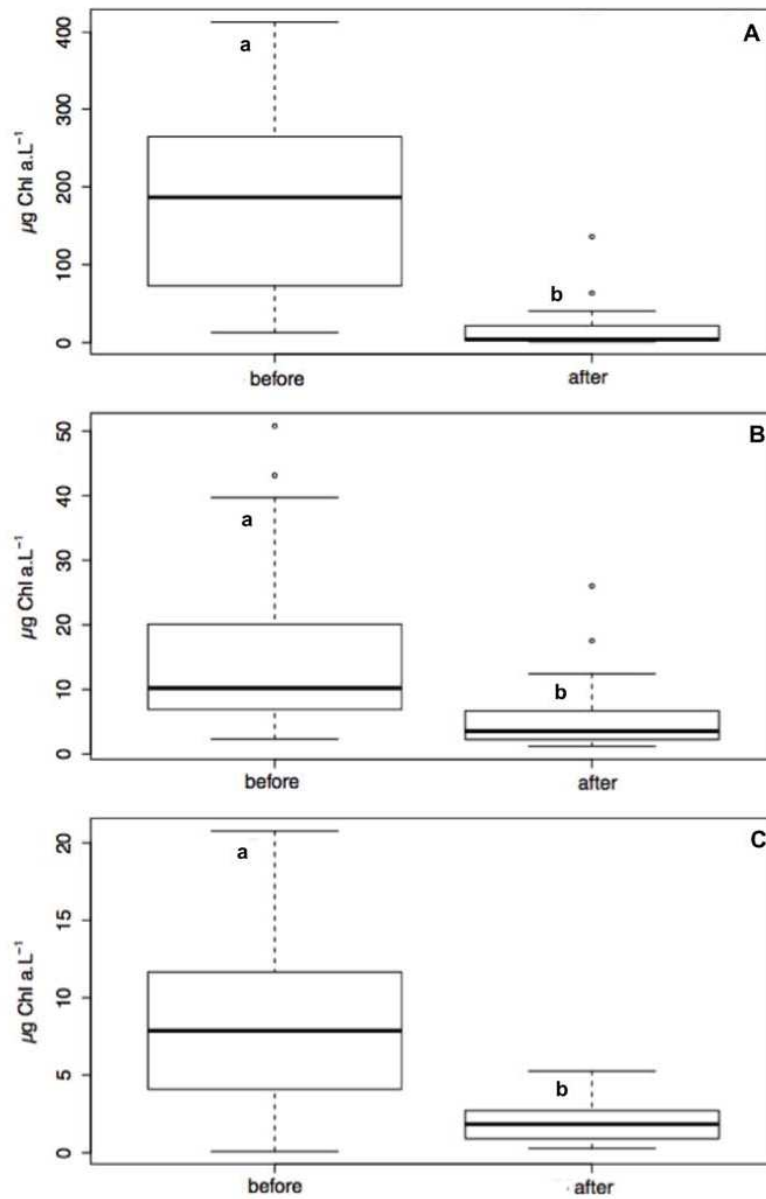
319 Two-way ANOVA and Permanova (see Methods) showed that the Chl *a* concentrations, the
320 TN and TP concentrations (for Chl *a*, TN and TP concentrations: Two way ANOVA, *p*-value
321 < 0.05) and the picoeukaryote abundances (Permanova, *p*-values < 0.05) significantly differed
322 among lagoons. Posthoc pairwise Tukey test on Chl *a* concentrations allowed separating the
323 lagoons into three groups (Table S1).

324 The first group was characterized as hypertrophic and included three lagoons (AR, GR and
325 both stations (ME and MW) of Méjean lagoon). The second group was characterized as
326 eutrophic and comprised three lagoons (PB, VC and both stations (PE and PW) of Prévost
327 lagoon). The third group was characterized as mesotrophic and comprised two lagoons (IN
328 and IS). Within each group, the lagoons showed a similar response to the nutrient reduction
329 (*i.e.* no significant effect of lagoons within groups according to the Anova and posthoc test, *p*-
330 value > 0.05). Hence, we selected one station in each group to illustrate the impact of trophic
331 status on the lagoon responses to the re-oligotrophication process. For each group, we chose
332 stations in inland lagoons under the direct influence of watershed discharges and more
333 sensitive to potential nutrient loadings than the seafront lagoons. Hence, MW, VC and IN
334 stations were selected to represent the hypertrophic, eutrophic and mesotrophic inland
335 lagoons, respectively.

336 The impact of the trophic status of the selected lagoons on the phytoplankton responses to the
337 re-oligotrophication process was investigated by comparing Chl *a* concentrations (Fig. 2) and
338 picoeukaryote and nanoeukaryote abundances (Fig. 3) before and after the diversion. Chl *a*
339 concentrations were significantly reduced (mean comparison all lagoons, *p* < 0.05) with a
340 decrease of 90.4%, 65.4 % and 79.9 % in the hypertrophic (MW), eutrophic (VC) and
341 mesotrophic (IN) lagoons, respectively (Fig. 2). Picoeukaryote abundances were reduced by
342 60.5% and by 81.8 % in hypertrophic (MW), and mesotrophic (IN) lagoons, respectively (Fig.
343 3). In contrast, in the eutrophic lagoon (VC) for picoeukaryotes the difference before and after

344 the diversion was not significant (mean comparison, p -value > 0.05 , see Fig. 3B).
345 Abundances of nanoeukaryotes did not show a global trend for the three lagoons (mean
346 comparison all lagoons, p -value > 0.05). Chl *a* concentrations and picoeukaryote abundances
347 were significantly correlated, showing that the response of the lagoons to the nutrient
348 reduction was particularly well reflected by the picoeukaryotes.

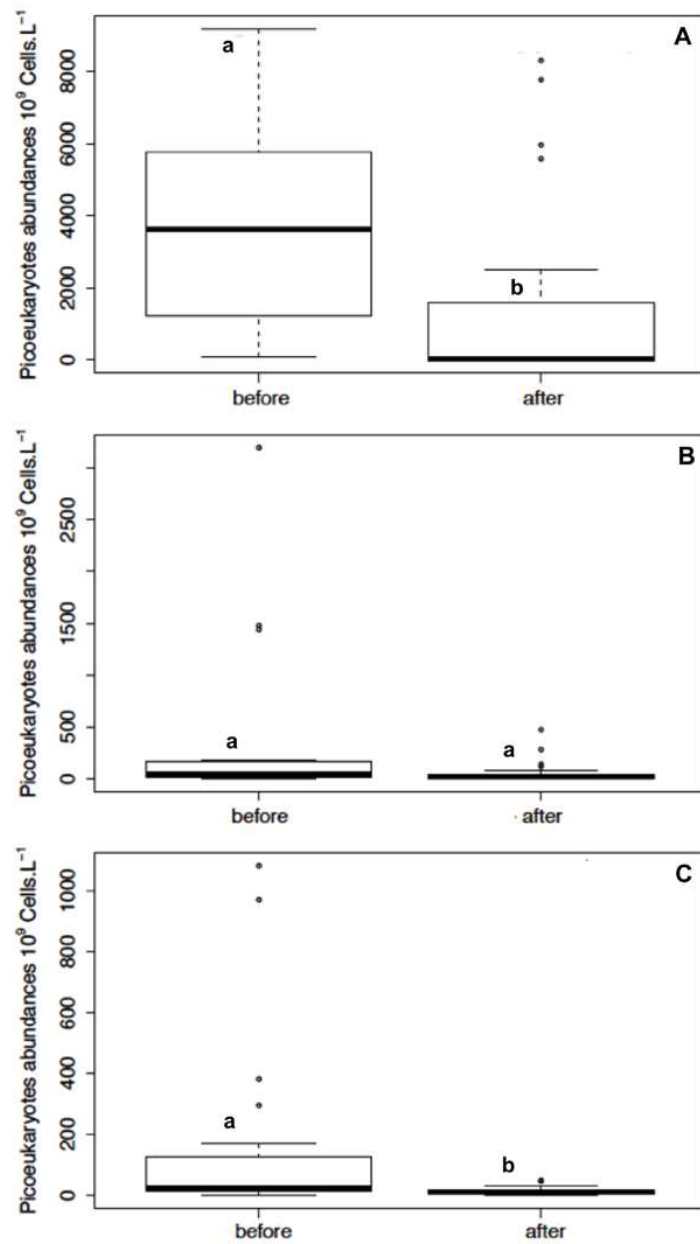
349



350

351 Figure 2. Distributions of Chl *a* concentration in hypertrophic (MW, A), eutrophic (VC, B)
352 and mesotrophic (IN, C) lagoons. Box-and-whisker plots from summer values from 2000 to
353 2005 (before diversion), and from 2006 to 2013 (after diversion). The whiskers represent the
354 5th and the 95th percentiles, the outer edges of the boxes represent the 25th and 75th
355 percentiles, and the horizontal line within the boxes represents the median. Significant
356 difference between means before and after is illustrated by different letters (a and b).

357



358

359 Figure 3. Distributions of picoeukaryote abundances in hypertrophic (MW, A), eutrophic
360 (VC, B) and mesotrophic (IN, C) lagoons. Box-and-whisker plots from summer values from
361 2000 to 2005 (before diversion), and from 2006 to 2013 (after diversion). The whiskers
362 represent the 5th and the 95th percentiles, the outer edges of the boxes represent the 25th and
363 75th percentiles, and the horizontal line within the boxes represents the median. Significant
364 difference between mean before and after is illustrated by different letters (a and b).

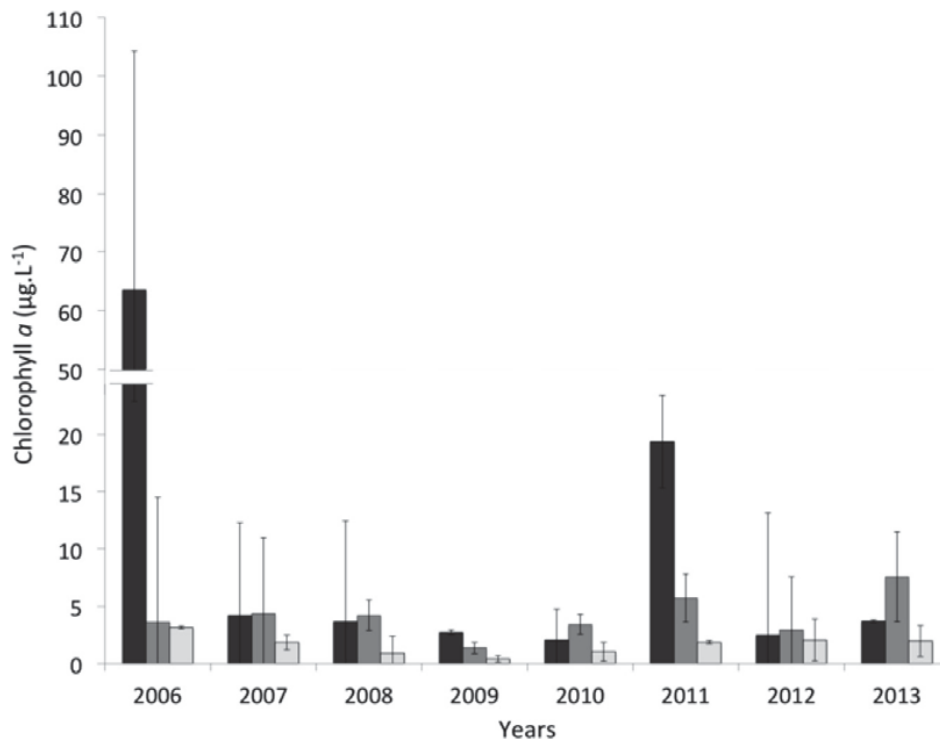
365

366

367 3.3. Phytoplankton responses after the reduction of effluent nutrient loads

368 Since 2006, *i.e.* after nutrient reduction, phytoplankton biomass measured in summer
369 decreased in the three selected lagoons (Fig. 4). The decrease of Chl *a* concentrations was
370 particularly pronounced between 2006 and 2007 and depended on the trophic status of
371 lagoons. Hence, summer Chl *a* concentrations were reduced by 87.7% in MW, 22.4% in VC
372 and 46.2% in IN between 2006 and 2007, reaching mean values of 1.7 $\mu\text{gChla.L}^{-1}$ in
373 mesotrophic lagoon (IN) to 9.8 $\mu\text{gChla.L}^{-1}$ in hypertrophic lagoon (MW) in the summer of
374 2007 (Fig. 4). Since 2007, the mean Chl *a* concentrations remained below 10 $\mu\text{gChla.L}^{-1}$ in
375 the three selected lagoons, except in 2011 in the hypertrophic lagoon (MW) where the mean
376 concentration reached 20.1 $\mu\text{gChla.L}^{-1}$.

377



378

379 Figure 4. Summer chlorophyll *a* concentrations in hypertrophic (MW), eutrophic (VC) and
380 mesotrophic (IN) lagoons from 2006 to 2013. Means of three summer values (June, July,
381 August). Black, dark gray and light gray indicate MW, VC and IN lagoons, respectively.

382

383 Since 2006, in parallel to phytoplankton biomass, phytoplankton community pigment
 384 composition was determined (Table 3). The total summer concentration of accessory
 385 pigments in the three selected lagoons showed the same pattern as observed for Chl *a*
 386 concentrations, with the highest pigment concentrations measured in hypertrophic lagoon
 387 (MW) and the lowest pigment concentrations measured almost in mesotrophic lagoon (IN).

388

389 Table 3. Summer concentrations of pigment markers of main phytoplanktonic groups in 2006
 390 in hypertrophic (MW), eutrophic (VC) and mesotrophic (IN) lagoons. Means of three summer
 391 values (June, July, August).

Pigments and associated taxonomic group	MW	VC	IN
	(µg.L ⁻¹)		
Fucoxanthin (diatoms)	22.28	0.11	0.62
Zeaxanthin (cyanobacteria – chlorophytes – prasinophytes)	4.29	0.04	0.06
Chlorophyll <i>b</i> (green algae)	1.73	0.16	0.1
Lutein (chlorophytes – prasinophytes)	3.06	0.07	0.06
Neoxanthin (chlorophytes – prasinophytes)	1.58	0.02	0.00
Prasincoxanthin (prasinophytes)	0.68	0.08	0.06
Alloxanthin (cryptophytes)	0.01	0.16	0.16
19'But-fucoxanthin (haptophytes)	0.04	0.00	0.00
19'Hex-fucoxanthin (haptophytes)	0.10	0.02	0.04
Peridinin (dinophytes)	0.05	3.87	0.16

392

393 In the hypertrophic lagoon (MW), fucoxanthin was the dominant pigment in 2006, indicating
 394 a dominance of the fucoxanthin-rich diatoms (Table 3 and Fig. 5A). Green algae pigments
 395 (Chl *b*, lutein, neoxanthin, violaxanthin, prasincoxanthin, and zeaxanthin) showed also high
 396 concentrations (more than 5 µg.L⁻¹) and proportions. We could safely assume that the bulk of
 397 zeaxanthin was associated with green algae, since abundances of cyanobacteria were
 398 systematically low in the lagoons. In contrast, in the eutrophic lagoon (VC) peridinin showed
 399 a high proportion in 2006 (45.4%) indicating a dominance of dinophytes. In the mesotrophic

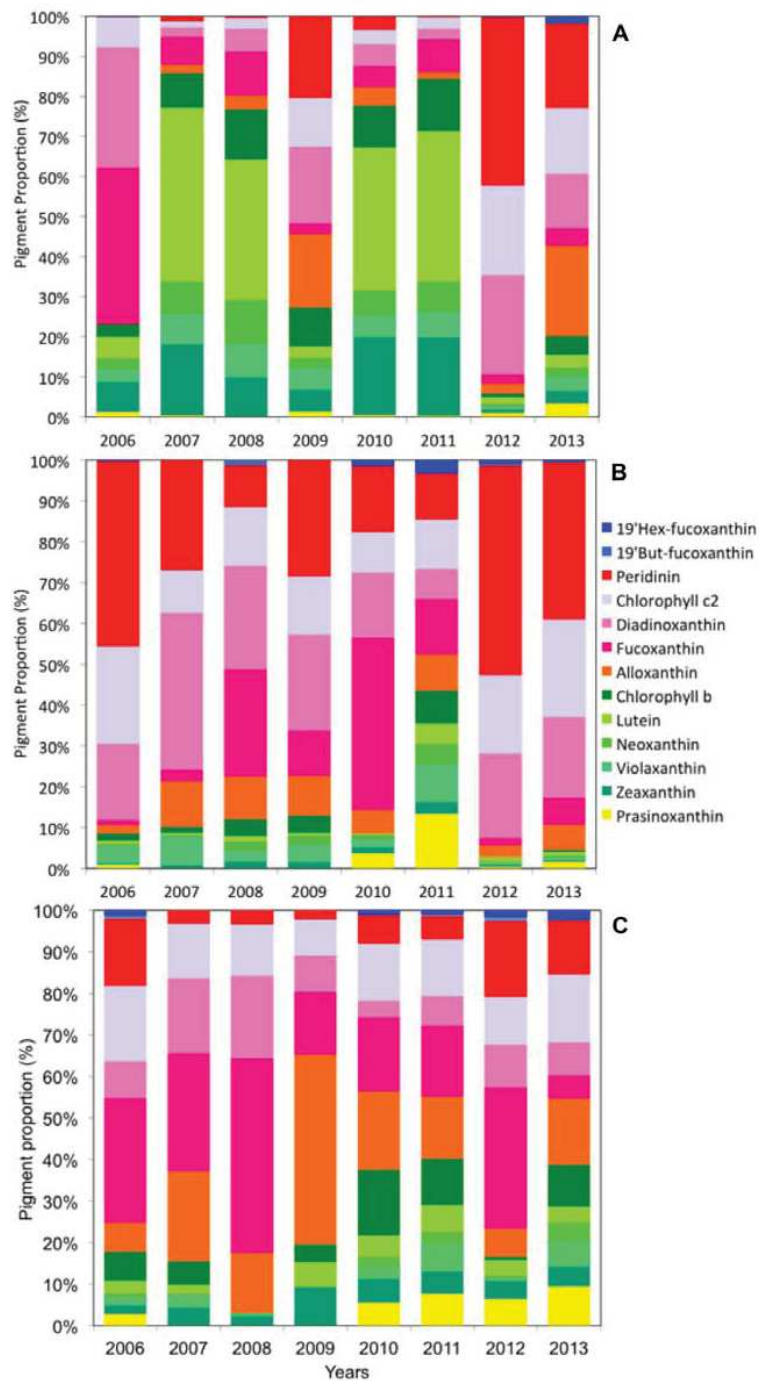
400 lagoon (IN), proportions of pigments were more equally distributed and fluctuated less than in
401 the other lagoons (Fig. 5) suggesting increased phytoplankton diversity.

402 The temporal patterns of the mean values of the total accessory pigment concentrations were
403 similar to those of phytoplankton chlorophyll *a* biomass. Concentrations of total accessory
404 pigment strongly decreased between 2006 and 2007, from 80.8% in hypertrophic (MW),
405 65.8% in eutrophic (VC) and 50.3% in mesotrophic (IN) lagoon but increased in 2011, with
406 284%, 34.6% and 15.5% in the hypertrophic (MW), eutrophic (VC) and mesotrophic (IN)
407 lagoons, respectively.

408 Figure 5 shows the time course of the proportions of the accessory pigments in the three
409 selected lagoons. In the hypertrophic lagoon (MW), the fucoxanthin proportion dropped (-
410 99.7%) between summers 2006 and 2007 and this decrease continued until 2011 (Fig. 5A).

411 This reduction of the fucoxanthin concentration coincided with a strong increase of the
412 proportion of green algae pigments (Chl *b*, lutein, neoxanthin, violaxanthin and zeaxanthin)
413 during the same period. The proportion of green algae pigments remained high during all the
414 monitoring and reached almost 80% during four years (up to 85.4% in 2007). The year 2011
415 was marked by strong shift in pigment composition with the lowest fucoxanthin concentration
416 (diatoms) and the highest concentrations of green algae pigments. On the contrary, the year
417 2012 is marked by a decrease of green algae group (4.88% of the pigment proportions). The
418 alloxanthin, marker of cryptophytes, increased after 2006 and its proportion fluctuated
419 between 0.02 % in 2006 and 22.4% in 2013. Peridinin, marker of dinophytes, was below 1%
420 in 2006 and fluctuated between 2007 and 2010. In 2012 when green algae decreased,
421 peridinin concentration strongly increased in association with Chl *c*2 and diadinoxanthin and
422 became the main phytoplanktonic group in 2012 and 2013 (peridinin proportion > 30%).

423



424

425 Figure 5. Proportions of accessory pigments in hypertrophic (MW, A), eutrophic (VC, B) and
 426 mesotrophic (IN, C) lagoons from 2006 to 2013. Samplings were performed in June, July,
 427 August) and the data have been calculated from mean summer values for each year.

428

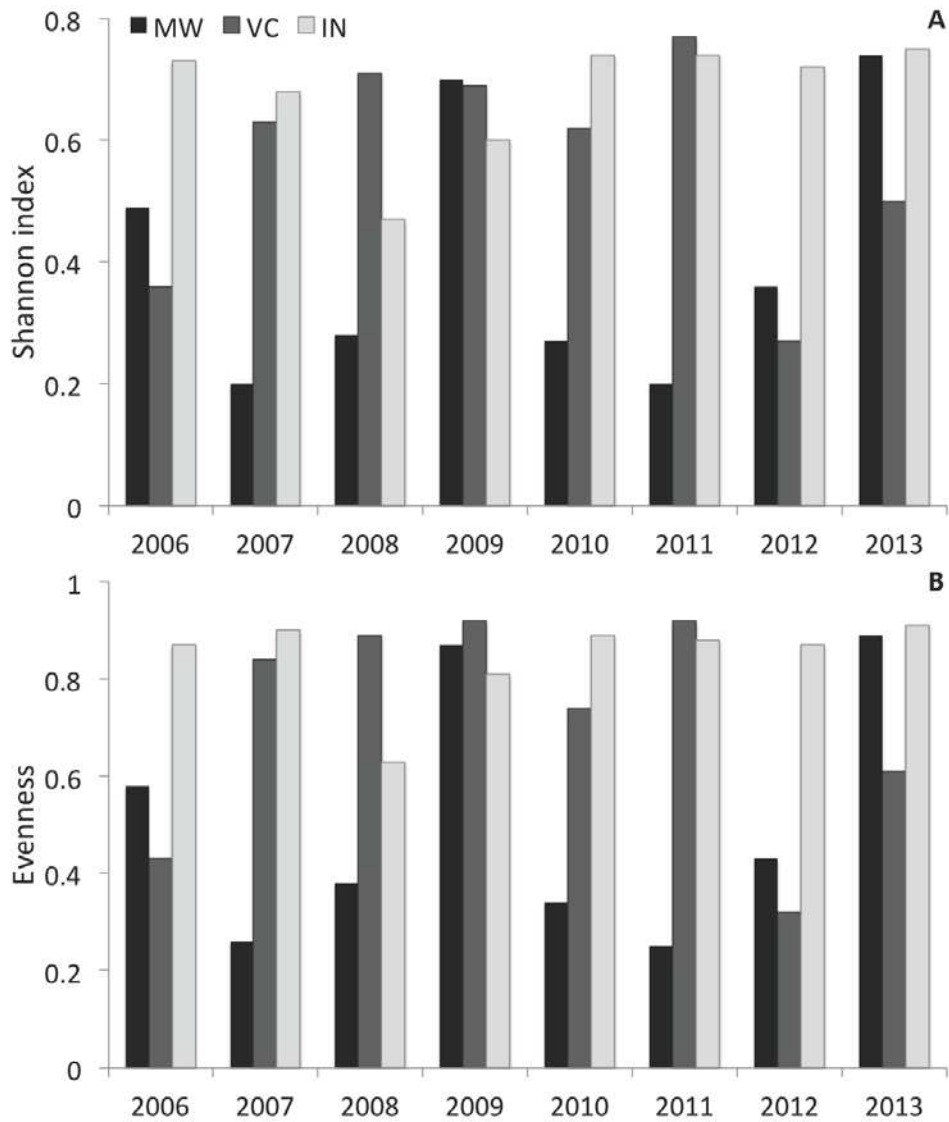
429 In the eutrophic lagoon (VC), phytoplankton pigment composition was dominated by
430 peridinin, Chl *c*2 and dianodinoxanthin during all the monitoring (Fig. 5B). Peridinin
431 proportions were higher in this eutrophic lagoon than in hypertrophic (MW) and mesotrophic
432 (IN) ones. Peridinin tended to decrease until 2011 (-40.5% in 2008), but highly increased in
433 2012 and 2013 (respectively, 51.2 and 38.5%). In contrast, alloxanthin (cryptophytes)
434 remained stable during the monitoring (up to 10% in proportions). Diatom pigment increased
435 and fluctuated between 2008 and 2011. As for hypertrophic lagoon, the year 2011 was
436 marked by a temporary increase of green algae pigments (up to 40% in proportions).

437 In the mesotrophic lagoon (IN), diatoms and cryptophytes pigments (respectively,
438 fucoxanthin and alloxanthin) were dominant during the 8-year monitoring (Fig. 5C).
439 dinophytes and prasinophytes pigments (respectively peridinin and prasinoxanthin) occurred
440 more since 2010. The proportion of green algae pigments fluctuated, during the entire
441 monitoring period, between 2% in 2008 and 40% in 2011. In the three selected lagoons,
442 19'hex-fucoxanthin and 19'but-fucoxanthin were rarely observed (haptophytes).

443

444 Based on the chemotaxonomic analyses, the Shannon diversity and Evenness indices (see
445 Methods) have been calculated as proxies for phytoplankton diversity through the 8-year
446 monitoring period (Figure 6A). Globally, the number of main phytoplankton groups
447 significantly changed during the survey. The richness of main taxonomic groups was
448 significantly lower during the period from 2007 to 2009 (4 or 5 groups) than in 2006 and after
449 2010 (6 groups). The low diversity during these early years reflected that the community was
450 dominated by diatoms, green algae and cryptophytes. Some differences of the richness also
451 appeared depending on the trophic status of lagoons. It was lower in hypertrophic lagoons
452 than in mesotrophic ones, and lower in mesotrophic lagoons than in eutrophic ones. Pooling
453 all years, there was a significant higher diversity (Shannon diversity index Fig. 6A, D_s) in the

454 mesotrophic lagoon (IN) compared to the hypertrophic lagoon (MW), but there was no
455 significant difference between mesotrophic (IN) and the eutrophic (VC) lagoons (Table 5).
456 The evenness showed also significant lower values in the hypertrophic lagoon (MW)
457 compared to the mesotrophic (IN) one, because of the green algae dominance in MW (Figure
458 6B).



459
460 Figure 6. Values of Shannon diversity Index (A) and Evenness (B) of the phytoplankton
461 communities in hypertrophic (MW in black), eutrophic (VC in dark grey) and mesotrophic
462 (IN in light grey) lagoons, based of the phytoplankton pigment composition during summer
463 period (June, July, August) from 2006 to 2013.

464 In the hypertrophic lagoon (MW), diversity D_s significantly fluctuated during the 8-year
465 monitoring (Fig. 6A). It firstly decreased from 2006 ($D_s = 0.49$) to 2007 ($D_s = 0.20$) and then
466 increased between 2007 and 2009 ($D_s = 0.70$). It decreased again between 2009 and 2011 (D_s
467 close to 0.20) and finally increased to reach a maximal D_s value in 2013 ($D_s = 0.74$). These
468 changes illustrated shifts in phytoplankton community composition. The low values of D_s in
469 2007/2008 and in 2010/2011 are related to the predominance of green algae (Fig. 5A) during
470 these four years. Evenness values showed the same patterns in time as that of the Shannon
471 diversity index (Fig. 6B). It strongly decreased when green algae was the dominant
472 phytoplankton group. After 2011, it increased to reach its highest value in 2013.

473 In contrast, in the eutrophic lagoon (VC), D_s increased from 2006 to 2008 (from 0.36 to 0.71)
474 and stayed relatively stable to reach 0.77 in 2011. The diversity decreased strongly in 2012
475 ($D_s = 0.27$, lowest diversity) and stayed lower in 2013 ($D_s = 0.50$) than between 2007 and
476 2011. Evenness increased from 2006 to 2009 (0.43 to 0.92) and then fluctuated to finish with
477 an intermediate value ($E = 0.61$) in 2013.

478 In the mesotrophic lagoon (IN), diversity and evenness significantly changed over time,
479 decreasing between 2006 and 2008 to reach the lowest values (respectively, 0.47 and 0.63,
480 Figure 6) in 2008. From 2009 to 2010, diversity indices increased and stayed relatively stable
481 to reach the highest values in 2013 (respectively, 0.75 and 0.91, Fig. 6). The lowest diversity
482 and evenness values observed in 2008 were associated to the dominance of two
483 phytoplanktonic groups (diatoms and cryptophytes, Fig. 5C).

484

485 *3.4. Lagoons trajectories based on pigment diversity*

486 In order to study whether the patterns observed for the selected stations are robust for the
487 entire Palavasian lagoon complex, multifactorial analyses were performed using accessory
488 pigment database from the 10 stations of the complex for the 8-year monitoring. It was

489 observed that pigment composition (concentration and diversity) significantly changed among
490 stations (Permanova, $F = 5.29$, $df = 9$, $p\text{-value} = 0.001$), and years (Permanova, $F = 4.49$, $df =$
491 7 , $p\text{-value} = 0.001$). Moreover, the interaction between the two factors also showed a
492 significant effect (Permanova, $F = 1.54$, $df = 59$, $p\text{-value} = 0.001$), indicating that the
493 temporal patterns were different among stations. The principal component analysis (PCA)
494 was used on both lagoon stations (Fig. 7) and years (Fig. 8) to elucidate phytoplankton
495 composition patterns in relation to lagoon trophic status and time. For each of the two PCA,
496 the results were significantly different (Monte-Carlo test, $p\text{-value} = 0.001$), although the
497 ellipses representing each group (either lagoons or by years) overlapped.

498 The first PCA showed differences between lagoons (Fig. 7). The first axis explained 71% of
499 the total variance, and was mainly driven by pigments markers of the green algae (lut, neo,
500 chl *b*, viola and zea), prasinophytes (prasino), diatoms (fuco, chl *c2*, diadino), associated with
501 total biomass. The second axis explained 16.5% of the total variance and opposed pigments
502 markers of dinophytes (peri) and cryptophytes (allo) in positive against pigment marker of
503 haptophytes (Hfuc) in negative (Fig. 7A). The first axis is correlated with pigments that are
504 characteristic for the phytoplankton groups which are enhanced by eutrophication (i.e., green
505 algae, diatoms) and a marker of eutrophication (Chl *a*). The position of the center of gravity
506 of the ten stations in this projection showed two groups of stations: the three most eutrophic
507 stations (ME, MW, GC) strongly separated from the other ones (Fig. 7B-C). The group of
508 hypertrophic stations presented a very large ellipse suggesting a strong variability of pigment
509 concentrations. Their center of gravity was also located close to Chl *a*, indicating an elevated
510 biomass in these stations compared to the others. More precisely, they are located in two
511 different directions: MW and ME were close to green algae pigments, while GC is closer to
512 pigments from diatoms and cryptophytes indicating a dominance of these three phytoplankton
513 groups with eutrophication. The second group of stations presented lower concentrations of

514 pigments for all the phytoplanktonic groups. Among this group, the centers of gravity of the
515 different stations ranged from positive to negative along the axis 2, reflecting the trophic
516 gradient ranging from the most (AN) to the less eutrophied (IS) station. Their positions along
517 the second axis reflect some differences in the phytoplankton composition along this gradient.
518 Eutrophic lagoons (AN and PB) were close to cryptophytes and dinophytes pigments. On the
519 opposite, mesotrophic lagoons (IN and IS) and Prévost (PE, PW), a lagoon under marine
520 influence, showed a very low phytoplankton biomass and pigment concentrations, and a
521 stronger signal of haptophytes pigment.

522

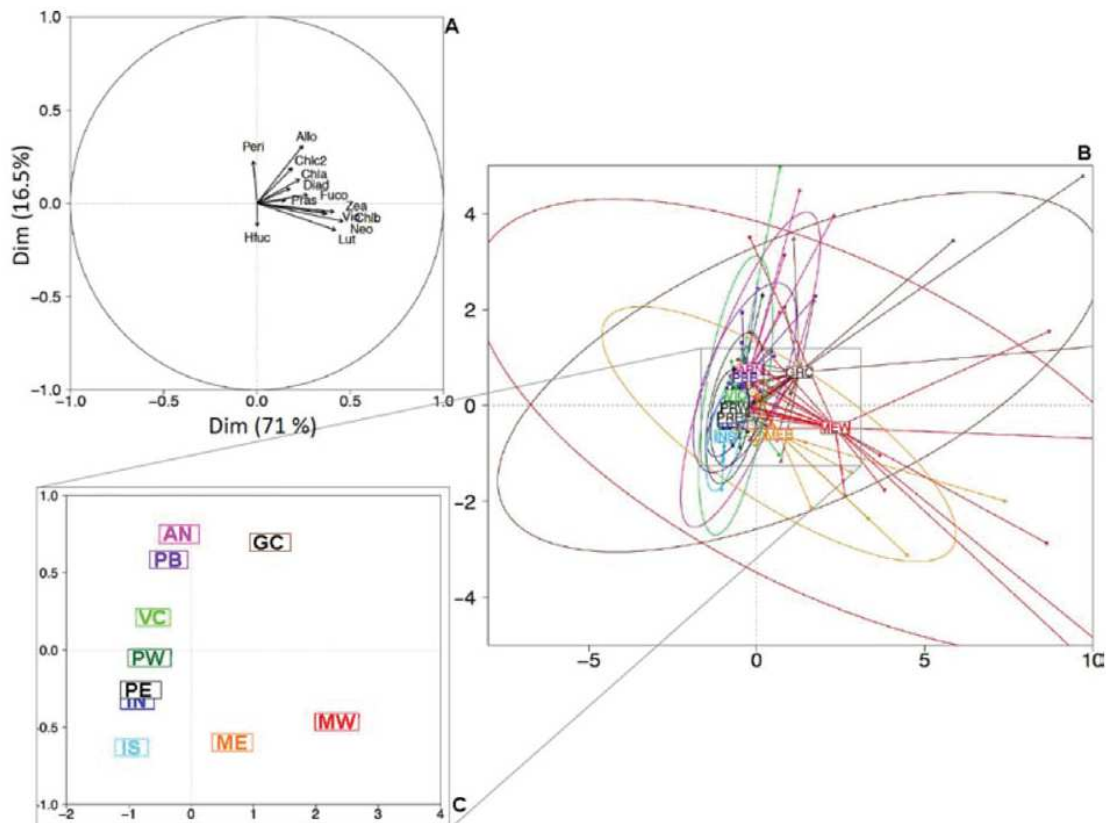
523

524

525

526

527



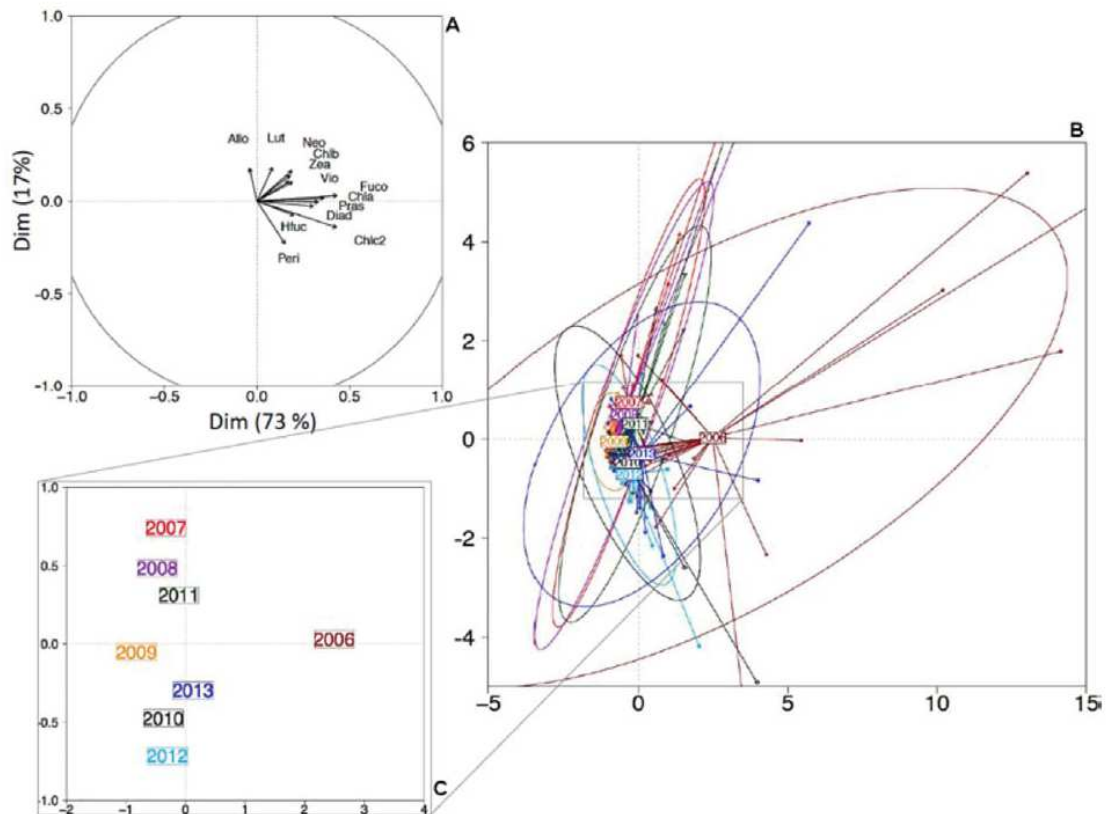
528

529 Figure 7. Between-class PCA by stations of the summer monitoring from 2006 to 2013 on the
 530 10 stations in the Palavasian complex. Correlation circle shows a projection of the pigment
 531 concentration along the two first axes with different percent of variance between-class.
 532 Arrows represent pigments (A) Projection of pigment composition of the ten stations for the 8
 533 years monitoring along the two axes by years, (B) Labels correspond to the center gravity of
 534 all the values, and ellipse represent 95% confidence limit of the mean, (C) Position of each
 535 center of gravity.

536

537 The second PCA showed differences between years (Fig. 8). The first axis explained 73% of
 538 the total variance, and was mainly driven by the pigment estimating total phytoplankton
 539 biomass (Chl *a*), pigment markers of diatoms (fuco) or mostly abundant in diatoms (diadino,
 540 Chl *c2*), and pigment marker of prasinophytes (prasio). The second axis explained 17% of
 541 the total variance and was mainly driven by pigment marker of cryptophytes (allo) and green
 542 algae in positive, opposed to pigment marker of dinophytes (peri) and haptophytes (19'Hex-
 543 fuco) (Fig. 8A). The vectors of the pigment markers of cryptophytes and dinophytes were

544 opposed in the first two planes of the PCA (Fig. 8A). The projection of the pigment
545 composition of the ten stations showed that 2006 differed from other years by a stronger
546 concentration of the pigments driving the first axis (Fig. 8B). The phytoplankton biomass was
547 still high in summer 2006, six months after the diversion (Fig. 4), and diatoms were the main
548 group in the ten stations, with a higher fucoxanthin concentration compared to the other
549 pigments that explain the position of the center gravity of this year on the axis 1. The
550 following years are distinct from 2006 along the axis 2, showing a change in phytoplankton
551 biomass and composition (Fig. 8B-C). Their position indicate a strong decrease of the Chl *a*
552 concentrations and shifts in phytoplankton composition with a decrease of diatoms and an
553 increase of green algae principally in 2007 and 2008. From 2007 to 2012, each center of
554 gravity showed a displacement along the axis 2, in the direction of the pigment marker of
555 dinophytes, indicating an increase of the occurrence and the concentration of the peridinin in
556 time. 2011 is characterized by a return to pigment markers of green algae, as described in
557 figure 5. Finally, 2013 also differed from the global trend, with a community composition
558 close from those in 2010, less dominated by dinophytes, more balanced between all the
559 pigments identified.



560

561 Figure 8. Between-class PCA by years of the summer monitoring from 2006 to 2013 on the
562 10 stations in the Palavasian complex. Correlation circle shows a projection of the pigment
563 concentration along the two first axes with different percent of variance between-class.
564 Arrows represent pigments (A) Projection of pigment composition of the ten stations for the 8
565 years monitoring along the two axes by years, (B) Labels correspond to the barycenter of all
566 the values, and ellipse represent 95% confidence limit of the mean, (C) Position of each
567 center of gravity.

568

569 4. Discussion

570 This study represented a unique opportunity to assess the impact of re-oligotrophication
571 processes in shallow Mediterranean coastal lagoons in conjunction with their contrasting
572 trophic states. The results show that phytoplankton responded quickly, and that the amplitude
573 and qualitative changes depend on the prior eutrophication status of the lagoon.

574

575 *4.1. Phytoplankton chlorophyll biomass in heavily eutrophied lagoons*

576 Before the reduction of the nutrient loadings, the ‘Palavasian’ lagoons were strongly degraded
577 by regular inputs of nitrogen and phosphorus from treated sewage. The most hypertrophic
578 lagoons Méjean and Grec presented Chl *a* concentrations close to those found in hypertrophic
579 lakes (Jeppesen et al., 1998; Bell and Kalff, 2001). In these lagoons, phytoplankton was the
580 major primary producer, with excessive blooms leading to a complete loss of seagrasses
581 communities and low macroalgal cover probably due to competition for light. Eutrophic
582 symptoms associated to water quality degradation in Palavasian lagoons can be illustrated by
583 the succession of primary producers (Schramm, 1999; Bricker et al., 2008), ranging from a
584 moderate impact, with presence of some macroalgae and seagrasses (IN and IS), to more than
585 the high impact, i.e., dense phytoplankton without macroalgae (ME, MW, GC). The
586 phytoplankton dominance may be related to its strong capacity to compete for dissolved
587 nutrients and light (Cebrian et al., 2014).

588 After the implementation of the diversion, TN, TP and Chl *a* biomass responded quickly by a
589 strong decrease within two years after the nutrient reduction, whatever the prior trophic status
590 of the lagoons. Although such a decrease has already been observed during re-
591 oligotrophication processes in lacustrine (Ruggiu et al., 1998; Jeppesen et al., 2005; Van
592 Donk et al., 2008), riverine or coastal ecosystems (Kemp et al., 2005; Greening and Janicki,
593 2006; Xu et al., 2010), it is highlighted that in these coastal lagoons, the response was quick
594 compared to the other systems. Hence, the reduction of chlorophyll *a* in the Tampa bay took 5
595 years (Greening and Janicki, 2006), and the reduction of TN and TP in lakes took about 5 and
596 10-15 years, respectively (Jeppesen et al., 2005). The amplitude of the decrease of Chl *a*
597 biomass was strongly linked to the prior trophic status of the lagoon, and was mainly driven
598 by the decrease of picoeukaryote abundances. Steady-state nutrient conditions observed in
599 these lagoons resulted in massive picoeukaryote blooms, observed particularly in eutrophic

600 and hypertrophic lagoons (Table 2). These picoplanktonic blooms often represented the
601 dominant fraction of Chl *a* biomass throughout summer (Bec et al., 2011) leading to a strong
602 depletion of nutrients in these highly eutrophied systems (Souchu et al., 2010). These
603 phenomena could explain the absence of significant changes for the inorganic nitrogen and
604 phosphorus concentrations after the reduction of nutrient loadings. The rapidity of the
605 responses of coastal lagoons could also be associated to favorable climatic conditions during
606 the five years (2006-2010), characterized by low or no rainfall during summer (“*Comparaison*
607 *climatologique annuelle - Infoclimat*”), reducing non-point source nutrient loads.

608

609 4.2. Phytoplankton functional taxonomic groups

610 Small cells (< 10 µm) are the typical dominant phytoplankton in lagoonal algal blooms
611 (Glibert et al., 2010; Bec et al., 2011; Pachés et al., 2014). In the Palavasian complex,
612 phytoplankton community was often dominated by small size classes, most belonging to pico-
613 (2-3 µm) and nanoeukaryotes (3-6 µm) (Bec et al., 2011). Major functional/taxonomic groups
614 were represented by diatoms, green algae, cryptophytes, and dinophytes. Among them,
615 diatoms, green algae and cryptophytes are functional groups composed of fast-growing algae
616 that may have been favored in response to high and fluctuating nutrient loadings (Paerl et al.,
617 2006; Paerl et al., 2010) such as observed in lagoons. However, these functional groups that
618 exhibited contrasting ecological strategies, especially in resource utilization (Litchman et al.,
619 2007), responded differently to the reduction of effluent nutrient loads in conjunction with
620 lagoon environmental changes (*i.e.* salinity, light, turbulence).

621 Diatoms were present in all the Palavasian lagoons and were particularly dominant in the
622 most eutrophic lagoons in 2006. In many coastal systems, diatoms dominated the
623 phytoplankton community when silicate concentrations were sufficiently high to sustain their
624 growth (Lie et al., 2011; Burford et al., 2012). In Palavasian lagoons, it has been suggested

625 that silicate concentrations may not be limiting for diatom growth (Souchu et al., 2010).
626 Diatoms, with high maximum nutrient uptake rates and high growth rates, may be favored
627 under high or fluctuating nutrients (Litchman et al., 2007) and are not inhibited by turbulence
628 associated with those nutrient regimes (Margalef, 1978). Moreover, diatoms have a high
629 nitrogen affinity, especially small-sized species (Litchman and Klausmeier, 2008; Litchman et
630 al., 2009) making them really competitive compared to others. Thus, this functional group is
631 well adapted to dominate highly eutrophied waters, particularly in coastal waters under
632 freshwater discharges or sewage influence (Paerl et al., 2010; Lie et al., 2011; Gadea et al.,
633 2013). Furthermore, diatoms with low half-saturation constants for irradiance-dependent
634 growth (Litchman et al., 2007) could be more adapted to the low irradiance associated with
635 high chlorophyll concentration in eutrophic and hypertrophic systems (Sommaruga and
636 Robarts, 1997). In terms of seasonal dynamics, diatoms blooms in temperate coastal systems
637 occur mainly in spring but may last during summer if nutrients are continuously supplied and
638 not entirely consumed (Chisholm, 1992; Agawin et al., 2000; Chang et al., 2003). Throughout
639 the year, the continuous discharge of sewage effluent resulted in high nutrient loadings in
640 lagoons that may sustain diatom growth (Lie et al., 2011; Burford et al., 2012). Then, the
641 reduction of effluent nutrient loadings could affect diatom growth, particularly during the dry
642 summer period, leading to the large decrease of fucoxanthin-rich diatoms. This decrease was
643 particularly observed in the hypertrophic lagoons between 2006 and 2007, suggesting a time
644 lag between reduction of nutrient loading and changes of phytoplankton community
645 composition. In these lagoons, the phytoplankton composition has shifted towards green algae
646 dominance. Temperature also plays an important role in the phytoplankton seasonal
647 succession. Many green algae (*Chlorella*, *Scenedesmus*, *Cosmarium*) have optimal
648 temperature for growth between 25 and 35°C (Litchman et al., 2010). After 2006, the shift

649 from diatoms to green algae dominance during summer could thus be explained by the shift in
650 nutrient delivery (decreasing external inputs) and by high summer temperatures.

651 Small *Chlorella*-like algae were the main component of the picoeukaryote community in the
652 eutrophic Palavasian lagoons before the reduction of nutrient loadings (Bec et al., 2011).
653 After 2006, green algae (chlorophytes and prasinophytes) was also a major functional group
654 of phytoplankton community in the 3-6 μm size range and replaced small diatoms especially
655 into hypertrophic lagoons (ME, MW, GC). Because of their high S:V ratio, efficient growth
656 rates and enhanced nutrient uptake rates (Paerl et al., 2003), green algae appear more
657 competitive than other phytoplankton functional groups to use regenerated forms of nutrients
658 in the lagoons (Glibert et al., 2010). Indeed, benthic fluxes are an important source of
659 nutrients (NID and DIP) in coastal lagoons, especially during summer, and may result in high
660 NH_4 efflux from the sediment to the water column (Glibert et al., 2010). Even if the effluent
661 diversion has resulted in a strong reduction of the external nutrient supply, internal supply
662 from benthic stocks related to eutrophication could stimulate phytoplankton growth
663 (McGlathery et al., 2007; Burford et al., 2012). Green algae have abilities to use ammonium
664 from regenerated sedimentary stock (Domingues et al., 2011; Donald et al., 2011) and have
665 particularly high affinity for ammonium uptake compared to diatoms and dinophytes
666 (Litchman et al., 2007).

667 Furthermore, the eutrophication gradient in the Palavasian lagoons is highly linked to
668 freshwaters inputs. Green algae were mainly observed in brackish and hypertrophic lagoons
669 such as Méjean lagoon (Table 2). This phytoplankton functional group is tolerant to low
670 salinity as observed in freshwater and brackish coastal lagoons (Coelho et al., 2007;
671 Cartaxana et al., 2009; Pachés et al., 2014) and is often observed in hypertrophic systems such
672 as lagoons under high freshwater inputs (Torres and delRio, 1995; Bonilla et al., 2005) and
673 lakes (Wasmund and Kell, 1991; Hepperle and Krienitz, 2001). So both low salinities and

674 high trophic status could explain the predominance of chlorophytes in some Palavasian
675 lagoons. Flagellates such as Prasinophytes and cryptophytes, present in the most eutrophic
676 lagoons also seems to be promoted by low salinities (Bonilla et al., 2005).

677 Cryptophytes were present in high proportions in the Palavasian lagoons where they can
678 respond quickly to nutrient loads due to their high growth rate (Paerl et al., 2003). In
679 mesotrophic lagoons, it allowed them to be more competitive than picoeukaryotes that were
680 less abundant. This taxonomic group is well adapted to turbid and low light environments
681 such as coastal and estuarine waters due to photoacclimation (phycobilins and alloxanthin
682 pigments) to low light intensities (Bergmann, 2004; Weng et al., 2009; Fischer et al., 2014).

683 Microscopic observations of the ciliate, *Mesodinium rubrum*, in some Palavasian lagoons
684 suggest that cryptophytes could be also a potential food source for the mixotrophic dinophytes
685 (Paerl et al. 2003; Myung et al., 2011).

686 Dinophytes were scarce or absent in mesotrophic and hypertrophic lagoons in 2006. In many
687 coastal waters, dinophytes occurrence is generally attributed to eutrophication (Anderson et
688 al., 2002; Heisler et al., 2008). However in the coastal lagoons in the South of France,
689 dinophytes have been reported mainly for oligotrophic and mesotrophic marine lagoons
690 (Collos et al., 2009; Bec et al., 2011). Hence, it was suggested that habitat disturbance,
691 species displacement and low turbulence could favor dinophytes occurrences. Due to
692 relatively low growth rates, it is expected that this functional group is better adapted under
693 low-nutrient and low turbulence conditions (Margalef, 1978). After the nutrient reduction, all
694 lagoons showed increasing proportion and occurrence of peridinin-rich dinophytes with time.

695 In eutrophic lagoons, the phytoplankton composition has shifted from diatoms to dinophytes.
696 This shift has already been observed during the re-oligotrophication of coastal ecosystems
697 caused by a reduction of phosphorus loadings (Yamamoto, 2003; Collos et al., 2009). In these
698 systems, the depletion of inorganic phosphorus may have led to blooms of dinophytes that can

699 utilize dissolved organic phosphorus (Seto Inland Sea) or picocyanobacteria as an additional
700 resource (Thau lagoon). Thus, the ability of dinophytes to grow while the availability of
701 inorganic nutrients decreases could be related to their ability to supplement their photo-
702 autotrophy by mixotrophy (Smayda and Reynolds, 2003; Litchman et al., 2007). Mixotrophy
703 could provide a unique resource niche under steady-state summertime conditions in coastal
704 and estuarine environments (Stickney et al., 2000). In freshwater lakes, mixotrophic flagellate
705 species (dinophytes, chrysophytes, cryptophytes) have appeared or increased during the re-
706 oligotrophication process (Gaedke, 1998; Anneville and Pelletier, 2000; Van Donk et al.,
707 2008). In lake Constance, it has been argued that the mixotrophic properties of *Dinobryon*
708 (chrysophyte) are an advantage in phosphorus-poor waters and its increasing biomass may be
709 explained by the increasing underwater light due to the decreasing biomass of the other
710 phytoplankton groups (Kamjunke et al., 2007). The authors suggested that the increased
711 underwater light availability promoted the autotrophic energy gain (phagotrophic phosphorus
712 gain) of *Dinobryon*. On the other hand, as large phytoplankton biomass blooms decreased, the
713 shift in species composition may have led to greater prevalence of some species such as
714 dinophytes that can fill that niche (Anderson et al., 2002).

715

716 4.3. Phytoplankton trajectories during re-oligotrophication process

717 The functional approach was used to understand the phytoplankton community patterns since
718 the re-oligotrophication started in the Palavasian lagoons. The analysis of four major
719 functional phytoplankton groups, through algal strategies and adaptations, revealed that the
720 trajectories of the phytoplankton community displayed a complex response to changing
721 nutrient loads over time. The trajectories of coastal ecosystems during re-oligotrophication
722 may be more complex than expected as other control factors maybe changing at the same time
723 (Duarte et al., 2009).

724 During the 8-year lagoon monitoring, the decrease of chlorophyll biomass is associated to
725 changes of phytoplankton diversity that are strongly linked to the prior trophic status of the
726 lagoons. Diversity, evenness and richness of phytoplanktonic groups were higher in
727 mesotrophic lagoons than in the most eutrophic ones. In ecosystems with high production,
728 diversity is generally reduced by competitive exclusion while it is maximized at
729 “intermediate” disturbance and production level (Huston, 1979; Duarte et al., 2006 and
730 references therein). The diversity changes reflected the modifications of the community
731 structure in response of the reduction of effluent nutrient loads. While Chl *a*, TN and TP
732 concentrations decreased strongly and quickly, the diversity of main phytoplanktonic groups
733 responded to the nutrient reduction over a much longer period. Throughout the monitoring,
734 the diversity patterns were marked by a strong variability in eutrophic and hypertrophic
735 lagoons whereas phytoplankton community structure reached the highest diversity and
736 stability (since 2010) in mesotrophic lagoons. Eutrophic and hypertrophic lagoons are still
737 subjected to environmental fluctuations (i.e. fluctuating nutrient supply) or disturbance related
738 to freshwater inputs from multiple canalization (See Methods) that can explain the
739 fluctuations of phytoplankton diversity. Moreover, as high nutrient availability tends to
740 reduce phytoplankton diversity by favoring fast-growing species (Huston, 1979; Duarte et al.,
741 2006), algal coexistence should be facilitated and thus phytoplankton diversity should
742 increase in time with the decreasing of nutrient availability in lagoons as observed in
743 mesotrophic ones.

744 Therefore, the responses of lagoon phytoplankton community to re-oligotrophication are not a
745 linear process that remains vulnerable to potential nutrient loads associated to rain events or to
746 interannual climate variations. Indeed, as during the summer of 2011, the re-oligotrophication
747 trend could be temporarily reversed by climatic conditions. The chlorophyll biomass and the
748 proportion of chlorophytes increased in all lagoons. This year presented a record of elevated

749 air temperature (1.5°C warmer than the 1900-2011 average). The spring was exceptionally
750 warm and allowed early phytoplankton growth while summer presented particularly
751 important rainfall and storm events, bringing nutrients to the lagoons (www.meteofrance.fr).
752 The year 2011 represented an exception compared to the 8-year lagoon monitoring period but
753 showed that the phytoplankton trajectories are fragile and can be reversed. In coastal
754 ecosystems, the re-oligotrophication may follow the reduction of sewage nutrient inputs but
755 may be affected by anthropogenic disturbance or by natural phenomena including rainfall
756 events or record flood years (Saeck et al., 2013).

757 This study showed that changes of phytoplankton community structure and composition are a
758 first step in restoration of water column for the Palavasian lagoons. Even if external nutrient
759 loadings decreased, high internal nutrient loads that have accumulated in the sediments during
760 the eutrophication period may release nutrients in the water column, particularly during
761 summer, delaying the recovery of lagoons in the long term as observed for lakes (Jeppesen et
762 al., 2005; Sondergaard et al., 2007). The increase of the light penetration, permitted by the
763 reduction of the phytoplankton biomass, initiated recently a shift among the primary
764 producers, with the reappearance of the macroalgae particularly in the most eutrophied
765 lagoons (work in progress). Benthic macroalgae can outcompete phytoplankton for nutrients,
766 especially if the major nutrient supply is internal loading from mineralization from sediments
767 (McGlathery et al., 2007). This primary producer reduces the flux of nutrients from the
768 sediment to the water column, which limits the supply of nutrients for phytoplankton growth.

769 By competition for nutrient and light, macroalgae could directly influence the phytoplankton
770 diversity and community structure during the re-oligotrophication process. Inversely to the
771 shift from benthic to pelagic-dominated primary producers occurring during eutrophication
772 (Bricker et al., 2008), Palavasian lagoons could expect a shift from a system pelagic-

773 dominated productivity based on phytoplankton to a more benthic-dominated system based on
774 macroalgae and seagrasses.

775

776 *Acknowledgements*

777 Amandine Leruste was supported by a PhD fellowship from the French Ministry of
778 Education, Higher Education and Scientific Research attributed by the Doctoral School
779 SIBAGHE in Montpellier. This paper uses data from the Lagoon Monitoring Network
780 (Réseau de Suivi Lagunaire) funded by Agence de l'Eau, Région Languedoc-Roussillon and
781 Ifremer. We thank the staff of the Ifremer laboratories in Languedoc-Roussillon for data
782 collection. We thank Annie Pastoureaud and André Vaquer for having initiated the HPLC
783 pigment analysis in the framework of the Lagoon Monitoring Network. This paper is
784 dedicated to the memory of Yves Collos (1949-2015).

785

786 **References**

- 787 Agawin, N.S.R., Duarte, C.M., Agusti, S., 2000. Nutrient and temperature control of the
788 Contribution of Picoplankton to Phytoplankton Biomass and Production. *Limnol. Oceanogr.*
789 45, 591–600.
- 790 Anderson, D.M., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., 2002. Harmful algal blooms and
791 eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25, 704–726.
792 doi:10.1007/BF02804901
- 793 Anderson, M.J., 2001. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance.
794 *Austral Ecol.* 26, 32–46. doi:10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x
- 795 Anneville, O., Pelletier, J.P., 2000. Recovery of lake Geneva from eutrophication:
796 quantitative response of phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* 148, 607–624.
- 797 Bec, B., Collos, Y., Vaquer, A., Mouillot, D., Souchu, P., 2008. Growth rate peaks at
798 intermediate cell size in marine photosynthetic picoeukaryotes. *Limnol. Oceanogr.* 53, 863–
799 867. doi:10.4319/lo.2008.53.2.0863
- 800 Bec, B., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V.,
801 Laugier, T., 2011. Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an
802 anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquat.*
803 *Microb. Ecol.* 63, 29–45. doi:10.3354/ame01480
- 804 Bell, T., Kalff, J., 2001. The contribution of picophytoplankton in marine and freshwater
805 systems of different trophic status and depth. *Limnol. Oceanogr.* 46, 1243–1248.
- 806 Bergmann, T., 2004. The physiological ecology and natural distribution patterns of
807 *Cryptomonas* Aagae in coastal aquatic ecosystems. New Brunswick Rutgers, The State
808 University of New Jersey.
- 809 Boesch, D.F., 2002. Challenges and opportunities for science in reducing nutrient over-
810 enrichment of coastal ecosystems. *Estuaries* 25, 886–900. doi:10.1007/BF02804914
- 811 Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., Perez, M.D., 2005. Influence of hydrology on
812 phytoplankton species composition and life strategies in a subtropical coastal lagoon
813 periodically connected with the Atlantic Ocean. *Estuaries* 28, 884–895.
814 doi:10.1007/BF02696017
- 815 Bricker, S.B., Longstaff, B., Dennison, W., Jones, A., Boicourt, K., Wicks, C., Woerner, J.,
816 2008. Effects of nutrient enrichment in the nation’s estuaries: A decade of change. *Harmful*
817 *Algae* 8, 21–32. doi:10.1016/j.hal.2008.08.028
- 818 Bullock, J.M., Aronson, J., Newton, A.C., Pywell, R.F., Rey-Benayas, J.M., 2011.
819 Restoration of ecosystem services and biodiversity: conflicts and opportunities. *Trends Ecol.*
820 *Evol.* 26, 541–549. doi:10.1016/j.tree.2011.06.011
- 821 Burford, M.A., Revill, A.T., Clementson, J.S.L., 2012. Effect of sewage nutrients on algal
822 production, biomass and pigments in tropical tidal creeks. *Mar. Pollut. Bull.* 64, 2671–2680.
- 823 Bustillos-Guzmán, J., Gárate-Lizárraga, I., López-Cortés, D., Hernández-Sandoval, F., 2004.
824 The use of pigment “fingerprints” in the study of harmful algal blooms. *Rev. Biol. Trop.* 52
825 Suppl 1, 17–26.
- 826 Carlier, A., Riera, P., Amouroux, J.-M., Bodiou, J.-Y., Desmalades, M., Gremare, A., 2008.
827 Food web structure of two Mediterranean lagoons under varying degree of eutrophication. *J.*
828 *Sea Res.* 60, 287–298. doi:10.1016/j.seares.2008.10.006
- 829 Cartaxana, P., Mendes, C.R., Brotas, V., 2009. Phytoplankton and ecological assessment of
830 brackish and freshwater coastal lagoons in the Algarve, Portugal. *Lakes Reserv. Res. Manag.*
831 14, 221–230. doi:10.1111/j.1440-1770.2009.00405.x
- 832 Cebrian, J., Corcoran, D., Lartigue, J., 2014. Eutrophication-driven shifts in primary
833 producers in shallow coastal systems: implications for system functional Change. *Estuaries*
834 *Coasts* 37, S180–S197. doi:10.1007/s12237-013-9689-x

- 835 Chang, F.H., Zeldis, J., Gall, M., Hall, J., 2003. Seasonal and spatial variation of
836 phytoplankton assemblages, biomass and cell size from spring to summer across the north-
837 eastern New Zealand continental shelf. *J. Plankton Res.* 25, 737–758.
838 doi:10.1093/plankt/25.7.737
- 839 Chisholm, S.W., 1992. Phytoplankton size, in: Falkowski, P.G., Woodhead, A.D., Vivirito, K.
840 (Eds.), *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*, Environmental Science
841 Research. Springer US, pp. 213–237.
- 842 Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem.
843 *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 210, 223–253. doi:10.3354/meps210223
- 844 Coelho, S., Gamito, S., Perez-Ruzafa, A., 2007. Trophic state of Foz de Almargem coastal
845 lagoon (Algarve, South Portugal) based on the water quality and the phytoplankton
846 community. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 71, 218–231. doi:10.1016/j.ecss.2006.07.017
- 847 Collos, Y., Bec, B., Jauzein, C., Abadie, E., Laugier, T., Lautier, J., Pastoureaud, A., Souchu,
848 P., Vaquer, A., 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic
849 dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea Res* 61, 68–75.
850 doi:10.1016/j.seares.2008.05.008
- 851 Comparaison climatologique annuelle –
852 Infoclimat [[http://www.infoclimat.fr/climatologie/annee/2016/montpellier-
853 frejorgues/valeurs/07643.html](http://www.infoclimat.fr/climatologie/annee/2016/montpellier-frejorgues/valeurs/07643.html)], 20 of August 2015.
- 854 de Jonge, V.N., de Jong, D.J., 2002. Ecological restoration in coastal areas in the Netherlands:
855 concepts, dilemmas and some examples. *Hydrobiologia* 478, 7–28.
856 doi:10.1023/A:1021014310819
- 857 Domingues, R.B., Barbosa, A.B., Sommer, U., Galvao, H.M., 2011. Ammonium, nitrate and
858 phytoplankton interactions in a freshwater tidal estuarine zone: potential effects of cultural
859 eutrophication. *Aquat. Sci.* 73, 331–343. doi:10.1007/s00027-011-0180-0
- 860 Donald, D.B., Bogard, M.J., Finlay, K., Leavitt, P.R., 2011. Comparative effects of urea,
861 ammonium, and nitrate on phytoplankton abundance, community composition, and toxicity in
862 hypereutrophic freshwaters. *Limnol. Oceanogr.* 56, 2161–2175.
863 doi:10.4319/lo.2011.56.6.2161
- 864 Duarte, C.M., Conley, D.J., Carstensen, J., Sanchez-Camacho, M., 2009. Return to
865 Neverland: shifting baselines affect eutrophication restoration targets. *Estuaries Coasts* 32,
866 29–36. doi:10.1007/s12237-008-9111-2
- 867 Duarte, P., Macedo, M.F., da Fonseca, L.C., 2006. The relationship between phytoplankton
868 diversity and community function in a coastal lagoon. *Hydrobiologia* 555, 3–18.
869 doi:10.1007/s10750-005-1101-9
- 870 Eker-Develi, E., Berthon, J.-F., Canuti, E., Slabakova, N., Moncheva, S., Shtereva, G.,
871 Dzhurova, B., 2012. Phytoplankton taxonomy based on CHEMTAX and microscopy in the
872 northwestern Black Sea. *J. Mar. Syst.* 94, 18–32. doi:10.1016/j.jmarsys.2011.10.005
- 873 Elliott, M., Burdon, D., Hemingway, K.L., Aritz, S.E., 2007. Estuarine, coastal and marine
874 ecosystem restoration: confusing management and science - a revision of concepts. *Estuar.
875 Coast. Shelf Sci.* 74, 349–366. doi:10.1016/j.ecss.2007.05.034
- 876 Fischer A.M., Ryan, J.P., Levesque, C., Welschmeyer, N. 2014. Characterizing estuarine
877 plume discharge into the coastal ocean using fatty acid biomarkers and pigment analysis.
878 *Marine Environmental Research* 99, 106-116.
- 879 Gadea, I., Rodilla, M., Sospedra, J., Falco, S., Morata, T., 2013. Seasonal Dynamics of the
880 Phytoplankton Community in the Gandia Coastal Area, Southern Gulf of Valencia. *Thalassas*
881 29, 35–58.
- 882 Gaedke, U., 1998. Functional and taxonomical properties of the phytoplankton community of
883 large and deep Lake Constance: interannual variability and response to re-oligotrophication
884 (1979–1993). *Arch. Hydrobiol. Spec. Issues Adv. Limnol.* 53, 119–141.

