

MUSÉUM NATIONAL



D'HISTOIRE NATURELLE

École Doctorale Sciences de la Nature et de l'Homme – ED 227

Année 2013

N°attribué par la bibliothèque

□□□□□□□□□□

THÈSE

**Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE**

Spécialité : Écologie microbienne marine

Présentée et soutenue publiquement par

Claire PASSARELLI

Le 03 décembre 2013

**Composition, rôles et devenir des exopolymères
dans les biofilms des sédiments marins côtiers**

Sous la direction de : Dr Tarik MEZIANE, Maître de conférences, MNHN

JURY :

M. Tarik MEZIANE

Maître de conférences, MNHN

Directeur de Thèse

M. Cédric HUBAS

Maître de conférences, MNHN

Co-encadrant

M. Tom MOENS

Professeur, université de Ghent (Belgique)

Rapporteur

M. Francis ORVAIN

Maître de conférences, université de Caen Basse-Normandie

Rapporteur

M. Jacques CLAVIER

Professeur, université de Bretagne Occidentale

Examineur

M. David M. PATERSON

Professeur, université de St Andrews (Écosse)

Examineur

REMERCIEMENTS

Trois ans de travail de thèse s'achèvent, presque quatre ans pour moi dans l'équipe ResAqua. Il est temps de remercier (autrement qu'avec des gâteaux...) les nombreuses personnes qui ont permis la réalisation de cette thèse.

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté de prendre du temps pour juger ce travail ; en particulier merci aux rapporteurs, Dr Francis Orvain et Prof. Tom Moens.

Je remercie mon directeur de thèse Tarik Meziane de m'avoir acceptée dans l'équipe, de m'avoir transmis ses connaissances sur les lipides au labo, et sur la politique et l'histoire pendant les pauses déjeuner. Un grand merci à mon « directeur de thèse officieux » Cédric Hubas qui, en plus de m'avoir fait découvrir les EPS, a (presque) réussi à me mettre à R, malgré mes réticences. Merci à vous deux pour m'avoir si bien encadrée et accompagnée, et d'avoir réussi à faire de trois ans de thèse trois années très agréables.

Un immense merci à Najet Thiney pour l'énorme travail qu'elle a fait pour moi au laboratoire. Sans elle, je serai encore en train d'extraire des lipides et de peser des sucres.

Merci à Jean-Michel et Nathalie d'avoir accompagné le début de ma thèse, on a passé de bons moments ensemble dans le grenier des étudiants.

Merci à Domy pour les sorties à la piscine, les discussions de futures puis de jeunes mamans. C'était très chouette de vivre cette grande aventure à deux !

Merci à toutes les stagiaires qui m'ont aidée à mettre en place et à faire tourner les expériences au laboratoire, et qui m'ont évité une belle quantité de travail : Audrey, Julie, Marie, Marion, Ersilia.

Enfin, merci à tous, à l'équipe ResAqua en général, à Simone et Isabelle, et aux visiteurs pour avoir fait que ces trois années se sont passées dans la joie et la bonne humeur.

Diverses analyses n'auraient pu se faire sans l'aide d'autres chercheurs. Merci en particulier à Christian Jeanthon et à Dominique Boeuf de m'avoir accueillie à Roscoff et de m'avoir initiée aux joies (et aux peines) de la DGGE.

Merci à Bruno Jesus et Mickaël Ruivo d'avoir pris le temps d'analyser mes pigments en HPLC.

Merci à David M. Paterson de nous avoir procuré le MagPI.

Merci à Claude Le Milbeau, Patrick Albéric et Matthieu Babin pour les analyses en GC-IRMS.

Merci à Tom Moens de nous avoir fourni les nématodes, et à Annelien Rigaux de nous les avoir amenés. Je remercie également Annelien de ne pas être partie en courant quand on lui a dit qu'il fallait mettre les 4000 nématodes un par un dans les microcosmes, et de nous avoir aidé à les répartir.

Merci à Agnès Travers de nous avoir fourni les souches de biosenseurs pour le quorum sensing.

Enfin, merci à Aude Andouche pour son aide avec le microscope à épifluorescence.

Un grand merci à Frédéric Olivier de m'avoir fait découvrir le magnifique archipel de Chausey et d'avoir lancé des travaux de recherches là-bas. Ne serait-ce que pour les couchers de soleils vus du sémaphore, ça valait le coup.

Merci beaucoup au SyMEL et à sa directrice Emmanuelle Elouard de nous avoir permis de mettre en place l'expérience sur l'archipel, ainsi qu'à Isabelle Rauss du Conservatoire du littoral pour son aide avec les conventions.

L'expérience n'aurait pas pu être menée sans l'aide efficace et sympathique des gardes du littoral, en particulier Thomas Abiven, Arnaud Tanguy, Yann Turgis, Marie-France Bernard et Éric Oulhen. Merci également à l'équipage du Gwen Ha Ruz de nous avoir quelque fois emmenés sur le site, et de nous avoir régulièrement transporté du matériel.

Merci à Aline Migné d'avoir accepté de participer à l'expérience, de nous avoir amené les cloches et de la bonne humeur de Roscoff (voire même des œufs de Pâques). Merci également à Renaud Michel et Dominique Davoult d'être venus en renfort quand nécessaire.

Merci aux nombreuses personnes qui ont accepté de venir me prêter main forte sur le terrain, même quand on avait des dizaines de kilos de sable à transporter : bien sûr Cédric et Tarik, mais aussi Jean-Michel, Audrey, Julie, Hector, Véronique, Adelaïde, Nathalie, Domy et Marie (sous la neige, et sans chauffage !).

Merci à l'équipage de la navette pour n'avoir jamais râlé même devant nos montagnes de matériel, et de nous avoir même aidés à le charger et décharger.

Merci au gérant de l'Etap Hotel pour son accueil sympathique à Granville, et à l'oncle Scott pour ses Texas Burger qui nous ont permis d'accumuler des réserves avant le terrain. Même si on aurait aimé manger plus souvent dans le petit wagon.

Merci également aux homards qui ont, lors de nos séjours à Chausey, accepté de sacrifier leur corps (et leurs pinces) pour la science (ou plutôt pour les scientifiques).

Je remercie également les personnes qui m'ont aidée à écrire et améliorer ce manuscrit.

Merci à Agathe, Anne-Sophie, Charlotte et Marie d'avoir accepté de prendre du temps pour relire des chapitres.

Merci à Hector pour la mise en page et pour m'avoir empêchée (à plusieurs reprises) de jeter mon PC par la fenêtre.

Enfin, last but not least, un grand merci à Marianne pour m'avoir offert assez de chocolat pour garder le moral et mener à bien l'écriture de cette thèse.

Un immense merci, enfin, à ma famille et à mes amis, qui m'ont encouragée et motivée pendant toutes mes études, en particulier pendant ces dernières années.

Un remerciement spécial à Laure-Line, qui par esprit de solidarité a décidé de soutenir le même jour que moi.

Pour m'avoir soutenue et encouragée, pour m'avoir aidée sur le terrain et dans l'écriture de mon manuscrit, pour m'avoir réconfortée à coup de macarons et avoir écumé tous les chocolatiers de Paris, pour ne pas avoir fui quand on a commencé à parler de mariage, bébé et soutenance de thèse la même année, et pour bien plus encore, un grand merci du fond du cœur à toi Hector.

À ma mère,

SOMMAIRE

<i>Remerciements</i>	3
<i>Sommaire</i>	9
INTRODUCTION GÉNÉRALE	13
<i>Les biofilms en zone intertidale</i>	15
<i>Les EPS, matrice du biofilm</i>	23
<i>Rôles des EPS</i>	32
<i>Objectifs de l'étude</i>	42
CHAPITRE I – MÉTHODES D'ANALYSE	45
<i>Analyse de la composition en acides gras</i>	47
<i>DGGE</i>	50
<i>Mesure des abondances bactériennes</i>	56
<i>Dosage des chlorophylles</i>	57
<i>Analyse des pigments par HPLC</i>	58
<i>Dosage des EPS colloïdaux</i>	60
<i>Analyse de la composition des EPS en monosaccharides</i>	61
<i>Quantification des composés du quorum sensing (QS)</i>	63
<i>Analyses isotopiques</i>	64
<i>Mesure des activités exo-enzymatiques</i>	66
<i>Mesure des flux de carbone à l'interface air – sédiment</i>	71
<i>Mesure de la stabilité du sédiment</i>	73
<i>Statistiques</i>	77
<i>Analyses dans les différentes expériences</i>	81
CHAPITRE II – ÉVOLUTION SAISONNIÈRE DES BIOFILMS : APPROCHE MULTI-MARQUEURS	85
<i>Abstract</i>	86
<i>Résumé</i>	87
<i>Introduction</i>	88
PARTIE 1 – COMPOSITION DES EPS EN LIEN AVEC LES ASSEMBLAGES BENTHIQUES	91
<i>Résumé</i>	92
<i>Multi-marker characterisation of microbial biofilms in intertidal flats</i>	93
<i>Abstract</i>	93
<i>Introduction</i>	94
<i>Material and methods</i>	97
<i>Results</i>	105
<i>Discussion</i>	117

Acknowledgment	125
<i>Conclusion</i>	126
PARTIE 2 – PARAMÈTRES DU BIOFILM EN LIEN AVEC DIVERSES FONCTIONS DE L'ÉCOSYSTÈME	127
<i>Matériel et méthodes</i>	128
<i>Résultats</i>	134
<i>Discussion</i>	142
CHAPITRE III – DEVENIR DES EPS DANS LES RÉSEAUX TROPHIQUES	151
<i>Abstract</i>	152
<i>Résumé</i>	153
<i>Introduction</i>	154
PARTIE 1 – TRANSFERT DES MICROORGANISMES ET DE LEURS EPS DANS LES RÉSEAUX TROPHIQUES	157
<i>Matériel et méthodes</i>	158
<i>Résultats</i>	164
<i>Discussion</i>	172
PARTIE 2 – DÉGRADATION DES EPS ET TRANSFERT DANS LES RÉSEAUX TROPHIQUES	181
<i>Matériel et méthodes</i>	182
<i>Résultats</i>	186
<i>Discussion</i>	191
CHAPITRE IV – PRODUCTION D'EPS ET STABILITÉ DU SÉDIMENT	197
<i>Abstract</i>	198
<i>Résumé</i>	199
<i>Introduction</i>	200
PARTIE 1 – PRODUCTION D'EPS PAR LES BACTÉRIES EN PRÉSENCE DE MÉIOFAUNE, ET RÔLE DU QUORUM SENSING	203
<i>Matériel et méthodes</i>	204
<i>Résultats</i>	209
<i>Discussion</i>	213
PARTIE 2 – PRODUCTION D'EPS PAR LE MICROPHYTOBENTHOS EN PRÉSENCE DE MACROFAUNE, ET EFFET SUR LA STABILITÉ DU SÉDIMENT	221
<i>Résumé</i>	222
Surface adhesion of microphytobenthic biofilms is enhanced under <i>Hediste</i> <i>diversicolor</i> (O.F. Müller) trophic pressure	223
Abstract.....	223
Introduction	224
Material and methods	226
Results	233

Discussion	240
Acknowledgement	246
<i>Conclusion</i>	249
DISCUSSION GÉNÉRALE	253
<i>La dynamique des EPS au cœur d'un réseau d'interactions complexe</i>	255
<i>les EPS dans les écosystèmes : interactions trophiques et non trophiques</i>	260
<i>Les microorganismes du biofilm, des espèces ingénieuses coopératives</i>	264
<i>Résumé</i>	265
Organisms as cooperative ecosystem engineers in intertidal flats	266
Abstract	266
Introduction.....	267
Ecosystem engineers providing biogenic structures	271
Sediment stability in coastal sediments: a combination of physico-chemical factors and engineering effects.....	276
Associations of ecosystem engineers	283
Conclusion & possible threats on ecosystem engineers	286
Acknowledgments	288
<i>Conclusion</i>	289
<i>Perspectives</i>	290
RÉFÉRENCES	295
ANNEXES	327

Introduction générale

LES BIOFILMS EN ZONE INTERTIDALE

Organisation générale

Les organismes vivant en zone intertidale doivent résister à de fortes fluctuations de leur environnement au cours des cycles de marée (Little & Kitching, 1996). Par exemple, la salinité dans le sédiment est de l'ordre de $35 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ à l'immersion, mais peut fortement augmenter quand le sédiment sèche et que l'eau s'évapore ou, à l'inverse, diminuer brutalement s'il pleut pendant l'émersion. La capacité des microorganismes à se développer sur les sédiments meubles dans ces conditions est en grande partie liée à leur organisation sous forme de biofilms, qui limitent les variations des conditions physicochimiques dans l'entourage immédiat des microbes (Wotton, 2004).

Les biofilms sont des associations de microorganismes liés ensemble par un ensemble de molécules appelées exopolymères ou EPS (Extracellular Polymeric Substances, substances polymériques extracellulaires ; Decho, 1990). En zone intertidale, ces biofilms sont composés d'une grande diversité d'espèces, aussi bien eucaryotes que procaryotes ; un même biofilm peut, par exemple, contenir des milliers d'espèces bactériennes (Franks & Stolz, 2009). Les biofilms regroupent des microorganismes aux métabolismes divers et complémentaires. La stratification « typique » des biofilms sur un sédiment meuble peut être mise en évidence simplement grâce à une colonne de Winogradsky (Fig. 1) : il s'agit de mettre au fond d'un tube transparent de la matière organique, et de la recouvrir de sédiment, de fermer la colonne hermétiquement et d'exposer la colonne à la lumière. Un biofilm se développe alors dans la colonne, formant des couches de différentes couleurs selon les pigments contenus dans les organismes de cette strate. Les organismes se répartissent, en effet, selon des forts gradients d'oxygène et de soufre créés par leur propre activité (Van Gemerden, 1993).

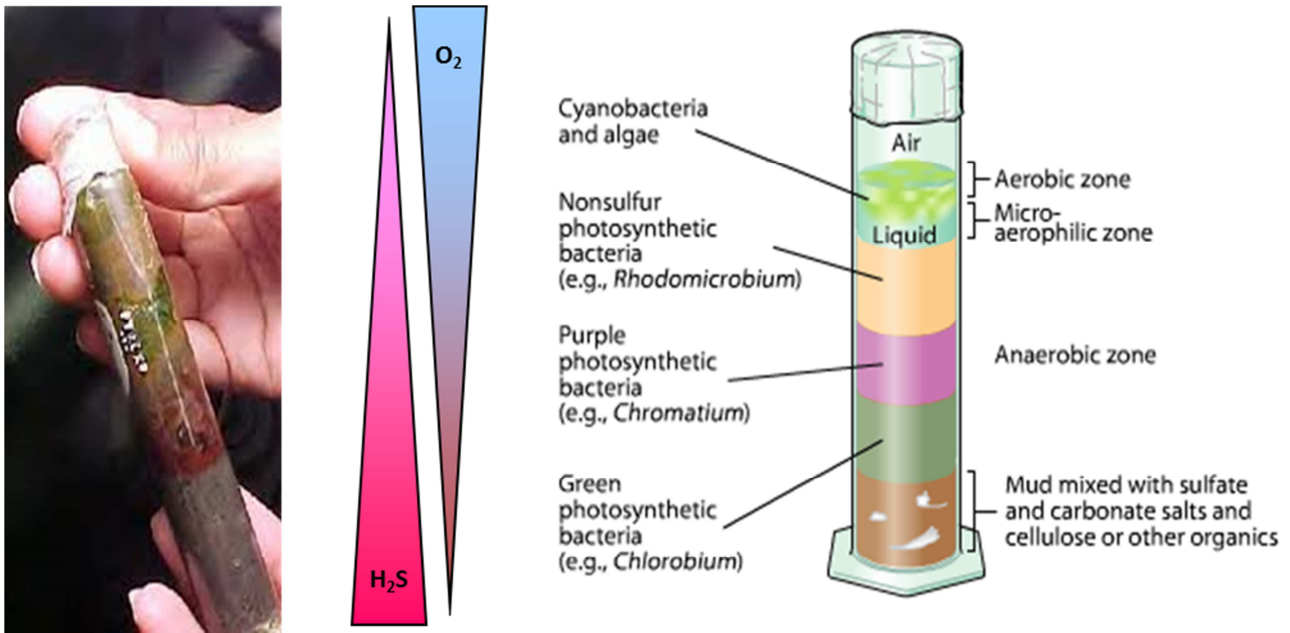


Fig. 1: colonne de Winogradsky montrant la stratification typique des biofilms sur les sédiments meubles en zone intertidale. D'après www.sumanasinc.com.

Fig. 1: Winogradsky column showing typical stratification of biofilms on soft-bottom tidal flats. Adapted from www.sumanasinc.com.

Le biofilm, ou « tapis microbien » (microbial mat), ne constitue pas un mince film à la surface du sédiment ; il comprend plusieurs strates d'organismes se développant à plus ou moins grande profondeur dans le sédiment (Van Gemerden, 1993). À la surface du biofilm les diatomées et les cyanobactéries pratiquent la photosynthèse aérobie et sont généralement responsables de la plus grande partie de la production primaire. Localement, les euglènes peuvent être dominantes (Jesus et al., 2009). Sous cette couche superficielle se situent des bactéries pourpres non sulfureuses, qui utilisent la MO produite par les couches supérieures comme source de carbone, mais qui réalisent également la photosynthèse. La production primaire de ces deux couches nourrit des bactéries et des eucaryotes hétérotrophes qui, en dégradant la matière organique produite, consomment une grande quantité d'oxygène (Van Gemerden, 1993, Franks & Stolz, 2009).

Cette consommation importante d'oxygène permet l'activité des bactéries hétérotrophes sulfato-réductrices (qui transforment les sulfates SO_4^{2-} en sulfides

S^{2-}) en anaérobie au début de la zone anoxique. Les bactéries hétérotrophes, en commençant la dégradation de la matière organique produite dans les couches supérieures du biofilm et en produisant des sulfides, fournissent également des donneurs d'électrons aux bactéries sulfureuses pourpres et vertes qui pratiquent la photosynthèse anoxygénique dans les couches plus profondes. Ces bactéries ont, en effet, besoin de peu de lumière pour réaliser leur photosynthèse : elles utilisent la bactériochlorophylle comme pigment pour capter les grandes longueurs d'onde (800 à 850 nm, proche infrarouge), qui diffusent mieux dans le sédiment que les petites (Franks & Stolz, 2009). Ces bactéries sont incapables de réaliser la photolyse de l'eau, si bien que leur photosynthèse ne produit pas d'oxygène ; en revanche, cette réaction recycle les ions sulfides en sulfates, fournissant ainsi un substrat aux bactéries sulfato-réductrices. Pour leur part, les bactéries sulfureuses vertes sont des anaérobies strictes et se placent en dessous des bactéries pourpres dans le biofilm ; ces dernières sont, en effet, capables de vivre en présence d'oxygène. La profondeur de pénétration de la lumière va dépendre de la granulométrie du sédiment : de un à deux millimètres en milieu vaseux, elle peut atteindre plusieurs centimètres en milieu sableux (Jesus et al., 2009). Les caractéristiques trophiques de ces groupes d'organismes sont résumées dans la table 1.

Une très large diversité de biofilms existe, s'éloignant plus ou moins de la structuration simplifiée décrite précédemment ; les espèces qui les composent et leurs proportions relatives dépendent de différentes conditions environnementales, comme la salinité, la place sur l'estran, l'exposition à la lumière, ou encore l'apport exogène de matière organique (Brotas et al., 1995, Franks & Stolz, 2009). Par exemple, si cet apport est fort, des biofilms constitués essentiellement de bactéries pourpres pratiquant la photosynthèse anoxygénique peuvent se mettre en place directement à la surface du sédiment (Hubas et al., 2011). De plus, un même biofilm peut varier saisonnièrement en fonction de la température et de l'apport de lumière. La colonisation d'un sédiment nu se fait généralement par les cyanobactéries qui enrichissent le

milieu en azote, permettant le développement d'autres organismes photosynthétiques qui peuvent alors compléter ou remplacer les cyanobactéries (Franks & Stolz, 2009).

Table 1 : tableau résumant les principaux types trophiques généralement présents dans les biofilms en zone intertidale, de la surface du sédiment aux zones plus profondes. MO : matière organique.

Table 1: recap chart of principal trophic types of common microorganisms in biofilms of intertidal flats, from the surface of the sediment to depth. MO: organic matter.

Groupe	Source d'énergie	Réaction associée	Donneur d'électrons	Source de carbone	Conditions de vie
Cyanobactéries, diatomées	Lumière	Photosynthèse oxygénique	H ₂ O	CO ₂	Aérobie Pas de H ₂ S
Bactéries pourpres non sulfureuses	Lumière	Photosynthèse (essentiellement : respiration et fermentation possibles)	H ₂ S et autres composés soufrés	MO	Aérobie ou anaérobie Peu de H ₂ S
Bactéries hétérotrophes	MO	Respiration Fermentation	MO	MO	Aérobie ou anaérobie
Bactéries sulfato-réductrices	MO	Fermentation Réduction de sulfates	MO	MO	Anaérobie
Bactéries sulfureuses pourpres ou vertes	Lumière	Photosynthèse anoxygénique	H ₂ S Produits de dégradation de la MO	CO ₂	Anaérobie (stricte pour les vertes) H ₂ S

Les diatomées, composant principal du microphytobenthos

En zone intertidale, les biofilms sont souvent dominés par les diatomées qui sont des algues unicellulaires eucaryotes. Ces algues forment un composant important du microphytobenthos (Méléder et al., 2007), ensemble des microalgues poussant à la surface des sédiments meubles, qui peut être responsable de plus de la moitié de la production primaire dans les estuaires (Stal, 2003, Underwood & Paterson, 2003).

Les diatomées appartiennent au taxon des algues brunes ; environ 5000 à 10000 espèces ont été décrites (Jeffrey et al., 1997b). Les pigments principaux des diatomées sont les chlorophylles *a*, *c₁* et *c₂* (la *c₁* étant remplacée par la *c₃* chez certaines espèces), ainsi que trois caroténoïdes : la fucoxanthine, la diadinoxanthine et le β -carotène (Jeffrey et al., 1997b). Ce sont des organismes ubiquistes mesurant de 5 à 200 μm en général, et caractérisés par un exosquelette siliceux, appelé frustule. Historiquement, la classification des diatomées est basée sur la morphologie du frustule, qui est généralement constitué de deux valves emboîtées (Cox, 2010). Les diatomées centrales ont un frustule ayant une symétrie centrale ou plusieurs centres de symétrie, alors que les diatomées pennales ont un frustule présentant une symétrie axiale. Cependant, la forme des frustules varie au sein d'une même espèce, en fonction des conditions environnementales. De nos jours, ce sont donc des analyses moléculaires basées sur l'ADN, plus fiables, sont utilisées (Cox, 2010).

Les diatomées pennales benthiques sont connues pour leur capacité de locomotion, en particulier chez les diatomées épipéliques, c'est-à-dire vivant à la surface des vasières, non attachés au sédiment (Decho, 1990). La mobilité, verticale, de ces diatomées, leur permet d'éviter les conditions anoxiques, la remise en suspension à l'immersion, et de se déplacer vers la lumière à l'émersion. Les diatomées épipsammiques, qui vivent en général attachées aux grains de sable, peuvent également présenter une mobilité qui leur permet d'éviter la dessiccation à marée basse, ainsi que les périodes prolongées d'anoxie. La mobilité des diatomées peut aussi être dirigée vers une source de nourriture,

car ces organismes sont mixotrophes : ils pratiquent la photosynthèse en présence de lumière, mais peuvent consommer des composés organiques du milieu en l'absence de lumière (Staats et al., 2000, Taylor et al., 2013). La locomotion des diatomées est permise par leur sécrétion d'EPS, même si le rôle exact des EPS n'est pas connu : soit ils fournissent la force nécessaire à l'avancée de la cellule en s'hydratant au contact de l'eau ; soit ils sont en lien avec le cytosquelette de la cellule, et c'est ce dernier qui permet la locomotion (Underwood & Paterson, 2003).

Quelques rôles des biofilms

La grande partie de la production primaire en zone côtière est réalisée par des microorganismes benthiques associés en biofilms (Underwood & Kromkamp, 1999, Méléder et al., 2007). Ceux-ci jouent également un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques de l'azote et du soufre. De par l'association de plusieurs métabolismes, ils permettent aussi une dégradation efficace de la matière organique, même réfractaire, dans le sédiment (Parmelee, 1995). Cela libère des nutriments dans le milieu, ce qui peut stimuler la production primaire du phytoplancton ou des algues. Les biofilms sont aussi des composants importants des réseaux trophiques car beaucoup d'organismes, comme les mollusques ou les poissons, s'en nourrissent (Austen et al., 1999, Andersen, 2001, Widdows & Brinsley, 2002). Les biofilms contrôlent en partie la densité et la composition de la macrofaune et de la méiofaune benthiques. En effet, de nombreux organismes marins ne recrutent sur un sédiment qu'en présence de biofilm (Decho, 1990) ; c'est en particulier le cas de plusieurs espèces cultivées. Le dépôt d'une cellule, d'une spore ou d'une larve sur le sédiment dépend souvent de facteurs abiotiques, comme l'hydrodynamisme. Cependant, ces organismes peuvent généralement décider s'ils restent sur un site donné ou s'ils se déplacent de nouveau (Olivier et al., 1996). La plupart des études sur le recrutement ont ainsi montré que les organismes recrutaient préférentiellement sur les sédiments couverts de biofilm (Palmer, 1988, Stocum

& Plante, 2006). Pour différentes larves, l'installation définitive sur un substrat est conditionnée à la présence d'un biofilm spécifique. Ainsi, les larves de l'annélide polychète *Janua brasiliensis* se lient aux EPS de manière hautement spécifique (Decho, 1990). L'âge de la larve, celle du biofilm et différentes autres conditions environnementales modulent cette interaction. Certains biofilms bactériens, au contraire, inhibent le recrutement des larves.

Marqueurs d'intérêt pour l'étude des microorganismes dans les biofilms

Les biofilms présentent une grande diversité et peuvent contenir des centaines voire des milliers d'espèces (Franks & Stolz, 2009). L'utilisation de marqueurs pour caractériser leur composition est donc intéressante, mais cette approche n'a pas été beaucoup utilisée en ce qui concerne les biofilms. Les marqueurs les plus communément utilisés sont les pigments qui caractérisent la composition de l'assemblage photosynthétique (Cariou-Le Gall & Blanchard, 1995, Brotas & Plante-Cuny, 1996, Barranguet et al., 1997). Certains pigments comme l'alloxanthine sont spécifiques d'un groupe, d'autres comme la chlorophylle *a* sont plus largement présents (Jeffrey et al., 1997b). La composition en pigments du sédiment peut permettre de démontrer la dominance de certains groupes dans un biofilm. Les pigments peuvent également révéler des informations sur le fonctionnement du biofilm et ses conditions de vie, car certains pigments (xanthophylles) sont impliqués dans des mécanismes de photoprotection (Jeffrey et al., 1997b).

Les acides gras permettent une caractérisation globale de la matière organique du sédiment car ils sont présents dans toutes les cellules (Arts & Wainman, 1999). En effet, la membrane cellulaire est composée de triglycérides, c'est-à-dire d'un glycérol sur lequel sont liés trois acides gras. Les acides gras se distinguent par leur nombre de carbones, leur nombre d'insaturations (doubles liaisons entre deux carbones), la position de ces insaturations et la présence de ramifications (Fig. 2). Or, certains acides gras ne peuvent être produits que par un groupe de producteurs donnés ; par exemple, les acides gras ramifiés ne sont

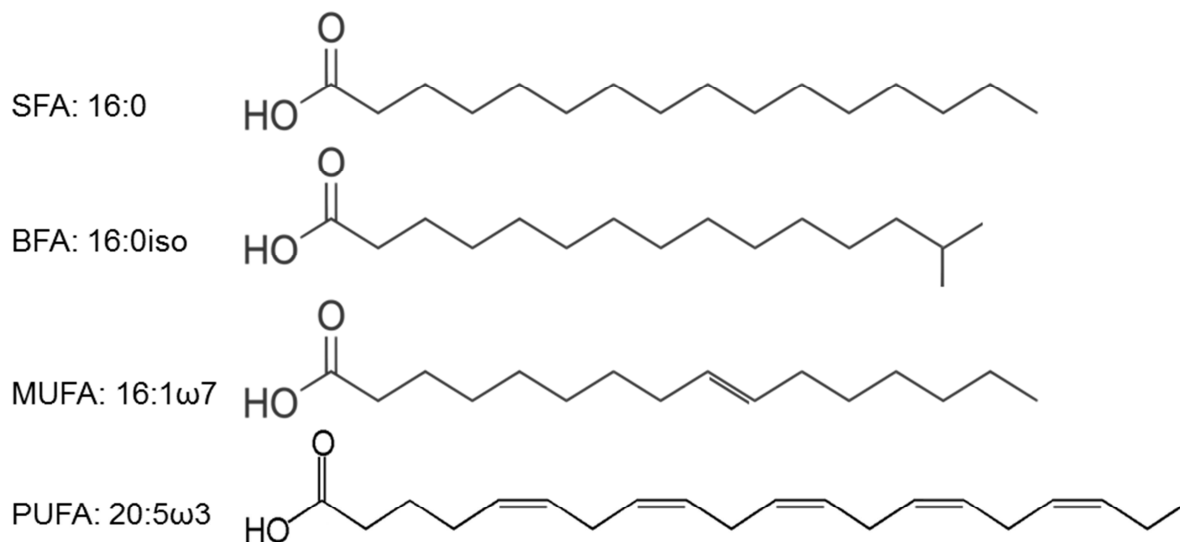


Fig. 2 : structure chimique de quelques acides gras, appartenant aux différentes classes d'acides gras. SFA : acide gras saturé; BFA : acide gras ramifié; MUFA : acide gras monoinsaturé ; PUFA : acide gras polyinsaturé.

Fig. 2: skeletal structure of some fatty acids (FA), illustrating the different types of FAs: SFA: Saturated FA; BFA: Branched FA; MUFA: MonoUnsaturated FA; PUFA: PolyUnsaturated FA.

produits que par les bactéries hétérotrophes (Arts & Wainman, 1999). Une grande partie des acides gras existent dans différents groupes, mais la plupart des groupes peuvent être caractérisés par la présence de quelques acides gras en quantité importante. Un autre intérêt des acides gras est qu'ils peuvent être utilisés comme traceurs de la matière organique dans les réseaux trophiques (Hall et al., 2006, Meziane et al., 2007). En effet, il est plus avantageux pour un consommateur d'utiliser un acide gras sans le modifier, et de l'intégrer directement dans ses cellules, que de le dégrader et d'en synthétiser un autre. De plus, chez les consommateurs, certains acides gras pourtant nécessaires au fonctionnement des cellules ne peuvent être synthétisés ; ils doivent forcément être trouvés dans l'alimentation et utilisés sans modification (Arts & Wainman, 1999). Grâce à ces acides gras traceurs, la consommation des microorganismes peut être suivie dans le réseau trophique.

Enfin, le développement des techniques de biologie moléculaire permet actuellement une caractérisation extrêmement fine du biofilm, pouvant aller jusqu'au niveau spécifique. Par exemple, la métagénomique consiste à amplifier tout l'ADN présent dans un échantillon pour un gène donné (Handelsman, 2004). Si ce gène, par exemple, est présent chez toutes les bactéries, avec une séquence différente pour chaque espèce, toutes les espèces bactériennes présentes dans le biofilm pourront être identifiées. Cela nécessite cependant que la séquence de chaque espèce soit préalablement connue, ce qui n'est pas toujours le cas. À un moindre niveau de détail, des techniques dites d'« empreinte moléculaire » (molecular fingerprinting) permettent d'obtenir une signature de l'assemblage étudié, signature qui dépend des groupes présents et de leur abondance relative. La DGGE (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis) par exemple donne une empreinte mettant en évidence tous les groupes taxonomiques constituant plus de 1 % de l'assemblage total (Muyzer et al., 1993).

Par analogie avec ces empreintes moléculaires, on peut décrire « l'empreinte chimique » d'un biofilm, à partir de sa composition en pigments ou en acides gras. Les empreintes seront d'autant plus proches que leur composition des biofilms est proche.

Toutes ces techniques permettent une caractérisation plus ou moins fine de l'assemblage microbien, mais ne caractérisent pas la matrice du biofilm, formée d'EPS.

LES EPS, MATRICE DU BIOFILM

Composition générale, en lien avec la structure

Les EPS sont, comme leur nom l'indique, des substances polymériques, sécrétées à l'extérieur des cellules par de nombreux microorganismes, en

particulier lorsqu'ils s'organisent en biofilm. C'est un ensemble de molécules très variées, composé essentiellement de glucides et de protéines, mais aussi de diverses autres molécules (Decho, 1990). La présence d'ADN a également été montrée dans certains biofilms ; cet ADN, comme les autres EPS, est excrété activement, il ne provient pas simplement de la lyse de cellules vieillissantes (Whitchurch et al., 2002).

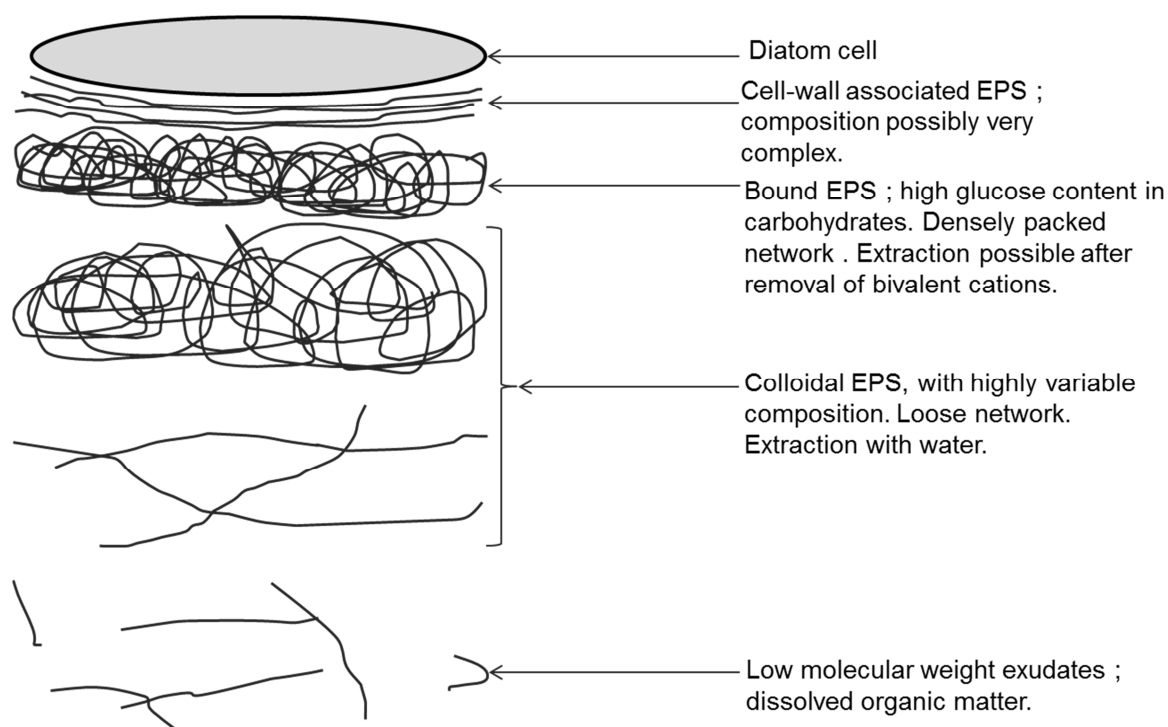


Fig. 3 : modèle conceptuel illustrant les différents types d'EPS benthiques. Figure modifiée d'après Underwood & Paterson, 2003.

Fig. 3: conceptual model of the range of different benthic EPS types. Adapted from Underwood & Paterson, 2003.

La composition des EPS va déterminer la structure de la matrice et ses propriétés physico-chimiques. Les EPS forment un continuum de structures, du gel à de la matière organique complètement soluble. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la cellule, la structure du réseau d'EPS change (Underwood & Paterson, 2003 ; Fig. 3). Au contact de la cellule se trouvent des EPS liés avec les protéines de la membrane plasmique qui forment donc un réseau compact en lien avec la cellule et son cytosquelette. Autour, se trouvent des EPS liés,

formant un réseau dense appelé capsule, faisant le tour de chaque cellule. Ces EPS sont fortement liés entre eux par des cations bivalents (Ca^{2+} en particulier). Un réseau plus lâche d'EPS, appelés colloïdaux, lient entre elles les différentes cellules du biofilm. Cette fraction est la fraction la plus diverse. Elle est composée de différents types d'EPS dont la composition en sucres varie en fonction des conditions environnementales mais aussi de l'état physiologique de la cellule. Enfin, certains EPS de faible poids moléculaire sont solubles dans l'eau circulant dans le biofilm : ils appartiennent alors à la matière organique dissoute. Ces différents réseaux ne sont pas homogènes ; ainsi, les EPS forment parfois des tubes au sein du biofilm, qui favorisent la circulation de l'eau et des nutriments (Wotton, 2004).

Différentes techniques permettent d'extraire spécifiquement ces différentes fractions (Underwood & Paterson, 2003). Les EPS colloïdaux peuvent être extraits du sédiment en mélangeant celui-ci pendant au moins une heure avec de l'eau ; les EPS colloïdaux passent alors dans l'eau. Pour les EPS liés, les extractions ont pendant un temps été réalisées avec de l'eau chaude, mais il a été montré par la suite que ce protocole permettait surtout le recueil de molécules de réserves intracellulaires (Chiovitti et al., 2004). Les méthodes employées actuellement utilisent soit une résine cationique soit de l'EDTA pour piéger les ions calciques, affaiblissant la liaison des EPS entre eux et permettant ainsi leur extraction comme les EPS colloïdaux. Enfin, les composés de bas poids moléculaires peuvent être séparés des composés de haut poids moléculaires, moins solubles, car ces derniers précipitent à froid dans l'éthanol.

Cependant, peu de marqueurs ont été développés pour caractériser ces fractions. Le dosage des sucres et des protéines totaux par colorimétrie est l'analyse la plus courante, mais ne donne qu'une idée très générale de la composition de la matrice. Plus récemment, le développement des techniques de chromatographie en phases gazeuse ou liquide a permis une caractérisation plus précise, en particulier de la composition des polymères glucidiques en monomères (Taylor et al., 1999, Pierre et al., 2010). La technique de

chromatographie à échange d'ions (HPAE-PAD, high performance anion exchange chromatography-pulsed amperometric detection) est également intéressante puisqu'elle permet une analyse des monomères dans dérivatisation (Panagiotopoulos & Sempere, 2005). Les mêmes monomères constituent l'immense majorité des glucides présents dans les EPS (Fig. 4), mais dans des proportions variables selon les producteurs et les conditions environnementales (de Brouwer & Stal, 2002, Underwood et al., 2004).

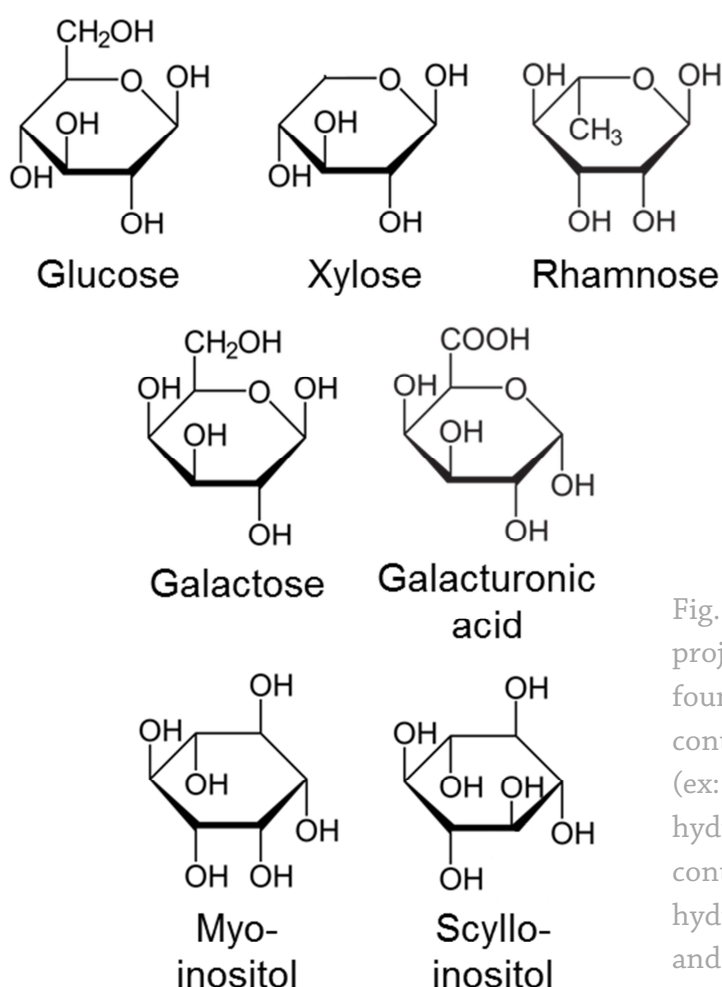


Fig. 4: structure de différents monomères glucidiques (projection de Haworth) trouvés dans les EPS. Les hexoses contiennent 6 carbones (ex : glucose), les pentoses 5 (ex : xylose). Les désoxysucres ont perdu un groupement hydroxyl (ex : rhamnose). Les acides uroniques ont un groupe carboxyl à la place d'un groupe hydroxyl (ex : acide galacturonique). Le myo-inositol et le scyllo-inositol sont des stéréoisomères.

Fig. 4: structural formulas (Haworth projection) of different monosaccharides found in EPS carbohydrates. Hexoses contain 6 carbons (ex: glucose), pentoses 5 (ex: xylose). Deoxy-sugars have lost a hydroxyl group (ex: rhamnose). Uronic acid contain a carboxyl group instead of an hydroxyl group (ex: galacturonic acid). Myo- and scyllo-inositol are stereoisomers.

Régulation de la production des EPS

La production d'EPS dans des cultures de microorganismes est plus importante pendant la phase stationnaire que pendant la phase de croissance exponentielle (Decho, 1990, Underwood & Paterson, 2003). De plus, la

biosynthèse est sous contrôle environnemental : par exemple, les EPS sont plus produits dans des conditions stressantes pour les microorganismes. En milieu naturel, la production des EPS par les diatomées a été liée à la photosynthèse et aux cycles de marées. En effet, les diatomées produisent de grandes quantités d'EPS à la fin de la période d'émersion (van Duyl et al., 1999), ce qui semble préparer les cellules à l'immersion. Cela leur permet en particulier de ne pas être remises en suspension à l'arrivée de l'eau.