- 885 Glibert, P.M., Boyer, J.N., Heil, C.A., Madden, C., Sturgis, B., Wazniak, C.S. 2010. Blooms
886 in lagoons: different from those of river-dominated estuaries. In: Kennish M, Paerl H (eds)
887 Coastal lagoons: critical habitats of environmental change. CRC Press, Boca Raton, FL.
888 Glibert, P.M., Fullerton, D., Burkholder, J.M., Cornwell, J.C., Kana, T.M., 2011. Ecological
889 stoichiometry, biogeochemical cycling, invasive species, and aquatic food webs: San
890 Francisco estuary and comparative Systems. *Rev. Fish. Sci.* 19, 358–417. doi:
891 10.1080/10641262.2011.611916
892 Greening, H., Janicki, A., 2006. Toward reversal of eutrophic conditions in a subtropical
893 estuary: water quality and seagrass response to nitrogen loading reductions in Tampa Bay,
894 Florida, USA. *Environ. Manage.* 38, 163–178. doi:10.1007/s00267-005-0079-4
895 Heemsbergen, D.A., Berg, M.P., Loreau, M., van Hal, J.R., Faber, J.H., Verhoef, H.A., 2004.
896 Biodiversity effects on soil processes explained by interspecific functional dissimilarity.
897 *Science* 306, 1019–1020. doi:10.1126/science.1101865
898 Heisler, J., Glibert, P.M., Burkholder, J.M., Anderson, D.M., Cochlan, W., Dennison, W.C.,
899 Dortch, Q., Gobler, C.J., Heil, C.A., Humphries, E., Lewitus, A., Magnien, R., Marshall,
900 H.G., Sellner, K., Stockwell, D.A., Stoecker, D.K., Suddleson, M., 2008. Eutrophication and
901 harmful algal blooms: A scientific consensus. *Harmful Algae* 8, 3–13.
902 doi:10.1016/j.hal.2008.08.006
903 Hepperle D, Krienitz L (2001) Systematics and ecology of chlorophyte picoplankton in
904 German inland waters along a nutrient gradient. *Int Rev Hydrobiol* 86, 269–284.
905 Ho, A.Y.T., Xu, J., Yin, K., Yuan, X., He, L., Jiang, Y., Lee, J.H.W., Anderson, D.M.,
906 Harrison, P.J., 2008. Seasonal and spatial dynamics of nutrients and phytoplankton biomass in
907 Victoria Harbour and its vicinity before and after sewage abatement. *Mar. Pollut. Bull.* 57,
908 313–324. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.04.035
909 Huston, M., 1979. A General Hypothesis of Species Diversity. *Am. Nat.* 113, 81–101.
910 Ibelings, B.W., Portielje, R., Lammens, E.H.R.R., Noordhuis, R., van den Berg, M.S., Jooisse,
911 W., Meijer, M.L., 2007. Resilience of alternative stable states during the recovery of shallow
912 lakes from eutrophication: Lake Veluwe as a case study. *Ecosystems* 10, 4–16.
913 doi:10.1007/s10021-006-9009-4
914 Jeppesen, E., Sondergaard, M., Jensen, J.P., Mortensen, E., Hansen, A.M., Jorgensen, T.,
915 1998. Cascading trophic interactions from fish to bacteria and nutrients after reduced sewage
916 loading: An 18-year study of a shallow hypertrophic lake. *Ecosystems* 1, 250–267.
917 doi:10.1007/s100219900020
918 Jeppesen, E., Sondergaard, M., Jensen, J.P., Havens, K.E., Anneville, O., Carvalho, L.,
919 Coveney, M.F., Deneke, R., Dokulil, M.T., Foy, B., Gerdeaux, D., Hampton, S.E., Hilt, S.,
920 Kangur, K., Kohler, J., Lammens, E., Lauridsen, T.L., Manca, M., Miracle, M.R., Moss, B.,
921 Noges, P., Persson, G., Phillips, G., Portielje, R., Schelske, C.L., Straile, D., Tatrai, I., Willen,
922 E., Winder, M., 2005. Lake responses to reduced nutrient loading - an analysis of
923 contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshw. Biol.* 50, 1747–1771.
924 doi:10.1111/j.1365-2427.2005.01415.x
925 Jeppesen, E., Sondergaard, M., Meerhoff, M., Lauridsen, T.L., Jensen, J.P., 2007. Shallow
926 lake restoration by nutrient loading reduction - some recent findings and challenges ahead.
927 *Hydrobiologia* 584, 239–252. doi:10.1007/s10750-007-0596-7
928 Kamenir, Y., Morabito, G., 2009. Lago Maggiore oligotrophication as seen from the long-
929 term evolution of its phytoplankton taxonomic size structure. *J. Limnol.* 68, 146–161.
930 Kamjunke, N., Henrichs, T., Gaedke, U., 2007. Phosphorus gain by bacterivory promotes the
931 mixotrophic flagellate *Dinobryon* spp. during re-oligotrophication. *J. Plankton Res.* 29, 39-46
932 doi:10.1093/plankt/fbl054
933 Katsiapi, M., Moustaka-Gouni, M., Vardaka, E., Kormas, K.A., 2013. Different
934 phytoplankton descriptors show asynchronous changes in a shallow urban lake (L. Kastoria,

- 935 Greece) after sewage diversion. *Fundam. Appl. Limnol.* 182, 219–230. doi:10.1127/1863-
936 9135/2013/0362
- 937 Kemp, W.M., Boynton, W.R., Adolf, J.E., Boesch, D.F., Boicourt, W.C., Brush, G.,
938 Cornwell, J.C., Fisher, T.R., Glibert, P.M., Hagy, J.D., Harding, L.W., Houde, E.D., Kimmel,
939 D.G., Miller, W.D., Newell, R.I.E., Roman, M.R., Smith, E.M., Stevenson, J.C., 2005.
940 Eutrophication of Chesapeake Bay: historical trends and ecological interactions. *Mar. Ecol.*
941 *Prog. Ser.* 303, 1–29.
- 942 Kennish M. and H. W. Paerl. 2010. Coastal Lagoons: Critical Habitats of Environmental
943 Change. CRC Marine Science Series, CRC Press, Boca Raton, FL.
- 944 Knopper, B., 1994. Aquatic primary production in coastal lagoons, in: *Coastal Lagoon*
945 *Processes*. Amsterdam, p. p 243–287.
- 946 Lie, A.A.Y., Wong, C.K., Lam, J.Y.C., Liu, J.H., Yung, Y.K., 2011. Changes in the nutrient
947 ratios and phytoplankton community after declines in nutrient concentrations in a semi-
948 enclosed bay in Hong Kong. *Mar. Environ. Res.* 71, 178–188.
949 doi:10.1016/j.marenvres.2011.01.001
- 950 Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M., Falkowsk, P.G., 2007. The role of
951 functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from
952 cellular to ecosystem level. *Ecology Letters* 10, 1170–1181. doi: 10.1111/j.1461-
953 0248.2007.01117.x
- 954 Litchman, E., Klausmeier, C.A., 2008. Trait-based community ecology of phytoplankton, in:
955 *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*. Annual Reviews, Palo Alto, pp. 615–
956 639.
- 957 Litchman, E., Klausmeier, C.A., Yoshiyama, K., 2009. Contrasting size evolution in marine
958 and freshwater diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2665–2670.
959 doi:10.1073/pnas.0810891106
- 960 Litchman, E., Pinto, P. de T., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., Yoshiyama, K., 2010.
961 Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia*
962 653, 15–28. doi:10.1007/s10750-010-0341-5
- 963 Livingston, R.J., 2000. Eutrophication processes in coastal systems. CRC Press.
- 964 McGlathery, K.J., Sundback, K., Anderson, I.C., 2007. Eutrophication in shallow coastal bays
965 and lagoons: the role of plants in the coastal filter. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 348, 1-18. doi:
966 10.3354/meps07132
- 967 Margalef, R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable
968 environment. *Ocean. Acta* 1, 493–509.
- 969 Meinesz, C, Derolez, V., Bouchoucha, M., 2013. Base de données "pressions sur les lagunes
970 méditerranéennes" - Analyse des liens état - pression. Report in French. Agence de l'Eau
971 Rhône-Méditerranée-Corse, Montpellier, France
- 972 Myung, G., Kim, H.S., Park, J.S., Park, M.G., Yih, W., 2011. Population growth and plastid
973 type of *Myrionecta rubra* depend on the kinds of available cryptomonad prey. *Harmful Algae*
974 10, 536–541. doi:10.1016/j.hal.2011.04.005
- 975 Neveux, J., Lantoiné, F., 1993. Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments
976 using the least squares approximation technique. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 40,
977 1747–1765. doi:10.1016/0967-0637(93)90030-7
- 978 Nixon, S.W., 1995. Coastal marine eutrophication - a definition, social causes, and future
979 concerns. *Ophelia* 41, 199–219.
- 980 Nixon, S.W., 2009. Eutrophication and the macroscope. *Hydrobiologia* 629, 5–19.
981 doi:10.1007/s10750-009-9759-z
- 982 Pachés, M., Romero, I, Martinez-Guijarro, R., Marti, C.M., Ferrer, J., 2014. Changes in
983 phytoplankton composition in a Mediterranean coastal lagoon in the Cullera Estany
984 (Comunitat Valenciana, Spain) *Water and Environment Journal* 28, 135–144.

- 985 doi:10.1111/wej.12020
- 986 Paerl, H.W., Valdes, L.M., Pinckney, J.L., Piehler, M.F., Dyble, J., Moisander, P.H., 2003.
- 987 Phytoplankton photopigments as indicators of estuarine and coastal eutrophication.
- 988 *BioScience* 53, 953–964.
- 989 Paerl, H.W., Valdes, L.M., Peierls, B.L., Adolf, J.E., Harding, Jr., L.W., 2006. Anthropogenic
- 990 and climatic influences on the eutrophication of large estuarine ecosystems. *Limnol.*
- 991 *Oceanogr.* 51, 448–462.
- 992 Paerl, H.W., Rossignol, K.L., Hall, S. N., Peierls, B.L., Wetz, M.S. 2010. Phytoplankton
- 993 community indicators of short- and long-term ecological change in the anthropogenically and
- 994 climatically impacted Neuse River estuary, North Carolina, USA. *Estuaries and Coasts* 33,
- 995 485–497.
- 996 Philippart, C.J.M., Beukema, J.J., Cadée, G.C., Dekker, R., Goedhart, P.W., van Iperen, J.M.,
- 997 Leopold, M.F., Herman, P.M.J., 2007. Impacts of nutrient reduction on coastal communities.
- 998 *Ecosystems* 10, 96–119. doi:10.1007/s10021-006-9006-7
- 999 R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R
- 1000 Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- 1001 Roy, S., Llewellyn, C.A., Egeland, E.S., 2011. *Phytoplankton Pigments: Characterization,*
- 1002 *Chemotaxonomy and Applications in Oceanography.* Cambridge University Press.
- 1003 Ruggiu, D., Morabito, G., Panzani, P., Pugnetti, A., 1998. Trends and relations among basic
- 1004 phytoplankton characteristics in the course of the long-term oligotrophication of Lake
- 1005 Maggiore (Italy). *Hydrobiologia* 370, 243–257.
- 1006 Scheffer, M., Hosper, S.H., Meijer, M.-L., Moss, B., Jeppesen, E., 1993. Alternative
- 1007 equilibria in shallow lakes. *Trends Ecol. Evol.* 8, 275–279. doi:10.1016/0169-5347(93)90254-
- 1008 M
- 1009 Scheffer, M., Carpenter, S.R., 2003. Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory
- 1010 to observation. *Trends Ecol. Evol.* 18, 648–656. doi:10.1016/j.tree.2003.09.002
- 1011 Schramm, W., 1999. Factors influencing seaweed responses to eutrophication: some results
- 1012 from EU-project EUMAC. *J. Appl. Phycol.* 11, 69–78. doi:10.1023/A:1008076026792
- 1013 Sherrard, N.J., Nimmo, M., Llewellyn, C.A., 2006. Combining HPLC pigment markers and
- 1014 ecological similarity indices to assess phytoplankton community structure: an environmental
- 1015 tool for eutrophication? *Sci. Total Environ.* 361, 97–110. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.08.058
- 1016 Smayda, T.J., Reynolds, C.S., 2003. Strategies of marine dinoflagellate survival and some
- 1017 rules of assembly. *J. Sea Res.* 49, 95–106. doi:10.1016/S1385-1101(02)00219-8
- 1018 Smith, V.H., 2006. Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and
- 1019 phosphorus enrichment. *Limnol. Oceanogr.* 51, 377–384.
- 1020 doi:10.4319/lo.2006.51.1_part_2.0377
- 1021 Sommaruga, R., Robarts, R.D., 1997. The significance of autotrophic and heterotrophic
- 1022 picoplankton in hypertrophic ecosystems. *FEMS Microbiol Ecol* 24,187–200.
- 1023 Sondergaard, M., Jensen, J.P., Jeppesen, E., 2003. Role of sediment and internal loading of
- 1024 phosphorus in shallow lakes. *Hydrobiologia* 506, 135–145.
- 1025 doi:10.1023/B:HYDR.0000008611.12704.dd
- 1026 Sondergaard, M., Jeppesen, E., Lauridsen, T.L., Skov, C., Van Nes, E.H., Roijackers, R.,
- 1027 Lammens, E., Protielje, R., 2007. Lake restoration: successes, failures and long-term effects.
- 1028 *J. Appl. Ecol.* 44, 1095-1105. doi: 10.1111/j.1365-2664.2007.01363.x
- 1029 Souchu, P., Bec, B., Smith, V.H., Laugier, T., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Collos,
- 1030 Y., Vaquer, A., 2010. Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic
- 1031 eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67,
- 1032 743–753. doi:10.1139/F10-018
- 1033 Stickney, H.L., Hood, R.R., Stoecker, D.K., 2000. The impact of mixotrophy on planktonic
- 1034 marine ecosystems. *Ecol. Model.* 125, 203–230. doi:10.1016/S0304-3800(99)00181-7

- 1035 Torres, E.S., delRio, J.G., 1995. Spatial variations of phytoplankton community structure in a
1036 highly eutrophicated coast of the Western Mediterranean Sea. *Water Sci. Technol.* 32, 313–
1037 322. doi:10.1016/0273-1223(96)00104-7
- 1038 Tournois, J., Ferraton, F., Velez, L., McKenzie, D.J., Aliaume, C., Mercier, L., Darnaude,
1039 A.M., 2013. Temporal stability of otolith elemental fingerprints discriminates among lagoon
1040 nursery habitats. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 131, 182–193. doi:10.1016/j.ecss.2013.07.006
- 1041 Van Donk, E., Hessen, D.O., Verschoor, A.M., Gulati, R.D., 2008. Re-oligotrophication by
1042 phosphorus reduction and effects on seston quality in lakes. *Limnologica* 38, 189–202.
1043 doi:10.1016/j.limno.2008.05.005
- 1044 Vidal, M., Duarte, C.M., Sanchez, M.C., 1999. Coastal eutrophication research in Europe:
1045 Progress and imbalances. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 851–854. doi:10.1016/S0025-
1046 326X(99)00030-2
- 1047 Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., Garnier, E., 2007.
1048 Let the concept of trait be functional! *Oikos* 116, 882–892. doi:10.1111/j.0030-
1049 1299.2007.15559.x
- 1050 Wasmund, N., Kell, V., 1991. Characterization of brackish coastal waters of different trophic
1051 levels by means of phytoplankton biomass and primary production. *Int. Rev. Gesamten*
1052 *Hydrobiol. Hydrogr.* 76, 361–370. doi:10.1002/iroh.19910760309
- 1053 Weng, H.-X., Qin, Y.-C., Sun, X.-W., Chen, X.-H., Chen, J.-F., 2009. Effects of light
1054 intensity on the growth of *Cryptomonas* sp (Cryptophyceae). *Environ. Geol.* 57, 9–15.
1055 doi:10.1007/s00254-008-1277-1
- 1056 Worm, B., Lotze, H.K., 2006. Effects of eutrophication, grazing, and algal blooms on rocky
1057 shores. *Limnol. Oceanogr.* 51, 569–579.
- 1058 Wright, S., Jeffrey, S., Mantoura, R., Llewellyn, C., Bjornland, T., Repeta, D., Welschmeyer,
1059 N., 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine
1060 phytoplankton. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 77, 183–196.
- 1061 Xu, J., Yin, K., Liu, H., Lee, J.H.W., Anderson, D.M., Ho, A.Y.T., Harrison, P.J., 2010. A
1062 comparison of eutrophication impacts in two harbours in Hong Kong with different
1063 hydrodynamics. *J. Mar. Syst., GEOHAB Modeling* 83, 276–286.
1064 doi:10.1016/j.jmarsys.2010.04.002
- 1065 Yamamoto, T., 2003. The Seto Inland Sea—eutrophic or oligotrophic? *Mar. Pollut. Bull.* 47,
1066 37-42. doi:10.1016/S0025-326X(02)00416-2
- 1067 Zapata, M., Rodriguez, F., Garrido, J.L., 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids
1068 from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and
1069 pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 195, 29–45.
1070 doi:10.3354/meps195029

1071 **Supplementary Materials**

1072

1073 Table S1. Statistics of mean comparison before and after the effluent diversion, of Chl *a* (μg
 1074 Chl $a.L^{-1}$), total nitrogen and total phosphorus concentrations (μM), with hypothesis =
 1075 concentration before > after (Wilcoxon test, R). Stars precise significance level (* p-value <
 1076 0.05, ** p-value < 0.005, *** p-value < 0.0005).

Lagoons	TN	TP	Chl <i>a</i>
MW	367***	359***	366***
ME	363***	351***	353***
GC	407***	405***	418***
AN	324***	318***	344***
PW	271.5***	274***	286***
PE	342.5***	324***	306***
VC	272*	295**	298**
PB	193***	183***	198***
IN	312*	350.5**	383***
IS	267.5*	304*	376***

1077

Bilan

L'étude de la réponse des communautés phytoplanctonique à la réduction des apports en nutriments inorganiques dissous a permis d'améliorer la compréhension des processus de restauration. Les résultats mis en évidence sont résumés ci-dessous et repris dans un schéma bilan (Figure 8).

La réduction des apports en phosphate et azote inorganiques dissous dans les lagunes palavasiennes a initié une chute importante de la biomasse phytoplanctonique. Cette chute s'est avérée plus importante dans les lagunes les plus proches de la sources de nutriments et étant les plus eutrophisées (Figure 8).

La chute de la biomasse a témoigné d'une réduction des abondances des cellules picoeucaryotiques, en particulier des diatomées qui n'étaient plus suffisamment compétitrices en réponse à la modification du fonctionnement nutritif des lagunes. Les apports provenant des effluents de station d'épuration ayant été fortement réduits, les flux sédimentaires d'ammonium sont devenus le principal apport d'azote dans la lagune en période estivale (Figure 8). Les algues vertes sont beaucoup plus compétitives pour cette forme d'azote par rapport aux diatomées, qui ont périclitées. Dans les lagunes les plus eutrophisées et les plus influencées par les apports continentaux, les algues vertes de petite taille sont devenues dominantes, grâce à cette compétitivité pour l'ammonium et leur faible sensibilité pour les fortes variations de salinité.

En parallèle, nous avons observé dans l'ensemble des étangs palavasiens l'émergence du groupe des Dinophytes. Ces organismes peuvent posséder des capacités d'adaptation de leur régime trophique, notamment lorsque les nutriments inorganiques dissous deviennent limitants. Dans ces conditions, ces organismes appelés « mixotrophes » peuvent consommer d'autres sources de nutriments, provenant notamment de matière organique dissoute ou particulaire, ou de la consommation de proies. Ces caractéristiques sont particulièrement avantageuses dans des écosystèmes riches en matière organique et soumis à une exacerbation de la limitation nutritive. La mixotrophie a permis aux Dinophytes de se développer aux dépens des petits organismes autotrophes, qui n'ont pas pu utiliser d'autres sources de nutriments, malgré des taux de croissance souvent réduits par rapport à ces organismes.

Dans les lagunes moins eutrophisées, une plus grande diversité d'organismes a été observée (Figure 8). Ces organismes ont témoigné de diverses stratégies d'adaptation aux conditions environnementales. La présence d'organismes capable de stocker les nutriments, ou d'utiliser la mixotrophie a reflété dans ces lagunes une limitation nutritive plus importante, indiquant un état moins dégradé ou plus avancé dans les processus de ré-oligotrophisation.

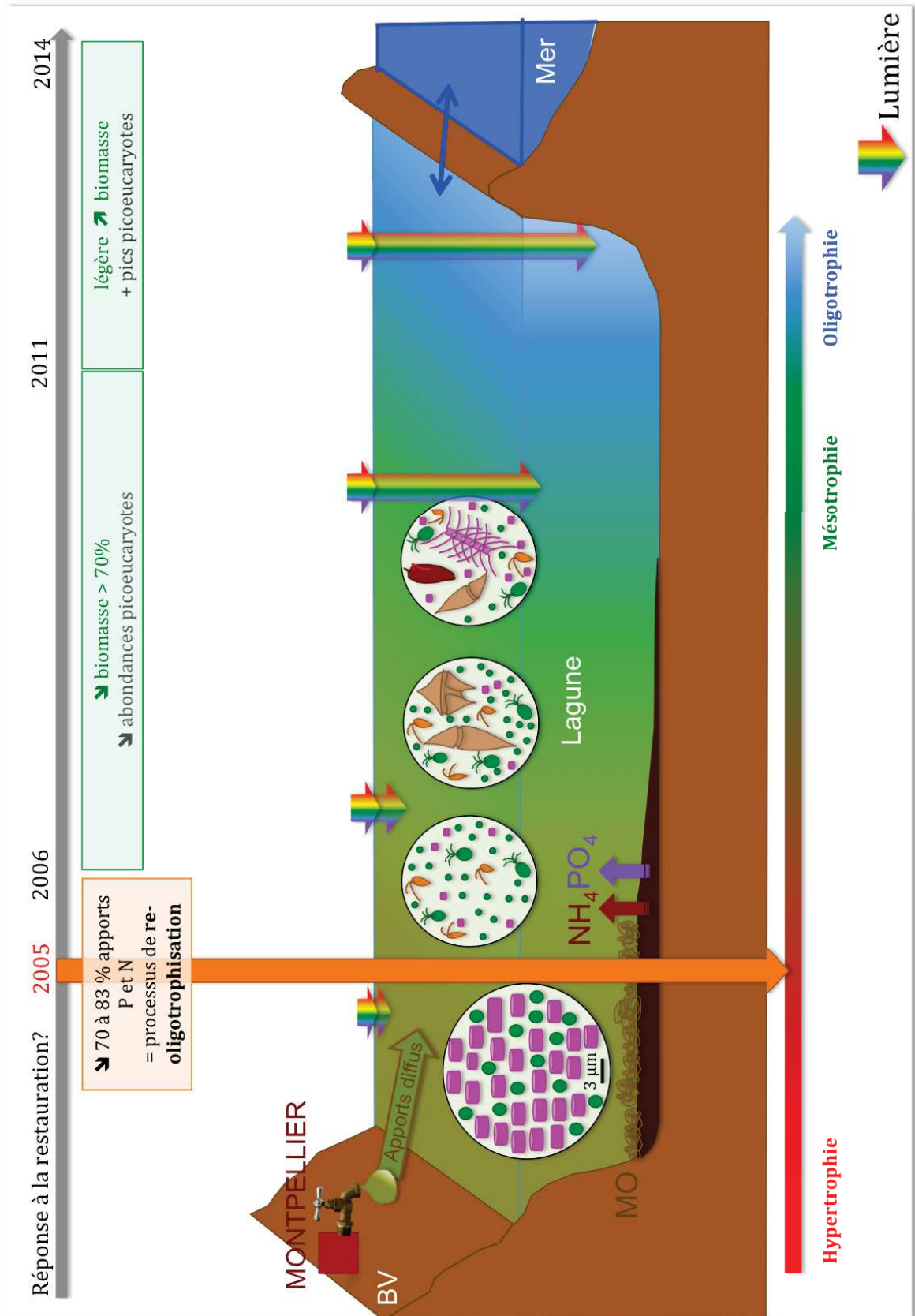


Figure 8. Schéma bilan n°1. Réponses des communautés phytoplanktoniques à la réduction des apports en nutriments inorganiques dissous dans les lagunes côtières – parallèle avec les résultats observés sur les étangs palavasiens.

**4 Variabilité des communautés phytoplanctoniques de trois lagunes aux niveaux trophiques contrastés
- analyse de deux ans de suivis mensuels**



4.1 Contexte du suivi mensuel et des expérimentations *in situ*

A l'issu des résultats obtenus dans le premier volet de cette thèse, mettant en évidence une réponse forte du phytoplancton à la réduction des apports nutritifs (Chapitre 3), il était nécessaire de caractériser la variabilité intrinsèque des communautés phytoplanctoniques au cours d'un cycle annuel. En effet, pour détecter la variabilité des communautés phytoplanctoniques suite à une perturbation telle que la réduction des apports en nutriments, la variabilité naturelle des communautés doit être connue (Smayda, 1998). De plus, les informations relatives à la variabilité saisonnière de la diversité phytoplanctonique des eaux côtières telles que les lagunes sont relativement réduites (Cloern and Jassby, 2008), en particulier dans le contexte de la mise en place de processus de re-oligotrophisation.

Dans ce cadre, nous avons sélectionné trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés, et qui présentent des caractéristiques écologiques intéressantes : Les lagunes Méjean ouest (MW), Ingril nord (IN) et Ayrolle (AYR). MW et IN appartiennent au complexe des étangs palavasiens. Elles présentent les niveaux extrêmes d'eutrophisation exhibés par les lagunes de ce complexe. AYR présente une faible dégradation anthropique et un niveau oligotrophe depuis qu'elle est étudiée (années 1999) (*cf.* Chapitre 2). Dans ces trois lagunes, nous avons étudié la variabilité saisonnière environnementale et phytoplanctonique à travers un suivi mensuel (Chapitre 4). Nous avons également précisé la variabilité saisonnière de la diversité fonctionnelle (Chapitre 5), et des stratégies d'exploitation des ressources, en conditions saturantes et limitantes dans un contexte de re-oligotrophisation (Chapitre 6) :

Ayrolle (AYR), lagune oligotrophe, dont l'étude des communautés phytoplanctoniques permet de caractériser leurs spécificités et leurs adaptations à un milieu pauvre en nutriments, et dont les principaux producteurs primaires sont des macrophytes benthiques, essentiellement représentés par *Zostera noltei* (rapports annuels RSL).

Ingril nord (IN), lagune mésotrophe, soumise depuis décembre 2005 à une réduction drastique des apports nutritifs (De Wit et al., 2015). L'étude des communautés de cette lagune relativement peu eutrophisée et dégradée à l'origine par les apports de l'agglomération de Montpellier permet de caractériser leur adaptation à un milieu intermédiaire en terme de dégradation et de productivité, mais soumis à une restauration écologique, et possédant également une population diversifiée de macrophytes comprenant des macroalgues et des phanérogames.

Méjean ouest (MW), lagune hypereutrophe, soumise depuis décembre 2005 à une réduction drastique des apports nutritifs (De Wit et al., 2015). L'étude des communautés phytoplanctoniques de cette lagune doit permettre de mettre en évidence leurs adaptations (i) à

une très forte eutrophisation, illustrée par une forte productivité et des stocks sédimentaires de nutriments toujours importants (De Wit et al., 2015), (ii) à des apports externes réduits en azote et phosphore en termes de structuration des communautés, de diversité taxonomique et fonctionnelle, et de stratégie d'exploitation des nutriments en conditions limitantes. Cette lagune présente également une forte variabilité de salinité liée à des apports d'eau douce provenant de plusieurs cours d'eau.

Pour répondre à ces questions, la première étape a été la mise en place du suivi mensuel des communautés phytoplanctoniques de ces trois lagunes. Il s'est déroulé de février 2013 à décembre 2014, et selon une approche méthodologique pluridisciplinaire permettant d'appréhender divers aspects de ces communautés :

- **La caractérisation de la biomasse phytoplanctonique**, permettant de comparer le rythme de production du phytoplancton, en relation avec la saisonnalité des conditions environnementales, dont la température et les apports nutritifs (*cf.* Chapitre 2). Cette étude a également permis de sélectionner les périodes présentant des efflorescences algales où la croissance est suffisante pour permettre l'étude des taux de croissance et la réponse à un enrichissement nutritif (Chapitre 6).

- **La structuration par classe de taille**, à travers l'étude de la contribution de l'ultra, du nano- et du microphytoplancton à la biomasse totale, mais également en terme de diversité phytoplanctonique illustrée par la composition pigmentaire (*cf.* Chapitre 2). Ces mesures ont permis d'identifier les principaux groupes phytoplanctoniques colonisant les trois lagunes, et de mettre en relation la variabilité saisonnière de la composition de ces communautés avec le fonctionnement de leur écosystème.

- **Les abondances et la diversité des groupes taxonomiques** identifiés en cytométrie en flux pour les organismes $<3 \mu\text{m}$ et en microscopie optique pour les organismes $>3 \mu\text{m}$. Certains traits fonctionnels tels que le régime trophique et la présence d'organes locomoteurs ont également été complétés grâce à la microscopie à épifluorescence (*cf.* Chapitre 2). Ces mesures ont permis de préciser les taxons présents au cours du cycle annuel et leurs fonctions dans les trois lagunes.

Ce Chapitre 4 sert avant tout à l'introduction des chapitres suivants. Il présente la variabilité des caractéristiques des communautés phytoplanctoniques des trois lagunes sélectionnées. Sur la base de ces observations, certaines caractéristiques fonctionnelles seront précisées dans les chapitres suivants. Nous allons donc présenter une partie des résultats majeurs obtenus à l'issue des 23 mois de suivi des communautés phytoplanctoniques, apportant des informations complémentaires au Chapitre 3, et utiles à la compréhension de la

méthodologie et des résultats des Chapitres 5 et 6. L'analyse des résultats de ce suivi a fait l'objet du Projet Industriel de Fin d'Etude d'Audrey Belli, étudiante à Polytech Montpellier.

4.2 Paramètres physico-chimiques

Les caractéristiques physico-chimiques des trois lagunes au cours des 23 mois de suivi (février 2013 à décembre 2014) sont résumées dans le tableau 5. Les températures des trois lagunes ont évolué de façon similaire au cours des deux années et ont reflété la saisonnalité du climat tempéré. Les températures les plus basses ont été observées entre novembre et janvier, tandis que les températures les plus élevées ont été mesurées en juillet.

Les mesures de salinité ont mis en évidence une forte variabilité dans la lagune hypereutrophe MW, une variabilité intermédiaire dans la lagune mésotrophe IN, et une faible variabilité dans la lagune oligotrophe AYR (Tableau 5). Globalement, MW a montré la plus faible salinité, tandis qu'IN a montré les salinités les plus fortes (jusqu'à 41,1).

Tableau 5. Caractéristiques environnementales des lagunes oligo- (AYR), méso- (IN) et hypereutrophe (MW) au cours des 23 mois de suivi. Valeurs moyennes, minimales et maximales de février 2013 à décembre 2014.

Station		Temp (°C)	Salinité	NH ₄ ⁺	NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Nt	PO ₄ ³⁻	Pt
AYR	Moy	15,7	31,3	4,06	1,20	0,24	29,3	0,09	0,71
	Min	5,1	21,1	0,10	0,00	0,00	13,8	0,00	0,32
	Max	25,2	37,5	42,8	22,2	3,60	93,2	0,26	2,27
IN	Moy	16,9	33,3	4,63	4,58	0,89	36,3	0,26	0,90
	Min	7,0	16,5	0,21	0,00	0,00	12,7	0,00	0,46
	Max	28,2	41,1	23,4	33,6	8,09	92,2	1,53	2,46
MW	Moy	16,9	22,8	2,53	3,90	0,25	55,6	1,24	2,88
	Min	6,2	7,6	0,10	0,00	0,00	18,4	0,05	0,60
	Max	26,9	36,6	14,6	41,7	1,12	159	7,58	11,4

Les concentrations moyennes en azote et en phosphore totales (Nt et Pt) ont illustré le gradient d'eutrophisation, les plus faibles valeurs moyennes ayant été observées dans la lagune oligotrophe (29,3 µM en Nt, 0,71 µM en Pt) et les plus élevées dans la lagune hypereutrophe (55,6 µM en Nt, 2,88 µM en Pt) (Tableau 5). Les concentrations en nutriments dissous n'ont pas reflété le gradient (Tableau 5), et ont montré une variabilité saisonnière marquée (Figure 9). Excepté pour la saison estivale, la lagune oligotrophe a montré les plus faibles concentrations cumulées en nutriments dissous. La concentration en ammonium dans la lagune oligotrophe en août 2014 d'une valeur de 42,8 µM représente la valeur maximale pour cette lagune.

Globalement, la lagune hypereutrophe a présenté les concentrations en phosphate les plus fortes, à l'exception de l'automne où les concentrations étaient légèrement supérieures dans la lagune mésotrophe. Les concentrations en azote inorganique dissous étaient en moyenne maximales à IN, bien qu'AYR ait présenté la concentration maximale en ammonium, et MW en nitrates (Tableau 5). Si la lagune oligotrophe a présenté la concentration maximale en ammonium en été, les étangs palavasiens ont montré des concentrations maximales en automne (23,4 μM à IN en novembre 2014 ; 14,5 μM à MW en octobre 2014). Les concentrations maximales en nitrates ont été mesurées en automne dans les trois lagunes, MW montrant la valeur la plus forte en décembre 2014 (41,6 μM). Globalement, l'azote inorganique dissous était majoritairement représenté sous forme d'ammonium, excepté en hiver où le nitrate était dominant dans la colonne d'eau (Figure 9).

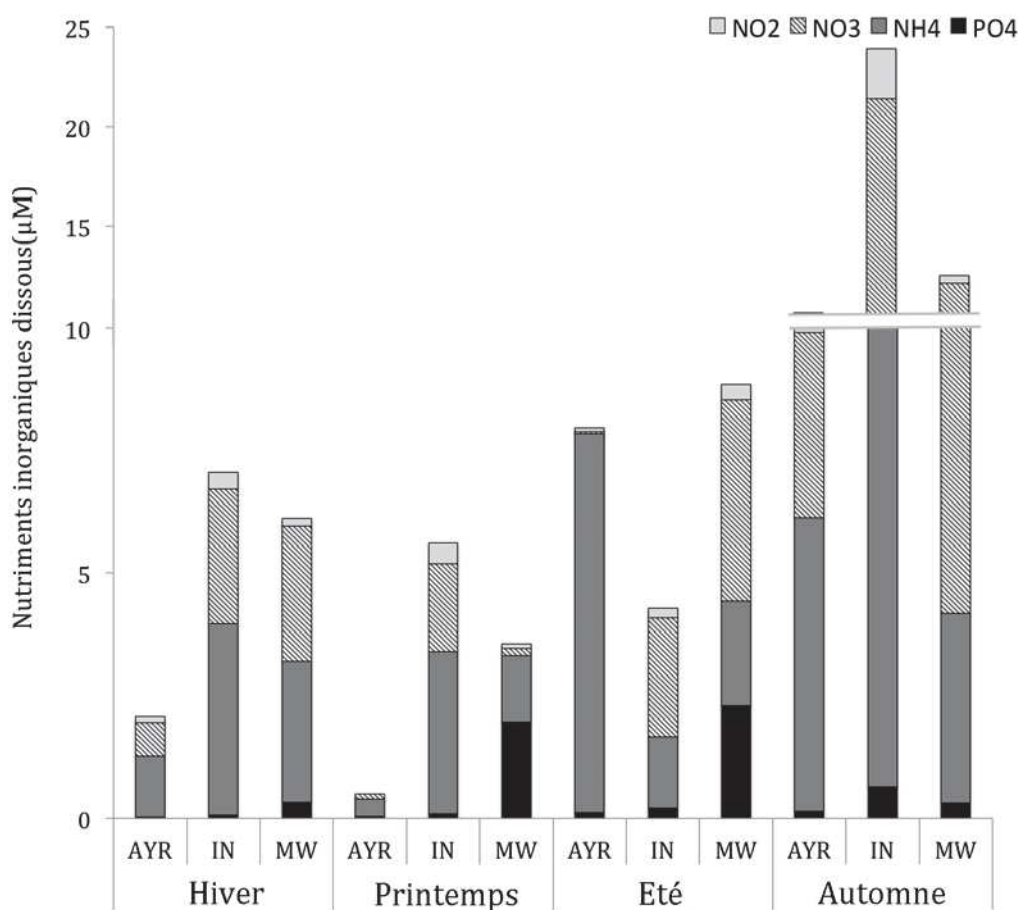


Figure 9. Variation des moyennes des concentrations cumulées en nutriments inorganiques dissous durant les saisons hivernales, printanières, estivales et automnales 2013 et 2014 dans les trois lagunes AYR, IN, et MW.

Un indice de variabilité environnementale a été calculé sur la base de la variabilité de la salinité, la température, les concentrations en azote et en phosphore totales, et la biomasse

estimée par la concentration en chlorophylle *a* (Maurice et al., 2013), les trois derniers illustrant le niveau d'eutrophisation des lagunes (Figure 10). Globalement, la variabilité a augmenté avec l'eutrophisation des lagunes, l'indice de variabilité le plus faible appartenant à la lagune oligotrophe et le plus élevé à la lagune hypereutrophe (3,0 et 3,7 respectivement).

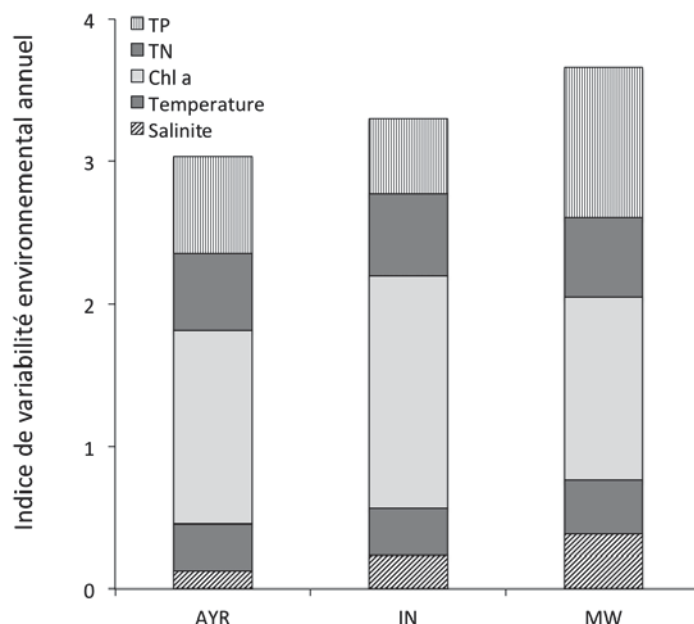


Figure 10. Indice de variabilité annuel des paramètres environnementaux, basé sur les valeurs salinité, température, concentrations en azote total, phosphore total et Chl *a* ; de février 2013 à décembre 2014, pour les lagunes AYR, IN, et MW.

4.3 Variabilité de la biomasse phytoplanctonique

Le suivi mensuel de la biomasse phytoplanctonique totale et fractionnée en trois classes de taille a permis de mettre en évidence plusieurs différences majeures dans la structuration des communautés des trois lagunes et leur variabilité saisonnière (Figure 11).

Les biomasses moyennes observées dans les trois lagunes sur les deux années ont reflété leur niveau d'eutrophisation, allant en moyenne de 1,42 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour AYR (Fig. 11 A), à 3,49 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour IN (Fig. 11 B) et 9,27 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour MW (Fig. 11 C). De plus, la lagune hypereutrophe a montré la biomasse maximale la plus élevée (39,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en juillet 2014), supérieure à celle des lagunes mésotrophe (23,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en juillet 2014) et oligotrophe (7,53 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en octobre 2014). La plus forte variabilité a donc été observée dans MW (de 0,90 à 39,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$) et la plus faible dans AYR (de 0,11 à 7,53 $\mu\text{g.L}^{-1}$), IN présentant des valeurs intermédiaires (de 0,79 à 23,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Par ailleurs, les niveaux de concentration en pigments accessoires mesurés par HPLC reflètent également le niveau d'eutrophisation, AYR ayant les plus faibles et MW les plus élevées.

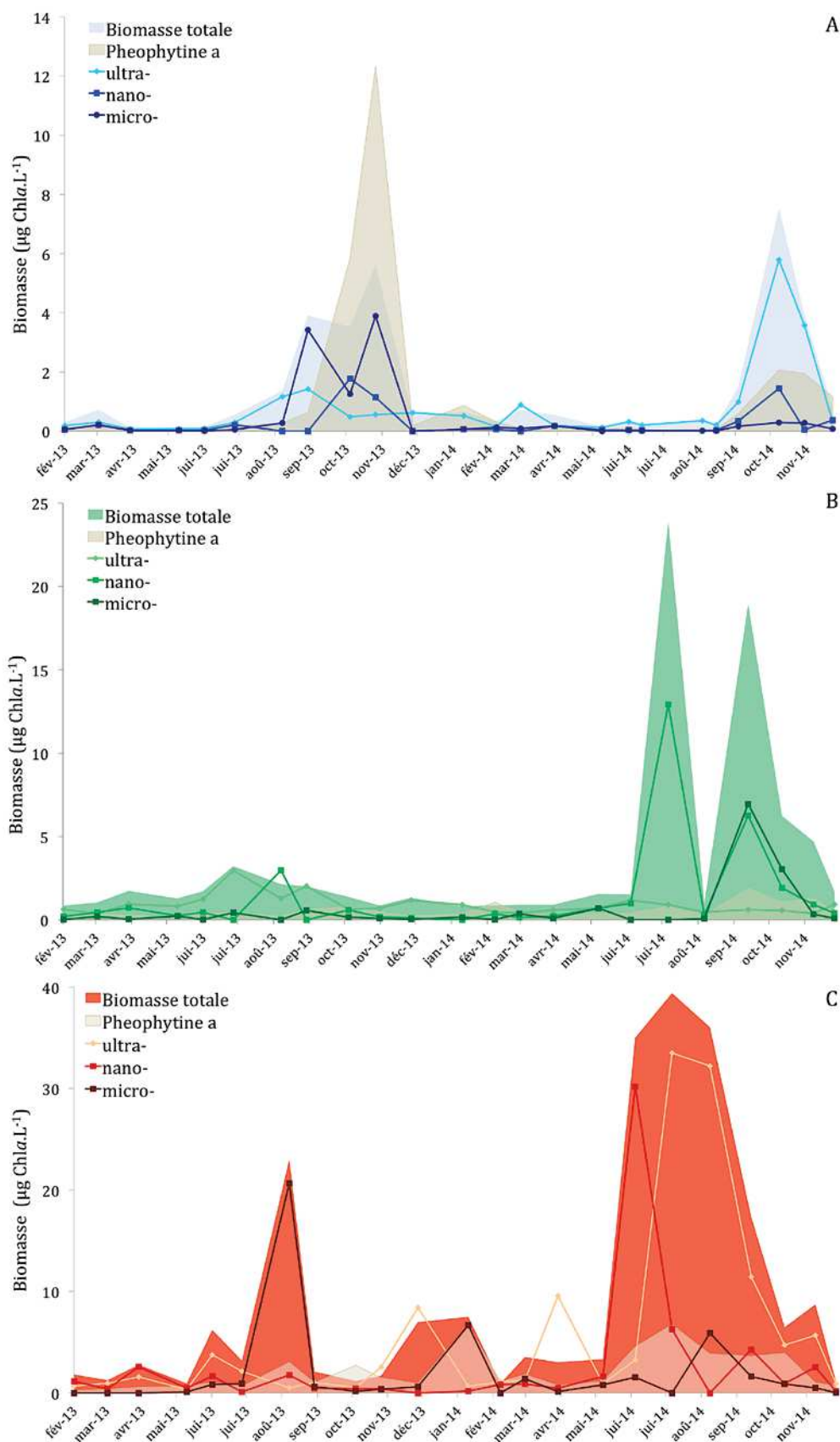


Figure 11. Biomasse phytoplanctonique totale et fractionnée par classe de taille dans les lagunes oligo- (AYR, fig. A), meso- (IN, fig. B) et hypereutrophe (MW, fig. C), associée au signal de Phéophytine *a*, de février 2013 à décembre 2014.

La rythmicité des communautés phytoplanctoniques dans les trois lagunes est également différente (Fig. 11). Dans la lagune oligotrophe, les pics de biomasse ont été mesurés en fin d'été et au cours de l'automne, avec des optimums de 5,59 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en novembre 2013 à 7,53 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en octobre 2014 (Fig. 11 A). Ces pics interviennent postérieurement à ceux observés dans les lagunes palavasiennes. En effet, dans la lagune mésotrophe, les pics de biomasses ont été observés entre juillet et octobre, avec des optimums de 3,22 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en juillet 2013 à 23,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en juillet 2014 (Fig. 11 B). Dans la lagune hypereutrophe, les pics de biomasses ont été mesurés entre juin et septembre, avec des optimums de 22,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en août 2013 à 39,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en juillet 2014 (Fig. 11 C). Les lagunes palavasiennes ont également exhibé une légère hausse de biomasse en avril 2013, mais cette tendance ne s'est pas reproduite en 2014. Enfin, la lagune mésotrophe a témoigné d'un pic de biomasse automnal de 18,9 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en septembre 2014, et la lagune hypereutrophe a témoigné d'un pic hivernal ayant atteint 7,49 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en janvier 2014. Le signal de phéophytine *a*, indicateur de cellules phytoplanctoniques dégradées ou de débris végétaux a montré des concentrations particulièrement élevées dans la lagune oligotrophe (Fig. 11 A). Plus particulièrement, des pics de phéophytine concomitants aux pics de chl *a* suggèrent une surestimation de la biomasse phytoplanctonique durant ces périodes. Ce signal fort, reflétant une forte remise en suspension sédimentaire et détritique, témoigne d'une origine benthique de la Chl *a* (microphytobenthos ou débris végétaux).

Sur les deux années, les niveaux de biomasse ont été beaucoup plus importants au cours de l'année 2014 par rapport à 2013, en particulier lors des périodes estivales plus favorables à la croissance phytoplanctonique en termes de température et d'ensoleillement. Entre 2013 et 2014, le pic de biomasse automnal de la lagune oligotrophe a augmenté de 34,5 %, le pic estival a augmenté de 641 % dans la lagune mésotrophe, et de 71,8 % dans la lagune hypereutrophe.

En terme de structuration, l'ultraphytoplancton a globalement dominé le phytoplancton des trois lagunes (Fig. 11). Néanmoins, le nano- et le microphytoplancton ont montré une participation accrue à la biomasse totale, notamment durant les pics automnaux dans la lagune oligotrophe. Cette observation renforce le postulat que ces biomasses reflètent le microphytobenthos ou des débris végétaux plutôt que le phytoplancton qui est principalement ultraphytoplanctonique dans cette lagune. Par ailleurs, la biomasse ultraphytoplanctonique a connu une hausse de juin à septembre 2013, avant l'augmentation de la phéophytine *a*, ce qui laisse supposer un rythme plus proche de celui des étangs palavasiens que celui de l'année suivante. Cependant, au sein des organismes $<6 \mu\text{m}$, les abondances cellulaires de picoeucaryotes ont augmenté à partir de mai jusqu'à un pic en septembre 2013 à $3,53 \times 10^8 \text{ cells.L}^{-1}$ (Fig. 12 A). De la même manière qu'en 2013, on observe en 2014 une augmentation progressive des abondances cellulaires, concernant cette fois les eucaryotes entre 3 et $6 \mu\text{m}$, à

partir de juillet 2014 jusqu'au pic en octobre ($8,20 \times 10^8$ cells.L⁻¹). Globalement, au sein de l'ultraphytoplancton, les eucaryotes sont restés largement dominants, mais des picocyanobactéries riches en phycocyanine sont aussi apparues lors des pics de biomasses et d'abondances entre juillet et octobre 2013 et 2014. Les picocyanobactéries riches en phycoérythrine étaient également présentes en faible abondance lors des périodes automnales et hivernales, d'octobre à novembre 2013 et d'octobre à décembre 2014.

Le phytoplancton de la lagune mésotrophe était également dominé par l'ultraphytoplancton, bien qu'un shift marqué ait été observé lors des pics de biomasses estivaux (Fig. 11 B). En 2013, le pic de biomasse estival s'est traduit par un shift de l'ultra- au nanophytoplancton. En 2014, le pic de biomasse estival était largement dominé par le nanophytoplancton ($12,92 \mu\text{g.L}^{-1}$), alors que le pic de biomasse automnal était co-dominé par le micro- et le nanophytoplancton ($6,96$ et $6,25 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ respectivement). En terme de composition, l'ultraphytoplancton était dominé au cours de l'année 2013 par les picoeucaryotes (jusqu'à $3,16 \times 10^9$ cells.L⁻¹ en juillet 2013) (Fig. 12 B). En 2014, la tendance était très différente : Les abondances des picoeucaryotes étaient bien moins élevées, au maximum $3,26 \times 10^8$ cells.L⁻¹, soit 10 fois moins qu'en 2013. De la même façon que dans la lagune oligotrophe, l'année 2014 s'est différenciée de 2013 par des abondances d'eucaryotes entre 3 et 6 μm plus importantes.

Dans la lagune hypereutrophe, l'ultra-, le nano et le microphytoplancton ont alternativement dominé la communauté phytoplanctonique (Fig. 11 C). Au printemps 2013, le nano- dominait la communauté. La biomasse ultraphytoplanctonique a ensuite augmenté, remplacée lors du pic estival par le microphytoplancton (90,1 %). La fraction ultraphytoplanctonique lors de ce pic était alors exclusivement picoeucaryotique (Fig. 12 C). A l'issue de ce pic, la biomasse était à nouveau principalement portée par l'ultraphytoplancton, appartenant majoritairement aux eucaryotes entre 3 et 5 μm (Fig. 12 C). Cette tendance s'est poursuivie jusqu'au pic de biomasse hivernal, au cours duquel on a observé un shift de l'ultraphytoplancton dominant en décembre 2013 au microphytoplancton en janvier 2014 (89,2 %). Les mois suivants ont également montré une dominance de l'ultraphytoplancton, jusqu'au pic de biomasse en juin 2014. Au cours de ce pic estival, on a également pu mettre en évidence un shift du nano- (86,3 %) à l'ultraphytoplancton, qui représentait entre 85,1 et 89,4 % de la biomasse totale en août et septembre 2014, puis est resté dominant jusqu'à la fin de l'année. Lors de cette période, la biomasse était majoritairement portée par des picoeucaryotes, dont les abondances ont atteint $2,0 \times 10^{10}$ cells.L⁻¹ en septembre 2014. Cette période a également été marquée par une forte hausse des abondances de picocyanobactéries riches en phycocyanine, ayant atteint $3,31 \times 10^9$ cells.L⁻¹ en septembre 2014.

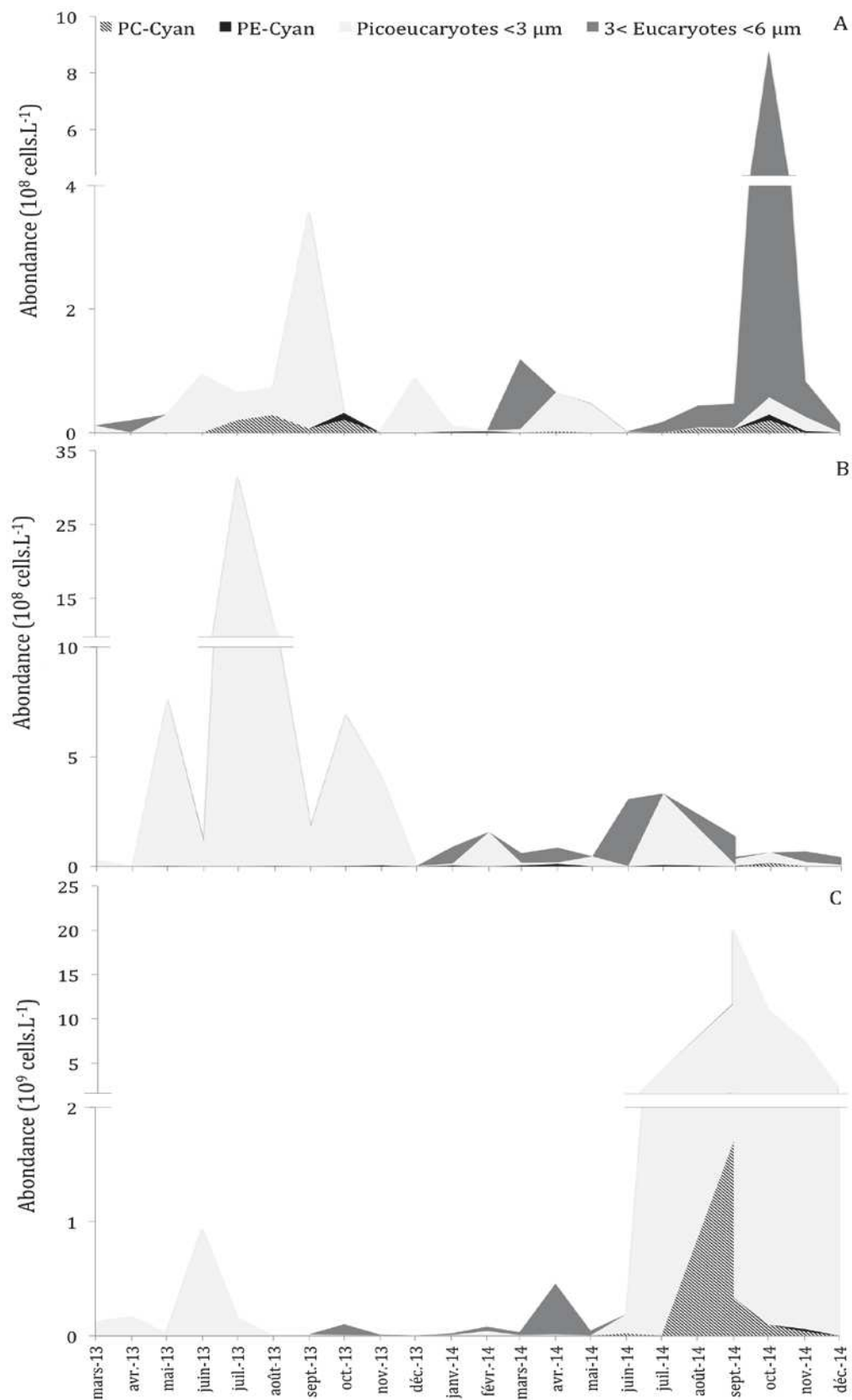


Figure 12. Abondances cellulaires des organismes autotrophes inférieurs à 6 μm dans les lagunes oligo- (AYR, Fig. A), méso- (IN, Fig. B), et hypereutrophes (MW, Fig. C), de février 2013 à décembre 2014.

4.4 Diversité taxonomique et fonctionnelle du phytoplancton

La composition en pigments indicateurs de certains groupes phytoplanctoniques reflétant la diversité taxonomique et fonctionnelle du phytoplancton montre une composition des communautés spécifique à chaque lagune (Figure 13).

En moyenne sur les deux années, la lagune oligotrophe a présenté une dominance de pigments marqueurs des Diatomées (Fucoxanthine : $0,20 \mu\text{g.L}^{-1}$) et des Dinophytes (Péridinine : $0,16 \mu\text{g.L}^{-1}$), les autres pigments possédant des concentrations inférieures à $0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 13 A). Dans la lagune mésotrophe, la composition pigmentaire suggère une population plus diversifiée, globalement dominée par les Diatomées (Fuco : $0,92 \mu\text{g.L}^{-1}$), associée à des proportions importantes de Cryptophytes, d'Algues vertes, de Dinophytes et de Prasinophytes (Allo : $0,26 \mu\text{g.L}^{-1}$; Chl *b* : $0,26 \mu\text{g.L}^{-1}$; Péri : $0,23 \mu\text{g.L}^{-1}$ et Prasincoxanthine : $0,12 \mu\text{g.L}^{-1}$), les autres pigments ayant des concentrations inférieures à $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Fig. 13 B). Dans la lagune hypereutrophe, quatre pigments dont les concentrations étaient supérieures à $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ ont dominé : Les pigments marqueurs des Algues vertes notamment Prasinophytes et Chlorophytes (Chl *b*, Lutéine), le pigment marqueur des Diatomées et celui marqueur des Dinophytes (Fig. 13 C). Plus précisément, la lagune hypereutrophe témoigne de très fortes concentrations en pigments de la lignée verte en comparaison avec les deux autres lagunes (somme des pigments marqueurs de la lignée verte : $4,12 \mu\text{g.L}^{-1}$). De plus, les faibles abondances de picocyanobactéries mesurées dans cette lagune par rapport aux abondances de picoeucaryotes ($10,1 \times 10^6 \text{ cell.L}^{-1}$ et $2,58 \times 10^9 \text{ cell.L}^{-1}$ respectivement) indiquent que la zéaxanthine, marqueurs des Cyanobactéries mais aussi des Chlorophytes et Prasinophytes, était davantage inféodée dans cette lagune aux eucaryotes (Fig. 13).

En terme de variation temporelle, la lagune mésotrophe a présenté le profil pigmentaire le plus stable dans le temps, tandis que la lagune hypereutrophe a présenté le profil le plus variable (Fig. 13). Dans la lagune oligotrophe, la forte proportion de pigments de la lignée verte en début d'année a chuté à partir de juillet 2013, lorsque le pic de biomasse a débuté. Ces pigments ont été remplacés par une forte proportion de Péridinine indicateur des Dinophytes, ayant dépassé 50 % du pool pigmentaire en septembre 2013. Durant cette période, de fortes abondances d'*Heterocapsa minima* et de *Protoperidinium sp.* (Notamment *P. cf. depressum* et *P. steinii*) ont été observées en juillet. Ces taxons ont été remplacés en août par plusieurs espèces du genre *Prorocentrum* (*Prorocentrum sp. cf. balticum, micans, lima*). La proportion de ce pigment a par la suite diminué à partir d'octobre 2013, lorsque celle de la fucoxanthine marqueur des Diatomées a augmenté, dépassant 40 % en octobre et novembre 2013. Ces mois ont été marqués par une forte dominance du genre *Chaetoceros*, associé aux genres *Amphiprora*, *Ceratoneis* (*C.*

closterium), *Cocconeis*, *Licmophora* et *Navicula*. Les mois les plus froids de l'année 2013, c'est-à-dire février et décembre ont montré une proportion d'Alloxanthine marqueur des Cryptophytes supérieure à 30 %, illustrant les fortes abondances de plusieurs Cryptophytes, dont *Plagioselmis sp.* et *Cryptomonas sp. cf. marssonii* ($1,8 \times 10^5$ cell.L⁻¹ en décembre 2013). De février à août 2014, le profil pigmentaire du phytoplancton de la lagune oligotrophe est resté relativement stable. Les Dinophytes représentaient environ 15 % du pool pigmentaire, représentés par *Heterocapsa minima* et *H. niei*, plusieurs taxa du genre *Gymnodinium* (dont *G. sanguineum*), et plusieurs taxa du genre *Prorocentrum*, dont le plus récurrent était *P. micans*. Les Algues vertes ont représenté 34 % de l'ensemble des pigments, principalement représentées par les genres *Tetraselmis* et *Pyramimonas*. Les Diatomées ont représenté durant cette période entre 7 et 20 % du pool pigmentaire total, à travers une présence stable de *Ceratoneis closterium*, *Cocconeis sp.*, *Navicula sp.*, et des pics d'abondance d'autres genres tels que *Chaetoceros* en avril 2014, ou *Licmophora* en juillet 2014. Enfin, les Cryptophytes constituaient entre 15 et 25 % de l'ensemble des pigments, principalement représentés par les deux espèces citées ci-dessus. Durant le pic de biomasse automnal de septembre à novembre 2014, les concentrations en pigments marqueurs des Algues vertes ont augmenté, représentant 45 % du pool pigmentaire, associées en septembre avec une augmentation de la concentration et de la proportion du pigment marqueurs des diatomées. Cette augmentation a illustré une efflorescence de plusieurs taxa du genre *Chaetoceros*, dont les abondances ont atteint $5,0 \times 10^5$ cell.L⁻¹ en septembre 2014. Les Dinophytes sont redevenus dominants en octobre (36,9 %) du fait de fortes abondances d'*Heterocapsa* et *Prorocentrum*, puis ont disparu en novembre. Les mois d'octobre et décembre 2014 ont également exhibé la présence d'*Asterionellopsis glacialis* (jusqu'à $9,2 \times 10^3$ cell.L⁻¹ en décembre 2014).

Dans la lagune mésotrophe, la proportion des pigments de la lignée verte a augmenté au début de l'année 2013, dépassant 50 % du pool de pigments au moment du pic de biomasse estival de juillet 2013. Bien que reflétant les fortes abondances de picoeucaryotes dont une grande partie sont des Chlorophytes *Chlorella*-like, cette augmentation a également illustré la hausse des abondances de *Tetraselmis sp.* ayant atteint $1,9 \times 10^5$ cell.L⁻¹ en juillet 2013. En parallèle, le pigment marqueur des Cryptophytes, atteignant 50 % en janvier 2013, a diminué jusqu'à représenter moins de 10 % des pigments en juillet 2013. La proportion de ce pigment a de nouveau augmenté en août, et remplacé une partie des Algues vertes dans la production du bloom phytoplanctonique, à travers plusieurs taxa dont *Plagioselmis sp.*. A la fin de l'été, les proportions des pigments marqueurs des Dinophytes et des diatomées ont augmenté et fluctué jusqu'à la fin de l'année 2014. Lors du pic de biomasse estival de 2014, la proportion du pigment marqueur des Dinophytes a diminué à partir de juillet jusqu'à sa complète disparition en

septembre 2014. Cette diminution est liée à la réduction des abondances d'*Heterocapsa minima* et *niei*, *Gonyaulax sp. cf. digitale* et *spinifera*, *Kryptoperidinium foliaceum*, *Peridinium quinquecorne*, *Prorocentrum triestinum*, *Protooperidinium steinii*. Dans un même temps, la proportion du pigment marqueur des diatomées a augmenté jusqu'à dépasser les 60 % du pool pigmentaire à la même période. Cette augmentation reflète un bloom de nombreux taxa du genre *Chaetoceros*, dont les abondances ont atteint $1,22 \times 10^6$ cell.L⁻¹ en septembre 2014, et dont la présence s'est prolongée en octobre ($2,40 \times 10^6$ cell.L⁻¹). Les genres *Skeletonema* et *Thalassiosira* ont également montré des abondances importantes au cours des mois de septembre à novembre 2014, associés à *Rhizosolenia sp.* en septembre ($4,1 \times 10^5$ cell.L⁻¹), et à *Asterionellopsis glacialis* en octobre et novembre. En décembre, les biomasses ont à nouveau diminué.

Dans la lagune hypereutrophe, les proportions de pigments ont fortement fluctué au cours des deux ans. Néanmoins, les pigments de la lignée verte étaient représentés en proportions bien supérieures à celles observées dans les deux autres lagunes. La hausse de la proportion du pigment marqueur des Dinophytes en avril 2013 reflète une forte abondance des taxa *Heterocapsa minima* et *H. niei*, ($6,40 \times 10^6$ cell.L⁻¹). Le pic de biomasse estival de l'année 2013 a concorde avec une proportion élevée (46,7 %) du pigment marqueur des Dinophytes, reflétant les fortes abondances de *Gyrodinium sp.*, *H. minima*, *H. niei*, *P. micans*, *Scrippsiella sp.* et un autre taxon non identifié. Le pic de biomasse hivernal a concorde avec une forte hausse de la proportion du pigment marqueur des Algues vertes. A cette période, des abondances fortes d'espèces appartenant à ce groupe ont été observées, notamment *Scenedesmus sp.*, *Eutreptiella sp.*, *Tetraselmis sp.* et *Pyramimonas sp.* Le pic de biomasse estival de l'année 2014 a marqué une profonde modification de la composition du phytoplancton. En effet, au début du pic, le pigment marqueur des Dinophytes dominait (62,2 % en juin), reflétant 14 taxa, dont *Gymnodinium sp.*, *Kryptoperidinium foliaceum*, *P. micans*, *Protooperidinium sp. cf. depressum*, *Scrippsiella*, *Taxon Oblea* étaient les plus abondants. Cependant, un shift au niveau de la composition taxonomique s'est déroulé en parallèle au shift du nano- à l'ultraphytoplancton à partir de juillet 2014. Les pigments marqueurs des Algues vertes sont devenus dominants, représentant plus de 70 % du pool pigmentaire. Cette tendance se maintient même après la fin du bloom, jusqu'à la fin de l'année 2014. Cette dominance était majoritairement associée aux très fortes abondances des picoeucaryotes décrites précédemment, mais elle a aussi reflété la présence d'*Eutreptiella sp.*, *Tetraselmis sp.* (jusqu'à $1,25 \times 10^6$ cell.L⁻¹ en septembre), et de plusieurs taxa du genre *Pyramimonas* (jusqu'à $6,94 \times 10^5$ cell.L⁻¹ en août). De la même manière que dans la lagune mésotrophe, les genres *Skeletonema* et *Thalassiosira* ont montré des abondances marquées en automne 2014, de septembre à novembre.

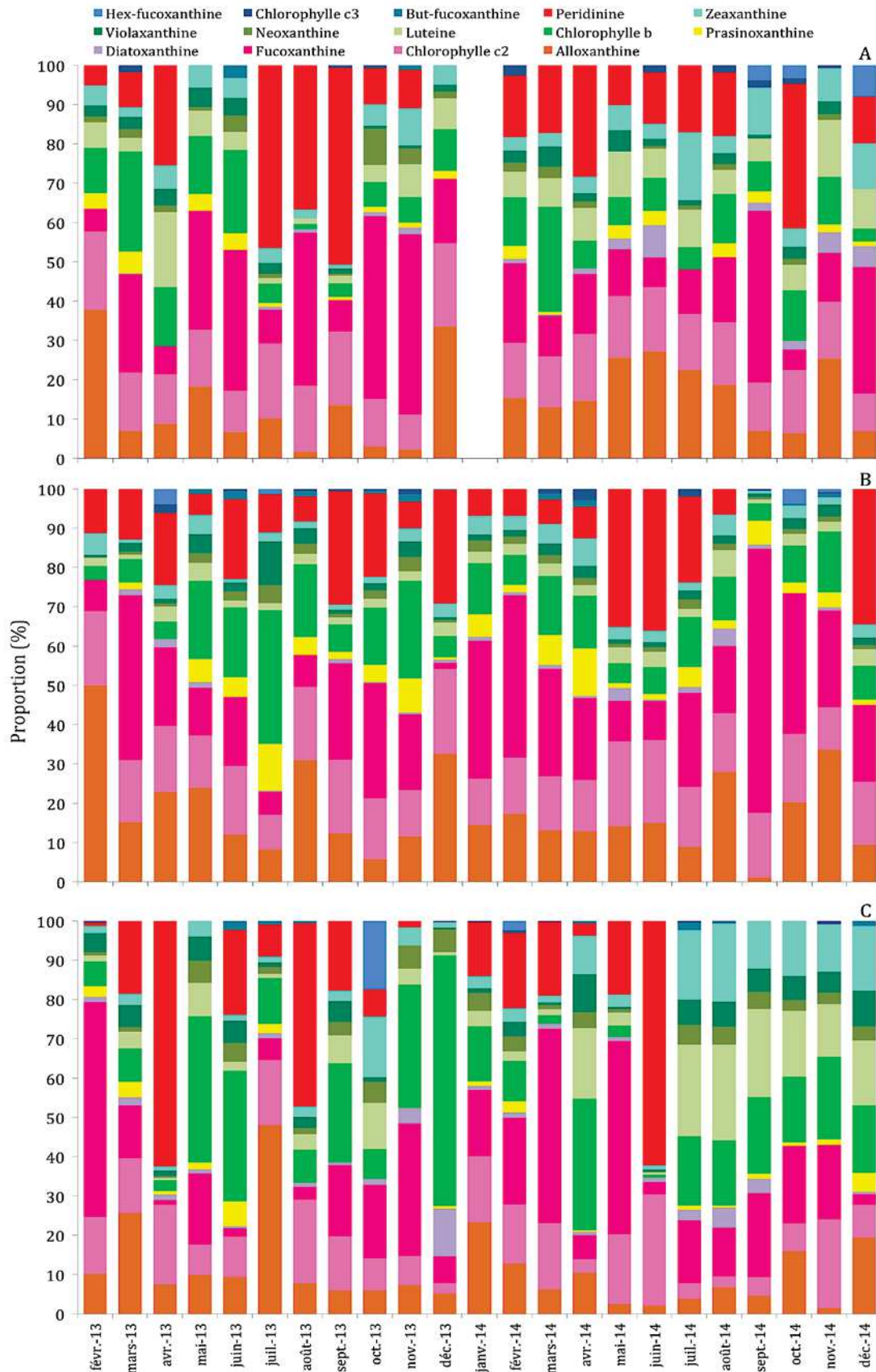


Figure 13. Contribution des pigments accessoires marqueurs de groupes phytoplanctoniques dans les lagunes oligo- (AYR, fig. A), meso- (IN, fig. B) et hypereutrophe (MW, fig. C), de février 2013 à décembre 2014.

4.5 Relation entre variabilité environnementale et composition du phytoplancton

Afin de mettre en relation la composition des communautés phytoplanctoniques reflétée par la composition pigmentaire et la variabilité environnementale des trois lagunes, des Analyses Canoniques des Correspondances (ACC) ont été effectuées. En premier lieu, cette analyse a été mise en place sur l'ensemble des données relatives à chaque lagune, afin de mettre en évidence un fonctionnement spécifique à chacune d'elles. Elle a également été réalisée sur les données des trois lagunes regroupées par saisons (printemps d'avril à juin, été de juillet à septembre, automne d'octobre à décembre, et hiver de janvier à mars), afin de mettre en évidence une saisonnalité de la composition des communautés en lien avec les paramètres environnementaux.

4.5.1 Composition phytoplanctonique spécifique aux lagunes et à leur fonctionnement

La figure 14 illustre les relations entre les caractéristiques environnementales des lagunes oligo- (AYR, Fig. 14 A), meso- (IN, Fig. 14 B) et hypereutrophe (MW, Fig. 14 C) et leur composition phytoplanctonique au cours des 23 mois étudiés.

Dans la lagune oligotrophe, l'axe 1 de l'ACC est significatif (test de permutation, p -value = 0,002), et est principalement expliqué par la salinité, le phosphore total et la concentration en Phéo a en positif, opposés à la température, l'azote total, et les concentrations en Chl a et en phosphate en négatif (Fig. 14 A). Ces trois derniers paramètres illustrant l'eutrophisation, les pics de biomasse automnaux se démarquent, et notamment la première période du pic de biomasse de juillet à septembre 2013. Le pigment marqueur des Dinophytes ayant été abondant au cours de cette période, la Péridine est associée à la Chl a et au Nt. L'axe 2 est significatif (test de permutation, p -value = 0,010), et oppose la température en négatif aux formes dissoutes de l'azote en positif. Ces formes dissoutes de l'azote sont associées aux pigments marqueurs des diatomées, des Algues vertes et des Haptophytes. Les mois de mars, mai 2013 et novembre 2014 ont exhibé de fortes proportions des pigments de la lignée verte. Les mois d'octobre et novembre 2013, relatifs à la deuxième période du pic de biomasse de l'année 2013, sont très éloignés des trois mois précédents. Associés à la phéophytine a , ils témoignent d'une forte remise en suspension sédimentaire, expliquant le shift de composition ayant eu lieu au cours de l'automne 2013, au bénéfice des diatomées benthiques. En 2014, la faible variabilité des concentrations et proportions pigmentaires n'a pas permis de mettre en évidence de relation entre la structuration des communautés et la variabilité environnementale.

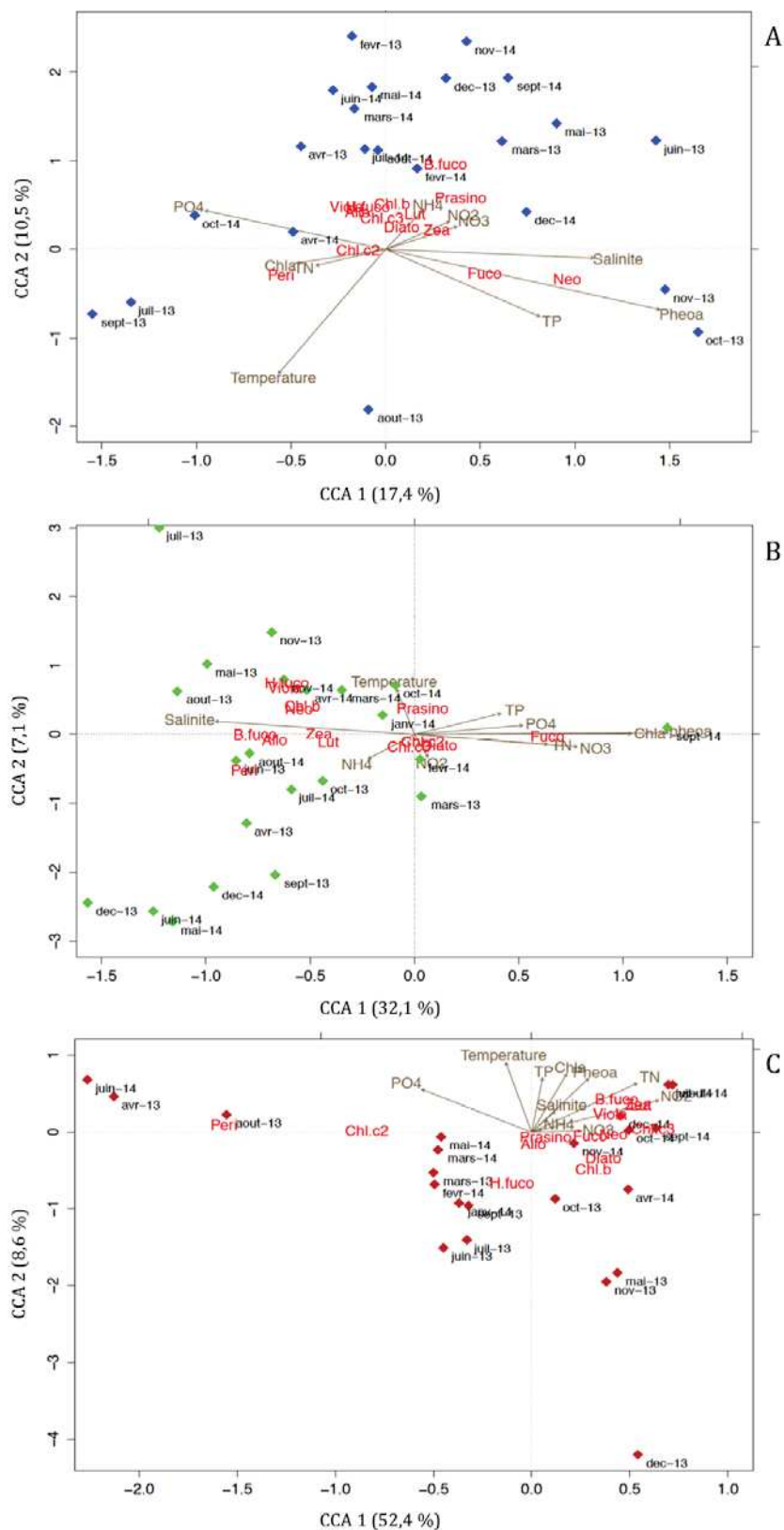


Figure 14. Diagramme d'ordination des deux premiers axes de l'analyse canonique des correspondances (ACC) entre les variables environnementales explicatives et la composition pigmentaire mensuelle dans les trois lagunes oligo- (AYR, fig. A), méso- (IN, fig. B), et hypereutrophes (MW, fig. C). Les flèches représentent les paramètres environnementaux, les losanges représentent la composition pigmentaire des échantillons mensuels.

Dans la lagune mésotrophe, l'axe 1 est significatif (test de permutation, p -value = 0,026), et est principalement expliqué par les paramètres illustrant l'eutrophisation en positif (Chl a , Nt, Pt, NO₃, PO₄) ainsi que la concentration en phéophytine a , opposés en négatif à la salinité et la concentration en ammonium (Fig. 14 B). L'axe 2 est également significatif (p -value = 0,028), et est faiblement expliqué en positif par la température opposée en négatif aux concentrations en nitrites et ammonium. L'axe 1 illustre l'eutrophisation en relation avec les apports du bassin versant (nitrates). Les diatomées semblent être majoritairement responsables des fortes biomasses, puisque la fucoxanthine est associée aux paramètres illustrant l'eutrophisation. Le mois de septembre 2014 est associé à de fortes biomasses, une forte proportion de pigment des diatomées, et de fortes précipitations (Données MétéoFrance). A l'opposé sur cet axe, on retrouve les pigments marqueurs des Dinophytes, des Cryptophytes et des Haptophytes (But-fuco, Hex-fuco, Chl $c3$). Les mois d'avril, septembre, et décembre 2013-14 sont associés à de fortes concentrations en ammonium et en Périidine.

Dans la lagune hypereutrophe, l'axe 1 est significatif (test de permutation, p -value = 0,002), et est expliqué en positif par les concentrations en azote dissous et total, et dans une moindre mesure par les concentrations en Chl a et en Phéo a , la salinité, et le phosphore total, opposé en négatif à la température et le phosphate (Fig. 14 C). Globalement, l'ensemble des pigments marqueurs des Algues vertes est associé aux paramètres de l'eutrophisation (Nt, Pt, Chl a), et lié aux mois durant lesquels les pics estivaux de biomasse ont eu lieu (juillet – août 2014). On retrouve également les mois de la fin de l'année 2014 durant lesquels les Algues vertes étaient dominantes (octobre à décembre 2014). A l'opposé, le pigment marqueur des Dinophytes est positionné en négatif sur l'axe 1, et est fortement associé aux mois d'avril et août 2013 et au mois de juin 2014, qui sont reliés ici à une hausse de la concentration en phosphates.

4.5.2 Saisonnalité

Les relations entre les données environnementales saisonnières et pigmentaires sont représentées par les figures 15 et 16. Concernant les données printanières regroupant avril, mai et juin 2013-14 des trois lagunes (Fig. 15 A), l'axe 1 est significatif (test de permutation, p -value = 0,002), et oppose les paramètres environnementaux illustrant la production phytoplanctonique et l'eutrophisation (Chl a , Nt, Pt) associés à la concentration en phéophytine a et à la température en positif, aux formes dissoutes de l'azote en négatif. Les pigments sont positionnés le long de cet axe, la Périidine marqueur des Dinophytes associée aux paramètres de l'eutrophisation et la température, les pigments marqueurs des Diatomées et des Algues vertes dans la direction des formes dissoutes de l'azote. Les Algues vertes sont plutôt associées à l'ammonium, tandis que les Diatomées sont davantage associées aux nitrates. L'axe 2 est

significatif (p -value = 0,006) et représente en positif la salinité et les formes dissoutes de l'azote. Globalement, les points relatifs aux deux années ne s'organisent pas de la même manière, indiquant des communautés et un fonctionnement différents entre les deux années. La lagune hypereutrophe présente les résultats les plus variables : les mois d'avril 2013 et juin 2014 sont marqués par des pics de biomasse portés par les plus fortes proportions du pigment marqueur des Dinophytes et positionnés les plus en avant le long de l'axe 1. Ils sont très éloignés du mois de mai 2014 présentant la plus forte proportion de Fucoxanthine marqueur des diatomées. Les mois de mai et juin 2013, ainsi qu'avril 2014, illustrent la forte variabilité des communautés de MW et la plus forte contribution des Algues vertes. La proximité des échantillons des lagunes méso- et oligotrophes indique une composition plus similaire par rapport à MW. Leur positionnement à l'opposé des paramètres illustrant l'eutrophisation le long de l'axe 1 reflète également leurs faibles niveaux d'eutrophisation par rapport à la lagune hypereutrophe. Les mois de mai et juin 2014 de la lagune mésotrophe sont associés au pigment marqueur des Dinophytes. Les mois de mai et juin 2013 dans la lagune oligotrophe relient les fortes concentrations en ammonium avec les fortes proportions en pigments de la lignée verte.

Concernant les données estivales (Fig. 15 B), l'axe 1 est significatif (p -value = 0,002) et illustre le gradient d'eutrophisation, qui est associé à l'augmentation de la température. L'axe 2 est significatif (p -value = 0,010) et représente les apports en eau douce et en nutriment provenant du lessivage du bassin versant par les pluies : il oppose la salinité en positif aux concentrations en nitrates et nitrites en négatif. Sur cet axe, la salinité est corrélée à l'augmentation de la température. Tous les pigments marqueurs des Algues vertes sont associés à l'augmentation de l'eutrophisation et la température, à l'opposé du pigment marqueur des Dinophytes. A l'inverse, le pigment marqueur des diatomées est associé aux nitrates et à de faibles salinités. La période estivale 2014 de la lagune hypereutrophe témoigne de la plus forte eutrophisation et de la plus forte concentration en pigments de la lignée verte. Elle est opposée à la période estivale de l'année 2013 dans la lagune oligotrophe, qui a exhibé les plus faibles biomasses et concentrations pigmentaires de l'ensemble des données estivales des trois lagunes. La période estivale de la lagune mésotrophe ne présente pas de particularité en terme de composition, ce qui explique son positionnement au centre de l'ACC, excepté en septembre 2014, marqué par de fortes proportions en pigment marqueur des Diatomées. Les mois de juillet et septembre 2013 sont associés à de fortes abondances de Dinophytes (Péri).

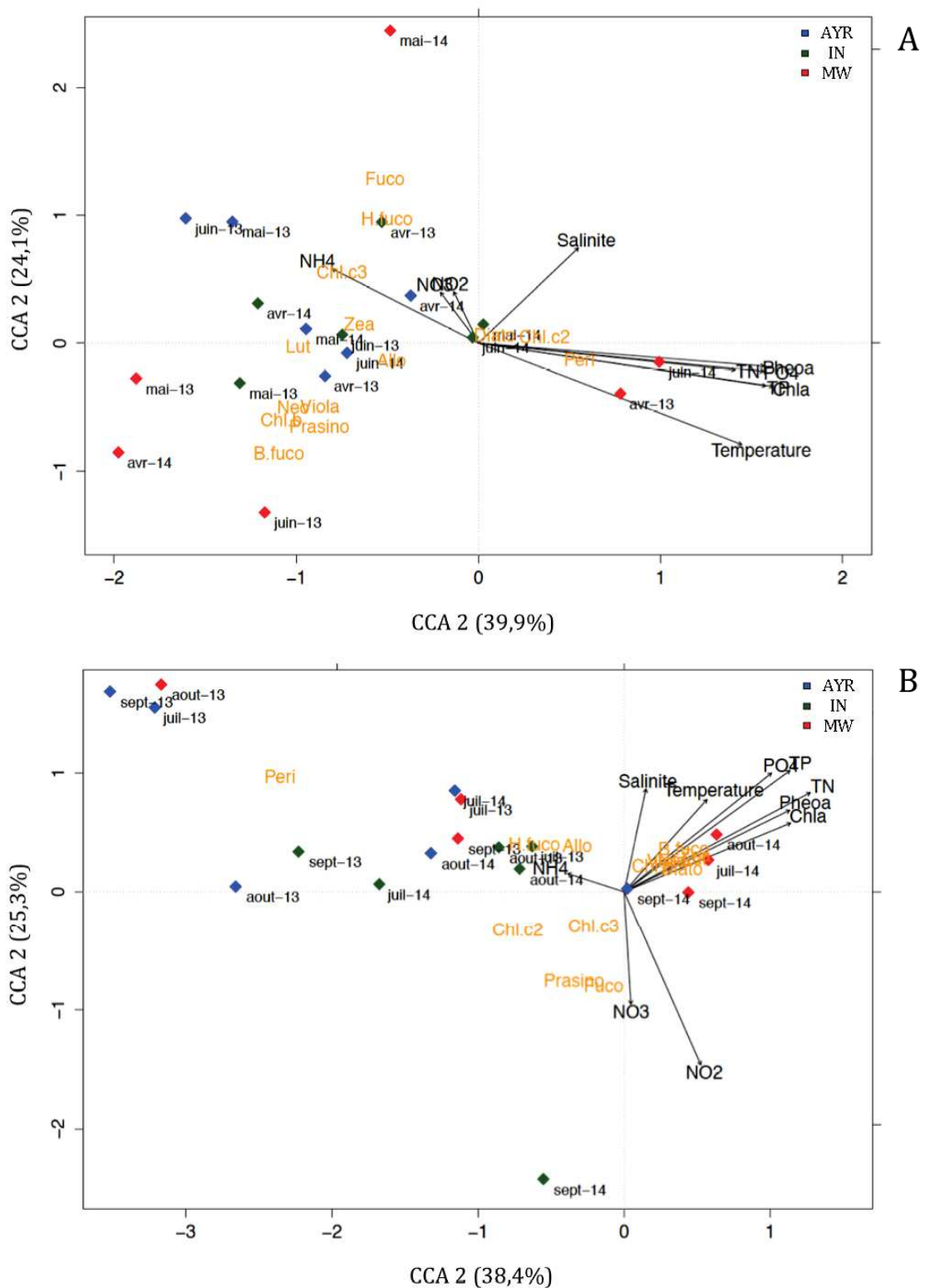


Figure 15. Diagramme d'ordination des deux premiers axes de l'analyse canonique des correspondances (ACC) entre les variables environnementales explicatives et la composition pigmentaire mensuelle dans les trois lagunes oligo- (AYR, bleu), méso- (IN, vert), et hypereutrophes (MW, rouge) au printemps (A) et été (B) 2013 et 2014. Les flèches représentent les paramètres environnementaux, les losanges représentent le positionnement des échantillons mensuels.

L'ACC représentant la relation entre les paramètres environnementaux et la composition automnale des communautés phytoplanctoniques est illustrée par la Figure 16 A. L'axe 1 n'est pas significatif (p -value = 0,082) (Fig. 16 A). Il oppose en positif la température, les formes dissoutes de l'azote et la concentration en phéophytine a , aux paramètres illustrant l'eutrophisation (Chl a , Nt, Pt) en négatif. L'axe 2 est significatif (p -value = 0,022) et oppose les paramètres de l'eutrophisation, les concentrations en Phéo a et en ammonium en positif à la salinité en négatif. Les pigments marqueurs des diatomées et des Cryptophytes sont associés aux nitrates et à la température, tandis que les pigments des Algues vertes (principalement la Chl b et la Néoxanthine) sont associés aux paramètres de l'eutrophisation. Le positionnement des échantillons indique un faible niveau d'eutrophisation des lagunes oligo- et mésotrophes. Globalement, les échantillons de ces lagunes ont été divisés en deux groupes selon leur groupe phytoplanctonique dominant : ceux dominés par les Dinophytes (octobre, novembre, décembre 2013, décembre 2014 pour IN ; octobre 2014 pour AYR), et ceux dominés par les diatomées et les Cryptophytes (les autres mois). A l'inverse, les échantillons de la lagune hypereutrophe ont montré une dominance des Algues vertes et une eutrophisation plus marquée.

La figure 16 B illustre les relations entre les variables environnementales et la composition des communautés phytoplanctoniques des trois lagunes au cours des saisons hivernales 2013-14. Les axes de cette ACC ne sont pas significatifs (p -value > 0,05). L'axe 1 oppose la température en positif aux paramètres illustrant l'eutrophisation et les concentrations des formes dissoutes de l'azote en négatif. L'axe 2 oppose la salinité en positif aux concentrations en nitrates, phosphate, azote et phosphore total et les concentrations en Chl a et en Phéo a en négatif. Dans la lagune hypereutrophe, les mois de mars 2013 et 2014 sont associés à la dominance des diatomées, ainsi qu'à des températures plus élevées et à une salinité réduite, indiquant des apports d'eau douce. La période hivernale de la lagune mésotrophe est également marquée par une forte proportion du pigment marqueur des diatomées. Ces échantillons sont opposés au gradient d'eutrophisation, et largement séparés des échantillons des deux autres lagunes.

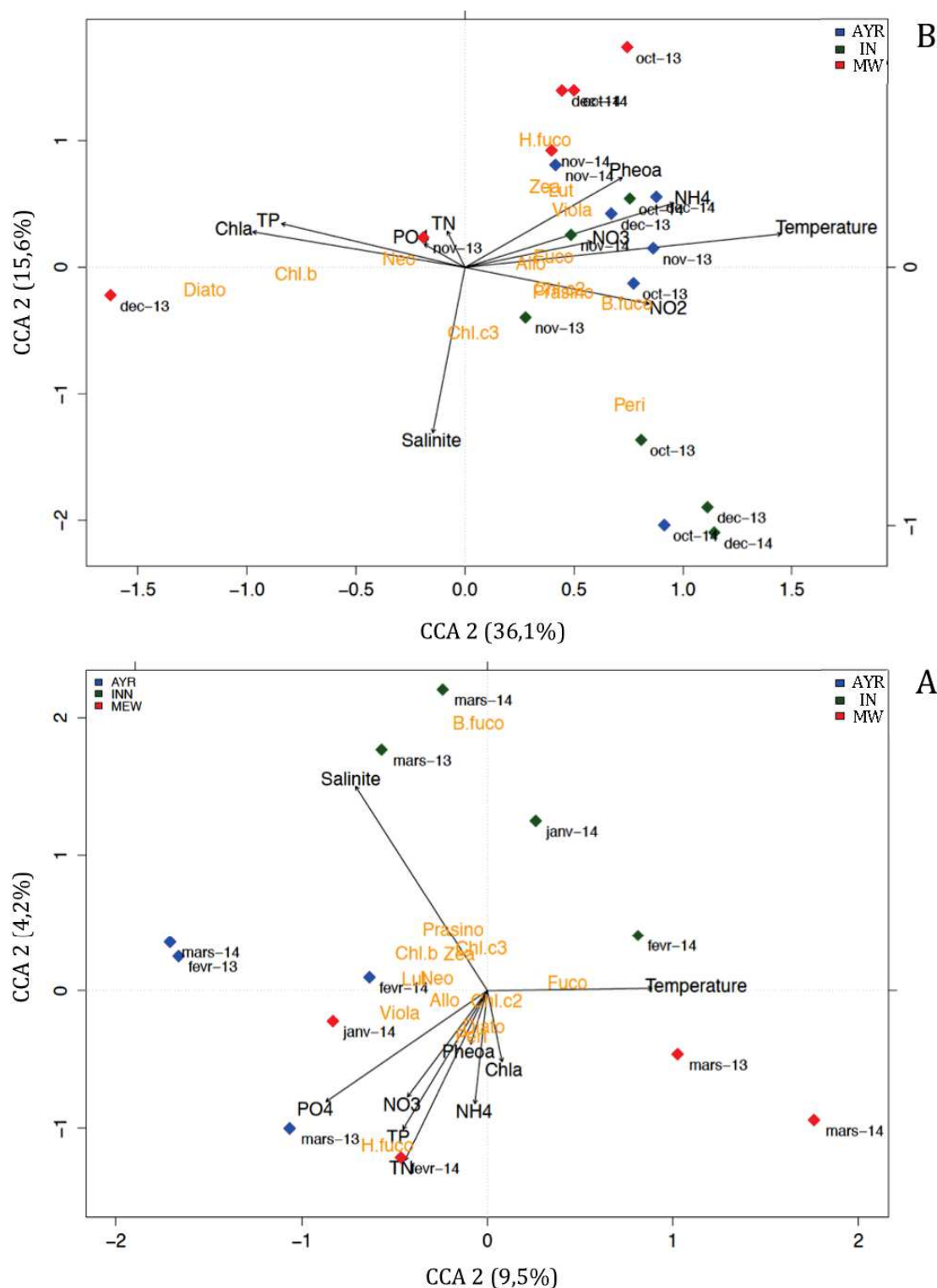


Figure 16. Diagramme d'ordination des deux premiers axes de l'analyse canonique des correspondances (ACC) entre les variables environnementales explicatives et la composition pigmentaire mensuelle dans les trois lagunes oligo- (AYR, bleu), méso- (IN, vert), et hypereutrophes (MW, rouge) au automne (A) et hiver (B) 2013-2014. Les flèches représentent les paramètres environnementaux, les losanges représentent le positionnement des échantillons mensuels.

4.6 Discussion et conclusions

Ces travaux ont mis en évidence une forte saisonnalité de la structuration et de la composition des communautés phytoplanctoniques des trois lagunes, dépendante de leur fonctionnement et notamment de leur niveau d'eutrophisation (Figure 17). Les deux lagunes du complexe des étangs palavasiens (IN et MW) ont présenté des pics de biomasse estivaux particulièrement élevés durant l'année 2014. Dans ces lagunes présentant des stocks sédimentaires encore significatifs (De Wit et al., 2015), l'augmentation de la température en période estivale a renforcé la reminéralisation bactérienne de la matière organique (Serpa et al., 2007) à l'origine de flux de nutriments benthiques qui ont favorisé la croissance phytoplanctonique (Cowan et al., 1996). Dans la lagune oligotrophe, de telles hausses de biomasse n'ont pas été mesurées pendant l'été. En revanche, une augmentation de la concentration en Chl *a* en automne, associée à une hausse de la concentration en phéophytine *a*, témoigne d'une forte remise en suspension sédimentaire à cette période généralement marquée par des épisodes de fortes rafales de vent.

Les niveaux de biomasse observés au cours de l'été 2014 dans les lagunes du complexe des étangs palavasiens témoignent de la fragilité des processus de restauration initiés en décembre 2005 (Chapitre 3). En effet, ils reflètent une augmentation par rapport aux années 2012 et 2013, contradictoire par rapport à la réduction mise en évidence depuis 2006 (Chapitre 3, Figure 17). Cette augmentation peut s'expliquer par une année 2014 particulièrement chaude (+1,46°C en moyenne par rapport à 2013), et un été plus pluvieux que la normale de saison, en particulier en juin, juillet et septembre (Données Météo station Fréjorgues, site Infoclimat). Ces températures élevées ont pu accentuer les flux benthiques de nutriments, stimulant la croissance phytoplanctonique. Les stocks de nutriments internes à ces lagunes ont donc un impact très important sur leur fonctionnement, ralentissant leur re-oligotrophisation (Phillips et al., 2005). Néanmoins, si cette augmentation de biomasse suggère une vulnérabilité des processus de re-oligotrophisation, les réponses du phytoplancton à un pulse nutritif sont encore méconnus dans ces systèmes, de même que la sensibilité de la restauration des lagunes aux apports ponctuels de nutriments auxquels elles peuvent être soumises. Ces questions sont abordées dans le Chapitre 6 de la thèse. L'augmentation de la biomasse intervenue en 2014 reste malgré tout relativement faible par rapport aux niveaux mesurés dans les lagunes avant 2006, et qui ont pu atteindre 630 $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ (Bec et al., 2011). Malgré sa vulnérabilité face aux conditions climatiques, la restauration écologique a donc été efficace puisque les pics de biomasse les plus élevés atteints 10 ans après son initiation restent encore plus de 16 fois inférieurs aux niveaux observés à l'origine.

L'analyse de la structure par classe de taille a mis en évidence une dominance globale de l'ultraphytoplancton au cours de l'année, remplacé transitoirement par le nano- ou le microphytoplancton lors des blooms phytoplanctoniques. Durant l'été 2013, le pic de biomasse dans la lagune hypereutrophe, principalement porté par l'ultraphytoplancton à l'origine, subit un shift en août et devient dominé par des Dinophytes (Figure 17). Les picoeucaryotes possédant un rapport surface/volume élevé constituent le groupe phytoplanctonique le plus compétitif pour acquérir les nutriments. Ces caractéristiques sont particulièrement avantageuses lorsqu'ils sont rares ou présents transitoirement dans le milieu (Chisholm, 1992; Raven, 1998), ce qui est le cas dans les lagunes étudiées du fait de leur consommation très rapide. Leur taux de croissance élevé leur permet d'être le premier groupe à répondre à un pulse nutritif, comme la composition des pics de biomasse estivaux de l'année 2013 l'a illustré. Ces organismes dits « compétiteurs » sont associés aux stratégies r ou C dans la littérature scientifique. Leur capacité à répondre rapidement à un changement environnemental et particulièrement à un enrichissement nutritif par une forte productivité leur permet de dominer les systèmes eutrophisés et régulièrement soumis à des apports nutritifs (Smayda, 1998). Ils peuvent cependant être remplacés par la suite par des cellules possédant des stratégies de croissance plus lentes (stratégie K). Les taux de croissance faibles et saturants à des niveaux de concentrations plus faibles permettent à ces organismes de se maintenir même lorsque les ressources sont limitantes, ce qui peut être le cas à l'issue d'une efflorescence algale (Smayda and Reynolds, 2001).

Cependant, le pic de biomasse observé en 2014 dans la lagune hypereutrophe a montré un fonctionnement différent. L'augmentation de la biomasse initiée en juin était principalement liée à de fortes abondances de Dinophytes appartenant au microphytoplancton. Cette période a également coïncidé avec d'importants cumuls de précipitations (+25 % en juin, +41 % en juillet par rapport aux normales de saison de 1961 à 1990), qui ont provoqué des turbulences et une variabilité de la salinité. Ces modifications environnementales sont défavorables aux Dinophytes (Margalef, 1978; Berdalet et al., 2007), à l'inverse des picoeucaryotes appartenant à la lignée verte (*Chlorella*-like). Ce groupe phytoplanctonique a également pu profiter des apports de nutriments majoritairement benthiques sous forme d'ammonium (Domingues et al., 2011b; Glibert et al., 2015). En effet, l'ultraphytoplancton est caractérisé par une forte affinité pour l'ammonium, contrairement aux cellules plus larges, en particulier les diatomées plus adaptées à l'utilisation des nitrates. De plus, les températures relativement élevées en période estivale facilitent l'assimilation de l'ammonium (Glibert et al., 2015), rendant les Algues vertes encore plus compétitives (Litchman et al., 2010). La lagune hypereutrophe possédant des stocks de matière organique importants, elle peut également favoriser les espèces de Dinophytes capables

d'utiliser la mixotrophie (Reynolds et al., 2002). Les assemblages d'espèces observés dans cette lagune au cours des 23 mois de suivi (*Eutreptiella sp.*, *Scenedesmus sp.*) témoignent de l'adaptation à un milieu eutrophisé et variable (Reynolds et al., 2002). Cette lagune reste majoritairement dominée par des espèces qui répondent rapidement aux modifications environnementales (Reynolds, 1988). La lagune hypereutrophe possède donc une composition des communautés très spécifique, liée aux stocks benthiques de matière organique qui favorisent les Dinophytes mixotrophes et les Algues vertes à travers des flux d'ammonium et de phosphates très importants.

Globalement, les communautés phytoplanctoniques des deux lagunes les moins eutrophisées possédant également des salinités plus importantes ont montré des proportions plus élevées de diatomées et de Cryptophytes que d'Algues vertes, plus spécifiques à la lagune hypereutrophe. Ces deux groupes phytoplanctoniques sont particulièrement avantagés du fait de taux de croissance élevés (Paerl et al., 2010), en particulier les diatomées lors d'apports en nitrates, les Cryptophytes étant également capables de répondre à un apport dominé par l'ammonium (Glibert et al., 2015). L'importance des abondances de diatomées dans la lagune oligotrophe pourrait également être liée à leur capacité à stocker de l'azote pour s'adapter à un système limité en nutriments (Litchman et al., 2007) et marqué par une forte compétition avec des macrophytes adaptés à l'oligotrophie (Bricker et al., 2008). De plus, une grande majorité des espèces de diatomées observées dans cette lagune sont benthiques, soulignant l'importance des processus de remise en suspension sédimentaire dans ce système. Enfin, certaines périodes ont été marquées par de fortes abondances de Dinophytes, qui peuvent posséder un avantage compétitif majeur pour se maintenir dans ce milieu pauvre en nutriments grâce à la mixotrophie (Kruk et al., 2010).

A l'issue de la première année de suivi, les pics printaniers et estivaux dans les étangs palavasiens et le pic automnal dans la lagune Ayrolle nous ont permis de sélectionner trois périodes témoignant d'efflorescences algales plus ou moins marquées. Au cours de ces trois périodes, les communautés phytoplanctoniques ont été finement décrites en termes de diversité taxonomique et fonctionnelle (Chapitre 5). En automne, les spécificités écologiques et fonctionnelles des communautés responsables du bloom printanier dans les lagunes palavasiennes ont été caractérisées en novembre 2013 pour étudier les communautés responsables du pic de biomasse automnal notamment dans Ayrolle. Au printemps, les spécificités écologiques et fonctionnelles des communautés responsables du bloom printanier dans les lagunes palavasiennes ont été caractérisées en avril 2014. Les mêmes travaux ont été réalisés en août-septembre 2014 pour étudier les communautés responsables des pics de

biomasse estivaux dans les étangs palavasiens. Les résultats de ces travaux font l'objet du Chapitre 5.

En parallèle à la description fine des caractéristiques fonctionnelles de ces communautés printanières, estivales et automnales, des expériences d'enrichissement saturant et limitant *in situ* ont été menées afin de comprendre l'effet d'un pulse nutritif sur ces communautés saisonnières. Dans le contexte de l'initiation d'un processus de re-oligotrophisation de lagunes côtières dégradées, nous avons souhaité comprendre la réponse du phytoplancton à un apport ponctuel de nutriments, pour évaluer son adaptation à une accentuation de la limitation nutritive (Domingues et al., 2011a) et la vulnérabilité des lagunes en cours de restauration à un pulse nutritif. Les résultats de l'expérience d'enrichissement *in situ* menée en période estivale sont développés dans le Chapitre 6.

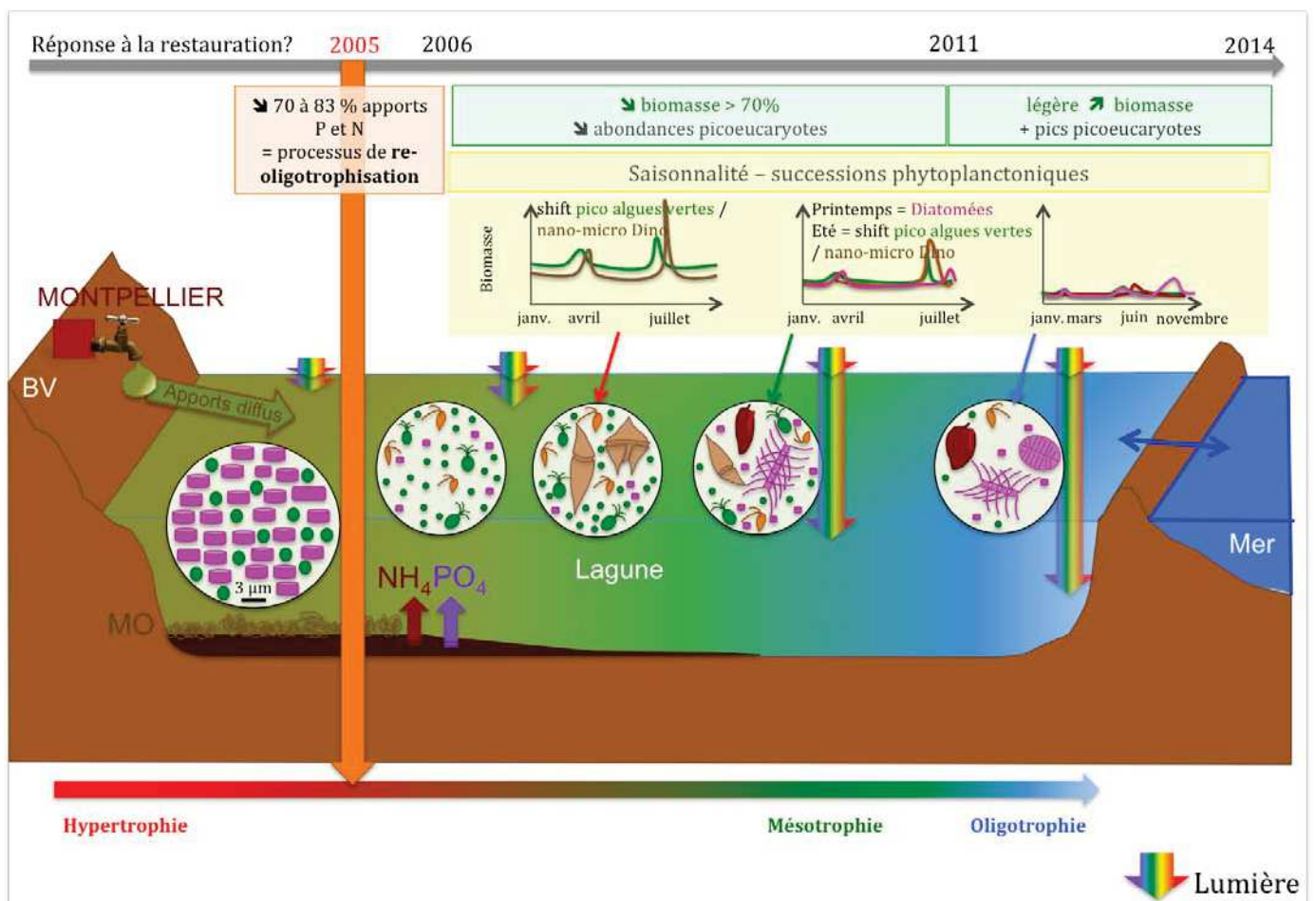
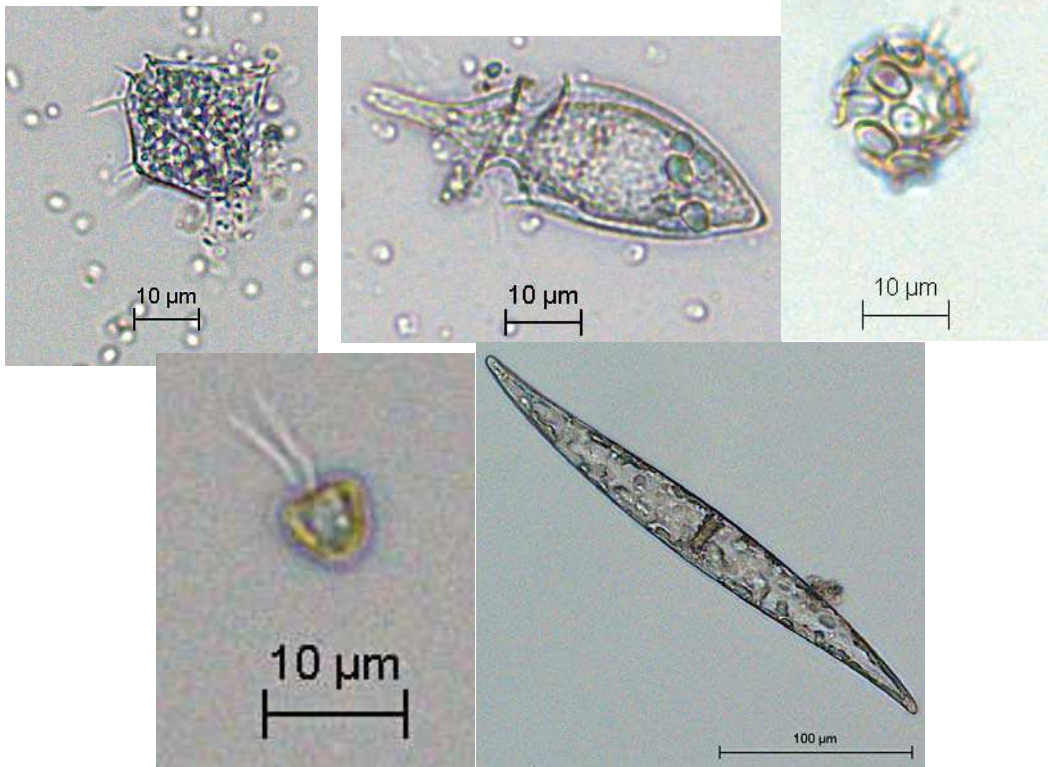


Figure 17. Schéma bilan de la variabilité intrinsèque des communautés phytoplanctoniques dans des lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés. Les biomasses, la composition et la dynamique temporelle de ces paramètres dépendent du fonctionnement nutritif des lagunes, et donc de leur niveau d'eutrophisation.

5 Multidimensional functional diversity indices improve understanding of phytoplankton ecology in coastal lagoons



5.1 Contexte de l'étude

L'étude des communautés phytoplanctoniques est généralement associée à l'évaluation de leur diversité, qu'elle soit génétique, phylogénétique, taxonomique et/ou fonctionnelle. La diversité phytoplanctonique et sa comparaison entre sites permettent de comprendre les adaptations des communautés aux caractéristiques de leur environnement (Reynolds, 1988; Watson *et al.*, 1997; Diez *et al.*, 2001).

Si la diversité génétique a apporté de précieuses informations concernant les organismes picoplanctoniques difficilement descriptibles par d'autres approches, elle reste cependant très couteuse. Les résultats sont difficiles à interpréter dans leur globalité et nécessitent des compétences analytiques particulières. Ce volet est cependant développé par d'autres membres de l'UMR MARBEC (Grzebyk *et al.*, 1998; Masseret *et al.*, 2009), et ne fait pas l'objet des travaux de cette thèse.

La diversité taxonomique a été largement utilisée pour caractériser les communautés phytoplanctoniques au sein de divers écosystèmes aquatiques (Rojo *et al.*, 1994; Cottingham and Carpenter, 1998; Gao and Song, 2005; Spatharis *et al.*, 2007). Cependant, elle est inadaptée à l'identification du phytoplancton inférieur à 5 μm (Diez *et al.*, 2001) qui s'avère être la composante dominante du phytoplancton des lagunes étudiées (Bec *et al.*, 2011). Des techniques telles que l'analyse de la composition pigmentaire par HPLC, ainsi que la cytométrie en flux ont permis de préciser la diversité de cette classe de taille. Néanmoins, si la diversité estimée par la composition pigmentaire permet d'évaluer la diversité taxonomique ET fonctionnelle des communautés phytoplanctonique à un instant t (Paerl *et al.*, 2003; Paerl *et al.*, 2010), elle ne le fait pas de manière précise et reproductible étant donné le caractère ubiquiste de certains pigments et le fait que la composition pigmentaire puisse évoluer en fonction des caractéristiques environnementales telle la qualité du spectre lumineux (Lohrenz *et al.*, 2003). De plus, la caractérisation de la diversité taxonomique de l'ultraphytoplancton par cytométrie en flux reste incomplète puisqu'une partie des cellules sont caractérisées comme appartenant aux picoeucaryotes et ultraeucaryotes, soit des eucaryotes inférieurs à 3 et à 5 μm (Bec *et al.*, 2005). La cytométrie en flux ne permet pas de préciser davantage leur appartenance à un groupe taxonomique, mais, couplée à d'autres techniques, telle que la microscopie à épifluorescence, il est possible de préciser certains traits fonctionnels de ces communautés. Au vue de leurs limites, ces techniques analytiques sont bien souvent couplées les unes aux autres, permettant ainsi de palier les lacunes de chacune d'entre elles (Breton *et al.*, 2000; Rodriguez *et al.*, 2003). Cette approche a notamment été privilégiée lors de ce travail de thèse.

La diversité fonctionnelle fait l'objet d'une attention croissante dans tous les domaines de l'écologie des communautés incluant celle du phytoplancton (Litchman and Klausmeier,

2008). Elle est privilégiée à la diversité taxonomique ou phylogénétique, car elle présente l'avantage de refléter directement la réponse fonctionnelle des communautés en termes de structure et de composition en réponse aux changements environnementaux (Weithoff, 2003; Norberg, 2004; Longhi and Beisner, 2010; Rodrigues *et al.*, 2015). En premier lieu, la diversité fonctionnelle d'une communauté a été définie comme un assemblage d'espèces possédant des fonctions similaires et répondant à des caractéristiques environnementales précises (Margalef, 1978; Margalef *et al.*, 1980; Sommer *et al.*, 1986). Dans ces publications, la notion de niche écologique privilégiée par ces groupes était alors illustrée au travers du Mandala de Margalef, par une succession de groupes phytoplanctoniques répartis au sein d'un repère bidimensionnel représentant les deux paramètres environnementaux impactant principalement les communautés phytoplanctoniques. La définition de la diversité fonctionnelle phytoplanctonique a par la suite évolué vers une approche basée sur les traits fonctionnels, c'est-à-dire des caractéristiques morphologiques, physiologiques ou comportementales ayant un impact sur la survie et la performance des espèces (Violle *et al.*, 2007; Mouillot *et al.*, 2013). Cette méthode présente l'intérêt d'associer à un taxon non pas une fonction mais plusieurs traits illustrant de multiples adaptations à divers paramètres environnementaux, tels que la pression de prédation, la disponibilité en nutriment, la turbulence et la turbidité de la colonne d'eau, *etc.* (Litchman *et al.*, 2007, 2010; Litchman and Klausmeier, 2008; Arthaud *et al.*, 2012; Houlliez *et al.*, 2015; Kruk *et al.*, 2015).

La diversité fonctionnelle paraissant être la plus pertinente pour refléter les réponses des communautés aux caractéristiques environnementales et leur variabilité, nous avons introduit lors du Chapitre 3 la notion de groupe fonctionnel (Reynolds, 1988; Litchman *et al.*, 2007; Litchman and Klausmeier, 2008; Kruk *et al.*, 2015). Nous avons alors relié les groupes fonctionnels et taxonomiques mis en évidence par HPLC aux caractéristiques trophiques des lagunes. Nous avons ensuite établi les trajectoires des communautés phytoplanctoniques en réponse aux processus de ré-oligotrophisation, à travers la succession de ces groupes fonctionnels portants des adaptations spécifiques aux caractéristiques des lagunes (Litchman *et al.*, 2010; Paerl *et al.*, 2010; Arthaud *et al.*, 2012). Ces groupes fonctionnels ont par le passé déjà été associés à des techniques d'identification plus analytiques, telles que l'HPLC, comme nous l'avons fait lors des précédents chapitres (Paerl *et al.*, 2003).

Cependant, dans les domaines autres que l'écologie du phytoplancton, les groupes fonctionnels tels qu'ils ont été décrits pour le phytoplancton n'apparaissent pas comme étant les plus pertinents pour comprendre les réponses des communautés aux changements environnementaux. En effet, au sein des analyses de la diversité fonctionnelle développées en Ichtyologie, la notion de groupe fonctionnel est obsolète, et a été remplacée par la notion

« d'entité fonctionnelle » regroupant les taxons possédant les mêmes combinaisons de traits fonctionnels (Villéger *et al.*, 2008; Mouchet *et al.*, 2010; Mouillot *et al.*, 2013). Dans ce domaine, des techniques reproductibles permettant de caractériser la diversité fonctionnelle à l'aide d'indices (richesse, équitabilité, divergence, spécialisation), et de représenter les communautés au sein d'un espace multidimensionnel, illustrant également le principe de niche écologique ont été développées (Villéger *et al.*, 2008; Mouchet *et al.*, 2010). En revanche, il n'existe aucune méthode comparable en écologie du phytoplancton, bien que certaines méthodes s'en rapprochent (Weithoff, 2003; Palfy *et al.*, 2013).

Sur la base de ce constat, nous avons décidé d'appliquer les techniques mises au point en Ichtyologie pour caractériser de manière fiable, reproductible et rigoureuse la diversité fonctionnelle du phytoplancton des lagunes côtières. L'approche multidimensionnelle de la diversité fonctionnelle présente l'intérêt de se baser sur tous les types d'analyses décrites ci-dessus, à travers le choix de traits fonctionnels pertinents en fonction de la question de recherche posée. L'impact de l'eutrophisation et la ré-oligotrophisation au travers du gradient d'eutrophisation des lagunes côtières sur les communautés phytoplanctoniques étant la question de recherche autour duquel s'articulent tous les volets de ce travail de thèse, nous avons ciblé des traits reliés à l'acquisition et la disponibilité nutritive, la croissance, *etc.* (Salmaso and Padisák, 2007; Litchman and Klausmeier, 2008; Litchman *et al.*, 2009, 2010).

Cette méthode a donc été utilisée pour caractériser la diversité phytoplanctonique de trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation différents, afin d'illustrer les adaptations fonctionnelles du phytoplancton en réponse à des conditions nutritives spécifiques. Nous avons également comparé trois saisons hydrologiques contrastées notamment par leurs apports en nutriments différents en termes d'origine, de forme et de concentration. Afin de mettre en évidence l'intérêt d'utiliser l'approche fonctionnelle, nous avons comparé les résultats obtenus avec les informations que prodigue l'approche taxonomique de la diversité phytoplanctonique.

5.2 Valorisation scientifique

L'utilisation de cette approche multidimensionnelle de la diversité fonctionnelle sur les communautés phytoplanctoniques des trois lagunes aux cours des trois saisons contrastées a donné lieu à la rédaction d'une publication scientifique. Ce travail a également fait l'objet d'une communication orale au *7th EUROLAG Symposium*, qui a eu lieu à Murcia du 1er au 4 Mars 2016.

MANUSCRIT C

**Multidimensional functional diversity indices improve understanding
of phytoplankton ecology in coastal lagoons**

Amandine Leruste^{1*}, Sébastien Villéger¹, Nathalie Malet², Rutger De Wit¹, Béatrice Bec¹

¹Centre of Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC) UMR 9190, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Ifremer, Place Eugène Bataillon, Université de Montpellier, Case 093, 34095 MONTPELLIER cedex 5, France

²Ifremer, Ifremer LEPAC-Corse, ZI Furiani, Im Agostini, 20600 Bastia, France

*Corresponding author: amandine.leruste@umontpellier.fr

En préparation

Abstract

Phytoplankton is particularly suitable to be used as a proxy for ecosystem functioning and anthropogenic pressures, because this compartment exhibits a wide range of rapid responses to changing conditions.

In many domains including phytoplankton ecology, functional diversity has been adopted to understand ecosystem functioning, using functional traits reflecting productivity, stability and resilience of ecosystems. This approach also overcomes the potential bias resulting from a simple taxonomic approach. Phytoplankton species have been often classified according to their functional or structural characteristics and their presence under similar environmental conditions, leading to the definition of functional groups. However, for a comprehensive understanding of changes in community structure, this group-based approach is less efficient than a multidimensional trait-based approach to assess functional diversity.

In order to improve knowledge of phytoplankton community function in coastal lagoons with diverse ecological conditions, we adapted a multidimensional trait-based approach using functional diversity indices, which was recently developed for fish communities. In the south of France, coastal lagoons exhibit a wide range of trophic conditions and environmental features, which result in high phytoplankton diversity. Hence we assessed the taxonomic diversity of phytoplankton, and compared it with the multidimensional functional diversity, to test if the multidimensional functional diversity permitted better discrimination of phytoplankton communities and how this was related to environmental conditions. Specifically, we characterized the taxonomic and functional α -diversity and β -diversity of phytoplankton communities in three coastal lagoons with different trophic status, ranging from oligo- to hypertrophy, which were sampled in three seasons (fall, spring and summer).

Among the nine communities (3 lagoons x 3 seasons), 104 taxa and three unidentified morphotypes were observed. Taxonomic diversity was quantified using species Richness and Shannon index. Using 5 functional traits, i.e. cell size, trophic regime, mobility, colony forming abilities and benthic or pelagic habit, the observed cells were grouped into 19 Functional Entities (FEs). Functional α -diversity was quantified using three independent components: richness, evenness and divergence. Taxonomic and functional β -diversities were compared among the nine communities. Taxonomic diversity was the lowest in the hypertrophic and most productive lagoon. Even if they shared several FEs, each community hosted a specific functional richness, which decreased with increasing eutrophication. Evenness and divergence had no clear trend over trophic gradient and seasons, except in the hypertrophic lagoon where evenness increased from fall to summer. FEs containing diatoms and microphytoplankton were most abundant in the oligotrophic lagoon, while small cells were particularly abundant in the meso- and hypertrophic lagoons, especially in summer. Functional β -diversities across seasons increased with the trophic gradient, highlighting a decrease in temporal stability of the community with increasing eutrophication.

Keywords: Phytoplankton, functional diversity, multidimensional diversity indices, coastal lagoons

Introduction

Phytoplankton constitutes the most important primary producer of aquatic systems, generating half of the global production (Litchman *et al.*, 2007). This autotrophic compartment is very sensitive to environmental variability. Hence, community composition and biomass are controlled both by bottom-up factors such as light, temperature, salinity, and nutrient availability, and top-down factors such as predation (Morais *et al.*, 2003; Smith and Lancelot, 2004). There is a huge diversity of Phytoplankton cells, which respond fast to environmental changes thanks to high growth rates and fast turnover (Cloern and Jassby, 2008). As phytoplankton diversity reflects environmental drivers, it has been used to better understand ecosystem functioning (Paerl *et al.*, 2007; 2010).

In many domains including phytoplankton ecology, functional diversity is currently used for understanding community assembly and ecosystem functioning (Kruk *et al.*, 2002; Longhi and Beisner, 2010). The study of functional diversity links community composition with ecological function and their main drivers (Norberg, 2004; Mouchet *et al.*, 2010), which are necessary to understand ecosystem functioning (Rodrigues *et al.*, 2015). Some authors prefer functional diversity to taxonomic diversity, while others use them in combination (*e.g.* Weithoff *et al.*, 2015). Hence, partial uncoupling between taxonomic and functional classifications is mainly the result of divergent evolution within lineages and convergent evolution among lineages (Weithoff *et al.*, 2015). It also overcomes many biases provided by the approach solely based on taxonomic diversity and better reflects productivity, stability, and resilience of ecosystems (Mouillot *et al.*, 2006). Margalef (1978) pioneered a functional approach of phytoplankton ecology by proposing a graphical representation of the major taxonomic groups niche occupancy in a two-dimensional space representing the pelagic environment as mainly structured by two factors, *i.e.* turbulence levels and nutrient concentrations. This graph, later referred to as the phytoplankton mandala (Margalef *et al.*, 1980), was largely based on how the form and structure of phytoplankton cells are related to their functionality in the environment (Litchman and Klausmeier, 2008). Since then, more comprehensive functional classifications

based on groups of species sharing the same functional traits have been proposed (Reynolds, 1988; Sommer *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 2002).

Functional traits are morphological, physiological or behavioral characteristic dependent of several environmental variables and that may impact performance and survival of species (McGill *et al.*, 2006; Violle *et al.*, 2007). The most relevant traits to characterize phytoplankton are linked to resource use and predation, directly impacting the community structure and composition (Litchman and Klausmeier, 2008). Cell size is the most important morphological trait, affecting all other traits and functions (Irwin *et al.*, 2006; Litchman *et al.*, 2009, 2010). It determines the surface to volume ratio, which drives light harvesting, nutrient affinity and acquisition, and growth rate (Chisholm, 1992; Raven, 1998). Moreover, phytoplankton physiological and behavioral characteristics such as nutrient and light acquisition (Kirk, 1983), and interactions with other trophic levels also depend on cell size (Mouillot *et al.*, 2006; Litchman *et al.*, 2010; Longhi and Beisner, 2010). The trophic mode, *i.e.* strict autotrophy, heterotrophy or mixotrophy, is also relevant, because it describes resources use. Hence, heterotrophy, which can be based on uptake of dissolved organic compounds or ingestion of planktonic cells or particles by phagocytosis, may represent a competitive advantage in dissolved nutrient poor systems (Weithoff, 2003). It thus implies ecological interactions between species, through competition (Litchman and Klausmeier, 2008), and predation. Cell shape and colony formation impact nutrient acquisition, sedimentation and predation, and thus also constitute important aspects of functional adaptations. While colony formation reduces nutrient uptake capacities of the individual cells (Longhi and Beisner, 2010), it results in increasing resistance to grazers, thus reducing mortality (Litchman *et al.*, 2010). Mobility improves the acquisition of dissolved nutrients by increasing the volume exploited by phytoplankton (Margalef, 1978; Litchman and Klausmeier, 2008). The selection of traits is decisive in the determination of the functional distance between species, so this choice must be well considered (Litchman and Klausmeier 2008, Pavoine *et al.*, 2013).

However, the clustering of species in functional groups may lead to a loss of information or to a weakness in the ecosystem processes explanation (Villéger *et al.*, 2010). Moreover, it can result in a misuse of the functional groups previously defined (Padisák *et al.*, 2009). Recent studies have used multivariate statistics to uncover the links between the functional composition and environmental conditions (Kruk *et al.*, 2011; Borics *et al.*, 2012; Palfy *et al.*, 2013; Roselli and Basset, 2015). New methodological approaches have proposed operational methods to describe a multidimensional trait space for characterizing functional diversity (Weithoff, 2003; 2015, Padisak *et al.*, 2007; Villéger *et al.*, 2008; Schleuter *et al.*, 2010). In this paper, we apply a method that has been introduced earlier in the field of fish biology (Villéger *et al.*, 2008). It consists of inferring a multidimensional functional space in which the communities can be plotted as a volume and allows the calculation of a set of indices to characterize different facets of the functional diversity. This multifaceted functional diversity allows to study how communities adapt to different environments.

Temperate aquatic systems at the interface between land and sea such as French Mediterranean lagoons have been submitted to varying degrees of eutrophication and salinity, reflected in the biomass and composition of their phytoplankton communities (Bec *et al.*, 2011). These lagoons undergo seasonal changes due to hydrological flushing and temperature variability, impacting phytoplankton diversity (Morais *et al.*, 2003; Bec *et al.*, 2005; Pecqueur *et al.*, 2011). Because of the importance of hydrology on phytoplankton biodiversity (Ferreira *et al.*, 2015), it is pertinent to consider seasonal variation according the chronology of a water year, which starts 1 October and ends 30 September (USGS website). For Mediterranean systems this separates a long wet period from a shorter warm and dry period. At the start of the water year in autumn, temperature decreases into the winter, and temperatures rise again in spring. Frequent rainfall events during this period favor run-off resulting in freshwater inputs into the lagoons (Lapointe and Matzie, 1996). These run-off bring nitrogen, mainly in the form of nitrate, and cause turbulences and a decrease of salinity (Mallin *et al.*, 1993; Perez-Ruzafa *et al.*, 2002). In summer, salinities and temperatures increase, the latter enhance the microbial mineralization of

organic matter resulting in the release of ammonium (Nuccio *et al.*, 2003), and phosphorus from sediment (Mazouni *et al.*, 1996; Serpa *et al.*, 2007; Collos *et al.*, 2009). As a result, Mediterranean lagoons appear as a very appropriate site for the study of how the ecological functions of phytoplankton communities respond to different eutrophication levels and to seasonal fluctuations in environmental factors.

The aim of this study was to explore the potentiality of the multidimensional functional space and the use of the multifaceted functional indices to describe the functional diversity of phytoplankton communities (α - functional diversity), and make comparisons among different phytoplankton communities (β - functional diversity). We also compared taxonomic and functional diversity to highlight ecological processes such as competitive exclusion, or the potential establishment of ecological niches after environmental changes (Weithoff *et al.*, 2015). Therefore, we choose three different coastal lagoons from the same region but diverse with respect to their trophic status, and compared samplings in three different seasons. As far as a set of appropriate traits has been selected, the functional space represents a mirror of a corresponding n -dimensional hypervolume of pertinent environmental conditions, *i.e.* it can be compared to the niche space *sensu* (Hutchinson, 1961). Hence the occupancy of the functional entities in the functional space allows us to make an inference about their niche occupancy. By using a set of three different functional diversity indices, we can describe the main facets of the functional diversity of a community. They thus improve our understanding of the drivers of phytoplankton community composition and ecosystem functioning (Villéger *et al.*, 2008; Mouchet *et al.*, 2010), by comparison with taxonomic diversity indices.

Methods

Selection of diverse sites with adapted communities

Three shallow coastal lagoons with diverse trophic states were selected on the French Mediterranean coastline (Fig. 1). The two most eutrophied lagoons are located at the Northeast and the Southwest of the “Palavasian” complex, close to the Montpellier city district. The

Palavasian complex has been submitted to a strong anthropogenic inputs during several decades from the Montpellier city district wastewater treatment through the Lez River. The river mouth located northeast of the complex caused a gradual eutrophication of the lagoons, from hypertrophy nearby, to mesotrophy at the southern extreme of the complex (Souchu *et al.*, 2010). However, the reduction in December 2005 of 70 to 83 % of P and N inputs to the lagoons has undergone a re-oligotrophication dynamic (De Wit *et al.*, 2015). Despite this new dynamic, nutrient stocks in sediment still remain important and linked to the proximity to the Lez River (Supplementary Materials Table S1). The two selected stations are located landward, under watershed influence, and without direct opening to the Mediterranean Sea. They present two-different trophic states: West Méjean (MW), directly connected to the Lez River is hypertrophic, and North Ingril (IN) located farthest from the river is mesotrophic. The third lagoon, Ayrolle (AYR) is oligotrophic, and is connected to the sea by a channel in the south – east (Fig. 1). Its connection with another lagoon upstream dabs nutrient intakes from a small watershed (104 km²).

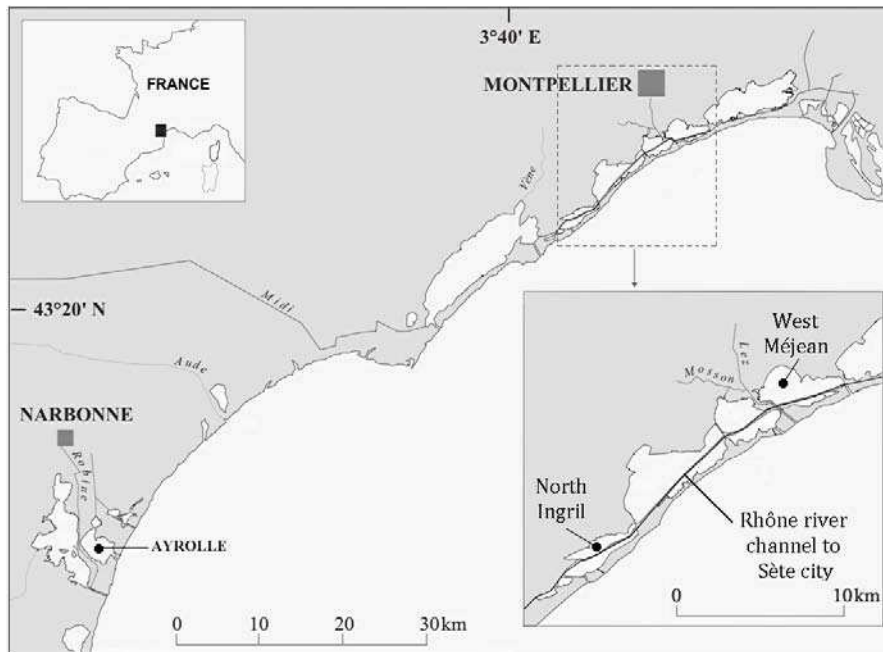


Figure 1. Location of the 3 sampling stations in the South of France. North Ingril (IN) and West Méjean (MW) stations are located in the same set of lagoons next to the Montpellier city agglomeration. Ayrolle (AYR) station is near the Narbonne city agglomeration.

Sampling procedure and environmental parameter measurement

Sampling was carried out during fall 2013, spring and summer 2014, from the 14th to 22th November 2013, the 14th to 23th April, and the 25th August to 4th September 2014. In each lagoon, 70 L of water prefiltered through 1000 µm mesh were sampled in sub-surface (20 cm depth). Salinity and temperature were measured on sub-surface with a conductivitymeter (Cond 3110 Set 2). For each sample, concentrations of NH₄⁺, PO₄³⁻, NO₃⁻, NO₂⁻, TN, TP (µM) were measured according standard fluorimetric and colorimetric methods (Aminot and Chaussepied, 1983).

Assessment of phytoplankton community composition

Phytoplankton biomass was estimated by quantification of the chlorophyll *a* concentration. Triplicate of maximum 100 mL of water (depending on phytoplankton biomass) were analyzed by spectrofluorimetry using the protocol described in Bec et al. (2011), according to Neveux and Lantoiné (1993). TN, TP and phytoplankton biomass were used as eutrophication proxy.

Taxonomic identification and abundances of phytoplankton >3 µm (micro- and nanophytoplankton) were done using optical microscopy. Triplicate of 1 L of samples fixed with formaldehyde (5 % final concentration) were stored in the dark prior to analysis. Because of the weak biomasses in the oligotrophic lagoon AYR, a modified method from Utermöhl protocol was used (Utermöhl, 1931). After at least four days of sedimentation, samples were concentrated by taking off 800 mL of supernatant. This step was repeated until a sufficiently concentrated volume to count phytoplankton. 50 µL of sample were then observed by optical microscopy, and cells were counted on fields or transects depending on their density. At least 200 cells were counted to obtain a relevant assessment of the assemblage. Taxonomic resolution was set at species level when possible, and taxonomy and scientific names were verified using the World Register of Marine Species (Törnroos and Bonsdorff, 2012).

The description and abundances of cells <3 µm were assessed by flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson) according to Bec *et al.* (2011). 1000 µL of samples were fixed with formaldehyde prefiltered on 0.2 µm mesh (2 % final concentration), submitted to a flash freeze and stored in -80°C prior to analysis. Eukaryotic phytoplankton cells (PEUK and Ultra, for picoeukaryotes <3 µm and phytoplankton between 3 and 5 µm, respectively) were distinguished on the basis of light diffraction and red fluorescence emissions (Chl *a*). Populations of coccoid cyanobacteria (picocyanobacteria phycoerythrin-rich (PE-cyan) and picocyanobacteria phycocyanin-rich (PC-cyan)) were identified and distinguished by their orange and red fluorescence emissions (Bec *et al.*, 2011).

Taxonomic diversity was calculated as species richness and Shannon index. Species richness (S) was measured as the total number of species in each community. The Shannon index was measured as:

$$H' = - \sum p_i \ln p_i$$

Where p_i is the relative biomass of species “i”, calculated as the biovolume of this species to the biovolume of the entire algal community (Longhi and Beisner, 2010). Permanova assessed if the taxonomic composition varied across lagoons and seasons (Anderson, 2001), and two-ways Anovas assessed if the species richness and the Shannon index significantly changed across lagoons and seasons (Gonzalez, 2000). Tukey's multiple comparison was used to compare the nine communities side-by-side ($\alpha = 0.05$).

Measuring functional diversity of phytoplankton

Each phytoplankton taxa was functionally described using five traits: cell size, trophic mode, mobility (Salmaso and Padisák, 2007; Palffy *et al.*, 2013), colony formation (Kruk *et al.*, 2002; Weithoff, 2003; Kruk *et al.*, 2010) and vertical position in the water column (Litchman *et al.*, 2010). Phytoplankton communities in the three coastal lagoons being mainly composed of small cells (Bec *et al.*, 2011), some traits - particularly morphological ones - were assessed by combining several techniques. For each observed cell, functional traits of micro- and

nanophytoplankton were assessed using microscopy (Verity and Borkman, 2009), while flow cytometry and epifluorescence microscopy assessed those of ultraphytoplankton (Bec *et al.*, 2005).

Cell size was measured using the greatest axial linear dimension (GALD, μm) (Palfy *et al.*, 2013). Phytoplankton taxa were grouped into five ordered size classes: (i) microphytoplankton $>20 \mu\text{m}$, less sensitive to predation, but less advantageous in nutrient depleted conditions, unless they have abilities to store nutrients (Litchman *et al.*, 2010; Palfy *et al.*, 2013), (ii) nanophytoplankton between 5 and 20 μm , (iii) ultraphytoplankton between 3 and 5 μm , (iv) picophytoplankton between 1 and 3 μm , and (v) picocyanobacteria $<1 \mu\text{m}$, the two smallest being the most competitive to acquire and use nutrient and light resources (Bec *et al.*, 2011). To integrate small cells in the characterization of functional diversity without creating bias in the importance of each functional group, we rescaled their abundances with an estimation of their biovolumes (Palfy *et al.*, 2013). For each species, cells volumes were estimated using mathematical formulae corresponding to the closest and simplest three-dimensional geometric form to the cell shape (Vadrucci *et al.*, 2007), using spherical, spheroid and cylindrical forms. All the cells $<5 \mu\text{m}$ were associated to spherical cells, according to their rounded shape after microscopic observations. Their biovolumes were calculated using the following formulae

$$V = \pi/6 \times d^3$$

With d the diameter, measured for each cell and averaged over the species level, from 1 μm for the picocyanobacteria, to 5 μm for picoeukaryotes between 3 and 5 μm .

Inside nano- and microphytoplankton, centric diatoms were associated to cylindrical forms, using the following formulae

$$V = \pi /4 \times d^2 \times h$$

With d , the diameter and h the height of cells measured for each cell and averaged over the species level.

The others cells shapes (Pennate Diatoms, Dinophytes, etc.) were assimilated to spheres, cylinder or spheroids, using the same measurement of diameter and height (Vadrucci *et al.*, 2007). The calculation of spheroid volume used the following formulae

$$V = \pi /6 \times d^2 \times h$$

With *d*, the diameter and the *h* the height of cells measured for each cell and averaged over the species level.

The phytoplankton trophic regime was obtained by assessing the presence of chlorophyll *a* in cells. For ultra- and nanophytoplankton, triplicates of 30 mL of water fixed with formaldehyde filtered on 0.2 µm (4 % final concentration) were kept at 4°C in the dark prior to analysis. Samples were stained 15 min in the dark with DAPI (40,6-diamidino-2-phenylindole), a fluorescent stain which binds to A-T regions in DNA, allowing us to distinguish life form from non-life one (Jiao and Ni, 1997). Then, aliquotes of 10 to 20 mL (depending on biomass) of sample were filtered through Whatman Nucleopore filters (25 mm diameter, 0.8 µm porosity), and observed with an epifluorescence microscope Olympus AX70. Living organism emitted blue fluorescence due to DAPI under UV excitation (350 nm excitation - 450 nm emission). Strict autotrophic cells containing Chl *a* were distinguished from strict heterotrophic ones (without Chl *a*) thanks it natural red autofluorescence under blue light excitation (Hansen, 1991; Santos *et al.*, 2007). Estimation of non-motile autotrophic picoeukaryotes was then performed by removing the abundance of mobile autotrophic picoeukaryotes obtained by epifluorescence microscopy to the total abundances of autotrophic picoeukaryotes assessed by flow cytometry. Microphytoplankton trophic regime was similarly characterized on 250 mL of samples fixed with glutaraldehyde (2.5 % final concentration) (Verity *et al.*, 1993). Hence, being thus only able to assess strict autotrophy or heterotrophy at the sampling moment, this trait was binary, but several species can be identified in the two trophic modes, indicating mixotrophic abilities, verified with scientific literature (Ismael, 2003).