Cette dynamique de production peut cependant être modifiée du fait du contrôle de la production d'EPS par la photosynthèse. De nombreuses études ont en effet montré que la production de glucides était positivement corrélée au taux de production primaire (Smith & Underwood, 1998, Staats et al., 2000, Perkins et al., 2001). De plus, en utilisant des inhibiteurs de la photosynthèse, Staats et al. (2000) ont montré que cette synthèse est nécessaire à la production des EPS. Cela est cependant en contradiction avec les travaux d'autres auteurs, qui ont montré la production d'EPS même en l'absence de lumière (Smith & Underwood, 1998, van Duyl et al., 1999, 2000). Il semblerait en fait que la production d'EPS à l'obscurité soit modulée par l'histoire des cellules productrices par rapport à la lumière (Perkins et al., 2001). La sécrétion d'EPS apparaît être un moyen pour les cellules de « se débarrasser » d'un excès d'énergie et de carbone, fixé en excès par rapport à l'azote (Stal, 2003) ; les diatomées sont capables de moduler le pourcentage de carbone fixé par la photosynthèse qui sera libéré dans les EPS, et ce de manière dépendante de la lumière. Quand la concentration en nutriments devient limitante pour la croissance cellulaire, une plus grande proportion du C fixé par la photosynthèse est ainsi excrétée sous forme d'EPS (Cook et al., 2007).

Les différentes fractions des EPS n'exhibent pas toutes le même comportement par rapport à la lumière (Underwood & Paterson, 2003). Les EPS liés, par exemple, ne semblent être produits qu'à la lumière ; leur concentration diminue à l'obscurité, ce qui est dû soit à leur solubilisation soit à leur utilisation par les microorganismes (de Brouwer & Stal, 2002, Orvain et al.,

2003). Les EPS colloïdaux sont eux produits à la fois à l'obscurité et à la lumière, même si leur sécrétion semble être affectée par l'éclairement (Perkins et al., 2001). À l'obscurité et à l'immersion, leur concentration diminue également (Orvain et al., 2003).

Diversité de la composition des EPS

La biosynthèse des EPS se fait sous contrôle génétique, mais cette régulation est assez lâche (Decho, 1990). La composition exacte va en effet varier d'une molécule à l'autre. La synthèse des EPS se fait, pour les bactéries Gram négatives, dans la membrane interne, de laquelle ils sortent par des porines. Pour les diatomées, la synthèse se fait au niveau de l'appareil de Golgi, puis ils sont transportés par des vésicules vers le compartiment extracellulaire (Underwood & Paterson, 2003, Wotton, 2004). L'excrétion se fait principalement au niveau du raphé, longue fente présente sur les valves chez les diatomées pennales. La composition des EPS microbiens va dépendre de l'état physiologique des cellules, de leur stade de croissance, des conditions physiques du milieu (viscosité, température...), ainsi que des concentrations en ions et en nutriments (Decho, 1990).

Les EPS des bactéries et les micro-algues sont formés globalement des mêmes composés, mais pas dans les mêmes proportions (Decho, 1990). Les glucides produits par les bactéries sont essentiellement des homopolysaccharides et des hétéropolysaccharides. Ces EPS contiennent également des glycoprotéines et beaucoup d'acides uroniques, et ils peuvent être substitués avec des groupements phosphate, acyl et sulfate. Au sein d'une même souche bactérienne, on trouve une diversité importante, liée au réarrangement des monomères dans les polymères, et aux groupements supplémentaires. Enfin, les EPS sont capables d'absorber un grand nombre de molécules organiques et inorganiques, ce qui rajoute une variabilité à leur composition (Wotton, 2004).

Les EPS des diatomées sont pour leur part plus riches en glucides que les EPS bactériens ; ils peuvent ne pas contenir du tout de protéines (Decho, 1990). Ils contiennent beaucoup d'hétéropolymères, avec une grande diversité de monomères. La composition des glucides en monomères varie en fonction de l'état physiologique de la cellule ; en particulier, une forte production photosynthétique est associée à une prépondérance du glucose parmi les monomères (de Brouwer & Stal, 2001, Bellinger et al., 2005, Hanlon et al., 2006). Par ailleurs, différents paramètres environnementaux affectent cette composition.

Mise en place du biofilm et quorum sensing

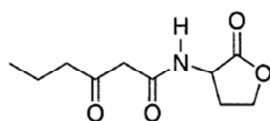
La découverte des mécanismes de détection du quorum, plus couramment appelée quorum sensing, fait suite à des travaux sur la bioluminescence chez *Vibrio fischeri* (Nealson et al., 1970). En effet, ces bactéries n'émettent de la lumière qu'à partir d'une certaine densité de population ; cette observation suggère l'existence d'un moyen, pour les bactéries, d'estimer la densité de leur propre population et d'y répondre. Ce système met en jeu des molécules appelées autoinducteurs, produits et libérés dans le milieu par toutes les cellules (Bassler, 1999). Quand les autoinducteurs atteignent une certaine concentration, ils se fixent sur des récepteurs à la surface des cellules, ce qui déclenche une cascade de signalisation aboutissant à l'activation des gènes permettant la luminescence.

Par la suite, d'autres « comportements » bactériens dépendant du même système de signalisation ont été découverts (voir Miller & Bassler, 2001 pour des exemples). Fuqua et al. (1994) ont alors proposé le terme de quorum pour désigner la population bactérienne minimale pour qu'un comportement coordonné se mette en place, et ainsi le terme quorum sensing pour désigner l'ensemble des mécanismes permettant aux bactéries de détecter leur densité cellulaire et d'adapter leur comportement en conséquence.

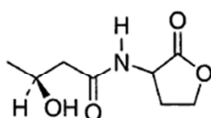
Selon les espèces bactériennes, différents systèmes de quorum sensing existent (Miller & Bassler, 2001, Henke & Bassler, 2004). Un des systèmes, présent chez les bactéries Gram négatives, fait intervenir des acyl-homosérines lactones (AHL) qui possèdent toutes le même noyau mais dont la chaîne acyl est spécifique (Fig. 5.a, Bassler, 2002). Celui présent chez la plupart des bactéries Gram positives fait intervenir différents oligopeptides (Fig. 5.b). Enfin, *V. harveyi*, comme un certain nombre d'autres espèces Gram positives ou négatives, possède deux systèmes : un impliquant les AHL, un deuxième impliquant une autre molécule (furanosyl borate diester, nommé AI-2 ; Fig. 5.c) ; ce dernier système sert à la communication interspécifique, alors que les autres sont utilisés en communication intraspécifique.

a. Acyl-Homoserine Lactone

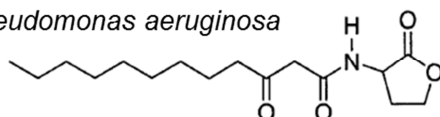
Vibrio fischeri



Vibrio harveyi



Pseudomonas aeruginosa

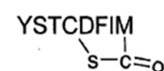


b. Oligopeptides

Bacillus subtilis

ERGMT

Staphylococcus aureus



c. AI-2

Vibrio harveyi

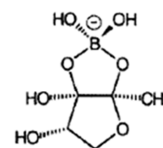


Fig. 5 : exemples de composés du QS. a. AHL, autoinducteurs des bactéries Gram négatives. b. oligopeptide autoinducteur des bactéries Gram positives. c. autoinducteur de type 2 (furanosyl borate diester) de *V. harveyi*. Figure adaptée de Bassler, 2002.

Fig. 5: examples of QS compounds. a. AHL autoinducers of Gram-negative bacteria. b. Oligopeptide autoinducer of Gram-positive bacteria. c. Type 2 autoinducer (furanosyl borate diester) of *V. harveyi*. Adapted from Bassler, 2002.

Si le fonctionnement des systèmes de QS a été très étudié en laboratoire, c'est assez récemment que ces composés ont pu être mis en évidence en milieu naturel ; leur présence a été démontrée pour la première fois dans des biofilms

épilithiques (McLean et al., 1997, Bachofen & Schenk, 1998). Par la suite, une étude a montré qu'un biofilm naturel, qui peut héberger des milliers d'espèces bactériennes différentes, contenait une grande diversité d'AHL (Decho et al., 2009). Les conditions du milieu vont de plus moduler la communication entre bactéries, en agissant sur différents aspects du système de production et de réponse aux molécules du QS (Decho et al., 2011). Les paramètres physicochimiques par exemple vont affecter la dégradation des composés et leur fixation aux récepteurs, tandis que le réseau d'EPS peut diminuer leur diffusion. Ceci peut aboutir, pour un même signal produit, à différents effets sur la cellule cible, selon les modifications subies par les molécules dans leur environnement (Fig. 6, Decho et al., 2010).

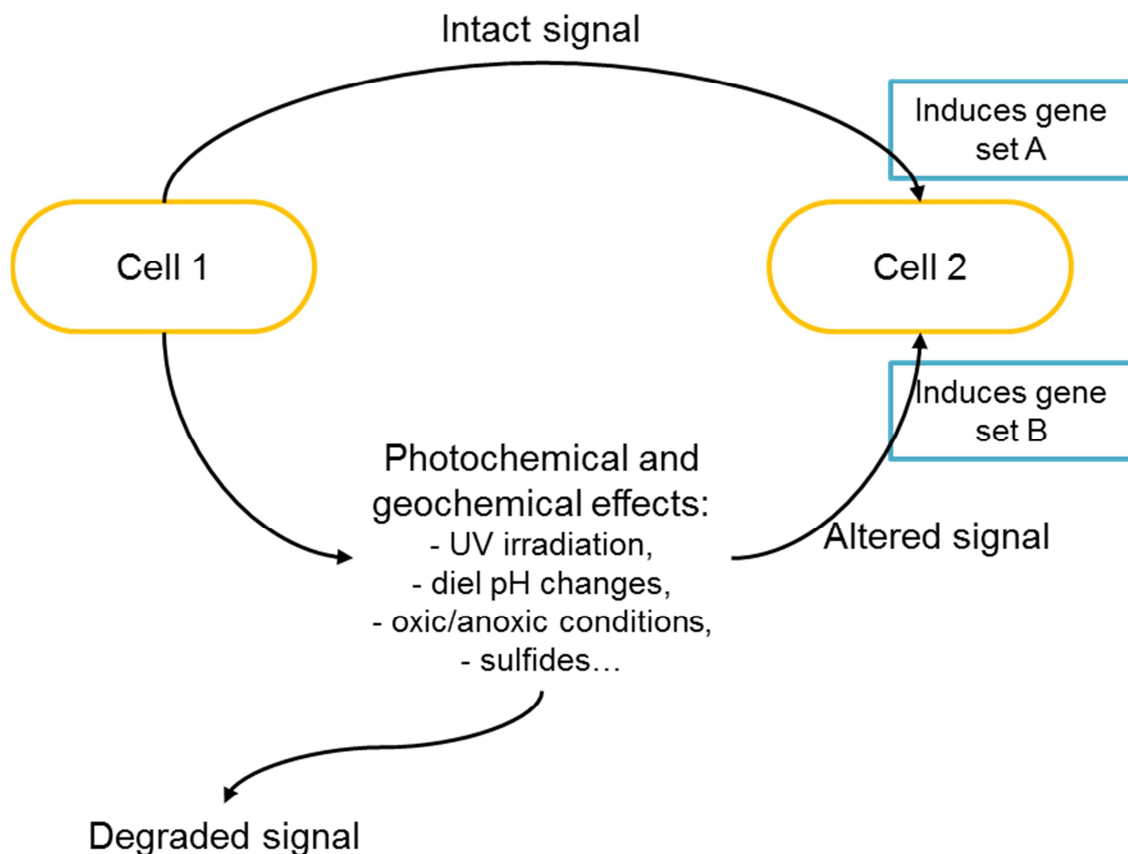


Fig. 6 : modification des signaux du QS dans l'environnement. D'après Decho et al., 2010.

Fig. 6: interaction of QS signal with the natural environment. Decho et al., 2010.

En milieu contrôlé, sur des biofilms monospécifiques, il a été montré que le quorum sensing joue un rôle crucial dans la régulation de la production d'EPS permettant la mise en place du biofilm (Davies et al., 1998, Decho, 2000, Decho et al., 2011). On sait peu de choses en revanche sur l'importance de ces systèmes en milieu naturel, sur des biofilms composés d'une forte diversité bactérienne, ni sur l'influence des paramètres biotiques (présence de consommateurs par exemple) sur le fonctionnement du système. Pourtant, certains eucaryotes peuvent répondre aux composés du QS, comme par exemple les spores d'algues du genre *Enteromorpha*, qui se servent de ces molécules pour recruter uniquement aux endroits couverts de biofilm (Wotton, 2004). Il se peut que réciproquement, les bactéries soient capables de réagir à la présence d'autres espèces, en particulier via la régulation de leur système de QS.

RÔLES DES EPS

EPS et maintien d'un milieu stable

Les EPS permettent la locomotion des diatomées, ainsi que cela a été décrit précédemment. Ils permettent, de plus, la mise en place du biofilm, et ainsi la complémentarité métabolique évoquée plus haut ; le développement du biofilm a en outre d'autres avantages pour les cellules microbiennes. En effet, si la production d'EPS n'est pas nécessaire à la croissance des microorganismes, leur présence facilite leur développement (Decho, 1990).

Les microorganismes benthiques, en zone intertidale, doivent supporter de fortes variations environnementales (salinité, lumière...) ; l'organisation en biofilm permet de limiter les changements des conditions physicochimiques aux alentours immédiats de la cellule. Les EPS permettent tout d'abord une résistance des microorganismes à la dessiccation (Potts, 1994), en particulier via l'accumulation de substances de haute viscosité autour des cellules. Ces substances sont fortement hygroscopiques, elles absorbent l'eau et l'humidité de l'air, et peuvent ainsi se trouver beaucoup plus hydratées que le milieu alentour. Ainsi, il a été montré que des bactéries séchées expérimentalement

conservent un pourtour hydraté pendant un certain temps, ce qui permet aux cellules de ne pas subir la dessiccation. 35 % de cellules entourées d'EPS peuvent ainsi survivre à un épisode important de dessiccation, contre moins de 5 % pour des cellules ne présentant pas d'enrobage d'EPS. Les EPS permettent ainsi une protection permanente contre la dessiccation ; en cas de stress important, les cellules sont également capables de produire des EPS plus riches en glucides, renforçant la structure « gélifiée » des EPS et augmentant encore la résistance des cellules. Les mécanismes de régulation de ce phénomène sont mal connus.

Les EPS servent de « milieu tampon » aux microorganismes, car en limitant le mouvement de certaines molécules, ils empêchent les brusques variations de leur concentration dans l'environnement immédiat des cellules (Decho, 1990, Wotton, 2004, Bhaskar & Bhosle, 2005). Les EPS sont capables d'absorber différentes molécules, comme par exemple les ions calciques, mais aussi d'autres ions, en particulier métalliques : cadmium (Cd^{2+}), cuivre (Cu^{2+}), chrome (Cr^{3+}), plomb (Pb^{2+}), mercure (Hg^{2+})... La force de la liaison de ces ions à la matrice d'EPS va dépendre des charges présentes dans cette matrice, ainsi que de la structure de la matrice, du pH et de la salinité ambiants. Les ions absorbés par les EPS ne vont pas atteindre les cellules, empêchant les dégâts que pourraient provoquer les métaux lourds. Il en est de même pour différents polluants, ce qui permet aux biofilms de se développer dans des environnements contaminés où d'autres organismes ne survivent pas (Sutherland, 2001). Cela peut également permettre aux bactéries de se développer en présence d'antibiotiques, qui n'atteignent pas les cellules (Anderson et al., 2011) ; la protection n'est cependant pas totale, des modifications du développement des biofilms ayant été observées en présence d'antibiotiques (Lubarsky et al., 2012). De plus, en concentrant les métaux et autre polluants, les biofilms peuvent constituer une porte d'entrée de ces molécules dans les réseaux trophiques (Bhaskar & Bhosle, 2005).

EPS comme ressource trophique

Certains microorganismes sont capables d'utiliser les EPS comme ressource trophique quand la photosynthèse n'est pas possible ou quand les nutriments ne sont pas disponibles. Les EPS serviraient alors de réserves extracellulaires. Chez les diatomées, les EPS liés sont ainsi presque entièrement dégradés pendant la nuit (Stal, 2003). La plupart des bactéries semblent incapables de dégrader les EPS qu'elles ont-elles-même produits (Decho, 1990). Ces bactéries pourraient en revanche utiliser les EPS produits par d'autres organismes. Une grande diversité d'enzymes capables de dégrader les EPS a été isolée chez les bactéries.

Les EPS sont de trop grosses molécules pour pouvoir passer la membrane cellulaire. Une fois sécrétés dans le milieu, ils doivent être dégradés en petits oligomères ou en monomères avant de pouvoir être assimilés, ce qui est principalement réalisé par des enzymes sécrétées à l'extérieur des cellules par les microorganismes (Hoppe, 1983, Lapidou & Rittmann, 2002, McKew et al., 2013). Ces exo-enzymes peuvent dégrader une grande variété de molécules : protéines, glucides, composés phosphatés... Les enzymes ne sont pas en contact direct avec les membranes des cellules, mais elles sont généralement liées au réseau d'EPS, ce qui les maintient à proximité des cellules (Meyer-Reil, 1994). Les microorganismes peuvent ainsi utiliser les enzymes mises en place par les générations précédentes, ce qui permet une économie dans la synthèse de ces enzymes (Decho, 2000). Les enzymes peuvent même être partagées avec d'autres organismes, comme les nématodes, chaque type d'organisme contribuant à la production d'un ensemble d'enzymes qui sera utile à tous (enzyme sharing concept ; Riemann & Helmke, 2002). La composition en monomères du polymère, ainsi la structure de ce dernier (enchaînement des monomères, ramifications) influencent la vitesse de dégradation du polymère (Oakes et al., 2010).

Les EPS sont des molécules riches en carbone et en azote ; de ce fait, ils constituent une source trophique potentiellement intéressante pour les espèces

capables de les consommer. De plus, il a été calculé que certains organismes ne pouvaient pas survivre en se nourrissant uniquement de bactéries (ce qui était leur régime alimentaire supposé), du fait d'un manque d'azote (Harvey & Luoma, 1984). Les EPS pourraient alors permettre de combler ce manque. Diverses études ont été mises en place pour tenter d'estimer la consommation des EPS par la méiofaune ou la macrofaune. Les EPS contenant très peu de lipides, on ne peut pas suivre leur transfert dans les réseaux trophiques grâce aux acides gras marqueurs traceurs. Le suivi des EPS dans les réseaux trophiques nécessite dès lors de les marquer, soit avec du carbone radioactif, soit avec du ^{13}C qui peut être séparé du ^{12}C (carbone le plus commun) par spectrométrie de masse. Les premières études, en milieu contrôlé, ont montré que les EPS peuvent être consommés par certains organismes comme les holothuries (Baird & Thistle, 1986), mais pas par tous. Par exemple, *Macoma balthica* ne semble pas pouvoir assimiler les EPS, faute de posséder les enzymes nécessaires pour les dégrader (Harvey & Luoma, 1984). Des études en milieu naturel ont montré que le ^{13}C assimilé par les diatomées peut être, dans les heures suivantes, transféré vers les bactéries et les nématodes (Middelburg et al., 2000). Ces auteurs ont suggéré que ce sont les EPS qui permettent de faire le lien si rapidement entre diatomées et bactéries, car les diatomées ont libéré presque 40 % du carbone fixé par la photosynthèse sous forme d'EPS.

Si les EPS constituent potentiellement une source trophique intéressante, ils peuvent aussi protéger les microorganismes qui les produisent des consommateurs (Decho, 1990, Decho & Lopez, 1993, Hoagland et al., 1993). Par exemple, le réseau d'EPS peut empêcher les unicellulaires eucaryotes, comme les foraminifères ou les ciliés, d'avoir accès aux cellules bactériennes qu'ils consomment. En maintenant les cellules attachées au sédiment, les EPS peuvent aussi protéger les cellules d'une consommation par de plus gros organismes. Il a également été montré que les EPS sont capables de protéger les cellules de l'action des enzymes digestives, permettant aux microorganismes de survivre au passage par le tube digestif d'un consommateur, même si le

mécanisme de protection reste inconnu (Decho & Lopez, 1993). Certaines cellules sont même capables de réaliser de la photosynthèse pendant le passage dans le tractus digestif du consommateur. Enfin, les EPS peuvent constituer un inhibiteur chimique, limitant la nutrition de certains organismes (Malej & Harris, 1993).

EPS, attachement des cellules et stabilité du sédiment

Du fait de leur nature chimique, les EPS peuvent se lier aux particules sédimentaires, permettant ainsi aux microorganismes qui les produisent d'adhérer à leur substrat (Decho, 1990, Sutherland, 2001). Cela évite la remise en suspension dans les environnements agités ; ceci est particulièrement important pour les diatomées dont le frustule, fragile, supporte mal les chocs (Stal, 2003). De plus, la matière organique est souvent concentrée dans des

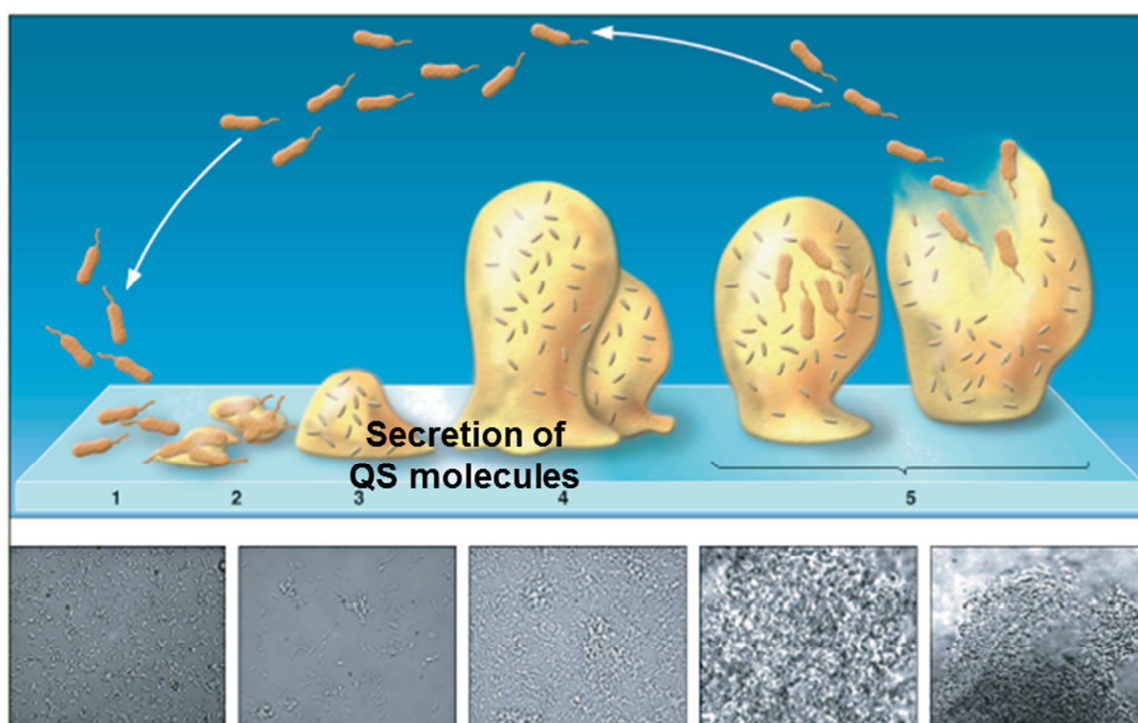


Fig. 7 : étapes de développement des biofilms. 1: attachement réversible. 2: attachement irréversible. 3 et 4 : maturation. 5: dispersion. Figure modifiée d'après Sauer et al., 2010.

Fig. 7: stages of biofilm developmental process. 1: reversible attachment; 2: irreversible attachment; 3 and 4: maturation and 5: dispersion. Adapted from Sauer et al., 2010.

particules ou à la surface des particules sédimentaires ; les EPS permettent alors aux microorganismes de se situer à proximité des sources de nutriments (Decho, 1990). Après une première étape d'attachement réversible, les microorganismes produisent des EPS qui peuvent les fixer définitivement à une particule sédimentaire (Fig. 7, Sauer et al., 2010). La composition des EPS est ici importante puisqu'il existe des mutants incapables d'adhérer au sédiment malgré une sécrétion forte de ces molécules.

En modifiant leur environnement par la sécrétion d'EPS, les microorganismes affectent également l'habitat d'autres organismes, en particulier ceux dont le recrutement et le développement dépendent de la stabilité du sédiment. Cette dernière dépend en effet de nombreux paramètres, à la fois physiques, chimiques et biologiques (Grabowski et al., 2011). Historiquement, c'est la granulométrie qui a été le facteur le plus utilisé pour prédire la stabilité d'un sédiment. Les grains de sable ne sont pas naturellement cohésifs entre eux, mais les particules d'argile le sont. Ces dernières ont en effet un ratio surface / volume important, et elles portent de fortes charges électrochimiques négatives. Ces charges sont contrebalancées par celles des cations présents dans l'eau ; si les cations divalents (Ca^{2+} par exemple) sont suffisamment concentrés, la distance entre deux particules d'argile diminue assez pour que ces particules se lient entre elles par des forces de Van der Waals. Les particules d'argile peuvent ainsi s'agréger de manière compacte, en particulier à de fortes salinités. La stabilité du sédiment va donc être fortement influencée par sa granulométrie, en particulier par son pourcentage de particules fines, dont les argiles font partie. Quand le pourcentage de particules fines augmente, des liens se forment entre celles-ci et avec les particules de plus grande taille ; la surface du sédiment devient moins rugueuse. Tout cela concourt à augmenter la stabilité du sédiment. Les sédiments les plus denses, contenant le moins d'eau, tendent également à être plus stables.

La stabilité du sédiment est également affectée par des facteurs géochimiques (Grabowski et al., 2011). En particulier, la minéralogie des

particules sédimentaires influence leur capacité cohésive, même si ce phénomène a peu été étudié. Du fait de l'importance des ions dans les forces de cohésion entre particules, la chimie de l'eau va également contrôler la stabilité du sédiment, et ce d'autant plus que la présence d'ions modifie l'interaction entre particules sédimentaires et EPS. Le pH, la salinité, le ratio entre cations monovalents et divalents, et le contenu en matière organique du sédiment sont quelques exemples de paramètres géochimiques à prendre en compte pour étudier la stabilité d'un sédiment.

Parmi les facteurs biologiques, la présence d'un biofilm est un des principaux facteurs gouvernant la stabilité du sédiment. Cela peut être directement lié à la présence de microorganismes, par exemple de filaments cyanobactériens liant les particules sédimentaires entre elles (Stal, 2010). Cependant, l'effet du biofilm sur la stabilisation du sédiment est généralement lié à la production d'EPS. Des corrélations positives entre concentrations des EPS et diverses mesures de stabilité du sédiment ont en effet été mises en évidence à la fois en laboratoire et sur le terrain (Decho, 1990, Paterson & Hagerthey, 2001, Stal, 2010). Ces phénomènes de stabilisation sont couramment liés à la présence de diatomées, si bien que le contenu en chlorophylle *a* du sédiment a été proposé comme indicateur de la stabilité du sédiment. Cependant, les bactéries sont également capables de produire des EPS stabilisant le sédiment (Gerbersdorf et al., 2008, Gerbersdorf et al., 2009), bien que ces EPS semblent moins efficaces pour la stabilisation que les EPS de diatomées (Yallop et al., 2000).

De manière générale, les EPS stabilisent le sédiment de différentes manières. Premièrement, ils peuvent diminuer la rugosité de la surface du sédiment, en comblant les espaces entre les particules et en lissant la surface de ces dernières (de Winder et al., 1999) ; le sédiment fait ainsi moins prise à l'eau et son érosion diminue. De plus, les EPS peuvent recouvrir totalement la surface des particules sédimentaires, les rendant ainsi cohésives (Grabowski et al., 2011). Du fait de leur taille importante, ces molécules peuvent également

s'adsorber à la surface de plusieurs particules, liant ces dernières entre elles (Sutherland, 2001). Les EPS forment un réseau plus ou moins lâche piégeant à la fois les cellules et les particules sédimentaires (Fig. 8, Passarelli et al., 2013). Du fait de la diversité importante de molécules composant les EPS, ceux-ci possèdent à la fois des propriétés hydrophiles et hydrophobes, ce qui leur permet d'adhérer à tout type de surface (Flemming & Wingender, 2001). La capacité des EPS à stabiliser le sédiment dépend de leur composition ; les protéines et certains monomères des glucides ont tendance à augmenter l'hydrophobicité du biofilm et ainsi son potentiel de biostabilisation (Bellinger et al., 2009). De même, les acides uroniques présents dans les EPS facilitent l'adsorption des EPS sur le sédiment (de Brouwer et al., 2005).

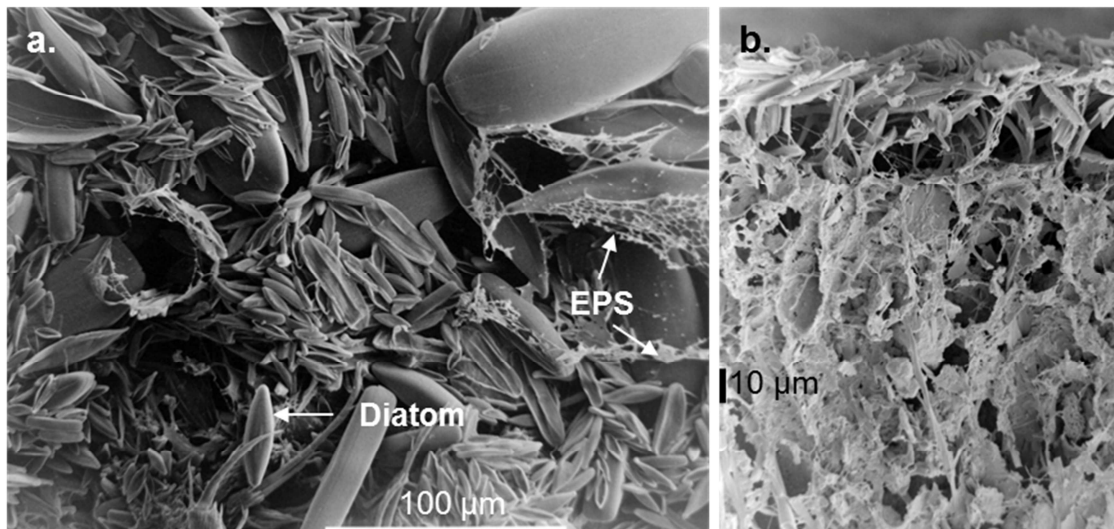


Fig. 8 : images en LTSEM (Low Temperature Scanning Electron Microscopy) d'un biofilm microphytobenthique sur du sédiment. Les EPS liant les particules sédimentaires entre elles sont visibles. a. surface du biofilm. Bande blanche : 100 µm. b. coupe ; la surface du sédiment est en haut de l'image. Bande noire : 10 µm. D'après Passarelli et al, 2013.

Fig. 8: LTSEM (Low Temperature Scanning Electron Microscopy) images of a microphytobenthic biofilm on sediment, showing the links between sediment particles through EPS. a. Surface of the biofilm. White bar: 100 µm. b. Fracture face; the sediment surface is at the top. Black bar: 10 µm. Adapted from Passarelli et al. 2013.

Un grand nombre d'autres organismes ont une influence sur la stabilité du sédiment, soit directement, soit indirectement via une action sur les microorganismes. Les organismes produisant des structures biogéniques, comme par exemple les polychètes construisant des tubes, modifient l'écoulement de l'eau à la surface du sédiment (Eckman et al., 1981, Nowell & Jumars, 1984, Friedrichs et al., 2000). À partir d'une certaine densité de structures, la vitesse de l'eau à la surface du sédiment est réduite (mise en place de « *skimming flow* »), ce qui protège le sédiment de l'érosion et favorise la déposition. Au contraire, une plus faible densité de structures favorise un écoulement turbulent et donc l'érosion du sédiment. De plus, ces structures peuvent modifier le développement du biofilm, et donc indirectement affecter la stabilité du sédiment (Passarelli et al., 2012b).

Les organismes bioturbateurs, qu'ils appartiennent à la méiofaune ou à la macrofaune, ont également un effet sur la stabilité du sédiment, généralement considéré comme négatif (Levinton, 1995, Black & Paterson, 1996, Orvain et al., 2004, Le Hir et al., 2007). Ils retravaillent le sédiment, dérangeant les structures en place, et construisant des terriers qui augmentent le contenu en eau du sédiment (Meadows & Meadows, 1991). Cependant certains produisent des EPS, modifient la circulation de l'eau et des nutriments dans le sédiment et peuvent ainsi stimuler le développement microbien (Scaps, 2002, Hubas et al., 2010). Leur effet net sur la stabilité est donc difficile à prévoir.

Enfin, certains organismes modifient les propriétés sédimentaires du fait de leur nutrition (Grabowski et al., 2011). Par exemple, les déposivores modifient la surface du sédiment, augmentant sa rugosité. Certains organismes comme l'arénicole consomment le sédiment, puis l'égestion de ce dernier peut aboutir à la biodéposition, ce qui généralement ajoute des particules fines au sédiment. Enfin, nombreux organismes consomment le biofilm, et ont ainsi un effet indirect sur la stabilisation. Daborn et al. (1993) ont ainsi montré que la stabilisation du sédiment est augmentée en présence d'oiseaux migrateurs :

ceux-ci se nourrissent en effet du copépode *C. volutator*, lui-même consommateur du biofilm.

La Fig. 9 schématise les principaux paramètres gouvernant la stabilité du sédiment.

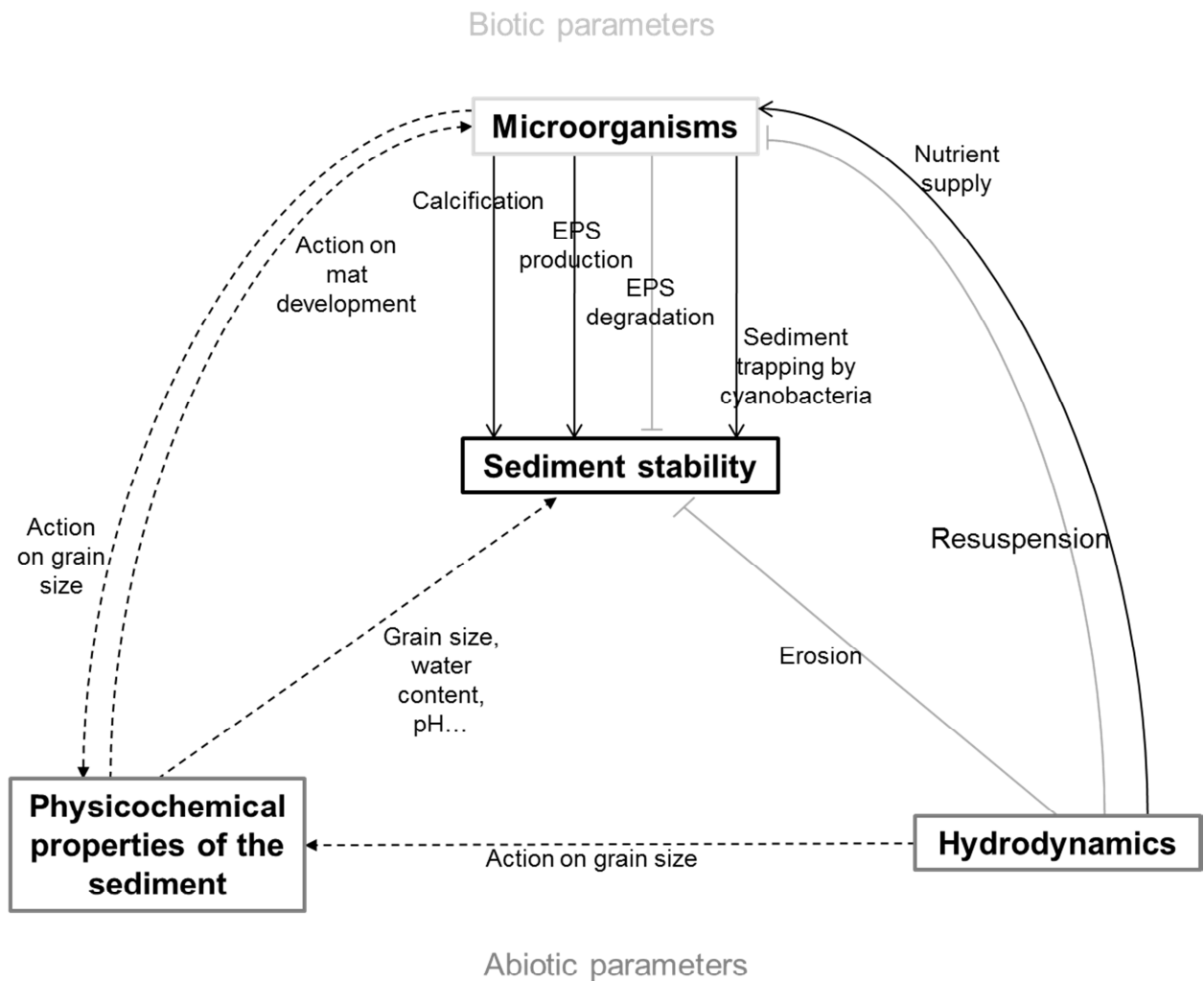


Fig. 9 : paramètres biotiques et abiotiques influençant la stabilité du sédiment. Flèche noire continue : stimule. Traits gris continue : inhibe. Flèche en pointillé : a une influence sur. D'après Hubas et al, 2011.

Fig. 9: biotic and abiotic parameters influencing sediment stability. Arrow with black solid line: stimulates. Arrow with gray solid line: inhibits. Arrow with dashed line: has an influence on. Hubas et al, 2011.

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

Deux types d'approches, complémentaires, sont utilisés en écologie pour comprendre le fonctionnement des écosystèmes. La première approche est celle du suivi spatial et / ou temporel de ce système, qui permet de caractériser les différentes communautés en milieu naturel, ainsi que les divers processus qui y sont associés. Cette approche est intéressante car toutes les variables susceptibles d'affecter le système sont présentes, et elle permet donc d'émettre des hypothèses sur les facteurs importants pour structurer cet écosystème. En revanche, elle ne permet pas de tester formellement le rôle d'un facteur donné. C'est ce manque que comble la deuxième approche, l'approche expérimentale. En milieu contrôlé, cette approche permet de tester l'influence d'un facteur d'intérêt. Le système est cependant simplifié, ce qui l'éloigne le milieu naturel.

Cette étude utilise ces deux approches complémentaires pour mieux comprendre la production d'EPS en conditions naturelles, et son lien avec leurs différents rôles écologiques. Elle vise à répondre aux questions suivantes :

(1) quels sont les facteurs déterminant la composition des EPS, et comment cette composition peut-elle être liée à la composition des assemblages microbiens ?

(2) les EPS sont-ils utilisés directement ou indirectement comme ressource trophique par la macrofaune, et cette utilisation nécessite-t-elle une dégradation par les bactéries ?

(3) comment les consommateurs du biofilms affectent-ils la production d'EPS ?

(4) comment différents paramètres biotiques (macrofaune, microorganismes, EPS) interagissent-ils pour déterminer la stabilité du sédiment ?

Le chapitre I détaille les méthodes d'analyses qui ont été utilisées dans les différents chapitres pour répondre à ces questions.

Le chapitre II présente un suivi d'un an en milieu naturel, qui a permis de mettre en relation composition des assemblages de microorganismes, composition des EPS, et différents paramètres de fonctionnement du biofilm.

Le chapitre III décrit deux expériences visant à caractériser le transfert des EPS dans les réseaux trophiques, et l'influence de la dégradation bactérienne dans ce transfert.

Le chapitre IV expose les résultats de deux expériences mises en place pour déterminer l'influence de la consommation sur la production d'EPS par les microorganismes. La première expérience s'est intéressée à l'effet de la méiofaune, et au rôle du QS dans la mise en place de cet effet. La deuxième expérience a utilisé des organismes de la macrofaune et a déterminé l'effet combiné de celle-ci et des microorganismes sur la stabilité du sédiment.

Enfin, les résultats de ces différentes études sont discutés ensemble et remis en perspective dans une dernière partie.

Chapitre I

Méthodes d'analyse

Les protocoles expérimentaux de chaque étude seront présentés dans les chapitres associés. Cependant, afin de ne pas en alourdir la lecture, les méthodes d'analyses sont détaillées ici.

ANALYSE DE LA COMPOSITION EN ACIDES GRAS

Cette analyse a été réalisée selon la méthode de Bligh & Dyer (1959), modifiée de la manière décrite dans l'article de Meziane et al. (2007) et Mortillaro et al. (2011).

Les acides gras ont été extraits de 400 à 500 mg de sédiment lyophilisé, ou de 30 mg de chair lyophilisée. Au préalable, un standard interne (l'acide gras saturé à 23 carbones, le 23:0, qui n'existe pas à l'état naturel ; acheté dans le commerce) a été ajouté en quantité connue à chaque échantillon. Ce standard permettra par la suite de calculer la concentration de chaque acide gras dans l'échantillon.

La première étape du protocole consiste à extraire tous les lipides de l'échantillon. Pour ce faire, un mélange d'eau distillée, de chloroforme et de méthanol (en ratio volumique 1:2:2) est ajouté à l'échantillon déposé dans un tube en verre, qui est ensuite placé dans le bain à ultrasons pendant 20 min. Un mélange d'eau distillée et de chloroforme (1:1, v:v) est alors ajouté à l'échantillon, et l'ensemble est centrifugé 5 min à 2000 g. Cette étape permet une séparation de la phase aqueuse et de la phase organique qui contient les lipides. Cette phase organique, diluée dans le chloroforme, est alors transférée vers un nouveau tube en verre. Un même volume de chloroforme est ajouté de nouveau au premier tube, et une seconde extraction identique à la première est réalisée. La phase organique restante est alors récupérée et ajoutée à la première. Le chloroforme est alors évaporé sous flux de diazote N₂. Les lipides totaux sont ainsi concentrés sans risquer d'être oxydés.

L'étape suivante consiste à saponifier les lipides. En effet, une classe importante de lipides est composée des triglycérides formant la membrane

cellulaire. La saponification permet de séparer le glycérol des trois acides gras (Fig. I.1a). C'est la composition de ces acides gras, et de ceux qui sont libres dans le plasma, qui sera par la suite analysée. La saponification se fait grâce à un mélange de soude NaOH ($2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) et de méthanol (1:2, v:v) à 90°C pendant 90 min. La saponification est arrêtée par ajout d'acide chlorhydrique concentré. On ajoute alors du chloroforme et on pratique une double extraction des acides gras comme décrit précédemment. Les deux volumes de chloroforme, qui contiennent les acides gras, sont de nouveau récupérés, transférés vers un nouveau tube en verre et concentrés sous flux de N_2 .

La dérivatisation des acides gras est l'étape suivante : elle permet de rendre les acides gras volatiles et ainsi de les analyser en chromatographie en phase gazeuse. Pour cela, les acides gras sont incubés dans du BF_3 -méthanol (boron-trifluoride méthanol) à 90°C pendant 10 min. Cette réaction transforme les acides gras en méthyl-esters d'acides gras (Fig. I.1b), qui sont alors récupérés avec du chloroforme (double extraction comme décrit précédemment) et gardés congelés dans le chloroforme.

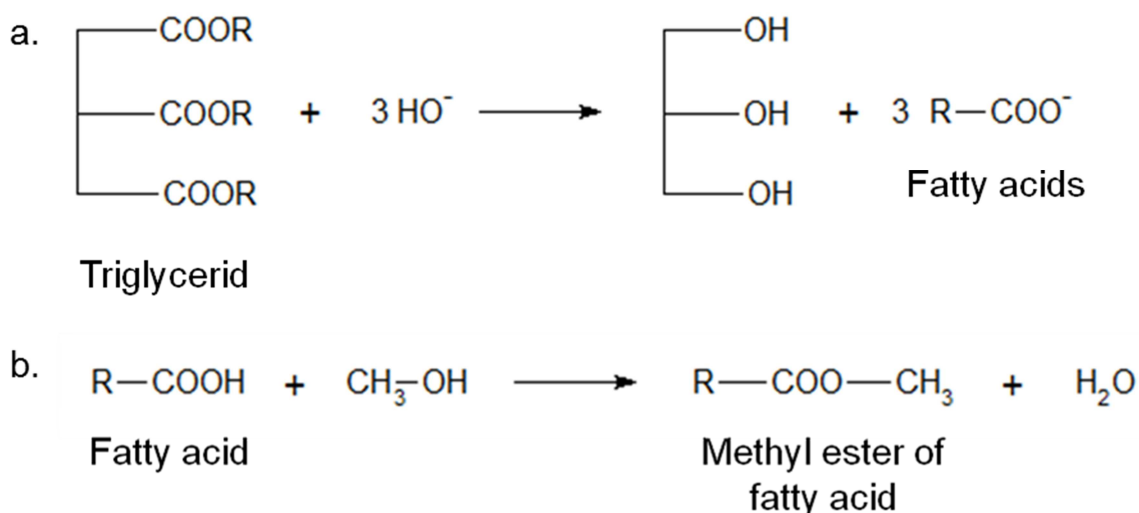


Fig. I.1 : réactions chimiques de a. saponification des triglycérides et b. méthylation des acides gras en en méthylesters d'acides gras. R est une chaîne carbonée.

Fig. I.1: chemical reactions of a. saponification of triglycerids and b. methylation of fatty acids into fatty acid methyl esters. R is a carbon chain.

Juste avant leur analyse en chromatographie en phase gazeuse, les échantillons sont de nouveau évaporés sous flux de N₂ et transférés dans de l'hexane. 1 µl du mélange est alors injecté en chromatographie en phase gazeuse (GC, Varian CP-3800 équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID)), qui permet à la fois la séparation et la quantification des acides gras. La séparation est réalisée sur une colonne Supelco OMEGA WAX 320® (30 m × 0.32 mm de diamètre interne, avec une épaisseur de film de 0.25 µm), avec l'hélium en gaz vecteur. Le programme de température utilisé est le suivant : départ à 60 °C pendant 1 min, puis augmentation de la température jusqu'à 150 °C à un taux de 40 °C·min⁻¹ (150 °C maintenus pendant 3 min), puis augmentation de la température jusqu'à 240 °C à un taux de 3 °C·min⁻¹ (240 °C maintenus pendant 7 min).

Les acides gras sont alors séparés selon leur nombre de carbone, leur nombre d'insaturations (doubles liaisons entre deux carbones) et leur structure chimique (présence de ramifications). Chaque acide gras apparaît sous forme d'un pic sur le chromatogramme, à un temps constant pour un acide gras donné, appelé temps de rétention. L'identification des pics se fait alors soit par comparaison avec des standards analytiques (mélange d'acides gras de composition connue ; Supelco™ 37, PUFA-1 Marine Source, Supelco Inc., USA), soit, pour les acides gras encore non déterminés, par injection de l'échantillon en GC-MS (un chromatographe en phase gazeuse Varian 450-GC couplé à un spectromètre de masse Varian 220-MS).

Sur les chromatogrammes obtenus grâce à la GC-FID, l'aire de chaque pic est proportionnelle à sa concentration dans l'échantillon. Connaissant l'aire du pic du 23:0, ainsi que la quantité initialement ajoutée à l'échantillon, on déduit les concentrations de tous les acides gras dans l'échantillon selon la formule :

$$C_{AG} = \frac{A_{AG}}{A_{23:0}} \times \frac{C_{23:0}}{P} \quad (\text{equ. 1})$$

où : C_{AG} est la concentration de l'acide gras dans l'échantillon ($\text{mg}_{AG} \cdot \text{g}_{\text{échantillon}}^{-1}$);

A_{AG} est l'aire du pic de l'acide gras ;

$A_{23:0}$ est l'aire du pic du 23:0 ;

$C_{23:0}$ est la quantité de 23:0 ajoutée (mg) ;

P est le poids sec (après lyophilisation) de l'échantillon (g).

Les acides gras sont notés X:Y ω Z, où X est le nombre de carbones, Y est le nombre de doubles liaisons (insaturations) et Z est la position de la double liaison la plus éloignée du carbone terminal. On ajoute iso aux noms des acides gras possédant un groupe méthyl sur le carbone précédent le carbone terminal. On ajoute anteiso à ceux possédant un groupe méthyl sur le carbone d'avant.

DGGE

La diversité génétique des communautés microbiennes a été évaluée grâce à la technique de biologie moléculaire d'électrophorèse sur gel en condition de gradient dénaturant (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE ; Muyzer et al., 1993). Cette technique exploite une propriété fondamentale de l'ADN : les bases azotées thymine (T) et adénine (A) sont liées entre elles par deux liaisons hydrogènes, tandis que trois liaisons hydrogènes lient la guanine (G) à la cytosine (C) (Fig. I.2 ; Watson & Crick, 1953). Ce dernier lien est donc plus fort.

La méthode consiste à amplifier par PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) l'ADN d'une communauté entière avec des amorces universelles pour un gène d'intérêt. Les produits de PCR, tous de la même taille, mais de séquences différentes, sont alors mis à migrer dans un gel qui contient, de haut en bas, de plus en plus de dénaturants. À partir d'une certaine concentration en dénaturants, qui dépend du pourcentage de GC et de la séquence de chaque

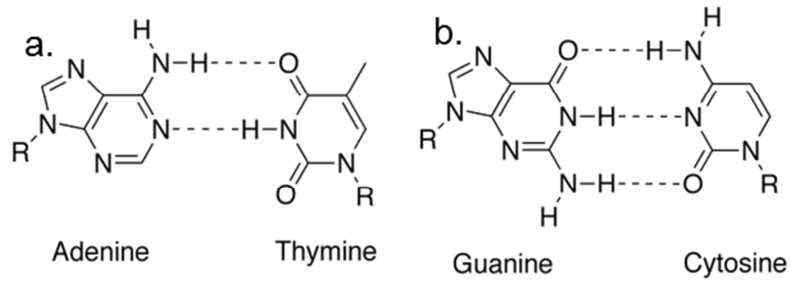


Fig. I.2 : liaisons hydrogènes entre a. l'adénine et la thymine (2 liaisons) et b. la guanine et la cytosine (3 liaisons). Les liaisons hydrogènes sont représentées en pointillé.

Fig. I.2: hydrogen bonds between a. adenine and thymine (2 bonds) and b. guanine and cytosine (3 bonds). Hydrogen bonds are figured in dotted lines.

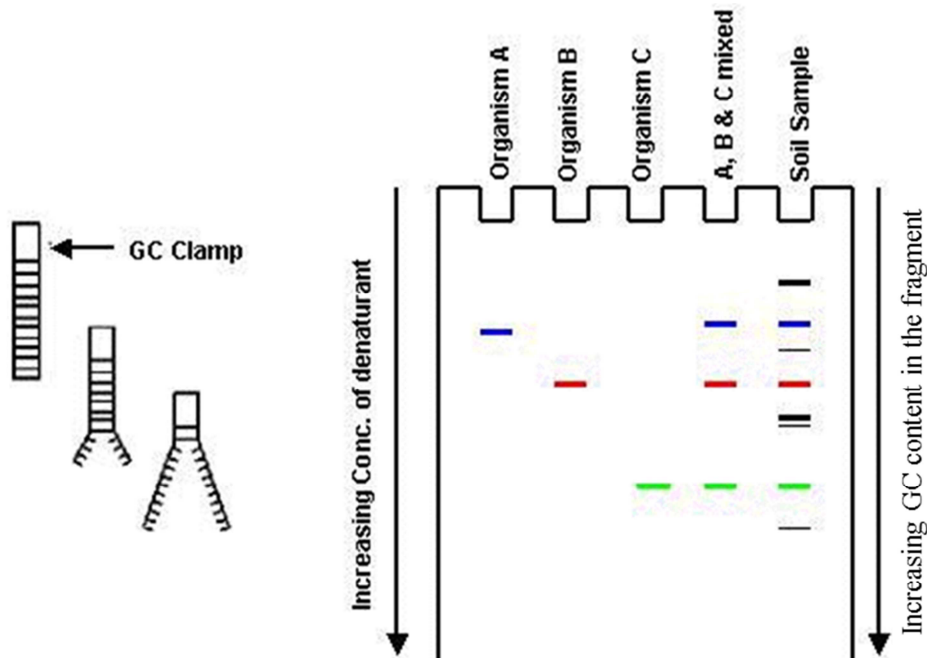


Fig. I.3 : représentation schématique de motifs de bandes de DGGE réalisées à partir de cultures d'un ou trois organismes, et d'un échantillon naturel de sédiment contenant ces organismes.

Fig. I.3: schematic DGGE band patterns of culture samples containing 1 or 3 organisms, and of a natural sediment sample containing these organisms.

fragment, les deux brins d'ADN commencent à se séparer ; la migration du fragment est alors arrêtée. Ainsi, plus un fragment contient de GC, plus la liaison entre les deux brins est forte et plus le fragment va migrer loin.

On obtient ainsi, pour chaque échantillon, un ensemble de bandes (appelé motif de bandes), chaque bande correspondant à un groupe d'organismes dont

la séquence et le contenu en GC sont proches (Fig. I.3). En outre, plus les membres d'un groupe sont présents en abondance dans l'échantillon initial, plus le nombre de fragments dans la bande correspondante sera important. La DGGE est donc une technique semi-quantitative. Elle permet à la fois d'avoir une idée des groupes présents dans un échantillon et de leur abondance relative.

Si la DGGE ne permet pas une identification précise de tous les organismes présents dans l'échantillon initial, elle donne une « empreinte génétique » de l'échantillon (« genetic fingerprinting »). On peut ainsi comparer deux échantillons selon leur motif de bandes ; le nombre de bandes en commun, de bandes présentes dans chaque échantillon et l'abondance relative de chaque groupe permet la comparaison.

Pour notre étude (expérience à Chausey, cf chapitre II), deux gènes d'intérêt ont été choisis. Le premier est le gène codant, chez les bactéries, l'ARN ribosomique 16S. Ce gène est présent chez toutes les bactéries et sa séquence est spécifique à chaque espèce. Des amorces universelles, qui permettent l'amplification de ce gène chez toutes les bactéries, ont été utilisées.

Le second est le gène *rbcL*-3P, codant une partie de la grande sous-unité de la RuBisCO (Ribulose-1-5 Bisphosphate Carboxylase Oxygenase) impliquée dans la photosynthèse. Ce gène est donc présent chez tous les organismes photosynthétiques ; des amorces spécifiques des diatomées ont été utilisées pour cibler cette population.

Extraction de l'ADN

0,4 g de sédiment homogénéisé a été utilisé pour extraire l'ADN de toute la communauté microbienne. Cette extraction a été réalisée avec le PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, USA), selon les instructions du constructeur. Brièvement, les cellules sont d'abord lysées à la fois mécaniquement (agitation forte) et chimiquement (utilisation de détergents). Les déchets (débris de cellules, molécules non ADN) sont alors précipités par

adjonction de différents produits chimiques, puis l'ADN est purifié sur une colonne ionique retenant spécifiquement l'ADN.

Amplification des gènes d'intérêt

Pour les deux gènes, l'amplification a été réalisée par PCR. Cette méthode utilise une polymérase de l'ADN qui fonctionne aux fortes températures (Taq polymérase, issue de la bactérie thermophile *Thermus aquaticus*). Cette polymérase est mise en contact avec l'ADN extrait, en présence de nucléotides et d'amorces. Ces dernières sont des oligonucléotides se fixant sur des régions constantes de l'ADN encadrant une région variable d'intérêt. Puis le mélange est soumis à des cycles de température :

- une phase de dénaturation (température forte) pendant laquelle les deux brins des fragments d'ADN se séparent ;
- une phase d'hybridation (température faible) pendant laquelle les amorces se fixent sur les brins d'ADN ;
- une phase de polymérisation (température moyenne) pendant laquelle l'enzyme polymérise le brin complémentaire de chaque brin d'ADN initial.

À chaque cycle, la quantité de fragments de la zone d'intérêt double donc. Les cycles sont répétés jusqu'à ce que la quantité d'ADN obtenue soit suffisante pour la réalisation de la DGGE.

Pour la réalisation de la DGGE, une des deux amorces contient un « clamp GC » (CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCGCCCCG), qui sera amplifié et qui permet d'éviter que les deux brins des fragments d'ADN ne se séparent complètement lorsque la concentration en dénaturants augmente.

Les amorces et conditions de PCR utilisées pour chaque PCR sont détaillées dans la table I.1.

Table I.1 : tableau récapitulatif des conditions de PCR utilisées pour les deux gènes d'intérêt.

Table I.1: recap chart of PCR conditions used for genes of interest.

	ARN_r 16S	<i>rbcl-3P</i>
Amorce sens	27F-GC (Weisburg et al., 1991)	CfD (Hamsher et al., 2011)
Amorce antisens	518R (Muyzer et al., 1993)	DPrbcL7-GC (Hamsher et al., 2011)
Taille du fragment amplifié	530 bp	790 bp
Volume final de PCR	15 µl	30 µl
Composition du mix de PCR	3 µl de tampon 5X MgCl ₂ à 2 mmol·l ⁻¹ 10 pmol de dNTP 10 pmol de chaque amorce 1,5 U de polymérase (GoTaq Flexi DNA polymerase)	6 µl de tampon 5X MgCl ₂ à 2 mmol·l ⁻¹ 20 pmol de dNTP 20 pmol de chaque amorce 3 U de polymérase (GoTaq Flexi DNA polymerase)
Quantité d'ADN ajoutée	0,4 µl	0,7 µl
Programme de PCR	<u>Dénaturation initiale</u> : 95 °C pendant 5 min <u>30 cycles</u> : 95°C pendant 30 s 55 °C pendant 45 s 72 °C pendant 45 s <u>Extension finale</u> : 72 °C pendant 10 min	<u>Dénaturation initiale</u> : 95 °C pendant 2 min <u>35 cycles</u> : 94°C pendant 20 s 60 °C pendant 30 s 72 °C pendant 2 min <u>Extension finale</u> : 72 °C pendant 10 min

Il convient de noter que l'amorce 518R a été couplée à un fluorochrome (Cy5) permettant ainsi une meilleure visualisation du gel.

L'étape suivante consiste à quantifier les produits de PCR, afin de déposer sur le gel de DGGE une quantité similaire d'ADN pour chaque échantillon. Pour cela, 0,5 µl de produit de PCR a été déposé sur un gel contenant 0,8 % d'agarose et contenant du BET (bromure d'éthidium, colorant de l'ADN). De plus, 1 µl d'un mélange de fragments d'ADN de tailles et concentrations connues a été déposé sur le gel (Smart Ladder, Eurogentec) ; ceci permettra de vérifier la taille du fragment de PCR obtenu et de déterminer la concentration d'ADN dans chaque produit de PCR. Après migration, l'image du gel est analysée avec le logiciel ImageQuantTL (Ge Healthcare), et la concentration en ADN de chaque produit de PCR est calculée.

Électrophorèse sur gel en condition de gradient dénaturant

La DGGE a été réalisée avec un système D-code Universal Mutation Detection (BioRad, Hercules, CA). Des quantités similaires de produits de PCR de chaque échantillon ont été chargées sur un gel d'épaisseur 1 mm et contenant 6 % (poids:volume) de polyacrylamide. Les 100 % de dénaturation correspondaient à de l'urée à 7 mol·l⁻¹ et du formamide (40 %). Le tampon de migration était du TAE 1,25X (Tris-HCl à 40 mmol·l⁻¹, acide acétique à 20 mmol·l⁻¹ et EDTA à 1 mmol·l⁻¹). Avant la visualisation, le gel a été lavé au TAE 1,25 X pendant 30 min.

Les conditions de migration et de visualisation des gels, pour chaque gène d'intérêt, sont détaillées dans la table I.2.

Les motifs de bandes ont été analysés avec le logiciel GelCompar II® (version 6.0, Applied Maths NV, Belgique), qui a permis d'associer les bandes correspondantes entre les différents échantillons.

Table I.2 : tableau récapitulatif des conditions de migration de DGGE utilisés pour les deux gènes d'intérêt.

Table I.2: recap chart of DGGE migration conditions used for genes of interest.

	ARN_r 16S	<i>rbcL</i>-3P
Quantité d'ADN chargée	400 ng	800 ng
Gradient de dénaturation	30 % à 50 %	10 % à 30 %
Température de migration	60 °C	57 °C
Tension de migration	150 V	150 V
Durée de migration	280 min	310 min
Visualisation du gel	Fluorescence du Cy5 lue au Typhoon Trio Imager (GE Healthcare)	Incubation au bromure d'éthidium (0,5 µg·ml ⁻¹) pendant 30 min puis lecture à l'ImageQuant™ LAS 4000 Imager (GE Healthcare)

MESURE DES ABONDANCES BACTÉRIENNES

La mesure des abondances bactériennes a été faite par comptage direct en microscopie. Pour cela, les échantillons sont fixés avec du formol à 3 % dans de l'eau de mer stérile. Les bactéries sont séparées du sédiment par l'ajout d'une goutte de Tween® 80 (Fisher Scientific) dans le mélange d'eau et de sédiment. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain à ultrasons (35 kHz) pendant 3 min, puis centrifugés 10 min à 1700 g. 1 ml de surnageant, qui contient les bactéries, est alors mélangé à 2 µg de DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich), qui est une molécule fluorescente se fixant sur

l'ADN. Le mélange est laissé 15 min à 5 °C à l'obscurité pour que le marquage puisse se faire.

Le mélange est alors filtré sur 0,2 µm ; le filtre est ensuite monté entre lame et lamelle en utilisant de l'huile à immersion non fluorescente pour optimiser l'observation. Les filtres sont observés grâce à un microscope à épifluorescence (Leica) connecté à un ordinateur via une caméra couleur, ce qui permet de prendre des photos des filtres grâce au logiciel ImagePro Express 6.0. 10 photos sont prises à différents endroits du filtre (Fig. I.4), et les bactéries sont comptées sur chaque image. La taille de l'image est ensuite calculée à l'aide d'une photo de mire placée sous le microscope ; ceci permet d'obtenir un nombre de bactéries par unité de surface. Le nombre total de bactéries sur le filtre, et donc dans l'échantillon de sédiment initial, est alors estimé.

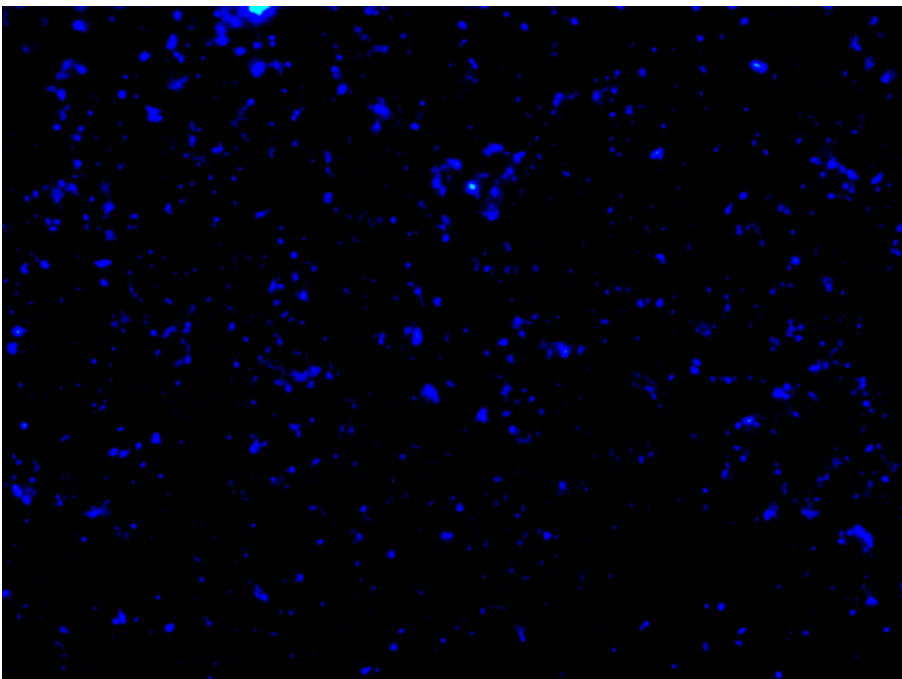


Fig. I.4 : photo d'un filtre au microscope à épifluorescence, montrant de nombreuses bactéries (points bleus).

Fig. I.4: picture of filter in epifluorescence microscopy, showing numerous bacteria (blue dots).

DOSAGE DES CHLOROPHYLLES

Le dosage des concentrations en chlorophylles *a*, *b* et *c* dans les sédiments a été réalisé par spectrophotométrie. 1,5 ml d'acétone à 90 % sont ajoutés à l'échantillon, qui est placé à l'obscurité pendant 16 h, pendant lesquelles les chlorophylles passent entièrement dans l'acétone. L'absorbance du mélange est

alors mesurée à 630, 647, 664 nm, ainsi qu'à 750 nm pour réaliser un blanc de turbidité. Les concentrations en chlorophylles sont calculées grâce aux équations suivantes (Jeffrey et al., 1997b) :

$$[\text{Chl } a] = \frac{(11,85 \times (A_{664} - A_{750}) - 1,54 \times (A_{647} - A_{750}) - 0,08 \times (A_{630} - A_{750})) \times V_e}{S \times 1000} \quad (\text{equ. 2})$$

$$[\text{Chl } b] = \frac{(-5,43 \times (A_{664} - A_{750}) + 21,03 \times (A_{647} - A_{750}) - 2,66 \times (A_{630} - A_{750})) \times V_e}{S \times 1000} \quad (\text{equ. 3})$$

$$[\text{Chl } c] = \frac{(-1,67 \times (A_{664} - A_{750}) - 7,60 \times (A_{647} - A_{750}) + 24,52 \times (A_{630} - A_{750})) \times V_e}{S \times 1000} \quad (\text{equ. 4})$$

avec : [Chl] la concentration en chlorophylle ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$),

A_n l'absorbance du mélange à la longueur d'onde « n » (nm),

V_e le volume d'extraction (1,5 ml ici),

S la surface échantillonnée (cm^2).

ANALYSE DES PIGMENTS PAR HPLC

Ces analyses ont été réalisées par les docteurs B. Jesus et M. Ruivo de l'université de Lisbonne, selon le protocole suivant.

Le sédiment lyophilisé est homogénéisé et c'est un sous-échantillon de 0,2 mg qui est analysé. Les échantillons sont passés au bain à ultrasons pendant 30 s dans 2 ml de méthanol froid à 95 %, tamponné à 2 % dans de l'acétate d'ammonium, puis l'extraction se déroule pendant 15 min à -20°C dans le noir. Les extraits sont ensuite filtrés sur des membranes Whatman (0,2 mm) juste avant l'analyse par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC).

Les extraits sont analysés avec une HPLC (Shimadzu) constituée d'un module effectuant le mélange des solvants (LC-10ADVP sous contrôle d'un programmeur de gradient SCL-10AVP), d'une barrette de photodiodes (SPD-M10AVP), d'un détecteur UV-visible et d'un détecteur de fluorescence (RF-10AXL). La séparation des pigments est réalisée par chromatographie en phase inverse avec une colonne C18 (Supelcosil, 25 cm de long, 4,6 mm de diamètre,

particules de 5 mm). Les solvants utilisés sont : l'acétate d'ammonium à 0,5 mol·l⁻¹ dans un mélange de méthanol et d'eau (85:15, v:v ; solvant A) ; un mélange d'acétonitrile et d'eau (90:10, v:v ; solvant B) ; et de l'éthyl-acétate pur (solvant C). Le gradient utilisé est décrit dans la table I.3.

Table I.3 : protocole d'analyse des pigments par HPLC.

Table I.3: HPLC protocol for pigment composition analyses.

Temps (min)	Solvants (%)			Flux (ml·min ⁻¹)	Type de gradient
	A	B	C		
0	60	40	0	0.6	Injection
2	0	100	0	0.6	Linéaire
7	0	80	20	0.6	Linéaire
17	0	50	50	0.6	Linéaire
21	0	30	70	0.6	Linéaire
28.5	0	30	70	0.6	Linéaire
29.5	0	100	0	0.6	Linéaire
30.5	60	40	0	0.6	Linéaire

L'identification et la calibration des pics est confirmée avec des standards de chlorophylles *a*, *b* et *c*, de β -carotène, de fucoxanthine, de diadinoxanthine, de diatoxanthine, de lutéine, de zéaxanthine et de phéophytine *a*. Les pigments ont été identifiés grâce à leur spectre d'absorption et à leur temps de rétention, et les concentrations sont calculées à partir des signaux du détecteur UV-visible (chlorophylles et caroténoïdes) ou du détecteur de fluorescence (phéophorbides et phéophytines).

DOSAGE DES EPS COLLOÏDAUX

La première étape consiste à extraire les EPS colloïdaux du sédiment. Pour les extraire, les échantillons de sédiment sont roulés à l'horizontale avec de l'eau distillée pendant 1h30.

Le dosage des glucides et des protéines est ensuite réalisé par colorimétrie.

Dosage des protéines

Il a été réalisé selon la méthode de Lowry modifiée. La première étape consiste à préparer le réactif 4, mélange dans les proportions 100:1:1 (v:v:v) des réactifs 1 (soude NaOH à $143 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ et carbonate de calcium Na_2CO_3 à $270 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), 2 (pentahydrate de sulfate de di-sodium CuSO_4 à $57 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$), et 3 (di-tartrate de sodium à $124 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$). Ce mélange est refait chaque jour.

250 μl d'échantillon (eau contenant les EPS colloïdaux) sont mélangés à 250 μl de SDS à 2 % (Sodium Dodecyl Sulfate, poids:volume) et à 700 μl du réactif 4, et le tout est passé au vortex puis incubé 15 min au bain-marie à 30 °C. Puis 100 μl de réactif de Folin, dilué dans le rapport 5:6 avec de l'eau distillée, sont ajoutés à chaque tube. Le tube est ensuite renversé une fois, vortexé et incubé 45 min à 30 °C.

Les échantillons deviennent alors bleus, d'autant plus qu'ils contiennent des protéines. L'absorbance de l'échantillon est alors mesurée à 750 nm et comparée à une courbe de calibration précédemment établie avec de la BSA (Albumine de Sérum Bovin) pour des concentrations allant de 0 à $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Les échantillons dont les mesures ne rentrent pas dans la gamme sont dilués et le protocole est réalisé de nouveau.

Dosage des glucides

200 μl d'échantillon sont mélangés à 200 μl de phénol à 5 % (poids:volume) et à 1 ml d'acide sulfurique (H_2SO_4) pur. Le tube est renversé une fois et incubé 30 min au bain-marie à 30 °C.

Les échantillons deviennent alors jaunes voire rouges, d'autant plus qu'ils contiennent des glucides. L'absorbance est mesurée à 488 nm, et comparée à une courbe de calibration précédemment établie avec du D-glucose, pour des concentrations jusqu'à 200 mg·l⁻¹. Les échantillons dont les mesures ne rentrent pas dans la gamme sont dilués et le protocole est réalisé de nouveau.

ANALYSE DE LA COMPOSITION DES EPS EN MONOSACCHARIDES

Le protocole a été adapté de la méthode décrite par Pierre et al. (2010), et est présenté ici pour 10 ml de sédiment. La première étape consiste à extraire les EPS, ce qui se fait en deux étapes. Les échantillons sont d'abord roulés avec 10 ml d'eau de mer artificielle à 30 g·l⁻¹ à 4 °C pendant 1 h, ce qui permet l'extraction des EPS colloïdaux. Les échantillons sont centrifugés 10 min à 3500 g et le surnageant est récupéré et conservé. 10 ml d'eau de mer sont alors ajoutés au culot, ainsi que 0,5 g de résine cationique (Dowex Marathon C, forme sodique, activée dans du PBS à 4 °C pendant 1 h). Cette résine permet de piéger les cations qui maintiennent les EPS liés entre eux et au sédiment, permettant ainsi l'extraction des EPS liés. Le mélange est roulé à nouveau pendant 1 h à 4 °C. Les tubes sont alors centrifugés 10 min à 3500 g et le surnageant est récupéré. Les deux fractions sont ensuite traitées de la même manière.

Les échantillons sont dialysés contre de l'eau distillée, afin d'enlever les molécules de petite taille (sel et sucres non EPS). La dialyse se fait avec un ruban retenant les molécules de taille supérieure à 12 à 14 kDa. Les échantillons sont insérés dans le ruban, qui est fermé hermétiquement, et mis à dialyser dans un grand volume d'eau distillée maintenue à 4 °C (environ 1 l par échantillon). Après 1 h, l'eau est changée et la dialyse se poursuit pendant 1 h. Après la dialyse, les échantillons sont lyophilisés.

L'étape suivante consiste à hydrolyser les sucres afin de séparer les différents monomères formant les glucides. L'échantillon lyophilisé est transféré dans un vial et de l'acide chlorhydrique à 2 mol·l⁻¹ est ajouté, à raison

de 1 ml pour 50 mg. Les échantillons sont alors incubés 4 h à 90 °C. Les échantillons sont ensuite congelés et lyophilisés.

Enfin, les échantillons sont silylés afin de pouvoir être injectés en GC. La dérivatisation se fait grâce au BSTFA:TMCS (N,O-bis(triméthylsilyl)trifluoroacétamide et triméthylchlorosilane, 100:1, Sigma). La réaction remplace le groupement alcool porté par le sucre par un groupement triméthylsilyl (-Si-(CH₃)₃; Fig. I.5, adaptée de Knapp, 1979); les sucres deviennent ainsi volatiles et peuvent être analysés en chromatographie en phase gazeuse. 2 mg d'échantillon sont placés dans un vial, auquel sont ajoutés 75 µl de BSTFA:TMCS et 75 µl de pyridine. L'échantillon est alors mélangé 2 h à température ambiante et analysé dans les 24 h suivantes. 1 µl du mélange est injecté en chromatographie en phase gazeuse (GC, Varian CP-3800 équipée d'un détecteur à ionisation de flamme (FID)). La séparation est réalisée sur une colonne VF-1701ms (Agilent Technologies, 30 m × 0.32 mm de diamètre interne, avec une épaisseur de film de 0.25 µm), avec l'hélium en gaz vecteur. Le programme de température utilisé est le suivant: départ à 150 °C puis augmentation à un taux de 7 °C·min⁻¹ jusqu'à 200 °C, maintenus 5 min. La température de l'injecteur est de 250 °C.

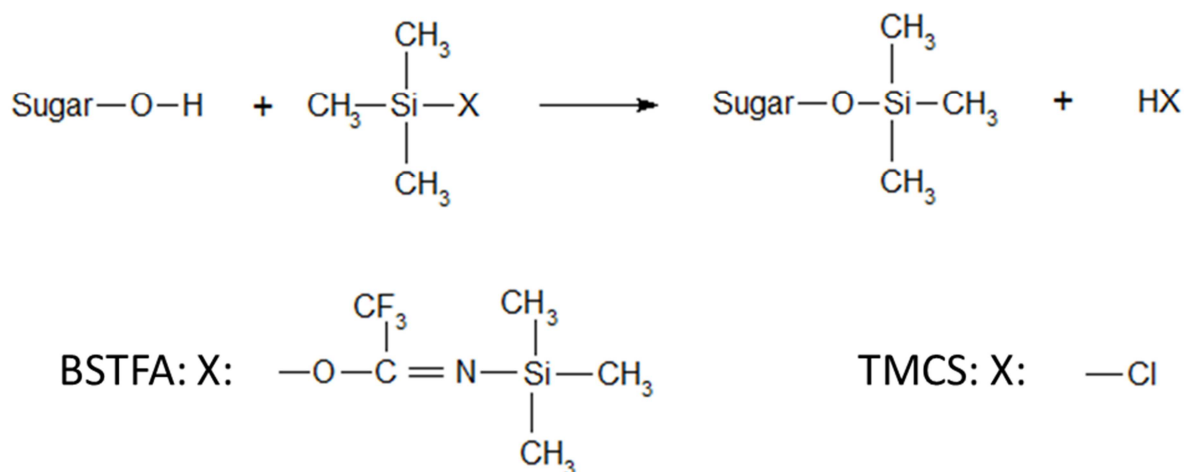


Fig. I.5 : dérivatisation des sucres par le BSTFA:TMCS. Le BSTFA et le TMCS sont formés d'un groupement triméthylsilyl (-Si-(CH₃)₃) lié à un radical X.

Fig. I.5: derivatisation of sugars by BSTFA:TMCS. BSTFA and TMCS are formed by a group trimethylsilyl (-Si-(CH₃)₃) linked to a group X.

Les pics de monosaccharides sont identifiés par comparaison de leur temps de rétention avec ceux de standards (arabinose, rhamnose, fucose, xylose, mannose, galactose, glucose, scyllo- et myo-inositol, acides galacturonique et glucuronique), préparés comme les échantillons (silylation et injection seulement).

QUANTIFICATION DES COMPOSÉS DU QUORUM SENSING (QS)

Le terme de composés du quorum sensing recouvre un ensemble varié de molécules, dont le point commun est de permettre la régulation de fonctions bactériennes dépendant de la densité de la population. Il est donc difficile de quantifier tous les composés du QS, d'autant plus que ces composés sont présents en très faible concentration dans l'environnement. De ce fait, des méthodes d'analyses utilisant des biosenseurs ont été développées. L'idée est d'utiliser des souches bactériennes émettant naturellement de la lumière en présence de composés du QS (par exemple, *Vibrio harveyi*). On place des souches en présence de l'échantillon à tester, et la lumière émise par les bactéries est mesurée grâce à un luminomètre.

Pour notre expérience (chapitre IV, partie 1), 3 souches ont été utilisées. La première est une souche classique de *V. harveyi*, sensible à tous les composés du QS (souche BB120). Les deux autres souches ont été modifiées afin de ne réagir qu'à un type de composés : les auto-inducteurs de type 1 (molécules AI-1 ; souche BB886) ou de type 2 (AI-2, BB170). Ces souches ont été cultivées à 25 °C à l'obscurité sous agitation permanente, dans du milieu de culture LB réalisé avec de l'eau salée à 25 g·l⁻¹ et autoclavée.

Pour la mesure, l'échantillon de sédiment a été mélangé avec 4 ml d'eau distillée, et le mélange a été centrifugé 10 min à 3000 g. Le surnageant a ensuite été filtré sur 0,2 µm pour s'assurer de l'absence de bactérie. 20 µl de surnageant ont alors été mis en contact avec 180 µl de culture de biosenseurs, repiquée la veille et diluée au 5000^{ème}. Ce mélange a été réalisé dans une plaque de

luminomètre de 96 puits à bords opaques. Pour chaque échantillon, 3 réplicats pour chaque souche de biosenseurs ont été réalisés. La luminosité a alors été mesurée grâce à un luminomètre à plaques (Trilux 1450 microbeta). Pour les 3 souches de biosenseurs, le surnageant de la souche BB120 a été utilisé à la place de l'échantillon comme témoin positif de présence de composés du QS, et de l'eau distillée comme témoin négatif.

Il est possible, par la suite, de mettre ces souches en contact avec des quantités connues de composés du QS afin de pouvoir associer chaque mesure de luminosité à une concentration. Cependant, étant donné que seule la comparaison entre traitements nous intéressait dans le cadre de notre étude, cette étape n'a pas été réalisée ici.

ANALYSES ISOTOPIQUES

Les échantillons ont été analysés pour leur composition en ^{13}C . Cet isotope stable du carbone est présent naturellement dans la nature à de très faibles concentrations ; contenant un neutron de plus que le carbone le plus courant, le ^{12}C , il peut être séparé de ce dernier par spectrométrie de masse.

Analyse de l'échantillon entier

Une première étape a consisté à analyser l'échantillon entier. Pour cela, les échantillons (sédiment, EPS ou chair) sont lyophilisés puis disposés dans des capsules d'étain. Le poids utilisé pour l'analyse dépend de la teneur en carbone de l'échantillon : environ 30 mg pour le sédiment ou les EPS, et 1 mg pour la chair.

Ces capsules sont ensuite envoyées pour analyse à l'UC Davis Stable Isotope Facility (Department of Plant Sciences, université de Davis, USA), équipée d'un spectromètre de masse Europe Hydra 20/20. Ce spectromètre permet de déterminer le ratio R ($^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$) de l'échantillon et ainsi de calculer le $\delta^{13}\text{C}$ (en ‰) de l'échantillon, défini ainsi :

$$\delta^{13}\text{C} = \left(\frac{R_{\text{échantillon}}}{R_{\text{standard}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (\text{equ. 5})$$

où le R_{standard} correspond au ratio $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$ de l'échantillon de référence (Vienna PeeDee Belemnite), fortement enrichi en ^{13}C . A l'état naturel, le $\delta^{13}\text{C}$ est donc presque systématiquement négatif.

Analyse des ratios isotopiques des acides gras par GC-IRMS

La seconde étape a consisté, pour certains échantillons, à déterminer le $\delta^{13}\text{C}$ de chaque acide gras. Cela se fait par chromatographie en phase gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse permettant la détermination des rapports isotopiques (IRMS). L'échantillon est injecté dans la GC, qui sépare et identifie les acides gras. Chaque acide gras est alors envoyé séparément au spectromètre de masse, qui détermine son ratio $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$.

Ces analyses ont été réalisées à l'Institut des Sciences de la Terre d'Orléans (chapitre III, partie 1) et à l'Institut des sciences de la mer de Rimousky (Canada ; chapitre III, partie 2).

Une fois le ratio déterminé, le $\delta^{13}\text{C}$ est calculé comme décrit précédemment. Ce $\delta^{13}\text{C}$ est alors corrigé pour prendre en compte la dérivatisation par le BF_3 -méthanol. En effet, celui-ci ajoute un carbone à l'acide gras, et peut ainsi modifier le rapport $^{13}\text{C} / ^{12}\text{C}$. Le $\delta^{13}\text{C}$ du BF_3 -méthanol utilisé pour l'expérience a donc été déterminé et le $\delta^{13}\text{C}$ de l'échantillon corrigé selon la formule :

$$\delta^{13}\text{C}_{\text{AG}} = \frac{n_{\text{MEAG}} \delta^{13}\text{C}_{\text{MEAG}} - n_{\text{Me}} \delta^{13}\text{C}_{\text{Me}}}{n_{\text{AG}}} \quad (\text{equ. 6})$$

où : n représente le nombre de carbones ;

AG est l'acide gras initial, donc le composé d'intérêt ;

MEAG est l'acide gras après dérivatisation, donc l'acide gras dont le $\delta^{13}\text{C}$ est mesuré ;

Me est le méthanol.

MESURE DES ACTIVITÉS EXO-ENZYMATIQUES

Le but de la méthode est d'analyser la capacité des bactéries d'un sédiment à dégrader une classe de molécules *via* la production d'enzymes extracellulaires. En effet, les molécules de grande taille, en particulier les polymères comme les EPS, ne peuvent traverser la membrane des cellules et doivent donc être dégradés en dehors des cellules avant de pouvoir être assimilés. La méthode utilise un substrat naturel de l'exo-enzyme à tester, auxquels a été couplé un fluorochrome. Quand l'enzyme dégrade le substrat, le fluorochrome est libéré. La quantité de fluorochromes libérée en un temps donné permet donc de déduire l'activité de l'enzyme.

Dans le cas de l'expérience à Chausey (cf chapitre II ; seule expérience où les activités exo-enzymatiques ont été mesurées), deux enzymes ont été étudiées : la β -glucosidase, qui dégrade la liaison osidique reliant les monomères dans les glucides ; et l' α -aminopeptidase, qui sépare l'acide aminé N-terminal du reste de la protéine. Pour la β -glucosidase (Fig. I.6a), le substrat utilisé est le D-glucopyranose (une des formes du glucose) qui est couplé à un fluorochrome appelé 4-methylumbelliférol (abrégé MUF). Pour l' α -aminopeptidase (Fig. I.6b), le substrat utilisé est la leucine couplée au 4-méthylcoumaryl-7-amide, abrégé MCA.

Le temps d'incubation a été fixé à 1h30 d'après les données de la littérature (van Duyl et al., 1999). Ces auteurs ont démontré qu'une heure était un temps d'incubation suffisant pour mesurer une activité de dégradation en milieu tempéré. Afin de pouvoir mesurer des activités même très faibles, en hiver par exemple quand les températures sont basses, ce temps a été allongé à 1h30.