Colony formation was coded as a categorical trait, *i.e.*, either free cells or cells aggregated into a linear colony, because neither round colony with or without mucilage were recorded in

our study case (Naselli-Flores et al., 2007). Mobility was assessed by observing the presence of structure allowing movement such as flagella, and was coded as a categorical trait with two modalities: mobile or non-mobile (Salmaso and Padisák, 2007). Vertical position in the water column was coded as an ordered trait with three categories: benthic, bentho-pelagic or pelagic life mode, based on information recorded from scientific literature (Tomas, 1997a; 1997b; Bérard-Therriault *et al.*, 1999; Hillebrand *et al.*, 1999; Loir, 2004). For well-identified autotrophic phytoplanktonic groups such as picocyanobacteria, several functional traits such as mobility or colony formation were completed with scientific literature (Bec *et al.*, 2005).

Computing functional diversity indices requires to build a multidimensional functional space (Mouillot et al. 2013). We used the procedure detailed in Maire et al. (2015). First, as all traits were categorical or ordered, taxa with the same combination of functional traits values were grouped into Functional Entities (FEs). Second, pairwise functional distances between FEs were computed using the Gower's distance, allowing equal weight for the different types of variables. Third, a Principal Coordinate Analysis (PCoA) was performed based on this dissimilarity matrix and the best multidimensional functional space was chosen according to the meanSD index. In our case we kept the three first axes of the PCoA. The coordinates of the FEs in the functional space allowed calculating the Functional identity (FId), which is the mean value of functional traits, weighted by abundance, across all species present in a given community. A canonical correlation analysis (CCA) described the relationship between FEs community compositions of the three lagoons the three seasons and their environmental variables (Roselli and Basset, 2015). FEs relative abundances were log-transformed ($x+1$) prior to analysis (Sabanci, 2014).

Functional diversity is multifaceted, so each phytoplankton community was described using complementary indices that described the distribution of species and their abundances (here biovolume) within the functional space (Mouillot et al., 2013).

- The Functional richness (FRic) measures the volume filled by the community in the multi-dimensional functional space, *i.e.* the range of functional strategies present.

- The Functional evenness (FEve) measures the regularity of the repartition of the FEs abundances in the functional space (Villéger et al., 2008). If abundance is regularly spaced, FEve tend to 1, while if the dominant FEs are very close, FEve tend to 0.
- The Functional divergence (FDiv) measures the proportion within a community of total abundance supported by FEs possessing extreme values of functional traits. This index is low when the most abundant FEs are located in the center of the functional space occupied by the community, and increase when the most abundant FEs have the most extreme traits values.

These three indices are a priori independent from each other (Villéger et al. 2008) and have been proven to be relevant to disentangle community assembly rules (Mouchet et al. 2010) and to assess impacts of disturbances on community structure (Mouillot et al., 2013).

We studied the β - functional diversity by comparing different communities among lagoons and among seasons (Bishop et al., 2015). Taxonomic and functional β -diversities were calculated using Bray-Curtis dissimilarity matrices (Abonyi et al., 2012), and illustrated by Principal Coordinates Analyzes (PCoA), using the relative abundance of taxa and FEs. A comparison between functional β -diversity and taxonomic β -diversity assessed if the taxonomic β -diversity was a good proxy of the functional β -diversity. Hence, two communities can be very dissimilar in term of species composition but very similar in term of functional traits. Taxonomic β -diversity can thus be a poor proxy of the functional β -diversity (Villéger et al., 2012). The two distance matrices were compared with the non-parametric Mantel test (Vegan, R), which determined the linear correlation between two matrices. All data analyses were performed on R (R Core Team, 2013).

Results

Seasonal variability of environmental parameters

Environmental characteristics of the three lagoons during the three seasons are resumed in Table 1. In fall and spring, DIN concentrations were higher in IN and MW and still below 1 μ M

in AYR. DIN mainly comprised NH_4^+ , although NO_3^- mounted up to one third of DIN during the fall sampling in IN and MW. In summer, the trophic gradient was particularly well reflected by Chl *a* concentrations, total phosphorus and phosphate concentrations (See also Chapter 6). During this period, TN concentrations were comparable (around 30 μM) for AYR and IN and fourfold higher (123 μM) in MW. Moreover, remarkably high phosphate concentration (2.5 μM) was observed in the hypertrophic MW lagoon, while DIN concentrations were low (<1.5 μM) in all three lagoons. In general, the data confirmed that Ayrolle (AYR) was oligotrophic. North Ingril (IN) and West Méjean (MW), which both are on a re-oligotrophication trajectory (Leruste et al., 2016, see Chapter 3), can still be considered as mesotrophic and hypertrophic, respectively. However, only TN, TP and Chl *a* concentrations in AYR in fall represented an anomaly in this respect that can be explained by sediment re-suspension due to stormy weather conditions prior to sampling.

Table 1. Details of the environmental parameters of the three lagoons in fall 2013, spring and summer 2014. Biomasses estimated by Chl *a* expressed as mean and standard deviation of triplicates values.

Seasons	Date	Station	T (°C)	Salinity	Nutrient (μM)							Tot Chl <i>a</i> ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
					TN	NH_4	NO_3	NO_2	DIN	TP	PO_4	
Fall	14/11	AYR	10.2	37.2	45.2	0.83	BD	0.14	0.97	2.75	0.18	5.60 ± 0.46
	19/11	IN	11.3	37.2	12.9	2.08	1.01	0.23	3.32	0.50	0.11	0.86 ± 0.02
	21/11	MW	6.2	27.4	38.4	1.60	0.90	0.14	2.64	1.25	0.46	1.70 ± 0.02
Spring	15/04	AYR	17.7	33.6	25.8	0.59	0.00	0.00	0.59	0.59	0.06	0.54 ± 0.01
	22/04	IN	15.3	37	18.6	1.70	0.35	0.05	2.1	0.56	0.04	0.90 ± 0.03
	17/04	MW	15.6	21.9	42.9	3.24	0.00	0.05	3.29	1.37	0.76	3.02 ± 0.44
Summer	03/09	AYR	21	30.9	32.5	0.62	0.00	0.07	0.69	0.45	0.12	0.23 ± 0.01
	25/08	IN	20.8	41.5	28.2	0.99	0.15	0.07	1.21	0.89	0.21	0.98 ± 0.04
	27/08	MW	23.2	36.6	123.6	0.68	0.00	0.37	1.05	8.72	2.48	36.1 ± 0.68

BD: Below the detection limit.

Taxonomic composition and α -diversity

Collectively, the nine communities included 104 taxa grouped in 11 classes, *i.e.*, Bacillariophyceae, Chlorophyceae, Cryptophyceae, Cyanophyceae, Chrysophyceae, Dinophyceae, Dictyochophyceae, Euglenoideae, Prasinophyceae, Prymnesiophyceae, and Trebouxiophyceae, and 3 morphotypes of unknown taxonomic affiliation. In term of relative biovolume, the taxonomic composition of the nine communities differed among lagoons (Permanova, $df = 2$, $F = 2.8$, $p < 0.001$) and among seasons (Permanova, $df = 2$, $F = 2.6$, $p < 0.001$). In fall, the community of the oligotrophic AYR lagoon was dominated by Bacillariophyceae (96.3%), with a huge contribution of Pennate Diatoms such as *Diploneis sp.*, *Cocconeis sp.*, and *Navicula sp.*. The fall community of IN was mainly composed of *Chlorella*-like cells representing 55.9% of the community. Bacillariophyceae was the second main group (20.9%), and Dinophyceae and Cryptophyceae were the two last important groups (7.8% and 5.1% respectively). The MW fall community was dominated by Euglenoideae (76.3%) and Bacillariophyceae (15.7%). In spring, the community of AYR was still dominated by Bacillariophyceae but in a lower proportion (63.8%), with a dominance of *Chaetoceros* species. Cryptophyceae was the second dominating group (17.8%). The spring community of IN was still dominated by *Chlorella*-like cells (45.0%), but the relative biomass of Dinophyceae was higher than in fall (24.7%), and represented the highest species richness (mean of 16 species for a total mean of 42 species). The two other main species belonged to Cryptophyceae (10.6%) and Prymnesiophyceae (6.5%). In the MW spring community, *Chlorella*-like cells were also dominant (40.4%) with Dinophyceae (27.3%) mainly composed of Peridinales species, and Prasinophyceae (19.8%). In summer, the community of AYR was still dominated by Bacillariophyceae (72.9%), *Chlorella*-like cells (10.4%) and Dinophyceae (7.7%). The dominance of *Chlorella*-like cells was lower in summer than in spring in the IN lagoon (37.9%), as well as those of the Dinophyceae (11.5%), while the relative biomass of Bacillariophyceae and Cryptophyceae increased (29.2% and 16.7 % respectively). The summer community of the hypertrophic MW lagoon was exclusively dominated by

Chlorella-like cells, which corresponded to 94.8% of the total biomass. This morphotype was exclusively responsible of the bloom observed this season.

The species richness also changed among lagoons (two-ways Anova, $F = 45.7$, $p < 0.0001$) and among seasons (two-ways Anova, $F = 56.8$, $p < 0.0001$). In all seasons, the mesotrophic IN lagoon exhibited the highest species richness, while hypertrophic MW lagoon exhibited the lowest one (Fig. 2-A). Shannon index significantly varied across the nine communities (two-ways Anova, $F = 15.5$, $p < 0.05$ for the season factor, $F = 26.4$, $p < 0.05$ for the lagoon factor). It ranged from 0.28 in MW in summer, to 2.5 in the oligotrophic lagoon AYR in spring. In fall, the mesotrophic IN lagoon exhibited the highest Shannon index (Fig. 2-B), while in the two other seasons, the oligotrophic AYR lagoon exhibited the highest one. The hypertrophic MW lagoon always showed the lowest one (Tukey's multiple comparisons, $p < 0.05$), with the lowest value observed during the summer *Chlorella*-like bloom.

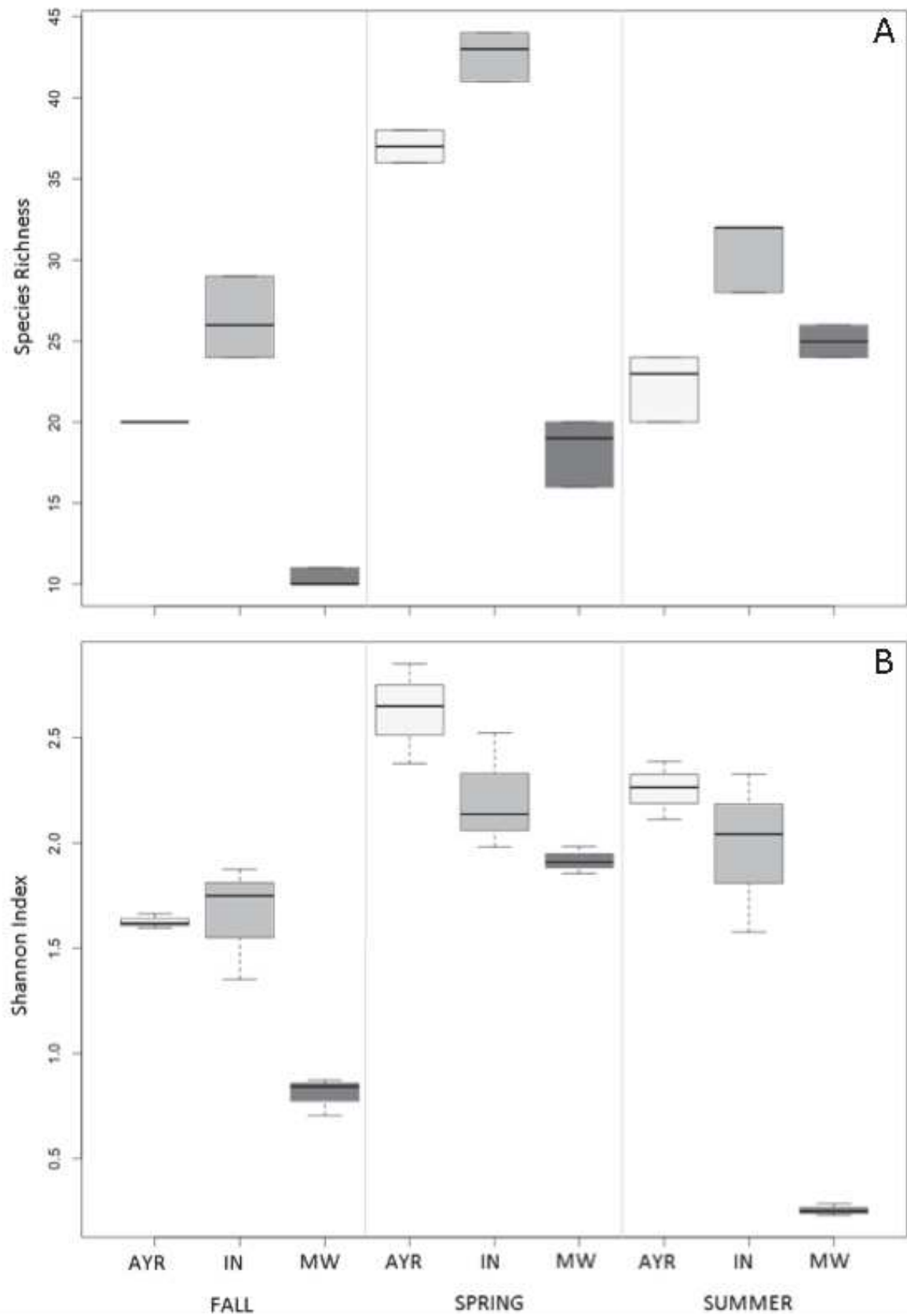


Fig. 2. Species richness (A) and Shannon index (B) among lagoons (AYR light grey, IN grey, MW dark grey) and seasons.

Taxonomic β -diversity

Matrice of Bray-Curtis distances representing taxonomic β -diversity was illustrated by PCoA (Fig. 3, Table S2-A). The lowest taxonomic β -diversity was observed between spring and summer communities of the mesotrophic lagoon IN (37 %). The highest values were observed between the summer community of the hypertrophic lagoon MW and the fall and summer communities of the oligotrophic AYR lagoon (99.9 %). The PCoA highlighted a low variability of the taxonomic diversity in IN (Fig. 3), while the MW and the AYR lagoons exhibited the highest variability.

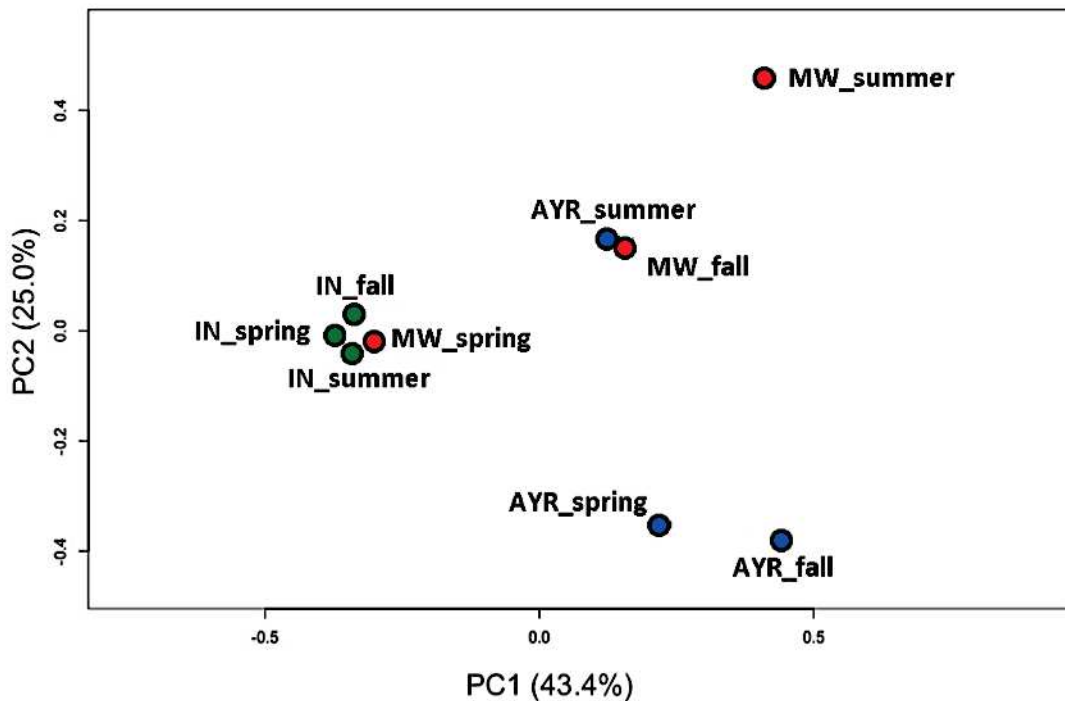


Figure 3. Representation of Bray-Curtis dissimilarity distances matrix, with Principal Coordinates Analysis (PCoA) between the nine communities (3 lagoons x 3 seasons) according to relative biomass of phytoplankton taxa. Colors represent the trophic status of the lagoons (blue for the oligotrophic AYR, green for the mesotrophic IN and red for the hypertrophic MW lagoons).

Functional α -diversity

Collectively, the traits of the phytoplankton cells observed by microscopy or flow cytometry allowed us to create 19 Functional Entities (FEs) (Table 2). The number of FEs in each lagoon ranged from 10 to 16, in MW in fall and in IN in summer, respectively (Table 3). Figure 4

shows the presence of these entities for each of the nine different communities plotted in the three-dimensional functional space together with an indication of their FEs biomasses as estimated from biovolumes. The coordinates of the nine communities in the three-dimensional functional space and the values of the four FD indices across the nine communities are provided in Table 3.

Between the three lagoons, the communities differently filled the functional space across seasons. Between fall and spring, the number of FEs composing the communities increased in the three lagoons (from 12 to 15 FEs in AYR, 14 to 15 FEs in IN, and 10 to 12 FEs in MW). Between spring and summer, this increase only continued in the two Palavasian lagoons IN and MW (from 15 to 16 and from 12 to 15 FEs respectively), while it decreased in AYR (from 15 to 13 FEs). Globally, this number was always highest in the mesotrophic IN lagoon (Table 3). In fall, the community of the oligotrophic AYR lagoon was dominated by benthic and benthopelagic species of autotrophic non-mobile and colony-forming microphytoplankton (x, i), mainly represented by Diatoms (Table 2). The community of the hypertrophic MW lagoon was mainly dominated by pelagic autotrophic mobile and single cell microphytoplankton, *i.e.* n FE, comprising several species of Dinophytes. The community of the hypertrophic lagoon during summer was the most unbalanced. It was almost exclusively composed of pelagic autotrophic, non-mobile and single cell picoeukaryotes, not capable of colony formation, (s) containing *Chlorella*-like cells. The community of the mesotrophic lagoon was always the less dominated by few FEs, in addition to have the highest FEs number (Fig. 4).

Chapitre 5 – Multidimensional functional diversity indices improve understanding of phytoplankton ecology in coastal lagoons

Table 2. Traits values of functional entities and their representative species. Labels are those used in Figures and in the main text.

Class size	Trophic regime	Mobility	Colony formation	Habitat	Typical representatives	Label
Pico <1 µm	Auto-	no	no	pelagic	<i>Synechococcus-like</i> Cyanobacteria	p
Pico <3 µm	Auto-	no	no	pelagic	nn. id., small autotrophic rounded cells, <i>Chlorella-like</i>	s
Pico <3 µm	Auto-	yes	no	pelagic	nn. id., small autotrophic flagellates	v
Pico <3 µm	Hetero-	yes	no	pelagic	nn. id., small heterotrophic flagellates	w
Ultra <5 µm	Auto-	no	no	benthic	Centric diatom sp. 3	a
Ultra <5 µm	Auto-	yes	no	pelagic	<i>Pyramimonas sp.</i>	d
Ultra <5 µm	Hetero-	yes	no	pelagic	<i>Ollicola vangoorii</i>	e
5< nano <20 µm	Auto-	no	yes	benthic	<i>Scenedesmus sp.</i> , Cyanobacteria sp. 2	b
5< nano <20 µm	Auto-	no	no	benthic	Centric diatom sp. cf <i>Thalassiosira sp.</i> , <i>Navicula sp.</i> cf <i>gregaria</i> , Pennate diatom sp., <i>Synechococcus-like</i>	c
5< nano <20 µm	Auto-	yes	no	benthopelagic	<i>Prorocentrum sp.</i> cf <i>mexicanum</i>	g
5< nano <20 µm	Auto-	yes	no	pelagic	<i>Apedinella spinifera</i> , <i>Cryptomonas sp.</i> , <i>Plagioselmis</i> sp., <i>Prorocentrum minimum</i> , <i>Tetraselmis sp.</i>	h
5< nano <20 µm	Hetero-	yes	no	pelagic	<i>Heterocapsa minima</i> , <i>H. niei</i> , <i>Protoperdinium sp. cf steinii</i>	f
Micro >20 µm	Hetero-	yes	no	pelagic	<i>Dinophysis acuminata</i> , <i>Gonyaulax sp. cf. spinifera</i> <i>Gyrodinium sp.</i> , <i>Oxyphysis Oxytoxicoides</i> , <i>Protoperdinium sp.</i> cf <i>americanum</i> , <i>bipes</i> Taxon <i>Oblea</i> , <i>Vulcanodinium sp.</i>	z
Micro >20 µm	Hetero-	yes	no	benthopelagic	<i>Peridinium quinquecorne</i>	o
Micro >20 µm	Auto-	yes	no	pelagic	<i>Eutreptiella sp.</i> , <i>Scrippsiella sp.</i> , <i>Kryptoperidinium foliaceum</i> <i>Prorocentrum micans</i> <i>Scrippsiella sp.</i> <i>Gymnodinium sanguineum</i> <i>Eutreptiella sp.</i> <i>Syracosphaera sp.</i>	n
Micro >20 µm	Auto-	no	no	benthopelagic	<i>Ceratoneis closterium</i> , <i>Amphiprora sp.</i> , <i>Pleurosigma</i> sp.	i
Micro >20 µm	Auto-	no	no	benthic	<i>Gyrosigma sp.</i> , <i>Diploneis sp.</i> , <i>Cocconeis sp.</i>	x
Micro >20 µm	Auto-	no	yes	benthic	<i>Licmophora sp.</i> , <i>Bacillaria sp.</i> cf <i>paxillifer</i>	k
Micro >20 µm	Auto-	no	yes	pelagic	<i>Chaetoceros sp.</i> (5 different species)	M

Non-taxonomically identified morphotypes are indicated by “nn id.”

Table 3. Functional diversity of phytoplanktonic assemblages in the three lagoons during three seasons. Number of Functional entities (FEs), biomass-weighted average position in the 3-Dimensionnal functional space (Fid-1-3), and values of functional richness (FRic), functional evenness (FEve), functional divergence (FDiv), and functional specialization (FSpe) indices.

Seasons	Lagoon	Nb FEs	Fid-1	Fid-2	Fid-3	FRic	FEve	FDiv	FSpe
Fall	AYR	12	-0.240	0.083	0.033	0.446	0.377	0.570	0.498
	IN	14	-0.046	-0.124	-0.004	0.382	0.460	0.884	0.503
	MW	10	0.019	0.043	-0.097	0.167	0.017	0.552	0.428
Spring	AYR	15	-0.131	0.032	-0.036	0.741	0.379	0.589	0.519
	IN	15	0.054	-0.083	-0.032	0.478	0.379	0.701	0.488
	MW	12	0.084	-0.066	-0.041	0.536	0.404	0.712	0.467
Summer	AYR	13	-0.203	0.046	0.019	0.540	0.313	0.873	0.586
	IN	16	-0.068	-0.054	-0.006	0.765	0.352	0.618	0.499
	MW	15	-0.059	-0.248	-0.011	0.571	0.480	0.957	0.497

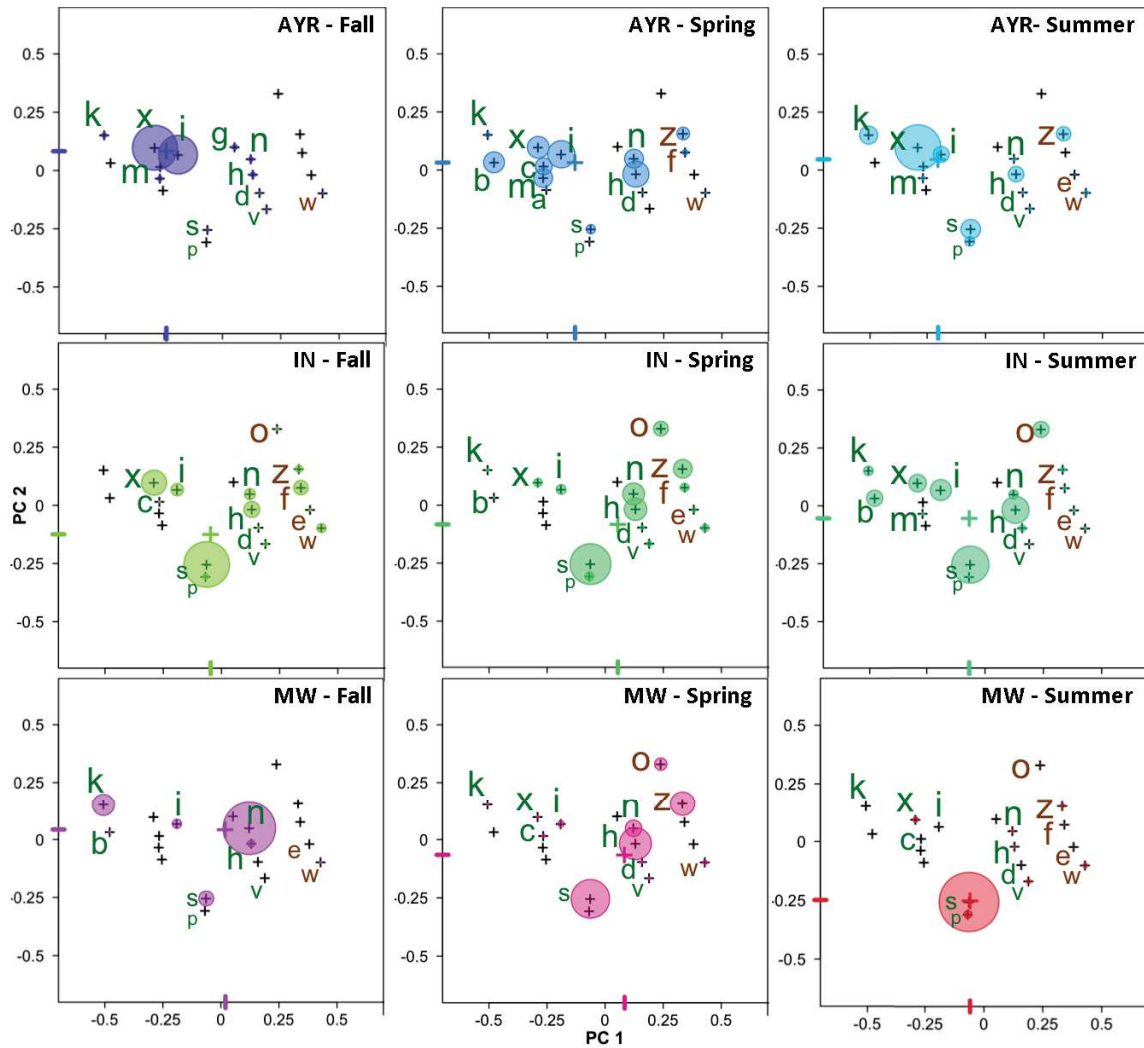


Figure 4. Functional diversity of phytoplankton communities of the three lagoons (AYR, IN and MW) in fall 2013, spring and summer 2014. Functional entities are represented with crosses and those present in each community are shown with a colored circle which area is proportional to their relative biomass. FEs participating to each community are indicated by their labels. Sizes of labels illustrated size classes. Autotrophic FEs are colored in green, heterotrophic in brown. Traits values of FEs are detailed in table 2. Colored lines on axes represent biovolumes-weighted average for the combination of traits taken account by these axes.

Functional β -diversity

The community of the oligotrophic AYR and the mesotrophic IN lagoons had a low functional β -diversity across seasons, compared to the communities of the hypertrophic lagoon MW (Fig. 5). The communities of the two Palavasian lagoons (IN and MW) were closer between them compared to AYR. The lowest functional β -diversity was observed between spring communities of IN and MW (21.6 %) (Fig. 5, Table S2-B). Globally, the communities of MW

expressed high functional β -diversity with those of AYR (from 65.3 % between spring communities, to 98.6 % between fall community of the oligotrophic lagoon AYR and summer community of the hypertrophic lagoon MW). Functional and taxonomic β -diversity between communities of the three lagoons during the three seasons were overall correlated (Mantel Test, $r = 0.69$, p -value = 0.003), even if some strong differences were observed between the representation of the taxonomic (Fig. 3) and the functional (Fig. 5) β -diversity. With the functional β -diversity, the community of the hypertrophic lagoon MW in fall expressed the most important dissimilarity from the others (Table S2, from 76.8 to 95.7 %), while in term of species composition, it was closer from the summer community of the oligotrophic AYR lagoon.

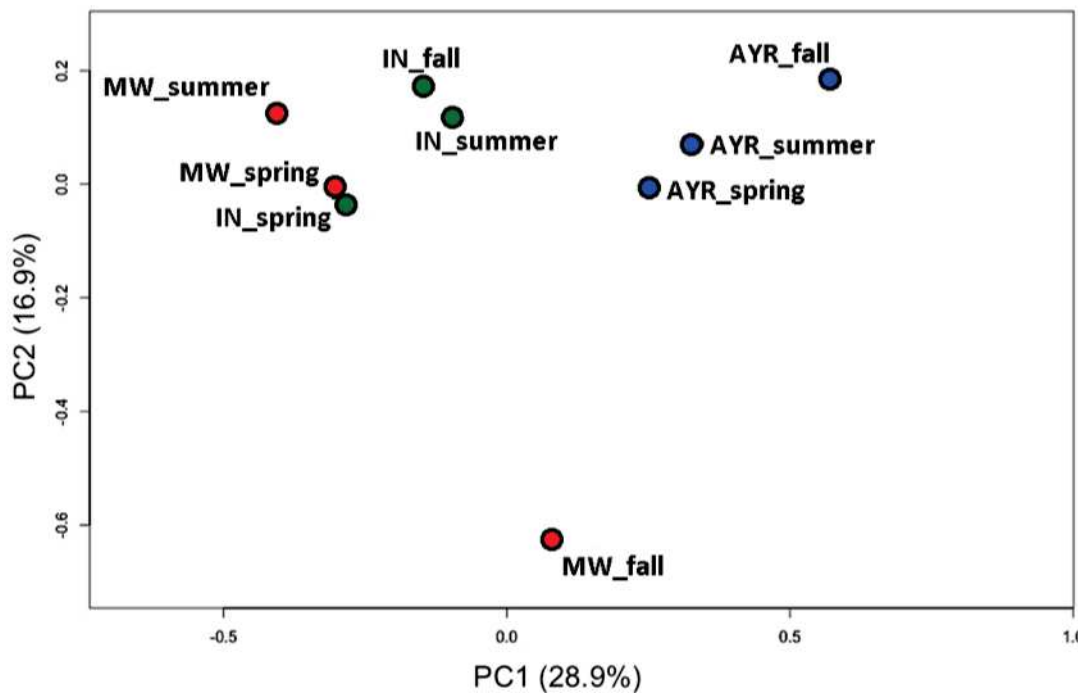


Figure 5. Representation of Bray-Curtis dissimilarity distances matrix, with Principal Coordinates Analysis (PCoA) between the nine communities (3 lagoons x 3 seasons) according to relative biomass of Functional Entities. Colors represent the trophic status of the lagoons (blue for the oligotrophic AYR, green for the mesotrophic IN and red for the hypertrophic MW lagoons).

Functional diversity indices

The functional richness (FRic) of each community is represented graphically by a scatterplot (Fig. 6, Fig. S1 and S2, Supplementary Materials). This index exhibited a strong variability, from 0.167 to 0.765 (factor 4.6), compared to the low variability of the number of FEs in the communities (from 10 to 16, factor 1.6). FRic values differed among lagoons, with the lowest values always in MW, ranging from 0.167 to 0.571 in fall and summer, respectively. The ranking between AYR and IN varied among samplings. Hence, in fall and spring the highest FRic was observed in AYR, 0.446 and 0.741, respectively. The highest FRic in summer was observed in IN, namely 0.765 (Table 3). For all lagoons, the lowest FRic values were systematically observed in fall (Table 3), as illustrated by the reduced volume in the functional space occupied by the fall communities (Fig. 6, Fig. S1 and S2, compare within lagoons). In general, the mesotrophic lagoon IN showed the smallest variation of FRic in term of volume occupied by the FEs in the functional space.

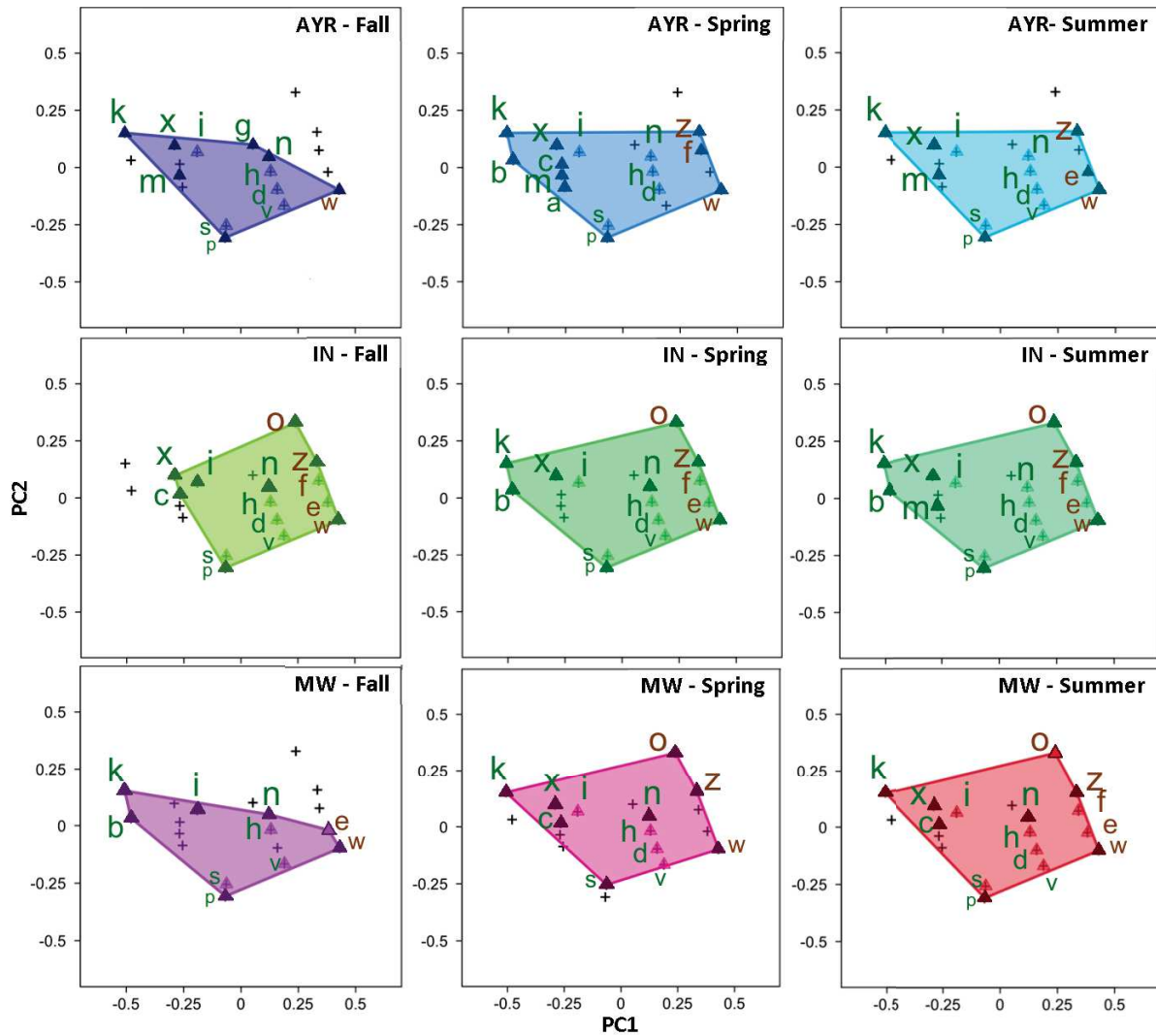


Figure 6. Functional richness of the three lagoons (AYR, IN and MW) in fall 2013, spring and summer 2014 in the three-dimensional functional space, illustrated with the first two principal coordinate axes 1 and 2. Functional entities present in a community are represented by triangles and those being vertices in the three-dimensional space are filled. Projections of the convex hull computed in 3-dimensions on this 2-dimensional space are illustrated by the colored polygon.

The Functional evenness index (FEve) was always <0.5 , revealing an unbalanced distribution of FEs abundances in the functional space. Moreover, the very low FEve value in the hypertrophic MW lagoon in fall (0.017) was linked to an over-representation of the n FE (Fig. 4), and a strongly reduced volume occupied by the community in the functional space.

The functional divergence index (FDiv) represents a measure for the divergence of traits among FEs within the community weighted by the abundances of the corresponding FEs. Low values of FDiv, *i.e.*, below 0.6, were observed for AYR in fall and spring and for MEW in fall. In

AYR and MEW the highest FDiv values of 0.873 and 0.597, respectively, were observed in summer. In contrast, in IN, FDiv was highest in fall and lowest in summer, *i.e.*, 0.884 and 0.618, respectively.

Relation between functional diversity and environmental characteristics

The relationship between the FEs composition of the nine communities and the environmental variables are illustrated by the CCA ordination of the 19 FEs and 10 environmental variables (Fig. 7). The two first axes of the ordination diagram explained 65.7 % of the variance. There was a strong negative relation between salinity, negatively correlated to the first axis, and NO_3^- concentrations positively correlated to the first axis. Total phosphorous, total nitrogen and Chl *a* concentrations were positively correlated to the second axis. NH_4^+ was positively correlated with both axes and there was also a strong correlation between NH_4^+ and NO_3^- . Eight of the nine communities were projected left-hand (negative and low values of axe 1) and the second axes appeared to separate the most eutrophicated lagoon samples (MW summer, MW spring) being associated with high Chl *a*, TP, TN and PO_4 concentrations, from the most oligotrophic lagoon samples (AYR fall, summer and spring) at the opposite. Only the fall community of the hypertrophic MW lagoon was projected on the right, related to high NO_3^- and particularly low temperature. This community was mainly composed of k and n FEs, corresponding to benthic microphytoplankton with Pennate Diatoms, Dinophytes and Euglenoid species. These two FE were projected at positive values of axe 1. The other FEs were projected to the left (negative and low values of axe 1) and separated mainly according axe 2. Along the first axis, the g, x, i, m, a, c and b FEs were projected on the negative side, associated to AYR, and opposed to ammonium concentrations arrow, indicating a strong negative relation between these groups and ammonium. Hence, most of the Diatoms cells belonged to these FEs (a, c, x, i, k, m) and were linked to AYR communities. The s FE corresponding to non-mobile picoeukaryotes was strongly associated to Chl *a* biomass and to summer community of the hypertrophic lagoon. The p and d FEs, corresponding to picocyanobacteria and *Pyramimonas sp.* were associated to

the summer community of the mesotrophic lagoon. The others FEs were close to the origin of the ordination plot, and were commonly present in the communities of all three lagoons.

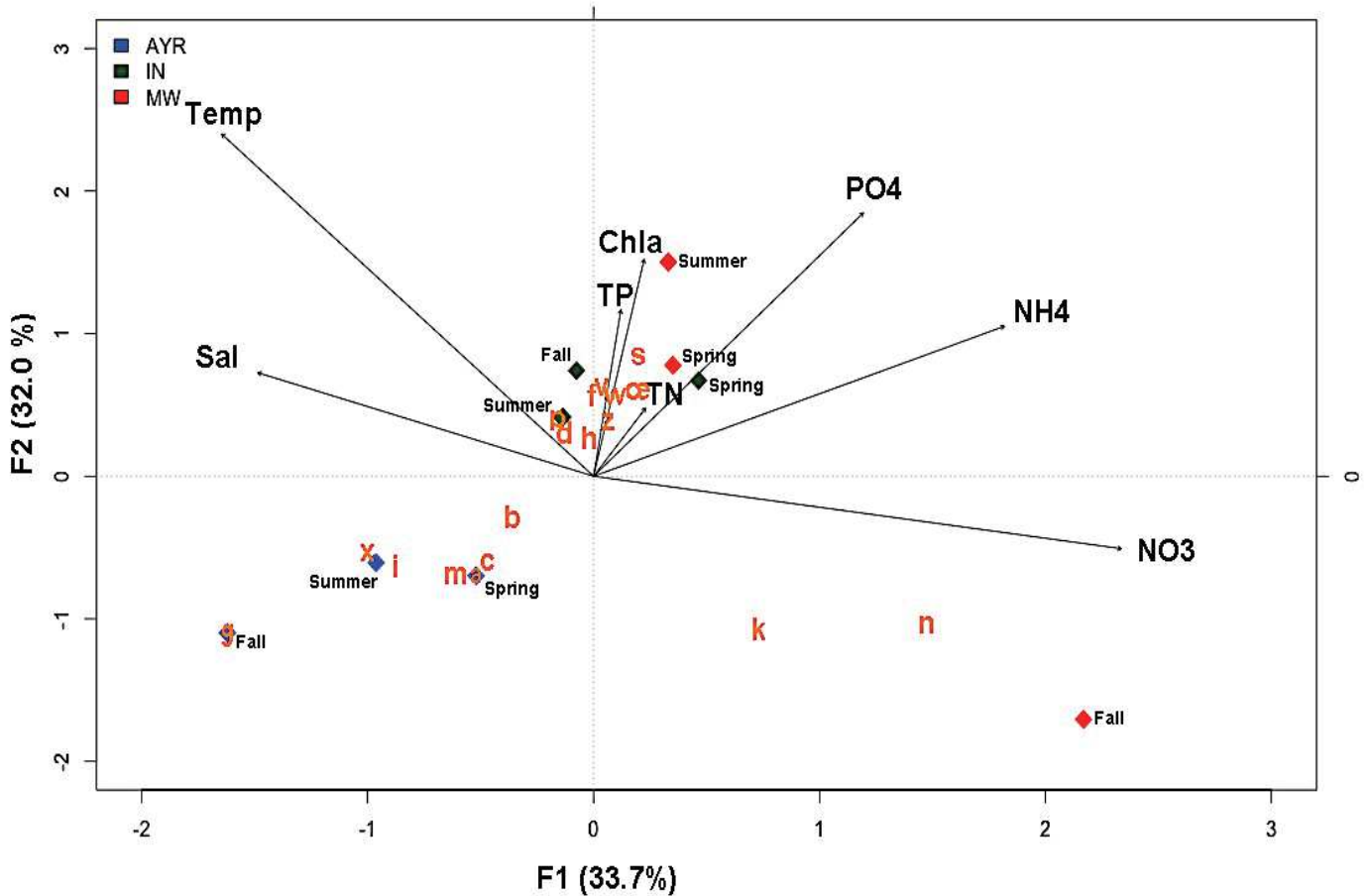


Figure 7. Ordination diagram of the first and the second axes of the Canonical Correspondence analysis (CCA) between environmental variables and the biomass of 19 Functional Entities (FEs). Arrows represent environmental parameters. Lagoons are represented by colored diamonds (blue for the oligotrophic AYR, green for the mesotrophic IN and red for the hypertrophic MW lagoons). FEs are presented with letters and their traits values are detailed in Table 2.

Discussion

Multidimensional functional indices (Villéger *et al.*, 2008) have been used to assess the functional diversity (FD) of fish communities (Mouillot *et al.*, 2007; Villéger *et al.*, 2010), benthic fauna (Sigala *et al.*, 2012) in coastal lagoons, aquatic vegetation in shallow eutrophic lakes (Arthaud *et al.*, 2012), and marine zooplankton (Pomerleau *et al.*, 2015). To the best of our knowledge, this is, however, the first time that such multidimensional functional indices have been used to assess phytoplankton functional diversity. Moreover, we took special care to

include the smallest phytoplankton cells, *i.e.*, picocyanobacteria and picoeukaryotes, which are often overlooked in classical taxonomic studies but can be recognized as phototrophs and counted by flow-cytometry. It has been reported that these small phototrophic organisms are often numerically the most abundant group in coastal lagoons such as the three selected ones (Bec *et al.*, 2011). Because these small cells can often not be identified to the species level (Bec *et al.*, 2011), using functional traits seems a more promising approach to take them into consideration than it would not be possible by an exclusively taxonomic approach (Palfy *et al.*, 2013). Hence, this suggests that the study of functional diversity is more adapted than the purely taxonomic approach to describe the phytoplankton community composition in coastal lagoons with a large proportion of picophytoplankton. However, the large size spectrum of the phytoplankton in coastal lagoons raised the problem of comparing functional traits among individuals and assessing their importance in the communities. Therefore, we have scaled the relative weight of the functional entities to their estimated biomasses using the biovolumes of the individual cells (see Methods).

Comparing functional and taxonomic diversity to disentangle the ecological processes structuring phytoplankton communities

In addition to the 19 functional entities (FEs), we identified 104 taxa and three morphotypes of unknown taxonomic affiliation. This allows us to compare taxonomic and functional diversity and draw some conclusion on the ecological processes driving community assembly in phytoplankton communities (Weithoff *et al.* 2015).

Among the nine communities, functional β -diversity segregated the oligotrophic lagoon AYR, while taxonomic β -diversity segregated a group comprising the mesotrophic IN lagoon during all seasons together with MW in spring (Fig 3 and 5). Therefore, the functional diversity most likely better reflects species responses to the main environmental drivers such as eutrophication status rather than the taxonomic diversity (Longhi and Beisner, 2010; Weithoff *et al.*, 2015). Collectively for the nine communities, we observed a correlation between β -

taxonomic and functional diversity. However this correlation has to be considered with caution, since it was calculated on species or FEs relative biovolumes and did not include distances between species or FEs. This correlation is also difficult to generalize in view of contradictory conclusive results (Villéger *et al.*, 2012), and it depends on mechanisms impacting community assembly (Hooper *et al.*, 2005). Comparing the mesotrophic IN lagoon with the oligotrophic AYR and the hypertrophic MW ones, we observed a high taxonomic β -diversity and a lower functional β -diversity, which may suggest the absence of environmental filtering, or that most species are generalist, sharing similar functional identities (Villéger *et al.*, 2012).

The mesotrophic IN lagoon showed the highest species richness and a Shannon index comparable to that of AYR in all seasons. This suggests that in coastal lagoons, taxonomic diversity is also maximal at an intermediate level of productivity and trophic status (Duarte *et al.*, 2006). The comparison between taxonomic and functional diversity highlighted several temporal ecological patterns in the three lagoons. In the hypertrophic MW lagoon, the high decrease of the taxonomic diversity between spring and summer, while the functional richness stayed stable suggest a competitive exclusion within functional groups, *e.g.*, in favor to the most competitive cells to use ammonium and grow fast under higher temperatures (See Chapter 3; Weithoff *et al.*, 2015). In the mesotrophic IN lagoon, the decrease of taxonomic diversity between spring and summer, while the functional richness increased suggest the potential establishment of a new functional niches linked to the increase of temperature and changes in nutrients inputs (Weithoff *et al.*, 2015).

Functional diversity indices highlight functional community structure

The FD indices describing different aspects of the functional diversity reflected the impact of the trophic gradient on phytoplanktonic communities, or the proximity between the two Palavasian lagoons. Collectively, the three FD indices (FRic, FEve and FDiv) were related to the eutrophication status of the lagoons, although the lowest values were not systematically observed in the most eutrophicated or productive MW lagoon.

Overall, our results are not systematically matching with a negative relation between disturbance level and diversity (Villéger *et al.*, 2010), or with a bell-shaped curve implying a peak of diversity at the intermediate disturbance frequency or intensity (Devictor *et al.*, 2010). As a matter of fact, the observed trends for each index changed with seasons. These FD indices reflect a more important seasonality of the functional diversity than that of taxonomic diversity, which can be explained by a need to cope with the temporal variations of the environmental characteristics in the lagoons. Moreover, the decrease of FD with the lagoon variability (See Chapter 4) suggest a causal link between the two, since ecologists hypothesize an increase of ecosystem stability in response to environmental fluctuation when diversity increase, thanks to functional redundancy (Hooper *et al.*, 2005).

During the two seasons that favor phytoplankton blooming, *i.e.* spring and summer, the functional evenness was highest in the most productive MW lagoon. A similar pattern has been observed for coastal macrophytes or aquatic vegetation in shallow eutrophic lakes (Arthaud *et al.*, 2012). The low FEve index, always comprised between 0.017 and 0.480 (Table 3) reflected unbalanced hypervolume infilling, especially in fall in the hypertrophic MW lagoon. It indicates an over-representation of several values of functional traits. In another way, the FDiv was globally higher in the two Palavasian lagoons, particularly in the mesotrophic IN lagoon in fall and in the hypertrophic MW lagoon in spring and summer. It shows that species with extreme values of traits are more dominating the MW community compared to the oligotrophic AYR lagoon, suggesting that the MW community is largely composed of specialists. The high level of FDiv observed in the hypertrophic lagoon in summer reflected a high level of niche differentiation among FEs within communities. Hence, the most abundant s FE is highly adapted to summer environmental characteristic in the hypertrophic lagoon, especially to use recycled NH_4 from sediments.

The low variability of FEs specific richness compared to the FRic variability highlights that species (or FEs) richness might provide an incomplete illustration of ecosystem functioning,

more specifically after a disturbance, and which require the use of several complementary tools to assess functional diversity (Villéger *et al.*, 2010).

How ecosystem functioning shape phytoplankton functional structure?

The lagoons have clearly shown a seasonal variability of environmental parameters. Moreover, interactions with the benthos are particularly important in these shallow lagoons. In this respect, in AYR the benthos is dominated by *Zostera noltei* meadows, while benthic macroalgae may occasionally bloom in MW. The decrease of salinity between fall and spring reflected freshwater inputs from watershed due to rainfall. Inversely, the increase of salinity between spring and summer in the Palavasian lagoons reflected the low watershed influence during the dry season. It has been proposed that this seasonality creates a shift in the inorganic nitrogen form available for phytoplankton, from nitrates carried by run-off into the lagoon during the wet seasons to recycled NH_4^+ and PO_4^{3-} release from sediment in summer (Mallin *et al.*, 1993; Nuccio *et al.*, 2003). Nevertheless, ammonium was systematically the predominant form of DIN, and only in fall nitrate mounted to 30 % of DIN. The huge increase of PO_4^{3-} concentration in the water column between spring and summer in the three lagoons confirmed the enhancement of these benthic fluxes from sediment by warmer temperatures (Serpa *et al.*, 2007). However, the just-in-time consumption of nutrients by phytoplankton hidden the shift between NO_3^- and NH_4^+ .

Communities are good and reliable indicators of habitat characteristics (Reynolds *et al.*, 2002). To understand how the taxonomic and the FEs composition of phytoplankton communities reflected their ecosystem functioning, we can view them in parallel to functional groups previously associated to aquatic systems having well defined ecological characteristics (Reynolds *et al.*, 2002; Padisák *et al.*, 2003; Kruk *et al.*, 2010). Hence, these species assemblages fitted to lagoons characteristic by several functional traits, which were related to ecological strategies (Reynolds, 1988; Litchman *et al.*, 2007; Padisák *et al.*, 2009).

The West Méjean lagoon is characterized by the highest variability of temperature, salinity and nutrient concentrations (see Chapter 4). This lagoon is highly influenced by continuous freshwater inputs from a stream and the Rhône River to Sète channel. It was highly degraded by nutrients inputs before 2006 (Leruste et al., 2016 – Chapter 3). This hypertrophic lagoon was the most productive, and was characterized by low taxonomic and functional diversities. This low diversity was reflected by a dominance of two main functional entities associated to the colonist strategy: The **n** FE dominating fall community, and the **s** FE dominating spring and summer ones. Globally, the composition of these two FEs highlighted the high eutrophication and the huge amount of organic matter whose remineralization produce high nutrients fluxes in summer. These organisms are colonist species, using their small size, high growth rate and nutrient affinity (Chisholm, 1992; Raven, 1998) to respond fast to a perturbation like a nutrient enrichment, and colonize eutrophicated lagoons (Reynolds, 1988; Smayda and Reynolds 2001, 2003). They were already assigned to shallow mixed and enriched waters (Reynolds et al., 2002, Padisak et al., 2009; Kruk et al., 2010, Palffy et al., 2013). Hence, Green Algae are particularly competitive to acquire nutrient and especially ammonium released from the sediment of the West Méjean lagoon during summer (Litchman et al., 2007; Donald et al., 2011).

The **n** FE comprising *Eutreptiella* sp., *Scrippsiella* sp., *Kryptoperidinium foliaceum*, *Gymnodinium sanguineum* was particularly abundant during fall in the MW lagoon. This assemblage also shares colonist species associated to shallow, highly nutrient-enriched habitats, often mesohaline and with reduced water-mass exchange with offshore waters (Smayda and Reynolds, 2001; Reynolds et al., 2002; Salmaso and Padisak; 2007; Alves-de-Souza *et al.*, 2008). With a secondary FE composed on benthic and microphytoplanktonic Diatoms, the composition of fall community of the hypertrophic lagoon reflected (i) the stirring of the water column, and (ii) high particulate organic matter. It was highlighted by the importance of the heterotrophic mode through organic matter consumption, considering mixotrophic abilities of Dinophytes and Euglenoid species in the **n** FE (Brandt, 2001; Ismael, 2003). The shift between spring FEs,

containing Dinophytes, to summer s one can be linked to the seasonal variability of temperature, nutrient availability and resources. Hence, high temperature and ammonium inputs enhanced Green Algae more than others (Litchman et al., 2007; Glibert et al., 2010; Paerl et al., 2010).

The mesotrophic IN lagoon exhibited a lower variability of salinity (see Chapter 4). This lagoon was lower impacted by eutrophication, and exhibited a lower range of phytoplankton biomass across seasons. This lagoon hosted a wide diversity of taxa and FEs among which the s FE was in stable proportions during the three seasons. The taxonomic and FE composition of this lagoon, comprising PE-cyan *Synechococcus*-like, Haptophytes and Diatoms reflected low nutrient concentrations and clearer waters (Reynolds *et al.*, 2002; Litchman *et al.*, 2007; Stomp *et al.*, 2007; Padisák *et al.*, 2009).

The oligotrophic AYR lagoon exhibited highest relative biomasses of Diatoms, especially in fall. Diatoms can grow very fast and can outcompete other phytoplanktonic species, especially for NO₃⁻ inputs brought by run-off (Glibert *et al.*, 2015). PE-cyan *Synechococcus*-like and large centric Diatoms highlighted the low eutrophication and the phosphorous limitation of this lagoon (Gailhard *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2002; Stomp *et al.*, 2007). Hence, large centric Diatoms can fit to depleted nutrient condition thank to their ability to store nitrate under their vacuoles (Litchman *et al.*, 2007). The presence of heterotrophic Dinophytes in the three lagoons during spring and summer suggest the use of phagotrophic or heterotrophic abilities to fit to systems where nutrient must be scarce (Ismael, 2003). Other taxa and FEs, such as the i one highlighted frequently stirred up and inorganically turbid shallow characteristic of the lagoon (Padisak *et al.*, 2009). The presence of PC-cyan reflects an adaptation to these inorganically turbid waters (Stomp *et al.*, 2007). This important mixing in fall must also explain the dominance of benthic or benthic-pelagic species (Fig. 2).

Several taxonomic groups, contained in the h FE, exhibited a high adaptability to a wide range of environmental characteristics (Reynolds *et al.*, 2002; Padisák *et al.*, 2003, 2009; Kruk *et al.*, 2010). This FE regrouping several nano-autotrophic species such as *Plagioselmis sp.* and *Apedinella sprinifera* was present in most of the communities, during the three seasons in the

mesotrophic IN lagoon, in spring and summer in the oligotrophic AYR lagoon, and in fall and spring in the hypertrophic MW lagoon. In this FE, several species can use mixotrophic abilities, implying higher tolerance to low nutrient and light availability (Glibert *et al.*, 2015).

To conclude, the multidimensional functional diversity approach with the use of three different functional indices is suitable for phytoplankton communities and represents a very promising avenue. This approach allowed considering all types of phytoplankton cells, even the smallest which cannot be taxonomically identified and which can be the most abundant cell type. The functional approach also better described ecosystem functioning, especially the gradient of eutrophication among the three selected coastal lagoons, than the classical taxonomic approach. Finally, the use of the three FD indices allowed describing several complementary aspects of diversity, which could miss in other studies about phytoplankton functional diversity. Nevertheless, the traits we selected were mainly morphological features (Table 2) and particularly the pigments of the light-harvesting photosynthesis units have not been considered so far. Therefore, single cell analysis of pigment composition would be a very promising avenue for the future studies of functional diversity of phytoplankton communities. Currently, with the flow cytometer we are able to discriminate between phycocyanin and phycoerythrin-containing cyanobacteria and this information has been used to explain the predominance of PC cyan in AYR and MW related to high turbidity levels (see above and Chapter 6). However, significant technological improvements are needed to measure a set of pigment traits on single cells of phytoplankton for a comprehensive study of the implications of these important traits for functional diversity of phytoplankton communities.

References

- Abonyi A, Leitão M, Lançon AM, Padisák J. (2012). Phytoplankton functional groups as indicators of human impacts along the River Loire (France). *Hydrobiologia* **698**: 233–249.
- Alves-de-Souza C, González MT, Iriarte JL. (2008). Functional groups in marine phytoplankton assemblages dominated by diatoms in fjords of southern Chile. *J Plankton Res* **30**: 1233–1243.
- Aminot, A., Chaussepied, M.C., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest.
- Anderson MJ. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol* **26**: 32–46.
- Arthaud F, Vallod D, Robin J, Bornette G. (2012). Eutrophication and drought disturbance shape functional diversity and life-history traits of aquatic plants in shallow lakes. *Aquat Sci* **74**: 471–481.
- Bec B, Husseini-Ratrema J, Collos Y, Souchu P, Vaquer A. (2005). Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *J Plankton Res* **27**: 881–894.
- Bec B, Collos Y, Souchu P, Vaquer A, Lautier J, Fiandrino A, *et al.* (2011). Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquat Microb Ecol* **63**: 29–45.
- Bérard-Therriault L, Poulin M, Bossé L. (1999). Guide d'identification du phytoplancton marin de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent incluant également certains protozoaires Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences No. 128. NRC Research Press.
- van Beusekom JEE, de Jonge VN. (2002). Long-term changes in Wadden Sea nutrient cycles: importance of organic matter import from the North Sea. *Hydrobiologia* **475**: 185–194.
- Bishop TR, Robertson MP, van Rensburg BJ, Parr CL. (2015). Contrasting species and functional beta diversity in montane ant assemblages. *J Biogeogr* **42**: 1776–1786.
- Borics G, Tothmeresz B, Lukacs BA, Varbiro G. (2012). Functional groups of phytoplankton shaping diversity of shallow lake ecosystems. *Hydrobiologia* **698**: 251–262.
- Brandt S. (2001). Euglenoids - heterotrophic euglenoids. *Collect Patrim Nat*. <http://www.emodnet-biology.eu/data-catalog?module=ref&refid=61188&printversion=1&dropIMISitle=1> (Accessed November 4, 2015).
- Chisholm SW. (1992). Phytoplankton Size. In: *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*, Falkowski, PG, Woodhead, AD, & Vivirito, K (eds) Environmental Science Research, Springer US, pp 213–237.

- Cloern JE. (1996). Phytoplankton bloom dynamics in coastal ecosystems: A review with some general lessons from sustained investigation of San Francisco Bay, California. *Rev Geophys* **34**: 127–168.
- Cloern JE. (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar Ecol-Prog Ser* **210**: 223–253.
- Cloern JE, Jassby AD. (2008). Complex seasonal patterns of primary producers at the land-sea interface. *Ecol Lett* **11**: 1294–1303.
- Coelho S, Gamito S, Perez-Ruzafa A. (2007). Trophic state of Foz de Almargem coastal lagoon (Algarve, South Portugal) based on the water quality and the phytoplankton community. *Estuar Coast Shelf Sci* **71**: 218–231.
- Collos Y, Hussein-Ratrema J, Bec B, Vaquer A, Hoai TL, Rougier C, *et al.* (2005). Pheopigment dynamics, zooplankton grazing rates and the autumnal ammonium peak in a Mediterranean lagoon. *Hydrobiologia* **550**: 83–93.
- Collos Y, Bec B, Jauzein C, Abadie E, Laugier T, Lautier J, *et al.* (2009). Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J Sea Res* **61**: 68–75.
- Devictor V, Mouillot D, Meynard C, Jiguet F, Thuiller W, Mouquet N. (2010). Spatial mismatch and congruence between taxonomic, phylogenetic and functional diversity: the need for integrative conservation strategies in a changing world. *Ecol Lett* **13**: 1030–1040.
- De Wit R, Rey-Valette H, Balavoine J, Ouisse V, Lifran R. (2015). Restoration ecology of coastal lagoons: new methods for the prediction of ecological trajectories and economic valuation. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* n/a–n/a.
- Donald DB, Bogard MJ, Finlay K, Leavitt PR. (2011). Comparative effects of urea, ammonium, and nitrate on phytoplankton abundance, community composition, and toxicity in hypereutrophic freshwaters. *Limnol Oceanogr* **56**: 2161–2175.
- Duarte P, Macedo MF, da Fonseca LC. (2006). The relationship between phytoplankton diversity and community function in a coastal lagoon. *Hydrobiologia* **555**: 3–18.
- Ferreira, JG, Wolff, WJ, Simas, TC, Bricker, SB, (2005). Does biodiversity of estuarine phytoplankton depend on hydrology? *Ecol. Model.* **187**: 513–523.
- Fouilland E, Trottet A, Bancon-Montigny C, Bouvy M, Le Floc'h E, Gonzalez J-L, *et al.* (2012). Impact of a river flash flood on microbial carbon and nitrogen production in a Mediterranean Lagoon (Thau Lagoon, France). *Estuar Coast Shelf Sci* **113**: 192–204.
- Gailhard I, Gros P, Durbec J, Beliaeff B, Belin C, Nezan E, *et al.* (2002). Variability patterns of microphytoplankton communities along the French coasts. *Mar Ecol Prog Ser* **242**: 39–50.
- Gilabert J. (2001). Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon:

- the Mar Menor. *J Plankton Res* **23**: 207–217.
- Glibert, Boyer JN, Heil C, Madden CJ, Sturgis B, Wazniak CS. (2010). Coastal Lagoons: Critical Habitats of Environmental Change. CRC Press: Boca Raton, FL.
- Glibert PM, Wilkerson FP, Dugdale RC, Raven JA, Dupont CL, Leavitt PR, *et al.* (2015). Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnol Oceanogr* n/a–n/a.
- Gonzalez EJ. (2000). Nutrient enrichment and zooplankton effects on the phytoplankton community in microcosms from El Andino reservoir (Venezuela). *Hydrobiologia* **434**: 81–96.
- Hansen P. (1991). Quantitative Importance and Trophic Role of Heterotrophic Dinoflagellates in a Coastal Pelagial Food Web. *Mar Ecol Prog Ser* **73**: 253–261.
- Hillebrand H, Dürselen C-D, Kirschtel D, Pollinger U, Zohary T. (1999). Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *J Phycol* **35**: 403–424.
- Hooper DU, Chapin FS, Ewel JJ, Hector A, Inchausti P, Lavorel S, *et al.* (2005). Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecol Monogr* **75**: 3–35.
- Hutchinson GE. (1961). The Paradox of the Plankton. *Am Nat* **95**: 137–145.
- Irwin AJ, Finkel ZV, Schofield OME, Falkowski PG. (2006). Scaling-up from nutrient physiology to the size-structure of phytoplankton communities. *J Plankton Res* **28**: 459–471.
- Ismael AA. (2003). Succession of heterotrophic and mixotrophic dinoflagellates as well as autotrophic microplankton in the harbour of Alexandria, Egypt. *J Plankton Res* **25**: 193–202.
- Jiao NZ, Ni IH. (1997). Spatial variations of size-fractionated chlorophyll, cyanobacteria and heterotrophic bacteria in the Central and Western Pacific. *Hydrobiologia* **352**: 219–230.
- Kirk JTO. (1983). Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems. <http://www.cambridge.org/us/academic/subjects/life-sciences/ecology-and-conservation/light-and-photosynthesis-aquatic-ecosystems-3rd-edition> (Accessed April 20, 2015).
- Kruk C, Mazzeo N, Lacerot G, Reynolds CS. (2002). Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *J Plankton Res* **24**: 901–912.
- Kruk C, Huszar VLM, Peeters ETHM, Bonilla S, Costa L, Lurling M, *et al.* (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshw Biol* **55**: 614–627.
- Kruk C, Peeters E t. h. m., Van Nes EH, Huszar VLM, Costa LS, Scheffer M. (2011). Phytoplankton community composition can be predicted best in terms of morphological groups. *Limnol*

- Oceanogr* **56**: 110–118.
- Kruk C, Martinez A, Nogueira L, Alonso C, Calliari D. (2015). Morphological traits variability reflects light limitation of phytoplankton production in a highly productive subtropical estuary (Rio de la Plata, South America). *Mar Biol* **162**: 331–341.
- Lapointe BE, Matzie WR. (1996). Effects of stormwater nutrient discharges on eutrophication processes in nearshore waters of the Florida Keys. *Estuaries* **19**: 422–435.
- Litchman E, Klausmeier CA, Schofield OM, Falkowski PG. (2007). The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecol Lett* **10**: 1170–1181.
- Litchman E, Klausmeier CA. (2008). Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. In: *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, Vol. 39, Annual Reviews: Palo Alto, pp 615–639.
- Litchman E, Klausmeier CA, Yoshiyama K. (2009). Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2665–2670.
- Litchman E, Pinto P de T, Klausmeier CA, Thomas MK, Yoshiyama K. (2010). Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* **653**: 15–28.
- Loir M. (2004). Guide des diatomées: Plus de 200 micro-algues silicieuses photographiées. Delachaux & Niestlé: Paris.
- Longhi ML, Beisner BE. (2010). Patterns in taxonomic and functional diversity of lake phytoplankton. *Freshw Biol* **55**: 1349–1366.
- Maire E, Grenouillet G, Brosse S, Villéger S. (2015). How many dimensions are needed to accurately assess functional diversity? A pragmatic approach for assessing the quality of functional spaces. *Glob Ecol Biogeogr* **24**: 728–740.
- Mallin M, Paerl H, Rudek J, Bates P. (1993). Regulation of estuarine primary production by watershed rainfall and river flow. *Mar Ecol Prog Ser* **93**: 199–203.
- Margalef R. (1978). Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Ocean Acta* **1**: 493–509.
- Margalef R, Estrada M, Blasco D. (1980). Functional morphology of organisms involved in red tides, as adapted to decaying turbulences. In: *Toxic Dinoflagellate Blooms*, pp 89–94.
- Mazouni N, Gaertner JC, DeslousPaoli JM, Landrein S, dOedenberg MG. (1996). Nutrient and oxygen exchanges at the water-sediment interface in a shellfish farming lagoon (Thau, France). *J Exp Mar Biol Ecol* **205**: 91–113.
- McGill BJ, Enquist BJ, Weiher E, Westoby M. (2006). Rebuilding community ecology from functional traits. *Trends Ecol Evol* **21**: 178–185.
- Morais P, Chicharo MA, Barbosa A. (2003). Phytoplankton dynamics in a coastal saline lake (SE-Portugal). *Acta Oecologica-Int J Ecol* **24**: S87–S96.