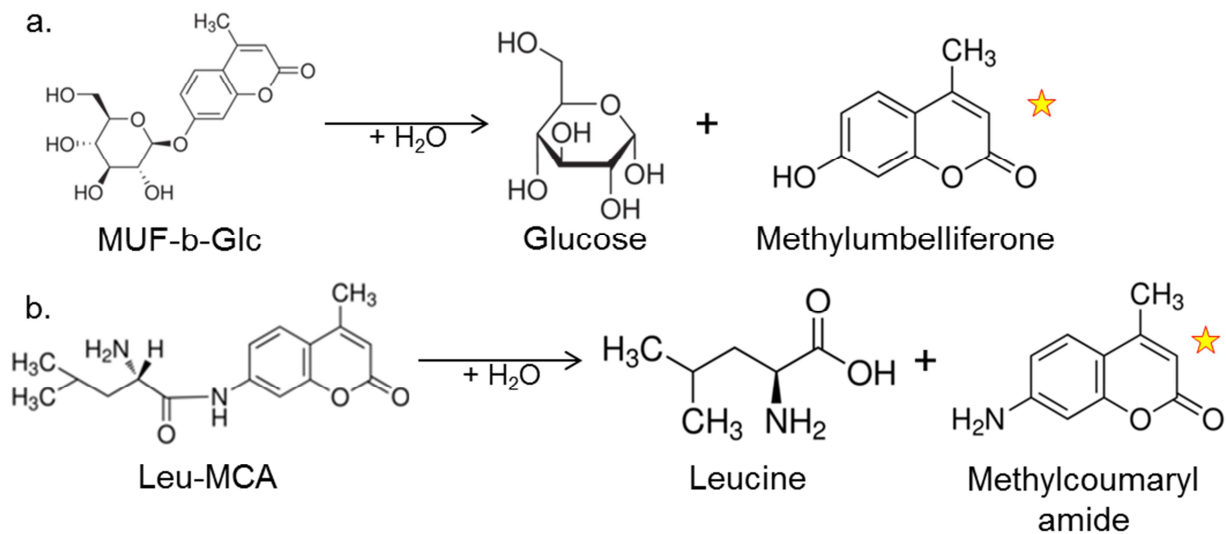
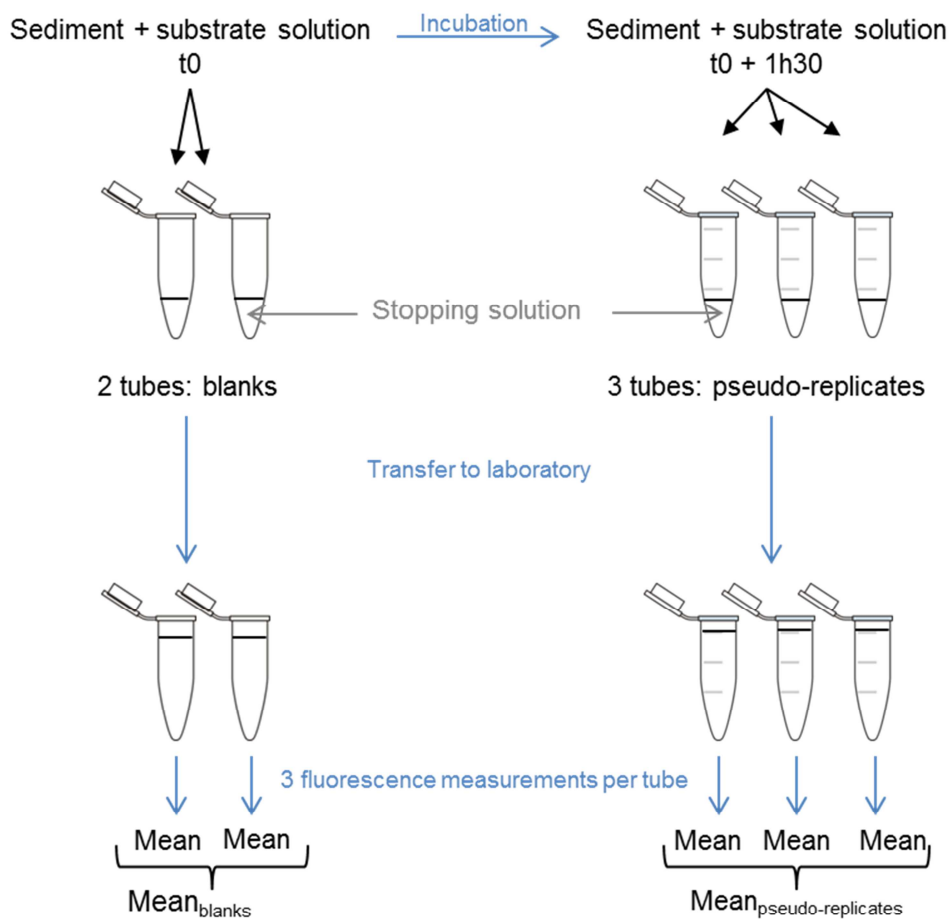


Fig. I.6 : réactions chimiques catalysées par a. la β -glucosidase et b. l' α -aminopeptidase. Les étoiles indiquent les molécules fluorescentes.

Fig. I.6: chemical reactions catalysed by a. β -glucosidase and b. α -aminopeptidase. The stars indicate fluorescent molecules.

Cinq tubes par échantillon ont été réalisés : 3 pseudo-réplicats et 2 blancs (Fig. I.7). Les blancs permettront de prendre en compte la fluorescence propre du substrat couplé au fluorochrome, et donc de ne mesurer que la fluorescence réellement liée à l'activité enzymatique. Pour chaque enzyme, le protocole est le même. 15 ml d'une solution de substrat fluorescent sont mélangés à l'échantillon de sédiment ; 1,4 ml sont immédiatement prélevés et ajoutés à chacun des tubes de blancs qui contiennent 0,56 ml de solution d'arrêt (qui stoppe l'activité enzymatique). Puis le sédiment est laissé 1h30 à incuber dans la solution de substrat, après quoi 1,4 ml sont prélevés et ajoutés à chacun des tubes de pseudo-réplicats contenant 0,56 ml de solution d'arrêt.

Pour la β -glucosidase, la solution de substrat contient du 4-methylumbelliferyl- β -D-glucose (abrégé MUF- β -Glc) à une concentration de $250 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Une solution mère est réalisée en mélangeant 32,5 mg de MUF- β -Glc à 4,8 ml de méthoxyéthanol et 19,2 ml d'eau distillée. À cette solution sont alors ajoutés 360 ml d'eau distillée, ce qui permet d'obtenir la concentration désirée. La solution d'arrêt contient de la glycine à une concentration de $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ et du chlorure d'ammonium NH_4Cl à $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.



Fluorescence value used for analysis = $Mean_{pseudo-replicates} - Mean_{blanks}$

Fig. I.7 : protocole de mesure des activités exo-enzymatiques.

Fig. I.7: protocol for exo-enzymatic activities measurements.

Pour l' α -aminopeptidase, la solution de substrat contient de la L-Leucine-7-amido-4-methylcoumarine (abrégée Leu-MCA) à $800 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Une solution mère est réalisée en mélangeant 100 mg de Leu-MCA à 2,5 ml de méthoxyéthanol et 9,8 ml d'eau distillée. À cette solution sont alors ajoutés 363 ml d'eau distillée, ce qui permet d'obtenir la concentration désirée. La solution d'arrêt contient du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à 10 % (poids:volume).

Les tubes de pseudo-réplicats et de blancs ont ensuite été congelés à -25°C jusqu'à la mesure de la fluorescence.

Les tubes ont été décongelés à température ambiante et la fluorescence a été mesurée avec un spectrofluorimètre. Les longueurs d'ondes d'excitation pour la β -glucosidase et l' α -aminopeptidase ont été fixées à 364 et 380 nm, respectivement. L'émission a été mesurée à 460 et 440 nm, respectivement (Chrost, 1989, Delmas & Garet, 1995).

Trois mesures ont été réalisées pour chaque tube ; la moyenne de ces mesures a été utilisée pour la suite des analyses. Pour chaque échantillon initial de sédiment, 3 mesures de pseudo-réplicats et 2 mesures de blancs ont ainsi été obtenues (1 mesure moyenne par tube). La moyenne des mesures de blancs a ensuite été ôtée à la moyenne des mesures des pseudo-réplicats, donnant ainsi une mesure moyenne de la fluorescence liée à l'activité des exo-enzymes dans l'échantillon initial.

Cette mesure a ensuite été comparée à une courbe de calibration établie précédemment, avec différentes concentrations de 4-méthylumbelliférol pour la β -glucosidase et de 7-amino-4-méthylcoumarine pour l' α -aminopeptidase. La concentration de fluorochrome dans chaque échantillon à la fin de l'incubation en a été déduite, et l'activité de dégradation de chaque enzyme ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) a été calculée.

Afin que l'enzyme dégrade préférentiellement les substrats couplés aux fluorochromes ceux-ci doivent être mis à disposition de l'enzyme en concentration saturante. Ainsi le sédiment atteint son activité maximale de dégradation dans les conditions environnementales de l'expérience. Ce protocole ne mesure donc pas l'activité naturelle de l'enzyme dans un environnement donné, mais l'activité maximale de dégradation qui pourrait avoir lieu dans cet environnement (activité maximale potentielle). Cette activité maximale va dépendre de la concentration en enzyme, de la température, ainsi que des conditions physico-chimiques dans lesquelles se trouve l'enzyme.

Avant le début de l'expérience, la concentration saturante pour les sédiments du site d'étude a donc été déterminée pour chacune des enzymes. Le

protocole de mesure des activités, tel que décrit ci-dessus, a été réalisé avec des concentrations variables de substrats, sur des échantillons homogènes de sédiment du site d'études. Pour la β -glucosidase, 8 concentrations ont été testées entre 2,7 et 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de MUF- β -Glc. Pour l'aminopeptidase, 11 concentrations ont été testées entre 0,4 et 1250 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ de Leu-MCA. Une courbe non linéaire a ensuite été ajustée aux mesures de fluorescence obtenues, selon l'équation :

$$F = a \left(1 - e^{-\frac{C}{S}}\right) \quad (\text{equ. 7})$$

avec F : la fluorescence mesurée,

C : la concentration en substrat associée.

a , qui représente la fluorescence maximale, et S , la concentration saturante, sont déterminées par ajustement du modèle sur les données obtenues (Fig. I.8). Les concentrations saturantes estimées pour la β -glucosidase et l' α -aminopeptidase sont 226 et 515 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivement. Par sécurité, ce sont des concentrations légèrement supérieures (250 et 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivement) qui ont été utilisées pour l'expérience.

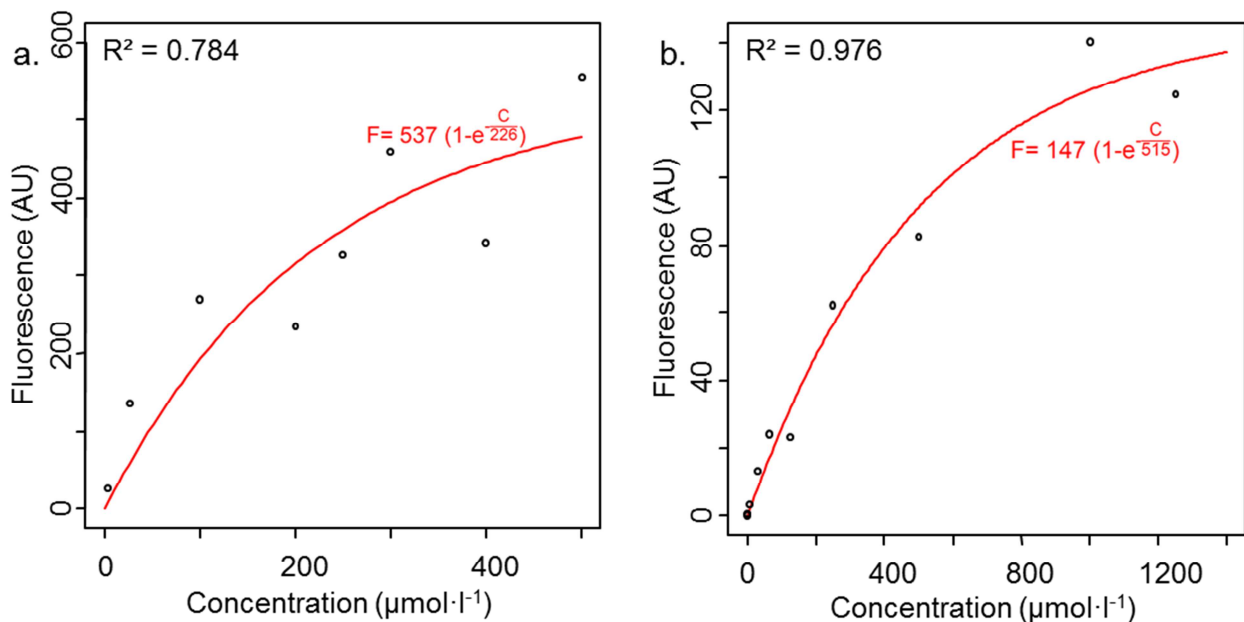


Fig. I.8 : détermination des concentrations saturantes pour a. la β -glucosidase et b. l' α -aminopeptidase.

Fig. I.8: determination of saturating concentrations for a. β -glucosidase and b. α -aminopeptidase.

MESURE DES FLUX DE CARBONE À L'INTERFACE AIR – SÉDIMENT

Ces mesures ont été réalisées sur le terrain, sur l'archipel de Chausey (cf. chapitre II). Elles permettent d'estimer la production ou la consommation de CO₂ par les communautés benthiques, selon le protocole mis au point par Migné et al. (2002).

Les mesures sont réalisées en circuit fermé grâce à un dôme transparent ou opaque qui se fixe de manière étanche sur la chambre benthique utilisée pour l'expérience (Fig. I.9.a). Le volume total d'air du système est d'environ 8 l, pour une surface de 0,071 m². Une pompe met en mouvement l'air sous le dôme ; cet air passe par un dessiccateur et sa pression partielle en CO₂ (en parties par millions, ppm) est mesurée par un analyseur de gaz à infrarouges (LiCor LI 800 ; Fig. I.9.b). Un capteur de lumière est fixé au niveau du sédiment et mesure la quantité de radiations utiles pour la photosynthèse (PAR, Photosynthetically Active Radiations, longueur d'onde entre 400 et 700 nm) reçue par le sédiment. Ce capteur permet de vérifier que l'intensité lumineuse est saturante (supérieure à 250 μmol·m⁻²·s⁻¹, Spilmont et al. 2006).

Une première mesure est effectuée avec un dôme transparent (Fig. I.9.c), en condition de lumière saturante, ce qui permet d'estimer la production primaire nette (PPN) résultant de la production primaire brute et de la respiration. Une seconde mesure est réalisée avec un dôme opaque (Fig. I.9.d), permettant ainsi de mesurer la respiration (R) de la communauté benthique. La production primaire brute (PPB) est déduite de ces deux mesures.

Les informations provenant à la fois de l'analyseur de gaz et du capteur de lumière sont enregistrées toutes les 15 secondes sur une centrale d'acquisition (data-logger LiCor Li-400), ce qui permet de suivre l'évolution des pressions partielles en CO₂ au cours du temps. Après une phase de stabilisation, la pression partielle en CO₂ varie linéairement au cours du temps (Fig. I.10). La pente de la droite est alors estimée par régression, et le flux de CO₂ est déduit de cette pente grâce à la formule suivante :

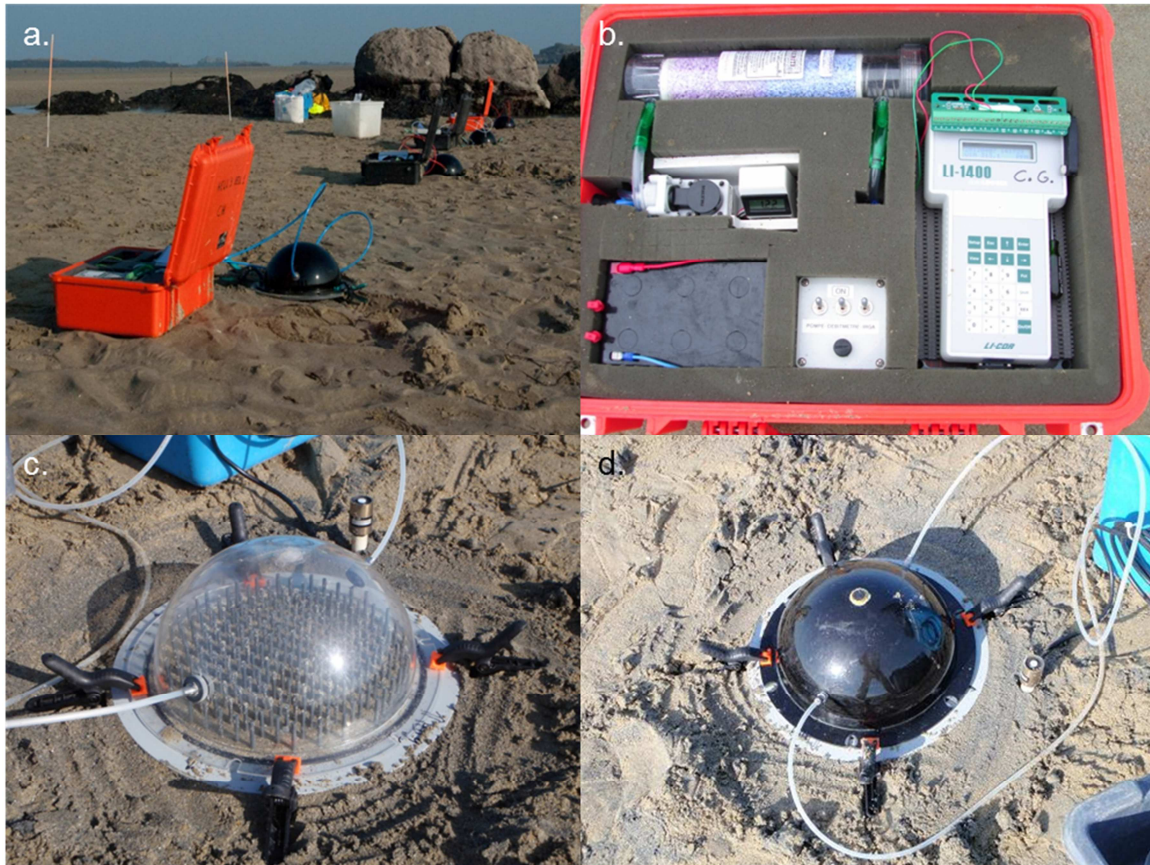


Fig. I.9 : mesure des flux de carbone à l'interface air-sédiment. a. 4 systèmes de mesure fonctionnant simultanément sur le terrain ; b. système d'analyse ; c. mesure avec le dôme transparent ; d. mesure avec le dôme opaque.

Fig. I.9: measurement of carbon fluxes at air-sediment interface. a. 4 measurement systems functioning simultaneously on a tidal flat; b. analysis system; c. measurement with transparent dome; d. measurement with opaque dome.

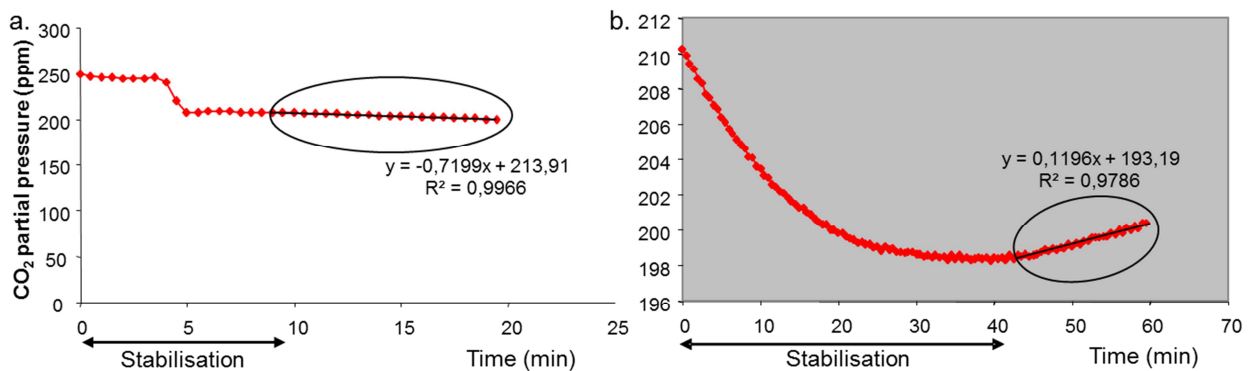


Fig. I.10 : évolution de la pression partielle en CO₂ au cours du temps sous a. un dôme transparent et b. un dôme opaque. La période pendant laquelle cette pression partielle varie linéairement au cours du temps est utilisée pour estimer les flux de carbone.

Fig. I.10: evolution of CO₂ partial pressure over time under a. transparent and b. opaque domes. The period when partial pressure varies linearly through time is used to assess carbon fluxes.

$$M = \frac{a_i M_m v 10^{-3} 60}{V S} \quad (\text{equ. 8})$$

où : M est le flux (production nette ou respiration ($\text{mmol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$));

a_i est la valeur absolue de la pente ;

M_m est la masse molaire du gaz ($M_m = 12 \text{ gC} \cdot \text{mol}^{-1}$ pour le CO_2) ;

v est le volume de la cloche ajustée à la chambre (environ 8 l) ;

V est le volume molaire du CO_2 gazeux ($V = 22,4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1}$ aux conditions normales de pression et température) ;

S est la surface de la chambre benthique ($S = 0,071 \text{ m}^2$).

La production brute est obtenue en ajoutant la production nette et la respiration ($\text{PPB} = \text{PPN} + \text{R}$).

MESURE DE LA STABILITÉ DU SÉDIMENT

La stabilité du sédiment a été estimée via sa capacité à retenir des particules, mesurée grâce au MagPI (Magnetic Particle Induction ; Larson et al., 2009). Cette méthode permet de mesurer des faibles modifications de la surface d'un sédiment. Elle consiste à déposer des particules magnétiques (fer) sur la surface de l'échantillon à étudier, et à mesurer l'intensité du champ magnétique nécessaire pour les détacher du sédiment. Ce champ magnétique est obtenu grâce à un aimant connecté à un générateur de tension variable ; plus la tension appliquée à l'aimant est forte et plus le champ magnétique est important.

Pour les mesures, des particules ferromagnétiques sont déposées sur la surface du sédiment en une seule couche. Le diamètre de ces particules est choisi pour être légèrement supérieur à celui des particules sédimentaires. L'aimant est alors amené à 3 mm du sédiment, et la tension qui lui est appliquée est augmentée par pas de 0,1 V. La tension permettant le détachement complet des particules du substrat est enregistrée (Fig. I.11).



Fig. I.11 : mesure de la stabilité du sédiment avec le MagPI. a. système de mesure ; b. attraction des particules ferromagnétiques par l'électro-aimant.

Fig. I.11: measurement of sediment stability using MagPI device. a. measurement system; b. attraction of ferromagnetic particles by the electromagnet.

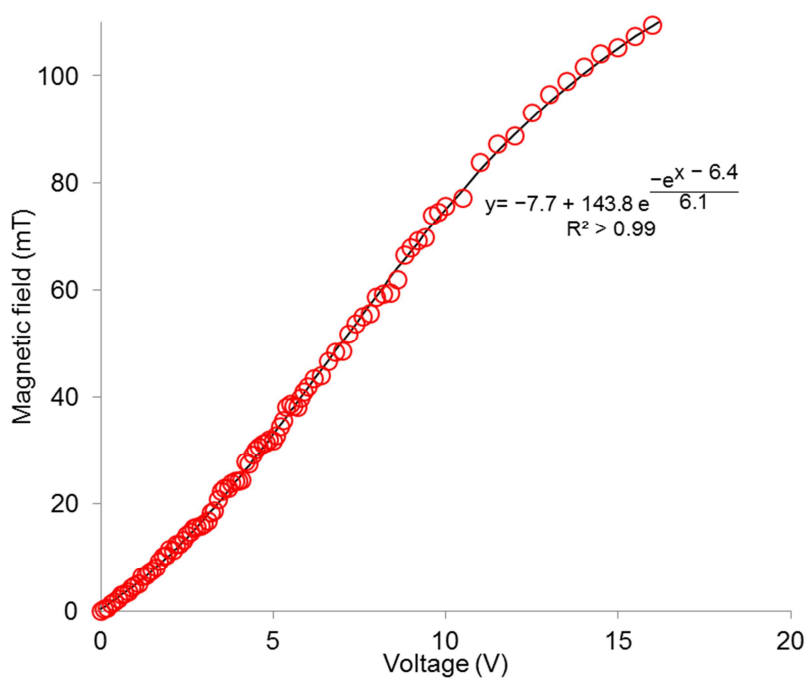
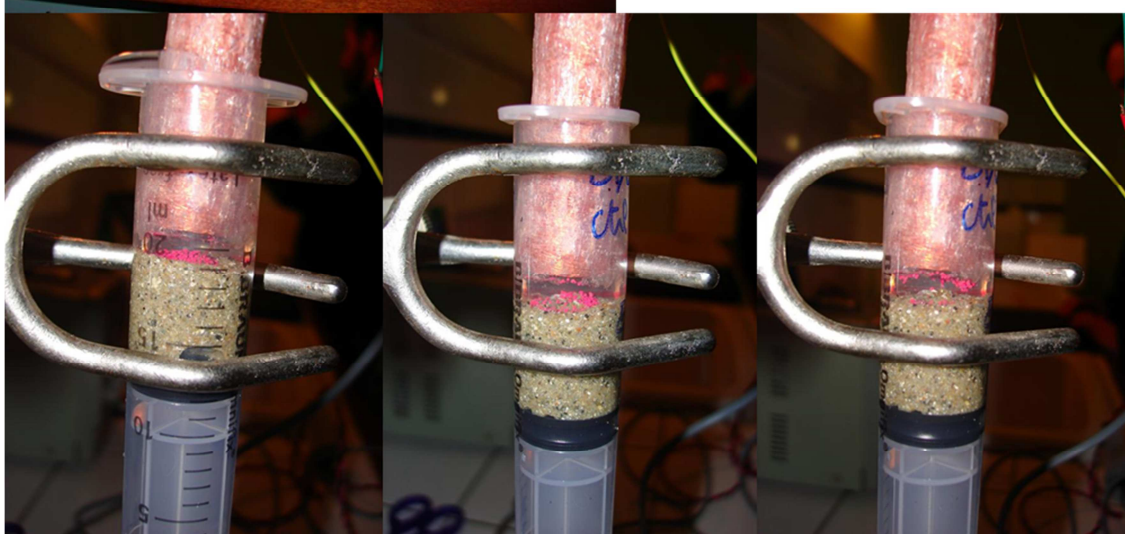


Fig. I.12 : courbe de calibration du MagPI, présentant l'intensité du champ magnétique associée à chaque tension appliquée à l'électro-aimant. Les cercles rouges représentent les mesures ; la ligne noire est la courbe de régression (courbe de Gompertz).

Fig. I.12: MagPI calibration curve, showing the intensity of the magnetic field against the tension applied to the electro-magnet. Red circles are measurements; black line is the regression curve (Gompertz curve).

Afin de pouvoir comparer les mesures de stabilité entre les études, une courbe d'étalonnage associant chaque mesure de tension à une intensité de champ magnétique a été réalisée grâce à un gaussmètre (410-HCAT, LakeShore ; Fig. I.12). C'est cette intensité qui a été utilisée comme mesure de la capacité adhésive du sédiment.

Une expérience méthodologique visant à mieux caractériser les propriétés du MagPI a été réalisée. La question posée était la suivante : la capacité adhésive du sédiment (capacité du sédiment à retenir une particule qui s'y dépose) est-elle représentative de sa résistance à l'érosion (capacité des particules à rester déposées) ?

Pour répondre à cette question, une expérience en laboratoire a été mise en place, avec 10 microcosmes contenant de l'eau de mer et du sédiment stériles. Des diatomées benthiques ont été mises en culture dans la moitié des microcosmes, permettant la mise en place d'un biofilm, tandis que les autres microcosmes recevaient des antibiotiques pour empêcher tout développement microbien. Dans chaque microcosme, 4 « disques » de particules ferromagnétiques ont été déposés. À 1, 4, 7 et 15 j après le début de l'expérience, la stabilité du sédiment dans chaque microcosme a été estimée de deux manières : soit en déposant un disque de particules ferromagnétiques sur le sédiment, et en réalisant immédiatement la mesure ; soit en utilisant un des disques de particules déposés avant le début de l'expérience pour la mesure. La première mesure est une estimation de la capacité du sédiment à retenir une particule qui s'y dépose ; c'est cette méthode qui a été utilisée dans le reste de la thèse. Le deuxième protocole permet d'évaluer la capacité du sédiment à retenir une particule déjà déposée, c'est-à-dire la résistance du sédiment à l'érosion.

Deux mesures ont ainsi été réalisées sur chaque microcosme, à 4 temps différents, avec deux méthodes différentes. Le champ magnétique nécessaire pour détacher les particules déposées au début de l'expérience était toujours plus fort que pour celles déposées juste avant la mesure. La corrélation entre les

deux mesures obtenues sur chaque microcosme à chaque temps a alors été testée. Les résultats montrent une corrélation positive significative entre les deux mesures (Fig. I.13, test de corrélation de rang de Spearman, $p < 0,001$, $\rho = 0,68$).

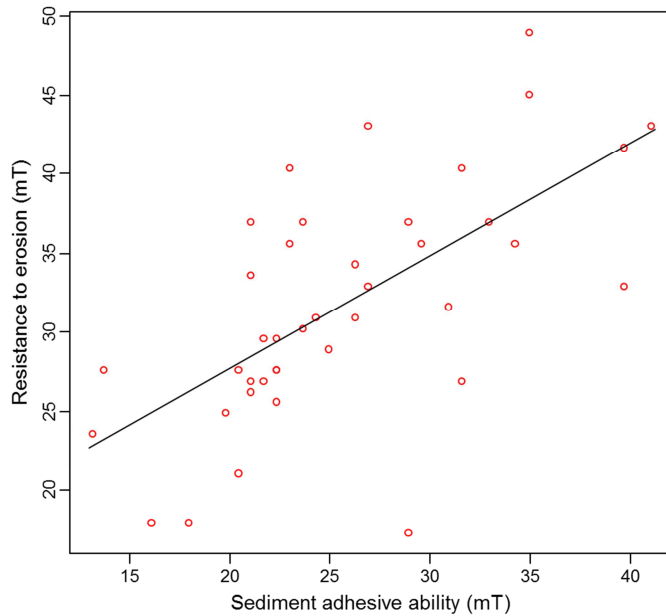


Fig. I.13 : corrélation entre résistance à l'érosion et capacité adhésive du sédiment, tels que mesurés grâce au MagPI.

Fig. I.13: correlation between resistance to erosion and sediment adhesive ability as measured by MagPI.

En conclusion, on peut dire que la capacité adhésive du sédiment, telle que mesurée par le MagPI, est représentative de la résistance à l'érosion de ce sédiment. Ce résultat est cohérent avec les résultats d'autres études sur le MagPI, montrant une corrélation des mesures de ce dernier avec celles d'autres appareils de mesure de la stabilité du sédiment (Cohesive Strength Meter, CSM ; Lubarsky et al., 2010).

STATISTIQUES

Afin de ne pas alourdir la lecture des autres chapitres, les tests les plus couramment utilisés pendant la thèse sont décrits ci-dessous.

Analyses univariées

Les expériences mises en place ne permettant pas l'analyse de nombreux réplicats, seuls des tests non paramétriques ont été utilisés. Contrairement aux tests paramétriques, ces tests ne font pas d'hypothèse sur la distribution des données, et peuvent donc s'appliquer à n'importe quelles données quantitatives. Ces tests classent les valeurs puis travaillent sur leur rang au sein du jeu de données.

Ainsi, afin de tester les différences entre les traitements (à une date donnée, avec plus de deux traitements), des tests de Kruskal-Wallis, notés KW, ont été réalisés. Pour chaque traitement, la somme des rangs affectés aux valeurs est calculée. Le test permet de déterminer grâce à une loi de χ^2 si les sommes de rang sont trop disparates pour que l'hypothèse d'unicité de la population d'origine soit retenue.

Pour comparer, au sein d'un traitement, les données mesurées à différentes dates, ce sont des tests de Friedman qui ont été utilisés. En effet, les valeurs d'une variable à différents temps de prélèvements dans une enceinte expérimentale donnée (chambre benthique ou microcosme) correspondent à des mesures répétées. Les différentes valeurs obtenues au cours du temps pour une chambre benthique sont donc typiquement appariées entre elles. Le test de Friedman permet de prendre en compte cette particularité en affectant des rangs aux différents temps de prélèvements au sein de la même enceinte expérimentale. Le test utilise également une loi de χ^2 .

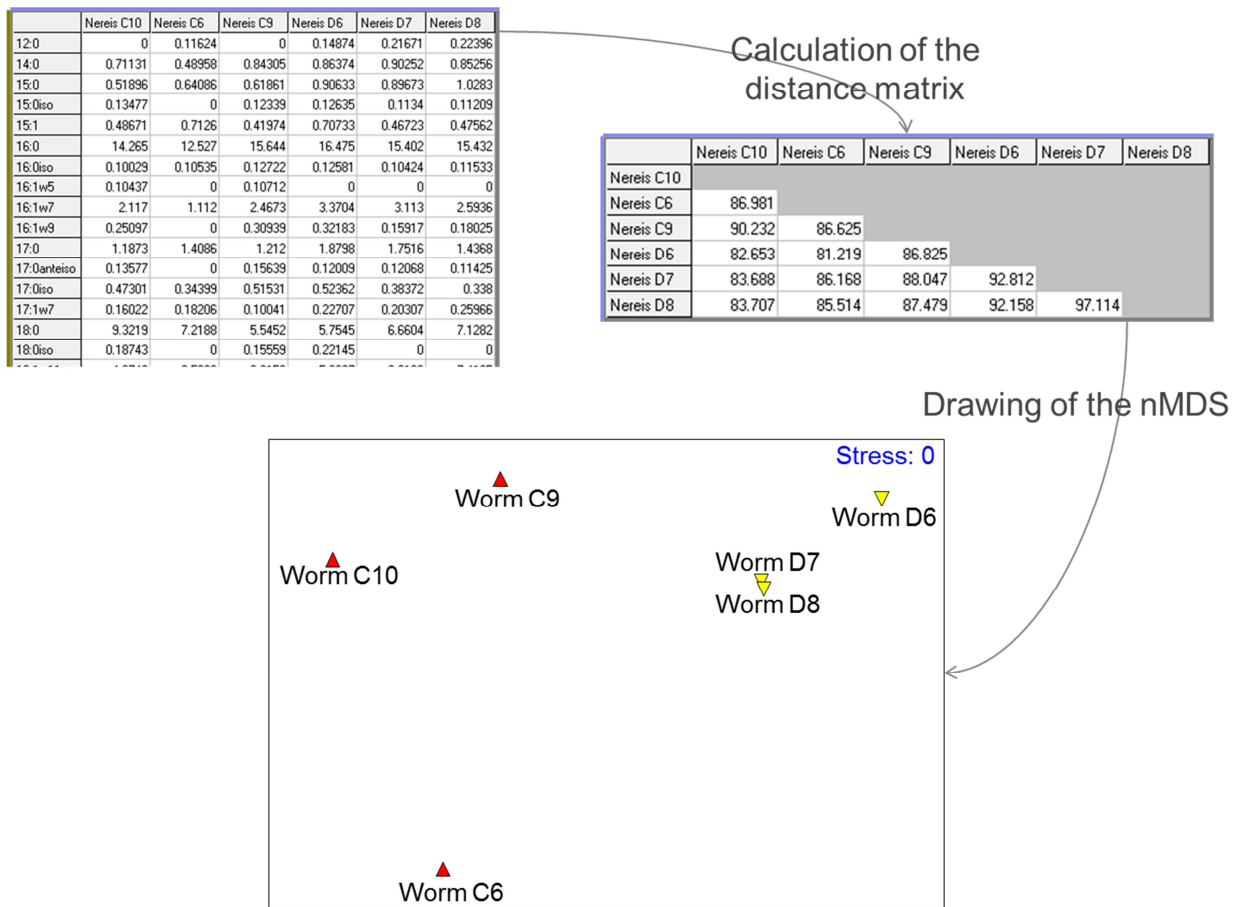


Fig. I.14 : réalisation d'une nMDS à partir d'un tableau d'acides gras pour 6 vers appartenant à 2 traitements expérimentaux.

Fig. I.14: drawing of an nMDS from a fatty acid table for 6 worms belonging to 2 experimental treatments.

Analyses multivariées

La corrélation de rangs entre deux variables a été testée par des tests de Spearman, qui ne font pas d'hypothèses sur la distribution des données : ce sont des tests de corrélation de rang.

Afin de comparer globalement les caractéristiques de deux échantillons (acides gras, pigments, monosaccharides, différentes variables du biofilm), des analyses nMDS (nonmetric MultiDimensional Scaling) ont été utilisées (Fig. I.14). Pour cela, une matrice de distance est construite : elle donne les

distances entre les échantillons deux à deux. L'analyse nMDS essaie alors de donner une représentation graphique de cette matrice de distances : chaque échantillon est représenté par un symbole, et les caractéristiques de deux échantillons sont d'autant plus proches que leurs symboles sont proches. Le « stress » d'une nMDS permet d'évaluer la qualité de cette représentation : il évalue l'adéquation entre la dissimilarité entre deux échantillons et la distance entre leurs symboles. Plus le stress est bas, plus la corrélation est forte et meilleure est la représentation. On considère généralement qu'un stress inférieur à 0,1 est bon, et correct en dessous de 0,2. L'analyse nMDS est un processus itératif qui vise à faire diminuer le stress au maximum ; dans cette thèse, les nMDS ont été réalisées avec 200 itérations.

La nMDS est une représentation graphique qui peut suggérer la présence de groupes au sein d'un ensemble d'échantillons ; ces groupes peuvent correspondre ou non à des traitements expérimentaux ou à des dates de prélèvement. Pour tester la différence entre ces groupes, une analyse de similitude (ANOSIM, ANalysis Of SIMilarity) peut être réalisée. Cette analyse basée sur la permutation (10000 permutations utilisées dans cette thèse) permet d'estimer si les différences entre groupes d'échantillons sont significatives ; elle compare pour cela la moyenne des rangs des dissimilarités entre échantillons de groupe différents avec la moyenne des rangs des dissimilarités intra-groupes. Cette analyse peut ensuite être complétée d'une analyse SIMPER (SIMilarity PERcentage) qui détermine les variables responsables du plus de dissimilarité entre les groupes.

Si le nombre de réplicats par groupe est très faible (inférieur à 4), une PerMANOVA (Permutational Multivariate ANalysis Of VAriance) peut remplacer l'ANOSIM. Cette analyse utilise également les permutations (2000) pour comparer les distances entre groupes d'échantillons avec la distance intra-groupe (Fig. I.15). Elle nécessite de plus que la dispersion des échantillons au sein des différents groupes soit homogène. Cette propriété est vérifiée avant l'analyse par un test par permutations.

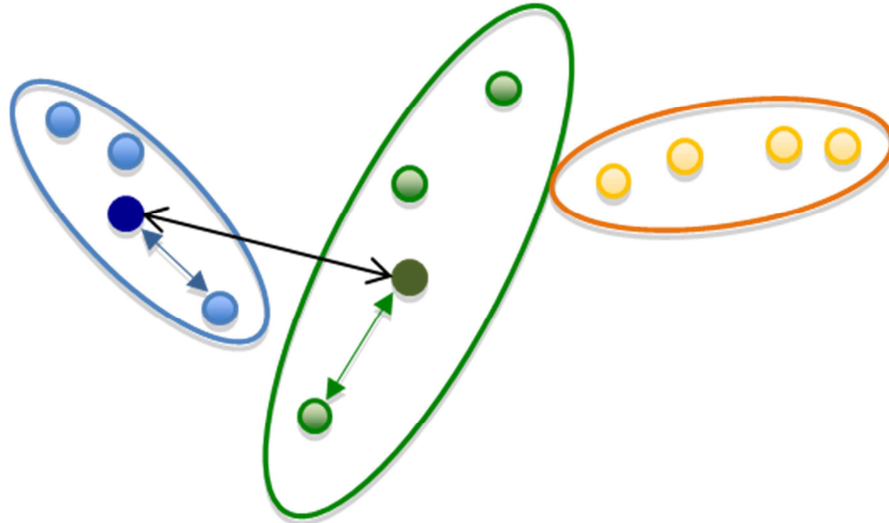


Fig. I.15 : distances intra-groupe (flèches bleue et verte) et inter-groupe (flèche noire). La dispersion multivariée au sein des groupes bleu et orange est similaire ; elle est différente entre ces groupes et le groupe vert.

Fig. I.15: intra- (blue and green arrows) and inter-group (dark arrow) distances. Multivariate dispersions inside blue and orange groups are similar; it is different between these groups and green group.

ANALYSES DANS LES DIFFÉRENTES EXPÉRIENCES

La table I.4 récapitule les différentes analyses réalisées pour chaque expérience, les dates des expériences et les publications associées.

J'ai également participé à la rédaction d'une revue sur les biofilms à bactéries pourpres, pour laquelle j'ai surtout écrit la partie concernant le lien entre biofilms et stabilité du sédiment. Cette revue est présentée en annexe 4.

Table I.4 : tableau récapitulant les différentes expériences menées avant et pendant la thèse. Bact : dénombrement bactérien ; chl. : dosage des chlorophylles ; EPS : dosage des EPS ; MagPI : mesure de la stabilité du sédiment ; flux : mesure des flux de carbone à l'interface air-sédiment ; méio, macro : dénombrement de la méiofaune et de la macrofaune (analyse réalisée en master uniquement) ; AG : composition en acide gras ; pigments : composition des pigments par HPLC ; sucres : analyse de la composition en monosaccharides des EPS ; EEA : activités exo-enzymatiques ; QS : dosage des composés du quorum sensing. Les trois couleurs de gris indiquent, du plus foncé au plus clair, les périodes de : réalisation de l'expérience ; analyse des échantillons ; analyse statistique et rédaction du ou des papiers. En rouge sont indiqués les mois de début et fin de thèse.