- Mouchet MA, Villéger S, Mason NWH, Mouillot D. (2010). Functional diversity measures: an overview of their redundancy and their ability to discriminate community assembly rules. *Funct Ecol* **24**: 867–876.
- Mouillot D, Spatharis S, Reizopoulou S, Laugier T, Sabetta L, Basset A, *et al.* (2006). Alternatives to taxonomic-based approaches to assess changes in transitional water communities. *Aquat Conserv Mar Freshw Ecosyst* **16**: 469–482.
- Mouillot D, Dumay O, Tomasini JA. (2007). Limiting similarity, niche filtering and functional diversity in coastal lagoon fish communities. *Estuar Coast Shelf Sci* **71**: 443–456.
- Mouillot D, Graham NAJ, Villéger S, Mason NWH, Bellwood DR. (2013). A functional approach reveals community responses to disturbances. *Trends Ecol Evol* **28**: 167–177.
- Mouillot D, Villéger S, Parravicini V, Kulbicki M, Arias-González JE, Bender M, *et al.* (2014). Functional over-redundancy and high functional vulnerability in global fish faunas on tropical reefs. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 13757–13762.
- Naselli-Flores L, Padisák J, Albay M. (2007). Shape and size in phytoplankton ecology: do they matter? *Hydrobiologia* **578**: 157–161.
- Neveux J, Lantoin F. (1993). Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep Sea Res Part Oceanogr Res Pap* **40**: 1747–1765.
- Norberg J. (2004). Biodiversity and ecosystem functioning: A complex adaptive systems approach. *Limnol Oceanogr* **49**: 1269–1277.
- Nuccio C, Melillo C, Massi L, Innamorati M. (2003). Phytoplankton abundance, community structure and diversity in the eutrophicated Orbetello lagoon (Tuscany) from 1995 to 2001. *Oceanol Acta* **26**: 15–25.
- Ouisse V, Fiandrino A, De Wit R, Malet N. (2013). Restauration des écosystèmes lagunaires : évaluation du rôle du sédiment et des herbiers à phanérogames. IFREMER LER-LR.
- Padisák J, Borics G, Fehér G, Grigorszky I, Oldal I, Schmidt A, *et al.* (2003). Dominant species, functional assemblages and frequency of equilibrium phases in late summer phytoplankton assemblages in Hungarian small shallow lakes. *Hydrobiologia* **502**: 157–168.
- Padisák J, Crossetti LO, Naselli-Flores L. (2009). Use and misuse in the application of the phytoplankton functional classification: a critical review with updates. *Hydrobiologia* **621**: 1–19.
- Paerl HW, Valdes LM, Pinckney JL, Piehler MF, Dyble J, Moisander PH. (2003). Phytoplankton Photopigments as Indicators of Estuarine and Coastal Eutrophication. *BioScience* **53**: 953–964.

- Paerl HW, Valdes-Weaver LM, Joyner AR, Winkelmann V. (2007). Phytoplankton indicators of ecological change in the eutrophying Palmico sound system, North Carolina. *Ecol Appl* **17**: S88–S101.
- Paerl HW, Rossignol KL, Hall NS, Peierls BL, Wetz MS. (2010). Phytoplankton Community Indicators of Short- and Long-term Ecological Change in the Anthropogenically and Climatically Impacted Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Estuaries Coasts* **33**: 485–497.
- Palfy K, Presing M, Voeroes L. (2013). Diversity patterns of trait-based phytoplankton functional groups in two basins of a large, shallow lake (Lake Balaton, Hungary) with different trophic state. *Aquat Ecol* **47**: 195–210.
- Pecqueur D, Vidussi F, Fouilland E, Le Floc'h E, Mas S, Roques C, *et al.* (2011). Dynamics of microbial planktonic food web components during a river flash flood in a Mediterranean coastal lagoon. *Hydrobiologia* **673**: 13–27.
- Perez-Ruzafa A, Gilabert J, Gutierrez JM, Fernandez AI, Marcos C, Sabah S. (2002). Evidence of a planktonic food web response to changes in nutrient input dynamics in the Mar Menor coastal lagoon, Spain. *Hydrobiologia* **475**: 359–369.
- Pomerleau C, Sastri AR, Beisner BE. (2015). Evaluation of functional trait diversity for marine zooplankton communities in the Northeast subarctic Pacific Ocean. *J Plankton Res* **37**: 712–726.
- Raven JA. (1998). The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Funct Ecol* **12**: 503–513.
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reynolds CS (Colin). (1988). Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton.
- Reynolds CS, Huszar V, Kruk C, Naselli-Flores L, Melo S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J Plankton Res* **24**: 417–428.
- Rodrigues LC, Simoes NR, Bovo-Scomparin VM, Jati S, Santana NF, Roberto MC, *et al.* (2015). Phytoplankton alpha diversity as an indicator of environmental changes in a neotropical floodplain. *Ecol Indic* **48**: 334–341.
- Roselli L, Basset A. (2015). Decoding Size Distribution Patterns in Marine and Transitional Water Phytoplankton: From Community to Species Level. *PLoS ONE* **10**: e0127193.
- Sabancı FC. (2014). Phytoplankton Distribution and its Relationship to the Physico-Chemical Environment in a Coastal Lagoon. *Ekoloji* **23**: 61–72.
- Salmaso N, Padisák J. (2007). Morpho-Functional Groups and phytoplankton development in

- two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia* **578**: 97–112.
- Santos VS, Villac MC, Tenenbaum DR, Paranhos R. (2007). Auto- and heterotrophic nanoplankton and filamentous bacteria of Guanabara Bay (RJ, Brazil): estimates of cell/filament numbers versus carbon content. *Braz J Oceanogr* **55**: 133–143.
- Schramm W. (1999). Factors influencing seaweed responses to eutrophication: some results from EU-project EUMAC. *J Appl Phycol* **11**: 69–78.
- Serpa D, Falcao M, Duarte P, da Fonseca LC, Vale C. (2007). Evaluation of ammonium and phosphate release from intertidal and subtidal sediments of a shallow coastal lagoon (Ria Formosa-Portugal): A modelling approach. *Biogeochemistry* **82**: 291–304.
- Sigala K, Reizopoulou S, Basset A, Nicolaidou A. (2012). Functional diversity in three Mediterranean transitional water ecosystems. *Estuar Coast Shelf Sci* **110**: 202–209.
- Smayda TJ, Reynolds CS. (2001). Community Assembly in Marine Phytoplankton: Application of Recent Models to Harmful Dinoflagellate Blooms. *J Plankton Res* **23**: 447–461.
- Smayda TJ, Reynolds CS. (2003). Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *J Sea Res* **49**: 95–106.
- Smith VH. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - A global problem. *Environ Sci Pollut Res* **10**: 126–139.
- Sommer U, Padisak J, Reynolds C, Juhasznagy P. (1993). Hutchinson Heritage - the Diversity-Disturbance Relationship in Phytoplankton. *Hydrobiologia* **249**: 1–7.
- Souchu P, Bec B, Smith VH, Laugier T, Fiandrino A, Benau L, *et al.* (2010). Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Can J Fish Aquat Sci* **67**: 743–753.
- Stomp M, Huisman J, Vörös L, Pick FR, Laamanen M, Haverkamp T, *et al.* (2007). Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol Lett* **10**: 290–298.
- Tomas CR. (1997a). Identifying Marine Diatoms and Dinoflagellates. *Mar Geol* 3-4: 320–321.
- Tomas CR. (1997b). Identifying Marine Phytoplankton. Academic Press. Törnroos A, Bonsdorff E. (2012). Developing the multitrait concept for functional diversity: lessons from a system rich in functions but poor in species. *Ecol Appl* **22**: 2221–2236.
- USGS: http://water.usgs.gov/nwc/explain_data.html.
- Utermöhl H. (1931). Neue Wege in der Quantitativen Erfassung des Planktons. (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verhandlungen Int Ver Limnol* **5**: 567–596.
- Vadrucci MR, Semeraro A, Zaccarelli N, Basset A. (2004). Nutrient Loading and Spatial-Temporal Dynamics of Phytoplankton Guilds. *Chem Ecol* **20**: S285–S301.
- Vadrucci MR, Cabrini M, Basset A. (2007). Biovolume determination of phytoplankton guilds in

- transitional water ecosystems of Mediterranean Ecoregion. *Transitional Waters Bull* **1**: 83–102.
- Verity P, Stoecker D, Sieracki M, Burkill P, Edwards E, Tronzo C. (1993). Abundance, Biomass and Distribution of Heterotrophic Dinoflagellates During the North-Atlantic Spring Bloom. *Deep-Sea Res Part II-Top Stud Oceanogr* **40**: 227–244.
- Verity PG, Borkman DG. (2009). A Decade of Change in the Skidaway River Estuary. III. Plankton. *Estuaries Coasts* **33**: 513–540.
- Villéger S, Mason NWH, Mouillot D. (2008). New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology. *Ecology* **89**: 2290–2301.
- Villéger S, Ramos Miranda J, Flores Hernandez D, Mouillot D. (2010). Contrasting changes in taxonomic vs. functional diversity of tropical fish communities after habitat degradation. *Ecol Appl* **20**: 1512–1522.
- Villéger S, Miranda JR, Hernandez DF, Mouillot D. (2012). Low Functional β -Diversity Despite High Taxonomic β -Diversity among Tropical Estuarine Fish Communities. *PLoS ONE* **7**: e40679.
- Violle C, Navas M-L, Vile D, Kazakou E, Fortunel C, Hummel I, *et al.* (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos* **116**: 882–892.
- Vörös L, Callieri C, Balogh KV, Bertoni R. (1998). Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* **369-370**: 117–125.
- Weithoff G. (2003). The concepts of ‘plant functional types’ and ‘functional diversity’ in lake phytoplankton – a new understanding of phytoplankton ecology? *Freshw Biol* **48**: 1669–1675.

Supplementary Materials

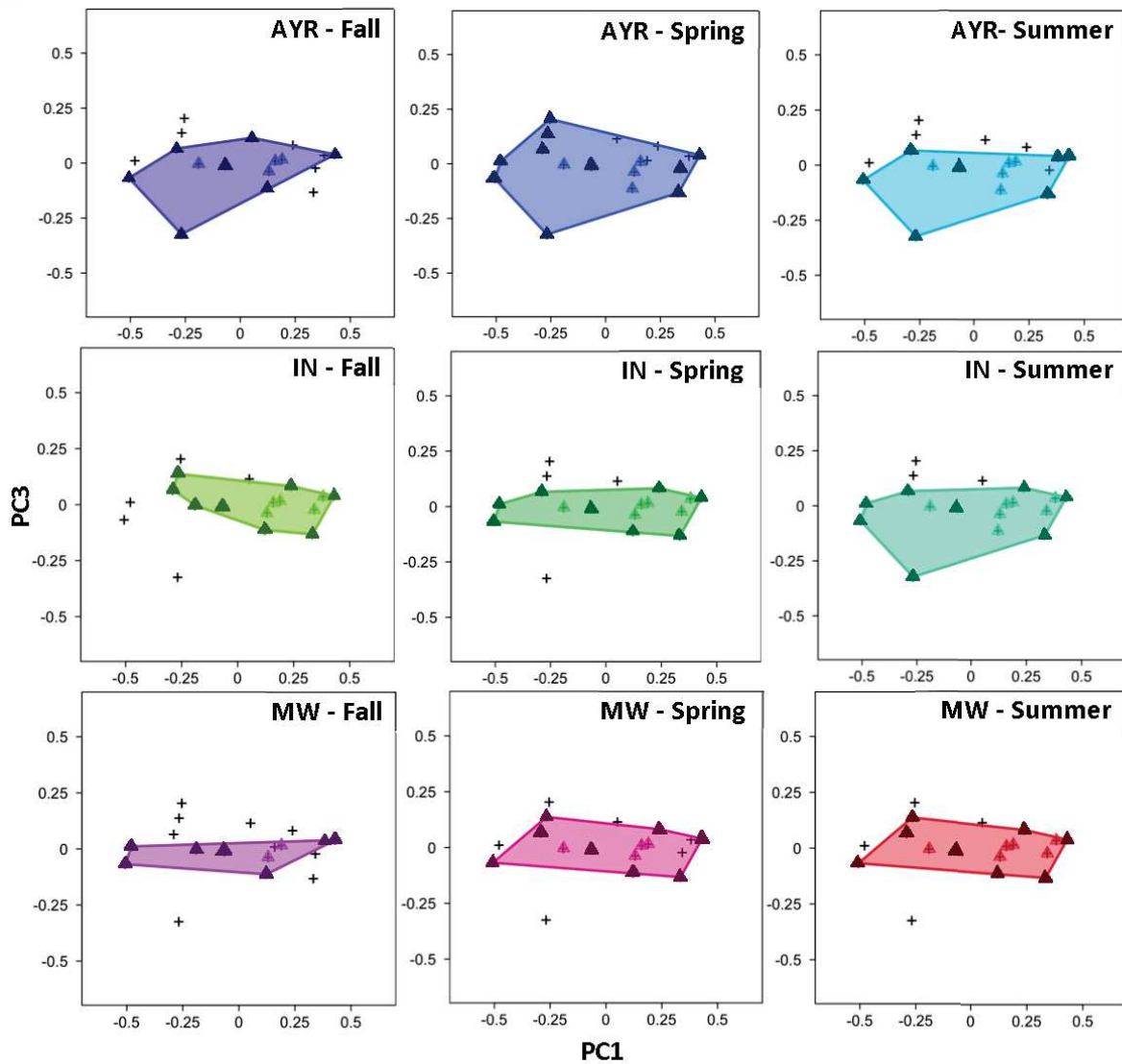


Figure S1. Functional richness of the three lagoons (AYR, IN and MW) in fall 2013, spring and summer 2014 in the three-dimensional functional space, illustrated with the first two principal coordinate axes 1 and 3. FEs present in a community are represented by triangles and those being vertices in the three-dimensional space are filled. Projections of the convex hull computed in 3-dimensions on this 2-dimensional space are illustrated by the colored polygon.

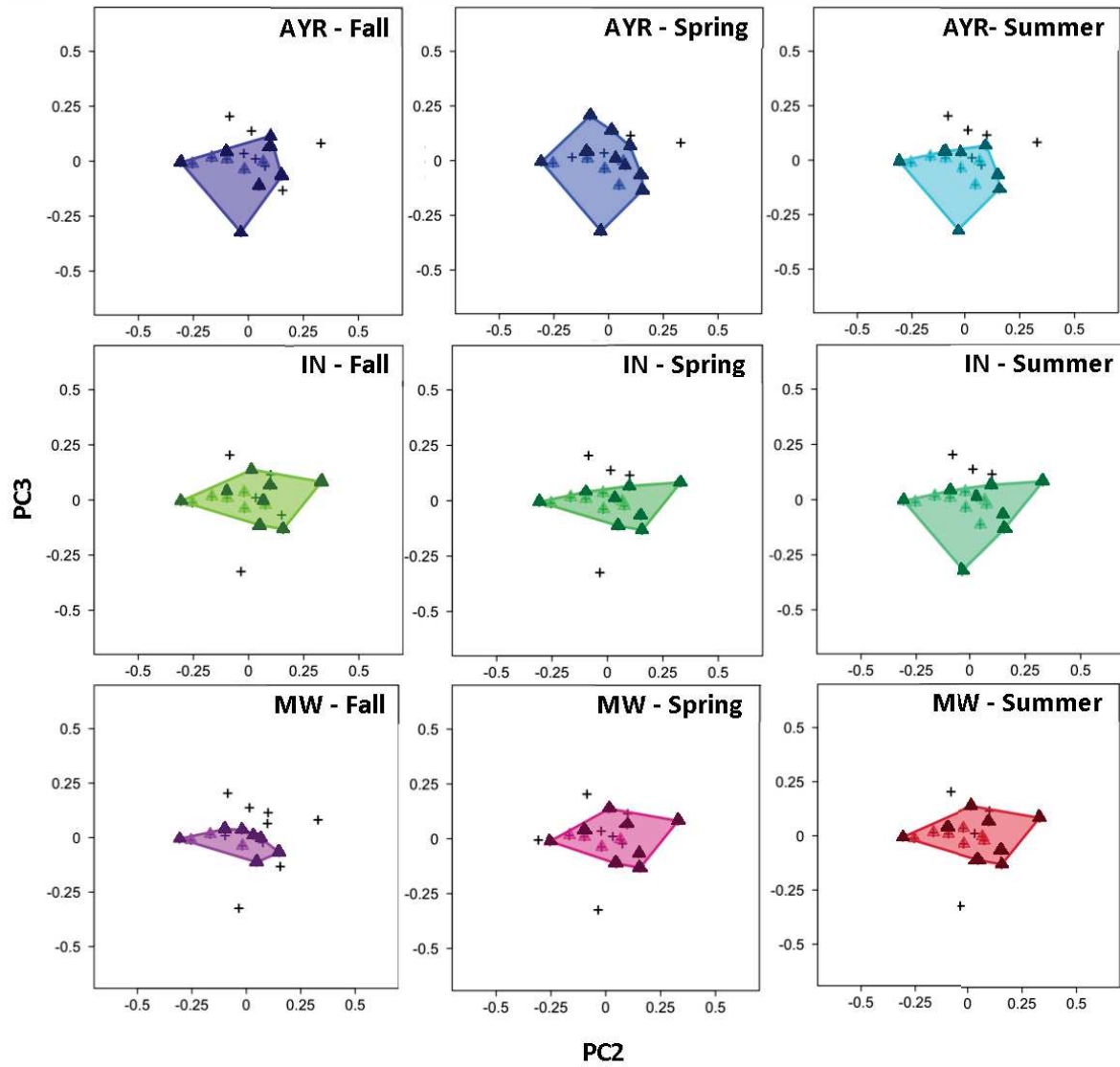


Figure S2. Functional richness of the three lagoons (AYR, IN and MW) in fall 2013, spring and summer 2014 in the three-dimensional functional space, illustrated with the first two principal coordinate axes 2 and 3. FEs present in a community are represented by triangles and those being vertices in the three-dimensional space are filled. Projections of the convex hull computed in 3-dimensions on this 2-dimensional space are illustrated by the colored polygon.

Chapitre 5 – Multidimensional functional diversity indices improve understanding of phytoplankton ecology in coastal lagoons

Table S1. Summary of environmental characteristics of the three lagoons. Temperature, salinity and Chl *a* values represent means and standard deviations from 2013 to 2014. Values of TN and TP represent median stock in the sediment (in g.m⁻² integrated in 5 cm).

Station	Label	Area (km ²)	Depth (m)	T (°C)	Salinity	Chl <i>a</i> (µg.L ⁻¹)	TN (g.m ⁻²)	TP (g.m ⁻²)	Trophic State
West Méjean	MW	5.4	0.75	16.9 (± 6.4)	22.8 (±8.8)	9.3 (±11.9)	73.6	17.0	Hypertrophic
North Ingril	IN	3.2	0.60	16.9 (± 5.6)	33.3 (±7.8)	3.5 (±5.7)	77.9	8.5	Mesotrophic
Ayrolle	AYR	13.4	0.70	15.9 (± 5.2)	31.3 (±3.9)	1.4 (±1.9)	23.2	8.6	Oligotrophic

Data, from Souchu et al., 2010, Bec et al., 2011, Ouisse et al., 2013

Table S2: Bray-Curtis dissimilarity distances calculated between communities according to (i) relative biomasses of functional entities, (ii) relative biomasses of taxa, for the three lagoons (Ayrolle – “AYR”, North Ingril – “IN”, and West Méjean – “MW”), the three seasons (fall – “fal”, spring – “spr”, summer – “sum”).

Bray-Curtis Distance Matrix based on taxa relative abundances								
	AYR_fal	IN_fal	MW_fal	AYR_spr	IN_spr	MW_spr	AYR_sum	IN_sum
IN_fal	0.989							
MW_fal	0.989	0.883						
AYR_spr	0.904	0.928	0.955					
IN_spr	0.982	0.430	0.884	0.889				
MW_spr	0.987	0.659	0.911	0.915	0.502			
AYR_sum	0.988	0.873	0.936	0.966	0.870	0.953		
IN_sum	0.986	0.469	0.900	0.829	0.370	0.573	0.840	
MW_sum	0.999	0.994	0.998	0.996	0.993	0.988	0.999	0.994
Bray-Curtis Distance Matrix based on FEs relative abundances								
	AYR_fal	IN_fal	MW_fal	AYR_spr	IN_spr	MW_spr	AYR_sum	IN_sum
IN_fal	0.770							
MW_fal	0.957	0.868						
AYR_spr	0.638	0.678	0.834					
IN_spr	0.938	0.330	0.768	0.639				
MW_spr	0.970	0.451	0.837	0.653	0.216			
AYR_sum	0.352	0.582	0.809	0.653	0.695	0.749		
IN_sum	0.771	0.385	0.852	0.473	0.336	0.330	0.636	
MW_sum	0.986	0.393	0.934	0.960	0.498	0.574	0.856	0.602

Bilan

Ce chapitre a consisté en l'étude la diversité des communautés phytoplanctoniques de lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés, et durant des saisons d'une année hydrologique marquées par des fonctionnements nutritifs différents. Pour décrire le mieux cette diversité, nous avons couplé la diversité taxonomique à la diversité fonctionnelle à l'aide de l'approche multidimensionnelle. L'utilisation de ces deux méthodes a mis en évidence une amélioration de la compréhension des adaptations du phytoplancton aux différents fonctionnements nutritifs des lagunes grâce à l'approche multidimensionnelle de la diversité fonctionnelle. Cette approche est donc également plus efficace pour illustrer le fonctionnement nutritif des lagunes. Cette plus grande efficacité a pu être mise en évidence lors de l'étude de la bêta-diversité fonctionnelle des communautés.

Globalement, la diversité taxonomique a tout de même montré les valeurs les plus élevées dans la lagune au niveau d'eutrophisation intermédiaire (IN), et les valeurs les plus faibles dans la lagune la plus eutrophisée (MW). La diversité fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques dans les lagunes Méjean ouest (hypereutrophe), Ingril nord (mésotrophe) mesurée au travers de la richesse fonctionnelle et du nombre d'entités fonctionnelles, a montré une évolution différente au cours des saisons automnales, printanières et estivales de celle de la communauté phytoplanctonique de la lagune Ayrolle (oligotrophe) (Figure 18 a).

La divergence fonctionnelle, exprimant la proportion de l'abondance totale supportée par des entités fonctionnelles ayant des valeurs extrêmes de traits dans une communauté a également été mesurée dans les trois lagunes au cours des trois saisons (Figure 18 b). Cet indice a illustré une forte spécialisation estivale dans les deux lagunes aux niveaux d'eutrophisation les plus contrastés : Méjean ouest hypereutrophe, et Ayrolle oligotrophe. Dans ces deux lagunes, la période estivale a coïncidé avec une forte divergence fonctionnelle, traduisant de fortes proportions des abondances totales portées par des entités fonctionnelles ayant des valeurs extrêmes de tailles cellulaires. Dans Ayrolle, les diatomées de grandes tailles étaient dominantes. Ces organismes ont potentiellement pu se maintenir dans un écosystème oligotrophe et fortement limité nutritivement grâce à des capacités de stockage, notamment de l'azote. A l'inverse, dans Méjean, ce sont les picoeucaryotes < 3 µm qui ont dominés, grâce à leur forte affinité pour les flux sédimentaires de nutriments et leur taux de croissance très compétitif.

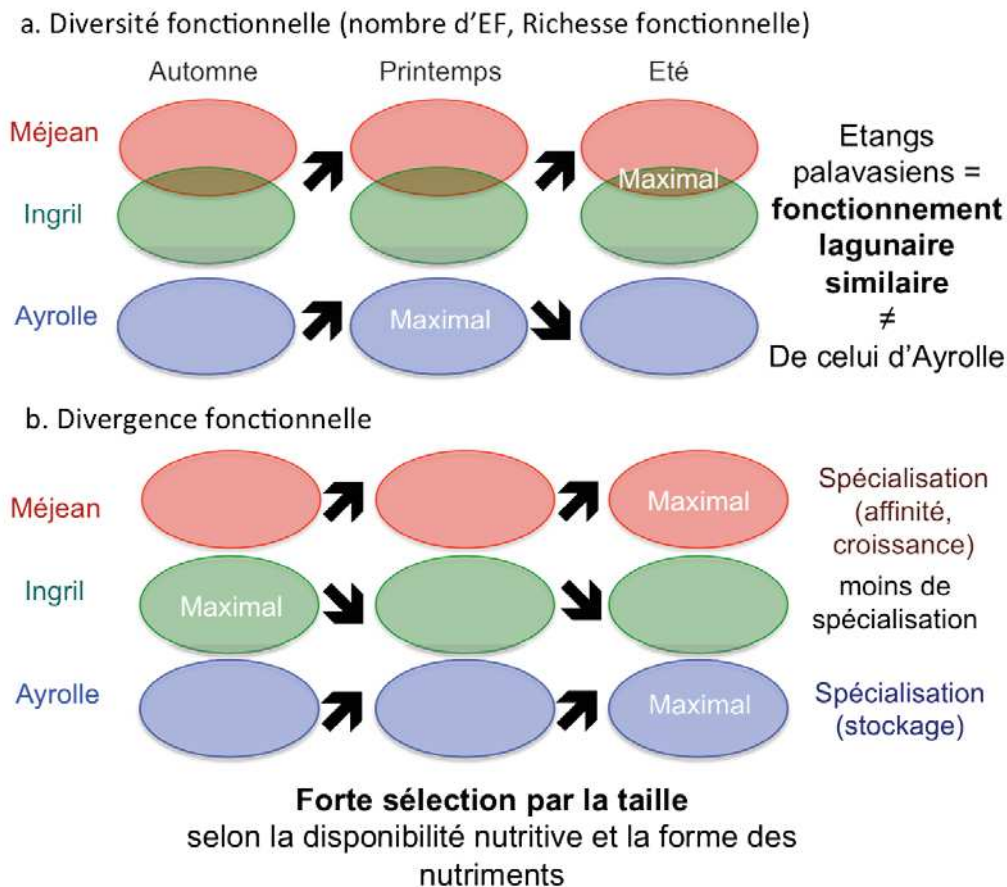


Figure 18. Schéma bilan des processus mis en évidence au travers l'étude de la diversité fonctionnelle du phytoplancton : a. la richesse fonctionnelle et le nombre d'entités fonctionnelles identifiées dans les trois lagunes au cours des trois saisons témoignent de la différence de fonctionnement lagunaire entre les étangs palavasiens et Ayrolle ; b. la divergence fonctionnelle a montré une forte spécialisation dans Méjean ouest et Ayrolle au cours des saisons, jusqu'à une forte spécialisation par la taille en été, liée à la disponibilité et à la forme des nutriments.

La comparaison de l'évolution des indices de diversité taxonomique et fonctionnelle au cours des saisons a mis en évidence plusieurs mécanismes d'adaptation fonctionnelle des communautés à leur environnement (Figure 19). Dans la lagune hypereutrophe Méjean ouest, la diversité taxonomique exprimée par l'indice de Shannon a diminué entre le printemps et l'été, tandis que la diversité fonctionnelle (FRic) a peu augmenté. Cette différence entre l'évolution des deux types de diversité indique un mécanisme d'exclusion compétitive ayant eu lieu en été en faveur des picoeucaryotes *Chlorella-like* qui se sont avérés les plus adaptés à la principale source de nutriments, d'origine sédimentaire (Figure 19). Dans la lagune mésotrophe Ingril nord, la diversité taxonomique a diminué entre le printemps et l'été, tandis que la diversité fonctionnelle a augmenté fortement. Cette différence a illustré une forte diversification fonctionnelle ayant entraîné une coexistence d'un plus grand nombre de stratégies fonctionnelles pendant la période estivale par rapport au printemps (Figure 19).

Couplage de la **diversité taxonomique (H')** et **fonctionnelle (EF, richesse)**

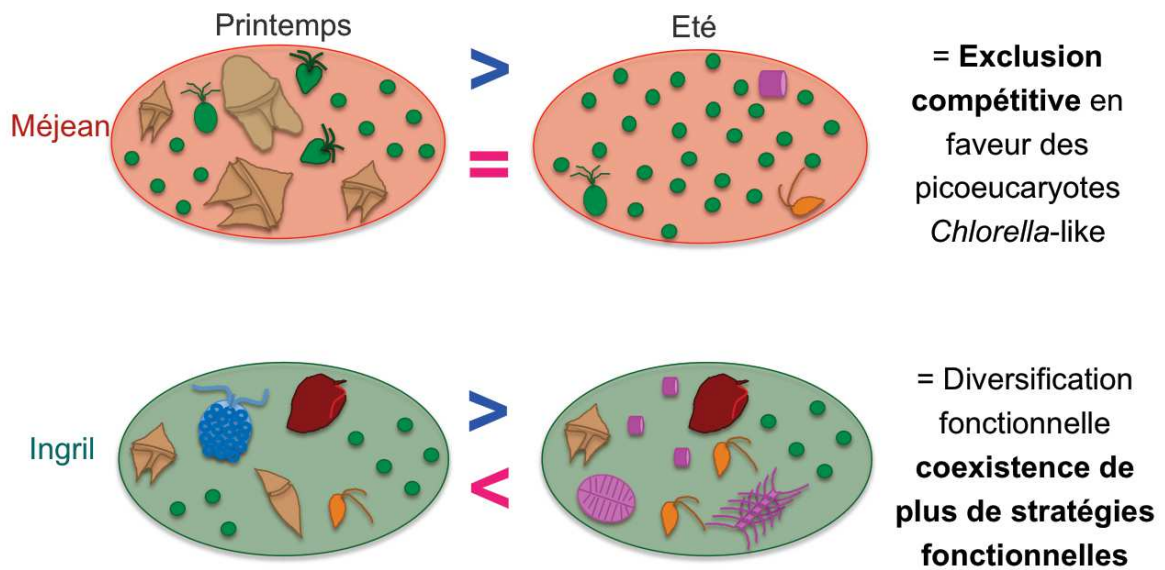


Figure 19. Schéma bilan des processus mis en évidence au travers de la comparaison entre les indices de diversité taxonomique (Indice de Shannon H') et fonctionnelle (Richesse fonctionnelle, nombre d'entités fonctionnelles) dans les lagunes Méjean ouest et Ingril nord entre le printemps et l'été 2014.

**6 Phytoplankton strategies to exploit nutrients
in three coastal lagoons with different trophic states, and
during re-oligotrophication processes?**



6.1 Contexte de l'étude

Nous avons étudié la biomasse, l'abondance et la diversité fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques des lagunes en tant qu'indicateurs biologiques reflétant la réponse de l'écosystème à des processus de ré-oligotrophisation (Chapitre 3). Ces résultats ont été complétés par une étude de la variabilité des communautés phytoplanctoniques de trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés (de l'oligo- à l'hypertrophie) au cours de deux cycles annuels (Chapitre 4). L'aspect fonctionnel de la réponse phytoplanctonique aux caractéristiques environnementales liées notamment au niveau d'eutrophisation a été abordé à travers la taille cellulaire et la composition pigmentaire.

La diversité fonctionnelle de ces communautés a été ensuite précisée lors de trois saisons aux caractéristiques hydrologiques contrastées (Chapitre 5). Ces saisons montrent des conditions nutritives spécifiques conduisant à une structuration taxonomique et fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques adaptée (de Jonge and de Jong, 2002; Gilabert, 2001). La diversité fonctionnelle du phytoplancton a dans ce cadre été établie sur la base de 5 traits fonctionnels directement liés à la disponibilité nutritive : la taille cellulaire (Chisholm, 1992; Litchman et al., 2009), le régime trophique (Burkholder et al., 2008; Ismael, 2003), la mobilité (Cowan et al., 1996), l'agencement en colonies (Litchman and Klausmeier, 2008; Longhi and Beisner, 2010) et le positionnement dans la colonne d'eau (benthique ou pélagique).

Cependant, nous n'avons pas pu développer au cours de cette étude l'un des aspects fonctionnels les plus importants du phytoplancton, à savoir la croissance (Furnas, 1990; Behrenfeld et al., 2002; Litchman and Klausmeier, 2008). En effet, la méthode utilisée nécessitait de caractériser les traits à l'échelle de l'individu, hors nous n'avions pas cette possibilité concernant le taux de croissance.

Néanmoins, la croissance est une caractéristique intrinsèquement liée à tous les traits fonctionnels répondant à la disponibilité des ressources, qu'elles soient lumineuses ou nutritives. Elle détermine la vitesse de production primaire, le maintien et le renouvellement de la biomasse, et la composition des communautés (Litchman and Klausmeier, 2008). La croissance phytoplanctonique traduit l'état des écosystèmes puisqu'elle dépend de nombreux paramètres environnementaux, tels que la qualité du spectre lumineux induite par la turbidité de l'eau. Parmi ces paramètres environnementaux, la quantité et la forme des nutriments disponibles dans le milieu sont les deux facteurs jouant essentiellement sur les capacités de croissance phytoplanctonique (Collos et al., 2004; Domingues et al., 2011). La croissance du phytoplancton doit donc être estimée pour comprendre quels organismes au sein de la communauté vont répondre aux nutriments disponibles ou à leur modification, et dans quelle mesure cette réponse va structurer la communauté (Litchman et al., 2007; Litchman and

Klausmeier, 2008). La caractérisation de la croissance est généralement couplée à une estimation du taux de mortalité par prédation. Cette donnée est également d'une grande importance, puisque la prédation régule les abondances phytoplanctoniques et participe à la structuration et la composition des communautés par la sélectivité prédateur-proie (Morais et al., 2003; Strom, 2008). Le premier objectif de ce Chapitre a donc été d'estimer les taux de croissance et de mortalité des communautés phytoplanctoniques dans trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés.

De plus, dans le contexte de la re-oligotrophisation des lagunes méditerranéennes, il est important de comprendre l'impact d'un pulse nutritif sur les communautés autotrophes. Le degré de réactivité du phytoplancton en réponse à un enrichissement nutritif, illustré par les taux de croissance et la production de biomasse, témoignent de l'adaptation du phytoplancton aux nouvelles conditions nutritives. Une forte réactivité révélerait la vulnérabilité des lagunes à une perturbation de la re-oligotrophisation engendrée par un enrichissement.

Afin de compléter la description des caractéristiques fonctionnelles du phytoplancton illustrant leur adaptation au fonctionnement des lagunes côtières, et dans l'optique d'une meilleure compréhension des processus de ré-oligotrophisation, le second objectif de ce chapitre était donc d'évaluer la réactivité des communautés phytoplanctoniques à un enrichissement nutritif ponctuel. Pour cela, les taux de croissance du phytoplancton ont été estimés par classe de taille, ce critère étant principalement déterminant pour l'écologie du phytoplancton (Chisholm, 1992).

Les processus de re-oligotrophisation entraînant la réduction des nutriments apportés à la lagune, ils accroissent la limitation nutritive pour les organismes autotrophes. Le troisième objectif de ce chapitre était de mieux comprendre l'impact de cette exacerbation de la limitation sur les communautés phytoplanctoniques. Pour cela, nous avons caractérisé la limitation en azote et phosphore du phytoplancton dans deux lagunes palavasiennes (IN et MW) aux niveaux d'eutrophisation contrastés, et soumises à un processus de re-oligotrophisation depuis neuf ans. La réponse des organismes phytoplanctoniques à limitation nutritive, en terme d'utilisation des ressources internes, externes et recyclées a également été évaluée. Ces observations ont également été menées sur le phytoplancton de la lagune oligotrophe et peu anthropisée Ayrolle, afin de comprendre les mécanismes d'adaptation intervenant dans les deux lagunes en cours de restauration. Ces expérimentations ont été réalisées en automne 2013, printemps et été 2014.

Elles ont en parallèle été conduites sur trois stations aux caractéristiques d'eutrophisation et de salinité contrastées de la lagune de Biguglia en Corse, dans le cadre d'une collaboration avec Vanina Pasqualini de l'Université de Corte, et de Nathalie Malet, de l'Ifremer Bastia. Cette collaboration aboutira à la mise en commun de résultats comparant les

caractéristiques écologiques des communautés phytoplanctoniques des 4 lagunes étudiées, et à leur valorisation dans le cadre d'une publication scientifique.

6.2 Valorisation scientifique

Les résultats de l'expérimentation menée en été 2014 font l'objet du Chapitre 6 de cette thèse, écrite sous la forme d'une publication scientifique (Manuscrit C).

Cette partie a fait l'objet d'une communication orale aux congrès *ECSA 55 : "Unbounded boundaries and shifting baselines - Estuaries and coastal seas in a rapidly changing world"* 6-9 September 2015 London - UK

« Phytoplankton responses to nutrient enrichment and limitation in two Mediterranean lagoons under contrasted trophic status and nutrient discharge reduction for 9 years »

Elle a également fait l'objet d'une conférence durant le Colloque annuel du RESOMAR (Réseau des Stations et Observatoires Marins) qui s'est tenu du 16 au 19 Novembre 2015 à Montpellier et Sète.

MANUSCRIT D

Phytoplankton strategies to exploit nutrients in coastal lagoons with different trophic states, and during re-oligotrophication processes?

Amandine Leruste^{1*}, François Guilhaumon¹, Nathalie Malet², Rutger De Wit¹, Yves Collos¹, Béatrice Bec¹

¹Centre of Marine Biodiversity, Exploitation and Conservation (MARBEC) UMR 9190, Université de Montpellier, CNRS, IRD, Ifremer, Place Eugène Bataillon, Université de Montpellier, Case 093, 34095 MONTPELLIER cedex 5, France

²Ifremer, Ifremer LEPAC-Corse, ZI Furiani, Im Agostini, 20600 Bastia, France

*Corresponding author: amandine.leruste@umontpellier.fr

Keywords: Phytoplankton, growth rate, diversity, dilution experiment, limitation

En préparation

Introduction

Eutrophication represents the main threat on coastal waters (Nixon, 2009). Coastal lagoons, which have restricted exchanges with the sea and long water residence times, are particularly vulnerable (Pereira Coutinho et al., 2012). Eutrophication has been defined as an increase in the rate of supply of organic matter to an ecosystem (Nixon, 1995) and is often caused by nutrient over-enrichment. This process stimulates primary production and impacts the composition of the autotrophic compartment, by modifying the competition between functional groups depending on their resource acquisition strategies (Paerl et al., 2003). Hence, availabilities of phosphorous, nitrogen and light constitute the main controlling factors of phytoplankton growth, biomass and community composition (Collos et al., 2004). They thus represent important aspects for eutrophication management (Domingues et al., 2011; Gallegos, 2014).

The loss of ecosystem services due to eutrophication of aquatic ecosystems has targeted the importance of reversing this trend, related by the Water Framework Directive (Zaldivar et al., 2008; Cartaxana et al., 2009). Therefore nutrient inputs need to be reduced (Boesch, 2002) and some fresh and coastal waters have been submitted to re-oligotrophication processes (Jeppesen et al., 2005; 2007; Van Donk et al., 2008; Collos et al., 2009). Re-oligotrophication first impacts phytoplankton communities since it results in nutrient limitation (Nixon, 2009), which is one of the keystone drivers of phytoplankton growth and community composition (Conley, 1999). There is a strong need for studies on re-oligotrophication (Domingues et al., 2011), since this process is poorly documented and less understood than better-described eutrophication processes (Phillips et al., 2005). Eutrophication and re-oligotrophication particularly affect phytoplankton growth, which is reflected by variation of their biomass, and changes of their community structure and composition (Cloern, 2001; Crossetti and Bicudo, 2005). The size structure of phytoplankton is particularly influenced (Ruggiu et al., 1998; Collos et al., 2009; Kamenir and Morabito, 2009).

Ecological restoration of aquatic systems is recognized as a very complex and variable process dependent on the context, and which often requires a long time effort to be successful (De Jonge and de Jong, 2002). Ecological restoration has been pursued for freshwater lakes since the 1980's, and re-oligotrophication in these systems has been better described than in coastal lagoons (Jeppesen et al., 2005; 2007). It often takes a long time to achieve the restoration target. Hence, several lakes showed hysteresis during re-oligotrophication, related to internal nutrient loading based on remobilization of nutrients from their sediments (Jeppesen et al., 2005; Phillips et al., 2005), or to insufficient reduction of external nutrient loadings (Van Donk et al., 2008). Hence, to be effective, nutrient management of eutrophic waterbodies requires understanding of the relationships between primary production and nutrient loads, especially from external and recycled sources (Domingues et al., 2011; Wood and Bukaveckas, 2014).

For the Mediterranean lagoons in the South of France, it has been shown that the limiting factor for phytoplankton growth varies among the different lagoons. It especially shifts along a gradient of trophic status from phosphorus to nitrogen with the increase of the eutrophication (Souchu et al., 2010). Among these lagoons, eight of them, built into a lagoon complex, has been submitted to a severe eutrophication process since the 60's, principally due to the indirect discharge of the effluents of the wastewater treatment plant of the Montpellier city district. This huge nutrients input led to a gradient of trophic status ranging from meso- to hypertrophy, dependent on their distance from the nutrient source, and autotrophic communities mainly dominated by picophytoplankton (Bec et al., 2011). Since 2006, this lagoon complex has been submitted to a drastic reduction of their anthropogenic inputs of P and N (De Wit et al., 2015), leading to the beginning of re-oligotrophication processes. This new dynamic was reflected by strong decrease of phytoplankton biomasses, the reduction of picoeukaryotes abundances, and changes in community composition which were variable among the lagoons and largely dependent on the trophic status of the lagoons before the nutrient reduction (Leruste et al., 2016 – Chapter 3). The lagoon complex thus represents an emblematic situation to study

phytoplankton adaptations to nutrient conditions during different steps of the re-oligotrophication process in coastal lagoons, depending to their initial trophic status.

It is important to understand how primary production and phytoplankton growth and community composition are linked to the availability of nutrients. Hence it helps to apprehend the result of actions to reduce eutrophication and predict the time-scale of the re-oligotrophication process. Therefore, we formulated three main questions, which were detailed in this study. First, which are the nutrients limiting the growth of the different functional groups during the re-oligotrophication trajectories of coastal lagoons? Second, how vulnerable are these lagoons to a punctual nutrient pulse? More specifically, we studied which organisms within the phytoplankton assemblages respond in a short-term to a nutrient pulse, depending on the type of nutrient, and how these respond. Third, what strategies of resource use can be observed in the phytoplankton assemblages to cope with an experimentally imposed nutrient limitation, *i.e.*, which of nutrient sources are preferentially used considering the internal, external and recycled pools?

To examine these questions, we selected two lagoons from the complex close to Montpellier that differed most strongly by their trophic status before the start of their re-oligotrophication trajectories in 2006. Hence, the selected lagoons were the originally mesotrophic Ingril lagoon and hypertrophic Méjean lagoon. For comparison, we selected the oligotrophic Ayrolle lagoon close to Narbonne as the oligotrophic reference site. Hence, during the summer of 2014 we sampled the phytoplankton communities of these three lagoons, which were used for the experimental incubations with enrichment using *in situ* light and temperature conditions. The nutrient additions allowed us to identify the reactivity of the different functional groups to a nutrient pulse. Nitrogen was added as ammonium, as this represents the predominant N source in summer (Landry and Hassett, 1982). Moreover, these enrichments allowed us to assess the vulnerability of the re-oligotrophication process to a punctual nutrient input. Using the “All minus one” technique, we induced nitrogen and phosphorous limitations to

understand phytoplankton strategies to exploit resources under depleted conditions (Andersen et al., 1991).

Material and Methods

Study site and sampling procedures

We selected three coastal lagoons with different trophic status on the French Mediterranean coast. The Ingril and Méjean lagoons, located respectively at the Southwest and the Northeast of the Palavasian complex close to the Montpellier city district have been degraded by eutrophication and are currently on a re-oligotrophication trajectory (Fig. 1). This complex has been submitted to strong anthropogenic inputs during several decades from the Montpellier city district wastewater treatment, through the Lez River. The mouth of this river located northeast of the complex caused a gradual eutrophication of the lagoons, from hypertrophy nearby, to mesotrophy at the southern extreme of the complex (Souchu et al., 2010). Since December 2005, this main anthropogenic inputs has been relocated in the Mediterranean Sea, leading to a decrease of 70% to 83% of P and N inputs in the lagoon (De Wit et al., 2015). However, benthic nutrients stocks into the lagoons still remain important (Ouisse et al., 2013). The two stations selected are located landward under watershed influence and without direct opening to the sea, and originally presented two-different trophic status. Before 2006, West Méjean (MW), directly connected to the Lez River was hypertrophic, and North Ingril (IN) located farthest from the river was mesotrophic (Souchu et al., 2010). At the opposite, Ayrolle (AYR) is an oligotrophic lagoon (Fig. 1), which has a small watershed (104 km²) without urbanization. AYR is also connected to the sea by a channel in the south – east.

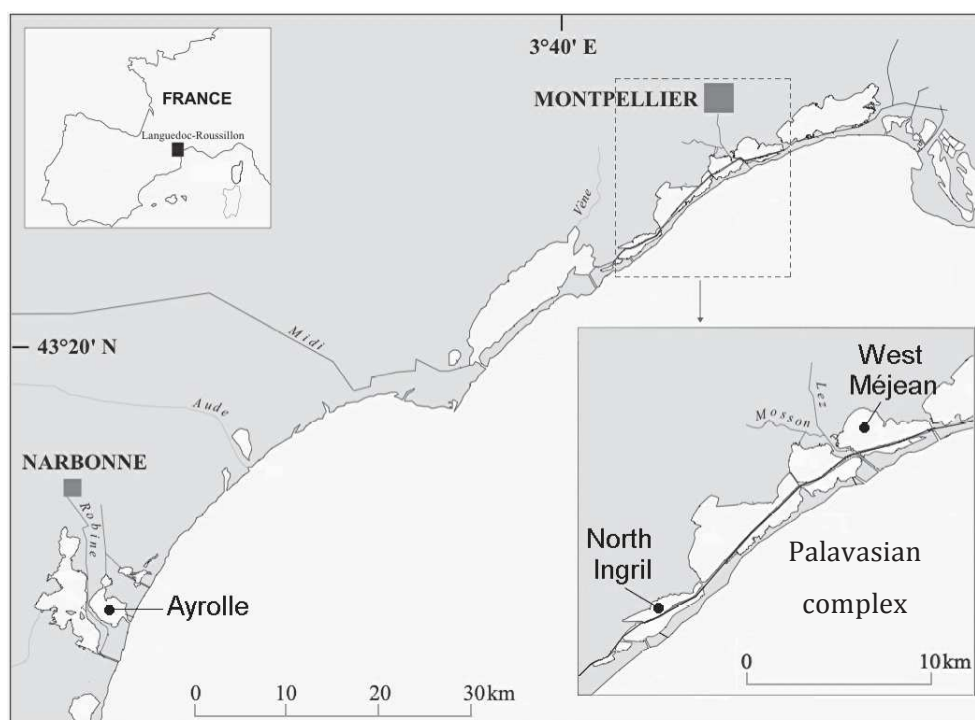


Fig. 1. Location of the sampling stations in Ayrolle (AYR), north Ingril (IN), west Méjean (MW) lagoons in the south of France.

Experiments were carried out from 25th August to 4th September 2014, at the Marine Station of Sète. In each lagoon, 70 L of water prefiltered through 1000 μL mesh to remove larger debris without removing zooplankton or larger phytoplankton (Collos et al., 2005) were sampled in sub-surface (20 cm depth) between 8h30 to 11h, and kept in the dark. At the sampling stations, salinity and temperature were measured with a conductivitymeter (Cond 3110 Set 2) on sub-surface (20 cm depth), and photosynthetic active radiation (PAR) with a LICOR LI_1400 at the water surface.

Upon return to the laboratory in Sète, the sampled volumes of water were homogenized by gentle shaking and then aliquoted. Two volumes of 80 mL of water were sampled in 100 mL polypropylene bottles prewashed with 1 mol.L⁻¹ HCl and three times rinsed with milli-Q water to analyze concentrations of NH_4^+ , PO_4^{3-} , NO_3^- , NO_2^- , TN, TP (μM) by the MIO (Marseille) (Aminot and Chaussepied, 1983).

Size class structure and community composition

Phytoplankton pigment analysis and biomass measurement were performed on fractionated water to assess the contribution of three different size classes, *i.e.* ultraphytoplankton <5 μm , nanophytoplankton between 5 and 20 μm and microphytoplankton >20 μm . Chl *a* concentrations were used as a proxy for phytoplankton biomasses. Triplicates of water samples were pre-filtered on 20 μm , and on 5 μm meshes (maximum 100 mL, depending on phytoplankton biomass) and analyzed by spectrofluorimetry using the protocol described in Bec et al. (2011), according to Neveux and Lantoiné, (1993) (See Chapter 2).

Chemotaxonomic analysis of pigment concentration using HPLC estimated phytoplankton diversity in each size class. Triplicates of size-fractionated water samples (150 to 2000 mL depending on biomass densities) were filtered on Whatman GF/F membranes 47 mm diameter, and stored at -80°C prior to analysis. Pigments analysis allowed the estimation of some major algal groups biomasses using pigments markers concentrations (Leruste et al., 2015 – See Chapter 2): fucoxanthin-rich diatoms using fucoxanthin (fuco), Dinophytes using peridinin (peri), Prasinophytes using prasinoxanthin (pras), Cryptophytes using alloxanthin (allo), Haptophytes using 19'But-fucoxanthin and 19'Hex-fucoxanthin (butfuco and hexfuco), Green algae using chlorophyll *b* (Chl *b*), lutein (lut), violaxanthin (vio), neoxanthin (neo) and zeaxanthin (zea), which can also indicate cyanobacteria occurrence, although diatoxanthine (diato) can indicate Euglenophytes and violaxanthin (viola) Chrysophytes (Roy et al., 2011). The community composition derived from the pigments signals was checked with microscopic observations and flow cytometry (Wright et al., 1991; Sherrard et al., 2006; Paerl et al., 2007) particularly to refine the zeaxanthin signal that corresponds both to Green algae and cyanobacteria. Hence, flow cytometry refined the HPLC results for ultraphytoplankton and especially cyanobacteria, by measuring abundances of cells <5 μm , (FACSCalibur, Becton Dickinson) (Bec et al., 2011). Cyanobacteria and eukaryotic phytoplankton cells (PEUK and Eukaryotes >3 μm , for picoeukaryotes <3 μm and ultraphytoplankton between 3 and 5 μm , respectively) were distinguished on the basis of light diffraction (FSC Forward Scatter, related to

cell size) and red fluorescence emissions (Chl *a*, wavelength >650 nm) (Bec et al., 2011). Populations of coccoid cyanobacteria (CYAN) were identified by their orange fluorescence emissions, and phycoerythrin-rich picocyanobacteria (PE-cyan) were distinguished from phycocyanin-rich picocyanobacteria (PC-cyan).

Optical microscopy observations helped to confirm HPLC results for nano- and microphytoplankton, by measuring abundance and taxonomic diversity of cells >5 µm. Triplicate of 1 L of samples fixed with formaldehyde (5% final concentration) were stored at obscurity prior to analysis. Because of weak biomasses into AYR station, a modified method from Utermöhl protocol was used (Utermöhl, 1931). After at least four days of sedimentation, samples were concentrated by taking off 800 mL of supernatant. This step was repeated until a sufficiently concentrated volume to count phytoplankton. 50 µL of sample were then observed by optical microscopy, and cells were counted on field or transect depending on their density. At least 200 cells were counted to obtain a significant view of the diversity for each sample. Taxonomic resolution was performed from the class to the species level (See Chapter 2).

Maximal growth and mortality rates

Phytoplankton maximal growth rates were measured by dilution experiments according to Landry and Hassett (1982). Five successive dilutions were carried out in duplicate by preparing different mixtures of samples and filtered (0.2 µm Suporcap cartridges, Pall-Gelman) lagoon water. The cartridges were previously rinsed with 1 L of deionized water and sample. The five duplicates finally consisted of 9, 17, 43, 74 and 100 % concentration of sample in 1 L polycarbonate bottles. These bottles were previously washed with 10 % HCl and three times rinsed with milli-Q water. Before incubation, the bottles received an enrichment based on f culture medium (Guillard and Ryther 1962), containing vitamins, silica, metals trace, nitrogen and phosphorus (NaH₂PO₄, final concentration 0.8 µM). The nitrogen was provided as ammonium (20 µM final concentration), assuming that this is the predominant nitrogen form during summer, mostly derived from remineralization processes in the sediment (Serpa et al.,

2007). The quantity of nitrogen enrichment was based on Bec et al. (2005), which observed phytoplankton limitation in the most eutrophic lagoon of the same region at 10 μM of nitrogen. Two bottles of sample without dilution and enrichment were incubated as control. Bottles were incubated for 24 h in lagoon water close to the Marine Station under *in situ* temperature and light conditions at 60 cm depth.

After 24 h incubation, Chl *a* biomasses of total, micro-, nano- and ultraphytoplankton were measured in each bottle, and their temporal changes after $t = 24$ h were used to calculate the apparent growth rate $k(x)$ for each dilution (x). For the enrichments (all nutrient added), the results were fitted to the linear equation (1), in order to calculate the maximum growth rate (μ_{max}) and the phytoplankton mortality rate (g) according to Landry and Hassett (1982):

$$k(x) = \mu_{\text{max}} - gx \quad (1)$$

With x as dilution factor, *i.e.* $x = 1$ for undiluted sample, and $x = 0$ for infinite dilution. Linear regression between apparent growth rate (k) and dilution factor (x) was used to calculate the maximum growth rate (μ_{max} as Y axis intercept) and phytoplankton specific mortality rate (g as the slope of the linear regression). It was assumed that this mortality is due to grazing (d^{-1}). Phytoplankton growth rate in incubations without added nutrient (μ_0) was subsequently extrapolated by adding g (estimated for nutrient-enriched series, see above) to the apparent growth rate (k_0) estimated for undiluted unenriched treatments, thus assuming that grazing was not impacted by the enrichment. The $\frac{\mu_0}{\mu_{\text{max}}}$ ratio assessed the impact of inorganic nutrient enrichment on growth, and estimated the nutrient sufficiency for phytoplankton growth (Landry and Hassett, 1982; Landry et al., 1998).

Nutrient limitation and resources use

To assess physiological nutrient limitation of phytoplankton, the “All minus one” growth experiment was combined with the dilution technique (Landry and Hassett, 1982). The “All minus one” growth experiment consisted of selectively enriching two dilutions series leaving out

nitrogen or phosphorous, respectively (Andersen et al., 1991). We assumed that specific grazing rates (g) were not affected by leaving out one of the nutrients and can thus be estimated in parallel in the complete enrichment series. All the bottles were incubated for 24 h in lagoon water close to the Marine Station of Sète under *in situ* temperature and light conditions, at 60 cm depth, and with the bottles enriched with the complete enrichment and the controls.

To identify which were the nutrient sources used for phytoplankton growth during nutrient-depletion, and estimate their relative contributions, we considered three potential sources: (1) an external source comprising the dissolved nutrients in the water at the beginning of incubation; (2) internal nutrients pools present at the start of the incubation; (3) nutrients supplied by recycling through grazing, considering excretion, egestion and ‘sloppy feeding’ (release of organic matter during physical phytoplankton cell breakage). The potential biomass production can be thus divided into these components: $C_E(t)$ from the external nutrient pool, $C_I(t)$ from internal nutrient reserves, $C_R(t)$ from the recycled nutrients. The external nutrient source is not affected by the dilution, while internal reserves are proportionally reduced, as grazing is reduced by a factor x , reducing recycled nutrient supply by the same way. Assuming that the amount of recycled nutrient is proportional to the amount of consumed food, the potential growth yield can be expressed as a function of the dilution factor:

$$\Delta C(x,t) = \Delta C_R(t)x^2 + \Delta C_I(t)x + \Delta C_E(t) \quad (2)$$

Accepted Eq. (2), and according that initial biomass in each dilution experiment was identical to biomass of the undiluted sample, reduced by the dilution factor (x), *i.e.* $C(x,0) = x.C(1,0)$, apparent growth rate $k(x)$ could be expressed by:

$$k(x) = \frac{1}{t} \ln \left(1 + \frac{\Delta C_R(t)x^2 + \Delta C_I(t)x + \Delta C_E(t)}{xC(1,0)} \right) \quad (3)$$

Introducing the potential production coefficient due to each nutrient source (Z) by $K_Z = \frac{\Delta C_Z(x,t)}{C(1,0)}$,

Eq. (3) could be re-express with production coefficients:

$$k(x) = \frac{1}{t} \ln (1 + K_R x + K_I + K_E x^{-1}) \quad (4)$$

K_R , K_I and K_E can be estimated by fitting Eq. (4) to estimate $k(x)$ by non linear regression method. To estimate parameters K_R , K_I , and K_E by multiple linear regressions, Eq. (4) could be antilogued on each side, giving the following expression:

$$\exp(k(x)t) - 1 = K_R x + K_I + K_E x^{-1} \quad (5)$$

With x and x^{-1} as independent variables and $\exp(k(x)t) - 1$ as the dependent variable.

According to these equations, Andersen et al. (1991) showed how mean growth rate expressed the contribution of each nutrient sources. To estimate the nutrient limitation in N or P controlling the growth, the Q ratio between maximal growth rate in replete nutrient condition μ_{max} and growth rate in N or P limitation μ_{-N} or μ_{-P} was calculated.

Statistical analysis

Data analysis was performed with R (R Core Team, 2013). To estimate the maximal growth rate and the grazing rate for the entire phytoplankton and the three size classes, mixed-effects multiple regression analyses were performed with apparent growth rate for each dilution as the dependent variable. Several equations resulting to the combination of explanatory variables of the equation (1) were fitted with the 'lmer' function in the 'lme4' library (version 1.1-10). All combinations were considered using the 'dredge' function of the MuMIn package. Model selection was based on parsimony using the small-sample corrected Akaike's information criterion (AIC_c). However, the linear model was the preferred model as it allows us to calculate μ_{max} and g according to equation (1) (Landry and Hassett, 1982). Therefore, we calculated the difference between the AIC_c of this linear model and the one having the lowest AIC_c to obtain a ΔAIC_c value. The linear model was accepted only for $\Delta AIC_c < 2$, and we concluded that statistically it does not make sense to calculate μ_{max} and g for $\Delta AIC_c > 2$ (Burnham and Anderson 2004).

To estimate the contribution of the three different nutrient sources to growth during nutrient depletion in the "All minus one" incubations, we estimated the coefficient K_I , K_E , K_R , which reflect internal, external or recycled sources, respectively. Therefore, we used mixed-effect multiple linear regressions according to the equation (5), with x and x^{-1} as independent

variables and $\exp(\mu_{\text{moy}}(x) t) - 1$ as the dependent variable. These calculations were performed for total phytoplankton and separately for the three different size classes. Based on the equation (5), several models using combinations of the explanatory variables were fitted with the 'lmer' function in the 'lme4' library. To identify the best model (best combinations of the three resources coefficients), the small-sample corrected Akaike's information criterion (AIC_c) was used to select the most parsimonious model. We estimated the proportion of biomass produced from these three sources, by multiplying initial biomasses with the three coefficients, respectively (Andersen et al., 1991).

Results

Environmental characteristics and trophic status of the lagoons

Environmental parameters and chlorophyll *a* concentrations of the three lagoons during sampling are presented in Table 1. These lagoons presented a gradient of trophic status that was reflected by chlorophyll *a* concentrations, total phosphorus (TP) and phosphate concentrations. This confirmed that Ayrolle (AYR) was oligotrophic, while north Ingril (IN) and west Méjean (MW), which both are on a re-oligotrophication trajectory (Leruste et al, 2016 – Chapter 3), can still be considered as mesotrophic and hypertrophic, respectively (*cf* Introduction and Chapter 5). A remarkably high phosphate concentration (2.5 μM) was observed in the hypertrophic MW lagoon. DIN concentrations were low (<1.5 μM) in three lagoons and mainly comprised ammonium. TN concentrations were comparable (around 30 μM) for AYR and IN and fourfold higher (123 μM) in the hypertrophic MW lagoon. This resulted in strong variations of the TN/TP ratio that decreased along the gradient of trophic status from 72 (AYR) to 14 (MW). Salinity was close to seawater in the two Palavasian lagoons (IN and MW) and lower (31) in the oligotrophic lagoon (AYR). Temperatures were comparable among the lagoons (21-23 °C).

Table 1. Environmental parameters and Phytoplankton biomasses expressed as Chl *a* concentration in the three lagoons during summer 2014. Chlorophyll *a* biomasses are expressed as mean and standard deviation of triplicates.

Lagoons	T (°C)	Salinity	Nutrient (µM)							Tot Chl <i>a</i> ± SD (µg.L ⁻¹)	TN/TP
			TN	NH ₄	NO ₃	NO ₂	DIN	TP	PO ₄		
AYR	21.0	30.9	32.5	0.62	0.00	0.07	0.69	0.45	0.12	0.23 ± 0.01	72.2
IN	20.8	41.5	28.2	0.99	0.15	0.07	1.21	0.89	0.21	0.98 ± 0.04	31.7
MW	23.2	36.6	123	0.68	0.00	0.37	1.05	8.72	2.48	36.1 ± 0.68	14.1

Characteristics of phytoplankton communities

The phytoplankton communities in the three lagoons were dominated by ultraphytoplankton, that represented 87, 63 and 84 % of the total chlorophyll *a* concentration in the oligo-, meso- and hypertrophic lagoons, respectively (Fig. 2).

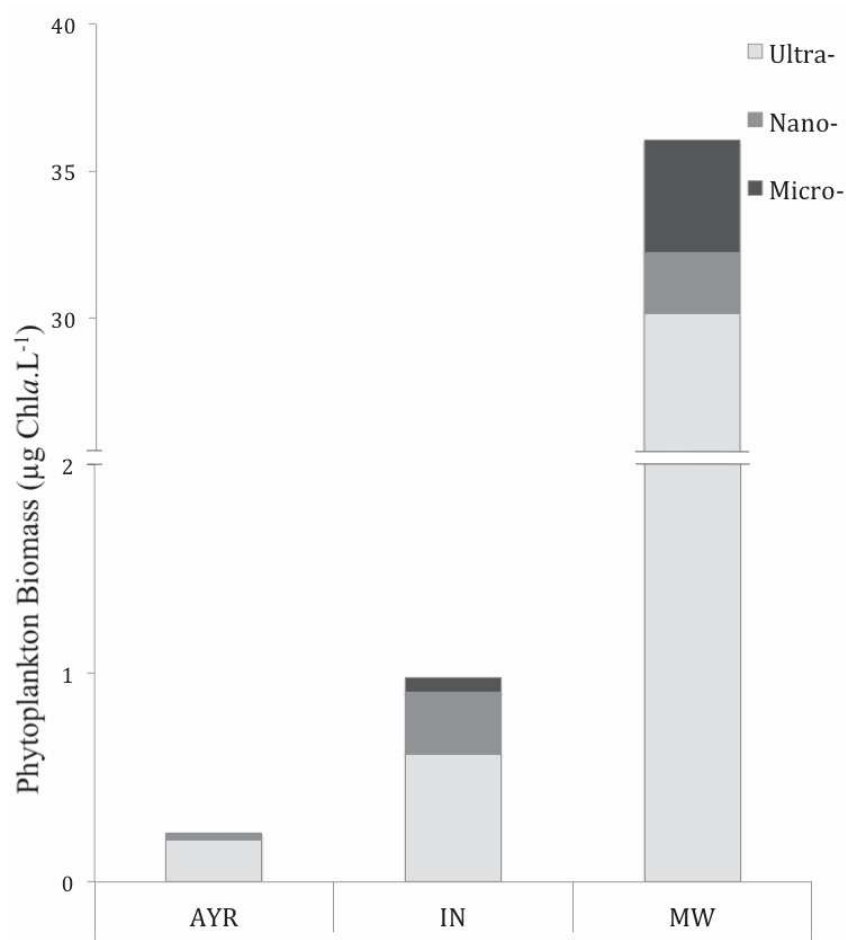


Fig. 2. Contribution of ultraphytoplankton <5 µm (light grey), nanophytoplankton between 5 and 20 µm (grey) and microphytoplankton >20 µm (dark grey) to the total biomass, in the oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons in summer 2014.

However, the composition of this major size class was specific for each lagoon. Thus, pigment composition showed that Green algae dominated the ultraphytoplankton of the oligo- and the hypertrophic lagoons, representing 44.5 and 55.3 % of the pigments in this size class, respectively (Fig. 3). This pigment signal reflected the dominance of *Chlorella*-like species, particularly high in the hypertrophic lagoon. Green algae and Cryptophytes dominated the ultraphytoplankton of the mesotrophic lagoon, reaching 38.2 and 37.7 % of the pigments concentrations of this size class, respectively. Cryptophytes were also well-represented in the ultraphytoplankton of the oligotrophic lagoons, with alloxanthin representing 19.4 % of the pigments of this fraction. Finally, fucoxanthin represented 19.7, 12.1 and 16.6 % of the ultraphytoplankton pigment pool in the oligo-, meso- and hypertrophic lagoons, respectively,

showing the presence of small-size fucoxanthin-rich diatoms. Pigment data showed that ultraphytoplankton also comprised cyanobacteria with biomass proportions ranging from 7.6 % in the mesotrophic lagoon to 19.7 % in the hypertrophic lagoon. They were also present in the oligotrophic lagoon, contributing to 12.6 % of the pool of pigments in this size class. However, in term of cell abundance, flow cytometry showed that phycocyanin-rich picocyanobacteria (PC-cyan) numerically dominated the ultraphytoplankton of the oligotrophic lagoon (Peuk: 11.9 %, PC-cyan: 76.5 %), while Picoeukaryotes (Peuk) dominated phytoplankton of the Palavasian lagoons (IN and MW) (Fig. 4). The numerical dominance of Peuk was particularly marked in the hypertrophic lagoon where it represented 68 % of cell counts. PC-cyan were also abundant in the hypertrophic lagoon, representing 30.6 % of the cell counts. In contrast, phycoerythrin-rich picocyanobacteria (PE-cyan) were only detected in the mesotrophic lagoon, reaching 2.3 % of the total ultraphytoplankton abundance (Fig. 4).

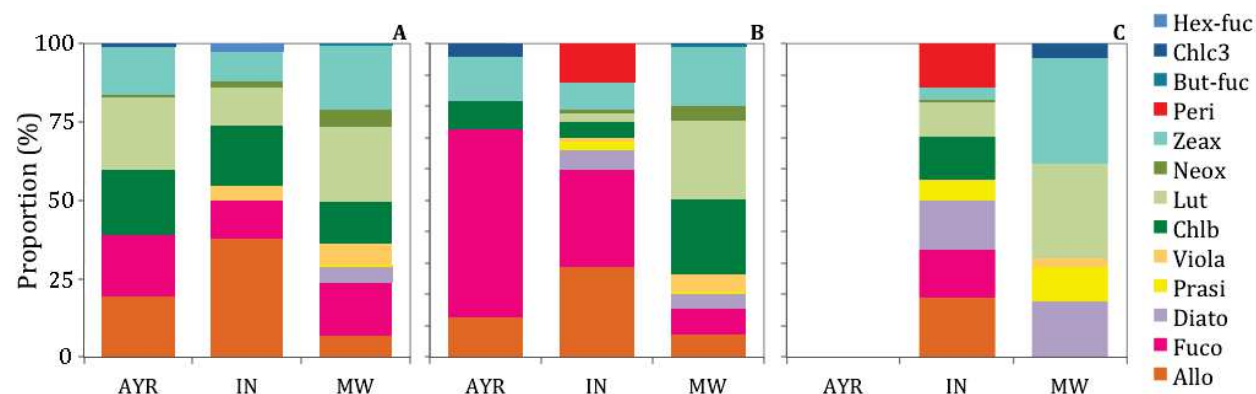


Fig. 3. Relative proportions of pigment biomarkers of phytoplankton communities in oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons, detailed for ultra- (A), nano- (B) and microphytoplankton (C). Pigment concentration of the microphytoplankton of Ayrolle below the detection limits.

Nano- and microphytoplankton compositions were also specific for each lagoon. Dinophytes pigment was only observed in the mesotrophic lagoon, representing 12.4 % of the pigment pool of the nanophytoplankton and 14.2 % of the microphytoplankton. The mesotrophic lagoon exhibited the highest pigment diversity both for the nano- and microphytoplankton fractions (Fig. 3). The hypertrophic lagoon still hosted the highest

proportion of Green algae pigment, representing 64.7 and 61.6 % of the pigment pools of nano- and microphytoplankton fractions, respectively. Fucoxanthin-rich diatoms dominated the nanophytoplankton of the oligotrophic lagoon, representing 60.0 % of the pigment pool of this fraction. It reflects a bloom of diatoms carried by several *Chaetoceros* species, and which dominated the nano- and microphytoplankton of this lagoon, reaching 56 % of the total cell abundance.

The microphytoplankton of the mesotrophic lagoon showed high pigment diversity, and nearly even proportions of different taxonomic groups among Dinophytes (peridinin), Chlorophytes (Chl *b*), Prasinophytes (prasincoxanthin), fucoxanthin-rich diatoms (fucoxanthin), and Cryptophytes (alloxanthin). Dinophytes also highly contributed to the total abundance, but lower than Cryptophyceae reaching more than 40% and mainly represented by *Plagioselmis* sp.. The microphytoplankton of the hypertrophic lagoon was mainly composed of zeaxanthin, lutein, violaxanthin, prasincoxanthin, and diatoxanthin, reflecting Green algae and/or cyanobacteria occurrence. Despite the fact that no Dinophytes pigment was detected in the hypertrophic lagoon, Dinophytes abundances, proportions, and richness were high according to microscopic observation. Hence, the observed taxa were mostly heterotrophic (lacking Chl *a*). We thus recorded Dinophysiales (*Oxyphysis oxitoxicoides*), Gonyaulacales (*Alexandrium* sp., *Gonyaulax spinifera*), Gymnodiniales (*Gymnodinium sanguineum*), Peridinales (*Heterocapsa minima*, *H. niei*, *Peridinium quinquecorne*, *Kryptoperidinium foliaceum*) and Prorocentrales (*P. micans*) species.