Table I.4: recap chart of different experiments carried out before and during the PhD. Measurements or analyses: Bact: bacterial abundances; chl.: chlorophyll concentrations; EPS: EPS concentrations; MagPI: sediment adhesive ability; flux: carbon fluxes at air-sediment interface; méio, macro: méio- and macrofaunal assemblages (analysis carried out in master only); AG: FA composition; pigments: pigment composition; sucres: EPS carbohydrates composition in monosaccharides; EEA: exo-enzymatic activities; QS: QS molecules. The 3 colours of grey indicate, from darker to lighter, periods of: experiment running; samples analyses; statistical analysis and article writing. In red are displayed the month of the beginning and the end of the PhD.

Expériences	Analyses effectuées	2010												2011												2012												2013												Publications
		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	
Chausey - 1 (M2)	Bact., chl., EPS, MagPI, flux, méio, macro.	[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												Passarelli et al. 2012a et 2013 Annexes 1 et 3
Chausey - 2 (ch. II)	AG, DGGE, pigments, EPS, sucres, MagPI, EEA, flux.	[Empty]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												Passarelli et al. Soumis
Conso. EPS - 1 (ch. III, partie 1)	AG, chl., EPS, $\delta^{13}C$.	[Empty]												[Empty]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Empty]												
Conso. EPS - 2 (ch. III, partie 2)	AG, EPS, sucres, $\delta^{13}C$.	[Empty]												[Empty]												[Empty]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												
Quorum sensing (ch. IV, partie 1)	Bact., EPS, QS.	[Empty]												[Empty]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Empty]												
Stabilité (ch. IV, partie 2)	AG, bact., chl., EPS, MagPI	[Empty]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Empty]												Passarelli et al. 2012b et 2013 Annexe 2 et 3
Revue bactéries pourpres	-	[Empty]												[Shaded area: J, F, M, A, M, J, J, A, S, O, N, D]												[Empty]												[Empty]												Hubas et al. 2011 Annexe 4

Chapitre II

Évolution saisonnière
des biofilms : approche
multi-marqueurs

ABSTRACT

Many molecular tools are used to describe microbial biofilms, such as fatty acid (FA), pigment analyses, and DNA fingerprinting. Yet these tools focus on microbial assemblages and therefore overlook an important component of the biofilm: the exopolymeric matrix (extracellular polymeric substances, EPS) that binds all cells together and to their substratum. The purpose of this study was twofold. First, this study was designed to test the efficiency of different tools to characterise either microbes or matrices of biofilms separately, and to evaluate if the chemical characterisation they provide are redundant or complementary. Secondly, we investigated whether data on EPS could be linked with data on biofilms' functioning in terms of bacterial degradation activities, carbon fluxes at air-sediment interface, and sediment stabilisation. In this view, an in situ experiment was carried out, where biofilms were sampled monthly for over a year. Results demonstrate that nearly all studied variables displayed strong seasonal variations. Monosaccharide composition of EPS carbohydrates could not be deduced from information on microbial assemblages, therefore adding information to data obtained from tools described above. Besides, data suggested that biofilm composition was not sufficient to explain totally variations in carbon fluxes and biostabilisation, and that other variables might be of importance. Yet, EPS concentrations and quality seem to alter deeply bacterial degradation activities, which constitute a first step of EPS transfer to higher trophic level. Finally, the association of different tool in a multi-marker approach allowed a fine characterisation of both composition and functioning of biofilms, therefore providing supplementary information that could not be deduced from the use of a single marker.

RÉSUMÉ

De nombreux outils d'analyse chimique (composition en acides gras et en pigments) ou bien d'empreintes moléculaires (DGGE par exemple) sont utilisés pour décrire les biofilms. Cependant ces outils ont pour objet les microorganismes, et non pas la matrice d'exopolymères (EPS) qui les lient entre eux et à leur substrat. Le but de ce chapitre est double : d'une part, caractériser la composition des EPS en lien avec la composition des assemblages microbiens, et analyser si cette caractérisation apporte des informations supplémentaires à celles apportées par les outils précédemment évoqués. D'autre part, mettre en lien ces données sur les EPS avec divers paramètres de fonctionnement du biofilm : activités bactériennes de dégradation, flux de carbone à l'interface air-sédiment, et stabilisation du sédiment. Pour cela, une expérience a été mise en place en milieu naturel, pendant laquelle les biofilms ont été échantillonnés mensuellement pendant plus d'un an. Les résultats démontrent une forte variation saisonnière de presque tous les paramètres étudiés. En outre, il apparaît que la composition des EPS en monosaccharides ne peut être déduite des données concernant l'assemblage microbien, et que cette composition apporte donc une information supplémentaire pour la caractérisation des biofilms. Si les résultats suggèrent des liens entre la composition générale du biofilm et les flux de carbone, ainsi qu'avec la stabilité, ces liens sont complexes, et d'autres facteurs (non étudiés ici) semblent intervenir. Cependant, les données montrent que la quantité et la qualité des EPS influencent fortement les activités bactériennes, qui en dégradant les EPS les intègrent dans le réseau trophique. Enfin, l'association de différents types de données, dans cette approche multi-marqueurs, permet une caractérisation fine à la fois de la composition du biofilm et de son fonctionnement ; cette approche apporte ainsi des informations supplémentaires, qui ne pourraient être obtenues par l'utilisation d'un seul marqueur.

INTRODUCTION

Les EPS sont un ensemble de molécules très diverses, contenant essentiellement des glucides et des protéines, mais également des glycoprotéines, de l'ADN, des acides humiques (Decho, 1990). Si le dosage des concentrations en glucides et protéines est réalisé depuis de nombreuses années, la possibilité de caractériser précisément la composition de ces molécules est plus récente (Taylor et al., 1999, Pierre et al., 2010). Aussi, peu de données sont disponibles sur la diversité de composition des EPS en milieu naturel et son lien avec leurs différentes fonctions.

En particulier, les EPS sont impliqués dans la biostabilisation des sédiments grâce notamment aux polymères glucidiques qu'ils contiennent (Yallop et al., 2000, Paterson & Hagerthey, 2001, de Brouwer et al., 2005). Diverses études se sont donc attelées à décrire la composition en monomères des glucides présents dans les EPS, voire les liaisons entre eux et les ramifications présentes au sein du polymère. Ces travaux montrent une grande diversité de composition des sucres, selon l'espèce ou l'environnement étudié (Bellinger et al., 2005, Pierre et al., 2010), ainsi que selon les paramètres environnementaux : concentration en nutriments et photopériode par exemple (de Brouwer & Stal, 2002, Underwood et al., 2004).

Pour mieux appréhender cette diversité et son lien avec les processus environnementaux, des biofilms naturels ont été échantillonnés pendant plus d'un an en zone intertidale. Des structures artificielles ont été utilisées pour influencer la mise en place des biofilms (Passarelli et al., 2012b; voir annexe 1), permettant ainsi la prise en compte d'une plus grande diversité de ces derniers. De fait, la composition en monosaccharides des glucides a été caractérisée en lien avec des paramètres tels que la composition en acides gras du sédiment et son contenu pigmentaire, qui décrivent les assemblages microbiens. D'autres paramètres, tels que les concentrations en glucides et protéines, ont été évalués et mis en relation avec des paramètres de fonctionnement de l'écosystème.

Les principaux objectifs de cette étude sont donc :

- (1) De caractériser la composition en sucres des EPS dans le sédiment, ses variations saisonnières ou liées aux conditions environnementales ;
- (2) De déterminer si cette composition peut être expliquée exclusivement par la composition de la communauté de microorganismes ;
- (3) Si non, d'évaluer quelles informations supplémentaires apporte cette composition par rapport aux données sur les assemblages microbiens ;
- (4) De mettre en relation les données sur les EPS (concentration et composition en sucres) avec des paramètres fonctionnels du biofilm (biostabilisation, flux de carbone).

Les trois premiers objectifs seront abordés dans une première partie, présentée sous forme d'article, actuellement soumis à *Marine Ecology Progress Series*. La deuxième partie abordera le dernier objectif sous la forme traditionnelle d'un chapitre de thèse.

Partie 1

COMPOSITION DES EPS EN LIEN AVEC LES ASSEMBLAGES MICROBIENS

RÉSUMÉ

Beaucoup de méthodes d'analyse chimique peuvent être utilisées pour décrire les biofilms : composition en acides gras et en pigments, et empreinte génétique des assemblages. Cependant, ces méthodes ont pour objet la composition des communautés microbiennes, et ne décrivent donc pas les exopolymères (EPS) qui forment pourtant un constituant essentiel des biofilms, car ils lient les cellules entre elles et avec le substrat. Cette étude a été conçue pour tester l'efficacité de différentes méthodes pour caractériser les microorganismes et la matrice du biofilm, et pour évaluer si les informations qu'elles apportent sont complémentaires ou redondantes. Des biofilms naturels, dont le développement était ou non influencé par des tubes imitant les tubes de polychètes, ont été échantillonnés tous les mois pendant plus d'un an en zone intertidale, sur l'archipel de Chausey. Les contenus en acides gras et en pigments, les empreintes génétiques des assemblages bactériens et de diatomées, ainsi que la composition des glucides en monosaccharides ont permis la comparaison des biofilms. Toutes les analyses montrent que les variations saisonnières des biofilms étaient prédominantes par rapport aux variations liées aux tubes artificiels. Les contenus en acides gras des biofilms étaient spécifiques de presque chaque mois d'échantillonnage, alors que les autres méthodes d'analyse ne permettaient que de séparer les saisons d'échantillonnage les unes des autres. L'analyse de la composition en glucides des EPS fournissait deux jeux de variables, car les EPS liés et colloïdaux n'ont pas la même composition en sucres. Les contenus en acides gras, pigments et monosaccharides fournissaient des informations complémentaires, cohérentes avec les profils génétiques de la communauté de diatomées et avec les concentrations en EPS. Cette étude a montré que cette approche multi-marqueur est une méthode efficace pour caractériser les biofilms naturels et pour analyser leur dynamique.

MULTI-MARKER CHARACTERISATION OF MICROBIAL BIOFILMS IN INTERTIDAL FLATS

Claire Passarelli ; Tarik Meziane ; Najet Thiney, Dominique Boeuf ; Bruno
Jesus ; Mickael Ruivo ; Christian Jeanthon ; Cédric Hubas

Article soumis pour publication dans *Marine Ecology Progress Series*

ABSTRACT

Many molecular tools are used to describe microbial biofilms, such as fatty acid (FA), pigment analyses, and DNA fingerprinting. However, these methods focus on microbial assemblages and therefore overlook the exopolymeric matrix (extracellular polymeric substances, EPS), an important component of the biofilm, that binds all cells together and to their substratum. This study was designed to test the efficiency of different tools to characterise both microbes and matrices of biofilms, and to evaluate if the information they provide are redundant or complementary. Natural biofilms whose development was influenced or not by artificial structures mimicking polychaete tubes were sampled monthly for over a year in intertidal flats of the Chausey archipelago. They were compared through the analysis of their FA and pigment content, the genetic profile of their bacterial and diatom communities, and also the monosaccharide composition of their EPS carbohydrates. All analyses demonstrated that seasonal variations of biofilms were predominant over variations prompted by the presence of artificial tubes. FA contents of sediments were specific to nearly each sampling month, while other analytical methods only allowed separating sampling seasons one from each other. The analysis of monosaccharide composition of EPS provided two sets of variables, as colloidal and bound EPS displayed different sugar composition. FA, pigment and monosaccharide contents provided complementary information and were consistent with genetic profiles of diatom community and EPS contents. Our study showed that this multi-marker approach appears to be a very efficient tool for characterising natural biofilms and to monitor their dynamics.

INTRODUCTION

In coastal soft-bottom areas, the majority of primary production is realised by biofilms made of several layers of benthic microorganisms with various metabolisms. These biofilms also provide different ecosystem services, such as nutrient recycling, degradation of pollutants, and sediment stabilisation, and they are essential for the recruitment of numerous benthic organisms. A large diversity of microbial biofilms exists, whose composition depends on environmental conditions such as salinity, tidal height, light exposure, and organic matter input. Additionally, they are sensitive to anthropic actions such as eutrophication or antibiotic release in the environment (Lubarsky et al., 2012, Sawall et al., 2012).

Because their composition varies depending on their milieu, biofilms are useful as proxies of environmental conditions. Their roles in ecosystems are diverse and significant, so that a precise characterisation of their composition and functioning is a valuable piece of information. Various markers have been developed to characterise sources of organic matter in sediment. First, stable isotopes of carbon analyses provide information on the origin of organic matter; indeed, ^{12}C and ^{13}C are used differently by organisms during photosynthesis, so that the ^{13}C composition of photosynthetic organisms is dependent on their photosynthetic systems and carbon sources. Yet, differences between groups of microorganisms are often weak so that the use of stable isotopes to study biofilms is not sensitive enough (Cook et al., 2004). On the other hand, fatty acid (FA) analysis of sediment is a promising tool. FAs are present among all living organisms, but most taxonomic or functional groups are characterised by a given association of FA. For instance, branched FAs are only produced by heterotrophic bacteria (Arts & Wainman, 1999). Description of FA content of sediment provides, together, information on taxonomic or functional groups and on the degradation state of organic matter. Another tool which has been developed in recent decades is the analysis of pigment composition with HPLC devices, in order to typify photosynthetic organisms (Jeffrey et al., 1997b). Some

pigments are present among a large range of photosynthetic organisms, such as chlorophyll *a*; on the contrary, some are specific of taxonomic groups, such as alloxanthin which reveals the presence of cryptophytes. Finally, the development of molecular ecology allows now a rapid assessment of the genetic diversity of microbial communities, for instance by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE, Muyzer et al., 1993), which gives a fingerprint of the genetic composition and diversity for microbial assemblages.

FAs, pigments and genetic diversity are three interesting markers, but they do not characterise an important part of the biofilm. Indeed, a biofilm is composed not only of various microorganisms, but also of the matrix in which the microbes are embedded (Decho, 1990). This matrix is composed of extracellular polymeric substances (EPS), which are produced by the different organisms of the biofilm. These EPS are chemically diverse molecules but are mainly composed of carbohydrates and protein, and contain very few lipids. These three markers therefore completely overlook this component of microbial biofilms. Yet EPS have various roles both for microorganisms, such as protection from pollutants and desiccation, and also for coastal systems, as they are for instance responsible for sediment stabilisation (Decho, 1990). Describing these molecules is therefore an interesting challenge for biofilm characterisation. Quantification of carbohydrates and proteins, as well as ratio between them, has been a first step, but GC-MS and LC-MS (gas and liquid chromatography coupled with mass spectrometry) now allow a further analysis of these molecules. Carbohydrates in particular have been investigated as they are crucial for sediment stabilisation by biofilms (de Brouwer et al., 2005); these molecules have been characterised through their monosaccharide composition, which has been shown to vary according to organisms and environmental conditions (de Brouwer & Stal, 2002, Underwood et al., 2004). Monosaccharide composition might therefore be used as a complementary analysis to describe the exopolymeric component of the biofilm.

However, little is known about the variability of carbohydrate composition in the field, both spatially and temporally. The aim of this study is to investigate how tools describing microbial assemblages and carbohydrate composition are linked and complementary in describing microbial biofilms in coastal environments. In order to test different environmental conditions and biofilm compositions, biofilms were followed over the year *in situ* in an intertidal area, in three experimental conditions. Artificial tubes mimicking polychaete tubes were used to modify biofilm development, as they were shown to influence both microphytobenthic expansion and EPS production (Passarelli et al., 2012b). Biofilms were then analysed monthly and characterised by their FA and pigment contents, DGGE fingerprinting and the monosaccharide composition of their EPS. Information provided by each of these methods alone and together were analysed.

MATERIAL AND METHODS

Study site

Experiments were carried out from March 2011 to April 2012 in the Chausey archipelago (France) within the Normand-Breton Gulf (English Channel), which is characterized by a megatidal regime (tidal range up to 14 m). The Chausey archipelago includes 1500 ha of soft sediment tidal flats.

Experimental design

Twelve cylindrical benthic chambers of 300 mm inner diameter and 60 mm depth were used. As detailed in a previous work (Passarelli et al., 2012b), solid PVC cylindrical rods were fixed to the bottom of each benthic chamber, simulating tubes of large polychaete “builder” species, such as *Lanice conchilega* or *Melinna cristata*. Three treatments were used (4 replicate chambers per treatment); a control treatment (Ctrl), without tubes; then 2 test treatments with varying densities of evenly spaced tubes: a low density (LD) treatment (637 tubes·m⁻²) and a high density (HD) treatment (2505 tubes·m⁻²). The LD treatment potentially destabilised the sediment (i. e. initiated interactive flow; Friedrichs et al., 2000), whereas the HD treatment most likely had a stabilising effect on it (i. e. initiated skimming flow; Friedrichs et al., 2000). These densities were both within the range of natural densities for polychaete tubes (up to 5000 ind·m⁻²; e.g. Friedrichs et al. 2000 for *Melinna cristata*).

Before positioning the chambers in the field, they were filled with defaunated sand (washed with 1 mol·l⁻¹ HCl, frozen and thawed) collected at the study site (medium sand, median grain size between 260 and 300 µm). They were then placed into the intertidal area on 21 March 2011, with a 2 m gap between chambers. Sampling was carried out approximately every month (14 times in the experiment, depending on tidal coefficient and accessibility of the study site) from the beginning of the experiment to 8 April 2012.

Sampling locations within the chambers were randomly chosen for each sampling time, taking care that a single location was never sampled twice in a 3-month period.

Visual observation of the plots confirmed that any cavities created by sampling were filled by natural sediment within 24 h, after which no trace of the sampling was apparent.

Composition of the microbial community

Fatty acids composition of the sediment

One sample was taken from each benthic chamber at every sampling date (2 cm inner diameter cut off syringe, 1 cm depth). Sediment cores were frozen and transported back to the laboratory where they were freeze-dried, and stored at -26 °C. 400 to 500 mg of sediment were weighted and used for the analysis. Fatty acid (FA) analysis was performed following the modified method of Bligh & Dyer (1959) as described in Mortillaro et al. (2011). Before extraction, an internal standard (FA 23:0) was added to every sample for quantification purpose. Lipids were extracted with a 20 min ultrasonication in a mixture of distilled water, chloroform and methanol in ratio 1:1:2 (v:v:v). Lipids were concentrated under N₂ flux, and saponified, in order to separate FAs, with a mixture of NaOH (2 mol·l⁻¹) and methanol (1:2, v:v) at 90 °C during 90 min. Saponification was stopped with hydrochloric acid. Samples were then incubated with BF₃-methanol (boron-trifluoride methanol) at 90 °C during 10 min to transform FAs into methyl esters, which were isolated and kept frozen in chloroform. Just before analysis, samples were dried under N₂ flux and transferred to hexane. One µl of the mixture was injected in a gas chromatograph (GC, Varian CP-3800 equipped with flame ionization detector), which allowed separation and quantification of FAs. Separation was performed with a Supelco OMEGAWAX 320 column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) with He as carrier gas. The following temperature program

was used: 60 °C for 1 min, then raise to 150 °C at 40 °C·min⁻¹ (held 3 min), then raise to 240 °C at 3 °C·min⁻¹ (held 7 min). Peaks of FAs were identified by comparison of the retention time with analytical standards (Supelco™ 37, PUFA-1 Marine Source, and Bacterial Mix, Supelco Inc., USA) and analysis of the sample in a gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC-MS, Varian 450GC with Varian 220-MS).

FAs are designated as X:YωZ, where X is the number of carbons, Y the number of double bonds and Z the position of the ultimate double bond from the terminal methyl.

Pigment composition of the sediment

Three samples were taken from each benthic chamber at every sampling date (2 cm inner diameter cut off syringe, 1 cm depth), and pooled. Samples were kept frozen at -26 °C until analysis. Pigments were extracted from a sub-sample of approximately 0.2 g of freeze-dried sediment with 2 ml of 95 % cold buffered methanol (2 % ammonium acetate) for 15 min at -20 °C, in the dark. Samples were sonicated for 30 s at the beginning of the extraction period. Extracts were filtered with Whatman membrane filters (0.2 μm) immediately before HPLC analysis. Pigment extracts were analysed using a Shimadzu HPLC comprised of a solvent delivery module (LC-10ADVP) with system controller (SCL-10AVP), a photodiode array (SPD-M10AVP) and a fluorescence detector (RF-10AXL). Chromatographic separation was carried out using a C18 column for reverse phase chromatography (Supelcosil, 25 cm long, 4.6 mm in diameter, and 5 μm particles). The solvents used were 0.5 mol·l⁻¹ ammonium acetate in methanol and water (85:15, v:v), acetonitrile and water (90:10, v:v), and 100 % ethyl acetate. The solvent gradient followed Kraay et al. (1992) with a flow rate of 0.6 ml min and an injection volume of 100 μl. Identification and calibration of the HPLC peaks was confirmed with chlorophyll *a*, chlorophyll *b* and β-carotene standards from Sigma and chlorophyll *c*,

fucoxanthin, diadinoxanthin, diatoxanthin, lutein, zeaxanthin, and pheophytin *a* standards from DHI. Pigments were identified by the absorption spectra and retention times and the concentrations calculated from the signals in the photodiode array (chlorophylls and carotenoids) or fluorescence detector (pheophorbides and pheophytins). As samples were not frozen in situ but transported in the dark before being frozen, diatoxanthin had time to revert to diadinoxanthin. Therefore, concentrations of diatoxanthin and diadinoxanthin were added and analysed together as xanthophyll concentration.

Genetic diversity of microbial communities

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE, Muyzer et al., 1993) of 16S rRNA and *rbcL* genes was used to compare the structure of the bacterial and diatom communities, respectively.

Sampling and DNA extraction

Three samples were taken from each benthic chamber (1 cm inner diameter cut off syringe, 1 cm depth) and pooled; sampling took place every season: in May, late August, November 2011 and March 2012. Samples were immediately frozen and stored at -26 °C until analysis. Samples were then homogenised and 0.4 g of sediment were used for whole-community DNA extraction, which was performed with the PowerSoil® DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, USA), according to manufacturer's instructions.

PCR amplification of 16S rRNA and *rbcL* genes

16S rRNA genes were amplified using the 27F (Weisburg et al., 1991) and 518R (Muyzer et al., 1993) primer pair which amplifies a fragment of approximately 530 bp. For DGGE analyses, a 5'-Cy5-labeled 518R primer and a primer 27F with a 40-bp GC-clamp (CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCC-

CCCGCCCG) added at the 5'-end were used. The reaction mixture (15 µl) contained the following components: 5X buffer (3 µl), 2 mM MgCl₂, 10 pmol of each dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP; Eurogentec, Seraing, Belgium), 10 pmol of each oligonucleotide primer, 1.5U of GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) and 0.4 µl of template DNA. The PCR program included an initial denaturation step at 95 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 45 s and 72 °C for 45 s, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

A fragment of approximately 790 bp of the large sub-unit of RUBISCO (*rbcL*-3p, 3' region of the plastid large subunit of ribulose-1-5 biphosphate carboxylase/oxygenase) was amplified using primers CfD and DPrbcL7-GC, specific to diatoms (Hamsher et al., 2011). The GC clamp described above was added at the 5'-end of the reverse primer. The reaction mixture (30 µl) was the same as before but contained 0.7 µl of template DNA. The PCR program included an initial denaturation step at 95 °C for 2 min, and 35 cycles as follow: denaturation at 94 °C for 20 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 2 min, and a final extension step at 72 °C for 10 min.

PCR products from replicate reactions (4 replicate samples per treatment) were pooled and quantified on 0.8 % agarose gel with ImageQuantTL software (Ge Healthcare) using DNA ladder (Smart Ladder, Eurogentec).

DGGE

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) was performed using a D-code Universal Mutation Detection System (BioRad, Hercules, CA). Samples containing approximately equal amounts of PCR products (400 ng and 800 ng of amplification products for 16S rDNA and *rbcL*-3p genes, respectively) were loaded onto 1 mm-thick, 6 % (wt./vol) polyacrylamide gel with a denaturation gradient from 30 % to 50 % (for 16S rDNA) or 10 to 30 % (for *rbcL*-3p), where 100 % of

denaturation corresponds to 7 M urea and 40 % formamide. Electrophoresis was run at 60°C (16S rDNA) or 57°C (rbcL-3p) for 280 min at 150 V in 1.25X TAE buffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetic acid, 1 mM EDTA). The gel was thereafter washed in fresh 1.25X TAE buffer and read thanks to Cy5 fluorescence with Typhoon Trio Imager (GE Healthcare) for 16S rDNA or incubated for 30min in 1.25X TAE buffer containing ethidium bromide (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) and read with ImageQuant™ LAS 4000 imager (GE Healthcare) for rbcL-3p.

DGGE migration patterns were analysed using GelCompar II® software (6.0, Applied Maths NV, Kortrijk, Belgium) to perform band matching.

EPS quantity and quality

EPS quantification

Three samples were taken from each benthic chamber at every sampling date (2 cm inner diameter cut off syringe, 1 cm depth). Samples were frozen until analysis. After addition of 2 ml of distilled water, samples were continuously rotated for 90 min at room temperature (Horizontal mixer, RM5-30V, Ingenieurbüro CAT), allowing the extraction of colloidal EPS. The supernatant was then analysed by colorimetry for carbohydrates and proteins. Carbohydrates and proteins were analysed according to the Dubois method (Taylor & Paterson, 1998) and modified Lowry method (adapted from Frølund et al., 1996), respectively. See Lubarsky et al. (2010) for more detailed procedures.

EPS monosaccharide composition

Three samples were taken from each benthic chamber at every sampling date (2 cm inner diameter cut off syringe, 1 cm depth), pooled onto one sample per chamber, and frozen until analysis. Monosaccharide composition of carbohydrates was determined using gas chromatography (GC), following a method adapted from Pierre et al. (2010). Briefly, EPS were extracted, and carbohydrates decomposed into

monosaccharides with acidic hydrolysis. Sugars were thereafter silylated and separated with GC.

Colloidal EPS were extracted by rotating the samples in artificial sea water ($30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) 1h at $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Bound EPS were thereafter recovered by adding resin (Dowex Marathon C, sodium form, Sigma) to the remaining sediment and performing a second extraction. Both fractions were distilled against distilled water (12 – 14 kDa) and freeze-dried.

EPS were dissolved in $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl, and heated 4 h at $90 \text{ }^\circ\text{C}$. The solution then mainly contained monosaccharides, and was freeze-dried again.

Silylation was performed with a mixture of BSTFA:TMCS (N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane, 100:1, Sigma) and pyridine (1:1, v:v), 2 h at room temperature. After the silylation, $1 \mu\text{l}$ of the sample was injected in GC (GC, Varian CP-3800 equipped with flame ionization detector) which allowed separation and relative quantification of sugars. Separation was performed with an Agilent Technologies VF-1701ms column ($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$ i.d., $0.25 \mu\text{m}$ film thickness) with He as carrier gas. The following temperature program was used: start at $150 \text{ }^\circ\text{C}$, raise to $200 \text{ }^\circ\text{C}$ at $7 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (held 5 min). Injector temperature was set at $250 \text{ }^\circ\text{C}$. Peaks of monosaccharides were identified by comparison of the retention time with analytical standards (rhamnose, fucose, xylose, mannose, galactose, glucose, scyllo- and myo-inositol, galacturonic and glucuronic acid), which had been prepared (silylation and injection only) as samples.

Statistical analyses

Non parametric statistics under the R statistical framework were used for univariate analyses as data violated assumptions of homogeneity of variance and normality. Differences between treatments were assessed by Kruskal-Wallis tests (KW), while differences between sampling time for each treatment were assessed by Friedman tests (considering data from each chamber as paired data).

nMDS analyses (500 iterations) were performed with similarity matrix constructed with Bray Curtis distances for FA, pigments and sugars. ANOSIMs were then used to assess the difference between assemblages at different sampling time (Primer 5 software, 10000 iterations), and variables responsible for such differences were investigated with SIMPER analysis. For DGGE analyses, nMDS were performed using Jaccard distance. As only 3 profiles per sampling time were available, PerMANOVA was then used to assess the difference between dates (2000 iterations).

Multiple Factor Analyses (MFAs) were performed to compare chambers at different sampling time using FA, pigment and sugar combined datasets (data were scaled to unit variance). Finally, correlations between MFA scores and quantitative variables were tested using Pearson tests after log transformation.

RESULTS

Composition of the microbial community

Fatty acid contents

Global composition of the microbial community and organic matter in sediments was assessed through their fatty acid (FA) content. In every treatment, total FA concentrations in sediment varied significantly through time (Friedman tests, $p < 0.001$); they were highest at the beginning of August, and lowest in April 2012 (Fig. II.1). Their concentrations in the different treatments followed a similar trend, except in September (KW test, $p < 0.05$). Total FA concentrations were highest in HD treatment and lowest in Ctrl treatment.

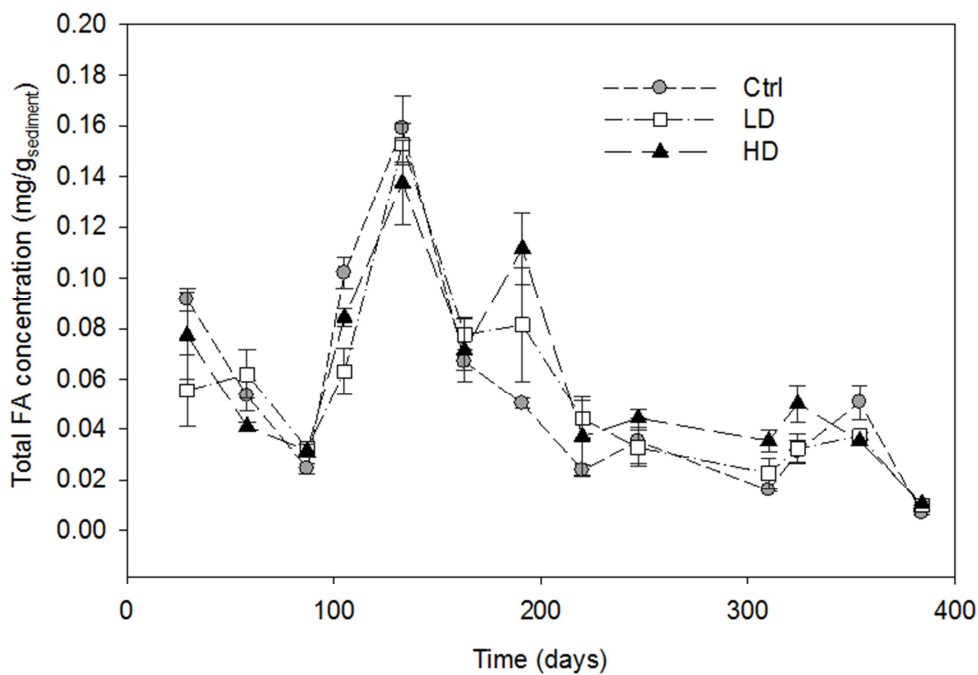


Fig. II.1: evolution of total fatty acid (FA) concentrations in sediment over the course of the experiment. The x axis displays the number of day from the beginning of the experiment (March 21st, 2011). Treatments were: no tubes (Ctrl, grey circles); low tube density (LD, empty squares) and high tube density (HD, black triangles).

Fig. II.1 : évolution des concentrations totales en acides gras (FA) dans les sédiments au cours de l'expérience. L'axe x représente le nombre de jours depuis le début de l'expérience (21 mars 2011). Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl, cercles gris), faible densité de tubes (LD, carrés blancs) et forte densité de tubes (HD, triangles noirs).

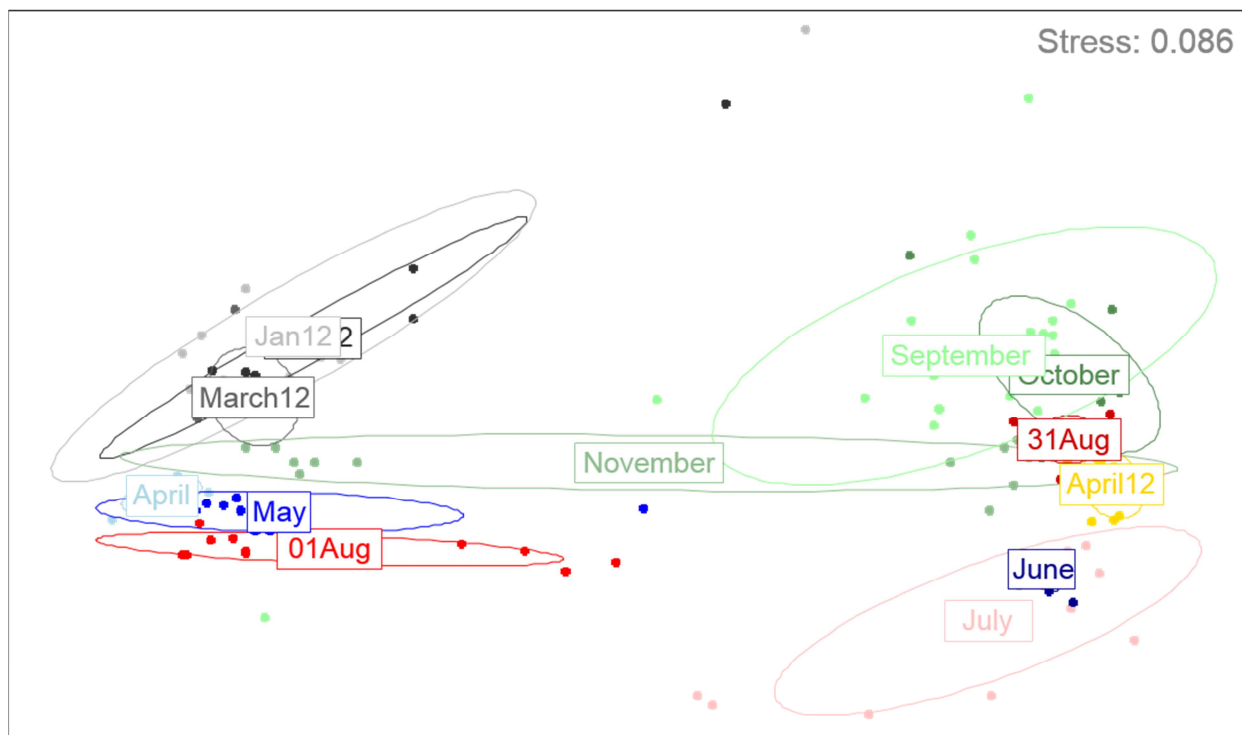


Fig. II.2: nonmetric Multidimensional Scaling (nMDS) plot of Bray Curtis similarities of the fatty acid (FA) composition of sediment over the course of the experiment. For each date, all replicates from each treatment are displayed. Data were transformed with Hellinger transformation prior to analysis. Aug: August. Jan: January. Feb: February.

Fig. II.2 : nMDS (nonmetric Multidimensional Scaling) représentant les distances de Bray Curtis entre les compositions en acides gras du sédiment au cours de l'expérience. Pour chaque date, tous les réplicats de chaque traitement sont représentés. La transformation de Hellinger a été appliquée aux données avant l'analyse. Aug: août. Jan : janvier. Feb : février.

Data showed a dramatic change in FA composition of sediment through time (Fig. II.2; ANOSIM: $R = 0.767$, $p < 0.001$). Sediment samples gathered in two groups of months according to their FA compositions, except November which displayed samples in both groups. Yet, a more detailed analysis (ANOSIM post-hoc pairwise tests) showed that samples from every sampling time were significantly different one from each other, except January, February and March 2012, whose samples were similar (Table II.1). SIMPER analysis showed that FAs 16:1 ω 7 and 20:5 ω 3, as well as saturated FAs (SFAs; mainly 14:0, 16:0 and 18:0) were responsible for the differences between time groups. Namely, proportions of 16:1 ω 7

and 20:5 ω 3 varied significantly through time in every treatment (Friedman tests, $p < 0.001$); they were present in higher proportions in April, May, at the beginning of August, in some samples of November and from January to March 2012, compared to other months. On the contrary, the ratio between saturated and polyunsaturated FAs (SFA/PUFA ratio) was lower in these months.

Table II.1: results of ANOSIM pairwise post-hoc tests comparing FA compositions between sampling times. All replicates from each treatment were used. Bottom panel: p -value associated to each test. Top panel: test significance: NS: not significant; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Aug.: August; Sept.: September; Oct.: October; Nov.: November; Jan.: January; Feb.: February; Mar.: March; Apr.: April.

Table II.1 : résultats des tests de comparaison *a posteriori* de l'ANOSIM réalisée sur les compositions en acides gras aux différents temps d'échantillonnage. Tous les réplicats de chaque traitement ont été utilisés. Partie basse du tableau : p -value associée à chaque test. Partie haute : significativité du test. NS : non significatif ; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. Aug. : août ; Sept. : septembre ; Oct. : octobre ; Nov. : novembre ; Jan. : janvier ; Feb. : février ; Mar. : mars ; Apr. : avril.

	April	May	June	July	01 Aug.	31 Aug.	Sept.	Oct.	Nov.	Jan. 12	Feb. 12	Mar. 12	Apr. 12
April		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
May	<0.001		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
June	<0.001	<0.001		***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
July	<0.001	<0.001	<0.001		***	***	***	***	***	***	***	***	***
01 Aug.	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		***	***	***	***	***	***	***	***
31 Aug.	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		***	***	***	***	***	***	***
Sept.	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		**	***	***	***	***	***
Oct.	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.009		***	***	***	***	***
Nov.	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		***	***	***	***
Jan. 12	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001		NS	NS	***
Feb. 12	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.205		NS	***
Mar. 12	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0.096	0.599		***
Apr. 12	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

FAs displayed similar evolution through time between treatments, with some exceptions. For instance, at the beginning of August, branched FAs, 16:1 ω 7, 20:5 ω 3, 18:1 ω 7, and 16:0 displayed significant differences between treatments (KW tests, $p < 0.05$). FAs 16:1 ω 7, 20:5 ω 3 and 18:1 ω 7 were in higher proportions in Ctrl and LD treatments compared with HD treatment, whereas 16:0 and branched FAs displayed a reversed pattern.

Pigment contents

Composition of the photosynthetic community was assessed through the analysis of pigments in sediments. Total pigment concentrations varied significantly through time in every treatment (Friedman tests, $p < 0.001$); total concentrations were lower at the beginning of the experiment, and the time of the increase seemed to vary between treatments (Fig. II.3). As a consequence, significant differences between treatments were observed in September (KW test, $p < 0.05$), with concentrations being higher in treatments with tubes compared with Ctrl treatment.

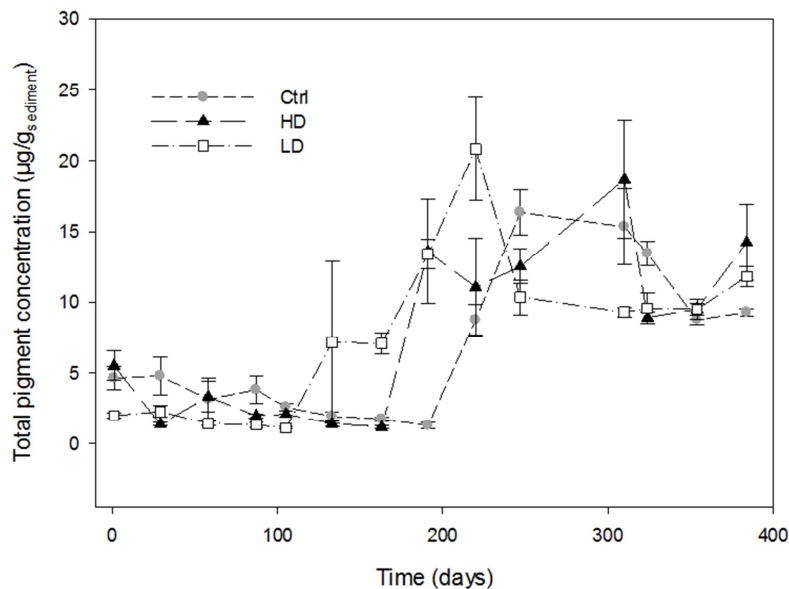


Fig. II.3: evolution of total pigment concentrations in sediment over the course of the experiment. The x axis displays the number of day from the beginning of the experiment (March 21st, 2011). Treatments were: no tubes (Ctrl, grey circles); low tube density (LD, empty squares) and high tube density (HD, black triangles).

Fig. II.3 : évolution des concentrations totales de pigments dans les sédiments au cours de l'expérience. L'axe x représente le nombre de jours depuis le début de l'expérience (21 mars 2011). Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl, cercles gris), faible densité de tubes (LD, carrés blancs) et forte densité de tubes (HD, triangles noirs).

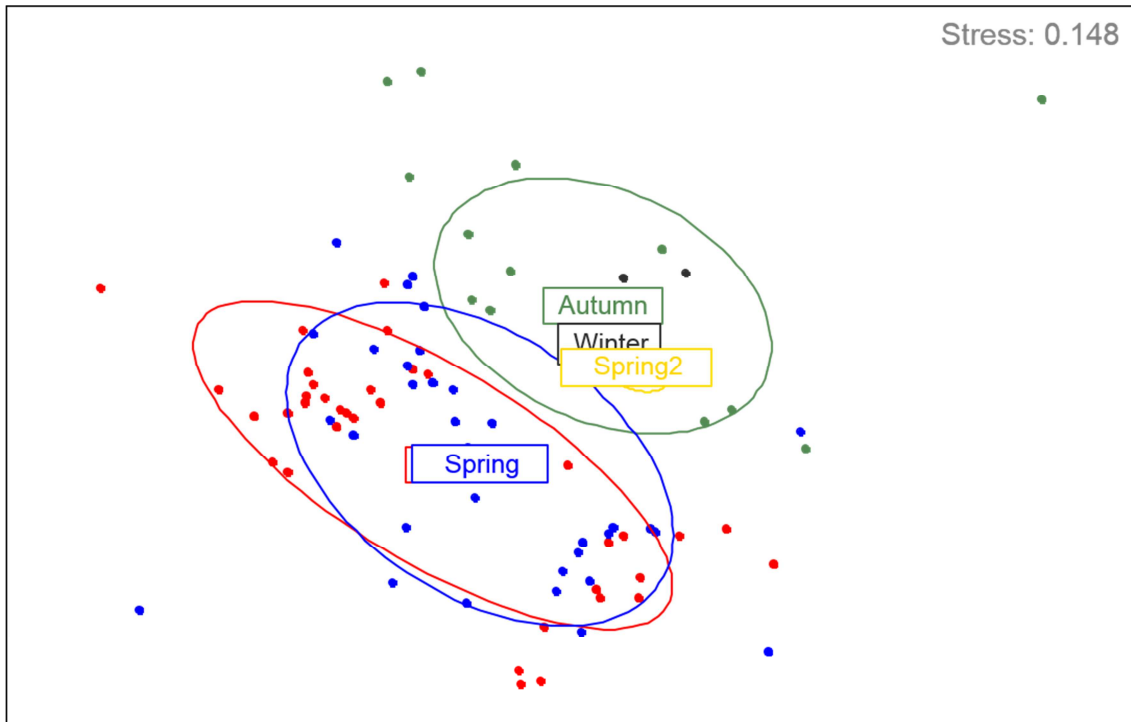


Fig. II.4: nonmetric Multidimensional Scaling (nMDS) plot of Bray Curtis similarities of the pigment composition of sediment over the course of the experiment. For each season, all replicates from each month and treatment are displayed. Data were transformed with Hellinger transformation prior to analysis. The acceptable value of stress indicates that the grouping representations are correct: distances between symbols correlate with dissimilarities between the sediment compositions of pigments. Spring: April, May, June 2011. Summer: July, 1st and 31st August, 2011. Autumn: September, October, November 2011. Winter: January, February, March 2012. Spring2: April 2012.

Fig. II.4 : nMDS (nonmetric Multidimensional Scaling) représentant les distances de Bray Curtis entre les compositions en pigments du sédiment au cours de l'expérience. Pour chaque saison, tous les réplicats de chaque traitement à chaque mois sont représentés. La transformation de Hellinger a été appliquée aux données avant l'analyse. Spring : avril, mai et juin 2011. Summer: juillet, 1^{er} et 31 août 2011. Autumn : septembre, octobre et novembre 2011. Winter : janvier, février et mars 2012. Spring2 : avril 2012.

Pigment composition of sediment also changed through time, with different samples exhibiting seasonal variations; as samples from months belonging to each season grouped together, analysis was performed on seasons for clarity (ANOSIM: $R = 0.236$, $p < 0.001$; Fig. II.4). Samples gathered in two groups, one containing samples from Spring and Summer 2011 (April to the end of August), one with those

from Autumn 2011 to Spring 2012 (September to April 2012). However, ANOSIM post hoc tests showed that except in Spring 2011 (April, May, June) and April 2012 (Spring2, only month in this season), whose samples were similar, samples of different seasons exhibited different pigment compositions (Table II.2). Pigments in higher proportions were chlorophyll *a*, fucoxanthin and alloxanthin. Regardless of the season, chlorophyll *a* accounted for approximately 50 % of pigments in sediment, while proportions of fucoxanthin and alloxanthin exhibited significant differences among time (Friedman tests, $p > 0.05$ for chlorophyll *a* and $p < 0.05$ for fucoxanthin and alloxanthin). Pigments contributing highly to dissimilarities between seasons were chlorophylls *a* and *c*, which were in higher proportions in autumn and winter, and chlorophyllide *a* and xanthophylls, which were in higher proportions in spring and summer.

Table II.2: results of ANOSIM pairwise post-hoc tests comparing pigment percentages in sediment between seasons. All replicates from each treatment and each month were used. Bottom panel: p -value associated to each test. Top panel: test significance: NS: not significant; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$. Spring: April, May, June 2011. Summer: July, 1st and 31st August, 2011. Autumn: September, October, November 2011. Winter: January, February, March 2012. Spring2: April 2012.

Table II.1: résultats des tests de comparaison a posteriori de l'ANOSIM réalisée sur les compositions en pigments aux différents temps d'échantillonnage. Tous les réplicats de chaque traitement ont été utilisés. Partie basse du tableau : p -value associée à chaque test. Partie haute : significativité du test. NS : non significatif ; * : $p < 0.05$; ** : $p < 0.01$; *** : $p < 0.001$. Spring : avril, mai et juin 2011. Summer: juillet, 1^{er} et 31 août 2011. Autumn : septembre, octobre et novembre 2011. Winter : janvier, février et mars 2012. Spring2 : avril 2012.

	Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring2
Spring		*	***	***	NS
Summer	0.049		***	***	*
Autumn	< 0.001	< 0.001		**	*
Winter	< 0.001	< 0.001	0.001		***
Spring2	0.23	0.022	0.043	<0.001	

Pigment compositions of sediment samples were similar between treatments for most of the dates, but they showed significant differences in September (ANOSIM: $R = 0.333$, $p < 0.05$). SIMPER indicated that chlorophyllide *a* and fucoxanthin were the main pigments contributing to this seasonal dissimilarity; chlorophyllide *a* was in higher proportion in HD treatment compared to LD and Ctrl treatments, whereas fucoxanthin showed a reversed pattern.

Structure of the bacterial and diatom communities

The structure of bacterial assemblages as assessed by DDGE was nearly identical through time and between treatments (Fig. II.5).

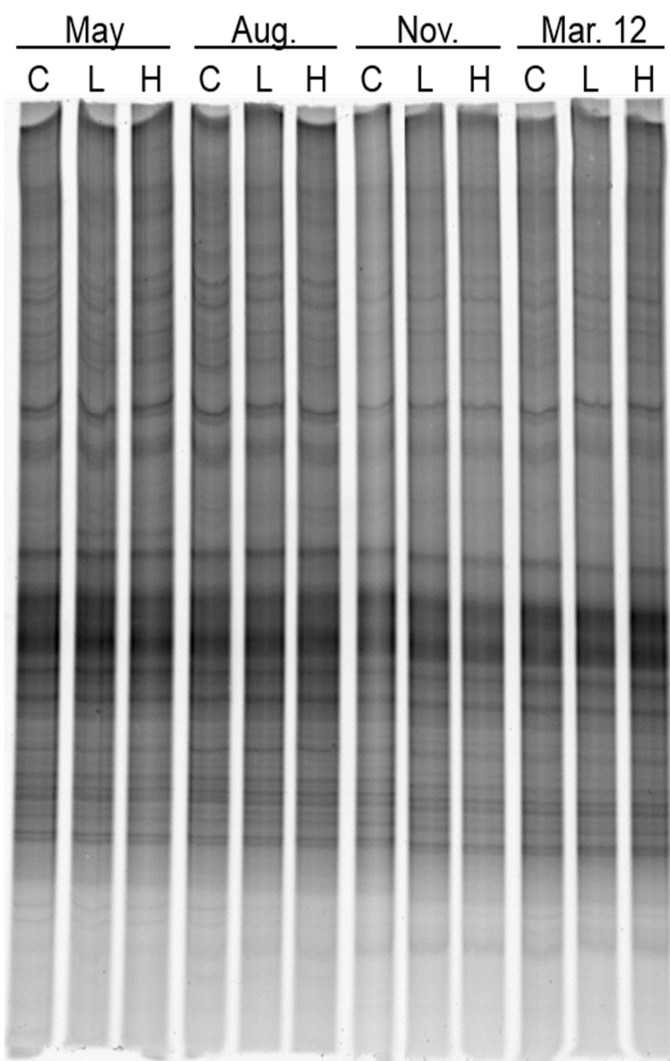


Fig. II.5: DGGE profiles of 16S gene in microbial assemblages over the course of the experiment. Each line represents one treatment on a specific date, DNA being pooled across replicates before migration. C: Ctrl treatment, no tubes. L: LD treatment, low tube density. H: HD treatment, high tube density. Aug.: August. Nov.: November. Mar. 12: March 2012. Note the similarity between lanes of different times and treatments.

Fig. II.5 : profils de DGGE dans les assemblages microbiens au cours de l'expérience, pour le gène codant l'ARNr 16S. Chaque ligne représente un traitement à une date de prélèvement, l'ADN ayant été groupé entre répliquats avant la migration. Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl), faible densité de tubes (LD) et forte densité de tubes (HD). May : mai. Aug. : août. Nov. : novembre. Mar. 12 : mars 2012. Noter la similarité des lignes entre temps et traitements.

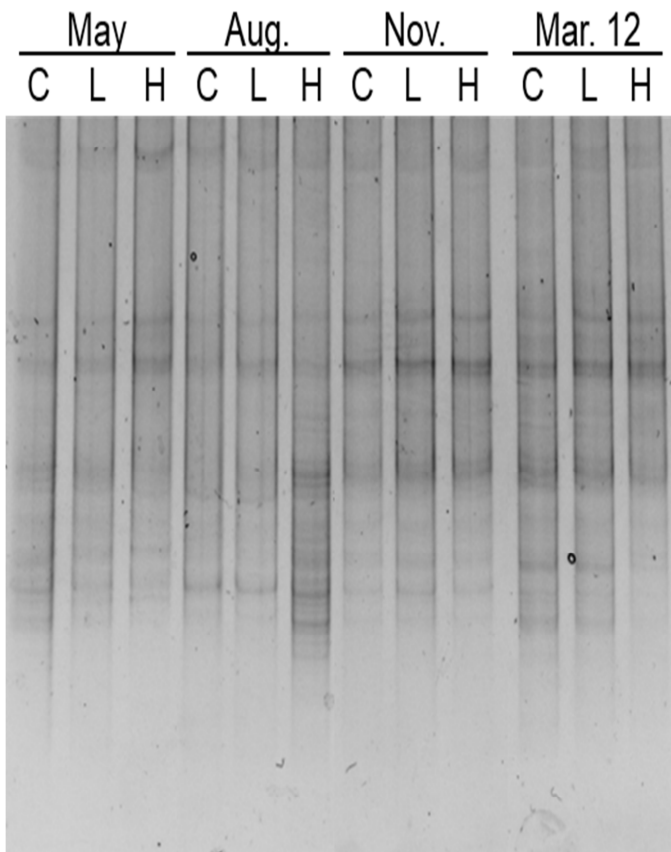


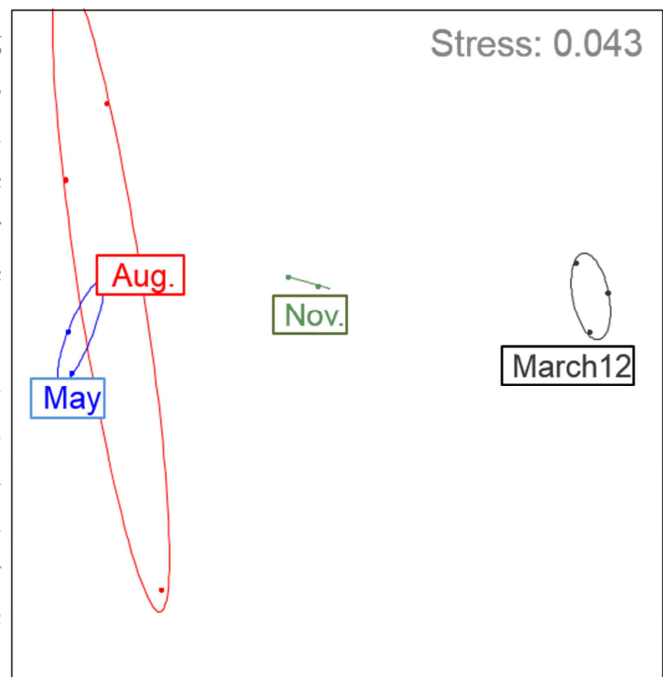
Fig. II.6: DGGE profiles of *rbcL-3P* gene of microbial assemblages over the course of the experiment. Each line represents one treatment on a specific date, DNA being pooled across replicates before migration. C: Ctrl treatment, no tubes. L: LD treatment, low tube density. H: HD treatment, high tube density. Aug.: August. Nov.: November. Mar. 12: March 2012.

Fig. II.6 : profils de DGGE des assemblages microbiens au cours de l'expérience, pour le gène de *rbcL-3P*. Chaque ligne représente un traitement à une date de prélèvement, l'ADN ayant été regroupé entre répliquats avant la migration. C : traitement Ctrl, pas de tubes. L : traitement LD, faible densité de tubes. H : traitement HD, forte densité de tubes. Aug. : août. Nov. : novembre. Mar. 12 : March 12.

The structure of diatom assemblages (Fig. II.6) revealed different band patterns between times and treatments, with the highest number of bands observed in August 2011 in HD treatment. Samples were significantly different between time groups (PerMANOVA, $p < 0.001$; Fig. II.7).

Fig. II.7: nonmetric Multidimensional Scaling (nMDS) plot of Jaccard distances of the DDGE profiles of *rbcL-3P* gene in microbial communities, over the course of the experiment. For each month, one replicate per treatment was used (pooled from 4 replicate chambers).

Fig. II.7 : nMDS (nonmetric Multidimensional Scaling) représentant les distances de Jacard entre les profils de DGGE pour le gène de la *rbcL-3P* dans les communautés microbiennes au cours de l'expérience. Un échantillon par traitement et par mois est représenté (analyse réalisée à partir de 4 répliquats regroupés).



EPS composition in monosaccharides

Glucose was the most abundant sugar, with a mean percentage of 74.6 ± 0.6 %. Mannose and galactose followed, with mean percentages of 7.6 ± 0.2 % and 5.3 ± 0.2 %, respectively. Glucose percentages varied significantly through time in each treatment, for colloidal and bound fractions (Friedman tests, $p < 0.001$), with highest contributions in summer.

EPS fractions

When considering the general composition of EPS in monosaccharides, colloidal and bound fractions appeared to be different (ANOSIM test, $R = 0.083$, $p < 0.001$). SIMPER analysis showed that 4 sugars explained more than 70 % of dissimilarities between treatments: glucose, which was more abundant in colloidal EPS, and mannose, xylose and scyllo-inositol, which were more abundant in bound EPS.

Therefore, the analysis was made separately for colloidal and bound EPS fractions.

Colloidal EPS

Monosaccharide composition of colloidal EPS changed through time, with different samples grouping together according to seasons (Fig. II.8.a; ANOSIM: $R = 0.311$, $p < 0.001$). When excluding April 2012 (Spring2, only month in this season) every season appeared to significantly differ from each other (Table II.3.a). Sugars explaining the more dissimilarity between seasons were the most abundant: glucose, mannose and galactose, as well as scyllo-inositol when comparing winter with other seasons. No differences between treatments were apparent.

Bound EPS

Monosaccharide composition of bound EPS changed through time, with different samples grouping together according to seasons (Fig. II.8.b; ANOSIM, $R = 0.336$, $p < 0.001$). When excluding April 2012, every season was significantly different from each other (Table II.3.b). Sugars explaining the more dissimilarity between seasons were also glucose, mannose and galactose, as well as fucose or scyllo-inositol, depending on the seasons of interest.

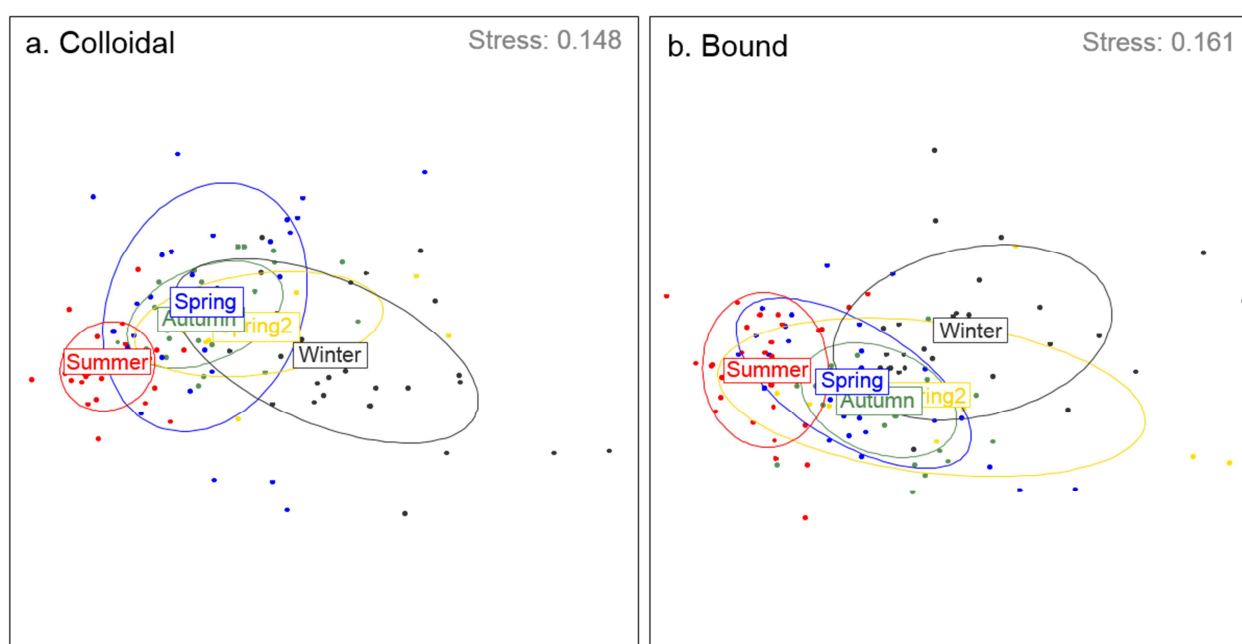


Fig. II.8: nonmetric Multidimensional Scaling (nMDS) plot of Bray Curtis similarities of the monosaccharide composition in a. colloidal and b. bound EPS over the course of the experiment. For each season, all replicates from each month and treatment are displayed. Data were transformed with Hellinger transformation prior to analysis. The acceptable value of stress indicates that the grouping representations are correct: distances between symbols correlate with dissimilarities between the sediment composition of pigments. Spring: April, May, June 2011. Summer: July, 1st and 31st August, 2011. Autumn: September, October, November 2011. Winter: January, February, March 2012. Spring2: April 2012.

Fig. II.8 : nMDS (nonmetric Multidimensional Scaling) représentant les distances de Bray Curtis entre les compositions en monosaccharides dans les EPS a. colloïdaux et b. liés au cours de l'expérience. Pour chaque saison, tous les réplicats de chaque traitement à chaque mois sont représentés. La transformation de Hellinger a été appliquée aux données avant l'analyse. Spring : avril, mai et juin 2011. Summer: juillet, 1^{er} et 31 août 2011. Autumn : septembre, octobre et novembre 2011. Winter : janvier, février et mars 2012. Spring2 : avril 2012.

Table II.3: results of ANOSIM pairwise post-hoc tests comparing monosaccharide composition of a. colloidal and b. bound EPS between seasons. All replicates from each treatment and each month were used. Bottom panel: *p*-value associated to each test. Top panel: test significance: NS: not significant; *: *p* < 0.05; **: *p* < 0.01; ***: *p* < 0.001. Spring: April, May, June 2011. Summer: July, 1st and 31st August, 2011. Autumn: September, October, November 2011. Winter: January, February, March 2012. Spring2: April 2012.

Table II.3: résultats des tests de comparaison *a posteriori* de l'ANOSIM réalisée sur les compositions en monosaccharides des EPS a. liés et b. colloïdaux aux différentes saisons. Tous les réplicats de chaque traitement ont été utilisés. Parties basses des tableaux : *p*-value associée à chaque test. Parties hautes : significativité du test. NS : non significatif ; * : *p* < 0.05 ; ** : *p* < 0.01 ; *** : *p* < 0.001. Spring : avril, mai et juin 2011. Summer: juillet, 1^{er} et 31 août 2011. Autumn : septembre, octobre et novembre 2011. Winter : janvier, février et mars 2012. Spring2 : avril 2012.

	a. Colloidal carbohydrates					b. Bound carbohydrates				
	Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring2	Spring	Summer	Autumn	Winter	Spring2
Spring		***	**	***	NS		***	**	***	NS
Summer	< 0.001		***	***	***	< 0.001		***	***	***
Autumn	0.004	< 0.001		**	NS	0.001	< 0.001		***	*
Winter	< 0.001	< 0.001	< 0.002		NS	< 0.001	< 0.001	< 0.001		**
Spring2	0.689	< 0.001	0.168	0.419		0.093	< 0.001	0.034	0.007	

Multi-marker approach

Results of MFA analysis combining datasets of fatty acids, pigments, colloidal and bound EPS are displayed in Fig. II.9. Glucose and galactose percentages in both EPS fractions contribute most to the first axis, while pigments β -caroten, xanthophylls, pheophytin, percentage of myo-inositol in bound EPS, and FA 16:1 ω 7 contribute most to the second axis. Results showed correlations between different types of variables (Fig. II.9.a); for instance, pigment pheophytin *a* was associated with most of branched fatty acids. Except for rhamnose, contributions of one monosaccharide in both EPS fractions seem to be correlated. Also, combination of the four datasets allowed the separation of samples from different months along a clear temporal gradient, with a specific combination of biomarkers for each season (Fig. II.9.b).

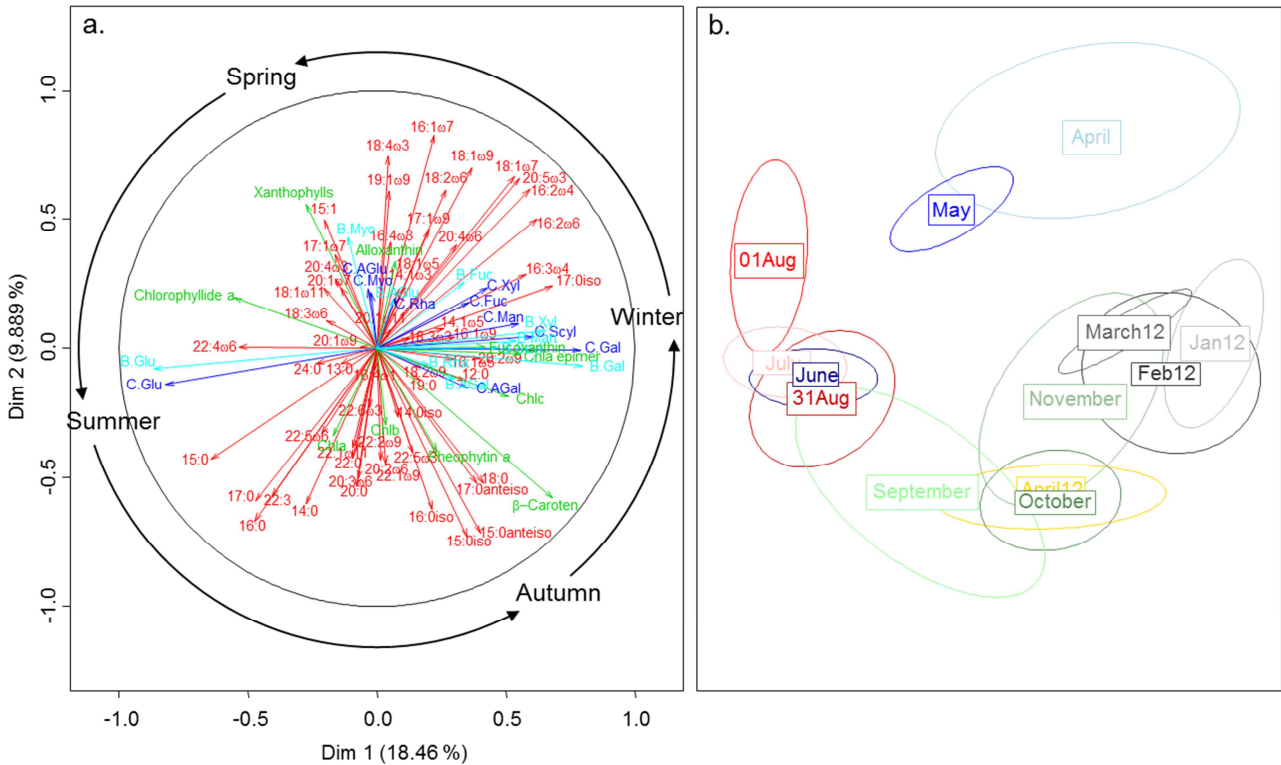


Fig. II.9: results of MFA analysis on sediment samples over the course of the experiment: a. correlation circle between variables used for the analysis; b. inertia ellipses grouping sediment samples from each month. Datasets used for the experiment were fatty acids, pigments, and monosaccharide composition of colloidal and bound EPS. Aug: August. Jan: January. Feb: February. Chla, Chlb, Chlc: chlorophylls *a*, *b* and *c*, respectively. C: Colloidal EPS. B: Bound EPS. AGlu: Glucuronic acid. AGal: galacturonic acid. Fuc: Fucose. Gal: Galactose. Glu: Glucose. Man: Mannose. Myo: Myo-inositol. Rha: Rhamnose. Scyl: Scyllo-inositol. Xyl: Xylose.

Fig. II.9 : résultats de l'analyse à multiples facteurs (MFA) sur les échantillons de sédiment au cours de l'expérience : a. cercle de corrélation entre les variables utilisées pour l'analyse ; b. ellipses d'inertie groupant les échantillons de sédiment de chaque mois. Les jeux de données utilisés pour l'expérience étaient les acides gras, les pigments, et la composition en monosaccharides des EPS colloïdaux et liés. Aug. : août. Jan. : janvier. Feb. : février. Chla, Chlb, Chlc : chlorophylles *a*, *b* et *c*, respectivement. C : EPS colloïdaux. B : EPS liés. AGlu : acide glucuronique. Agal : acide galacturonique. Fuc: Fucose. Gal: Galactose. Glu: Glucose. Man: Mannose. Myo: Myo-inositol. Rha: Rhamnose. Scyl: Scyllo-inositol. Xyl: Xylose.

Scores of samples in the MFA analysis were extracted and correlations with EPS concentrations in sediment were tested. Results showed that EPS concentrations in both carbohydrates and protein were negatively correlated with the first dimension of MFA (Pearson tests after log-transformation, $p < 2 \cdot 10^{-16}$).

DISCUSSION

In order to test the efficiency of different tools to characterise biofilms, two parameters were used to alter their expansion. First, experimental chambers with different densities of artificial tubes mimicking biogenic structures were used, and their biofilm composition was followed at different sampling times all over the course of the year. Artificial tubes were shown to influence the development of biofilms *in situ* as demonstrated by FA content of the upper sediment (Passarelli et al., 2012b; this study). Yet, all analyses showed a predominant effect of sampling time over experimental conditions. Therefore, the discussion will focus on seasonal evolution of the biofilm, regardless of the experimental treatments.

Composition of the microbial community as described by fatty acid and pigment biomarkers

Fatty acids allowed a general characterisation of organic matter in sediment, as they are not, contrary to pigments, restricted to photosynthetic organisms. Their total concentrations in sediments varied between 5 and 160 $\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{sediment}}^{-1}$, which is consistent with literature data on these environments (Meziane et al., 1997). Concentrations exhibited a strong seasonal pattern (Fig. II.1), reaching their maximum in summer and their minimum in winter. Accumulation of organic matter in summer was also characterised by an increase of saturated fatty acid (SFA) percentages, which remained high until the end of autumn; in the meantime, percentages of polyunsaturated FAs (PUFAs) was low. PUFAs are accumulated by numerous organisms but are rapidly degraded when organisms die (Grossi et al., 2006). On the other hand, SFAs, which are ubiquitous, also are the end product of OM degradation in sediments (Sun et al., 1997). Therefore, the increase of SFA percentages, and of its ratio to PUFAs, demonstrates an accumulation of degraded OM in sediments in summer and autumn. On the other hand, spring and winter months, as well as the beginning of August, are characterised by higher MUFA and

PUFAs percentages; in particular, MUFA 16:1 ω 7 and PUFA 20:5 ω 3 (or EPA for eicosapentaenoic acid) percentages showed a drastic increase in these months. These FAs are mainly produced by microphytobenthos in these environments, especially diatoms, dinoflagellates and cyanobacteria (Volkman et al., 1980, Arts & Wainman, 1999); winter, spring, and beginning of August therefore appear to be major periods of microphytobenthic development, while other parts of summer and autumn are more associated with the degradation of OM.

Seasonal modification of FA contents of sediments in an intertidal mudflat had already been demonstrated (Cook et al., 2004). Yet, in this study, even if months gathered together following seasonal trends, most differ significantly from each other regarding their FA composition, except in winter time. FAs therefore highlight even small shifts in the composition of OM and microbial communities. Also, FAs were the only marker allowing the separation of the beginning of August from other summer months, and, even if temporal variations were prevailing over variations between tube treatments, FA composition of OM was characteristic of every tube treatment in most months. FAs are therefore a powerful tool to characterise OM in sediments, and to highlight its temporal and spatial variations.

Pigments were used to characterise the abundance and taxonomic composition of microphytobenthic communities. Their concentrations were consistent with literature data (e. g. Paterson et al., 2000), and increased significantly during autumn and winter (Fig. II.3). This pattern could be explained by a higher predation on microphytobenthos in other seasons, by meiofaunal and macrofaunal organisms (Hubas et al., 2006). This hypothesis is consistent with the observed differences in dynamics between treatments: where tubes are absent, i. e. where refuge from predation is absent (Woodin, 1978), pigment concentrations increase later than in other treatments. In spring and summer months, the predation pressure might be too high for the tubes to provide an efficient refuge, or performed by organisms not affected by their presence.

The composition of the microphytobenthic community was revealed by the pigment composition of the sediments. The abundance of fucoxanthin, together with chlorophylls *a* and *c*, is consistent with results of FA analysis in demonstrating the prevalence of diatoms in this environment (Jeffrey et al., 1997b). Also, the presence of alloxanthin shows the occurrence of cryptophytes (Jeffrey et al., 1997b), which adds information compared to results of FA analysis. Pigments analysis therefore allowed a taxonomic characterisation of the photosynthetic community.

As FAs with OM composition, the analysis of the pigment composition of sediment demonstrated that photosynthetic organisms were more influenced by seasonal variations than by tube treatments. Indeed, analyses of pigment composition of sediments showed that assemblages of photosynthetic organisms were specific of each season. Proportions of chlorophylls *c* and fucoxanthin displayed a seasonal pattern, being higher in autumn and winter compared to spring and summer; on the contrary, chlorophyllide *a* showed a reversed pattern. This last pigment reveals the occurrence of senescent diatoms (Jeffrey et al., 1999), which is consistent with a higher predation rate in these months. Also, the occurrence of chlorophyllide *a* might be related to an exogenous supply of pigment. Xanthophylls displayed the same seasonal pattern than chlorophyllide *a*, which can be explained by their role in the xanthophyll cycle, which act as a photoprotection mechanism (Jeffrey et al., 1997b); in spring and summer months, when light intensity increases, xanthophyll production increases, and diadinoxanthin is transformed in diatoxanthin.

Pigment were thus used here as a biomarker and appeared to be a powerful tool. Contrary to FA, they did not provide a monthly characterisation of sediment, as FA did, but they still demonstrated seasonal variations. In this study, they added some additional information, like the presence of cryptophytes and the possible influence of predation in shaping microphytobenthic communities. Moreover, season grouping was not the same between both biomarkers, partly because they

describe two different assemblages. Both markers were therefore complementary in describing the composition of the microbial assemblages in sediment.

Composition of the EPS of the biofilm as described by their monosaccharide content

EPS were divided in two fractions according to their extraction protocol: colloidal EPS were extracted with water only while bound EPS were extracted with a strong cationic resin. This resin traps the cations maintaining the links between bound EPS, therefore allowing their release in the water. Our results demonstrate that these fractions are two chemically different EPS fractions, as their monosaccharide general composition is significantly different. Therefore, the analysis of monosaccharide composition of EPS provides two sets of variables instead of one, allowing a better characterisation of biofilm.

Most abundant sugars were the same, but in different proportions, in both fractions. EPS carbohydrates consisted mostly in glucose, which always represented more than half of the monosaccharides. Colloidal EPS contained more glucose than bound EPS, which is consistent with literature data (Taylor et al., 1999, Hofmann et al., 2009, Pierre et al., 2010). Yet, Pierre et al. (2010) obtained lower percentages of glucose, especially in bound fractions where percentage reached 20 % only. The observed difference could originate from a different producing community, for instance epipelagic assemblages instead of epipsammic ones, as they analysed mud instead of sand in our study. Also, our sampling protocol, which includes a freezing step, might prompt some release of intracellular material, especially of some chrysolaminarin, which is an intracellular storage glucan in diatoms, mainly composed of glucose (Chiovitti et al., 2004, Underwood et al., 2004). Other abundant monosaccharides were mannose and galactose, which is consistent with observation made on *Cylindrotheca closterium* cultures (Underwood et al., 2004). As glucose is a preferred target of degradation by heterotrophic bacteria (Bellinger et al., 2005, Hofmann et al., 2009), the prevalence of glucose in colloidal carbohydrates

could explain why they are more easily degraded than bound ones (Taylor et al., 1999).

Both bound and colloidal carbohydrates displayed seasonal variations in their monosaccharide composition. EPS characterisation was not sufficient to distinguish samples from different months, but for both fractions, samples gathered according to their sampling season (Fig. II.8). Sediments in spring and autumn exhibited similar composition, which was intermediate between summer and winter compositions. Glucose was mainly responsible for such differences; it accumulated in summer and was in lower proportion in other seasons. Higher percentages of glucose in EPS have been correlated with photosynthetic production (de Brouwer & Stal, 2001, Bellinger et al., 2005, Hanlon et al., 2006). Also, in the studied sediments, the increase in glucose proportion in summer may originate from the degradation of intracellular chrysolaminarin, released in the environment by senescent diatoms. Other seasons displayed a higher diversity of sugars, which might be explained by the preferential degradation of glucose by heterotrophic bacteria (Bellinger et al., 2005, Hofmann et al., 2009): particularly, fucose, rhamnose and galactose are known to be more difficult for them to assimilate than glucose (Girollo et al., 2003). Finally, nutrient concentrations in pore water and light exposure of biofilms also vary seasonally, and both factors have been demonstrated to alter EPS carbohydrate composition (de Brouwer & Stal, 2002, Underwood et al., 2004), potentially strengthening the effect of photosynthesis and EPS degradation in shaping carbohydrate composition.

Pierre et al. (2010) revealed the presence of myo-inositol in carbohydrates of marine sediment; this sugar is crucial for the functioning of many eukaryotic cells and is also a growth factor for various organisms. Our sediment samples also contained this sugar, and additionally its stereoisomer: scyllo-inositol. To our knowledge, this monosaccharide has never been found in EPS carbohydrates. In diatoms, it may originate from myo-inositol after transformation by the myo-inositol deshydrogenase enzyme (Gross & Meyer, 2003), which may explain its

presence in the biofilm. Also, this monomer was an important sugar in separating winter from other seasons, which might be explained by variations in the functioning of this enzyme, although its role is still under investigation (Gross & Meyer, 2003). In soils, scyllo-inositol is associated to phosphate in scyllo-inositol hexakisphosphate, which forms an important part of the organic phosphorus content (Turner et al., 2005).

When studying different mudflats, de Brouwer et al. (2003) showed that EPS mainly originated from refractory dissolved organic matter. This process is probably not at stake here, as monosaccharide composition revealed a high proportion of glucose in every sample. Sugar composition can therefore be interpreted in terms of functionality for microorganisms. For instance, uronic acids have acidic groups which provide sites for sediment – organism interactions, so that they facilitate the fixation of cells to sediment (Bellinger et al., 2009). Also, deoxy-sugars such as fucose and rhamnose, and pentoses seem to promote biostabilisation of the sediment by enhancing the hydrophobicity of the biofilm (Zhou et al., 1998, Bellinger et al., 2009). Finally, differences in monosaccharide composition have been shown to promote the development of different bacterial community, which in turn provide recruitment cues for diverse organisms; changes in EPS carbohydrate composition can therefore facilitate or hinder the resilience of ecosystem engineers (Nelson et al., 2013).

Characterisation of the biofilm by the multi-marker approach

Analyses of sugar composition of both bound and colloidal EPS revealed that samples from spring and autumn were similar, and their composition was intermediate between ones in summer and winter time. However, neither FA nor pigment composition displayed such pattern, and their variations did not fully explain changes in EPS carbohydrates composition. EPS composition is dependent on the producing species, but also on environmental conditions (Decho, 1990, de Brouwer & Stal, 2002, Underwood et al., 2004). Our results suggest that in the

studied environment, external factors varying seasonally such as temperature, photoperiod, and nutrient concentrations are likely to influence more EPS composition than the structure of the producing community does. The similar composition of spring and autumn EPS carbohydrates is consistent with this hypothesis.

While FAs allowed the finest characterisation of sediment, as their composition is specific to months, pigments and sugars were only able to separate between seasons. Yet, when combining datasets of the four measured variables (MFA analysis, Fig. II.9), samples from every season clearly gathered together, showing a well-defined temporal evolution. This analysis also provides the association between variables and samples, which allows a detailed study of the evolution of the biofilm in the course of year.

In winter time, the sediment contained high proportions of fucoxanthin and chlorophyll *c*, which indicated the development of diatoms (Jeffrey et al., 1997b); in the meantime, proportions of most sugars except glucose, particularly galactose and mannose in both EPS fractions, and scyllo-inositol in colloidal EPS, increased. Other studies showed photosynthetic production is associated with an increase of glucose proportion in EPS (Hanlon et al., 2006). Therefore, the development of diatoms in our study does not seem to be associated with an important photosynthetic production; low winter temperatures are probably responsible for such a pattern (Colijn & Dejonge, 1984, Hubas et al., 2006). Such discrepancies between production rates and chlorophyll concentration have been demonstrated in other studies (Yallop et al., 2000). In spring, the production of diatoms increased, as demonstrated by increase in 16:1 ω 7 and 20:5 ω 3 biomarkers (Dalsgaard et al., 2003). Also, the increase of alloxanthin proportions together with 18:4 ω 3 FAs mirrored the development of cryptophytes. In late spring, xanthophyll proportions increased, as a protection against light intensity for diatoms (Jeffrey et al., 1997b). Summer was characterised by high amounts of most saturated FAs, which indicates the accumulation of degraded organic matter (Sun et al., 1997, Lü et al., 2010,

Balzano et al., 2011). This is consistent with the senescence of diatoms revealed by chlorophyllide *a* (Jeffrey et al., 1999); these organisms may then release in the environment high amounts of intracellular chrysolaminarin, explaining the increase of glucose proportions in both EPS fraction in summer. This glucose may also originate from higher photosynthetic production in late spring and in the beginning of summer, when light intensity, photoperiod and temperature are increased. Finally, autumn is characterised by high levels of markers of bacterial degradation: pheophytin *a* which is a degraded form of chlorophyll (Lorenzen, 1967) as well as most branched FAs, which characterise heterotrophic bacteria (Arts & Wainman, 1999).

Also, it is worth noticing that results obtained from the whole dataset are consistent with other variables. For instance, EPS concentrations in both carbohydrates and proteins correlated well with the first axis of MFA analysis. Additionally, DGGE profiles of the diatom community revealed different patterns, each pattern being specific to one season. As concern bacteria, DGGE analyses did not reveal any differences in assemblages: band patterns and intensities were similar between time and treatments, showing that bacterial groups and proportion of each group remained similar among the year. Yet, if bacterial assemblages are constant along the year, most bacteria may be dormant (Novitsky, 1987, Cole, 1999), and their activity is likely to vary seasonally, as demonstrated by FA analyses in our experiment.

Association of FA and pigment biomarkers together with monosaccharide composition of EPS therefore complement each other to allow a fine characterisation of the biofilm in the course of year, describing its composition and functioning. Furthermore, as different monosaccharides may be associated with different ecosystem functions (stabilisation, recruitment cues for instance; Zhou et al., 1998, Bellinger et al., 2009, Nelson et al., 2013), this set of variables may indicate diverse roles of biofilms for the ecosystem.

ACKNOWLEDGMENT



The authors thank the Conservatoire du Littoral, the Syndicat Mixte des Espaces Littoraux de la Manche and the Syndicat Mixte Littoral Normand for their involvement in the project. We thank M.-F. Bernard, Y. Turgis, A. Guigny, E. Oulhen, A. Migné and the crew of Gwen Ha Ruz for their valuable help with fieldwork. This work received support from the “ATM Biodiversité des microorganismes”, and their support is gratefully acknowledged.

CONCLUSION

Les différents marqueurs étudiés ont montré leur utilité pour caractériser la dynamique saisonnière des biofilms ; en particulier, l'analyse du contenu en acide gras du sédiment a permis une caractérisation fine de la matière organique, avec des variations décelables d'un mois sur l'autre. L'analyse des monosaccharides a permis de générer deux jeux de variables correspondant aux deux fractions des EPS analysées ; la composition des glucides semblait influencée par les paramètres environnementaux, comme ceux contrôlant la photosynthèse, et ne pouvait être déduite de la composition de l'assemblage microbien. Les informations issues des acides gras, des pigments et des monosaccharides étaient complémentaires, et ont permis une description saisonnière fine de la composition et du fonctionnement du biofilm. De plus, la composition des EPS glucidiques pouvant affecter leurs rôles dans le compartiment benthique, cette caractérisation multi-marqueurs pourrait permettre d'étudier les fonctions des biofilms dans l'écosystème.

Partie 2

PARAMÈTRES DU BIOFILM EN LIEN AVEC DIVERSES FONCTIONS DE L'ÉCOSYSTÈME

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Site d'étude

Le suivi a été réalisé en zone intertidale de l'archipel de Chausey (Fig. II.10, golfe Normand-Breton), qui se situe à 17 km au large de Granville (Manche). Cet archipel de 11 km de long sur 5 km de large est caractérisé par son régime mégatidal (marnage pouvant atteindre 14 m). La zone intertidale couvre ainsi plus de 2000 ha dont 1500 de sédiments meubles.

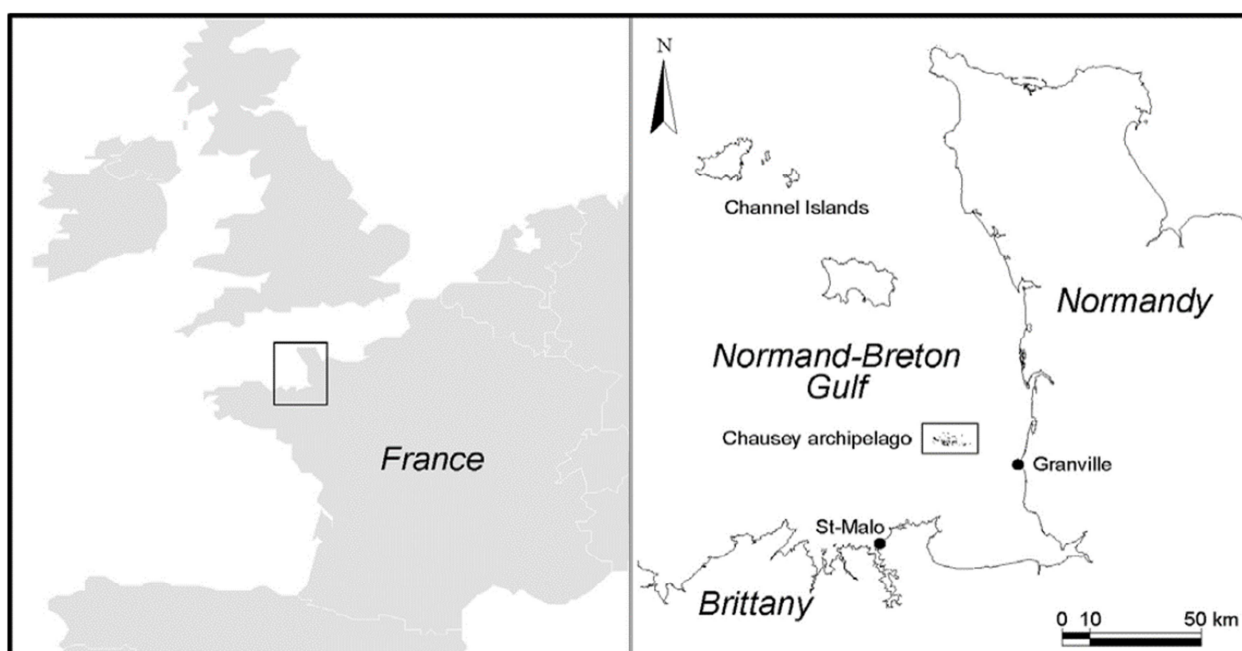


Fig. II.10 : localisation de l'archipel de Chausey. D'après Toupoint et al., 2008.