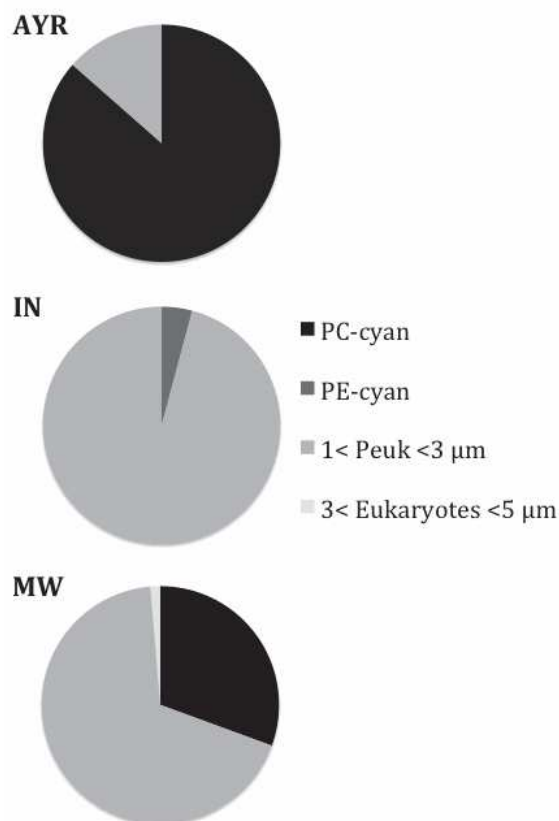


Fig. 4. Composition of the ultraphytoplankton in phycocyanin-rich picocyanobacteria (PC-cyan, black), phycoerythrin-rich picocyanobacteria (PE-cyan, dark grey), Picoeukaryotes (Peuk, grey), and Eukaryotes >3 μm (light grey) from the oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons in summer 2014.

Growth and mortality rate under natural nutrient conditions

Growth and mortality rates estimates based on Chl *a* concentration are indicated in Table 2. Without enrichment, the entire phytoplankton of the oligotrophic lagoon exhibited a μ_0 of 1.20 d⁻¹. Inversely, a loss of biomass was observed in the mesotrophic lagoon during the incubation, as indicated by the negative μ_0 , highlighting severe growth limitation and cell mortality independent of grazing. No meaningful rates could be determined for the total phytoplankton community in the hypertrophic lagoon. However, we were able to calculate meaningful specific growth and grazing rates for the microphytoplankton and ultraphytoplankton size classes in all three lagoons, but not for the nanoplankton size fractions (Table 2). This decomposition in size classes precised the growth of each functional groups previously described. The microphytoplankton of the oligotrophic lagoon, mainly represented

by *Chaetoceros* species exhibited the highest μ_0 , reaching 3.95 d⁻¹. Inversely, the ultraphytoplankton that dominated the community in this lagoon and mainly composed of PC-cyan (Fig. 4) exhibited a lower $\mu_0 = 1.14$ d⁻¹, close to that of its entire phytoplankton community (Table 2). In the mesotrophic lagoon, the highly diverse microphytoplankton expressed a $\mu_0 = 1.22$ d⁻¹, while the ultraphytoplankton, which dominated its phytoplankton community and was mainly composed of Peuk, exhibited μ_0 close to 0, indicating a growth limitation. In the hypertrophic lagoon, the microphytoplankton mostly composed of Green algae and Dinophytes showed a high growth rate ($\mu_0 = 2.16$ d⁻¹), while the ultraphytoplankton, which dominated its phytoplankton community and was mainly composed of Peuk *Chlorella*-like, exhibited μ_0 lower than 1 d⁻¹. The highest grazing rate was observed for the microphytoplankton of the hypertrophic lagoon, reaching 2.10 d⁻¹ while those of the entire phytoplankton of the oligotrophic lagoon was null (Table 2).

Table 2. Specific growth rates (μ_0) and grazing rate (g) measured in incubations without enrichment and maximum specific growth rates (μ_{\max}) subsequently calculated using complete enrichment in the oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons. Values were estimated according the linear Landry and Hassett (1982) equation. This model has been compared to alternative models by mixed-effect multiple linear regressions of apparent growth rates, based on Chl *a* concentration from dilution experiments. The parsimony of the different models was checked by the AIC criterion. The linear model was only accepted when it presented a $\Delta AIC_c < 2$ with respect to the most parsimonious model (see Methods). AIC_c -w describe the strength of explanation of the model.

Lagoons	Fraction	μ_0	g	μ_{\max}	n	AIC_c	ΔAIC_c	AIC_c -w
		Rates (d ⁻¹)						
AYR	Total	1.20	0.00	1.29	8	4.2	0.0	0.68
	micro	3.95	-1.38	4.41	7	15.2	0.0	0.65
	nano	-	-	-	8	15.0	5.6	0.05
	ultra	1.14	-0.46	1.28	10	5.9	0.0	0.43
IN	Total	-0.18	-0.22	0.43	10	-8.6	0.0	0.41
	micro	1.22	-0.48	1.83	8	7.4	0.3	0.34
	nano	-	-	-	10	25.2	4.3	0.09
	ultra	-0.02	-0.35	0.61	9	1.8	0.1	0.34
MW	Total	-	-	-	10	0.3	6.3	0.04
	micro	2.16	-2.10	1.34	10	29.2	0.0	0.71
	nano	-	-	-	10	27.6	3.0	0.16
	ultra	0.91	-1.17	1.14	10	0.0	0.0	0.86

The addition of the complete enrichment before the incubation resulted in an increase of growth rate for all the communities, except for the microphytoplankton of the hypertrophic lagoon, which showed an apparent decrease of 36 % of its growth rate (Table 2). The ratio of μ_0 and μ_{\max} can be used as an index for the severity of nutrient limitation under natural conditions (Fig. 5). Hence, severe nutrient limitation was observed for the total and ultraphytoplankton communities in the mesotrophic lagoon with μ_0/μ_{\max} ratios close to 0. A minor degree of nutrient limitation was detected for the total, micro- and ultraphytoplankton communities in the oligotrophic lagoon and for the ultraphytoplankton in the hypertrophic lagoon ($\mu_0/\mu_{\max} > 0.75$). A moderate nutrient limitation was observed for the microphytoplankton in the mesotrophic

lagoon ($0.5 < \mu_0/\mu_{\max} = 0.67 < 0.75$). In the oligotrophic lagoon, the enrichment allowed the increase of 7.5 % of the growth rate for the entire phytoplankton, 11.6 % for the microphytoplankton, and 12.2 % for the ultraphytoplankton. In the mesotrophic lagoon, the enrichment released the growth limitation, allowing positive μ_{\max} . The growth rate of the microphytoplankton increased from 50 % with the addition of the enrichment. In the hypertrophic lagoon, the ultraphytoplankton growth rate increased from 25.3 % with the enrichment.

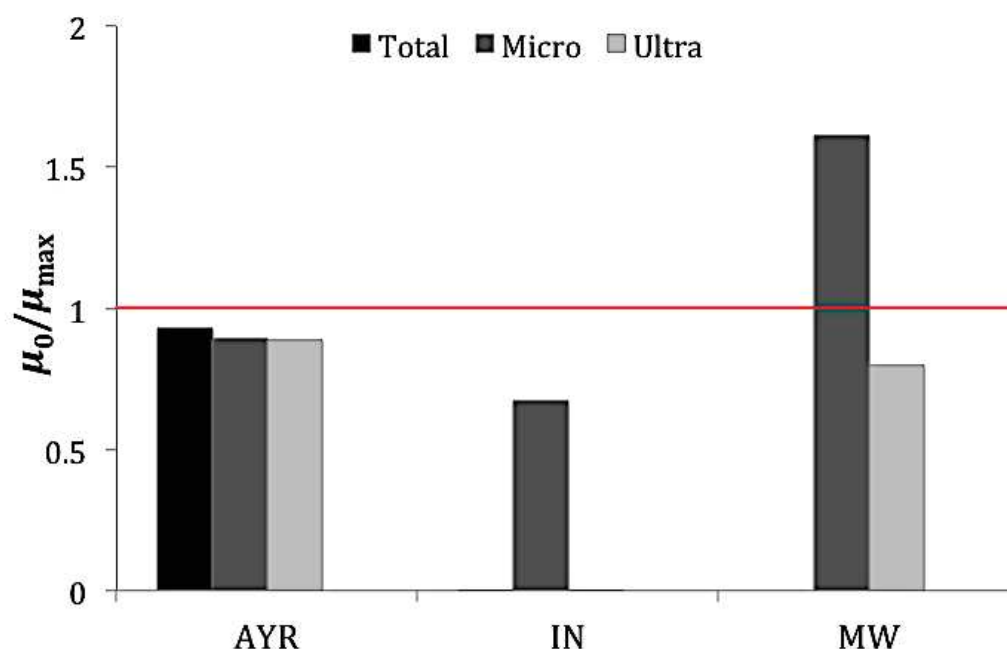


Fig. 5. Ratio between growth without enrichment and maximal growth rate with total enrichment (μ_0/μ_{\max}) of total phytoplankton (black), micro- (grey) and ultraphytoplankton (light grey), in the oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW), lagoons, based on growth rates calculated from Chl *a* biomasses in summer 2014.

Internal, external and recycled resources exploitation during nutrient depletion

The growth rate of the entire phytoplankton and the three size classes under experimentally-induced N and P limitations are presented in Table 3, as well as the Q_N and Q_P ratios illustrating the severity of the experimentally-induced N and P limitations respectively. In the enrichment lacking N, the entire phytoplankton, the micro- and the ultraphytoplankton size

fractions most often exhibited nitrogen limitation, expressed by μ_{-N} lower than μ_{max} , leading Q_N values <1 (Table 3; Fig. 6 A). Accordingly, the induced nitrogen limitation was most severe for the ultraphytoplankton in the hypertrophic lagoon ($Q_N = 0$, Fig. 6 A). However, in the oligotrophic lagoon, after 24 h incubation with the enrichment lacking N, we were not able to detect microphytoplankton biomass and thus not able to calculate a μ_{-N} value, suggesting a severe N limitation in this case as well.

Table 3. Maximum growth rates with complete enrichment (μ_{max}), with enrichment without N (μ_{-N}) and without P (μ_{-P}), and Q_N and Q_P values based on μ_{max} and μ_{-N} or μ_{-P} ratios respectively, for the oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons and for total phytoplankton, micro-, nano- and ultraphytoplankton.

Lagoons	Fraction	μ_{max}	μ_{-N}	μ_{-P}	Q_N	Q_P
		Rates (d ⁻¹)				
AYR	Total	1.29	-1.06	0.76	-	0.53
	micro	4.41	-	1.54	-	0.38
	nano	-	1.48	1.18	-	-
	ultra	1.28	0.91	1.13	0.70	0.88
IN	Total	0.43	0.21	0.26	0.48	0.59
	micro	1.83	0.66	1.52	0.36	0.83
	nano	-	0.20	-0.08	-	-
	ultra	0.61	0.16	0.13	0.27	0.21
MW	Total	-	-0.01	1.25	-	-
	micro	1.34	-0.21	2.10	-	1.57
	nano	-	0.85	1.35	-	-
	ultra	1.14	0.00	1.13	0.00	0.99

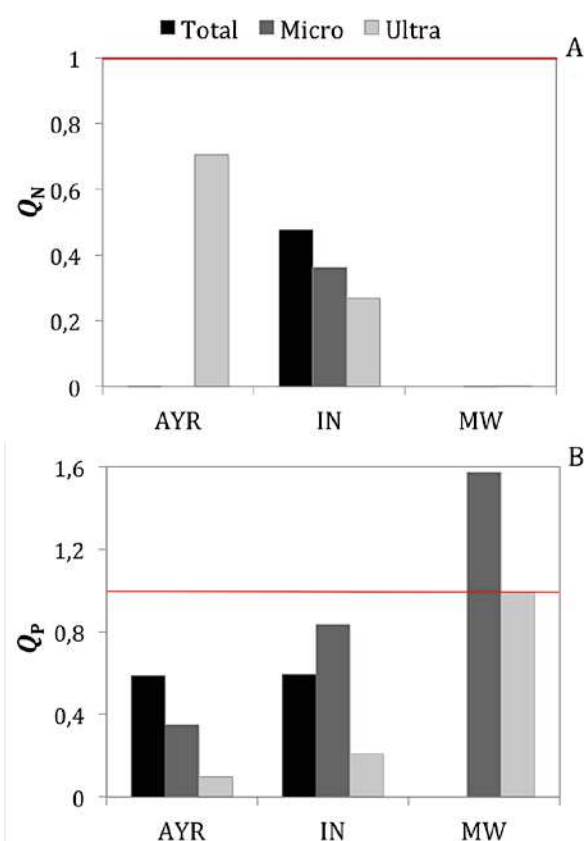


Fig. 6. Ratio between maximal growth rates with total enrichment and enrichment without N called Q_N (A), and between maximal growth rates with total enrichment and enrichment without P called Q_P (B), for total phytoplankton (black), micro- (grey) and ultraphytoplankton (light grey), in the oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons, based on growth rates calculated from Chl *a* values in summer 2014. The red line precises ratios equal to 1.

To cope with the nitrogen limitation, the entire phytoplankton of the three lagoons can potentially use several resource pools (Fig. 7 A-C; Table S1 Supplementary Materials). In the oligo- and the hypertrophic lagoons, phytoplankton mainly used recycled nitrogen, while in the mesotrophic lagoon it mainly used internal pool and 18 % of external nitrogen (Fig. 7 A). The decomposition in three size classes specified different trends across the communities (Fig. 7 C). In the oligotrophic lagoon, the ultra- and nanophytoplankton mainly composed of PC-cyan and diatoms used internal nitrogen resources. In the mesotrophic lagoon, the two main size classes's use of N resources echoed the entire phytoplankton: ultraphytoplankton composed of Peuk and Cryptophytes used internal resources and nanophytoplankton mainly composed of

Cryptophytes and diatoms used external one. The microphytoplankton used 84 % of recycled nitrogen and 16 % of internal nitrogen pool. In the hypertrophic lagoon, the dominant ultraphytoplankton exhibited exclusive use of recycled pool, as well as the entire phytoplankton, while the two other size classes only used internal nitrogen pool (Fig. 7 C).

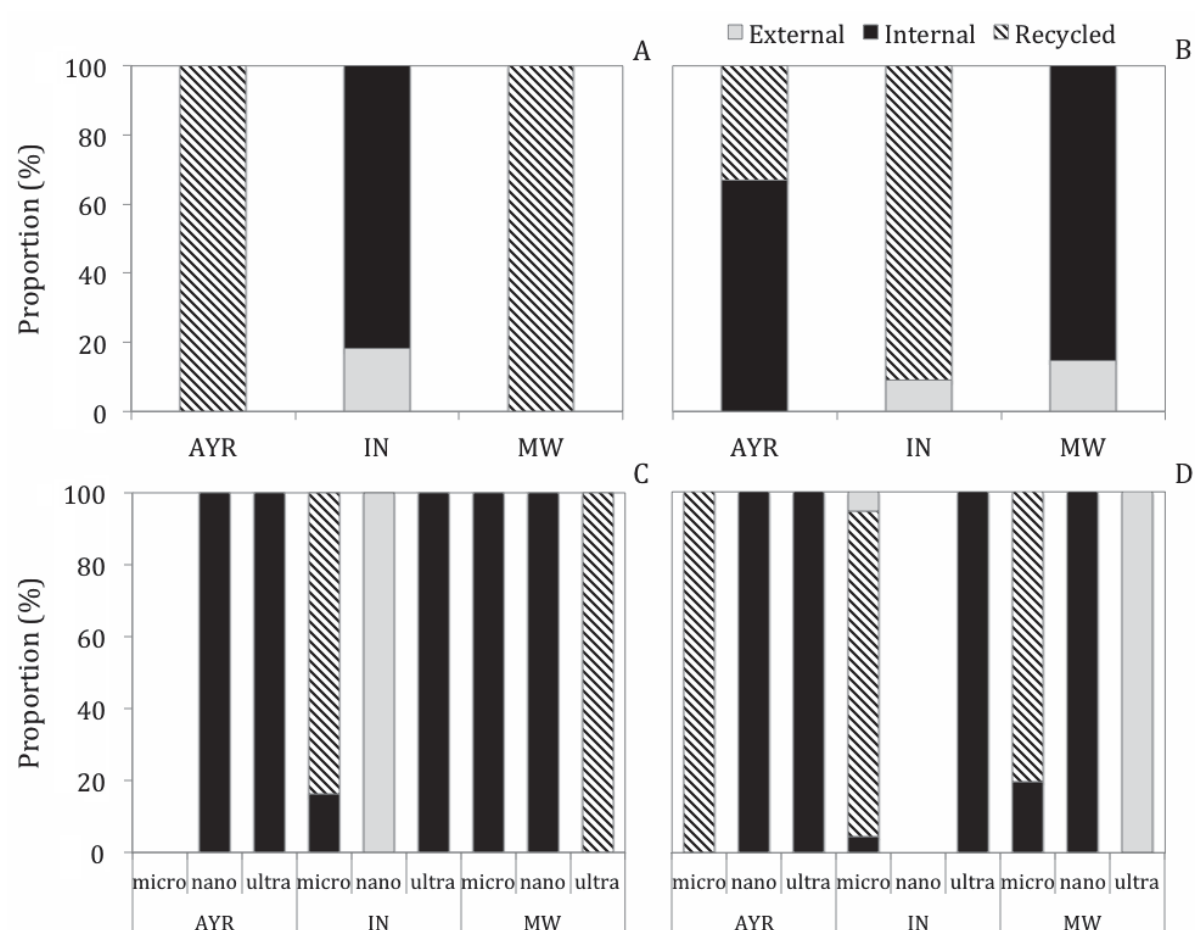


Fig. 7. Contribution of internal (black), external (light gray) and recycled (shaded) nitrogen (A – C) and phosphorous (B – D) resources used to growth under limited condition, for total phytoplankton (A – B), and decomposed for micro-, nano- and ultraphytoplankton (B – D) in oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons during summer 2014.

With the enrichment lacking P, the entire phytoplankton of the oligo- and the mesotrophic lagoons exhibited Q_P values <1 , indicating a P limitation. When decomposing into size fractions, the P-limitation increased with the decreasing eutrophication for the micro- and the dominant ultraphytoplankton (Fig. 6 B). In the hypertrophic lagoon, $Q_P >1$ highlighted the

absence of P limitation, and also supported nitrogen limitation, released with the enrichment of N without P (Fig. 6 B).

To cope with the phosphorous limitation, the entire phytoplankton has used several resource pools in the three lagoons (Fig. 7 B-D). In the oligotrophic lagoon, the entire phytoplankton mainly used internal P resources, and in a lower part recycled P loads, about 67 and 33 % respectively (Fig. 7 B). In the mesotrophic lagoon, it consumed 91 % of recycled phosphorous, and 9 % of external one, while in the hypertrophic lagoon it used 85 % of internal phosphorous and 15 % of external one. The decomposition into size classes highlights several strategies of use of internal, external and recycled phosphorous pools (Fig. 7 D). In the oligotrophic lagoon, the microphytoplankton mainly represented by *Chaetoceros* species only used recycled phosphorous, while the nano- and the ultraphytoplankton mainly comprising PC-cyan, diatoms and Cryptophytes only used internal phosphorous pools. In the mesotrophic lagoon, the microphytoplankton used 90 % of recycled phosphorous and 5 % of external and internal ones, while the ultraphytoplankton mainly composed of Peuk only used internal phosphorous. In the hypertrophic lagoon, the ultraphytoplankton was the only to use external P loads, while the microphytoplankton used 80 % of recycled and 20 % of internal phosphorous, and the nanophytoplankton exclusively used internal phosphorous pool.

Discussion

Summer phytoplankton communities and their adaptation to trophic status in the three lagoons

In this paper we describe the phytoplankton communities in the three lagoons and discuss how adaptive strategies can be linked to environmental characteristic of their ecosystem, and more specifically to the trophic status in the lagoon (Reynolds et al., 2002). We particularly pay attention to the fact that two of the three lagoons are on a re-oligotrophication trajectory since 2006 (Leruste et al., 2016 – Chapter 3). Nevertheless, chlorophyll *a*, total phosphorous and phosphate concentrations showed that during the summer of 2014, north

Ingril (IN) and west Méjean (MW) still could be considered as mesotrophic and hypertrophic, respectively, which we could compare with the oligotrophic Ayrolle lagoon.

The summer phytoplankton communities were dominated by ultraphytoplankton in all three lagoons, which is a characteristic feature of most Mediterranean coastal lagoons (Bec et al., 2011). In general, small cells are particularly adapted to low nutrient concentrations due to their high nutrient affinity (Chisholm, 1992; Raven, 1998). In this respect, we observed that DIN concentrations were low in all three lagoons ($<1.5 \mu\text{M}$) showing that these phytoplankton communities are able to take up DIN with high affinity. High DIP (phosphate) concentrations were found in the hypertrophic lagoon, showing that phosphorus availability was in excess in this lagoon. In addition to their efficient inorganic nutrient uptake systems, it has been proposed that a high photosynthetic efficiency (Raven, 1998; Litchman et al., 2010) also confer them a competitive advantage, which may explain their success in the hypertrophic lagoon (Bec et al., 2008; 2011), especially during summer (Bec et al., 2005).

Both cell counts and pigment data showed that picoeukaryotes (Peuk) were dominant in the ultraphytoplankton of the hypertrophic lagoon, mainly comprising Green algae, and especially *Chlorella*-like picoeukaryotes. Among the Green Algae, Prasinophytes and Chlorophytes observed in this hypertrophic lagoon possess both a good tolerance to high NH_4 concentrations, as well as a high affinity for uptake (Bec et al., 2011). Hence, these organisms are particularly adapted to use NH_4^+ as nitrogen source. This compound dominated DIN, and its presence in the water column results both from internal recycling and benthic fluxes (Ouisse et al., 2013). In addition, these organisms are also well adapted to turbulence, turbidity and variability of salinity, as it has been observed in other hypertrophic coastal waters (Paerl et al., 2007).

In the hypertrophic lagoon, the abundance of Dinophytes in the nano- and the microphytoplankton may be linked to their mixotrophic abilities, which represent a competitive advantage in systems where stock of organic matter are important. Hence, when dissolved inorganic nutrients are depleted to very low concentrations by more competitive

ultraphytoplankton, mixotrophic species can maintain themselves thanks to a higher growth efficiency at low light (Litchman et al., 2006). In the nearby Thau lagoon, it has been observed that Dinophytes comprising mixotrophic and heterotrophic species, bloomed under N limitation during dry period, and that some of the mixotrophic species showed consumption of dissolved organic nitrogen (Collos et al., 2014). Moreover, several Dinophytes species, such as *Gyrodinium sp.* and *Protoperdinium sp.* observed in the hypertrophic and the mesotrophic lagoons are able to graze on diatoms or Ciliates (Legrand et al., 1998). This heterotrophic ability could explain their persistence in this lagoon dominated by picoeukaryotes and despite the lack of nutrient (Zhang et al., 2005).

For the ultraphytoplankton of the oligotrophic lagoon, cell counts showed that cyanobacteria were more abundant than Peuk, while pigment data indicated that Peuk dominated over cyanobacteria. This apparent contradiction can be explained by the fact that the Peuk (1-3 μm cell size) were larger than the cyanobacteria (1 μm). Hence, cyanobacteria represented a lower biomass than Peuk, but were still able to outnumber them in the oligotrophic lagoon because of their small cell size. The cyanobacteria in both the oligotrophic and the hypertrophic lagoons were dominated by phycocyanin-containing species (PC-cyan), which contrasted with the mesotrophic lagoon where phycoerythrin species (PE-cyan) dominated the cyanobacterial community. PC-cyan exhibit efficient use of red light, which dominates the spectrum in turbid waters, where turbidity can be explained by high plankton densities as well as by sediment resuspension. Hence, their presence in the oligotrophic lagoon appears to be linked to turbidity due to recurrent sedimentary suspension affecting the water column light quality (Stomp et al., 2007). Inversely, the presence of PE-cyan in the mesotrophic lagoon reflected an adaptation to low turbidity (Vörös et al., 1998; Stomp et al., 2007). However in this lagoon, Peuk dominated the ultraphytoplankton community in term of abundance and biomass.

The highest calculated specific growth rates were 3.95 d^{-1} and 2.16 d^{-1} , for the microphytoplankton in the oligotrophic and hypertrophic lagoons, respectively. In the

oligotrophic lagoon, this size fraction was mainly composed of *Chaetoceros* species, which also showed high growth rates in Mediterranean lagoons in earlier studies (Bec et al., 2005). In contrast, specific growth rates of ultraphytoplankton during summer were generally lower, *i.e.* around 1 d⁻¹, which is in agreement with Zhang et al. (2005).

Reactivity of phytoplankton to nutrient pulses

To better understand the adaptation of autotrophic communities to the environmental conditions during the re-oligotrophication process, it was necessary to understand the sensibility to these communities to a nutrient pulse (Duarte et al., 2000; Wood and Bukaveckas, 2014). We assume that re-oligotrophication, which reduces nutrient availability, results in an increase of nutrient limitation for phytoplankton communities. In most of cases where we were able to calculate specific growth and grazing rates we observed that nutrient enrichment enhanced growth rates, indicating a nutrient limitation under natural conditions. The only exception was for the microphytoplankton of the hypertrophic lagoon, where we observed an unlikely ratio of $\mu_0/\mu_{\max}= 1.6$. Hence, despite the high concentration of added nutrients, the enrichment was insufficient to allow a linear trend of the microphytoplankton apparent growth rate as a function of the dilution factor in the hypertrophic lagoon (Landry and Hassett, 1982). This appears to be due to methodological problems. Most likely, the very high biomass results in nutrient depletion for the less diluted samples and, hence, in an underestimation of their specific growth rates. This was supported by the very low apparent growth rate in the bottles containing 100 % and 75 % of unfiltered water. In the oligotrophic lagoon, the nutrient pulse only marginally stimulated the growth rate of the phytoplankton (less than 12.2 %), indicating a low reactivity of the phytoplankton in this lagoon. The phytoplankton of the mesotrophic lagoon responded the most importantly to the enrichment. The growth rate of the microphytoplankton in this lagoon showed an increase of 50 %, indicating that despite the lower eutrophication status compared to the hypertrophic MW lagoon, phytoplankton communities of IN still strongly react to an enrichment. The ultraphytoplankton of the hypertrophic lagoon also responded to

the enrichment by an increase of its growth rate. However, this increase was lower than those of the phytoplankton of the mesotrophic lagoon. Considering the high picoeukaryote abundances in this lagoon, the enrichment may have been insufficient to allow the estimation of the maximal phytoplankton growth rate.

Nutrient limitation impacts phytoplankton biomass, growth, and community composition (Domingues et al., 2011). Different observations can be used to get indications on the phytoplankton growth-limiting factors in the lagoons. In the first place, taking the TN/TP ratio as a proxy for element ratios in phytoplankton, we observed ratios highly above the Redfield one for the oligotrophic and mesotrophic lagoons and a value slightly below the Redfield ratio for the hypertrophic lagoon. In agreement with Souchu et al. (2010), this suggests that phosphorus appears to be the limiting factor in the oligotrophic and mesotrophic lagoons, while nitrogen is limiting growth in the hypertrophic lagoon. The high DIP concentrations in the hypertrophic lagoon further support that phosphate is in excess and thus not-limiting growth in this lagoon. The “All minus one” experiments give further indications about limiting growth factors *in situ*. Hence, the nitrogen limitation in the hypertrophic lagoon was strongly supported by the Q_N and Q_P values of 0 and 1, respectively. In contrast, in the oligotrophic and in the mesotrophic lagoons, measured Q_N and Q_P values were always below 1, indicating the ease of inducing N and P limitation in experimental incubations. This raises the question, whether the phytoplankton in these lagoons was co-limited by N and P simultaneously. Although this is in principle in contradiction with Liebig’s law of the minimum (Liebig et al., 1842) there are increasing evidences about N and P co-limitation in freshwater, marine, and coastal lagoons (Hlaili et al., 2006; Harpole et al., 2011). Such a co-limitation could also explain why both DIN and DIP values are low in the oligotrophic and mesotrophic lagoons. Moreover, Souchu et al. (2010) have also pointed out the shift of N and P co-limitation to an exclusive N limitation between lagoons with increasing eutrophication. Among the co-limitation, each size class expressed some specificity according to their composition and their affinity to nutrient uptake, and the amount of available nutrients. Despite their high affinity to dissolved nutrients

(Chisholm, 1992), ultraphytoplankton growth rate was limited in the three lagoons. In the oligotrophic lagoon, PC-cyan were more N than P limited, probably because of their high affinity to P due to specific mechanisms to acquire this nutrient (Donald et al., 1997).

To sustain phytoplankton growth under nutrient-limiting conditions, phytoplankton used other resources in addition to the externally supplied, such as the internal or recycled pools. In the hypertrophic lagoon, the dominant ultraphytoplankton was the most competitive to use recycled nitrogen and external phosphorous (Raven, 1998), while all others globally used internal resources. This results highlighted specific strategies including excessive nutrient uptake during pulses, *i.e.*, luxury consumption and storage. Several phytoplanktonic groups commonly use these strategies, such as diatoms (Litchman et al., 2007; Domingues et al., 2011), and picophytoplankton in variable nutrient regimes (Glover et al., 2007).

Vulnerability of phytoplankton to nutrient pulses during re-oligotrophication

Our incubation experiments may provide some indications whether an incidental nutrient pulse disturbs the phytoplankton communities and the lagoons are thus vulnerable to eutrophication. In the mesotrophic lagoon we observed a strong enhancement of growth both for micro- and ultraphytoplankton, thus showing its vulnerability. It indicates that this lagoon is still highly sensitive to nutrient pulse. Among the autotrophic compartments hosted by this lagoon, such as the phytoplankton and the macrophytic communities, picoeukaryotes always seems to be the highest competitive to use nutrient pulse, highlighting the fragility of the re-oligotrophication process even in one of the less degraded lagoon of the Palavasian complex.

The enhancement of the phytoplankton growth by the enrichment was less pronounced for the ultraphytoplankton in the hypertrophic lagoon. Beside the above-mentioned methodological problems, the effect may be attenuated by the particular conditions observed in August 2014 in this lagoon. Hence, chlorophyll a densities achieved $36 \mu\text{gL}^{-1}$, which was much higher than during the summer period in preceding years. This high biomass is the first return to levels observed in summer 2006, during which summer biomasses reached to $79.9 \pm 40.7 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$.

This high density may reflect its vulnerability and a potential resistance to enhance re-oligotrophication due to re-current occasional nutrient inputs and internal loadings sustained by benthic fluxes (Phillips et al., 2005). These fluxes are particularly high during summer in NH_4^+ and PO_4^{3-} (Ouisse et al., 2013), as reflected by the high phosphorous concentration observed in the hypertrophic lagoon ($2.48 \mu\text{M}$) (Souchu et al., 2010), and despite the strong nutrient consumption by high phytoplankton biomasses. This release of nutrient impacts benthic and pelagic communities, particularly in shallow systems under 5 m depth such as coastal lagoons (Cowan et al., 1996). It thus enhanced picoeukaryotes and PC-cyan growth (Velasco et al., 2006), and led the bloom of Chlorophytes and cyanobacteria (Carstensen et al., 2007).

Despite the nine years of re-oligotrophication dynamic, the hypertrophic lagoon still presents degraded characteristics. Accordingly, phytoplankton still was the main autotrophic compartment (Bricker et al., 2008), which was dominated by picophytoplankton (Bec et al., 2011). The picophytoplankton was also the main compartment to react to a nutrient pulse, mainly through Green algae and more particularly small *Chlorella*-like, which are highly competitive in turbulent systems (Margalef, 1978, Reynolds and Lund, 1988) and under conditions when DIN supply is dominated by ammonium (Litchman et al., 2007). Moreover, Green algae have optimum temperature for growth that matches with summer temperatures, enhancing their dominance during this period (Litchman et al., 2010). The competitiveness of this size class was so important that they were the only to use recycled N and external P, leading the use of N and P internal pools for the nanophytoplankton and recycled P for the microphytoplankton.

In contrast, in the oligotrophic lagoon, the very low biomass and the numerical dominance of PC-cyan reflects adaptation to very low nutrient concentration in an oligotrophic system (Caroppo, 2000). It highlights a very minor enhancement induced by nutrient enrichment. In this respect, the μ_0 values were surprisingly high both for the microphytoplankton dominated by *Chaetoceros* sp. and for ultraphytoplankton. Moreover, these were only partially compensated by the grazing rates measured in the incubations. In this

shallow oligotrophic lagoon the ecosystem functioning is largely impacted by the benthos. Hence, this lagoon has an important cover of seagrasses (*Zostera noltei* represent more than 80 % of coverage) predominating the primary production and inorganic nutrient uptake. In addition, the benthos is home to suspension feeders that exert grazing on phytoplankton thus maintaining low population densities despite high μ_0 values. In this oligotrophic ecosystem, benthic and macrophytic community must mainly benefit from nutrient input (Bricker et al., 2008), and the phytoplankton may have adapted by using other nutrient sources such as internal one, to cope with this low access to nutrient loads (Glover et al., 2007). We expect that the short-term vulnerability of the currently mesotrophic and hypertrophic lagoons will only decrease after prolonged re-oligotrophication and particularly upon return of the benthic communities that are characteristic for the oligotrophic conditions as the marine Magnoliophyta.

References

- Aminot, A., Chaussepied, M.C., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest.
- Andersen, T., Schartau, A., Paasche, E., 1991. Quantifying External and Internal Nitrogen and Phosphorus Pools, as Well. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69, 67–80.
- Bec, B., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Laugier, T., 2011. Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquat. Microb. Ecol.* 63, 29–45.
- Bec, B., Collos, Y., Vaquer, A., Mouillot, D., Souchu, P., 2008. Growth rate peaks at intermediate cell size in marine photosynthetic picoeukaryotes. *Limnol. Oceanogr.* 53, 863–867.
- Bec, B., Hussein-Ratrema, J., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., 2005. Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *J. Plankton Res.* 27, 881–894.
- Boesch, D.F., 2002. Challenges and opportunities for science in reducing nutrient over-enrichment of coastal ecosystems. *Estuaries* 25, 886–900.
- Bricker, S.B., Longstaff, B., Dennison, W., Jones, A., Boicourt, K., Wicks, C., Woerner, J., 2008. Effects of nutrient enrichment in the nation's estuaries: A decade of change. *Harmful Algae* 8, 21–32.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (Eds.), 2004. Model Selection and Multimodel Inference. Springer New York, New York, NY.
- Cartaxana, P., Mendes, C.R., Brotas, V., 2009. Phytoplankton and ecological assessment of brackish and freshwater coastal lagoons in the Algarve, Portugal. *Lakes Reserv. Res. Manag.* 14, 221–230.
- Chisholm, S.W., 1992. Phytoplankton Size, in: Falkowski, P.G., Woodhead, A.D., Vivirito, K. (Eds.), Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea, Environmental Science Research. Springer US, pp. 213–237.
- Cloern, J.E., 2001. Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 210, 223–253.
- Collos, Y., Bec, B., Jauzein, C., Abadie, E., Laugier, T., Lautier, J., Pastoureaud, A., Souchu, P., Vaquer, A., 2009. Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea Res.* 61, 68–75.
- Collos, Y., Gagne, C., Laabir, M., Vaquer, A., Cecchi, P., Souchu, P., 2004. Nitrogenous Nutrition of *Alexandrium Catenella* (dinophyceae) in Cultures and in Thau Lagoon, Southern France. *J. Phycol.* 40, 96–103.

- Collos, Y., Husseini-Ratrema, J., Bec, B., Vaquer, A., Hoai, T.L., Rougier, C., Pons, V., Souchu, P., 2005. Pheopigment dynamics, zooplankton grazing rates and the autumnal ammonium peak in a Mediterranean lagoon. *Hydrobiologia* 550, 83–93.
- Collos, Y., Jauzein, C., Ratmaya, W., Souchu, P., Abadie, E., Vaguer, A., 2014. Comparing diatom and *Alexandrium catenella/tamarense* blooms in Thau lagoon: Importance of dissolved organic nitrogen in seasonally N-limited systems. *Harmful Algae* 37, 84–91.
- Conley, D.J., 1999. Biogeochemical nutrient cycles and nutrient management strategies. *Hydrobiologia* 410, 87–96.
- Cowan, J.L.W., Pennock, J.R., Boynton, W.R., 1996. Seasonal and interannual patterns of sediment-water nutrient and oxygen fluxes in Mobile Bay, Alabama (USA): Regulating factors and ecological significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141, 229–245.
- Crossetti, L.O., Bicudo, C.E.D., 2005. Structural and functional phytoplankton responses to nutrient impoverishment in mesocosms placed in a shallow eutrophic reservoir (Garcas Pond), Sao Paulo, Brazil. *Hydrobiologia* 541, 71–85.
- De Jonge, V.N., de Jong, D.J., 2002. Ecological restoration in coastal areas in the Netherlands: concepts, dilemmas and some examples. *Hydrobiologia* 478, 7–28.
- De Wit, R., Rey-Valette, H., Balavoine, J., Ouisse, V., Lifran, R., 2015. Restoration ecology of coastal lagoons: new methods for the prediction of ecological trajectories and economic valuation. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* n/a–n/a.
- Domingues, R.B., Anselmo, T.P., Barbosa, A.B., Sommer, U., Galvão, H.M., 2011. Nutrient limitation of phytoplankton growth in the freshwater tidal zone of a turbid, Mediterranean estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 91, 282–297.
- Donald, K.M., Scanlan, D.J., Carr, N.G., Mann, N.H., Joint, I., 1997. Comparative phosphorus nutrition of the marine cyanobacterium *Synechococcus* WH7803 and the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Plankton Res.* 19, 1793–1813.
- Duarte, C.M., Agusti, S., Agawin, N.S.R., 2000. Response of a Mediterranean phytoplankton community to increased nutrient inputs: a mesocosm experiment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195, 61–70.
- Gallegos, C.L., 2014. Long-term variations in primary production in a eutrophic sub-estuary. I. Seasonal and spatial patterns. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 502, 53–67.
- Glover, H.E., Garside, C., Trees, C.C., 2007. Physiological responses of Sargasso Sea picoplankton to nanomolar nitrate perturbations. *J. Plankton Res.* 29, 263–274.
- Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of Marine Planktonic Diatoms: I. *Cyclotella* *Nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.

- Harpole, W.S., Ngai, J.T., Cleland, E.E., Seabloom, E.W., Borer, E.T., Bracken, M.E.S., Elser, J.J., Gruner, D.S., Hillebrand, H., Shurin, J.B., Smith, J.E., 2011. Nutrient co-limitation of primary producer communities. *Ecol. Lett.* *14*, 852–862.
- Hlaili, A.S., Chikhaoui, M.-A., El Grami, B., Mabrouk, H.H., 2006. Effects of n and p supply on phytoplankton in Bizerte Lagoon (western Mediterranean). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *333*, 79–96.
- Jeppesen, E., Sondergaard, M., Jensen, J.P., Havens, K.E., Anneville, O., Carvalho, L., Coveney, M.F., Deneke, R., Dokulil, M.T., Foy, B., Gerdeaux, D., Hampton, S.E., Hilt, S., Kangur, K., Kohler, J., Lammens, E., Lauridsen, T.L., Manca, M., Miracle, M.R., Moss, B., Noges, P., Persson, G., Phillips, G., Portielje, R., Schelske, C.L., Straile, D., Tatrai, I., Willen, E., Winder, M., 2005. Lake responses to reduced nutrient loading - an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshw. Biol.* *50*, 1747–1771.
- Jeppesen, E., Sondergaard, M., Meerhoff, M., Lauridsen, T.L., Jensen, J.P., 2007. Shallow lake restoration by nutrient loading reduction - some recent findings and challenges ahead. *Hydrobiologia* *584*, 239–252.
- Kamenir, Y., Morabito, G., 2009. Lago Maggiore oligotrophication as seen from the long-term evolution of its phytoplankton taxonomic size structure. *J. Limnol.* *68*, 146–161.
- Landry, M., Hassett, R., 1982. Estimating the Grazing Impact of Marine Micro-Zooplankton. *Mar. Biol.* *67*, 283–288.
- Landry, M.R., Brown, S.L., Campbell, L., Constantinou, J., Liu, H., 1998. Spatial patterns in phytoplankton growth and microzooplankton grazing in the Arabian Sea during monsoon forcing. *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* *45*, 2353–2368.
- Legrand, C., Graneli, E., Carlsson, P., 1998. Induced phagotrophy in the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Aquat. Microb. Ecol.* *15*, 65–75.
- Leruste, A., Hatey, A., Bec, B., De Wit, R., 2015. Selecting an HPLC method for chemotaxonomic analysis of phytoplankton community in Mediterranean coastal lagoons. *Transitional Waters Bull.* *9*, 20–41.
- Liebig, J., Gregory, W., Webster, J.W., 1842. *Animal chemistry; or, Organic chemistry in its application to physiology and pathology*. Cambridge [Mass.] J. Owen; New York, D. Appleton and company.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Miller, J.R., Schofield, O.M., Falkowski, P.G., 2006. Multi-nutrient, multi-group model of present and future oceanic phytoplankton communities. *Biogeosciences* *3*, 585–606.

- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M., Falkowski, P.G., 2007. The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecol. Lett.* *10*, 1170–1181.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Yoshiyama, K., 2009. Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2665–2670.
- Litchman, E., Pinto, P. de T., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., Yoshiyama, K., 2010. Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* *653*, 15–28.
- Margalef, R., 1978. Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Ocean. Acta* *1*, 493–509.
- Neveux, J., Lantoiné, F., 1993. Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* *40*, 1747–1765.
- Nixon, S.W., 1995. Coastal Marine Eutrophication - a Definition, Social Causes, and Future Concerns. *Ophelia* *41*, 199–219.
- Nixon, S.W., 2009. Eutrophication and the microscope. *Hydrobiologia* *629*, 5–19.
- Ouisse, V., Fiandrino, A., De Wit, R., Malet, N., 2013. Restauration des écosystèmes lagunaires : évaluation du rôle du sédiment et des herbiers à phanérogames. IFREMER LER-LR.
- Paerl, H.W., Valdes, L.M., Pinckney, J.L., Piehler, M.F., Dyble, J., Moisander, P.H., 2003. Phytoplankton Photopigments as Indicators of Estuarine and Coastal Eutrophication. *BioScience* *53*, 953–964.
- Paerl, H.W., Valdes-Weaver, L.M., Joyner, A.R., Winkelmann, V., 2007. Phytoplankton indicators of ecological change in the eutrophying Palmico sound system, North Carolina. *Ecol. Appl.* *17*, S88–S101.
- Paerl, H.W., Rossignol, K.L., Hall, N.S., Peierls, B.L., Wetz, M.S., 2010. Phytoplankton Community Indicators of Short- and Long-term Ecological Change in the Anthropogenically and Climatically Impacted Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Estuaries Coasts* *33*, 485–497.
- Pereira Coutinho, M.T., Brito, A.C., Pereira, P., Goncalves, A.S., Moita, M.T., 2012. A phytoplankton tool for water quality assessment in semi-enclosed coastal lagoons: Open vs closed regimes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *110*, 134–146.
- Phillips, G., Kelly, A., Pitt, J.A., Sanderson, R., Taylor, E., 2005. The recovery of a very shallow eutrophic lake, 20 years after the control of effluent derived phosphorus. *Freshw. Biol.* *50*, 1628–1638.
- Raven, J.A., 1998. The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Funct. Ecol.* *12*, 503–513.

- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Reynolds, C.S., Lund, J.W.G., 1988. The phytoplankton of an enriched, soft-water lake subject to intermittent hydraulic flushing (Grasmere, English Lake District). *Freshw. Biol.* 19, 379–404.
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., Melo, S., 2002. Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* 24, 417–428.
- Roy, S., Llewellyn, C.A., Egeland, E.S., 2011. *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography*. Cambridge University Press.
- Ruggiu, D., Morabito, G., Panzani, P., Pugnetti, A., 1998. Trends and relations among basic phytoplankton characteristics in the course of the long-term oligotrophication of Lake Maggiore (Italy). *Hydrobiologia* 370, 243–257.
- Serpa, D., Falcao, M., Duarte, P., da Fonseca, L.C., Vale, C., 2007. Evaluation of ammonium and phosphate release from intertidal and subtidal sediments of a shallow coastal lagoon (Ria Formosa-Portugal): A modelling approach. *Biogeochemistry* 82, 291–304.
- Sherrard, N.J., Nimmo, M., Llewellyn, C.A., 2006. Combining HPLC pigment markers and ecological similarity indices to assess phytoplankton community structure: an environmental tool for eutrophication? *Sci. Total Environ.* 361, 97–110.
- Souchu, P., Bec, B., Smith, V.H., Laugier, T., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Collos, Y., Vaquer, A., 2010. Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67, 743–753.
- Stomp, M., Huisman, J., Vörös, L., Pick, F.R., Laamanen, M., Haverkamp, T., Stal, L.J., 2007. Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol. Lett.* 10, 290–298.
- Utermöhl, H., 1931. Neue Wege in der Quantitativen Erfassung des Planktons. (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verhandlungen Int. Ver. Limnol.* 5, 567–596.
- Van Donk, E., Hessen, D.O., Verschoor, A.M., Gulati, R.D., 2008. Re-oligotrophication by phosphorus reduction and effects on seston quality in lakes. *Limnologica* 38, 189–202.
- Velasco, J., Lloret, J., Millan, A., Marin, A., Barahona, J., Abellan, P., Sanchez-Fernandez, D., 2006. Nutrient and particulate inputs into the Mar Menor lagoon (Se Spain) from an intensive agricultural watershed. *Water. Air. Soil Pollut.* 176, 37–56.
- Vörös, L., Callieri, C., Balogh, K.V., Bertoni, R., 1998. Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* 369-370, 117–125.

- Wood, J.D., Bukaveckas, P.A., 2014. Increasing Severity of Phytoplankton Nutrient Limitation Following Reductions in Point Source Inputs to the Tidal Freshwater Segment of the James River Estuary. *Estuaries Coasts* 37, 1188–1201.
- Wright, S., Jeffrey, S., Mantoura, R., Llewellyn, C., Bjornland, T., Repeta, D., Welschmeyer, N., 1991. Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Mar Ecol Progr Ser* 77, 183–196.
- Zaldivar, J.-M., Cardoso, A.C., Viaroli, P., Newton, A., de Wit, R., Ibanez, C., Reizopoulou, S., Somma, F., Razinkovas, A., Basset, A., Holmer, M., Murray, N., 2008. Eutrophication of transitional waters. *Transitional Water Monogr.* 2.
- Zhang, L.Y., Sun, J., Liu, D.Y., Yu, Z.S., 2005. Studies on growth rate and grazing mortality rate by microzooplankton of size-fractionated phytoplankton in spring and summer in the Jiaozhou Bay, China. *Acta Oceanol. Sin.* 24, 85–101.

Supplementary Materials

Table S1. Potential production coefficients due to internal stores (K_i), recycled (K_R), and external pools (K_E) estimated by mixed-effect multiple linear regressions of equation (5) according to apparent growth rates, based on chl *a* concentration from dilution experiment without N or P addition. Values obtained for total phytoplankton and decomposed for micro-, nano- and ultraphytoplankton in oligo- (AYR), meso- (IN) and hypertrophic (MW) lagoons. *n*: number of observations used to construct the model. Values of AIC_c , ΔAIC_c , and AIC_c-w describe the parsimony of the model.

Limiting nutrient	Lagoon	Fraction	$\mu_{(-N/-P)}$	K_i	K_R	K_e	n	AIC_c	ΔAIC_c	AIC_c-w
N	AYR	Total	-1.06	-0.66	0.19	0.00	7	-9.8	0.73	0.35
		Micro-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Nano-	1.48	11.1	0.00	0.00	10	82.5	0.00	0.54
		Ultra-	0.91	1.77	0.00	0.00	8	31.3	0.00	0.86
	IN	Total	0.21	0.09	0.00	0.02	10	-8.7	0.00	0.49
		Micro-	0.66	0.72	3.74	0.00	10	28.7	0.00	0.94
		Nano-	0.20	-0.51	0.00	0.08	10	1.8	0.00	0.88
		Ultra-	0.16	0.17	0.00	0.00	10	-5.5	0.00	0.78
	MW	Total	-0.01	-0.14	1.72	0.00	10	-0.8	0.00	0.74
		Micro-	-0.21	0.57	0.00	0.00	10	36.1	0.00	0.57
		Nano-	0.85	0.93	0.00	0.00	9	39.5	0.00	0.84
		Ultra-	0.00	-0.08	1.47	0.00	9	-6.4	0.00	0.97
P	AYR	Total	0.76	1.16	0.57	0.00	10	8.1	0.00	0.41
		Micro-	1.54	-6.79	76.9	0.00	10	75.8	0.00	0.66
		Nano-	1.18	3.60	0.00	0.00	7	52.6	0.00	0.94
		Ultra-	0.13	2.16	0.00	0.00	10	42.5	0.00	0.78
	IN	Total	0.26	-0.19	0.55	0.05	10	-5.5	0.00	0.43
		Micro-	1.52	0.29	6.10	0.36	10	32.7	0.00	0.84
		Nano-	-0.08	-0.29	0.00	0.00	10	5.7	0.00	0.54
		Ultra-	0.13	0.23	0.00	0.00	10	7.6	0.00	0.76
	MW	Total	1.25	1.00	0.00	0.17	10	27.4	0.00	0.68
		Micro-	2.10	5.07	20.8	0.00	9	73.0	0.06	0.35
		Nano-	1.35	0.31	0.00	0.00	10	56.6	0.00	0.66
		Ultra-	1.13	-0.19	0.00	0.23	10	12.6	0.00	0.83

7 Discussion, conclusions et perspectives



7.1 Discussion générale

Ce travail de thèse a permis de mieux cerner les processus de re-oligotrophisation des lagunes côtières présentant des états de dégradation plus ou moins marqués. Il a également conduit à améliorer la description des adaptations des communautés phytoplanctoniques aux caractéristiques écologiques et plus particulièrement liées à l'eutrophisation des lagunes côtières. Les principaux résultats obtenus en réponse aux questions de recherche posées initialement sont résumés ci-dessous :

7.1.1 Quelles trajectoires suivent les communautés phytoplanctoniques de lagunes côtières soumises à des processus de re-oligotrophisation ?

Les résultats du **Chapitre 3** ont mis en évidence une réponse marquée des communautés phytoplanctoniques à la réduction drastique des apports nutritifs diffus. En comparaison avec d'autres écosystèmes, cette réponse a été très rapide. En effet, elle a été observée six mois seulement après la réduction des apports, alors que dans certains écosystèmes lacustres, ce type de réponse n'a été mis en évidence que 5 à 10 ans après la mise en place de moyens de gestion des apports nutritifs, voire plus (Jeppesen et al., 2005; Greening and Janicki, 2006).

La réponse à la réduction des apports s'est tout d'abord traduite par une forte diminution des biomasses dans chaque lagune, proportionnelle au niveau d'eutrophisation initial. Cette réduction a témoigné d'une diminution marquée de l'abondance des picoeucaryotes. Ces organismes possédant des taux de croissance élevés liés à un faible rapport surface/volume appliquent la stratégie r décrite par Reynolds and Lund (1998). Leurs capacités à répondre très rapidement à une modification environnementale telle qu'un pulse nutritif leur permettaient de se maintenir à de très fortes abondances avant la réduction des apports. La chute des abondances de picoeucaryotes à l'issue de la réduction des apports en phosphore d'un effluent d'eau usée est similaire à celle observée dans le lac Grasmere (Reynolds and Lund, 1988).

L'analyse de la variabilité de la composition pigmentaire des communautés phytoplanctoniques durant les huit années suivant la réduction des apports diffus a mis en évidence des trajectoires différentes selon les caractéristiques trophiques des lagunes. Les abondances de diatomées entre 3 et 6 μm aux taux de croissance très compétitifs qui dominaient les lagunes ont drastiquement diminué. Cette réduction a été particulièrement marquée dans les lagunes les plus dégradées (notamment hypereutrophes), où elles ont été remplacées par des Algues vertes également picophytoplanctoniques. En parallèle, les Dinophytes ont été identifiés de manière plus importante et récurrente dans l'ensemble des lagunes du complexe. Dans les lagunes eutrophes, ce groupe phytoplanctonique a même largement dominé les communautés

en 2012 et 2013, leur proportion de pigments oscillant entre 40 et 50 % de la concentration pigmentaire totale. Dans la lagune mésotrophe, la chute des abondances de diatomées a été moins brutale, puisque ce groupe est resté majoritaire jusqu'en 2008. Leur abondance a par la suite diminué, pour être remplacé par des Cryptophytes, des Algues vertes et des Dinophytes en proportions relativement équilibrées.

Ces modifications de la composition témoignent d'adaptations fonctionnelles à la réduction de la disponibilité nutritive. Les diatomées de petite taille possédant une forte affinité pour l'azote étaient particulièrement adaptées à dominer les lagunes eutrophisées et soumises à des apports d'eau douce et de nutriment permanents issus d'effluents (Litchman and Klausmeier, 2008; Paerl et al., 2010; Lie et al., 2011). La réduction de ces apports a initié un changement dans la forme et l'origine des nutriments soutenant la croissance phytoplanctonique. La principale source de nutriments en période estivale depuis la diversion de l'émissaire de Maera est le compartiment sédimentaire, duquel proviennent des flux d'ammonium et de phosphate générés par la reminéralisation bactérienne (De Wit et al., 2015). Ces nutriments favorisent davantage les Algues vertes que les diatomées, qui sont par ailleurs moins compétitives en terme de croissance lorsque les températures sont élevées (Litchman et al., 2010). L'augmentation des abondances de Dinophytes pourrait provenir de leur croissance saturant à de plus faibles concentrations de nutriments, leur permettant de se développer dans des milieux présentant une limitation nutritive plus importante. Cette augmentation peut également être liée à l'utilisation de capacités mixotrophiques à travers l'osmotrophie de nutriments organiques dissous, ou la phagotrophie de particules de matière organique ou de cellules. Les Dinophytes compensent ainsi leur faible compétitivité pour la matière inorganique dissoute, cet avantage leur permettant de se maintenir même dans le cas d'une limitation nutritive (Smayda, 1997). Par ailleurs, cette transition d'une dominance des communautés des diatomées aux Dinophytes lors d'un processus de re-oligotrophisation a déjà été observée, notamment dans l'estuaire la Mer intérieure de Seto (Japon). La réduction des apports en phosphore inorganique dissous (PID) a eu un impact négatif sur les diatomées, dont les abondances ont chuté. Cette réduction a en revanche favorisé les Dinophytes, capables de décomposer le phosphore organique dissous (POD) grâce à la phosphatase alcaline, leur permettant de se développer et de dominer la communauté phytoplanctonique (Yamamoto, 2003; Burk, 2005).

7.1.2 Quelle est la diversité fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques des lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés ?

Plusieurs résultats importants émergent du **Chapitre 5**. En premier lieu, la diversité fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques semble plus adaptée que la diversité taxonomique pour traduire les caractéristiques écologiques contrastées des lagunes côtières. Ce

résultat concorde avec la littérature scientifique dans laquelle de nombreux auteurs privilégient également la diversité fonctionnelle (Kruk et al., 2002; Longhi and Beisner, 2010) ou la couple avec l'étude de la diversité taxonomique (Weithoff et al., 2015). La diversité fonctionnelle paraît d'autant plus pertinente pour l'étude des communautés phytoplanctoniques des lagunes côtières qui sont dominées par des cellules de petite taille non identifiables précisément par les techniques utilisées lors de cette thèse (Bec et al., 2011).

En terme de variabilité temporelle, les résultats des **Chapitre 4 et 5** ont mis en évidence une dynamique proche pour les deux lagunes du complexe des étangs palavasiens, différente de celle de la lagune oligotrophe située dans le complexe des étangs du Narbonnais. Le fonctionnement écologique semblable de ces deux lagunes situées aux extrémités du complexe des étangs palavasiens suggère que malgré sa fragmentation, l'ensemble du complexe suit une dynamique saisonnière semblable, distincte de celle de la lagune Ayrolle. Les communautés phytoplanctoniques des deux lagunes du complexe des étangs palavasiens, exclusivement dominées par les picoeucaryotes avant la réduction des apports nutritifs (Bec et al., 2011), montrent aujourd'hui une vraie dynamique saisonnière. La présence d'un pic de biomasse printanier indique que les communautés ne sont plus impactées uniquement par des apports nutritifs diffus, mais également par des processus saisonniers tels que les apports printaniers du bassin versant. Leur fonctionnement tend donc à se rapprocher d'un fonctionnement « normal » caractérisé par des successions phytoplanctoniques (Gailhard et al., 2002).

La diversité fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques des trois lagunes, basée sur des traits relatifs à l'acquisition et l'utilisation des ressources, a mis en évidence des spécificités associées à une saisonnalité marquée. Les entités fonctionnelles (EF) décrites ont traduit le fonctionnement écologique des lagunes, par analogie avec des groupes fonctionnels associés par le passé à des milieux aux caractéristiques écologiques bien définies (Smayda and Reynolds, 2001; Reynolds et al., 2002; Palfy et al., 2013). En terme de divergence fonctionnelle, les communautés automnales ont montré une dominance d'espèces généralistes, situées au centre de l'espace fonctionnel. A l'inverse, les communautés estivales ont davantage montré une dominance d'espèces spécialistes, situées vers les extrémités de l'espace fonctionnel. Ces espèces possèdent des valeurs de traits extrêmes, tels qu'une petite taille (picoeucaryotes dominant la population estivale du phytoplancton de la lagune hypereutrophe) ou au contraire une grande taille (diatomées pennées de grande taille dans la lagune mésotrophe).

La lagune hypereutrophe s'est démarquée des autres par une forte dominance de seulement deux Entités Fonctionnelles (EFs). En automne 2013, le phytoplancton de cette lagune était faiblement diversifié, et dominé par une EF contenant des organismes microphytoplanctoniques autotrophes flagellés. Parmi eux, *Eutreptiella sp.*, indicatrice de milieux pollués par de fortes concentrations en matière organique (Bazin et al., 2014), et des

espèces de Dinophytes colonisatrices associées à des milieux peu profonds, enrichis notamment par d'importantes quantités de matière organique, et peu connectés à la mer (Reynolds et al., 2002; Padisák et al., 2003; Alves-de-Souza et al., 2008). Ces organismes témoignent de capacités mixotrophes permettant d'utiliser la matière organique stockée dans les milieux eutrophisés. Les pics de biomasse printaniers et estivaux de 2013 dans les lagunes palavasiennes ont reflété des changements de la diversité fonctionnelle des communautés. Ils ont en premier lieu été portés par des picoeucaryotes appartenant aux Algues vertes, puis dans un second temps, les picoeucaryotes colonisateurs (stratégie r ou C) ont été remplacés par des organismes possédant des taux de croissance moins importants, appliquant la stratégie K ou S (Margalef, 1978; Reynolds and Lund, 1988; Smayda and Reynolds, 2001). La lagune oligotrophe s'est principalement démarquée des autres par des phénomènes de remise en suspension sédimentaire via un brassage de la colonne d'eau produit par des rafales de vent notamment en automne. Des pics de phéophytine *a* associés à une dominance de diatomées benthiques témoignent de ce brassage (Gailhard et al., 2002).

L'année 2014 contraste avec l'année précédente, puisqu'elle témoigne d'un retour de la dominance des picoeucaryotes associée à des abondances et des biomasses très élevées, en particulier dans la lagune hypereutrophe. En période estivale, cette communauté était dominée par l'entité fonctionnelle « s » composée d'organismes de type *Chlorella*. Ces organismes ont toutes les capacités pour conquérir un milieu eutrophisé et variable et le dominer en réponse à une perturbation environnementale de type enrichissement nutritif (stratégie colonisatrice r (Reynolds and Lund, 1988), ou C (Smayda and Reynolds, 2001)). De nombreuses études ont auparavant associé ces organismes à des systèmes peu profonds, brassés, et eutrophisés (Reynolds et al., 2002), en particulier en période estivale durant laquelle les températures élevées et les flux d'ammonium sédimentaires stimulent la croissance des Algues vertes (Glibert et al., 2010). Les autres composantes de ces communautés, telles que les Dinophytes (*Gymnodinium sp.*, *Gyrodinium sp.*, *Scrippsiella*, *Heterocapsa*, *Prorocentrum micans* et *P. minium*), témoignent également d'une stratégie colonisatrice adaptée à des milieux de faible profondeur, très enrichis, et aux échanges restreints avec la mer. Ces observations soulignent l'état encore dégradé de ces écosystèmes, notamment la lagune hypereutrophe Méjean Ouest.

Les lagunes méso- et oligotrophe ont exhibé une plus grande diversité d'entités fonctionnelles, associée à une présence plus importante de diatomées, en particulier au printemps dans la lagune oligotrophe (Glibert et al., 2015). Ce groupe était principalement composé de diatomées centriques possédant des capacités à stocker les nutriments afin de se maintenir dans des écosystèmes limités en phosphore, tel que Souchu et al. (2010) l'ont suggéré pour les lagunes Ayrolle et Ingril nord. La présence de deux espèces de Dinophysis dans la lagune mésotrophe Ingril nord au printemps et automne reflète également des niveaux

d'eutrophisation moins importants (Smayda and Reynolds, 2001). Ces observations ont soulevé plusieurs questions quant à la limitation nutritive des communautés phytoplanctoniques de ces trois lagunes, développées lors du **Chapitre 6**.

Les niveaux élevés de biomasse en 2014 confirment la tendance à l'augmentation mise en évidence depuis 2012 (Chapitre 3). Plusieurs hypothèses peuvent alors être envisagées pour expliquer cette nouvelle tendance :

- Si la réduction des apports initiée en décembre 2005 est assimilée à une perturbation environnementale, la hausse de biomasse phytoplanctonique traduirait-elle un mécanisme de résilience vis-à-vis de cette perturbation (Elliott et al., 2007) ?

Les niveaux de biomasse mesurés à l'issue de trois ans d'augmentation (2012-2014) encore très éloignés de ceux enregistrés avant la réduction des apports suggèrent qu'excepté du fait d'une nouvelle pollution (par exemple due à un nouvel apport massif de nutriments), les lagunes ne reviendront probablement pas à de tels niveaux de dégradation. Ces écosystèmes auraient-ils donc atteint un état intermédiaire, entre les niveaux de dégradation des années 2000-2005, et l'état de référence vers lequel ils devraient tendre à l'issue du processus de restauration écologique (figure 20) ? Certains écosystèmes lacustres ont témoigné d'une résistance à la restauration écologique due à des mesures insuffisantes pour initier une réponse de ces écosystèmes (Phillips et al., 2005). Dans notre cas, les lagunes n'ont pas montré de résistance à la restauration initiée par réduction des apports, puisqu'elles ont répondu par une très forte réduction de biomasse et une nette amélioration de leur fonctionnement. Néanmoins, cette hypothèse d'état intermédiaire signifierait que la résilience du système à l'issue d'une perturbation telle que la re-oligotrophisation n'a pas permis d'atteindre l'*état désiré* (vers lequel on souhaiterait voir tendre l'écosystème en terme de fonctionnement, et de services écosystémiques apportés aux différents utilisateurs du milieu), soulignant une hystérésis de type II. Ces observations impliquent que les moyens mis en place pour parvenir à la restauration écologique des lagunes du complexe des étangs palavasiens n'ont pas été suffisants pour permettre leur retour à un bon état écologique (Elliott et al., 2007). L'état de biomasse faible atteint dans les années 2010 pourrait n'avoir été qu'un état alternatif instable, tendant vers un état stable encore fortement dégradé vers lequel les lagunes se sont orientées en 2012-2014. Cette instabilité aurait donc induit un retour vers un état d'équilibre intermédiaire à l'état de dégradation initial et celui vers lequel on souhaiterait voir tendre les lagunes restaurées (figure 20) (Scheffer and Carpenter, 2003). Des processus similaires ont auparavant été mis en évidence dans des systèmes lacustres eutrophisés soumis à une réduction des apports nutritifs. Les biomasses phytoplanctoniques ont en effet montré une augmentation de manière transitoire, traduisant une instabilité entre deux états, dits clairs et turbides. On peut donc supposer que les lagunes palavasiennes suivent la même trajectoire, et alterneront entre des états plus clairs et

plus turbides, jusqu'à une autre mesure de restauration qui permettra un shift permanent vers un état clair (Scheffer et al., 1993; Jeppesen et al., 2007).

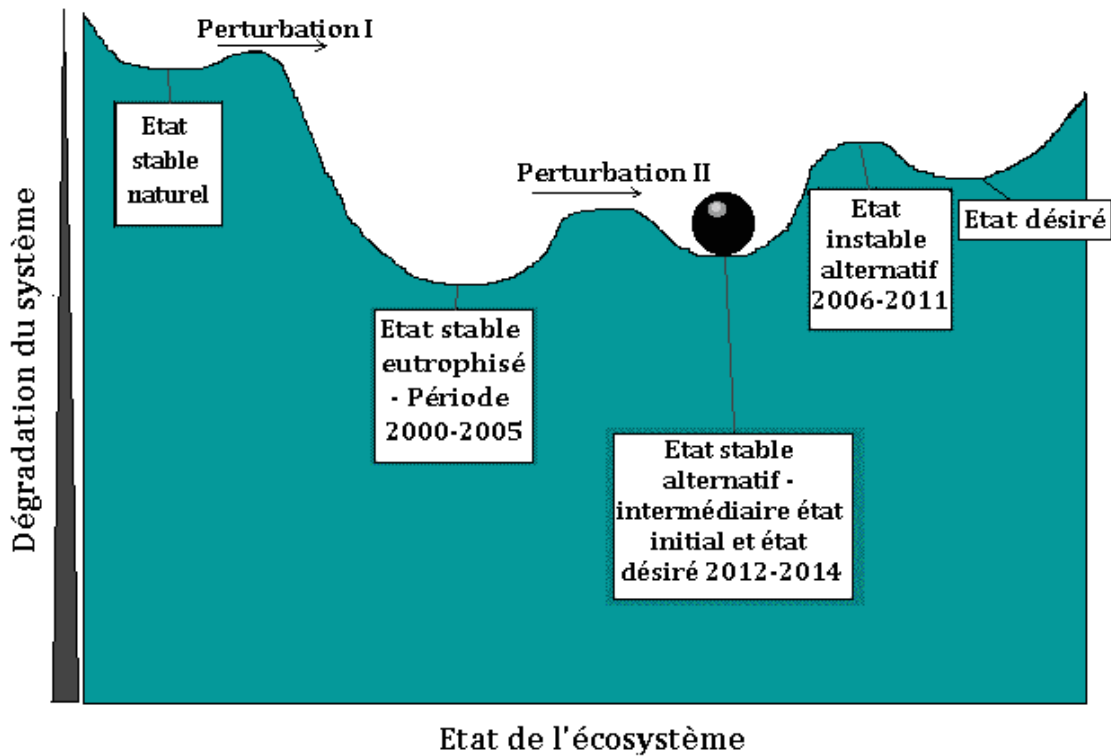


Figure 20. Evolution de l'état des lagunes palavasiennes au cours des processus d'eutrophisation (représenté par la perturbation I) et de restauration (représentée ici par la perturbation II), selon Scheffer and Carpenter (2003).

- L'augmentation des biomasses estivales observée depuis 2012 serait-elle liée à des conditions climatiques ayant favorisé la croissance des communautés phytoplanctoniques ? En premier lieu, les températures moyennes des mois de juin à septembre de ces trois dernières années ont globalement été supérieures de plus d'1,5°C aux normales de saisons de 1961 à 1990 ("Comparaison climatologique annuelle - site Infoclimat"). La hausse des températures affecte les propriétés physiques de l'eau et les processus physico-chimiques intervenant dans les sédiments. Ces températures plus élevées ont accru les flux nutritifs d'origine benthique, stimulant la croissance phytoplanctonique (Jeppesen et al., 2009), en particulier des picoeucaryotes appartenant à la lignée verte (Glibert et al., 2010; Litchman et al., 2010). Les années 2009-2012 ont également coïncidé avec une augmentation des épisodes orageux intenses, ayant augmenté les cumuls de précipitation. Entre juin et septembre 2012, les cumuls de précipitation atteignent +51,2 % par rapport aux moyennes de saison 1961-1990, alors qu'ils étaient inférieurs aux moyennes de saison en 2009, 2010 et 2011 (de -67, -50,5 et -15,7 % respectivement). L'année 2013 montre une diminution des précipitations estivales (-30,7 %), puis l'année 2014 témoigne d'une recrudescence des

précipitations de +109,5 % pendant cette période. Les apports d'eau douce et de nutriments par le lessivage du bassin versant pourraient également avoir favorisé la croissance d'organismes phytoplanctoniques euryhalins tels que les Algues vertes (Bonilla et al., 2005; Coelho et al., 2007; Cartaxana et al., 2009), au détriment d'espèces plus sensibles à la variabilité de salinité et aux turbulences. Si des épisodes climatiques caractérisés par des températures et une pluviométrie supérieures aux moyennes de saison sont en lien avec ces hausses de biomasse, il y a donc un réel intérêt à porter une attention particulière à l'évolution des conditions météorologiques à une échelle temporelle plus importante dans le contexte des changements climatiques globaux. Ces changements pourraient en effet être à l'origine de cette hausse de biomasse estivale. Ils pourraient alors expliquer l'hystérésis observée dans les lagunes. Leur impact sur les flux nutritifs provenant des sédiments devraient également être pris en considération dans l'étude des trajectoires d'évolution des lagunes côtières soumises à des processus de restauration (Landkildehus et al., 2014; Vaquer-Sunyer et al., 2015).

7.1.3 Quelle est la réactivité des communautés phytoplanctoniques de lagunes côtières en re-oligotrophisation à un enrichissement nutritif ponctuel ?

Dans le contexte de la restauration écologique, les communautés phytoplanctoniques des lagunes ont montré une modification de leur composition pour s'adapter au nouvel état d'eutrophisation et à la modification de la limitation nutritive (Chapitre 3). Ces changements de composition traduisent également la mise en place de stratégies d'exploitation et d'utilisation des ressources adaptées aux nouvelles conditions trophiques de leur milieu. Leur réactivité à un pulse nutritif a illustré le degré de limitation auquel elles font face, et leur degré d'adaptation à la re-oligotrophisation. Cette information permet également de mieux prédire les trajectoires et la durée des processus de restauration écologique (Wood and Bukaveckas, 2014).

Dans cette optique, l'expérience d'enrichissement *in situ* menée au cours de l'été 2014, et qui a fait l'objet du **Chapitre 6**, a mis en évidence plusieurs points. En premier lieu, les communautés phytoplanctoniques des deux lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastés et soumises à un processus de re-oligotrophisation depuis 2006 ont répondu rapidement à un enrichissement nutritif. Cette réponse s'est traduite par une production de biomasse relativement importante au cours des 24 h d'incubation. La communauté phytoplanctonique de la lagune hypereutrophe a en outre montré une limitation nutritive avant la fin de l'incubation, malgré la forte concentration en nutriments ajoutée (20 μM de NH_4 , 0,8 μM de PO_4). Par comparaison, la même expérimentation d'enrichissement menée dans une lagune oligotrophe et peu soumise à des pressions anthropiques depuis les années 2000 (Ayrolle) a induit une faible réponse du phytoplancton (< à 12 % d'augmentation du taux de croissance). Dans cette lagune très peu enrichie, les herbiers sont abondants et constituent le principal producteur primaire

(Rapports RSL). Dans des conditions de faible disponibilité nutritive, les Phanérogames ont montré une forte compétitivité pour l'acquisition des nutriments, au détriment du compartiment phytoplanctonique, suggérant que le phytoplancton n'a globalement pas un accès important aux nutriments externes ou recyclés dans cette lagune (de Wit et al., 2012). La faible réponse de cette communauté phytoplanctonique en terme de croissance traduit soit (i) une faible utilisation des nutriments externes, au profit de nutriments issus du stockage interne, (ii) un stockage des nutriments apportés plutôt qu'une production de biomasse (Litchman et al., 2009; Domingues et al., 2011). La réponse des lagunes palavasiennes à l'enrichissement reflète une vulnérabilité très importante de ces lagunes, beaucoup plus marquée que pour la lagune oligotrophe. En effet, le fonctionnement des lagunes palavasiennes pourrait être rapidement altéré (Elliott et al., 2007) par le biais d'une forte production de biomasse phytoplanctonique et une modification de la composition des communautés au profit des organismes les plus compétitifs (De Wit, 2011). Les différents groupes taxonomiques et fonctionnels composant les communautés ont répondu plus ou moins fortement à l'enrichissement. Globalement, les plus petites classes de taille ont davantage profité de l'enrichissement que les cellules plus larges. Dans les lagunes du complexe des étangs palavasiens, l'ultraphytoplancton principalement constitué de picoeucaryotes a dominé et profité principalement de l'enrichissement, tandis que dans la lagune oligotrophe, ce sont les picocyanobactéries riches en phycocyanine qui ont été avantagées. Cette réponse reflète la forte compétitivité des picoeucaryotes et des cyanobactéries face à un pulse nutritif (Caroppo, 2000; Bec et al., 2005).

7.1.4 Quelles sont les stratégies d'exploitation des ressources des communautés phytoplanctoniques en réponse à la limitation nutritive, accrue lors des processus de re-oligotrophisation ?

L'expérience d'enrichissement *in situ* a également mis en évidence une limitation nutritive marquée dans les trois lagunes durant la période estivale. A court terme, la communauté phytoplanctonique de la lagune hypereutrophe a montré une forte limitation en azote. Cette limitation a été provoquée par une consommation rapide des nutriments par les picoeucaryotes présents en grande abondance (De Wit et al., 2015). La forte concentration en phosphates dans l'eau confirme l'importance des flux benthiques de nutriments, puisque malgré sa forte consommation, le phosphate n'est pas limitant. En revanche, les flux benthiques sont malgré tout insuffisants en ammonium pour soutenir la croissance picoeucaryotique. Les communautés phytoplanctoniques des lagunes méso- et oligotrophe ont quant à elles été co-limitées en azote et en phosphore. Ces résultats concordent avec l'étude de Souchu et al. (2010) qui avait montré que l'augmentation de l'eutrophisation des lagunes conduit à une intensification de la limitation par l'azote, tandis que les lagunes moins eutrophisées sont davantage limitées en phosphore.

Pour répondre à cette limitation, les divers groupes phytoplanctoniques composant ces communautés ont utilisé différentes stratégies. Les picoeucaryotes dominants la communauté de la lagune hypereutrophe ont été les seuls à profiter des apports en azote recyclé. Cette observation reflète une fois de plus leur forte compétitivité pour acquérir les nutriments par rapport aux autres classes de tailles, qui ont uniquement utilisées leurs ressources internes en azote. Dans la lagune mésotrophe, le microphytoplancton semble avoir davantage profité des ressources nutritives recyclées, à l'inverse de l'ultraphytoplancton qui a principalement utilisé des ressources internes, de la même façon que dans la lagune oligotrophe. Ces deux lagunes ont abrité une plus forte proportion de diatomées, dont *Chaetoceros sp.*, qui a également exhibé des capacités de croissance estivales importantes et parfois supérieures à l'ultraphytoplancton (Zhang et al., 2005). De plus, les picocyanobactéries composant principalement la classe de taille <5 µm dans la lagune oligotrophe ont déjà témoigné de l'utilisation de ressources internes dans des milieux peu favorables (Glover et al., 2007).

7.2 Conclusion générale

La restauration écologique est définie par la Société pour la restauration écologique (SER, www.ser.org) comme « le processus d'assister la régénération d'un écosystème qui a été endommagé, dégradé, ou détruit » (SER, 2004). D'après les résultats du Chapitre 3, la re-oligotrophisation du complexe des lagunes palavasiennes a donc initié leur restauration écologique, puisqu'elle a permis de réduire leur dégradation et d'améliorer significativement leur fonctionnement. Globalement, ce travail de thèse a permis d'apporter des connaissances sur les **processus intervenant lors de la restauration écologique de lagunes côtières très dégradées**, par le biais de l'étude du compartiment phytoplanctonique. Les trajectoires d'évolution des communautés phytoplanctoniques lors de ces processus sont résumées au travers d'un schéma bilan (Figure 21).

En premier lieu les communautés phytoplanctoniques d'une **lagune hypereutrophe**, présentant un apport continu d'eau douce chargée en nutriments via les effluents d'une station de traitement des eaux usées, étaient **principalement dominées par des eucaryotes de taille réduite** (2-6 µm) (Bec et al., 2011). Ces organismes de petite taille étaient principalement représentés par des diatomées, particulièrement compétitives, associées à des Algues vertes de type *Chlorella*. Ces deux groupes phytoplanctoniques ont un mode de vie colonisateur, caractérisé par une réponse rapide à une perturbation environnementale telle qu'un enrichissement nutritif (Stratégie C) (Smayda and Reynolds, 2001) (Figure 21).

Un processus de re-oligotrophisation initié via une réduction drastique des apports en N et P inorganiques a entraîné une réponse rapide des lagunes, illustrée par une **chute de la biomasse**, plus forte dans celles qui étaient initialement les plus dégradées. Cette réduction a

été tempérée ces trois dernières années par une tendance à l'augmentation de la biomasse, bien qu'elle soit encore très faible par rapport aux seuils atteints avant la mise en place de la ré-oligotrophisation (Figure 21). La chute des biomasses s'est **accompagnée d'une réduction des abondances de picoeucaryotes**, en particulier des diatomées. Ce groupe phytoplanctonique s'est avéré moins adapté à l'utilisation des flux benthiques issus de la reminéralisation bactérienne, représentant la nouvelle source principale de nutriments pendant la période estivale. L'ammonium, associé aux fortes températures estivales a stimulé la croissance des **Algues vertes picoeucaryotiques** de type Chlorelle, qui ont par la suite dominé la communauté phytoplanctonique. Cette étape est illustrée par la communauté de la lagune hypereutrophe Méjean ouest (MW) (Figure 21). Cette lagune hypereutrophe présente encore un état très dégradé 9 ans après la réduction des apports diffus, reflété par une forte limitation en azote et par des flux benthiques de nutriments provenant de la reminéralisation de stocks de matière organique importants. Lors d'un pulse nutritif, les picoeucaryotes profitent majoritairement, et sont les principaux à exploiter les ressources en azote recyclés.

La ré-oligotrophisation a également initié le retour d'une **saisonnalité des communautés** liée à des apports nutritifs variables au cours du temps. Cette saisonnalité de la biomasse s'est illustrée par **l'apparition de groupes phytoplanctoniques appliquant des stratégies de vie tolérant le stress nutritif** (stratégie S), grâce à des taux de croissance plus lents, saturants à des concentrations nutritives plus faibles, ou capables de stocker les nutriments. Parmi ces organismes, les **Dinophytes** ont augmenté leur fréquence d'apparition et leur abondance (Figure 21). Leur présence pourrait être liée à l'utilisation de voies trophiques alternatives à l'autotrophie, via la **mixotrophie** (Reynolds, 2006). Dans un milieu possédant de fortes quantités de matière organique, les organismes phagotrophes pourraient se maintenir malgré une plus faible compétitivité pour les nutriments inorganiques dissous, grâce à l'ingestion de particules ou l'osmotrophie de nutriments organiques dissous. L'hétérotrophie par le biais de la prédation pourrait également profiter aux Dinophytes dans un milieu dégradé siège d'une forte productivité primaire (Stoecker, 1999). Ces organismes ont notamment montré une dominance de la biomasse phytoplanctonique à la fin des efflorescences printanières et estivales au cours de l'année 2013 (Figure 21).

La caractérisation des communautés phytoplanctoniques d'une lagune mésotrophe (IN) a permis de visualiser l'état vers lequel devraient tendre les communautés phytoplanctoniques de lagunes dégradées si la restauration écologique se poursuit (Figure 21). Dans une lagune mésotrophe, possédant des stocks de nutriments organiques moins importants, les communautés phytoplanctoniques se sont définies par une **biomasse modérée, et une diversité taxonomique et fonctionnelle plus marquée** que dans la lagune hypereutrophe. Le picophytoplancton n'est pas aussi majoritaire, et on observe des successions de diverses classes

de tailles et divers groupes phytoplanctoniques en fonction des saisons et des apports nutritifs. Les **diatomées** participent plus fortement à la composition des communautés printanières, et sont remplacées en début d'efflorescence estivale par des picoeucaryotes appartenant aux Algues vertes (Glibert et al., 2010). Les Algues vertes sont ensuite elles-mêmes remplacées par les Dinophytes en fin d'efflorescence (Figure 21). Les **Cryptophytes** présentent des biomasses plus importantes, et on voit également apparaître des **Picocyanobactéries riches en phycoérythrine** et des **Haptophytes**, particulièrement adaptés aux milieux peu turbides et peu eutrophisés.

La caractérisation des communautés phytoplanctoniques d'une lagune oligotrophe (AYR) a permis d'illustrer le fonctionnement d'une lagune peu anthropisée et eutrophisée, vers lequel les lagunes dégradées devraient tendre à l'issue de la restauration écologique (Figure 21). Les communautés phytoplanctoniques de la lagune oligotrophe se sont illustrées par de **très faibles biomasses**. Elles étaient **dominées par l'ultraphytoplancton**, principalement représenté par des picoeucaryotes très compétitifs pour l'acquisition des nutriments en milieu limitant (Bec et al., 2005). Cette communauté a également présenté de faibles abondances de picocyanobactéries riches en phycoérythrine. Lors de périodes climatiques plus instables, une dominance transitoire des picocyanobactéries riches en phycocyanine associée à des diatomées benthiques a été mise en évidence. Ces organismes témoignent d'un brassage significatif des eaux et des sédiments rendant la colonne d'eau turbide, notamment en automne (Vörös et al., 1998). Dans cette lagune, une dominance occasionnelle des diatomées et des Dinophytes a été observée. La présence de ces organismes est certainement favorisée par leurs adaptations aux conditions nutritives défavorables. Les diatomées centriques de grande taille peuvent en effet s'affranchir de la limitation nutritive par le biais de **stockage de nutriments** dans leurs vacuoles, et les Dinophytes via l'utilisation de la **mixotrophie** et d'un taux de croissance plus lent. Dans cette lagune, les organismes phytoplanctoniques ne sont sans doute pas les principaux producteurs primaires. Les **herbiers à Phanérogames** composés de *Zostera noltei* couvrant plus de 80% de la surface d'Ayrolle (De Wit et al., 2015), jouent certainement ce rôle. Ces organismes possèdent en effet des capacités d'acquisition des nutriments très compétitives en milieu oligotrophe. Elles leur permettent d'exploiter les nutriments inorganiques dissous au détriment du phytoplancton qui va privilégier l'utilisation de ressources internes (de Wit et al., 2012).

Ces trois lagunes témoignent des successions de producteurs primaires intervenant le long d'un gradient d'eutrophisation (ou de re-oligotrophisation). Aujourd'hui, 9 ans après la réduction drastique des apports nutritifs aux lagunes, des Macroalgues sont réapparues transitoirement dans la lagune hypereutrophe Méjean (*Ulva spp.*, *Chaetomorpha spp.*). La lagune Ingril nord a également vu augmenter sa surface colonisée par les Macrophytes (De Wit et al.,

2015). Ces organismes autotrophes entrent en compétition avec le phytoplancton, modifiant la disponibilité nutritive. On observe une tendance inverse à celle proposée par Schramm (1999) et Bricker et al. (2008) pour expliquer les successions de producteurs primaires au cours du processus d'eutrophisation. Les organismes pélagiques régressent en termes de biomasse et d'abondance, laissant une place croissante aux organismes benthiques qui peuvent exploiter la lumière incidente accrue grâce à la réduction de la turbidité, et les stocks benthiques de nutriments (Schramm, 1999; Bricker et al., 2008). Ces observations soulignent l'importance d'intégrer les Macrophytes dans l'étude des trajectoires d'évolution des communautés autotrophes des lagunes côtières soumises à des processus de restauration écologique (voir perspectives de recherches § 7.3.2.3) (Newton et al., 2014).

En terme de restauration écologique, les Chapitres 3, 4, et 5 ont montré une tendance à l'aggravation de l'eutrophisation dans les étangs palavasiens de 2012 à 2014, illustrée par une augmentation de la biomasse et par l'importance de groupes phytoplanctoniques adaptés à des systèmes dégradés et riches en matière organique (Smayda and Reynolds, 2001; Reynolds et al., 2002). Ces assemblages témoignent de stocks sédimentaires toujours importants, produisant des flux benthiques suffisamment forts pour soutenir une forte production primaire estivale (Cowan et al., 1996; Gallegos and Jordan, 1997), et favorisant également les espèces pouvant consommer la matière organique par des modes de nutrition alternatifs. La gravité de ce retour vers un état dégradé n'est pas identique pour toutes les lagunes. Les lagunes les moins dégradées à l'origine telles qu'Ingril nord, montrent malgré tout une stabilité de leur niveau d'eutrophisation, et une co-limitation en azote et phosphore témoignant d'une dynamique d'oligotrophisation. Néanmoins, les communautés de cette lagune ont fortement réagi à un enrichissement nutritif, ce qui suggère une vulnérabilité toujours importante vis-à-vis de l'eutrophisation.

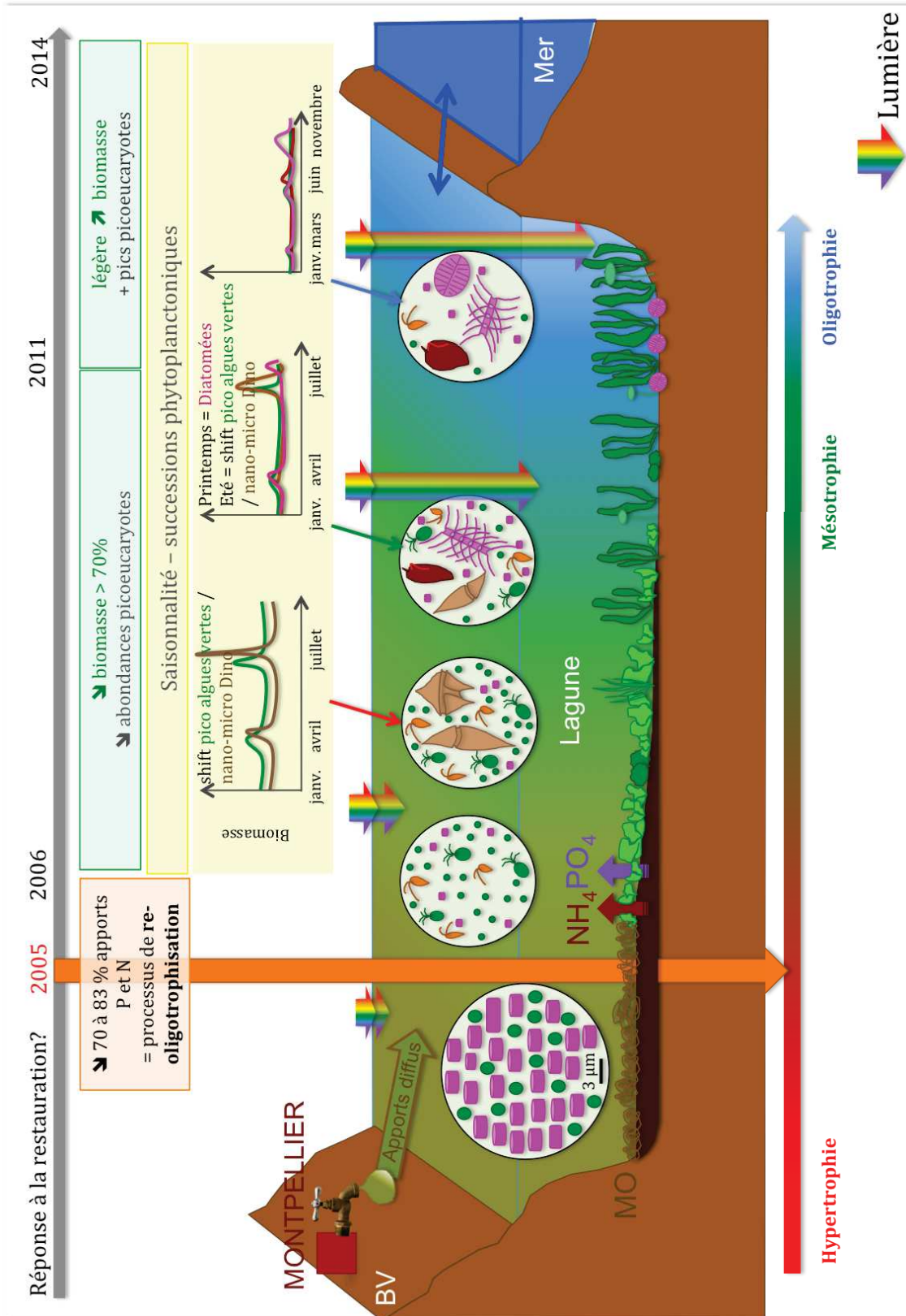


Figure 21. Schéma bilan – Impact de la réduction des apports nutritifs diffus sur les trajectoires des communautés phytoplanctoniques d’une lagune très dégradée. Analogie entre cette trajectoire et la composition des communautés de trois lagunes aux niveaux d’eutrophisation contrastés.

7.3 Perspectives

7.3.1 La restauration écologique des lagunes – Quelle évolution ?

A partir de l'ensemble des résultats obtenus pendant la thèse, nous avons pu évaluer l'efficacité des moyens mis en place pour améliorer la qualité et le fonctionnement des lagunes, et statuer sur les efforts supplémentaires à entreprendre pour poursuivre cette dynamique. Les actions ayant visé à réduire les apports de matière organique par le biais d'une réduction des apports en nutriments correspondent à un processus de re-oligotrophisation (Nixon, 2009).

Si l'on se base sur les études des processus de re-oligotrophisation de systèmes fermés ou semi-fermés (lacs, lagunes) (Yamamoto, 2003; Jeppesen et al., 2005; Phillips et al., 2005), ainsi que sur la hausse de biomasse observée dans les étangs palavasiens depuis 2012, leur restauration écologique n'est probablement pas atteignable dans les conditions actuelles, ou bien n'atteindra pas son terme avant une très longue période. La hausse de biomasse suggère qu'un palier aurait été atteint à l'issue de la réduction des apports. Cette observation implique la nécessité de prendre des mesures de restauration supplémentaires pour améliorer davantage la qualité et le fonctionnement des lagunes et dépasser ce palier (Jeppesen et al., 2007; De Wit et al., 2015). Sans cela, le bon état écologique ne sera pas atteignable, notamment pour les lagunes les plus eutrophisées telles que Méjean. Ces écosystèmes pourraient rester dans un état alternatif turbide similaire à ceux mis en évidence dans d'autres écosystèmes fermés soumis à une restauration écologique (Jeppesen et al., 2007). Plus encore, pour cette lagune, l'éventualité de parvenir à un fonctionnement proche de celui d'Ayrolle choisie comme lagune de référence vers lequel pourraient tendre les lagunes palavasiennes à l'issue de la restauration écologique paraît utopique sans effort supplémentaire. Le choix d'un *état atteignable* (de Wit, 2011) pourrait être appliqué dans ce cas-là, puisque l'état de référence a peu de chance d'être approché sans mesure complémentaire. L'incapacité à tendre vers l'état désiré, et la stagnation à un état encore éloigné de l'état atteignable pourraient s'expliquer par une production primaire soutenue par des stocks benthiques de nutriments toujours significatifs. Elles pourraient également provenir d'une vulnérabilité des lagunes face aux changements climatiques globaux. En effet, l'augmentation des températures et des épisodes climatiques extrêmes pourraient avoir favorisé la productivité primaire phytoplanctonique et macrophytique (de Wit, 2011).

Aujourd'hui, la problématique de la restauration écologique des lagunes palavasiennes nécessite de redéfinir l'objectif que l'on cherche à atteindre dans le cadre de cette restauration. L'objectif du bon état écologique des eaux douces et superficielles d'ici 2027 imposé par la Directive Cadre sur l'Eau n'a pas été atteint pour l'instant, et est encore entouré d'une forte incertitude quant à la durée et les moyens nécessaires ("DCE," 2000; Derolez et al., 2015). La définition de l'état désiré vers lequel on souhaite voir tendre les lagunes palavasiennes nécessite

une approche concertée entre écologues, économistes, juristes, sociologues, gestionnaires, utilisateurs, pour tenir compte des multiples usages des systèmes lagunaires. Cette démarche intègre un enjeu supplémentaire à la restauration écologique des lagunes vers un bon état : l'usage durable des écosystèmes restaurés, aussi relayé par la DCE. Par ailleurs, cette approche aurait également l'intérêt de sensibiliser tous les usagers des lagunes à la nécessité du maintien de leur bon état écologique. Elle permettrait également d'impliquer les populations locales dans la prise de décision concernant la politique de gestion de ces écosystèmes. Les lagunes sont généralement entourées de zones densément peuplées, et les bonnes pratiques de ces populations en matière de gestion de leurs déchets (ou de l'utilisation de produits phytosanitaires par exemple) peuvent avoir un poids non négligeable sur leur restauration écologique ("Les actes des rencontres LAGUN'R - Rencontres scientifiques autour de l'étang de Berre", 2013; Newton et al., 2014).

Les lagunes sont des écosystèmes très productifs procurant une grande variété de services tels que l'aquaculture, la production de poissons via des nourriceries pour les juvéniles et les espèces migratrices, la nidification des oiseaux, la protection contre les tempêtes, le tourisme, *etc.* Ces services sont d'une grande importance écologique mais aussi économique pour notre société (Anthony et al., 2009; Newton et al., 2014). L'exploitation des lagunes est donc très diverse, et suscite des conflits concernant les attentes des utilisateurs par rapport au fonctionnement lagunaire à l'issue de la restauration écologique. Celles-ci sont très différentes en fonction des corps de métier, et impliquent donc des visions contrastées quand à l'état désiré pour les lagunes du complexe des étangs palavasiens.

Les conchyliculteurs et les pêcheurs, qui représentent les activités économiques principales des lagunes, désirent un écosystème productif permettant une croissance rapide des poissons et des coquillages. Cette attente implique donc une biomasse phytoplanctonique suffisante pour alimenter les niveaux trophiques supérieurs. Dans d'autres lagunes méditerranéennes, la restauration écologique a déjà permis de réduire les épisodes anoxiques liés aux crises dystrophiques qui avaient majoritairement lieu en période estivale (Lardicci et al., 2001) et particulièrement dans la lagune de Thau (Derolez, 2015). A ce titre, elle apporte une amélioration significative des conditions de production aquacole et ichtyologique en réduisant les risques de mortalité liés à l'anoxie. En terme d'impact sur le réseau trophique, la restauration écologique a induit un changement dans la structure et la composition des communautés phytoplanctoniques. Cette modification a des répercussions sur l'ensemble du réseau trophique, puisque tous les organismes phytoplanctoniques n'ont pas la même qualité nutritionnelle (Cloern and Dufford, 2005). L'augmentation de la taille des cellules pourrait être bénéfique pour les organismes filtreurs dont les capacités de filtration pouvaient être limitées par la taille réduite des cellules phytoplanctoniques (Caroppo, 2000). Cependant, le remplacement des

diatomées par des Dinophytes observé dans nos lagunes, également induit par la réduction des apports en PID dans la Mer intérieure de Seto (Japon) a eu un impact plutôt négatif sur le réseau trophique, et donc sur les organismes consommant le phytoplancton tels que les huîtres et les poissons. Le taux de croissance plus lent des Dinophytes a réduit les transferts entre le phytoplancton et les niveaux trophiques supérieurs, induisant une réduction de la production huître et un déclin des prises de pêches (Yamamoto, 2003). La restauration écologique des lacs a quand à elle induit une réduction des prises de poissons (Jeppesen et al., 2005). Elle a également occasionné un changement de leur composition, traduite par une réduction des abondances de poissons plancti-benthivores, une augmentation des poissons herbivores consommant les Macrophytes, et des poissons prédateurs (Jeppesen et al., 2007). La restauration écologique pourrait donc engendrer une modification des pratiques de pêche (modification des espèces) et conchylicoles (augmentation potentielle de la durée de production), associée à une mortalité réduite. Cependant, aucune différence entre la diversité et la densité de poisson de trois lagunes aux niveaux d'eutrophisation contrastées, dont deux appartenant au complexe des étangs palavasiens (Ingril et Prévost), n'a été mise en évidence en 2011 (Brehmer et al., 2011). Ce résultat suggère que ces modifications pourraient ne pas avoir lieu avant d'atteindre un niveau de restauration écologique très avancé.

Les usagers, dans le cadre du tourisme et des activités récréatives (baignade), désirent une eau de bonne qualité, une absence de nuisances olfactives, la présence d'espèces emblématiques telles que les Flamants rose. La restauration écologique devrait permettre de réduire les nuisances olfactives causées par la dégradation de la matière organique en condition anoxique, notamment grâce à la réduction des malaïgues (Souchu et al., 1998). La restauration pourrait également représenter un intérêt majeur pour le tourisme, en améliorant la perception des populations vis-à-vis de ces systèmes parfois négligés en raison de leur mauvaise réputation (systèmes pollués, mauvaises odeurs, moustiques). A ce titre, la restauration accroîtrait la valeur économique des lagunes, à travers notamment leur valeur patrimoniale (De Wit et al., 2015). Cependant, la restauration pourrait également avoir un effet indésirable sur le tourisme. La réapparition d'une végétation benthique en réponse à la réduction de la turbidité de l'eau pourrait représenter une modification environnementale défavorable aux populations de Flamants roses qui passent une partie de l'année sur les étangs palavasiens, s'alimentant d'invertébrés qui colonisent les fonds vaseux. La restauration permettant la recolonisation des fonds par les Macrophytes pourrait donc entraîner une migration de cette espèce dont l'accès aux fonds vaseux sera réduite, vers des milieux plus favorables. Cette disparition serait toutefois compensée par l'apparition ou l'amplification de la présence d'autres organismes d'intérêt écologique ou possédant un attrait touristique plus adapté à la présence de Macrophytes. Parmi eux, les hippocampes pourraient représenter un intérêt touristique, de même que l'avifaune

consommant des poissons herbivores (De Wit et al., 2015). D'un autre point de vue, les personnes pratiquant la plaisance ou les sports de glisse (planche à voile, *Kitesurf*) désirent des écosystèmes peu densément peuplés par les Macrophytes gênant le déplacement en bateau. Or ces communautés devraient être favorisées par la restauration écologique, et augmenter leur surface de colonisation, induisant une réduction de la fréquentation des lagunes par les personnes pratiquant ce type d'activité. Pour mettre en place des moyens supplémentaires de restauration, il est donc nécessaire de cibler l'état désiré vers lequel l'ensemble des usagers souhaite voir tendre les lagunes. Tous les paramètres évoqués ci-dessus nécessitent d'être pris en compte, à travers une démarche participative telle que la concertation.

La restauration écologique des lagunes a déjà demandé un investissement très important (De Wit et al., 2015), et nécessitera des coûts supplémentaires liés soit à l'application d'actions ciblées, soit à la gestion à long terme de ces milieux. Ces problématiques posent une deuxième question inhérente à l'application de projets de restauration écologique d'un écosystème soumis à une exploitation intense et diverse, et procurant de nombreux biens et services utiles au bien-être des populations : Est ce que les avantages apportés par la restauration écologique l'emporteront sur les coûts investis dans cette optique, et à quel terme les compenseront-ils (Alexander and McInness, 2012) ?

Cette question soulève un besoin de connaître précisément la valeur des services écosystémiques fournis par les lagunes, et le gain qu'apporterait la restauration écologique à la valeur globale des écosystèmes. Le choix des techniques de restauration passives ou actives à mettre en place sur les lagunes palavasiennes doit donc intégrer :

- une évaluation des services écosystémiques qu'elles fournissent (Aronson et al., 2013; Salles, 2010), cette étape nécessitant une bonne connaissance du fonctionnement des lagunes notamment en terme de biodiversité (Brehmer et al., 2011) ;
- une étude sur les perceptions des populations bénéficiaires des services écosystémiques envers les lagunes afin de juger de leur importance ;
- l'impact éventuel de la restauration sur la valeur de ces services.

A ce titre, la valeur du capital naturel représentant les stocks de ressources naturelles, desquels dérivent les biens et services dont dépendent les sociétés et l'économie humaine, doit être estimée (Aronson et al., 2007). Le capital naturel regroupe (i) le capital naturel renouvelable (écosystème, êtres vivants), intégrant la biodiversité, (ii) le capital naturel non renouvelable (énergies fossiles, minéraux), (iii) le capital naturel récupérable (eau potable) (iv) le capital naturel cultivé (aquaculture, pisciculture). Selon cette définition, les services écosystémiques pourraient donc être définis en termes d'intérêts du capital naturel, qui apportent eux-mêmes des bénéfices aux populations humaines ("Les actes des rencontres LAGUN'R - Rencontres scientifiques autour de l'étang de Berre", 2013).

La compensation des coûts des mesures de restauration écologique par l'augmentation des bénéfices prodigués par les services écosystémiques pourrait également illustrer l'efficacité de ces mesures de restauration écologique. Cette approche est très complexe, et nécessite l'utilisation de nombreuses techniques pour évaluer d'une part, le fonctionnement des lagunes (Brehmer et al., 2011), d'autre part la valeur économique de la biodiversité (capital naturel) et de tous les services écosystémiques prodigués par la lagune et qui découlent de son fonctionnement (y compris les services procurant un bénéfice indirect, tels que la protection des côtes ou l'épuration de l'eau). Cette valeur économique se traduit notamment par la perception des populations et leur consentement à payer (De Wit et al., 2015). D'autre part, le bénéfice économique apporté par la restauration écologique doit aussi être quantifié. Cette analyse doit également intégrer les incertitudes liées à l'efficacité des mesures de restauration et les conflits d'intérêts des différents usagers de l'écosystème (Salles, 2010).

A titre d'exemple, plusieurs mesures de restauration active par le biais d'actions d'éco-ingénierie pourraient permettre d'améliorer le fonctionnement des lagunes du complexe des étangs palavasiens, et atteindre le bon état écologique imposé par la DCE. Dans le cas des lagunes les plus dégradées, deux techniques pourraient être appropriées pour réduire les quantités de matière organique stockées depuis la réduction des apports nutritifs. En premier lieu, les stocks benthiques de nutriments étant la principale source soutenant la production primaire, un dragage pourrait permettre d'enlever une partie des sédiments contaminés, et réduire ainsi l'eutrophisation des lagunes (Moss et al., 1996). De la même façon, l'enlèvement d'une partie des Macroalgues qui se sont développées grâce à ces stocks sédimentaires, et qui ne sont pas consommées (via le broutage ou la reminéralisation bactérienne de la matière organique), pourrait également permettre de réduire l'eutrophisation et l'occurrence de crises dystrophiques liées à leur dégradation (De Wit et al., 2015). Dans les lagunes moins dégradées présentant une colonisation partielle d'herbiers (telle qu'Ingril nord et sud), le réensemencement ou la plantation d'herbiers pourrait permettre d'accélérer leur propagation. Cette mesure permettrait d'accélérer l'amélioration de la qualité de l'eau et du fonctionnement écologique du milieu. Ces mesures ont déjà montré leur efficacité dans divers écosystèmes en cours de réhabilitation, tels que l'étang de Berre, la lagune du Prévost au sein des étangs palavasiens, ou des zones côtières (USA) (Orth et al., 2012; "Les actes des rencontres LAGUN'R - Rencontres scientifiques autour de l'étang de Berre", 2013; De Wit et al., 2015).

Ces questions sont aujourd'hui abordées par l'Observatoire Homme-Milieus littoral méditerranéen, et font l'objet d'une thèse de doctorat, débutée en 2015 par Mariam Sy, sous la direction de Rutger de Wit, intitulée « Evaluation des services écosystémiques et d'intégrité écologique des systèmes lagunaires dans un processus de restauration écologique ».

7.3.2 Perspectives de recherche

L'ensemble de ce travail de thèse et les perspectives de gestion qui en découlent introduisent de nouvelles questions qui pourraient faire l'objet de recherches futures.

7.3.2.1 *Poursuivre la compréhension des processus de restauration écologique des lagunes palavasiennes*

La restauration initiée en décembre 2005 n'a pas permis d'atteindre un bon état écologique de l'ensemble des lagunes du complexe des étangs palavasiens. Cette dynamique va donc être poursuivie, ce qui nécessite un maintien du suivi de leurs caractéristiques trophiques. Cette mesure est en effet essentielle pour évaluer mais également pour comprendre les trajectoires d'évolution des lagunes en réponse aux mesures de restauration écologique (Newton et al., 2014). Les résultats du Chapitre 4 indiquent que la période estivale est la plus propice pour illustrer l'effet du niveau d'eutrophisation sur le phytoplancton. Le suivi pourrait donc être prolongé uniquement durant l'été, en intégrant le mois de septembre qui a également témoigné de fortes biomasses phytoplanctoniques et de conditions estivales.

L'importance des flux benthiques de nutriments dans le maintien d'un état trophique dégradé a été établi pour le cas des lagunes palavasiennes présentant d'importants stocks de matière organique benthique. Dans des milieux peu profonds tels que les lagunes côtières, les processus physico-chimiques à l'interface sédiments-eau jouent un rôle prépondérant sur le fonctionnement écologique global (Cloern and Jassby, 2008). Au sein des lagunes palavasiennes, ces processus se sont illustrés par une stimulation de la production primaire phytoplanctonique en condition estivale. Dans le cadre du suivi de la restauration écologique, il serait donc judicieux de quantifier ces processus, et d'évaluer leur impact réel sur les communautés phytoplanctoniques. Ces observations pourraient être reliées à une étude approfondie des adaptations fonctionnelles du phytoplancton en terme de régime trophique en lien avec le niveau d'eutrophisation des lagunes et le processus de re-oligotrophisation (consommation des ressources en azote et phosphore organique dissous et particulaire, voir ci-dessous § 7.3.2.2).

Dans le contexte actuel, et compte-tenu des hausses de biomasse phytoplanctonique durant les étés 2012 à 2014 en parallèle à la hausse des températures et des épisodes orageux, il semble également important d'évaluer l'effet potentiel des changements climatiques globaux sur le fonctionnement des lagunes palavasiennes. Les changements climatiques ont un impact avéré sur les communautés phytoplanctoniques des milieux marins côtiers. Dans les systèmes peu profonds où la lumière n'est pas limitante, cet impact est essentiellement lié à deux principaux paramètres influençant la productivité primaire : la température et la disponibilité nutritive (Cloern and Dufford, 2005). Dans la région au sud des Cévennes, les changements climatiques globaux vont notamment se traduire par des températures moins froides en hiver, une hausse des températures et de la sécheresse estivale, associés à l'augmentation des épisodes

climatiques extrêmes (Site internet « Science et vie »). La température régulant la productivité primaire et les processus physico-chimiques responsables des flux nutritifs d'origine benthique, sa hausse entrainerait une augmentation de la productivité (et sur une plus longue période de l'année), associée à une accentuation des flux benthiques. La recrudescence des épisodes climatiques extrêmes altérerait le régime hydrologique des écosystèmes marins côtiers (Kennish et al., 2014). Cette altération se traduirait par un accroissement des apports ponctuels en eau douce et en nutriments provenant du lessivage du bassin versant, ayant également un impact sur les communautés phytoplanctoniques (Moss et al., 2011). Le suivi estival pourrait ainsi permettre de surveiller/détecter l'apparition de modifications dans le fonctionnement des lagunes liés aux changements climatiques (Cloern and Jassby, 2008; Kennish et al., 2014). Les liens de cause à effet entre la hausse des températures et des précipitations, les processus physico-chimiques internes, et la hausse de la biomasse ou la modification des communautés phytoplanctoniques pourraient également être approfondis notamment par le biais d'expérimentations en mésocosmes. Deux hypothèses peuvent alors être envisagées :

- Les changements climatiques globaux vont fragiliser la résilience et la résistance des lagunes côtières face aux perturbations environnementales, par le biais de catastrophes naturelles telles que les inondations (Kennish et al., 2014). La hausse des températures va accroître les flux sédimentaires, qui vont stimuler la production primaire (Jeppesen et al., 2007, Zilius et al., 2013). L'élévation du niveau de la mer n'ayant pas affecté le caractère confiné des lagunes, la matière organique produite va s'accumuler, accentuant les symptômes d'eutrophisation (Moss et al., 2011). Ces processus risquent donc de freiner voir inhiber la restauration écologique.
- La hausse des températures induite par les changements climatiques va accroître la reminéralisation bactérienne de la matière organique, accentuant la production primaire. Ce mécanisme va aggraver l'eutrophisation des lagunes un temps, mais les processus de restauration vont s'accélérer puisque les stocks sédimentaires vont être consommés plus rapidement. La hausse des températures va également provoquer la montée du niveau de la mer et des lagunes, accroissant les échanges avec le milieu marin. Le renouvellement plus rapide de l'eau va accélérer l'export de la matière organique hors de la lagune, accélérant leur restauration écologique.

L'évaluation des impacts des changements climatiques globaux sur le fonctionnement des lagunes permettrait une estimation plus réaliste de l'efficacité et de la durée des processus de restauration écologique en tenant compte des scénarios climatiques établis pour les prochaines décennies (Landkildehus et al., 2014).

7.3.2.2 *Perspectives de recherche concernant le phytoplancton*

L'étude des trajectoires d'évolution des communautés phytoplanctoniques lors de processus de restauration des lagunes méditerranéennes a permis de mettre en évidence des successions de groupes phytoplanctoniques possédant des caractéristiques fonctionnelles adaptées à la modification de la qualité et de la quantité des ressources nutritives disponibles. Nos observations ont notamment souligné une accentuation de la présence et de l'abondance de certains groupes tels que les Cryptophytes et les Dinophytes suite à la réduction des apports diffus en provenance des effluents de la station de traitement des eaux de l'agglomération de Montpellier. Cette réduction a modifié la forme et la quantité des nutriments disponibles pour les organismes autotrophes, accentuant la limitation en nutriments inorganiques dissous, tandis que les stocks de nutriments organiques dissous et particulaires sont restés relativement élevés.

Les Cryptophytes, les Chrysophytes et les Dinophytes possèdent des caractéristiques fonctionnelles leur permettant de se maintenir dans des conditions limitantes en nutriments inorganiques dissous. Ces caractéristiques fonctionnelles se manifestent par des capacités d'acquisition des nutriments via la consommation de ressources organiques dissoutes ou particulaires par l'osmotrophie ou la phagotrophie (Stickney *et al.*, 2000; Cloern and Dufford, 2005). L'utilisation de ces stratégies alternatives à l'autotrophie traduit généralement une réponse à la limitation pour une ressource, qu'elle soit lumineuse ou nutritive (Stoecker, 1999; Stickney *et al.*, 2000; Smalley and Coats, 2002). Elle peut intervenir lorsque la limitation est entraînée par la consommation des nutriments par des organismes plus compétitifs (Smalley and Coats, 2002). Ce peut être le cas lors de successions saisonnières, les organismes mixotrophes apparaissant transitoirement à l'issue d'un pulse nutritif lorsque les groupes phytoplanctoniques plus compétitifs ont consommé les nutriments disponibles et deviennent limités (Stickney *et al.*, 2000). L'utilisation de la mixotrophie a également été observée en réponse à une limitation de la lumière (Marshall and Laybourn-Parry, 2002; McKie-Krisberg *et al.*, 2015). Grâce à ces modes de nutrition, ces organismes ont pu entrer en compétition avec les organismes uniquement phototrophes et dominer transitoirement les écosystèmes en cours de re-oligotrophisation (Tableau 6). Leur présence peut donc refléter la modification des ressources induite par des processus de re-oligotrophisation.

A l'issue de la restauration, lorsque les stocks nutritifs sédimentaires ont été consommés, ces groupes ne sont plus forcément les plus compétitifs. Ils pourraient donc être supplantés par des groupes phytoplanctoniques plus adaptés à l'oligotrophie, tels que les picoeucaryotes possédant une forte compétitivité en milieu limitant (Bec *et al.*, 2005), ou les diatomées stockant les nutriments pour s'affranchir de la limitation nutritive (Litchman *et al.*, 2009). Néanmoins, des espèces mixotrophes tels que *Prorocentrum minimum*, *micans* et *triestinum*, ou *Dinophysis sp.* ont également été observées dans la lagune oligotrophe Ayrolle. Les capacités osmotrophiques

et phagotrophiques constituent également un avantage adaptatif majeur dans des conditions nutritives limitantes. En effet, elles permettent une ingestion plus efficace des nutriments qui sont beaucoup plus concentrés dans les proies telles que les bactéries ou dans des particules de matériel humique que dans la colonne d'eau. En outre, l'ingestion de proies est favorisée par l'augmentation de la limitation en phosphore ou en azote (Legrand *et al.*, 1998; Granéli and Turner, 2006; Burkholder *et al.*, 2008). Dans une lagune oligotrophe et limitante en phosphore comme Ayrolle, cette caractéristique peut être très avantageuse pour les Dinophytes tels que *Prorocentrum micans*. En effet, les picocyanobactéries de type *Synechococcus*, qui sont des proies privilégiées par ces Dinophytes phagotrophes (Jeong *et al.*, 2005b), ont été identifiées dans cette lagune au cours du suivi mensuel. *Heterocapsa triquetra* constitue un autre exemple de Dinophyte dont la phagotrophie est favorisée en condition nutritive limitante, à travers l'ingestion de petits flagellés et diatomées. Dans les milieux limités en azote tels que la lagune Méjean, d'autres espèces de Dinophytes tels que *Gymnodium sanguineum* identifiés au cours du cycle annuel combleraient leur besoin en azote grâce à l'ingestion de petits ciliés (Legrand *et al.*, 1998).

Tableau 6. Exemples de l'utilisation de stratégies d'acquisition des ressources alternatives à la phototrophie en réponse à la ré-oligotrophisation.

Milieu	Contexte	Organismes	Stratégie	Référence bibliographique
Lac Constance	Re-oligotrophisation, limitation en P	<i>Dinobryon sp.</i> Chrysophyte	Phagotrophie sur des bactéries	(Kamjunke <i>et al.</i> , 2007)
Mer interne de Seto	Re-oligotrophisation Réduction des apports en PID	<i>Alexandrium tamarense</i> , <i>Gymnodinium catenatum</i> , Dinophytes	Consommation de POD	(Anderson <i>et al.</i> , 2002; Yamamoto, 2003)
Lagune de Thau	Re-oligotrophisation, réduction des concentrations en Phosphore réactif soluble	<i>Alexandrium catenella</i> , Dinophyte	Phagotrophie sur <i>Synechococcus</i> , consommation d'urée	(Collos <i>et al.</i> , 2009)

Dans ce contexte, il paraît donc pertinent d'approfondir les connaissances sur les capacités mixotrophiques des Crypto-, Chryso- et Dinophytes au sein des lagunes en cours de restauration écologique. Il faudrait dans un premier temps caractériser finement les successions d'espèces pratiquant ces modes de nutritons dans les lagunes du complexe des étangs palavasiens témoignant d'états de restauration contrastés. A partir des espèces identifiées, les

processus d'ingestion de proies et de particules seraient précisés par l'estimation du nombre et des types de particules ingérées grâce à certaines techniques telles que l'ingestion d'algues marquées par de la fluorescence (*Fluorescently Labelled Algae*) (Legrand *et al.*, 1998).

En parallèle, une estimation des concentrations en nutriments organiques dissous et particulaires (POD, POC, NOD, NOC, COD, COP) présents dans ces lagunes permettra de quantifier les stocks de matière organique disponible ou potentiellement reminéralisable (Guariento *et al.*, 2010). Cette information précisera la quantité de nutriments qui pourraient encore stimuler la croissance phytoplanctonique et maintenir un état d'eutrophisation dégradé. Elle permettrait aussi d'expliquer la transition des communautés phytoplanctoniques vers une dominance d'organismes capables de consommer la matière organique ou les bactéries elles-mêmes stimulées par cette source de nutriments (Burkholder *et al.*, 2008).

Cette étude pourrait en parallèle aborder le risque d'apparition d'espèces potentiellement nuisibles ou toxiques, généralement associées à l'utilisation de la mixotrophie (Burkholder *et al.*, 2008). Cette problématique pourrait en effet faire l'objet d'une attention croissante, puisque de nombreuses espèces parmi les Dinophytes recensés parfois en grande abondance dans les lagunes palavasiennes (*Prorocentrum*, *Protoperidinium*, *Gymnodinium*, *Alexandrium*, *Gonyaulax*, *Heterocapsa*, *Dinophysis*, *Scrippsiella*, *Vulcanodinium* etc.) sont identifiées comme potentiellement nuisibles ou toxiques (Jeong *et al.*, 2005a; Granéli and Turner, 2006; Spatharis *et al.*, 2009). Ces Dinophytes présentent un risque pour la santé humaine, qui s'est déjà manifesté par le biais d'une contamination de bivalves d'intérêt commercial dans Ingril (Abadie, 2015; Abadie *et al.*, 2015). La quantification des stocks benthiques de cellules enkystées dans les lagunes palavasiennes et l'impact des caractéristiques environnementales des lagunes sur la composition et l'abondance de ces kystes permettrait de préciser le risque d'efflorescence toxique d'espèces telles qu'*Alexandrium tamarense* ou *Scrippsiella* sp. (Pospelova *et al.*, 2004; Krepakevich and Pospelova, 2010). Ce risque n'est cependant pas généralisable à long terme pour toutes les lagunes et peut être tempéré, puisque ces organismes tolèrent mal une forte variabilité environnementale. En conséquence, dans les lagunes soumises à des perturbations par des apports d'eau douces permanents ou transitoires telles que Méjean, Arnel, ou Vic, ces communautés devraient être régulées naturellement et ne devraient pas s'implanter de manière permanente.

Le groupe des picoeucaryotes, qui a été principalement décrit au cours de ce travail par la composition pigmentaire grâce à l'HPCL et la cytométrie, est actuellement l'objet d'une description plus fine de sa diversité. En effet, la diversité génétique de ces organismes est en cours de détermination dans cinq lagunes du complexe des étangs palavasiens (Méjean ouest, Prévost, Vic, Ingril nord et sud), par Daniel Grzebyk du Laboratoire MARBEC.

7.3.2.3 *Intégrer le phytoplancton dans le fonctionnement du compartiment autotrophe*

La restauration écologique des lagunes a initié une profonde modification du compartiment autotrophe. La chute des biomasses phytoplanctoniques a entraîné la réduction de la turbidité, accroissant la quantité et modifiant la qualité de la lumière pénétrant dans la colonne d'eau. L'augmentation de la disponibilité lumineuse a permis la réapparition et l'augmentation de la présence d'organismes autotrophes benthiques et/ou sessiles (Macroalgues et Phanérogames, voir discussion § 7.2) (De Wit *et al.*, 2015). Schramm a proposé en 1999 un schéma illustrant les phases de succession des producteurs primaires dans des eaux côtières peu profondes en réponse à l'augmentation de l'eutrophisation. Les observations menées sur les étangs palavasiens depuis la diversion de l'émissaire de la station de traitement des eaux de Montpellier suggèrent une succession de producteurs primaires comparable à l'inverse de la séquence proposée par Schramm, illustrée dans la Figure 22. Ce constat implique que le phytoplancton pourrait être fortement concurrencé pour les nutriments disponibles qui sont actuellement déjà limitants. Cette compétition pourrait être particulièrement accrue dans le cadre de la restauration écologique, puisque la re-oligotrophisation a modifié la balance nutritive des apports externes (bassin versant) et internes (reminéralisation bactérienne). Dans ces conditions, la majorité des nutriments disponibles en été proviennent des sédiments, et favorisent les organismes benthiques qui peuvent les absorber avant les organismes pélagiques tels que le phytoplancton (McGlathery *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2013). Le microphytobenthos constitue également un compartiment important, en particulier dans ces systèmes peu profonds où le brassage des eaux par le vent provoque de fréquentes remises en suspension sédimentaires (Chatterjee *et al.*, 2013). Par ailleurs, ces organismes sont régulièrement identifiés comme appartenant au phytoplancton pélagique lorsqu'ils sont remis en suspension dans la colonne d'eau. Leur identification semble donc nécessaire pour avoir une vision exhaustive du phytoplancton *stricto sensu*.

Il serait donc particulièrement pertinent d'intégrer l'ensemble des organismes autotrophes benthiques et sessiles au suivi estival, et à l'étude de l'impact des flux nutritifs benthiques sur le phytoplancton (De Wit *et al.*, 2012). En effet, les organismes benthiques participent fortement aux processus physico-chimiques intervenant à l'interface sédiments-eau, et doivent être pris en considération (Chatterjee *et al.*, 2013, Kennish *et al.*, 2014). Peu d'études ont déjà tenu compte de toute la diversité des organismes autotrophes dans les écosystèmes marins côtiers, la plupart se focalisant sur un compartiment (McGlathery *et al.*, 2001, Kennish *et al.*, 2014). Cette stratégie permettrait pourtant d'une part d'appréhender les interactions (compétition, inhibition) qui peuvent intervenir entre ces organismes, et qui sont particulièrement importantes dans des milieux peu profonds tels que les lagunes (McGlathery *et al.*, 2001; Kennish *et al.*, 2014). De plus, les caractéristiques trophiques contrastées des lagunes

du complexe des étangs palavasiens permettraient de mettre en évidence l'impact du niveau d'eutrophisation sur la diversité des producteurs primaires et leurs interactions. D'autre part, l'ensemble de ces organismes participe à la réponse de l'écosystème à la ré-oligotrophisation. Cette stratégie permettrait donc de préciser les trajectoires d'évolution des organismes autotrophes au cours de la restauration écologique, et de mieux prédire la durée de ces processus. La réimplantation de Macrophytes pourrait accélérer les processus de restauration, en facilitant la transition vers un état alternatif « clair », grâce à leur compétition pour les ressources nutritives, le piégeage des nutriments sur une plus longue période (Kennish *et al.*, 2014), ou l'inhibition de la croissance phytoplanctonique par de l'allélopathie (Laabir *et al.*, 2013).

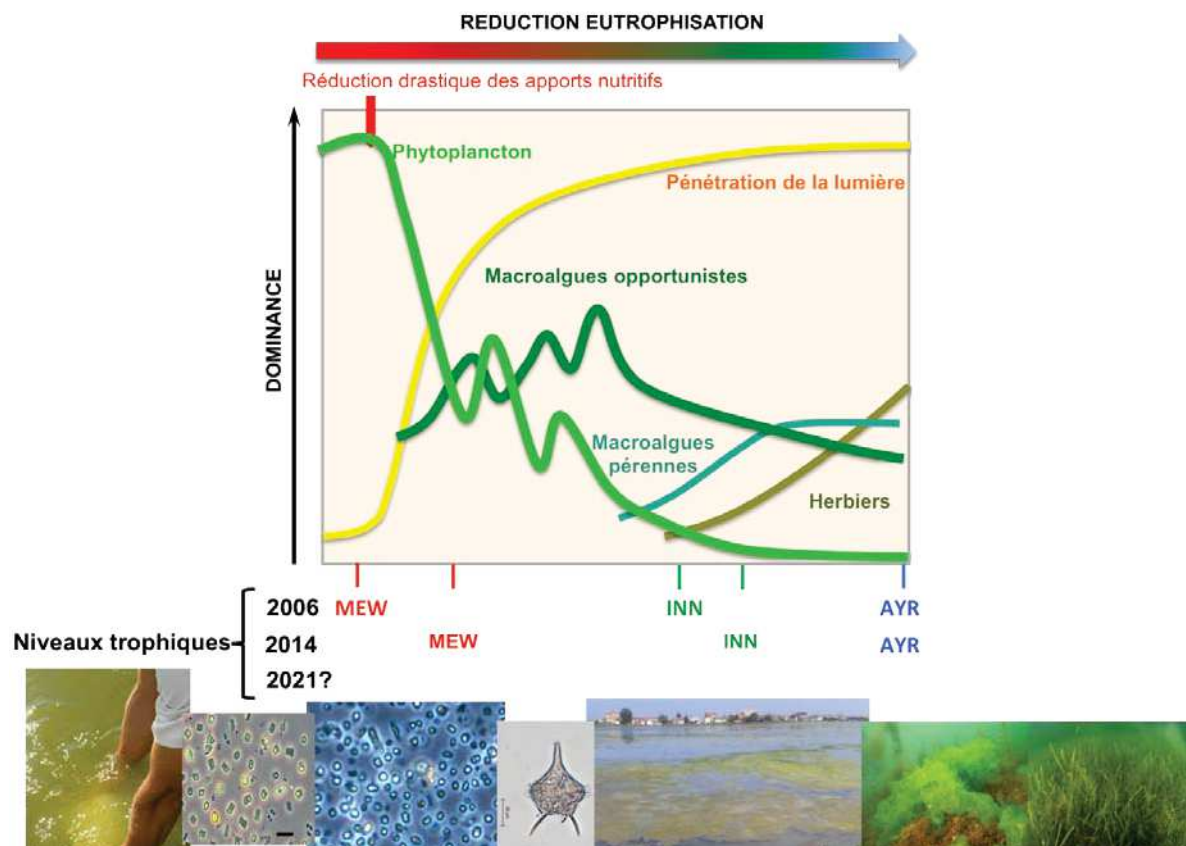


Figure 22. Succession des compartiments autotrophes phytoplanctoniques et macrophytiques. Adapté de Schramm 1999 et de Bec *et al.*, ICES 2011.

La caractérisation des successions des Macrophytes en fonction de l'eutrophisation des lagunes et des processus de restauration de 1998 à 2015 est en cours de détermination, dans le cadre de la thèse de doctorat d'Ines Le Fur, co-encadrée par Rutger de Wit et Vincent Ouisse (IFREMER). Elle permettra de vérifier/compléter les trajectoires d'évolution de ces organismes suite à la réduction des apports proposées dans la Figure 22. Au cours de cette thèse, les flux de nutriments, la production primaire et la séquestration de la matière par différents genres représentatifs de niveaux d'eutrophisation contrastés (*Ulva*, *Gracilaria*, *Chaetomorpha*, *Halopithys*, et *Zostera noltei*) vont également être quantifiés. La finalité sera d'estimer par de la

modélisation la durée des processus de restauration écologique en fonction des stocks de nutriments et de l'ensemble des paramètres décrits ci-dessus. Il serait donc intéressant à l'issue de cette thèse de mutualiser les observations menées sur le phytoplancton et les macrophytes, afin de mieux comprendre les processus de restauration écologique des lagunes et de comparer l'impact des niveaux d'eutrophisation contrastés à l'origine du processus de re-oligotrophisation sur leurs trajectoires.

Des expérimentations *in situ* pourraient également préciser les interactions entre ces compartiments, via la compétition pour les ressources ou l'allélopathie. Leur mise en place serait la prochaine étape logique puisque des essais *in vitro* ont déjà mis en évidence un mécanisme d'inhibition du phytoplancton par des substances sécrétées par les Phanérogames (Laabir *et al.*, 2013).

7.3.2.4 Intégrer le phytoplancton dans le réseau trophique

Le phytoplancton n'est pas le seul compartiment biologique impacté par la restauration écologique et le réchauffement climatique. L'ensemble des organismes du milieu profitant de transferts d'énergie issue de la production primaire est touché par la modification de la disponibilité des ressources nutritives (Fig. 23), au travers les changements qu'elle occasionne sur la biomasse et la composition des communautés des producteurs primaires (Cloern and Dufford, 2005).

Il serait intéressant d'étudier l'ensemble des niveaux du réseau trophique, tels que le zooplancton, les poissons et les oiseaux dans les lagunes palavasiennes. Ce travail permettrait de caractériser plus précisément les types d'interactions entre ces différents organismes (Fig. 23). Il est important de comprendre ces interactions car elles participent aux processus qui contrôlent la structuration et la composition des communautés de chaque niveau trophique (Guariento *et al.*, 2010). Au sein du réseau trophique, deux effets régulent principalement les communautés par des mécanismes en cascades : les effets *bottom-up* et *top-down*. Les effets *bottom-up* sur le phytoplancton proviennent des nutriments nécessaires à leur survie. Ces effets ont par conséquent été abordés lors de ce travail de thèse. Ils doivent par ailleurs être complétés par (i) l'étude de l'impact des flux benthiques et de la matière organique sur les communautés phytoplanctoniques (§ 7.3.2.1), et (ii) la compétition des autres compartiments autotrophes pour la disponibilité des ressources (§ 7.3.2.2). En revanche, les effets *top-down* n'ont pas été évoqués, alors que la prédation joue un rôle essentiel sur la structuration du phytoplancton (Fig. 19) (Cloern and Dufford, 2005; First *et al.*, 2007). Coupler l'étude de ces compartiments aurait l'avantage d'une part d'améliorer la compréhension de la contribution des niveaux trophiques supérieurs à la structuration des communautés phytoplanctoniques, notamment à travers la prédation sélective et les cascades trophiques (Cloern and Dufford, 2005; Cardona, 2006). D'autre part, le couplage de tous les compartiments permettrait d'avoir une vision plus réaliste

du fonctionnement des lagunes (Guariento et al., 2010), et donc de l'effet de la restauration écologique à long terme sur leur fonctionnement. Enfin, cette démarche pourrait aider à prédire l'effet de la restauration sur une grande partie des services écosystémiques tels que la production ichthyologique, le rôle nourricier pour les oiseaux (poissons et zooplancton), la production aquacole, les activités récréatives (qualité de l'eau, présence de macrophytes ou de nuisances olfactives liées à la décomposition de la matière organique). Ce genre d'étude plus globale pourrait servir d'outil pour la prise de décision d'actions de gestion des lagunes (Brehmer et al., 2011).

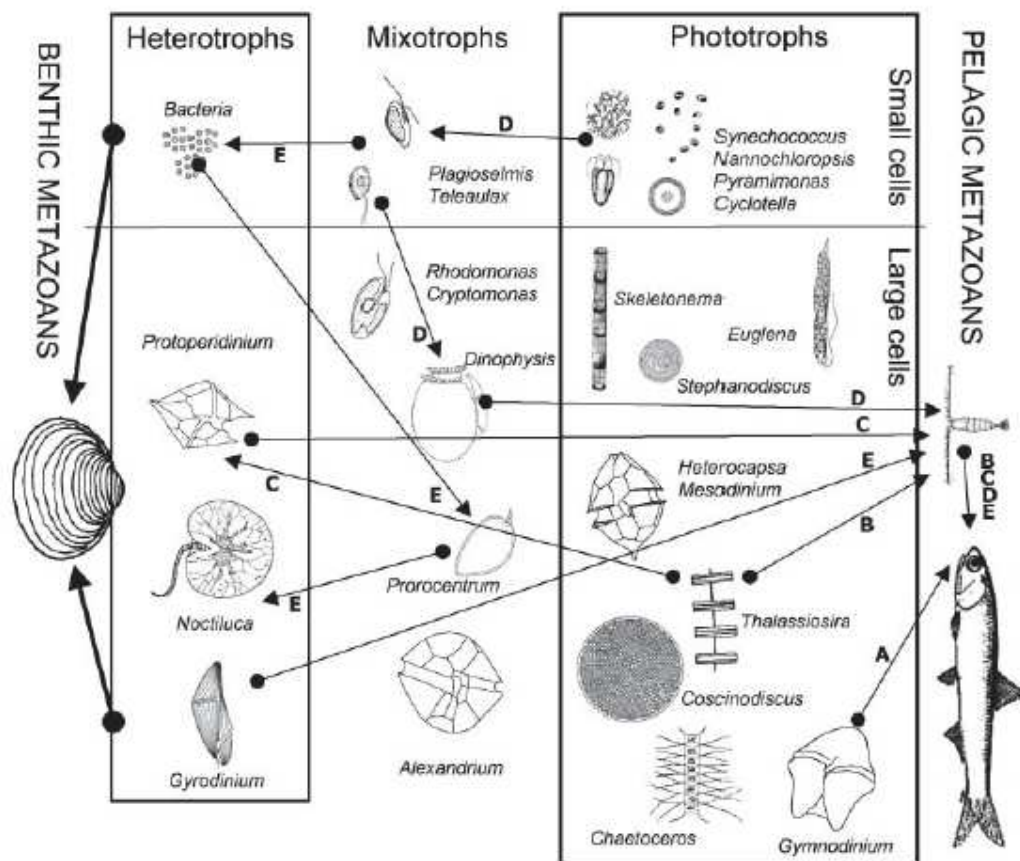


Figure 23. Interactions et transferts d'énergie entre le phytoplancton et les métazoaires benthiques et pélagiques, en fonction de leur taille et de leur mode de nutrition. Tiré de Cloern and Dufford (2005).

Concernant le phytoplancton, une meilleure compréhension du rôle de ce compartiment dans le réseau trophique pourrait être obtenue au travers de la complexification de l'approche de leur diversité fonctionnelle, en intégrant des traits ayant un effet sur les interactions entre communautés. Par exemple, les mécanismes d'allélopathie inhibant la croissance des prédateurs, ou la qualité nutritionnelle (Cloern and Dufford, 2005), les capacités d'ingestion des différentes sources de nutriments (matière organique, bactéries, etc.). Cette démarche permettrait d'avoir une vision plus globale des interactions entre cellules phytoplanctoniques, et entre le phytoplancton et les niveaux trophiques supérieurs.

8 Bibliographie⁹

293

⁹ La liste des références bibliographiques ci-après contient uniquement les références relatives aux parties de la thèse qui ne sont pas rédigées sous forme de publication. Ces parties-là contiennent leurs propres listes de références.

-A-

- Abadie, E. (2015). Etude de *Vulcanodinium rugosum* (Dinoflagellé producteur de pinnatoxines) se développant dans la lagune méditerranéenne de l'Ingril.
- Abadie, E., Kaci, L., Berteaux, T., Hess, P., Sechet, V., Masseret, E., Rolland, J.-L., and Laabir, M. (2015). Effect of Nitrate, Ammonium and Urea on Growth and Pinnatoxin G Production of *Vulcanodinium rugosum*. *Mar. Drugs* 13, 5642–5656.
- Abid, F., Sellami-Kammoun, A., Ayadi, H., Drira, Z., Bouian, A., and Aleya, L. (2008). Biochemical adaptation of phytoplankton to salinity and nutrient gradients in a coastal solar saltern, Tunisia. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 80, 391–400.
- Agatz, M., Asmus, R.M., and Deventer, B. (1999). Structural changes in the benthic diatom community along a eutrophication gradient on a tidal flat. *Helgol. Mar. Res.* 53, 92–101.
- Agawin, N.S.R., Duarte, C.M., and Agusti, S. (2000). Nutrient and Temperature Control of the Contribution of Picoplankton to Phytoplankton Biomass and Production. *Limnol. Oceanogr.* 45, 591–600.
- Alexander, S., and McInness, R. (2012). The benefits of wetland restoration. Ramsar Scientific and Technical Briefing Note no.4.
- Alvain, S., Moulin, C., Dandonneau, Y., and Loisel, H. (2008). Seasonal distribution and succession of dominant phytoplankton groups in the global ocean: A satellite view. *Glob. Biogeochem. Cycles* 22, GB3001.
- Alves-de-Souza, C., González, M.T., and Iriarte, J.L. (2008). Functional groups in marine phytoplankton assemblages dominated by diatoms in fjords of southern Chile. *J. Plankton Res.* 30, 1233–1243.
- Amilhat, E., Farrugio, H., Lecomte-Finiger, R., Simon, G., and Sasal, P. (2008). Silver eel population size and escapement in a Mediterranean lagoon: Bages-Sigean, France. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.*
- Andersen, T., Schartau, A., and Paasche, E. (1991). Quantifying External and Internal Nitrogen and Phosphorus Pools, as Well. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 69, 67–80.
- Andersen, R.A. (1992). Diversity of eukaryotic algae. *Biodivers. Conserv.* 1, 267–292.
- Anderson, D.M., Glibert, P.M., and Burkholder, J.M. (2002). Harmful algal blooms and eutrophication: Nutrient sources, composition, and consequences. *Estuaries* 25, 704–726.
- Anneville, O., and Pelletier, J.P. (2000). Recovery of Lake Geneva from eutrophication: quantitative response of phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* 148, 607–624.
- Anthony, A., Atwood, J., August, P., Byron, C., Cobb, S., Foster, C., Fry, C., Gold, A., Hagos, K., Heffner, L., Kellogg, D.Q., Lellis-Dibble, K., Opaluch, J.J., Oviatt, C., Pfeiffer-Herbert, A., Rohr, N., Smith, L., Smythe, T., Swift, J., and Vinhateiro, N. (2009). Coastal Lagoons and Climate Change: Ecological and Social Ramifications in US Atlantic and Gulf Coast Ecosystems. *Ecol. Soc.* 14, 8.
- Aronson, J., Claeys, F., Picon, P., Bernard, G., and Bocognano, J.-M. (2013). La notion de capital naturel appliquée à l'étang de Berre : états de référence et trajectoires, in: Actes Des Rencontres Lagun'R. G. Bernard, E. Le Corre. pp. 376–386.