Fig. II.10: localisation of Chausey archipelago. From Toupoint et al., 2008.

Le site choisi pour cette étude se trouvait sur la plaine du Rétin (Fig. II.11), à l'écart des zones les plus fréquentées de l'archipel. Cette plaine est en partie exploitée par des vénériculteurs qui y cultivent la palourde japonaise. Le sédiment présent au site d'étude est du sable moyen (médiane de 260 μm). Une analyse précédente en ce lieu, réalisée sur deux mois au printemps, avait montré que les structures artificielles mimant les tubes de polychètes influencent le développement des biofilms (Passarelli et al., 2012b). Ce site semblait donc approprié dans le cadre de notre étude.

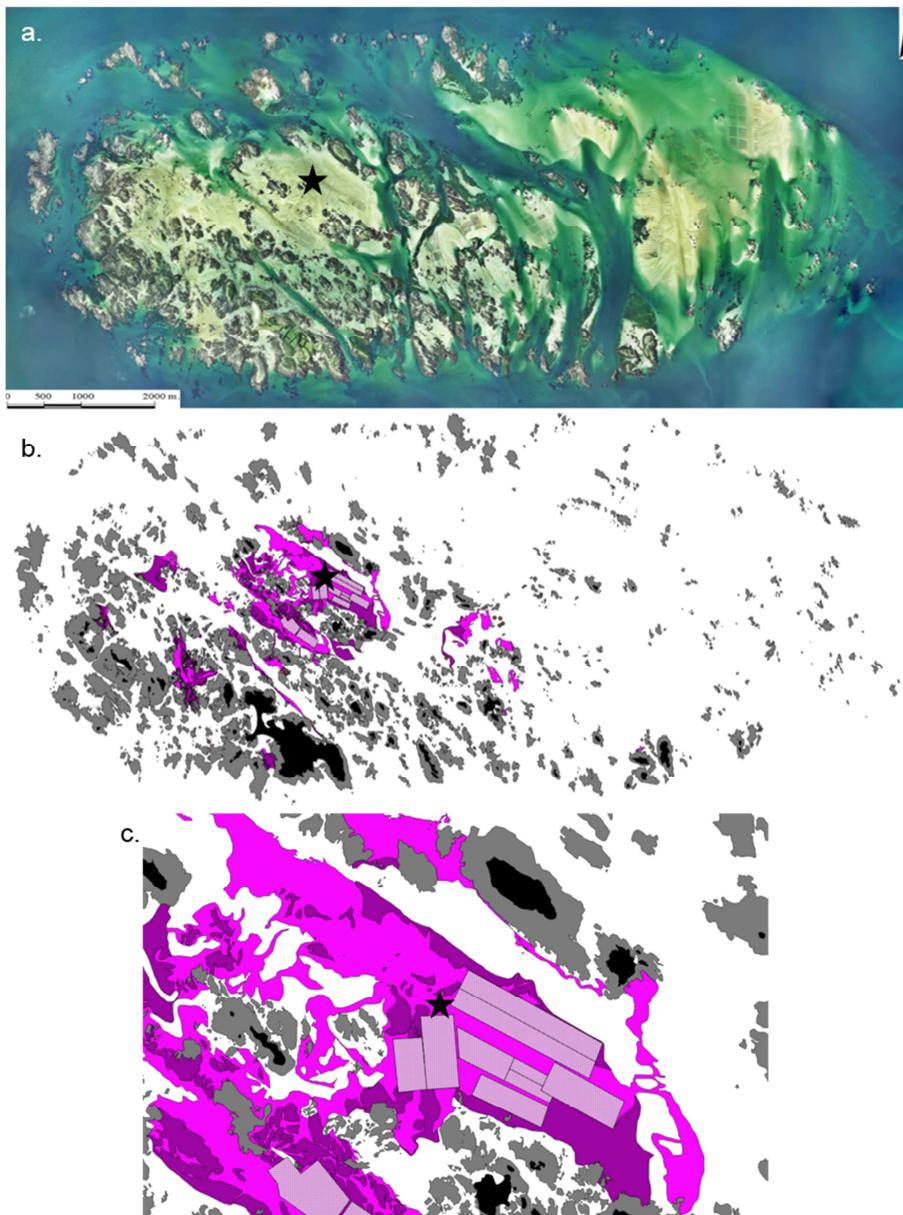


Fig. II.11 : localisation du site d'étude sur l'archipel de Chausey. a. mosaïque photographique de l'archipel de Chausey, prise le 13 août 2002. Mission DIREN/IGN FR 5539/100C. Niveau d'eau : +2,60 m SHOM. Réalisée par J. Fournier. Commanditaire : P. Talec (DIREN Basse – Normandie). Modifiée d'après Godet et al. (2008). b. carte de l'archipel de Chausey montrant en violet les lits de *Lanice conchilega*. Thèse de L. Godet. c. zoom sur la plaine du Rétin, où l'expérience a été menée. Les rectangles représentent les zones de conchyliculture. Les étoiles indiquent la zone d'étude.

Fig. II.11: localisation of the study site on Chausey archipelago. a. photographic mosaic of Chausey archipelago, taken on 13th August, 2002. Mission DIREN/IGN FR 5539/100C. Water level: +2.60 m SHOM. Done by J. Fournier. Sponsor: P. Talec (DIREN Basse – Normandie). Adapted from Godet et al. (2008). b. map of Chausey archipelago, displaying in purple fields of *Lanice conchilega*. Thesis of L. Godet. c. zoom-in on the « Plaine du Rétin » where the experiment took place. Rectangles are zones of shellfish farming. The stars indicate the study site.

Protocole expérimental

Douze chambres benthiques de 30 cm de diamètre et 6 cm de hauteur ont été utilisées (Fig. II.12). Des tubes solides en PVC, faisant 9,5 cm de hauteur pour un diamètre de 5 mm, ont été fixés au fond des chambres pour mimer les tubes de grandes espèces de polychètes, comme *L. conchilega*. 3 traitements ont été utilisés : un traitement contrôle (Ctrl), sans tubes ; un traitement LD (Low tube Density), comprenant 637 tubes·m⁻² ; et enfin un traitement HD (High tube Density) comprenant 2505 tubes·m⁻². Les tubes ont été régulièrement répartis dans les chambres, et les densités ont été choisies selon les données de la littérature afin d'avoir différents effets sur la stabilité du sédiment (Friedrichs et al., 2000). En effet, à faible densité de tubes, chacun d'entre eux perturbe l'écoulement de l'eau à la surface du sédiment, et les perturbations peuvent interagir entre elles, créant ainsi une érosion locale sévère. À plus forte densité, l'essentiel de l'eau passe au-dessus de l'assemblage de structures ; le sédiment est ainsi protégé de l'érosion. Ainsi, les densités de tubes ont été choisies pour provoquer soit une déstabilisation (traitement LD) soit une stabilisation (traitement HD) du sédiment.

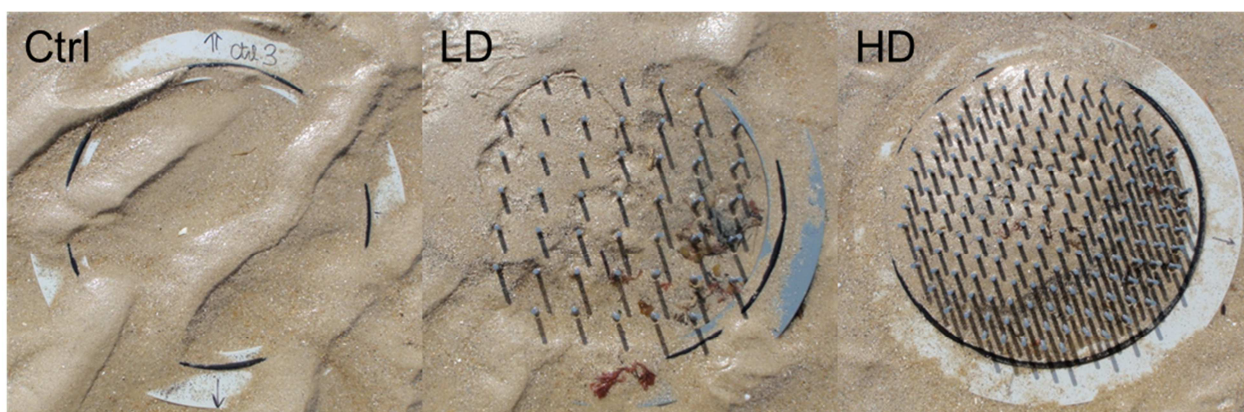


Fig. II.12 : photos des chambres benthiques deux semaines après leur installation sur le site d'étude. De gauche à droite : pas de tubes (Ctrl), faible densité de tubes (LD) et forte densité de tubes (HD).

Fig. II.12: pictures of the benthic chambers deux weeks after their installation on the study site. From left to right: no tubes (Ctrl), low tube density (LD) and high tube density (HD) treatments.

Avant le début de l'expérience, les chambres benthiques ont été remplies avec du sédiment préalablement prélevé au site d'étude et défauné en laboratoire par lavage à l'acide, puis congélation et décongélation. Le sédiment utilisé garde ainsi une granulométrie similaire à celle des sédiments alentours. Les enceintes ont ensuite été installées sur la plaine du Rétin, à 2 m l'une de l'autre, le 22 mars 2011. Du sédiment a ensuite été prélevé dans les enceintes presque tous les mois (14 campagnes de prélèvements entre mars 2011 et avril 2012), afin de réaliser les différentes analyses.

Plusieurs paramètres du biofilm pouvant varier au cours de l'émersion, l'ordre d'échantillonnage des chambres a été tiré aléatoirement pour chaque série de prélèvement. De plus, la place de chaque prélèvement dans l'enceinte a également été tirée aléatoirement pour chaque série de mesure, en prenant garde à ce que le même emplacement au sein d'une enceinte ne soit jamais échantillonné plus de 2 fois pendant 3 mois consécutifs. 24 h après le prélèvement, les zones prélevées avaient été remplies de sédiment provenant des alentours, si bien qu'aucune trace du prélèvement ne subsistait.

Analyses

Les analyses présentée dans l'article (partie 1) ont été réalisées selon les protocoles décrits au chapitre I et ne seront pas détaillées à nouveau ici.

Mesure des activités exo-enzymatiques

Les mesures d'activités exo-enzymatiques ont été réalisées à chaque série de mesures, sauf début août 2011 et en mars 2012, du fait de problèmes avec les réactifs. Pour chaque enzyme, 3 carottes de sédiment par enceinte (2 cm de diamètre, 1 cm de profondeur) ont été prélevées, réunies et conservées au frais. La mesure de l'activité a été réalisée dans les heures suivantes sur le sédiment ainsi obtenu, selon le protocole décrit au chapitre I. Les autres sont détaillées ci-dessous.

Flux de carbone à l'interface air-sédiment

Les flux de carbone à l'interface air-sédiment ont été mesurés à 4 dates pendant le suivi : lors de l'installation (mars 2011), en août et octobre 2011, et lors de la fin de l'expérience en avril 2012. Une cinquième série de mesure était programmée pour juillet, mais n'a pas pu être réalisée à cause des intempéries. Lors des 4 séries de mesures, les flux ont été mesurés sur les 12 chambres benthiques. Étant donné le temps nécessaire pour chacune des mesures (2 h environ) et l'impossibilité de réaliser plus de 4 mesures à la fois, les mesures ont été réalisées sur 2 jours.

Les mesures ont été effectuées selon le protocole décrit au chapitre I.

Stabilité du sédiment

Les mesures ont été réalisées à chaque série de mesures sur 3 échantillons pour chaque enceinte. Les échantillons ont été prélevés sans que la surface du sédiment ne soit dérangée (sans contact entre le piston de la seringue et le sédiment), maintenus à l'horizontal et analysés dans les heures suivant leur prélèvement. Les échantillons ont ensuite été analysés selon le protocole décrit au chapitre I, et la moyenne des trois valeurs a été utilisée comme le résultat représentatif de l'enceinte.

Analyses statistiques

Analyses univariées

Afin de tester les différences entre les traitements à une date donnée, des tests de Kruskal-Wallis ont été réalisés. Pour comparer, au sein d'un traitement, les données mesurées à différentes dates, ce sont des tests de Friedman qui ont été utilisés.

Analyses multivariées

La corrélation de rangs entre deux variables a été testée par des tests de Spearman. Pour chaque test, le coefficient de corrélation et la p-value sont donnés.

Une ACP a été réalisée sur les variables suivantes : concentrations des EPS (protéines et glucides), activités exo-enzymatiques et flux de carbone, aux dates où ceux-ci étaient disponibles (fin août, octobre, avril 2012). L'ACP a été réalisée sur R et les 3 premiers axes de l'analyse ont été conservés.

Enfin, la différence entre les groupes d'échantillons, selon leur date ou leur traitement, a été testée avec une analyse de similitude (ANOSIM, ANalysis Of SIMilarity), générée par le logiciel Primer®. Pour cela, une matrice de distance basée sur la distance euclidienne normalisée a d'abord été calculée. L'ANOSIM a ensuite été réalisée en se basant sur cette matrice, à partir de 10000 permutations.

RÉSULTATS

Les résultats développés dans l'article (acides gras, pigments, DGGE, analyse des monosaccharides) ne seront pas abordés à nouveau, sauf ponctuellement en lien avec les résultats présentés ici.

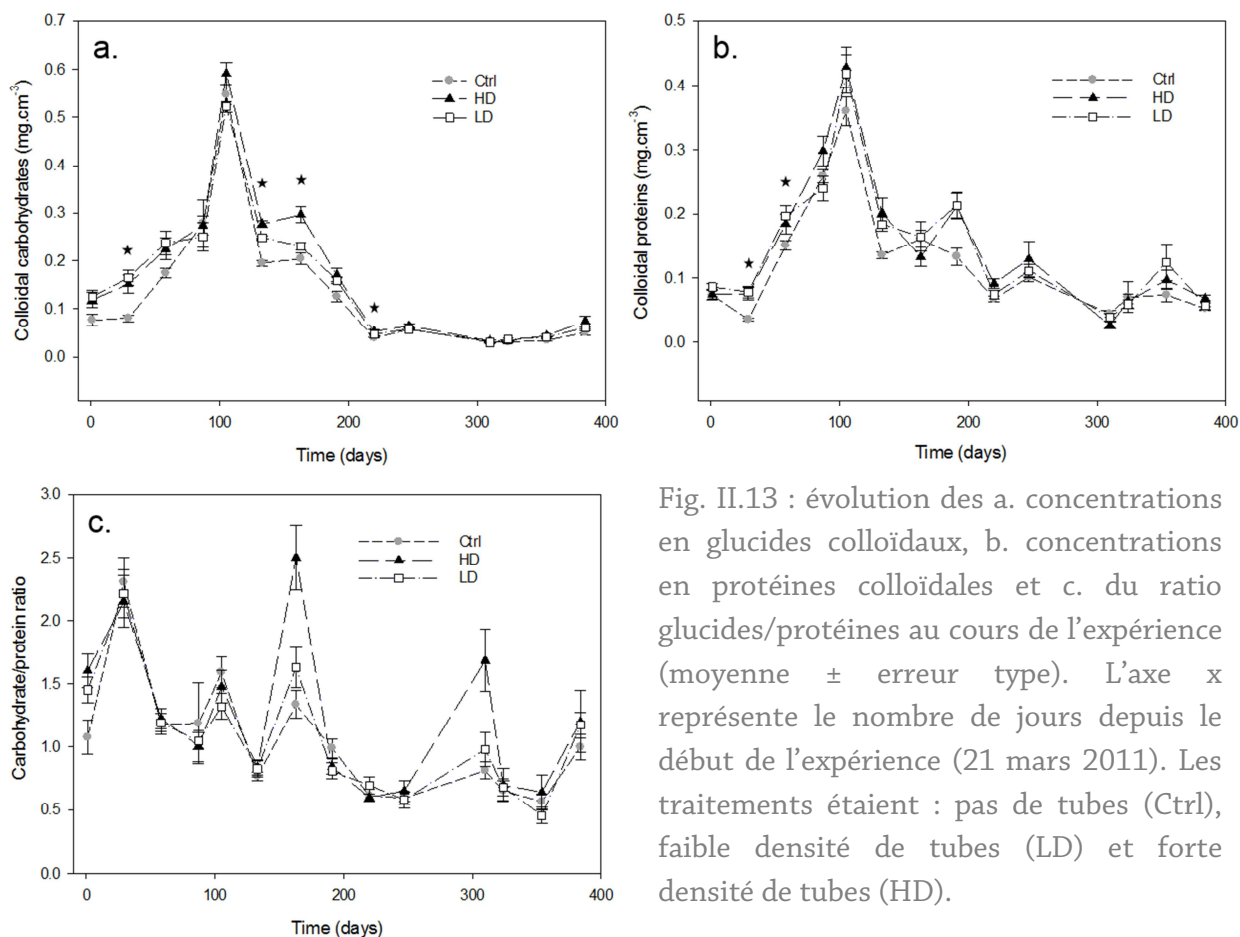


Fig. II.13 : évolution des a. concentrations en glucides colloïdaux, b. concentrations en protéines colloïdales et c. du ratio glucides/protéines au cours de l'expérience (moyenne \pm erreur type). L'axe x représente le nombre de jours depuis le début de l'expérience (21 mars 2011). Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl), faible densité de tubes (LD) et forte densité de tubes (HD).

Fig. II.13: evolution of a. colloidal carbohydrate concentrations, b. colloidal protein concentration and c. carbohydrate / protein ratio over the course of the experiment (mean \pm se). The x axis displays the number of days from the beginning of the experiment (March 21st, 2011). Treatments were: no tubes (Ctrl, grey circles); low tube density (LD, empty squares) and high tube density (HD, black triangles).

Concentration des EPS colloïdaux

Les concentrations en glucides dans les sédiments ont varié significativement au cours du temps (Fig. II.13.a, tests de Friedman, $p < 0,001$). Les concentrations étaient comprises entre $0,030 \pm 0,002$ mg·cm⁻³ (chambres

Ctrl, février 2012) et $0,591 \pm 0,023 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ (chambres HD, juillet 2011). Les concentrations suivaient la même dynamique dans tous les traitements : elles étaient maximales en été, avec un pic fort en début d'été, et minimales en hiver. Cependant les chambres avec tubes (traitements LD et HD) contenaient généralement plus d'EPS que les chambres Ctrl, avec des différences significatives mises en évidence en avril, août et octobre (tests de KW, $p < 0,05$).

Les concentrations en protéines des sédiments ont varié significativement au cours du temps (Fig. II.13.b, tests de Friedman, $p < 0,001$). Les concentrations étaient comprises entre $0,026 \pm 0,005 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ (chambres HD, janvier 2012) et $0,428 \pm 0,031 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ (chambres HD, juillet 2011). Les concentrations dans tous les traitements suivaient la même dynamique saisonnière, avec des valeurs maximales en été, surtout en juillet, et minimales en hiver. Les concentrations étaient similaires entre les traitements, sauf en avril et mai 2011 où les chambres contenant des tubes contenaient plus de protéines que les chambres Ctrl (tests de KW, $p < 0,05$).

Enfin, le rapport des concentrations en glucides et en protéines a également varié au cours du temps dans tous les traitements (Fig. II.13.c, tests de Friedman, $p < 0,001$). Il était compris entre $0,045 \pm 0,06$ (chambres LD, mars 2012) et $2,50 \pm 0,26$ (chambres HD, 31 août). Son évolution ne suivait pas une dynamique saisonnière claire, sa valeur présentant des pics de plus ou moins grande importance en avril, juillet, fin août 2011, ainsi qu'en janvier et avril 2012. Aucune différence significative entre les traitements n'a été montrée. Même si le rapport des concentrations a varié au cours du temps, les deux concentrations ont globalement suivi la même évolution au cours de l'expérience : elles sont positivement corrélées (test de corrélation de Spearman, $p < 0,001$, $\rho = 0,834$).

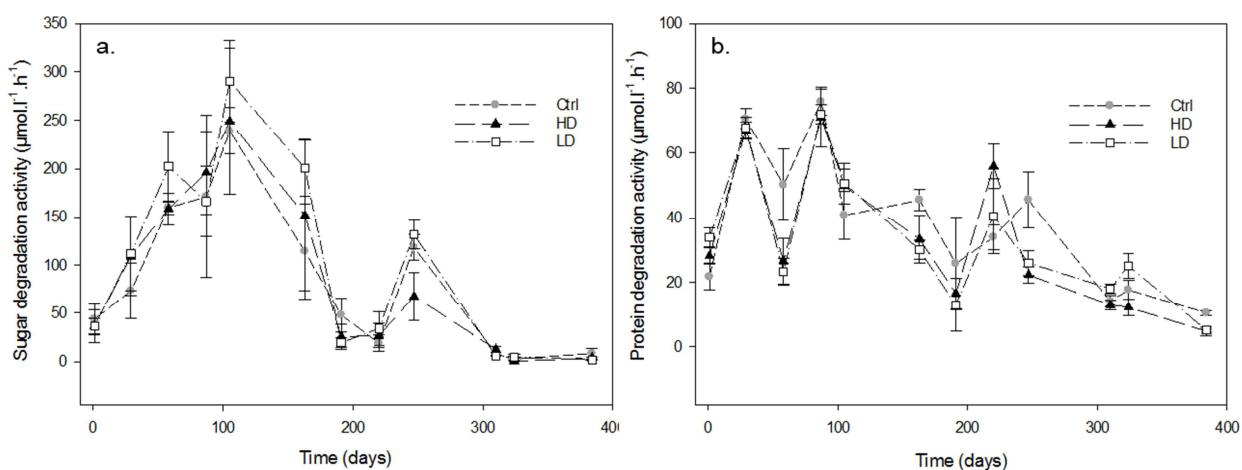


Fig. II.14 : évolution des activités maximales potentielles de dégradation des a. glucides et b. protéines au cours de l'expérience (moyenne \pm erreur type). L'axe x représente le nombre de jours depuis le début de l'expérience (21 mars 2011). Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl), faible densité de tubes (LD) et forte densité de tubes (HD).

Fig. II.14: evolution of maximal potential degradation activity of a. carbohydrates and b. proteins over the course of the experiment (mean \pm se). The x axis displays the time from the beginning of the experiment (March 21st, 2011). Treatments were: no tubes (Ctrl, grey circles); low tube density (LD, empty squares) and high tube density (HD, black triangles).

Activités exo-enzymatiques

Les deux activités exo-enzymatiques mesurées ont significativement varié au cours du temps (Fig. II.14, tests de Friedman, $p < 0,01$).

La capacité du sédiment à dégrader les sucres, mesurée par l'activité de la β -glucosidase, a suivi une évolution saisonnière nette (Fig. II.14.a), avec une activité minimale en hiver, une augmentation progressive jusqu'en juillet puis une diminution en automne. En novembre, cette capacité a augmenté à nouveau. Janvier 2012 a été le seul mois où des différences significatives entre traitements ont été démontrées (test de KW, $p < 0,05$). L'activité de la β -glucosidase était positivement corrélée à la concentration en glucides dans le sédiment (test de corrélation de Spearman, $p < 0,001$, $\rho = 0,714$).

La capacité du sédiment à dégrader les protéines, mesurée par l'activité de l' α -aminopeptidase, a varié sans motif saisonnier notable (Fig. II.14.b), avec cependant des pics en avril et en juin, ainsi qu'en octobre (chambres avec tubes)

et novembre (chambres Ctrl). Avril 2012 a été le seul mois où des différences significatives entre traitements ont été démontrées (test de KW, $p < 0,05$). L'activité de l' α -aminopeptidase était positivement corrélée à la concentration en protéines dans le sédiment (test de corrélation de Spearman, $p < 0,001$, $\rho = 0,361$).

Les deux activités étaient positivement corrélées entre elles (test de corrélation de Spearman, $p < 0,001$, $\rho = 0,486$).

Flux de carbone à l'interface air-sédiment

Les flux de carbone n'ont été mesurés que 4 fois pendant le suivi : en mars, fin août, en novembre et en avril 2012. Ces flux ne montrant pas d'évolution saisonnière significative, les données issues des différentes dates ont été réunies pour tester la différence entre les traitements. Les données issues de la première série de mesures (mars 2011), le lendemain de l'installation, n'ont pas été prises en compte. Les résultats montrent des différences significatives entre traitements pour la production brute (Fig. II.15.a, test de KW, $p < 0,001$), la respiration (Fig. II.15.b, test de KW, $p < 0,01$) et la production nette (Fig. II.15.c, test de KW, $p < 0,05$). La production brute et la respiration étaient minimales dans les chambres Ctrl, intermédiaires dans les chambres LD et maximales dans les chambres HD. Quel que soit le traitement, la production nette était négative, ce qui signifie que les assemblages benthiques consommaient du CO_2 . Cette consommation de CO_2 était maximale dans les chambres HD.

La respiration des assemblages benthiques était positivement corrélée aux concentrations en EPS, que ce soit en glucides (test de corrélation de Spearman, $p < 0,01$, $\rho = 0,535$) ou en protéines (test de corrélation de Spearman, $p < 0,01$, $\rho = 0,451$). Fin août, elle était significativement différente entre les traitements (test de KW, $p < 0,05$).

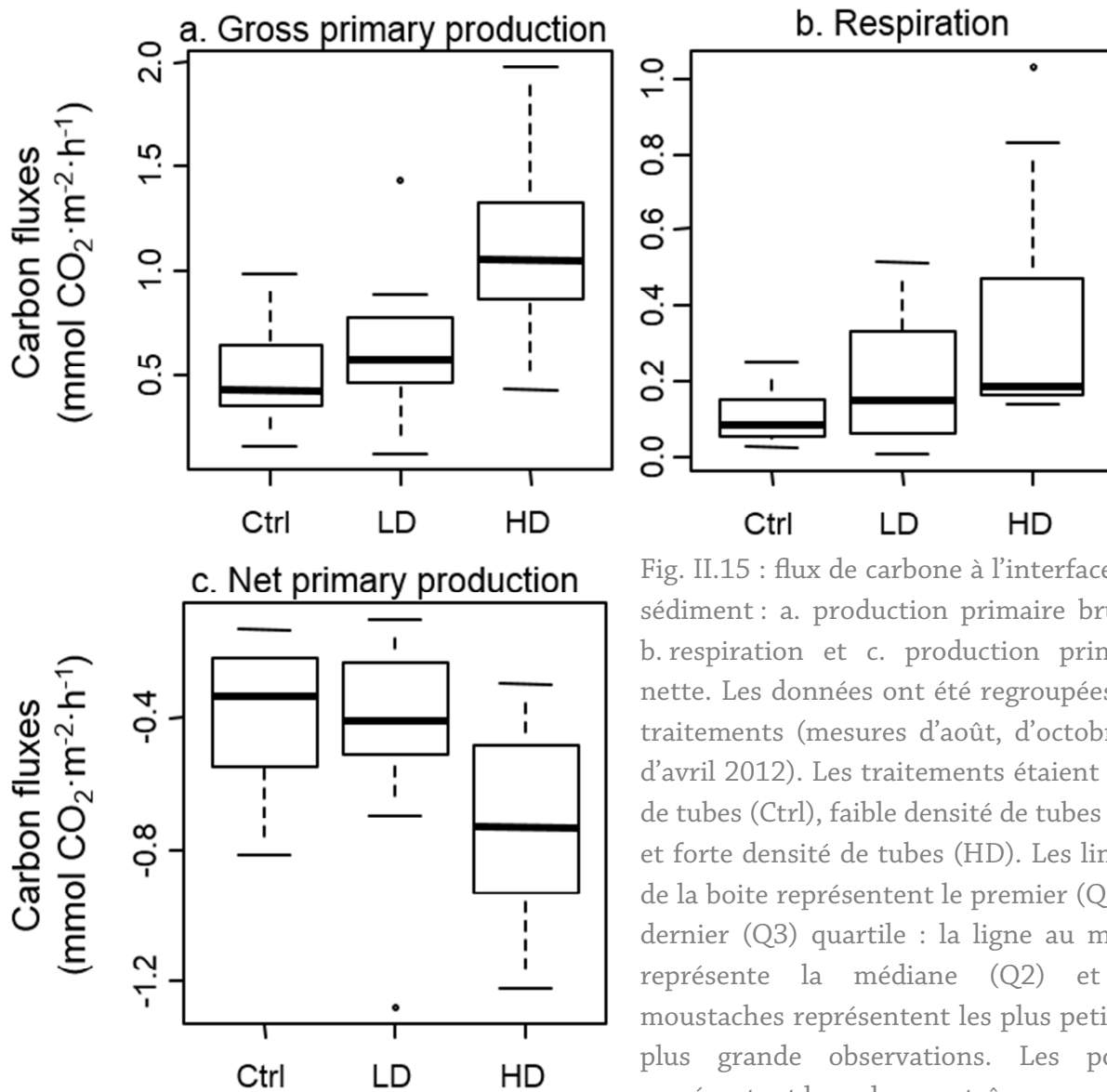


Fig. II.15 : flux de carbone à l'interface air-sédiment : a. production primaire brute ; b. respiration et c. production primaire nette. Les données ont été regroupées par traitements (mesures d'août, d'octobre et d'avril 2012). Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl), faible densité de tubes (LD) et forte densité de tubes (HD). Les limites de la boîte représentent le premier (Q1) et dernier (Q3) quartile : la ligne au milieu représente la médiane (Q2) et les moustaches représentent les plus petite et plus grande observations. Les points représentent les valeurs extrêmes.

Fig. II.15: carbon fluxes in different treatments: a. gross primary production; b. respiration and c. net primary production. Data were pooled from August, October and April 2012. Treatments were: no tubes (Ctrl); low tube density (LD) and high tube density (HD). Box limits represent lower (Q1) and upper quartiles (Q3), midline represents sample median (Q2) and whiskers represent the smallest and largest observations. Points are outliers.

Stabilité

L'évolution des mesures de stabilité du sédiment au cours du temps a mis en évidence un souci avec le matériel de mesure : les mesures réalisées jusqu'au 1^{er} août n'étaient pas concordantes avec les mesures réalisées après cette date

(Fig. II.16.a). Un nouvel étalonnage de l'appareil a été réalisé après le 1^{er} août, mais n'a pas montré de différence avec l'étalonnage précédent. L'oxydation des particules ferromagnétiques au fur et à mesure de leur utilisation est probablement à l'origine de cet artefact. Aussi, les valeurs de stabilité dans les chambres avec tubes ont été ramenées à celles des chambres contrôle (Fig. II.16.b). Ce procédé étant susceptible de masquer au moins en partie les évolutions saisonnières, seule la différence entre les traitements a été analysée.

À chaque date du suivi, excepté lors de la mise en place de l'expérience, des différences significatives entre traitements ont été démontrées (tests de Kruskal-Wallis, $p < 0,05$). La stabilité était plus forte dans les chambres HD comparées aux chambres des autres traitements.

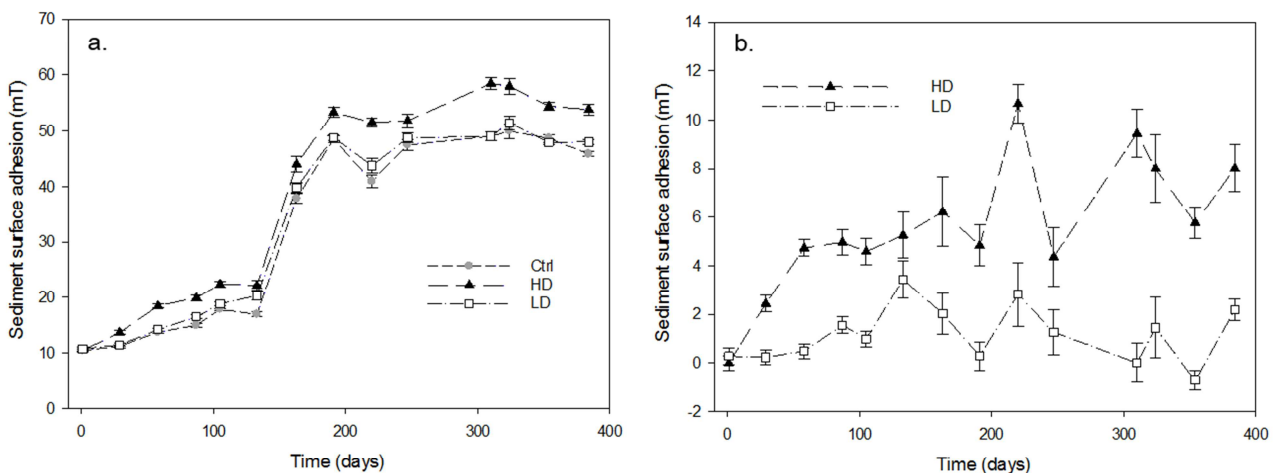


Fig. II.16 : évolution de la capacité adhésive du sédiment (moyenne \pm erreur type) au cours de l'expérience : a. données brutes ; b. valeurs ramenées à la moyenne des chambres Ctrl. L'axe x représente le nombre de jours depuis le début de l'expérience (21 mars 2011). Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl), faible densité de tubes (LD) et forte densité de tubes (HD).

Fig. II.16: evolution of sediment adhesive capacities (mean \pm se) over the course of the experiment: a. raw data and b. values compared to the mean of Ctrl chambers. The x axis displays the number of days from the beginning of the experiment (March 21st, 2011). Treatments were: no tubes (Ctrl, grey circles); low tube density (LD, empty squares) and high tube density (HD, black triangles).

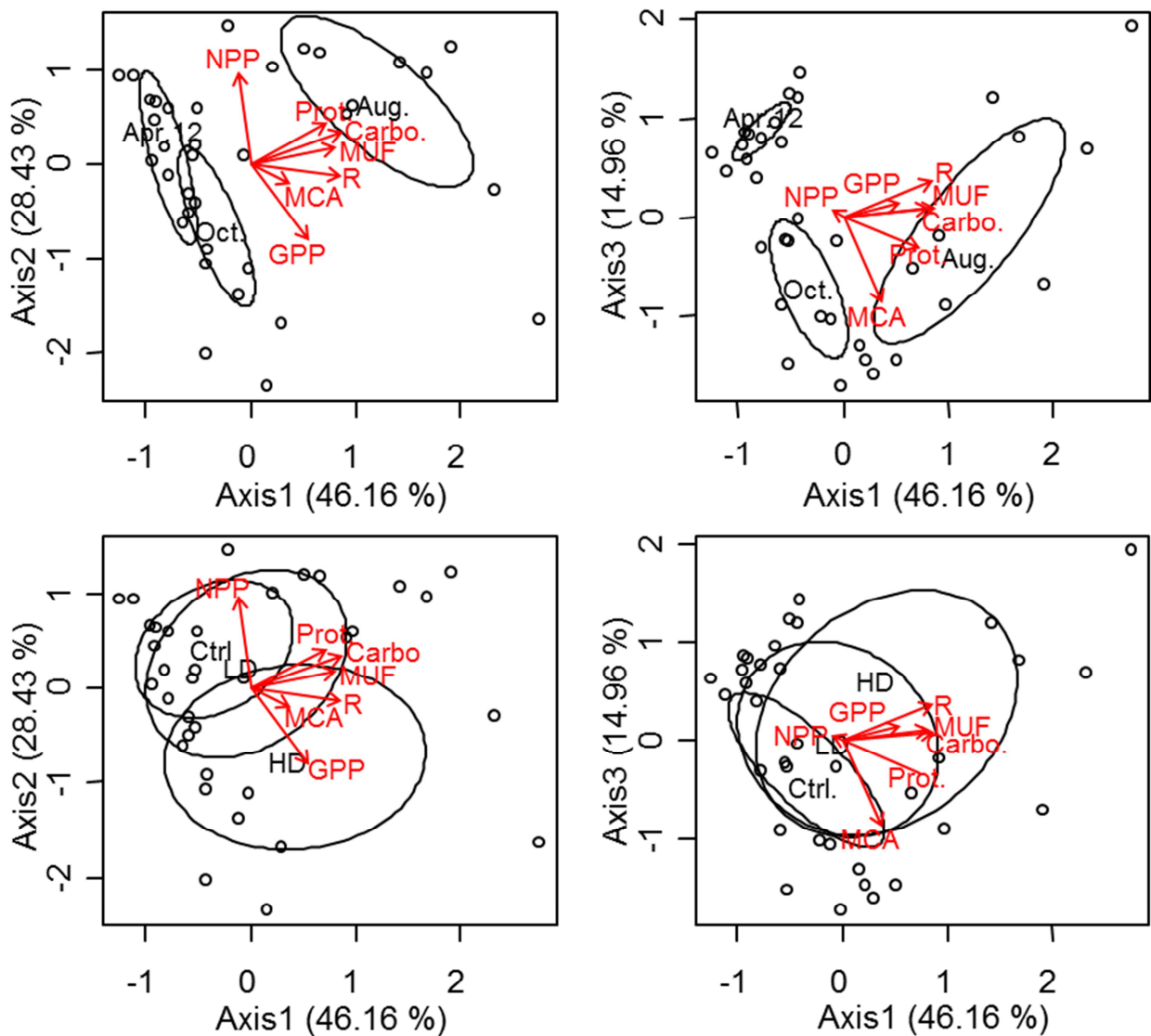


Fig. II.17 : résultats de l'ACP réalisée avec les données concernant le biofilm. Les données issues de chaque enceinte à chaque temps d'échantillonnage ont été utilisées. Les variables utilisées pour l'analyse étaient : les concentrations colloïdales en glucides (Carbo.) et protéines (Prot.) ; les activités maximales potentielles de dégradation des glucides (MUF) et des protéines (MCA) ; les productions primaires brutes et nettes (GPP et NPP, respectivement) et la respiration des communautés benthiques (R). Les traitements étaient : pas de tubes (Ctrl), faible densité de tubes (LD) et forte densité de tubes (HD).

Fig. II.17: results from PCA analysis on biofilm data. Data pooled from August (Aug.), October (Oct.) and April 2012 (Apr.12) were used. Variables used were colloidal concentrations of carbohydrates (Carbo.) and proteins (Prot.); maximal potential degradation activities of carbohydrates (MUF) and proteins (MCA); gross and net primary production (GPP and NPP, respectively) and respiration of benthic communities (R). Treatments were: no tubes (Ctrl); low tube density (LD) and high tube density (HD).

Analyse multivariée

Les résultats de l'ACP sont présentés sur la figure II.17. Les variables contribuant significativement ($p < 0,05$) à l'axe 1 sont, par ordre décroissant de contribution, la concentration en glucides, la respiration de la communauté benthique, l'activité de dégradation des glucides, la concentration en protéines, la production brute et l'activité de dégradation des protéines. L'axe 2 est quant à lui expliqué par la production nette, les concentrations en glucides et protéines, et la production brute. Enfin, l'axe 3 est expliqué par l'activité de dégradation des protéines et la respiration. À eux trois, ces axes expliquent presque 90 % de la variation du jeu de données.

Les échantillons se séparent selon leur date le long de l'axe 1, alors qu'ils se séparent selon leur traitement le long des axes 2 et 3. L'ANOSIM montre que les différences entre temps et entre traitements sont significatives ($p < 0,001$).

DISCUSSION

Les résultats présentés dans la première partie ne seront pas discutés de nouveau ici, sauf éventuellement en lien avec les résultats de la deuxième partie.

Évolution des concentrations en EPS

Les concentrations en EPS colloïdaux, que ce soit en glucides ou en protéines, ont montré une dynamique temporelle forte, similaire entre les traitements. En été, les concentrations en EPS étaient maximales, alors qu'elles étaient minimales en hiver. En effet, la production d'EPS est souvent liée à l'activité photosynthétique (Stal, 2003, Bhaskar & Bhosle, 2005, Hanlon et al., 2006), qui elle-même dépend de la température. Ceci est cohérent avec l'augmentation de la proportion en glucose dans les EPS en été, qui dénote également une forte activité photosynthétique (cf Partie 1). Aussi, les variations des concentrations d'EPS peuvent être expliquées par la composition du biofilm, comme cela a été démontré dans la première partie de ce chapitre : les concentrations sont fortement corrélées aux scores de l'analyse multi-factorielle (MFA, Multiple Factor Analysis) prenant en compte la composition en acides gras, pigments et sucres du sédiment (Fig. II.9).

Dans une première étude sur une période de 2 mois au printemps (Passarelli et al., 2012b; voir annexe 1), il avait été montré que les concentrations d'EPS étaient influencées par les traitements expérimentaux, avec des concentrations supérieures dans les chambres avec tubes comparées aux chambres contrôles. Les résultats de cette deuxième étude confirment l'effet de ces structures artificielles à la même saison, mais montrent que cet effet est saisonnier. Seules les concentrations en glucides présentent des différences entre les traitements en dehors du printemps (août et octobre). Le printemps correspond à la période de mise en place et de croissance du biofilm, qui semble donc s'accélérer en présence de tubes. Ces structures, en modifiant l'écoulement de l'eau à la surface du sédiment, peuvent en effet favoriser l'apport de nutriments au biofilm (Friedrichs et al., 2009) ; ceci permet un

meilleur développement du microphytobenthos, et donc une production accrue d'EPS. D'autre part, les structures biogéniques semblent fournir un refuge par rapport à la prédation (Woodin, 1978), ce qui peut empêcher la consommation du biofilm lors des premiers stades, alors que les EPS ne permettent pas encore une protection efficace (Wotton, 2004). Enfin, les tubes modifient les assemblages de méiofaune et de macrofaune (Passarelli et al., 2012b), qui peuvent soit par leur production de mucus soit par leur effet sur le microphytobenthos affecter la production d'EPS dans les biofilms en formation ou matures.