Aronson, J., Milton, S.J., and Blignaut, J. (2007). *Restoring Natural Capital: Science, Business, and Practice*, Island Press, Washington DC. ed. Editeurs.

Arthaud, F., Vallod, D., Robin, J., and Bornette, G. (2012). Eutrophication and drought disturbance shape functional diversity and life-history traits of aquatic plants in shallow lakes. *Aquat. Sci.* *74*, 471–481.

-B-

Bazin, P., Jouenne, F., Deton-Cabanillas, A.-F., Perez-Ruzafa, A., and Veron, B. (2014). Complex patterns in phytoplankton and microeukaryote diversity along the estuarine continuum. *Hydrobiologia* *726*, 155–178.

Backer, L.C., and McGillicuddy, D.J. (2006). Harmful algal blooms - At the interface between coastal oceanography and human health. *Oceanography* *19*.

Barbier, E.B., Hacker, S.D., Kennedy, C., Koch, E.W., Stier, A.C., and Silliman, B.R. (2011). The value of estuarine and coastal ecosystem services. *Ecol. Monogr.* *81*, 169–193.

Bec, B., Husseini-Ratrema, J., Collos, Y., Souchu, P., and Vaquer, A. (2005). Phytoplankton seasonal dynamics in a Mediterranean coastal lagoon: emphasis on the picoeukaryote community. *J. Plankton Res.* *27*, 881–894.

Bec, B., Collos, Y., Souchu, P., Vaquer, A., Lautier, J., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., and Laugier, T. (2011). Distribution of picophytoplankton and nanophytoplankton along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Aquat. Microb. Ecol.* *63*, 29–45.

Berdalet, E., Peters, F., Koumandou, V.L., Roldán, C., Guadayol, Ò., and Estrada, M. (2007). Species-specific physiological response of dinoflagellates to quantified small-scale turbulence¹. *J. Phycol.* *43*, 965–977.

Behrenfeld, M.J., Maranon, E., Siegel, D.A., and Hooker, S.B. (2002). Photoacclimation and nutrient-based model of light-saturated photosynthesis for quantifying oceanic primary production. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *228*, 103–117.

Bioret, F., Géhu, J.M., Glemarec, M., Bellan-Santini, D., Salaün, M., and Giraudet, J. (2004). *Connaissance et gestion des habitats et des espèces d'intérêt communautaire: Tome 2: Habitats côtiers*.

Blüthgen, N., and Klein, A.-M. (2011). Functional complementarity and specialisation: The role of biodiversity in plant–pollinator interactions. *Basic Appl. Ecol.* *12*, 282–291.

Bockstahler, K.R., and Coats, D.W. (1993). Spatial and Temporal Aspects of Mixotrophy In Chesapeake Bay Dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* *40*, 49–60.

Boesch, D.F. (2002). Challenges and opportunities for science in reducing nutrient over-enrichment of coastal ecosystems. *Estuaries* *25*, 886–900.

Bonilla, S., Conde, D., Aubriot, L., Pérez, and M. del C. (2005). Influence of hydrology on phytoplankton species composition and life strategies in a subtropical coastal lagoon periodically connected with the Atlantic Ocean. *Estuaries* *28*, 884–895.

Boyd, C.M., and Gradmann, D. (2002). Impact of osmolytes on buoyancy of marine phytoplankton. *Mar. Biol.* *141*, 605–618.

- Boynton, W.R., Hagy, J.D., Murray, L., Stokes, C., and Kemp, W.M. (1996). A comparative analysis of eutrophication patterns in a temperate coastal lagoon. *Estuaries* 19, 408–421.
- Brehmer, P., Chi, T.D., Laugier, T., Galgani, F., Laloe, F., Darnaude, A.M., Fiandrino, A., and Mouillot, D. (2011). Field investigations and multi-indicators for shallow water lagoon management: perspective for societal benefit. *Aquat. Conserv.-Mar. Freshw. Ecosyst.* 21, 728–742. doi:10.1002/aqc.1231.
- Breton, E., Brunet, C., Sautour, B., and Brylinski J-M. (2000). Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: comparison by pigment signatures and microscopic counts. *J. Plankton Res.* 22, 1423–1440.
- Bricker, S.B., Longstaff, B., Dennison, W., Jones, A., Boicourt, K., Wicks, C., and Woerner, J. (2008). Effects of nutrient enrichment in the nation's estuaries: A decade of change. *Harmful Algae* 8, 21–32.
- Buchet, R. (2010). DCE : Consolidation des conditions de référence pour les éléments de qualité biologiques impliqués dans l'évaluation des masses d'eau littorales.
- Bullock, J.M., Aronson, J., Newton, A.C., Pywell, R.F., and Rey-Benayas, J.M. (2011). Restoration of ecosystem services and biodiversity: conflicts and opportunities. *Trends Ecol. Evol.* 26, 541–549.
- Burnham, K.P., and Anderson, D.R. (2004). *Model Selection and Multimodel Inference* (New York, NY: Springer New York).
- Burk, A.R. (2005). *Progress in Aquatic Ecosystems Research*. Nova Publishers.
- Burkholder, J.M., Glibert, P.M., and Skelton, H.M. (2008). Mixotrophy, a major mode of nutrition for harmful algal species in eutrophic waters. *Harmful Algae* 8, 77–93.
- C-**
- Callieri, C., and Piscia, R. (2002). Photosynthetic efficiency and seasonality of autotrophic picoplankton in Lago Maggiore after its recovery. *Freshw. Biol.* 47, 941–956.
- Cameron, R.A.D., Triantis, K.A., Parent, C.E., Guilhaumon, F., Alonso, M.R., Ibáñez, M., de Frias Martins, A.M., Ladle, R.J., and Whittaker, R.J. (2013). Snails on oceanic islands: testing the general dynamic model of oceanic island biogeography using linear mixed effect models. *J. Biogeogr.* 40, 117–130.
- Campbell, D. (1994). Interaction Between the Environment, Intermediary Metabolism and Cellular-Differentiation in a Filamentous Cyanobacterium. *Bull. Inst. Pasteur* 92, 27–43.
- Cardona, L. (2006). Trophic cascades uncoupled in a coastal marsh ecosystem. *Biol. Invasions* 8, 835–842. doi:10.1007/s10530-005-0420-0
- Carlier, A., Riera, P., Amouroux, J.-M., Bodiou, J.-Y., Desmalades, M., and Grémare, A. (2008). Food web structure of two Mediterranean lagoons under varying degree of eutrophication. *J. Sea Res.* 60, 264–275.
- Caroppo, C. (2000). The contribution of picophytoplankton to community structure in a Mediterranean brackish environment. *J. Plankton Res.* 22, 381–397.
- Carstensen, J., Conley, D.J., Andersen, J.H., and Aertebjerg, G. (2006). Coastal eutrophication and trend reversal: A Danish case study. *Limnol. Oceanogr.* 51, 398–408.

- Cartaxana, P., Mendes, C.R., and Brotas, V. (2009). Phytoplankton and ecological assessment of brackish and freshwater coastal lagoons in the Algarve, Portugal. *Lakes Reserv. Res. Manag.* *14*, 221–230.
- Chatterjee, A., Klein, C., Naegelen, A., Claquin, P., Masson, A., Legoff, M., Amice, E., L’Helguen, S., Chauvaud, L., and Leynaert, A. (2013). Comparative dynamics of pelagic and benthic micro-algae in a coastal ecosystem. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *133*, 67–77.
- Cebrian, J., Corcoran, D., and Lartigue, J. (2014). Eutrophication-Driven Shifts in Primary Producers in Shallow Coastal Systems: Implications for System Functional Change. *Estuaries Coasts* *37*, S180–S197.
- Chang, F.H., Zeldis, J., Gall, M., and Hall, J. (2003). Seasonal and spatial variation of phytoplankton assemblages, biomass and cell size from spring to summer across the north-eastern New Zealand continental shelf. *J. Plankton Res.* *25*, 737–758.
- Chisholm, S.W. (1992). Phytoplankton Size. In *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*, P.G. Falkowski, A.D. Woodhead, and K. Vivirito, eds. (Springer US), pp. 213–237.
- Cloern, J.E. (2001). Our evolving conceptual model of the coastal eutrophication problem. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* *210*, 223–253.
- Cloern, J.E., and Dufford, R. (2005). Phytoplankton community ecology: principles applied in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *285*, 11–28.
- Cloern, J.E., and Jassby, A.D. (2008). Complex seasonal patterns of primary producers at the land-sea interface. *Ecol. Lett.* *11*, 1294–1303.
- Coelho, S., Gamito, S., and Perez-Ruzafa, A. (2007). Trophic state of Foz de Almargem coastal lagoon (Algarve, South Portugal) based on the water quality and the phytoplankton community. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *71*, 218–231.
- Comparaison climatologique annuelle - Infoclimat [WWW Document] (2015) URL <http://www.infoclimat.fr/stations-meteo/climato-globale-comparaison-annees.php?staid=07643> (accessed 7.20.15).
- Coleman, V., and Burkholder, J. (1994). Community Structure and Productivity of Epiphytic Microalgae on Eelgrass (*zostera-Marina* L) Under Water-Column Nitrate Enrichment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *179*, 29–48.
- Collos, Y., and Harrison, P.J. (2014). Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae. *Mar. Pollut. Bull.* *80*, 8–23.
- Collos, Y., Vaquer, A., Bibent, B., Souchu, P., Slawyk, G., and Garcia, N. (2003). Response of coastal phytoplankton to ammonium and nitrate pulses: seasonal variations of nitrogen uptake and regeneration. *Aquat. Ecol.* *37*, 227–236.
- Collos, Y., Gagne, C., Laabir, M., Vaquer, A., Cecchi, P., and Souchu, P. (2004). Nitrogenous Nutrition of *Alexandrium Catenella* (dinophyceae) in Cultures and in Thau Lagoon, Southern France1. *J. Phycol.* *40*, 96–103.
- Collos, Y., Bec, B., Jauzein, C., Abadie, E., Laugier, T., Lautier, J., Pastoureaud, A., Souchu, P., and Vaquer, A. (2009). Oligotrophication and emergence of picocyanobacteria and a toxic dinoflagellate in Thau lagoon, southern France. *J. Sea Res.* *61*, 68–75.
- Commission Aménagement du Territoire (2010). Avis de la commission Aménagement du

Territoire sur le rapport d'autosaisine : "La requalification des stations touristiques du littoral du Languedoc-Roussillon."

Costa, L.S., Huszar, V.L.M., and Ovalle, A.R. (2009). Phytoplankton Functional Groups in a Tropical Estuary: Hydrological Control and Nutrient Limitation. *Estuaries Coasts* 32, 508–521.

Costanza, R., d'Arge, R., deGroot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R.V., Paruelo, J., et al. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253–260.

Cottingham KL, and Carpenter SR. (1998). Population, community, and ecosystem variates as ecological indicators: Phytoplankton responses to whole-lake enrichment. *Ecol. Appl.* 8, 508–530.

Cowan, J.L.W., Pennock, J.R., and Boynton, W.R. (1996). Seasonal and interannual patterns of sediment-water nutrient and oxygen fluxes in Mobile Bay, Alabama (USA): Regulating factors and ecological significance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 141, 229–245.

-D-

Danovaro, R., Gambi, C., Dell'Anno, A., Corinaldesi, C., Fraschetti, S., Vanreusel, A., Vincx, M., and Gooday, A.J. (2008). Exponential Decline of Deep-Sea Ecosystem Functioning Linked to Benthic Biodiversity Loss. *Curr. Biol.* 18, 1–8.

David, V., Ryckaert, M., Karpytchev, M., Bacher, C., Arnaudeau, V., Vidal, N., Maurer, D., and Niquil, N. (2012). Spatial and long-term changes in the functional and structural phytoplankton communities along the French Atlantic coast. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 108, 37–51.

De Jonge, V.N., and de Jong, D.J. (2002). Ecological restoration in coastal areas in the Netherlands: concepts, dilemmas and some examples. *Hydrobiologia* 478, 7–28.

Demeny, P. (1990). Tradeoffs Between Human Numbers and Material Standards of Living. *Popul. Dev. Rev.* 16, 408–421.

Derolez, V. (2015). Les suivis de la qualité du milieu: des appuis pour la gestion de la lagune.

Derolez, V., Oheix, J., Ouisse, V., Munaron, D., Fiandrino, A., Messiaen, G., Hubert, C., Lamoureux, A., Malet, N., Fortune, M., Berard, L., Mortreux, S., and Guillou, J.-L. (2015). Suivi estival des lagunes méditerranéennes françaises - Bilan des résultats 2014.

Deslous-Paoli, J.M., Souchu, P., Mazouni, N., Juge, C., and Dagault, F. (1998). Relationship between environment and resources: impact of shellfish farming on a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Oceanol. Acta* 21, 831–843.

Devictor, V., Clavel, J., Julliard, R., Lavergne, S., Mouillot, D., Thuiller, W., Venail, P., Villéger, S., and Mouquet, N. (2010). Defining and measuring ecological specialization. *J. Appl. Ecol.* 47, 15–25.

De Wit, R. (2011). Challenges for applying vulnerability assessments in coastal lagoons. *Transitional Waters Bull.* 5, 32–41.

De Wit, R., Troussellier, M., Courties, C., Buffan-Dubau, E., and Lemaire, E. (2012). Short-term interactions between phytoplankton and intertidal seagrass vegetation in a coastal lagoon (Bassin d'Arcachon, SW France). *Hydrobiologia* 699, 55–68.

- De Wit, R., Rey-Valette, H., Balavoine, J., Ouisse, V., and Lifran, R. (2015). Restoration ecology of coastal lagoons: new methods for the prediction of ecological trajectories and economic valuation. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.*
- Díaz, S., and Cabido, M. (2001). Vive la différence: plant functional diversity matters to ecosystem processes. *Trends Ecol. Evol.* *16*, 646–655.
- Diez B, Pedros-Alio C, and Massana R. (2001). Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* *67*, 2932–2941.
- DIRECTIVE 2000/60/CE DU PARLEMENT EUROPEEN ET DU CONSEIL Du 23 Octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (2000).
- Domingues, R.B., Anselmo, T.P., Barbosa, A.B., Sommer, U., and Galvão, H.M. (2011a). Nutrient limitation of phytoplankton growth in the freshwater tidal zone of a turbid, Mediterranean estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *91*, 282–297.
- Domingues, R.B., Barbosa, A.B., Sommer, U., and Galvão, H.M. (2011b). Ammonium, nitrate and phytoplankton interactions in a freshwater tidal estuarine zone: potential effects of cultural eutrophication. *Aquat. Sci.* *73*, 331–343.
- Donald, D.B., Bogard, M.J., Finlay, K., and Leavitt, P.R. (2011). Comparative effects of urea, ammonium, and nitrate on phytoplankton abundance, community composition, and toxicity in hypereutrophic freshwaters. *Limnol. Oceanogr.* *56*, 2161–2175.
- Donald, D.B., Bogard, M.J., Finlay, K., Bunting, L., and Leavitt, P.R. (2013). Phytoplankton-Specific Response to Enrichment of Phosphorus-Rich Surface Waters with Ammonium, Nitrate, and Urea. *Plos One* *8*.
- Duarte, C.M., Conley, D.J., Carstensen, J., and Sanchez-Camacho, M. (2009). Return to Neverland: Shifting Baselines Affect Eutrophication Restoration Targets. *Estuaries Coasts* *32*, 29–36.
- Dupuy, C., Vaquer, A., Lam-Hoai, T., Rougier, C., Mazouni, N., Lautier, J., Collos, Y., and Le Gall, S. (2000). Feeding rate of the oyster *Crassostrea gigas* in a natural planktonic community of the Mediterranean Thau Lagoon. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* *205*, 171–184.

-E-

- Elliott, M., Burdon, D., Hemingway, K.L., and Apitz, S.E. (2007). Estuarine, coastal and marine ecosystem restoration: Confusing management and science - A revision of concepts. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *74*, 349–366.

-F-

- Faber, M.J., Smith, L.M.J., Boermans, H.J., Stephenson, G.R., Thompson, D.G., and Solomon, K.R. (1997). Cryopreservation of fluorescent marker-labeled algae (*Selenastrum capricornutum*) for toxicity testing using flow cytometry. *Environ. Toxicol. Chem.* *16*, 1059–1067.
- Falkowski, P., and Kiefer, D. (1985). Chlorophyll-a Fluorescence in Phytoplankton - Relationship to Photosynthesis and Biomass. *J. Plankton Res.* *7*, 715–731.
- First, M.R., Lavrentyev, P.J., Jochem, F.J. (2007). Patterns of microzooplankton growth in dilution experiments across a trophic gradient: Implications for herbivory studies. *Mar. Biol.* *151*,

1929–1940.

Franco, A., Fiorin, R., Zucchetta, M., Torricelli, P., and Franzoi, P. (2010). Flounder growth and production as indicators of the nursery value of marsh habitats in a Mediterranean lagoon. *J. Sea Res.* *64*, 457–464.

Furnas, M. (1990). In situ Growth-Rates of Marine-Phytoplankton - Approaches to Measurement, Community and Species Growth-Rates. *J. Plankton Res.* *12*, 1117–1151.

-G-

Gailhard, I., Gros, P., Durbec, J., Beliaeff, B., Belin, C., Nezan, E., Lassus, P. (2002). Variability patterns of microphytoplankton communities along the French coasts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *242*, 39–50.

Gallegos, C.L., Jordan, T.E. (1997). Seasonal progression of factors limiting phytoplankton pigment biomass in the Rhode River estuary, Maryland (USA). I. Controls on phytoplankton growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *161*, 185–198.

Gao, X.L., and Song, J.M. (2005). Phytoplankton distributions and their relationship with the environment in the Changjiang Estuary, China. *Mar. Pollut. Bull.* *50*, 327–335.

Garrido, J.L., and Zapata, M. (1996). Ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography of algal chlorophylls. *J. Chromatogr. A* *738*, 285–289.

Garrido, M., Cecchi, P., Vaquer, A., and Pasqualini, V. (2013). Effects of sample conservation on assessments of the photosynthetic efficiency of phytoplankton using PAM fluorometry. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* *71*, 38–48.

Gilabert, J. (2001). Seasonal plankton dynamics in a Mediterranean hypersaline coastal lagoon: the Mar Menor. *J. Plankton Res.* *23*, 207–217.

Glibert, Boyer, J.N., Heil, C., Madden, C.J., Sturgis, B., and Wazniak, C.S. (2010). Coastal Lagoons: Critical Habitats of Environmental Change. CRC Press, Boca Raton, FL.

Glibert, P.M., Wilkerson, F.P., Dugdale, R.C., Raven, J.A., Dupont, C.L., Leavitt, P.R., Parker, A.E., Burkholder, J.M., and Kana, T.M. (2015). Pluses and minuses of ammonium and nitrate uptake and assimilation by phytoplankton and implications for productivity and community composition, with emphasis on nitrogen-enriched conditions. *Limnol. Oceanogr.* *61*, 165–197.

Glover, H.E., Garside, C., and Trees, C.C. (2007). Physiological responses of Sargasso Sea picoplankton to nanomolar nitrate perturbations. *J. Plankton Res.* *29*, 263–274.

Granéli, E., and Turner, J. (2007). *Ecology of Harmful Algae* (Berlin ; New York: Springer).

Greening, H., and Janicki, A. (2006). Toward reversal of eutrophic conditions in a subtropical estuary: water quality and seagrass response to nitrogen loading reductions in Tampa Bay, Florida, USA. *Environ. Manage.* *38*, 163–178.

Gross, N., Suding, K.N., Lavorel, S., and Roumet, C. (2007). Complementarity as a mechanism of coexistence between functional groups of grasses. *J. Ecol.* *95*, 1296–1305.

Grzebyk, D., Sako, Y., and Berland, B. (1998). Phylogenetic analysis of nine species of *Prorocentrum* (Dinophyceae) inferred from 18S ribosomal DNA sequences, morphological comparisons, and description of *Prorocentrum panamensis*, sp. nov.. *J. Phycol.* *J. Phycol.*

34, 1055 – 1068.

Guariento, R.D., Carneiro, L.S., Caliman, A., Bozelli, R.L., Fonseca Leal, J.J., and Esteves, F. de A. (2010). Interactive effects of omnivorous fish and nutrient loading on net productivity regulation of phytoplankton and periphyton. *Aquat. Biol.* 10, 273–282.

Guillard, R.R.L., Ryther, J.H., 1962. Studies of Marine Planktonic Diatoms: I. *Cyclotella Nana* Hustedt, and *Detonula Confervacea* (Cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* 8, 229–239.

-H-

Hagerthey, S.E., Louda, J.W., and Mongkronsri, P. (2006). Evaluation of pigment extraction methods and a recommended protocol for periphyton Chlorophyll a determination and chemotaxonomic assessment. *J. Phycol.* 42, 1125–1136.

Hansen, P. (1991). Quantitative Importance and Trophic Role of Heterotrophic Dinoflagellates in a Coastal Pelagial Food Web. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 73, 253–261.

Hansen, P.J., and Calado, A.J. (1999). Phagotrophic Mechanisms and Prey Selection in Free-living Dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 382–389.

Heemsbergen, D.A., Berg, M.P., Loreau, M., Hal, J.R. van, Faber, J.H., and Verhoef, H.A. (2004). Biodiversity Effects on Soil Processes Explained by Interspecific Functional Dissimilarity. *Science* 306, 1019–1020.

Houliiez, E., Lizon, F., Lefebvre, S., Artigas, L.F., and Schmitt, F.G. (2015). Phytoplankton photosynthetic activity dynamics in a temperate macrotidal ecosystem (the Strait of Dover, eastern English Channel): Time scales of variability and environmental control. *J. Mar. Syst.* 147, 61–75.

Howarth, R.W. (1998). An assessment of human influences on fluxes of nitrogen from the terrestrial landscape to the estuaries and continental shelves of the North Atlantic Ocean. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 52, 213–223.

Huisman, J., Arrayas, M., Ebert, U., and Sommeijer, B. (2002). How do sinking Phytoplankton species manage to persist? *Am. Nat.* 159, 245–254.

Hunter, B.L., and Laws, E.A. (1981). ATP and chlorophyll a as estimators of phytoplankton carbon biomass. *Limnol. Oceanogr.* 26, 944–956.

Hutchinson, G.E. (1961). The Paradox of the Plankton. *Am. Nat.* 95, 137–145.

Huzar, V.L., H., and Caraco, N.F. (1998). The relationship between phytoplankton composition and physical–chemical variables: a comparison of taxonomic and morphological–functional descriptors in six temperate lakes. *Freshw. Biol.* 40, 679–696.

hydroweb [WWW Document]. URL <http://www.hydro.eaufrance.fr/selection.php> (accessed 5.2.16).

-I-

Irwin, A.J., Finkel, Z.V., Schofield, O.M.E., and Falkowski, P.G. (2006). Scaling-up from nutrient physiology to the size-structure of phytoplankton communities. *J. Plankton Res.* 28, 459–471.

Ismael, A.A. (2003). Succession of heterotrophic and mixotrophic dinoflagellates as well as autotrophic microplankton in the harbour of Alexandria, Egypt. *J Plankton Res* 25, 193–202.

-J-

Jeong, H.J., Du Yoo, Y., Park, J.Y., Song, J.Y., Kim, S.T., Lee, S.H., Kim, K.Y., and Yih, W.H. (2005a). Feeding by phototrophic red-tide dinoflagellates: five species newly revealed and six species previously known to be mixotrophic. *Aquat. Microb. Ecol.* 40, 133–150.

Jeong, H.J., Park, J.Y., Nho, J.H., Park, M.O., Ha, J.H., Seong, K.A., Jeng, C., Seong, C.N., Lee, K.Y., and Yih, W.H. (2005b). Feeding by red-tide dinoflagellates on the cyanobacterium *Synechococcus*. *Aquat. Microb. Ecol.* 41, 131–143.

Jeppesen, E., Sondergaard, M., Jensen, J.P., Mortensen, E., Hansen, A.M., and Jorgensen, T. (1998). Cascading trophic interactions from fish to bacteria and nutrients after reduced sewage loading: An 18-year study of a shallow hypertrophic lake. *Ecosystems* 1, 250–267.

Jeppesen, E., Sondergaard, M., Jensen, J.P., Havens, K.E., Anneville, O., Carvalho, L., Coveney, M.F., Deneke, R., Dokulil, M.T., Foy, B., et al. (2005). Lake responses to reduced nutrient loading - an analysis of contemporary long-term data from 35 case studies. *Freshw. Biol.* 50, 1747–1771.

Jeppesen, E., Sondergaard, M., Meerhoff, M., Lauridsen, T.L., and Jensen, J.P. (2007). Shallow lake restoration by nutrient loading reduction - some recent findings and challenges ahead. *Hydrobiologia* 584, 239–252.

Jiao, N.Z., and Ni, I.H. (1997). Spatial variations of size-fractionated chlorophyll, cyanobacteria and heterotrophic bacteria in the Central and Western Pacific. *Hydrobiologia* 352, 219–230.

John, U., Cembella, A., Hummert, C., Elbrächter, M., Groben, R., and Medlin, I. (2003). Discrimination of the toxigenic dinoflagellates *Alexandrium tamarense* and *A. ostenfeldii* in co-occurring natural populations from Scottish coastal waters. *Eur. J. Phycol.* 38, 25–40.

Jouvin, P. (2008). La Mission racine (1963-1983) et 45 ans d'aménagement du littoral languedocien - Séminaire des Sites et Paysages.

-K-

Kamenir, Y., and Morabito, G. (2009). Lago Maggiore oligotrophication as seen from the long-term evolution of its phytoplankton taxonomic size structure. *J. Limnol.* 68, 146–161.

Kamjunke, N., Henrichs, T., and Gaedke, U. (2007). Phosphorus gain by bacterivory promotes the mixotrophic flagellate *Dinobryon* spp. during re-oligotrophication. *J. Plankton Res.* 29, 39–46.

Kennish, M.J., Brush, M.J., and Moore, K.A. (2014). Drivers of Change in Shallow Coastal Photic Systems: An Introduction to a Special Issue. *Estuaries Coasts* 37, S3–S19.

Keren, N., Berg, A., van Kan, P.J.M., Levanon, H., and Ohad, I. (1997). Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: The role of back electron flow. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 1579–1584.

Kirk, J.T.O. (1983). *Light and Photosynthesis in Aquatic Ecosystems*.

- Kjerfve, B. (1986). Comparative oceanography of coastal lagoons.
- Kjerfve, B. (1994). Coastal lagoon processes. In: Kjerfve, B. (ed) Coastal lagoon processes. Elseiviers Oceanogr. Ser. 243–287.
- Knopper, B. (1994). Aquatic primary production in coastal lagoons. In Coastal Lagoon Processes, (Amsterdam), pp 243–287.
- Krepakevich, A., and Pospelova, V. (2010). Tracing the influence of sewage discharge on coastal bays of Southern Vancouver Island (BC, Canada) using sedimentary records of phytoplankton. *Cont. Shelf Res.* 30, 1924–1940.
- Kruk, C., Mazzeo, N., Lacerot, G., and Reynolds, C.S. (2002). Classification schemes for phytoplankton: a local validation of a functional approach to the analysis of species temporal replacement. *J. Plankton Res.* 24, 901–912.
- Kruk, C., Huszar, V.L.M., Peeters, E.T.H.M., Bonilla, S., Costa, L., Lurling, M., Reynolds, C.S., and Scheffer, M. (2010). A morphological classification capturing functional variation in phytoplankton. *Freshw. Biol.* 55, 614–627.
- Kruk, C., Martinez, A., Nogueira, L., Alonso, C., and Calliari, D. (2015). Morphological traits variability reflects light limitation of phytoplankton production in a highly productive subtropical estuary (Rio de la Plata, South America). *Mar. Biol.* 162, 331–341.
- Kruse, S., Jansen, S., Krägersky, S., and Bathmann, U. (2009). Gut content analyses of three dominant Antarctic copepod species during an induced phytoplankton bloom EIFEX (European iron fertilization experiment). *Mar. Ecol.* 30, 301–312.
- L-**
- Laabir, M., Grignon-Dubois, M., Masseret, E., Rezzonico, B., Soteras, G., Rouquette, M., Rieuvilleneuve, F., and Cecchi, P. (2013). Algicidal effects of *Zostera marina* L. and *Zostera noltii* Hornem. extracts on the neuro-toxic bloom-forming dinoflagellate *Alexandrium catenella*. *Aquat. Bot.* 111, 16–25.
- La Jeunesse, I., Deslous-Paoli, J.M., Ximenes, M.C., Cheylan, J.P., Mende, C., Borrero, C., and Scheyer, L. (2002). Changes in point and non-point sources phosphorus loads in the Thau catchment over 25 years (Mediterranean Sea - France). *Hydrobiologia* 475, 403–411.
- Landkildehus, F., Sondergaard, M., Beklioglu, M., Adrian, R., Angeler, D.G., Hejzlar, J., Papastergiadou, E., Zingel, P., Cakiroglu, A.I., Scharfenberger, U., Drakare, S., Noges, T., Sorf, M., Stefanidis, K., Tavsanoğlu, U.N., Trigo, C., Mahdy, A., Papadaki, C., Tuvikene, L., Larsen, S.E., Kernan, M., and Jeppesen, E. (2014). Climate Change Effects on Shallow Lakes: Design and Preliminary Results of a Cross-European Climate Gradient Mesocosm Experiment. *Est. J. Ecol.* Vol. 63.
- Landry, M., and Hassett, R. (1982). Estimating the Grazing Impact of Marine Micro-Zooplankton. *Mar. Biol.* 67, 283–288.
- Landry, M., Kirshtein, J., and Constantinou, J. (1995). A Refined Dilution Technique for Measuring the Community Grazing Impact. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 120, 53–63.
- Lardicci, C., Como, S., Corti, S., and Rossi, F. (2001). Recovery of the macrozoobenthic community after severe dystrophic crises in a Mediterranean coastal lagoon (Orbetello, Italy). *Mar. Pollut. Bull.* 42, 202–214.

- Legrand, C., Graneli, E., and Carlsson, P. (1998). Induced phagotrophy in the photosynthetic dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*. *Aquat. Microb. Ecol.* *15*, 65–75.
- Les actes des rencontres LAGUN'R - Rencontres scientifiques autour de l'étang de Berre. (2013).
- Leston, S., Lillebø, A.I., and Pardal, M.A. (2008). The response of primary producer assemblages to mitigation measures to reduce eutrophication in a temperate estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *77*, 688–696.
- Lewitus, A.J., Glasgow, H.B., and Burkholder, J.M. (1999). Kleptoplastidy in the toxic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae). *J. Phycol.* *35*, 303–312.
- Lie, A.A.Y., Wong, C.K., Lam, J.Y.C., Liu, J.H., and Yung, Y.K. (2011). Changes in the nutrient ratios and phytoplankton community after declines in nutrient concentrations in a semi-enclosed bay in Hong Kong. *Mar. Environ. Res.* *71*, 178–188.
- Litchman, E., and Klausmeier, C.A. (2008). Trait-Based Community Ecology of Phytoplankton. In *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, (Palo Alto: Annual Reviews), pp. 615–639.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., Schofield, O.M., and Falkowski, P.G. (2007). The role of functional traits and trade-offs in structuring phytoplankton communities: scaling from cellular to ecosystem level. *Ecol. Lett.* *10*, 1170–1181.
- Litchman, E., Klausmeier, C.A., and Yoshiyama, K. (2009). Contrasting size evolution in marine and freshwater diatoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2665–2670.
- Litchman, E., Pinto, P. de T., Klausmeier, C.A., Thomas, M.K., and Yoshiyama, K. (2010). Linking traits to species diversity and community structure in phytoplankton. *Hydrobiologia* *653*, 15–28.
- Lohrenz, S.E., Carroll, C.L., Weidemann, A.D., and Tuel, M. (2003). Variations in phytoplankton pigments, size structure and community composition related to wind forcing and water mass properties on the North Carolina inner shelf. *Cont. Shelf Res.* *23*, 1447–1464.
- Longhi, M.L., and Beisner, B.E. (2010). Patterns in taxonomic and functional diversity of lake phytoplankton. *Freshw. Biol.* *55*, 1349–1366.
- Louda, J.W. (2008). HPLC-based chemotaxonomy of Florida Bay phytoplankton: Difficulties in coastal environments. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* *31*, 295–323.
- Lotze, H.K., Lenihan, H.S., Bourque, B.J., Bradbury, R.H., Cooke, R.G., Kay, M.C., Kidwell, S.M., Kirby, M.X., Peterson, C.H., and Jackson, J.B.C. (2006). Depletion, Degradation, and Recovery Potential of Estuaries and Coastal Seas. *Science* *312*, 1806–1809.
- M-**
- Maire, E., Grenouillet, G., Brosse, S., and Villéger, S. (2015). How many dimensions are needed to accurately assess functional diversity? A pragmatic approach for assessing the quality of functional spaces. *Glob. Ecol. Biogeogr.* *24*, 728–740.
- Margalef, R. (1978). Life-forms of phytoplankton as survival alternatives in an unstable environment. *Ocean. Acta* *1*, 493–509.
- Margalef, R., Estrada, M., and Blasco, D. (1980). Functional morphology of organisms involved in red tides, as adapted to decaying turbulences. In: *Toxic Dinoflagellate Blooms*, pp 89–94.

- Marshall, W., and Laybourn-Parry, J. (2002). The balance between photosynthesis and grazing in Antarctic mixotrophic cryptophytes during summer. *Freshw. Biol.* *47*, 2060–2070.
- Maso, M., and Garces, E. (2006). Harmful microalgae blooms (HAB); problematic and conditions that induce them. *Mar. Pollut. Bull.* *53*, 620–630.
- Mason, N.W.H., Mouillot, D., Lee, W.G., and Wilson, J.B. (2005). Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity. *Oikos* *111*, 112–118.
- Mason, N.W.H., and de Bello, F. (2013). Functional diversity: a tool for answering challenging ecological questions. *J. Veg. Sci.* *24*, 777–780.
- Mason, N.W.H., de Bello, F., Mouillot, D., Pavoine, S., and Dray, S. (2013). A guide for using functional diversity indices to reveal changes in assembly processes along ecological gradients. *J. Veg. Sci.* *24*, 794–806.
- Masseret, E., Grzebyk, D., Nagai, S., Genovesi, B., Lasserre, B., Laabir, M., et al. (2009). Unexpected Genetic Diversity among and within Populations of the Toxic Dinoflagellate *Alexandrium catenella* as Revealed by Nuclear Microsatellite Markers. *Appl. Environ. Microbiol.* *75*, 2037–45.
- Maurice, C.F., Bouvier, C., de Wit, R., and Bouvier, T. (2013). Linking the lytic and lysogenic bacteriophage cycles to environmental conditions, host physiology and their variability in coastal lagoons. *Environ. Microbiol.* *15*, 2463–2475.
- Mazouni, N., Gaertner, J.C., DeslousPaoli, J.M., Landrein, S., and d’Oedenberg, M.G. (1996). Nutrient and oxygen exchanges at the water-sediment interface in a shellfish farming lagoon (Thau, France). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *205*, 91–113.
- McCree, K.J. (1972). Test of current definitions of photosynthetically active radiation against leaf photosynthesis data. *Agric. Meteorol.* *10*, 443–453.
- McGlathery, K.J., Anderson, I.C., and Tyler, A.C. (2001). Magnitude and variability of benthic and pelagic metabolism in a temperate coastal lagoon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *216*, 1–15.
- McKie-Krisberg, Z.M., Gast, R.J., and Sanders, R.W. (2015). Physiological Responses of Three Species of Antarctic Mixotrophic Phytoflagellates to Changes in Light and Dissolved Nutrients. *Microb. Ecol.* *70*, 21–29.
- Millet, B. (1989). Hydrodynamic Motions in the Bassin De Thau - Ecological Corroboration of a Numerical-Model of Circulation. *Oceanol. Acta* *12*, 37–46.
- Moore, J.K., and Villareal, T.A. (1996). Buoyancy and growth characteristics of three positively buoyant marine diatoms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *132*, 203–213.
- Morais, P., Chicharo, M.A., and Barbosa, A. (2003). Phytoplankton dynamics in a coastal saline lake (SE-Portugal). *Acta Oecologica-Int. J. Ecol.* *24*, S87–S96.
- Moss, B., Stansfield, J., Irvine, K., Perrow, M., and Phillips, G. (1996). Progressive restoration of a shallow lake: A 12-year experiment in isolation, sediment removal and biomanipulation. *J. Appl. Ecol.* *33*, 71–86.
- Moss, B., Kosten, S., Meerhoff, M., Battarbee, R.W., Jeppesen, E., Mazzeo, N., Havens, K., Lacerot, G., Liu, Z., De Meester, L., Paerl, H., and Scheffer, M. (2011). Allied attack: climate change and eutrophication. *Inland Waters* *1*, 101–105.

- Mouchet, M.A., Villéger, S., Mason, N.W.H., and Mouillot, D. (2010). Functional diversity measures: an overview of their redundancy and their ability to discriminate community assembly rules. *Funct. Ecol.* *24*, 867–876.
- Mouillot, D., Gaillard, S., Aliaume, C., Verlaque, M., Belsher, T., Troussellier, M., and Chi, T.D. (2005). Ability of taxonomic diversity indices to discriminate coastal lagoon environments based on macrophyte communities. *Ecol. Indic.* *5*, 1–17.
- Mouillot, D., Mason, N.W.H., Dumay, O., and Bastow Wilson, J. (2005). Functional regularity: a neglected aspect of functional diversity. *Oecologia* *142*, 353–359.
- Mouillot, D., Graham, N.A.J., Vileger, S., Mason, N.W.H., and Bellwood, D.R. (2013). A functional approach reveals community responses to disturbances. *Trends Ecol. Evol.* *28*, 167–177.
- Mozetic, P., Solidoro, C., Cossarini, G., Socal, G., Precali, R., France, J., Bianchi, F., De Vittor, C., Smolaka, N., and Umani, S.F. (2010). Recent Trends Towards Oligotrophication of the Northern Adriatic: Evidence from Chlorophyll a Time Series. *Estuaries Coasts* *33*, 362–375.
- N-**
- Navarro, M.B., Balseiro, E., and Modenutti, B. (2011). UV radiation simultaneously affects phototrophy and phagotrophy in nanoflagellate-dominated phytoplankton from an Andean shallow lake. *Photochem. Photobiol. Sci.* *10*, 1318–1325.
- Nelson, N.B., Prézelin, B.B., and Bidigare, R.R. (1993). Phytoplankton light absorption and the package effect in California coastal waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *94*, 217–227.
- Neveux, J., and Lantoiné, F. (1993). Spectrofluorometric assay of chlorophylls and phaeopigments using the least squares approximation technique. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* *40*, 1747–1765.
- Newton, A., Icelly, J., Cristina, S., Brito, A., Cardoso, A.C., Colijn, F., Riva, S.D., Gertz, F., Hansen, J.W., Holmer, M., Ivanova, K., Leppakoski, E., Canu, D.M., Mocenni, C., Mudge, S., Murray, N., Pejrup, M., Razinkovas, A., Reizopoulou, S., Perez-Ruzafa, A., Schernewski, G., Schubert, H., Carr, L., Solidoro, C., PierluigiViaroli, and Zaldivar, J.-M. (2014). An overview of ecological status, vulnerability and future perspectives of European large shallow, semi-enclosed coastal systems, lagoons and transitional waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *140*, 95–122.
- Nishikawa, T., Hori, Y., Nagai, S., Miyahara, K., Nakamura, Y., Harada, K., Tanda, M., Manabe, T., and Tada, K. (2010). Nutrient and Phytoplankton Dynamics in Harima-Nada, Eastern Seto Inland Sea, Japan During a 35-Year Period from 1973 to 2007. *Estuaries Coasts* *33*, 417–427.
- Nixon, S.W. (1982). Nutrient dynamics, primary production and fisheries yields of lagoons. *Oceanol. Acta* 357–371.
- Nixon, S.W. (1995). Coastal Marine Eutrophication - a Definition, Social Causes, and Future Concerns. *Ophelia* *41*, 199–219.
- Nixon, S.W. (2009). Eutrophication and the macroscope. *Hydrobiologia* *629*, 5–19.
- Niyogi, K.K., Bjorkman, O., and Grossman, A.R. (1997). Chlamydomonas Xanthophyll Cycle Mutants Identified by Video Imaging of Chlorophyll Fluorescence Quenching. *Plant Cell* *9*, 1369–1380.
- Norberg, J. (2004). Biodiversity and ecosystem functioning: A complex adaptive systems

approach. *Limnol. Oceanogr.* *49*, 1269–1277.

-O-

Oren, A. (1993). Availability, uptake and turnover of glycerol in hypersaline environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* *12*, 15–23.

Orth, R.J., Moore, K.A., Marion, S.R., Wilcox, D.J., and Parrish, D.B. (2012). Seed addition facilitates eelgrass recovery in a coastal bay system. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* *448*, 177–195.

Ouisse, V., Fiandrino, A., De Wit, R., Malet, N. (2013). Restauration des écosystèmes lagunaires : évaluation du rôle du sédiment et des herbiers à phanérogames Rapport final du Contrat n° 2012 1835. Report in French, Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, Montpellier, France: [http:// archimer.ifremer.fr/doc/00166/27774/](http://archimer.ifremer.fr/doc/00166/27774/)

-P-

Padisak, J., and Reynolds, C.S. (1998). Selection of phytoplankton associations in Lake Balaton, Hungary, in response to eutrophication and restoration measures, with special reference to the cyanoprokaryotes. *Hydrobiologia* *384*, 41–53.

Padisák, J., Borics, G., Fehér, G., Grigorszky, I., Oldal, I., Schmidt, A., and Zábóné-Doma, Z. (2003). Dominant species, functional assemblages and frequency of equilibrium phases in late summer phytoplankton assemblages in Hungarian small shallow lakes. *Hydrobiologia* *502*, 157–168.

Paerl, H.W., Dyble, J., Moisander, P.H., Noble, R.T., Piehler, M.F., Pinckney, J.L., Steppe, T.F., Twomey, L., and Valdes, L.M. (2003a). Microbial indicators of aquatic ecosystem change: current applications to eutrophication studies. *FEMS Microbiol. Ecol.* *46*, 233–246.

Paerl, H.W., Valdes, L.M., Pinckney, J.L., Piehler, M.F., Dyble, J., and Moisander, P.H. (2003b). Phytoplankton Photopigments as Indicators of Estuarine and Coastal Eutrophication. *BioScience* *53*, 953–964.

Paerl, H.W., Rossignol, K.L., Hall, N.S., Peierls, B.L., and Wetz, M.S. (2010). Phytoplankton Community Indicators of Short- and Long-term Ecological Change in the Anthropogenically and Climatically Impacted Neuse River Estuary, North Carolina, USA. *Estuaries Coasts* *33*, 485–497.

Palfy, K., Presing, M., and Voeroes, L. (2013). Diversity patterns of trait-based phytoplankton functional groups in two basins of a large, shallow lake (Lake Balaton, Hungary) with different trophic state. *Aquat. Ecol.* *47*, 195–210.

Parsons, T.R., Harrison, P.J., and Waters, R. (1978). An experimental simulation of changes in diatom and flagellate blooms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* *32*, 285–294.

Pecqueur, D., Vidussi, F., Fouilland, E., Le Floc'h, E., Mas, S., Roques, C., Salles, C., Tournoud, M.-G., and Mostajir, B. (2011). Dynamics of microbial planktonic food web components during a river flash flood in a Mediterranean coastal lagoon. *Hydrobiologia* *673*, 13–27.

Pérez-Ruzafa, A., Marcos, C., Pérez-Ruzafa, I.M., and Pérez-Marcos, M. (2013). Are coastal lagoons physically or biologically controlled ecosystems? Revisiting r vs. K strategies in coastal lagoons and estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *132*, 17–33.

- Pernet, F., Malet, N., Pastoureaud, A., Vaguer, A., Quere, C., and Dubroca, L. (2012). Marine diatoms sustain growth of bivalves in a Mediterranean lagoon. *J. Sea Res.* *68*, 20–32.
- Philippart, C.J.M., Beukema, J.J., Cadée, G.C., Dekker, R., Goedhart, P.W., Iperen, J.M. van, Leopold, M.F., and Herman, P.M.J. (2007). Impacts of Nutrient Reduction on Coastal Communities. *Ecosystems* *10*, 96–119.
- Phillips, G., Kelly, A., Pitt, J.A., Sanderson, R., and Taylor, E. (2005). The recovery of a very shallow eutrophic lake, 20 years after the control of effluent derived phosphorus. *Freshw. Biol.* *50*, 1628–1638.
- Pospelova, V., Chmura, G.L., and Walker, H.A. (2004). Environmental factors influencing the spatial distribution of dinoflagellate cyst assemblages in shallow lagoons of southern New England (USA). *Rev. Palaeobot. Palynol., Middle latitude dinoflagellates and their cysts* *128*, 7–34.
- Piehlner, M.F., Twomey, L.J., Hall, N.S., and Paerl, H.W. (2004). Impacts of inorganic nutrient enrichment on phytoplankton community structure and function in Pamlico Sound, NC, USA. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *61*, 197–209.
- R-**
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Raven, J.A. (1998). The twelfth Tansley Lecture. Small is beautiful: the picophytoplankton. *Funct. Ecol.* *12*, 503–513.
- Raven, J.A., Beardall, J., Flynn, K.J., and Maberly, S.C. (2009). Phagotrophy in the origins of photosynthesis in eukaryotes and as a complementary mode of nutrition in phototrophs: relation to Darwin's insectivorous plants. *J. Exp. Bot.* *60*, 3975–3987.
- Reynolds, C.S. (1988). Functional morphology and the adaptive strategies of freshwater phytoplankton.
- Reynolds, C.S. (2006). *Ecology of phytoplankton* (Cambridge; New York: Cambridge University Press).
- Reynolds, C.S., Huszar, V., Kruk, C., Naselli-Flores, L., and Melo, S. (2002). Towards a functional classification of the freshwater phytoplankton. *J. Plankton Res.* *24*, 417–428.
- Roche, P.A., Billen, G., Bravard, J.-P., Décamps, H., Pennequin, D., Vindimian, E., and Wasson, J.-G. (2005). Les enjeux de recherche liés à la directive-cadre européenne sur l'eau. *Comptes Rendus Geosci.* *337*, 243–267.
- Rochette, S., Rivot, E., Morin, J., Mackinson, S., Riou, P., and Le Pape, O. (2010). Effect of nursery habitat degradation on flatfish population: Application to *Solea solea* in the Eastern Channel (Western Europe). *J. Sea Res.* *64*, 34–44.
- Rodrigues, L.C., Simoes, N.R., Bovo-Scomparin, V.M., Jati, S., Santana, N.F., Roberto, M.C., et al. (2015). Phytoplankton alpha diversity as an indicator of environmental changes in a neotropical floodplain. *Ecol. Indic.* *48*, 334–341.
- Rodriguez, F., Pazos, Y., Maneiro, J., and Zapata, M. (2003). Temporal variation in phytoplankton assemblages and pigment composition at a fixed station of the Ria of Pontevedra (NW Spain). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *58*, 499–515.

- Rojo, C., Cobelas, M., and Arauzo, M. (1994). An Elementary, Structural-Analysis of River Phytoplankton. *Hydrobiologia* 289, 43–55.
- Roselli, L., and Basset, A. (2015). Decoding Size Distribution Patterns in Marine and Transitional Water Phytoplankton: From Community to Species Level. *PLoS ONE* 10, e0127193.
- Rosenfeld, J.S. (2002). Functional redundancy in ecology and conservation. *Oikos* 98, 156–162.
- Roy, S., Llewellyn, C.A., and Egeland, E.S. (2011). *Phytoplankton Pigments: Characterization, Chemotaxonomy and Applications in Oceanography* (Cambridge University Press).
- Ruggiu, D., Morabito, G., Panzani, P., and Pugnetti, A. (1998). Trends and relations among basic phytoplankton characteristics in the course of the long-term oligotrophication of Lake Maggiore (Italy). *Hydrobiologia* 370, 243–257.
- S-**
- Salles, J.M. (2010). Evaluer la biodiversité et les services écosystémiques: Pour quoi faire?
- Salmaso, N., and Padisák, J. (2007). Morpho-Functional Groups and phytoplankton development in two deep lakes (Lake Garda, Italy and Lake Stechlin, Germany). *Hydrobiologia* 578, 97–112.
- Santos, V.S., Villac, M.C., Tenenbaum, D.R., and Paranhos, R. (2007). Auto- and heterotrophic nanoplankton and filamentous bacteria of Guanabara Bay (RJ, Brazil): estimates of cell/filament numbers versus carbon content. *Braz. J. Oceanogr.* 55, 133–143.
- Scheffer, M., Hosper, S.H., Meijer, M.-L., Moss, B., and Jeppesen, E. (1993). Alternative equilibria in shallow lakes. *Trends Ecol. Evol.* 8, 275–279.
- Scheffer, M., and Carpenter, S.R. (2003). Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. *Trends Ecol. Evol.* 18, 648–656.
- Schluter, L., Mohlenberg, F., Havskum, H., and Larsen, S. (2000). The use of phytoplankton pigments for identifying and quantifying phytoplankton groups in coastal areas: testing the influence of light and nutrients on pigment/chlorophyll a ratios. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 192, 49–63.
- Schramm, W. (1999). Factors influencing seaweed responses to eutrophication: some results from EU-project EUMAC. *J. Appl. Phycol.* 11, 69–78.
- Science et vie [WWW Document] (2015) URL <http://www.science-et-vie.com/2015/11/cop21-comment-le-changement-climatique-affectera-la-france/> (accessed 1.26.16).
- Serpa, D., Falcao, M., Duarte, P., da Fonseca, L.C., and Vale, C. (2007). Evaluation of ammonium and phosphate release from intertidal and subtidal sediments of a shallow coastal lagoon (Ria Formosa-Portugal): A modelling approach. *Biogeochemistry* 82, 291–304.
- Sieburth, J.M., Smetacek, V., and Lenz, J. (1978). Pelagic ecosystem structure: Heterotrophic compartments of the plankton and their relationship to plankton size fractions 1. *Limnol. Oceanogr.* 23, 1256–1263.
- Silva, P.C.L.D., Goncalves, F., Ribeiro, R., and Soares, A.M.V.M. (1997). First evaluation of the restoration of Braças Lagoon (Figueira da Foz - Portugal). *Arch. Für Hydrobiol.* 141, 109–125.
- Simon, R.D. (1971). Cyanophycin Granules from the Blue-Green Alga *Anabaena cylindrica*: A

- Reserve Material Consisting of Copolymers of Aspartic Acid and Arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *68*, 265–267.
- Smalley, G.W., and Coats, D.W. (2002). Ecology of the red-tide dinoflagellate *Ceratium furca*: Distribution, mixotrophy, and grazing impact on ciliate populations of Chesapeake Bay. *J. Eukaryot. Microbiol.* *49*, 63–73.
- Smayda, T.J. (1998). Patterns of variability characterizing marine phytoplankton, with examples from Narragansett Bay. *Ices J. Mar. Sci.* *55*, 562–573.
- Smayda, T.J. (2002). Adaptive Ecology, Growth Strategies and the Global Bloom Expansion of Dinoflagellates. *J. Oceanogr.* *58*, 281–294.
- Smayda, T.J., and Reynolds, C.S. (2001). Community assembly in marine phytoplankton: application of recent models to harmful dinoflagellate blooms. *J. Plankton Res.* *23*, 447–461.
- Smayda, T.J., and Reynolds, C.S. (2003). Strategies of marine dinoflagellate survival and some rules of assembly. *J. Sea Res.* *49*, 95–106.
- Smith, V.H., Tilman, G.D., Nekola, J.C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* *100*, 179–196.
- Smith, V.H. (2003). Eutrophication of freshwater and coastal marine ecosystems - A global problem. *Environ. Sci. Pollut. Res.* *10*, 126–139.
- Smith, V.H. (2006). Responses of estuarine and coastal marine phytoplankton to nitrogen and phosphorus enrichment. *Limnol. Oceanogr.* *51*, 377–384.
- Sommer, U., Padisak, J., Reynolds, C., and Juhasznagy, P. (1993). Hutchinson Heritage - the Diversity-Disturbance Relationship in Phytoplankton. *Hydrobiologia* *249*, 1–7.
- Søndergaard, M., Jeppesen, E., Lauridsen, T.L., Skov, C., Van Nes, E.H., Roijackers, R., Lammens, E., and Portielje, R. (2007). Lake restoration: successes, failures and long-term effects. *J. Appl. Ecol.* *44*, 1095–1105.
- Souchu, P., Gasc, A., Collos, Y., Vaquer, A., Tournier, H., Bibent, B., and Deslous-Paoli, J.M. (1998). Biogeochemical aspects of bottom anoxia in a Mediterranean lagoon (Thau, France). *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* *164*, 135–146.
- Souchu, P., Bec, B., Smith, V.H., Laugier, T., Fiandrino, A., Benau, L., Orsoni, V., Collos, Y., and Vaquer, A. (2010). Patterns in nutrient limitation and chlorophyll a along an anthropogenic eutrophication gradient in French Mediterranean coastal lagoons. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* *67*, 743–753.
- Sournia, A. (1982). Form and Function in Marine Phytoplankton. *Biol. Rev.* *57*, 347–394.
- Spatharis, S., Tsirtsis, G., Danielidis, D.B., Chi, T.D., and Mouillot, D. (2007). Effects of pulsed nutrient inputs on phytoplankton assemblage structure and blooms in an enclosed coastal area. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* *73*, 807–815.
- Spatharis, S., Dolapsakis, N.P., Economou-Amilli, A., Tsirtsis, G., and Danielidis, D.B. (2009). Dynamics of potentially harmful microalgae in a confined Mediterranean Gulf-Assessing the risk of bloom formation. *Harmful Algae* *8*, 736–743.
- Staehr, P.A., Markager, S., and Sand-Jensen, K. (2004). Pigment specific in vivo light absorption of

phytoplankton from estuarine, coastal and oceanic waters. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 275, 115–128.

Stickney, H.L., Hood, R.R., and Stoecker, D.K. (2000). The impact of mixotrophy on planktonic marine ecosystems. *Ecol. Model.* 125, 203–230.

Stoecker, D.K. (1999). Mixotrophy among dinoflagellates. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 397–401.

Stomp, M., Huisman, J., Vörös, L., Pick, F.R., Laamanen, M., Haverkamp, T., and Stal, L.J. (2007). Colourful coexistence of red and green picocyanobacteria in lakes and seas. *Ecol. Lett.* 10, 290–298.

Strom, S.L. (2008). Microbial Ecology of Ocean Biogeochemistry: A Community Perspective. *Science* 320, 1043–1045.

-T-

Tagliapietra, D., and Ghirardini, A.V. (2006). Notes on coastal lagoon typology in the light of the EU Water Framework Directive: Italy as a case study. *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 16, 457–467.

Tambi, H., Flaten, G.A.F., Egge, J.K., Bodtker, G., Jacobsen, A., and Thingstad, T.F. (2009). Relationship between phosphate affinities and cell size and shape in various bacteria and phytoplankton. *Aquat. Microb. Ecol.* 57, 311–320.

Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., and Siemann, E. (1997). The Influence of Functional Diversity and Composition on Ecosystem Processes. *Science* 277, 1300–1302.

Törnroos, A., and Bonsdorff, E. (2012). Developing the multitrait concept for functional diversity: lessons from a system rich in functions but poor in species. *Ecol. Appl.* 22, 2221–2236.

Trask, B., Vandenengh, G., and Elgershuizen, J. (1982). Analysis of Phytoplankton by Flow-Cytometry. *Cytometry* 2, 258–264.

-U-

Umgiesser, G., Ferrarin, C., Cucco, A., De Pascalis, F., Bellafiore, D., Ghezzi, M., and Bajo, M. (2014). Comparative hydrodynamics of 10 Mediterranean lagoons by means of numerical modeling. *J. Geophys. Res. Oceans* 119, 2212–2226.

Utermöhl, H. (1931). Neue Wege in der Quantitativen Erfassung des Planktons. (Mit besondere Berücksichtigung des Ultraplanktons). *Verhandlungen Int. Ver. Limnol.* 5, 567–596.

-V-

Vallina, S.M., Follows, M.J., Dutkiewicz, S., Montoya, J.M., Cermeno, P., and Loreau, M. (2014). Global relationship between phytoplankton diversity and productivity in the ocean. *Nat. Commun.* 5, 4299.

Vaquer-Sunyer, R., Conley, D.J., Muthusamy, S., Lindh, M.V., Pinhassi, J., and Kritzberg, E.S. (2015). Dissolved Organic Nitrogen Inputs from Wastewater Treatment Plant Effluents Increase Responses of Planktonic Metabolic Rates to Warming. *Environ. Sci. Technol.* 49, 11411–11420.

Van Donk, E., Ianora, A., and Vos, M. (2011). Induced defences in marine and freshwater phytoplankton: a review. *Hydrobiologia* 668, 3–19.

- Van Heukelem, L., and Thomas, C.S. (2001). Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *J. Chromatogr. A* *910*, 31–49.
- Van Nes, E.H., and Scheffer, M. (2007). Slow recovery from perturbations as a generic indicator of a nearby catastrophic shift (Vol 169, pg 738, 2007). *Am. Nat.* *170*, 660–660.
- Verity, P., Stoecker, D., Sieracki, M., Burkill, P., Edwards, E., and Tronzo, C. (1993). Abundance, Biomass and Distribution of Heterotrophic Dinoflagellates During the North-Atlantic Spring Bloom. *Deep-Sea Res. Part II-Top. Stud. Oceanogr.* *40*, 227–244.
- Verity, P.G., and Borkman, D.G. (2009). A Decade of Change in the Skidaway River Estuary. III. Plankton. *Estuaries Coasts* *33*, 513–540.
- Villéger, S., Mason, N.W.H., and Mouillot, D. (2008). New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology. *Ecology* *89*, 2290–2301.
- Villéger, S., Miranda, J.R., Hernandez, D.F., and Mouillot, D. (2012). Low Functional β -Diversity Despite High Taxonomic β -Diversity among Tropical Estuarine Fish Communities. *PLoS ONE* *7*, e40679.
- Violle, C., Navas, M.-L., Vile, D., Kazakou, E., Fortunel, C., Hummel, I., and Garnier, E. (2007). Let the concept of trait be functional! *Oikos* *116*, 882–892.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H., and Tilman, D. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: Sources and consequences. *Ecol. Appl.* *7*, 737–750.
- Vörös, L., Callieri, C., Balogh, K.V., and Bertoni, R. (1998). Freshwater picocyanobacteria along a trophic gradient and light quality range. *Hydrobiologia* *369-370*, 117–125.
- W-**
- Walsby, A.E., Hayes, P.K., Boje, R., and Stal, L.J. (1997). The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *New Phytol.* *136*, 407–417.
- Watson, S.B., McCauley, E., and Downing, J.A. (1997). Patterns in phytoplankton taxonomic composition across temperate lakes of differing nutrient status. *Limnol. Oceanogr.* *42*, 487–495.
- Weithoff, G. (2003). The concepts of ‘plant functional types’ and ‘functional diversity’ in lake phytoplankton – a new understanding of phytoplankton ecology? *Freshw. Biol.* *48*, 1669–1675.
- Weithoff, G., Rocha, M.R., and Gaedke, U. (2015). Comparing seasonal dynamics of functional and taxonomic diversity reveals the driving forces underlying phytoplankton community structure. *Freshw. Biol.* *60*, 758–767.
- Woelfel, J., Schoknecht, A., Schaub, I., Enke, N., Schumann, R., and Karsten, U. (2014). Growth and photosynthesis characteristics of three benthic diatoms from the brackish southern Baltic Sea in relation to varying environmental conditions. *Phycologia* *53*, 639–651.
- Wood, J.D., and Bukaveckas, P.A. (2014). Increasing Severity of Phytoplankton Nutrient Limitation Following Reductions in Point Source Inputs to the Tidal Freshwater Segment of the James River Estuary. *Estuaries Coasts* *37*, 1188–1201.

Working Group 2.3 - REFCOND Water Framework Directive - Common Implementation Strategy (2000/60/EC) - Policy Summary to Guidance document No 10 - Rivers and Lakes - Typology, Reference Conditions and Classification systems.

Worm, B., and Lotze, H.K. (2006). Effects of eutrophication, grazing, and algal blooms on rocky shores. *Limnol. Oceanogr.* 51, 569–579.

Worm, B., Barbier, E.B., Beaumont, N., Duffy, J.E., Folke, C., Halpern, B.S., Jackson, J.B.C., Lotze, H.K., Micheli, F., Palumbi, S.R., et al. (2006). Impacts of Biodiversity Loss on Ocean Ecosystem Services. *Science* 314, 787–790.

Wright, S., Jeffrey, S., Mantoura, R., Llewellyn, C., Bjornland, T., Repeta, D., and Welschmeyer, N. (1991). Improved HPLC method for the analysis of chlorophylls and carotenoids in marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 77, 183–196.

-Y-

Yin, K., Song, X.-X., Liu, S., Kan, J., and Qian, P.-Y. (2008). Is inorganic nutrient enrichment a driving force for the formation of red tides? A case study of the dinoflagellate *Scrippsiella trochoidea* in an embayment. *Harmful Algae* 8, 54–59.

Yamamoto, T. (2003). The Seto Inland Sea - eutrophic or oligotrophic? *Mar. Pollut. Bull.* 47, 37–42.

-Z-

Zhang, L.Y., Sun, J., Liu, D.Y., and Yu, Z.S. (2005). Studies on growth rate and grazing mortality rate by microzooplankton of size-fractionated phytoplankton in spring and summer in the Jiaozhou Bay, China. *Acta Oceanol. Sin.* 24, 85–101.

Zilius, M., Bartoli, M., Bresciani, M., Katarzyte, M., Ruginis, T., Petkuvienė, J., Lubiene, I., Giardino, C., Bukaveckas, P.A., Wit, R. de, and Razinkovas-Baziukas, A. (2013). Feedback Mechanisms Between Cyanobacterial Blooms, Transient Hypoxia, and Benthic Phosphorus Regeneration in Shallow Coastal Environments. *Estuaries Coasts* 37, 680–694.

Résumé

Les lagunes Méditerranéennes ont été profondément dégradées par les pressions anthropiques, en particulier le complexe des étangs Palavasiens qui a souffert d'un enrichissement nutritif intensif provenant de l'effluent de la station de traitement des eaux de l'agglomération Montpellieraine. Cet enrichissement a engendré un gradient trophique de la méso- à l'hypertrophie dans ces huit lagunes, altérant profondément la structure des producteurs primaires vers une dominance du compartiment phytoplanctonique. Le phytoplancton témoigne d'une réponse rapide à la variabilité environnementale, et son importante diversité lui permet de refléter une grande diversité de processus écologiques et de fonctionnement écosystémiques. Ce compartiment constitue donc un indicateur du fonctionnement des écosystèmes aquatiques pertinent et fréquemment utilisé.

Depuis Décembre 2005, l'effluent responsable de l'eutrophisation des lagunes Palavasiennes a été dévié dans la mer Méditerranée. Cette mesure a réduit de 70 à 83 % les apports en phosphore et azote inorganiques aux lagunes, initiant un processus de restauration écologique. Cette thèse vise à mieux comprendre les processus de restauration des lagunes Méditerranéennes via l'étude des trajectoires d'évolution des communautés phytoplanctoniques. L'analyse de 14 ans de données de 2000 à 2013 a permis de montrer que la restauration engagée par la re-oligotrophisation des lagunes a entraîné une amélioration de la qualité de l'eau principalement liée à la réduction drastique de la biomasse phytoplanctonique. Cette réduction a illustré la chute des abondances de Diatomées picoeucaryotiques, qui étaient particulièrement favorisées par les apports nutritifs diffus provenant de l'effluent. L'analyse des trajectoires des communautés phytoplanctoniques depuis la réduction des apports a mis en évidence une modification de leur composition exprimée par une hausse des abondances des Algues vertes et des Dinophytes. Cette modification reflète le changement induit par la re-oligotrophisation de l'origine et de la forme des nutriments disponibles. Elle traduit notamment l'importance des flux d'ammonium et de phosphates sédimentaires pour lesquels les Algues vertes sont très compétitives, et l'importance des stocks de matière organique favorisant les espèces mixotrophes. Le picophytoplancton qui dominait exclusivement les communautés est aujourd'hui transitoirement remplacé par le nano- et le microphytoplancton au cours des efflorescences saisonnières, grâce à des stratégies d'acquisition et d'utilisation des nutriments différentes. La variabilité saisonnière de la diversité taxonomique et fonctionnelle des communautés phytoplanctoniques de deux lagunes du complexe des étangs Palavasiens aux niveaux trophiques contrastés a été approfondie, et comparée à celle d'une lagune oligotrophe. Cette analyse a mis en évidence des particularités des communautés, témoignant de fonctionnements écologiques distincts principalement lié à la dégradation des lagunes par l'eutrophisation. Les résultats de cette thèse indiquent que les processus de restaurations restent inachevés. La biomasse phytoplanctonique tend à ré-augmenter depuis 2012 en réponse à des conditions climatiques favorables. Le phytoplancton des lagunes Palavasiennes réponds toujours fortement à un pulse nutritif, illustrant la vulnérabilité de ces lagunes vis-à-vis de l'enrichissement d'origine anthropique.

Mots-clés : Phytoplancton, eutrophisation, restauration, re-oligotrophisation, diversité, lagunes côtières

Abstract

Mediterranean coastal lagoons have been deeply degraded by anthropic pressures, especially those from the Palavasian complex, which have affected by an intensive nutrient enrichment from the sewage treatment plant of the Montpellier agglomeration. This enrichment displayed a trophic gradient from mesotrophy to hypertrophy in these height lagoons. It also altered primary producers communities by favoring fast growing phytoplankton. The phytoplankton responds very fast to environmental variability. Its high diversity allows it to reflect a huge diversity of ecological processes and ecosystem functioning. These characteristics enable it to be an efficient and widely used indicator of aquatic ecosystems functioning.

In December 2005, the effluent responsible of the eutrophication of the Palavasian lagoons was diverted in the Mediterranean Sea. This measure drove a reduction of the inorganic phosphorous and nitrogen inputs to the lagoons from 70 to 83 %, and began an ecological restoration process. This thesis aimed to improve the understanding of the restoration process of Mediterranean coastal lagoons by studying phytoplankton communities' trajectories. The analysis of fourteen years data from 2000 to 2013 established that the restoration initiated by the re-oligotrophication of coastal lagoons led to an improvement of the water quality, linked to a drastic reduction of the phytoplankton biomass. This reduction highlighted a sharp drop of the picoeukaryotic Diatoms, which were particularly enhanced by the diffused nutrient inputs from the effluent. The analysis of phytoplankton trajectories since the nutrient inputs reduction showed a modification of composition highlighted by an increase of abundances of Green algae and Dinophytes. This modification reflects the change of the origin and the form of available nutrients caused by the re-oligotrophication. It especially emphasize the importance of ammonium and phosphate benthic fluxes for which Green algae are the most competitive, and the importance of benthic stocks of organic matter which favor mixotrophic species. Picophytoplankton, which was exclusively dominant in the Palavasian lagoons before the diversion, is now temporarily replaced by nano- and microphytoplankton during seasonal blooms thank to other strategies to acquire and use nutrients. The seasonal variability of taxonomic and functional phytoplankton diversity of two lagoons from the Palavasian complex with diverse trophic status was deepened, and compared to those of an oligotrophic lagoon. It highlighted some particularities of the phytoplankton communities to fit to distinct ecosystems functioning linked to the degradation caused by eutrophication. The restoration is still unfinished today. The phytoplankton biomass increases since 2012 in response to suitable climatic conditions. The phytoplankton of the Palavasian lagoons still quickly responds to a nutrient pulse, highlighting the lagoon vulnerability to an anthropic nutrient input.

Key words: Phytoplankton, eutrophication, restoration, re-oligotrophication, diversity, coastal lagoons