L'évolution saisonnière de la qualité des EPS a déjà été démontrée par l'analyse de la composition des EPS en monosaccharides. Un autre marqueur de la qualité des EPS est le rapport entre concentration en glucides et concentration en protéines, qui dans notre étude, a montré une variabilité temporelle significative. Cependant, aucune différence entre les traitements n'a été démontrée. Ce motif de variations est cohérent avec la composition en monosaccharides des EPS, qui variait temporellement et non entre les traitements. Le rapport des concentrations en glucides et protéines est en partie révélateur de la part relative du microphytobenthos et des bactéries dans la production des EPS ; en effet, ceux produits par le microphytobenthos sont plutôt riches en glucides, tandis ceux produits par les bactéries sont plutôt riches en protéines (Decho, 1990). Ainsi, les variations de ce rapport peuvent être mises en relation avec des modifications de la communauté productrice d'EPS au cours des mois, qui ont été démontrées par les acides gras et les pigments.

Activités exo-enzymatiques

Les activités exo-enzymatiques de dégradation des sucres et des protéines ont essentiellement varié de manière saisonnière, et peu du fait des traitements. Elles rejoignent en cela la majorité des paramètres étudiés jusqu'ici.

Ces deux activités étaient positivement corrélées entre elles, ce qui est cohérent avec les données de la littérature (Danovaro et al., 2001).

Les activités maximales potentielles des exo-enzymes étaient positivement corrélées aux concentrations des molécules qu'elles dégradent. Deux facteurs peuvent expliquer cette corrélation. Premièrement, l'activité des exo-enzymes est contrôlée par des paramètres abiotiques qui varient saisonnièrement, comme la température ; cette dernière étant maximale en été, l'activité maximale potentielle augmente en été. Deuxièmement, l'activité maximale de dégradation des glucides et des protéines dépend de la présence de ces polymères dans le milieu. Par exemple, la quantité d'enzyme produite peut augmenter en présence de molécules à dégrader, et son activité peut être favorisée (Chrost, 1989). Il est également envisageable que la présence des glucides et / ou des protéines modifie les paramètres physico-chimiques au voisinage de l'enzyme, comme par exemple le pH ou les concentrations ioniques (Decho, 1990), et favorise ainsi son activité. Enfin, cette corrélation montre que les produits de dégradation des glucides et des protéines sont rapidement utilisés par les cellules environnantes, même si les bactéries dégradent généralement plus de molécules que ce qu'elles assimilent (Azam, 1998) ; en effet, dans le cas contraire l'accumulation de produits de dégradation tendrait à limiter l'activité enzymatique (Chrost, 1989).

Les deux activités de dégradation montrent également un pic à la fin de l'automne, alors que les concentrations des glucides et protéines sont relativement basses. Cette augmentation de l'activité de dégradation a également été mise en évidence par l'accumulation d'acides gras branchés, marqueurs de bactéries hétérotrophes, et de phéophytine, produit de dégradation de la chlorophylle (cf Partie 1). Là encore, des modifications de l'environnement physico-chimique des enzymes sont peut-être en jeu. Un autre facteur pouvant entrer en jeu est la modification de la composition des EPS. Il est par exemple intéressant de noter qu'à la fin de l'automne, le rapport entre glucides et protéines se trouve à un niveau très bas par rapport au reste de

l'année. Cette donnée est cohérente avec une production d'EPS majoritairement réalisée par les bactéries à cette période de l'année (Decho, 1990), et peut également être un marqueur d'un changement général de composition des EPS, qui stimulerait l'activité de dégradation des bactéries. Par exemple, le glucose et galactose sont des inhibiteurs compétitif de l'enzyme quand ils sont présents sous forme de monomère (Chrost, 1989) ; leur présence en quantité importante dans les polymères pourrait donc influencer l'activité de l'enzyme une fois le polymère dégradé. Ces résultats montrent à nouveau l'importance de considérer les variations qualitatives des EPS pour expliquer leur dégradation.

Flux de carbone

À l'inverse des autres paramètres étudiés, les flux de carbone ne présentaient pas d'évolution saisonnière significative. Ceci est en contradiction avec les données de la littérature (Hubas et al., 2006), qui montrent une évolution saisonnière nette de ces flux dans plusieurs environnements, en grande partie liée à l'évolution saisonnière de la température. Cependant, ces flux n'ont pu être mesurés qu'à 4 dates pendant le suivi, au lieu des 14 séries de mesures pour les autres paramètres. De plus, en raison d'intempéries, aucune mesure n'a pu être réalisée au début de l'été, alors que les concentrations d'EPS augmentent fortement à cette date, ce qui suggère que la production primaire est forte. Le jeu de données, incomplet, ne nous permet donc pas d'aboutir à une conclusion sur les variations saisonnières des flux de carbone dans le milieu étudié.

Quelle que soit la date ou le traitement étudiés, le système était globalement autotrophe (consommation nette de CO₂ dans les chambres benthiques à la lumière). Cependant, les productions primaires brute et nette ainsi que la respiration présentaient des différences entre les traitements. Ces trois flux étaient minimaux dans les chambres contrôles et augmentaient avec la densité de tubes, confirmant ainsi ce qui avait été observé lors d'une précédente étude (Passarelli et al., 2012b). Or, les acides gras ont montré, pour

la plupart des mois étudiés, des différences de composition du sédiment entre les traitements. Ceci démontre que les assemblages benthiques étaient différents entre les traitements, ce qui peut expliquer les variations de production ou consommation du CO₂.

Lors de la mesure réalisée fin août, la respiration de la communauté benthique étaient significativement différente entre les traitements, alors que ni les acides gras, ni les pigments, ni les monosaccharides, ni les concentrations d'EPS ne varient selon les conditions expérimentales. Seule la DGGE semblait montrer des différences entre les assemblages de diatomées (partie 1, Fig. II.6) ; ces différences étaient trop fines pour être mises en évidence par le contenu pigmentaire du sédiment. Le marqueur ayant la résolution la plus fine (DGGE) permettait donc de mieux mettre en relation la composition des assemblages et les paramètres de fonctionnement du système.

De plus, les variations observées sur les flux de carbone peuvent ne pas être totalement imparties à des différences de communautés benthiques. Les tubes, en plus d'affecter la composition des biofilms, peuvent en effet influencer leur production ou consommation de carbone via une modification de leur milieu de vie (modification de l'hydrodynamisme ou de la circulation des nutriments par exemple).

Stabilité du sédiment

Du fait des problèmes rencontrés avec l'appareil de mesure de la stabilité, l'évolution temporelle de cette dernière ne pourra pas être discutée ici. Cependant, les premières mesures semblent cohérentes avec ce qui avait été trouvé lors d'une précédente expérience (Passarelli et al., 2012b) : une augmentation de la stabilité au printemps, qui se poursuit au début de l'été. Une étude utilisant une autre méthode de mesure de stabilité a suivi l'évolution du seuil d'érosion sur deux sites sur une période d'un an (Andersen, 2001). Les résultats montrent que l'évolution saisonnière de la stabilité est différente selon le site ; le premier présentait un seul pic en décembre / janvier, alors que l'autre

présentait des pics en mai, octobre, février et juin. Cette étude démontrait également une variabilité interannuelle forte, avec des valeurs très différentes de stabilité entre les deux mois de juin échantillonnés.

Contrairement à de nombreux autres paramètres, les mesures de stabilité présentaient des différences entre traitements à chaque mesure, sauf au moment de l'installation de l'expérience en mars 2011. Comme observé par Passarelli et al. (2012b), la capacité adhésive du sédiment était plus forte dans les chambres HD que dans les autres chambres. La biostabilisation du sédiment par les biofilms est généralement corrélée à la quantité d'EPS (Paterson et al., 2000, Yallop et al., 2000, de Brouwer et al., 2002, Friend et al., 2003, Andersen et al., 2010). Cependant, dans la présente étude, les concentrations en EPS étaient généralement similaires entre les traitements. Des auteurs ont démontré que la quantité maximale d'EPS ne correspondait pas toujours à la stabilisation maximale (Stal, 2010), d'autres paramètres comme la qualité entrant également en compte (de Brouwer et al., 2005).

Dans notre étude, les deux paramètres décrivant la qualité des EPS (rapport glucides sur protéines et composition en monosaccharides des glucides) sont pourtant similaires entre traitements. Les différences observées de capacité adhésive du sédiment sont donc, en partie au moins, liées à d'autres paramètres. La présence des microorganismes étant parfois nécessaire à la stabilisation du sédiment (Stal, 2010), des variations de la composition de l'assemblage microbien comme celles mises en évidence par l'analyse des acides gras peuvent être en partie responsables des différences observées. Un autre facteur rentrant en jeu est celui de la granulométrie (Defew et al., 2002, Stal, 2003). En effet, la présence de structures biogéniques est connue pour modifier la granulométrie du sédiment ; en particulier, à forte concentration en tubes, la mise en place d'un écoulement particulier appelé « *skimming flow* » permet un enrichissement du sédiment en particules fines (Eckman, 1983). Ces particules, du fait de leur fort rapport surface sur volume, favorisent l'adhésion des particules entre elles et donc la stabilisation du sédiment. D'autres facteurs

abiotiques, comme la chimie de l'eau interstitielle (salinité, concentration des cations bivalents...), sont modifiés par les tubes et contrôlent la stabilisation du sédiment (Grabowski et al., 2011). Une association de facteurs abiotiques et biotiques serait alors à l'origine de la stabilisation observée dans les chambres à forte densité de tubes.

Caractérisation générale du biofilm

Les différents paramètres décrits ici, ainsi que dans la première partie, nous permettent de caractériser finement la composition du biofilm (parties 1 et 2) et son fonctionnement (partie 2). En associant les différentes variables décrites dans cette partie (concentration des EPS, activité de dégradation, flux de carbone), il apparaît que les biofilms fonctionnent différemment à la fois entre les dates et entre les traitements (Fig. II.17), avec une prédominance de l'effet saisonnier. Ceci est en accord avec les données obtenues dans la première partie, qui montrent une évolution saisonnière de la composition du biofilm, décrite par ses acides gras, ses pigments et son contenu en monosaccharides. Les deux parties du présent chapitre montrent l'utilité, et la nécessité, d'associer différents marqueurs et variables lors de la description des biofilms naturels, qui sont des systèmes complexes.

Cette étude suggère des liens forts entre la composition d'un biofilm et son importance dans le fonctionnement du système benthique, avec une influence sur les flux de carbone, la stabilisation, et la dégradation de la matière organique. Malgré sa dimension expérimentale, liée à l'utilisation d'imitations de structures biogéniques, les limites de cette étude sont celles généralement associées aux suivis en milieu naturel : si des liens entre paramètres de composition et paramètres de fonctionnement sont suggérés, ils ne sont pas testés formellement.

Les prochains chapitres adopteront donc une approche expérimentale en milieu contrôlé pour mieux caractériser les liens entre biofilm, EPS et

stabilisation du sédiment (chapitre IV), ainsi que l'utilisation trophique des EPS (chapitre III), en particulier via leur dégradation par les bactéries.

Chapitre III

Devenir des EPS dans les
réseaux trophiques

ABSTRACT

EPS are diverse molecules rich in C and N, and therefore may form an interesting trophic resource for benthic organisms. Yet, assimilation of entire molecules is impossible given their large size; therefore, EPS consumption requires either the presence of specific digestive enzymes allowing EPS degradation, or a preceding degradation by bacteria. Two experimental studies based on ^{13}C -enriched EPS were designed to determine whether worms *Hediste diversicolor* are able to use EPS as a trophic resource, and whether this consumption is channelled through bacterial degradation. Moreover, the impact of worms on EPS composition of the sediment was investigated. The first experiment showed that worms consume microorganisms rather than EPS; they assimilate microbial fatty acids directly, without modification and without the need of bacterial degradation. A low utilisation of EPS was however not excluded. Despite weaknesses in the experimental design, the second experiment showed that EPS consumption by worms is low even when EPS are the only available food source. This consumption was however sufficient to alter EPS composition of the sediment, which resulted from interactions between mucus production by *H. diversicolor*, initial EPS content of the sediment, and selective assimilation and degradation of specific monomers. Further experiments using ^{13}C -enriched EPS in natural environments would be necessary to specify whether these results are representative of benthic faunal assemblages, and to assess EPS importance as trophic resource.

RÉSUMÉ

Les EPS sont des molécules riches en C et en N, et constituent de ce fait une ressource trophique potentiellement intéressante pour les organismes benthiques. Cependant, leur taille rend l'assimilation de la molécule entière impossible, si bien que leur consommation nécessite soit des enzymes digestives capables de les dégrader, soit une dégradation préalable des molécules par les bactéries. Deux expériences utilisant des EPS marqués au ^{13}C ont été mises en place pour déterminer si les vers *Hediste diversicolor* (néréididés) utilisent les EPS comme ressource trophique, et si cette utilisation se fait via la dégradation bactérienne. De plus, l'impact des vers sur la composition des EPS a été évalué. La première expérience a permis de démontrer que les vers consomment préférentiellement les microorganismes, dont ils assimilent les acides gras sans modification, plutôt que les EPS. La dégradation bactérienne ne semblait pas être nécessaire à cette consommation. Une utilisation faible des EPS n'a cependant pas pu être exclue. La deuxième expérience, bien que présentant des lacunes dans le protocole expérimental, a permis de montrer que la consommation des EPS par les vers est faible, même lorsque ceux-ci constituent la seule ressource trophique disponible. Cependant, cette consommation a tout de même un effet sur la composition des EPS du sédiment, qui résulte de l'interaction entre production de mucus par les vers, contenu en EPS initial, assimilation et dégradation sélective de certains monomères. Des expériences utilisant des EPS marqués au ^{13}C en milieu naturel permettraient de déterminer dans quelle mesure ces résultats sont représentatifs des assemblages benthiques, et l'importance des EPS dans les réseaux trophiques.

INTRODUCTION

Les EPS étant majoritairement composés de glucides et de protéines, ils représentent potentiellement une source de carbone et d'azote intéressante pour les organismes benthiques (Decho & Moriarty, 1990). Cependant, une dégradation en monomères ou en oligomères est nécessaire avant que ces molécules de grande taille ne puissent être assimilées (Hoppe, 1983), que ce soit par les bactéries ou par d'autres organismes benthiques (méiofaune, macrofaune). Dans le chapitre précédent, les activités de dégradations enzymatiques ont pu être mises en lien avec la présence de bactéries hétérotrophes ainsi que d'autres marqueurs de dégradation. Les bactéries ne sont cependant pas les seuls organismes à produire des exo-enzymes permettant la dégradation des EPS. Par exemple, Riemann & Helmke (2002) ont montré que les nématodes produisaient également des exo-enzymes, qui permettent le développement des bactéries sur le mucus qu'ils produisent. Ces bactéries produisent alors à leur tour des exo-enzymes, qui profitent à la fois aux nématodes et aux bactéries. Ces auteurs ont introduit le concept de partage d'enzyme (« enzyme sharing ») pour décrire cette relation particulière.

Si la dégradation des EPS par des exo-enzymes est si importante, c'est que certains organismes ne possèdent pas les enzymes digestives nécessaires pour dégrader les EPS consommés (Harvey & Luoma, 1984, Riemann & Helmke, 2002). Il est donc difficile d'estimer dans quelle mesure les EPS représentent une source trophique importante pour les organismes benthiques, et à quel point les bactéries sont nécessaires pour faire entrer les EPS dans les réseaux trophiques.

De plus, les résultats présentés au chapitre précédent suggèrent un lien entre composition des EPS et dégradation. On s'attend en effet à ce que certains polymères soient plus faciles à dégrader que d'autres, selon leur composition, leur structure et leur accessibilité (Oakes et al., 2010) ; on s'attend donc à ce que les organismes benthiques, qu'ils appartiennent aux microbes, à la méiofaune ou à la macrofaune, assimilent préférentiellement certains composés, et

modifient ainsi la composition des EPS, et donc leur propriétés et fonctions dans l'écosystème.

Les objectifs de ce chapitre sont donc de déterminer :

- (1) si les EPS sont consommés par les consommateurs, et si oui, s'ils sont plus ou moins consommés que les microorganismes producteurs ;
- (2) si cette consommation se fait directement ou via les bactéries, qui assimileraient les EPS avant d'être consommées ;
- (3) l'impact de cette consommation sur la composition des EPS.

Ce chapitre est découpé en deux parties exposant deux expériences complémentaires menées en laboratoire. La première partie abordera les deux premiers objectifs ; la deuxième partie permettra d'affiner les réponses aux deux premiers objectifs, et de discuter le troisième. L'annélide polychète dépositivore *H. diversicolor*, facile à élever en laboratoire, au régime alimentaire opportuniste et de composition en acides gras bien connue, a servi de modèle pour ces expériences.

Partie 1

TRANSFERT DES MICROORGANISMES ET DE LEURS EPS DANS LES RÉSEAUX TROPHIQUES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèles expérimentaux

Des cultures de microphytobenthos ont été mises en place à partir de sédiment vaseux récolté sur l'archipel de Chausey. Le sédiment a été mélangé avec de l'eau de mer, et le tout a été filtré sur 5 μm . Le filtrat a été enrichi en milieu de Guillard (f/2) pour stimuler la croissance des diatomées. La culture a alors été séparée en deux fioles de 1 l, auxquelles a été ajouté 1 ml de solution de silice à 30 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Ceci permet de s'assurer d'une bonne croissance des diatomées, car leur développement est souvent limité par la disponibilité de la silice, nécessaire à la construction du frustule. Les fioles ont été laissées à la lumière naturelle.

De plus, du bicarbonate de sodium a été ajouté à chaque fiole, ce qui fournit un substrat aux microphytobenthos pour la photosynthèse. Pour une fiole, c'est du bicarbonate « normal », avec du ^{12}C , qui a été ajouté (118 mg ajoutés). Pour la deuxième, c'est la même quantité de bicarbonate, mais marqué au ^{13}C , qui a été ajouté (Fig. III.1). Le ^{13}C est un isotope stable du carbone qui contient un neutron supplémentaire par rapport au ^{12}C , et ces deux isotopes pourront donc être différenciés en spectrométrie de masse. La culture a poussé pendant 10 j avec une photopériode de 12 h.

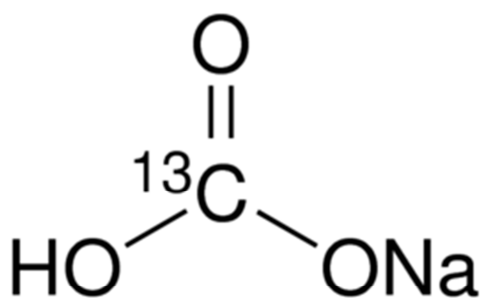


Fig. III.1 : représentation de bicarbonate de sodium avec un ^{13}C à la place de l'isotope le plus commun, le ^{12}C .

Fig. III.1: schematic view of sodium bicarbonate with a ^{13}C instead of the common ^{12}C .

Après le début de l'expérience, les cultures ont été repiquées chaque semaine. Les deux cultures ont été repiquées de la même manière, seul le type de bicarbonate différant entre les fioles. Pour le repiquage, 100 ml de culture

ont été mélangés à 500 µl de solution de silice à 30 g·l⁻¹, 25 ml de solution de bicarbonate à 3,36 g·l⁻¹, et 475 ml d'eau de mer artificielle à 35 g·l⁻¹ de sel.

Des observations visuelles au microscope ont confirmé que la culture de microphytobenthos contenait essentiellement des diatomées, en particulier des genres *Cylindrotheca* et *Navicula* (Paterson, pers. comm.). Ces genres font partie du tychoplancton, c'est-à-dire que ce sont des organismes benthiques mais qui peuvent être charriés avec le plancton en cas de turbulence.

Les vers (*Hediste diversicolor*, anciennement *Nereis diversicolor*, appartenant aux Néréididés) ont été achetés auprès de la station biologique de Roscoff. Ils ont été mis 3 jours à jeûner avant le début de l'expérience afin de vider le contenu de leurs tubes digestifs.

Ces vers sont capables de consommer les diatomées de manière préférentielle, si bien qu'ils peuvent être d'avantage enrichis en ¹³C qu'un sédiment contenant des diatomées marquées (Woulds et al., 2012).

Extraction de la nourriture à partir des cultures

Pour les traitements ¹²C et ¹³C, les extractions ont été réalisées de la même manière (Fig. III.2). 400 ml de culture ont été utilisés pour l'extraction des EPS et autant pour celle du mélange diatomées + EPS.

Pour l'extraction des EPS, de la résine est ajoutée à la culture (20 g pour 400 ml), qui est ensuite roulée à l'horizontal pendant 1h30. La solution est alors laissée à décanter pendant 30 min ; les diatomées sédimentent dans le fond du tube. Le surnageant est récupéré, et l'absence de diatomées est vérifiée sous le microscope. L'extrait d'EPS est ensuite dialysé pendant 30 min dans une eau à 4 °C, ce qui permet l'élimination du bicarbonate restant. C'est cet extrait qui sera ensuite ajouté dans les microcosmes.

Pour l'extraction des diatomées, la culture est séparée en 8 tubes de 50 ml, qui sont laissés à décanter pendant 1 h. Les diatomées et EPS associés se concentrent alors dans le bas du tube. Le surnageant est alors supprimé,

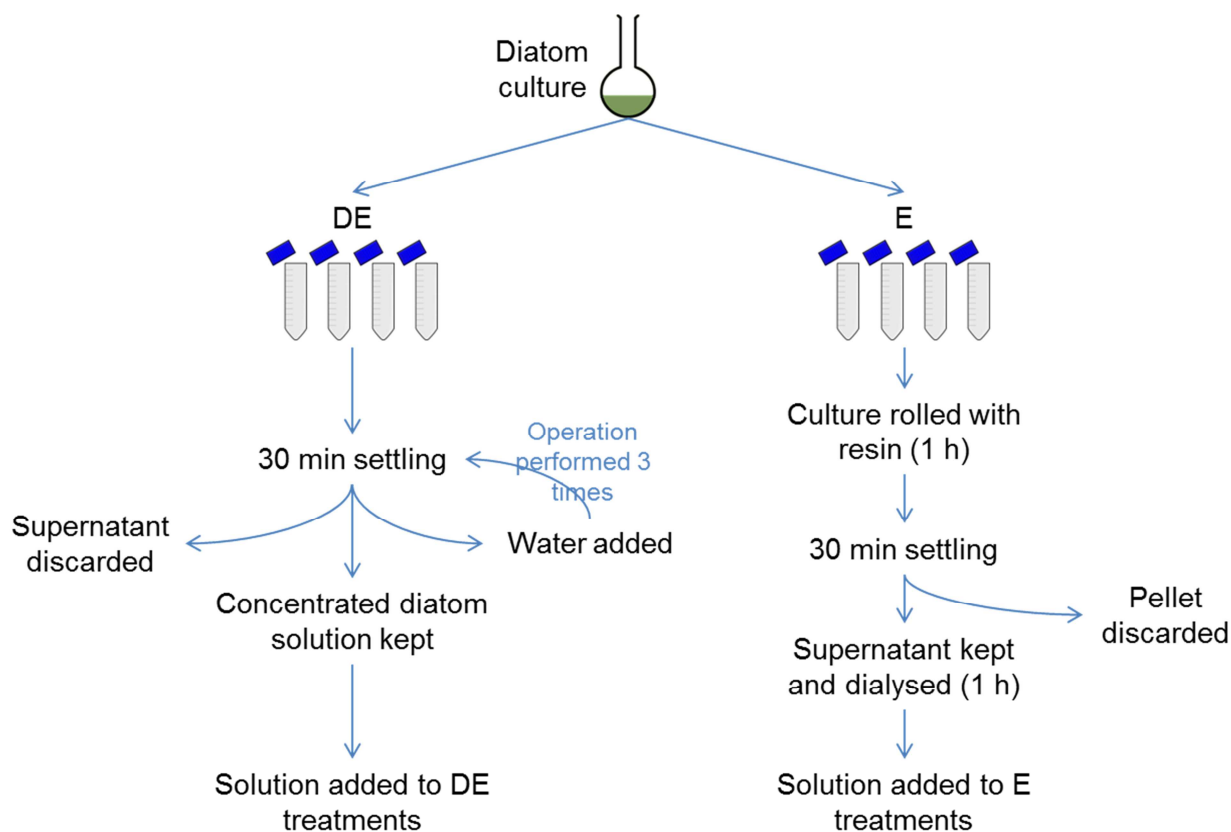


Fig. III.2 : protocole utilisé pour obtenir les solutions de diatomées et EPS (pour les microcosmes DE ; à gauche) et d'EPS (pour les microcosmes E ; à droite).

Fig. III.2: protocol used to get solutions of diatoms and EPS (for DE microcosms ; left panel) and of EPS (microcosms E ; right panel).

remplacé par de l'eau de mer autoclavée, puis on répète l'opération. Ceci permet de « rincer » au maximum la culture du bicarbonate résiduel. Le culot, qui contient les diatomées et les EPS concentrés, est alors récupéré et ajouté dans les microcosmes. Des dosages de chlorophylles et d'EPS sont réalisés sur ces extraits pour vérifier leur utilité dans la mise en place du traitement associé.

Dispositif expérimental

On utilise des microcosmes de taille $14 \times 14 \times 6$ cm (Fig. III.3.a), dans lesquels on ajoute 190 ± 5 g de sable stérilisé (brûlé 5 h à 550°C) et 400 ml d'eau de mer artificielle autoclavée. Un ver est ajouté à chaque microcosme. Chaque jour, le microcosme est complété avec de l'eau distillée autoclavée.



Fig. III.3 : a. montage expérimental. Les microcosmes éclairés sont ceux contenant les diatomées. b. Photo de deux microcosmes, appartenant au traitement diatomées (à gauche, traitement DE12) et au traitement contrôle (à droite, traitement C). Noter le développement massif de diatomées dans le traitement DE12.

Fig. III.3: a. experimental setup. Microcosms with light are those containing diatoms. b. Pictures of two microcosm, belonging to treatments with diatom (left, DE12 treatment) and control treatment (right, C treatment). Note the massive development of diatoms in the DE12 microcosm.

Cinq traitements ont été mis en place (Fig. III.3.b), avec 7 répliqués par traitement :

- traitement contrôle (C) : les bacs contrôles sont chaque jour complétés avec de l'eau contenant des antibiotiques (streptomycine : $150 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ et chloramphénicol : $240 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) ;

- traitement EPS ^{12}C (E12) : au début de l'expérience, puis une fois par semaine, chaque microcosme a reçu 50 ml de solution d'EPS non marqués ;
- traitement diatomées + EPS ^{12}C (DE12) : au début de l'expérience, puis une fois par semaine, chaque microcosme a reçu 10 ml de solution de diatomées non marquées ;
- traitement EPS ^{13}C (E13) : au début de l'expérience, puis une fois par semaine, chaque microcosme a reçu 50 ml de solution d'EPS marqués au ^{13}C ;
- traitement diatomées + EPS ^{13}C (DE13) : au début de l'expérience, puis une fois par semaine, chaque microcosme a reçu 10 ml de solution de diatomées marqués au ^{13}C .

Prélèvements

Le sédiment des microcosmes a été échantillonné après 15 et 30 jours d'expérience (T1 et T2, respectivement), avec une seringue de 1,2 cm de diamètre dont l'extrémité a été coupée. Quatre carottes de sédiment (1 cm) ont été prélevées par microcosme, et elles ont été immédiatement congelées à l'azote liquide. Elles ont servi à l'analyse des concentrations en chlorophylles, en EPS (protéines et glucides), ainsi qu'à l'analyse des acides gras et des isotopes. Ces analyses ont été réalisées selon les protocoles décrits au chapitre I.

Les vers ont été prélevés à la fin de l'expérience et immédiatement congelés à l'azote liquide. Le ver a été lyophilisé et 1 mg de chair a été recueilli pour l'analyse isotopique. Le reste de l'individu a été utilisé pour l'extraction des acides gras.

Statistiques

Des tests de Kruskal-Wallis (KW) ont permis d'estimer si les concentrations en chlorophylles, EPS ou ^{13}C étaient significativement différentes entre traitements. Quand les différences étaient significatives, des tests de Wilcoxon Mann-Whitney ont été réalisés pour déterminer quels étaient

les traitements différents deux à deux. La correction de Holm-Bonferroni a été utilisée pour ces comparaisons multiples.

Pour comparer les compositions en acides gras entre temps et traitements, un tableau de distance a été construit en utilisant la distance de Bray Curtis sur des données standardisées. Une nMDS a alors été tracée à partir de ce tableau (200 itérations). Une ANOSIM a permis de déterminer si des différences significatives existaient entre les traitements. Une analyse SIMPER a finalement permis d'identifier les acides gras responsables du plus de dissimilarité entre traitements.

RÉSULTATS

Validation du protocole expérimental

Les prélèvements réalisés dans les microcosmes après 15 jours d'expérience (T1) ont permis de vérifier que le protocole expérimental était adéquat, c'est-à-dire que le sédiment était enrichi en EPS dans les traitements E, en chlorophylle et en EPS dans les traitements DE, et en ^{13}C dans les traitements associés.

Cependant, les analyses de chlorophylle à T1 montrent que les microcosmes E, censés contenir uniquement des EPS, étaient contaminés par de la chlorophylle (Fig. III.4). Que ce soit pour le ^{12}C ou le ^{13}C , ils contenaient autant de chlorophylle que leurs analogues DE. Les traitements E ont donc été exclus de la suite de l'analyse. Les traitements DE contenant à la fois des diatomées et des EPS, les analyses réalisées nous permettront tout de même de discuter de la consommation des EPS par les vers.

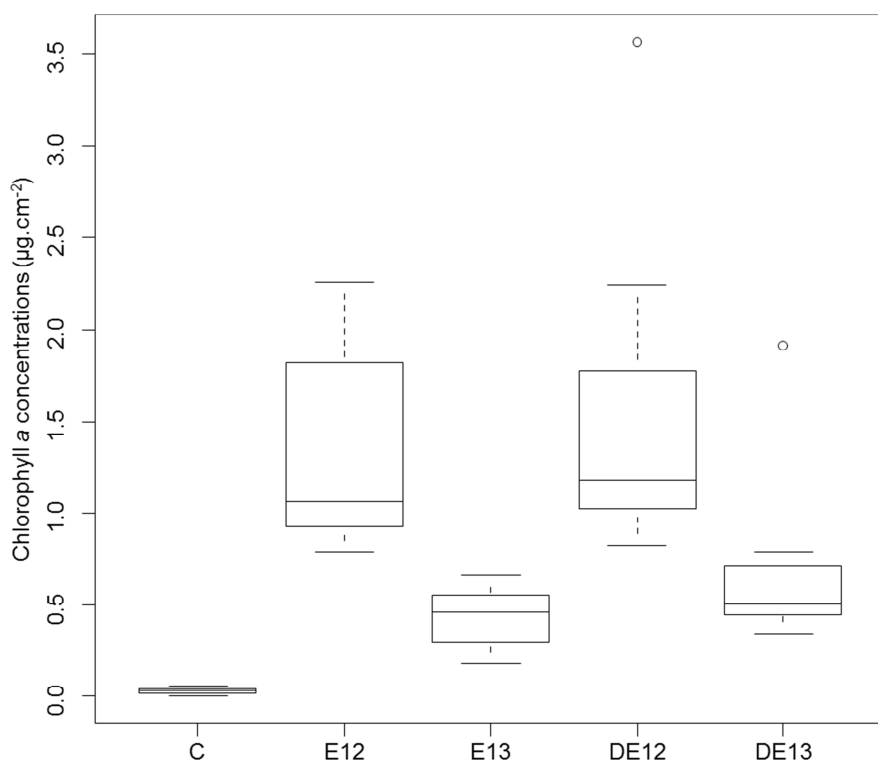


Fig. III.4 : concentrations en chlorophylle *a* dans les microcosmes à T1 (15 j d'expérience). Les traitements étaient : C : contrôle ; E : EPS ; DE : diatomées et EPS ; 12 : ^{12}C ; 13 : ^{13}C .

Fig. III.4: chlorophyll *a* concentrations at T1 (15 d of experiment). Treatments were: C: control; E: EPS; DE: diatoms and EPS; 12: ^{12}C ; 13: ^{13}C .

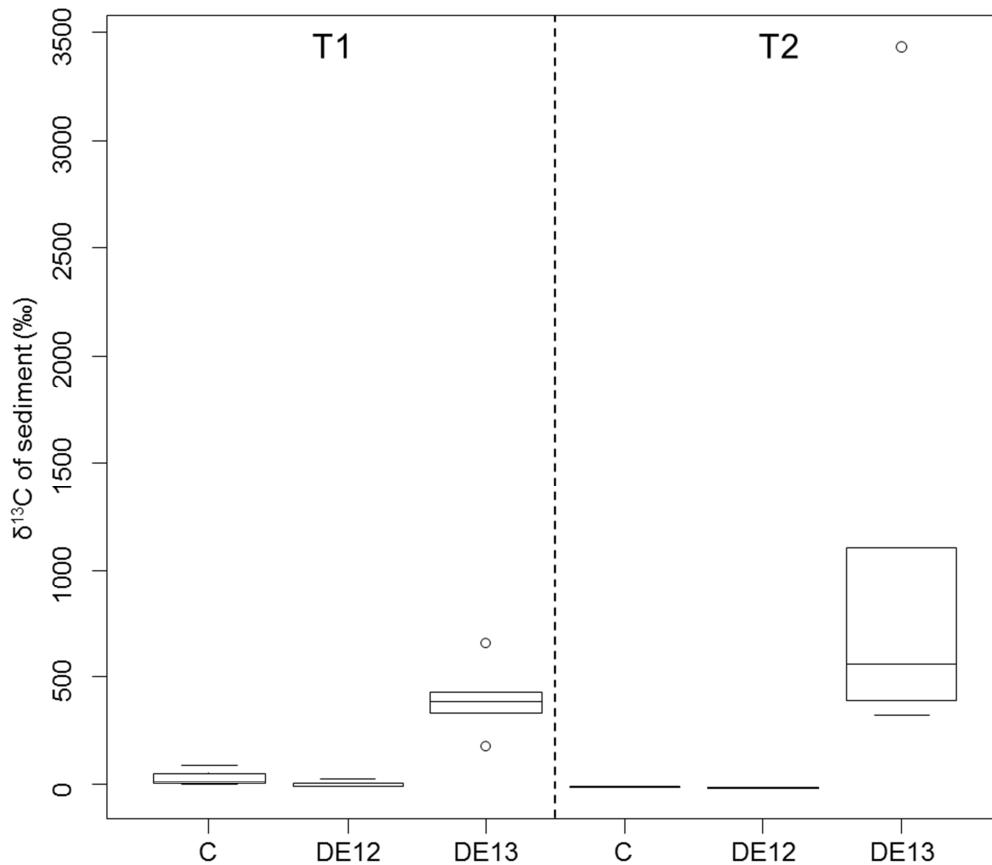


Fig. III.5 : composition isotopique ($\delta^{13}\text{C}$) du sédiment dans les microcosmes à T1 (15 j) et T2 (30 j). Les traitements étaient : C : contrôle ; DE : diatomées et EPS ; 12 : ^{12}C ; 13 : ^{13}C .

Fig. III.5: isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) of sediment in microcosms at T1 (15 d) and T2 (30 d). Treatments were: C: control; DE: diatoms and EPS; 12: ^{12}C ; 13: ^{13}C .

Des analyses isotopiques ont été réalisées sur un lyophilisat de la culture de diatomées ajoutée aux microcosmes. Les résultats montrent un fort enrichissement en ^{13}C , avec un $\delta^{13}\text{C}$ dépassant 3400 ‰, pour tous les échantillons analysés, contre un $\delta^{13}\text{C}$ négatif pour les échantillons DE12.

Les analyses isotopiques réalisées sur le sédiment montrent un fort enrichissement dans le sédiment des microcosmes DE13, dont le $\delta^{13}\text{C}$ était significativement plus fort que celui des deux autres traitements (Fig. III.5, test de KW, $p < 0,05$).

Notre protocole d'enrichissement du sédiment avec des diatomées et EPS marqués au ^{13}C a donc été efficace à cet égard.

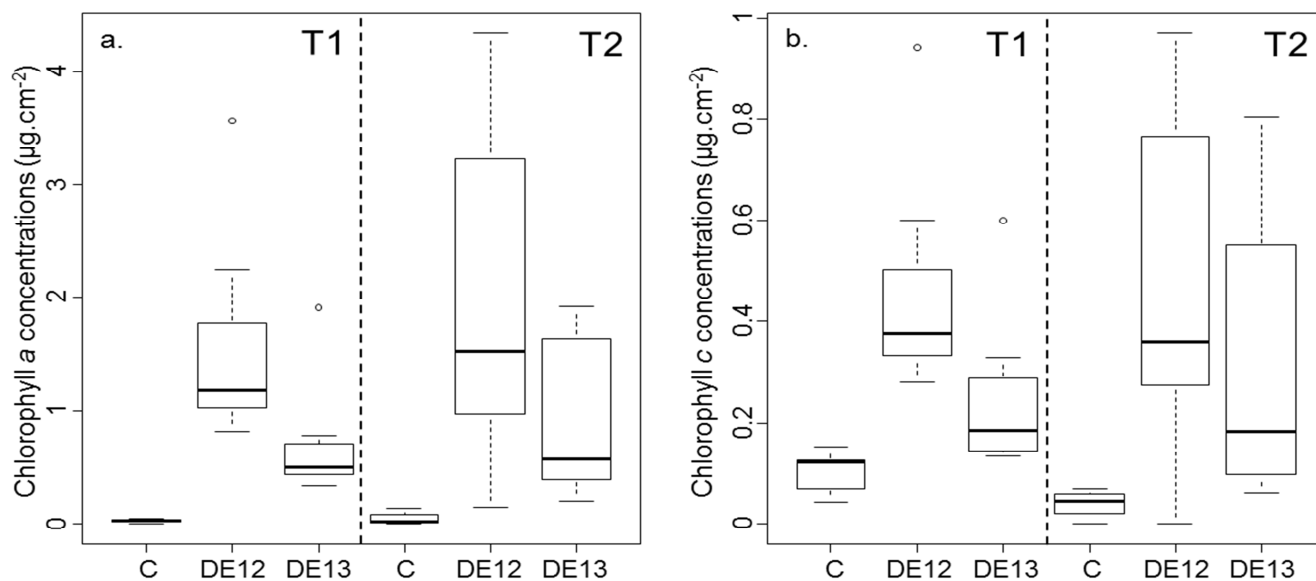


Fig. III.6 : évolution des concentrations en a. chlorophylle *a* et b. chlorophylle *c* au cours de l'expérience : à T1 (15 j) et T2 (30 j). Les traitements étaient : C : contrôle ; DE : diatomées et EPS ; 12 : ^{12}C ; 13 : ^{13}C .

Fig. III.6: evolution of a. chlorophyll *a* and b. chlorophyll *c* concentrations over the course of the experiment: at T1 (15 d) and T2 (30 d). Treatments were: C: control; DE: diatoms and EPS; 12: ^{12}C ; 13: ^{13}C .

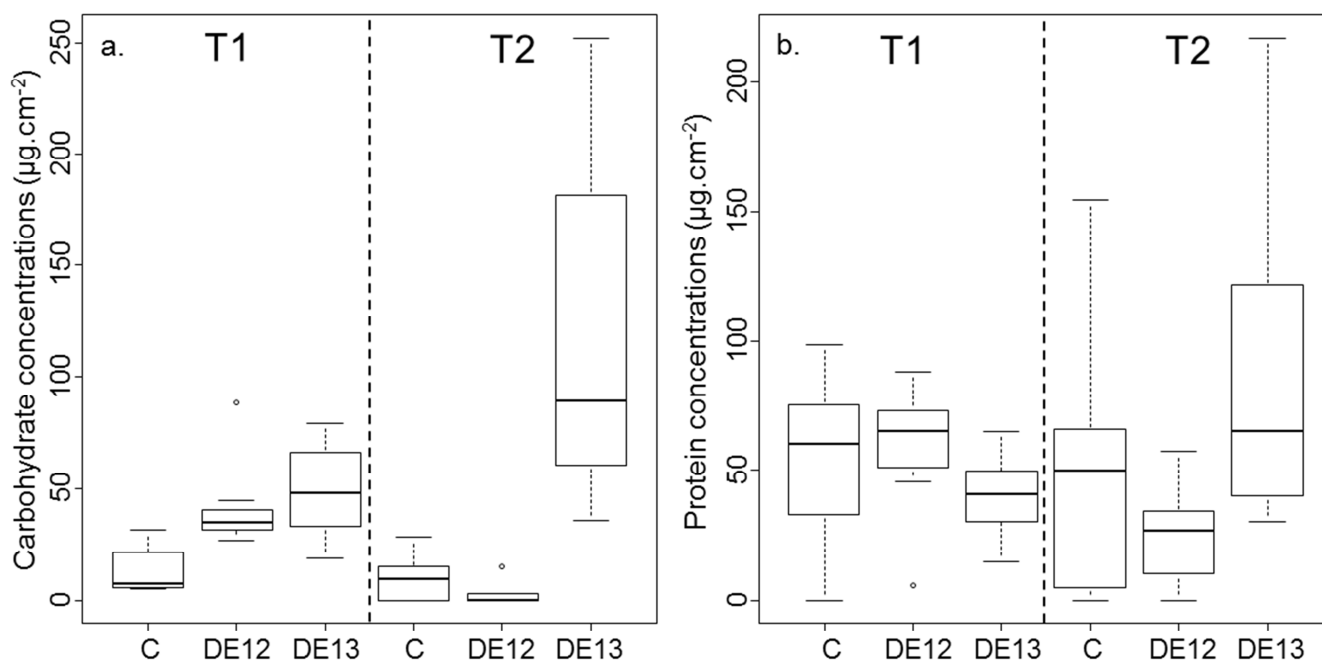


Fig. III.7 : évolution des concentrations en a. glucides et b. protéines au cours de l'expérience : à T1 (15 j) et à T2 (30 j). Les traitements étaient : C : contrôle ; DE : diatomées et EPS ; 12 : ^{12}C ; 13 : ^{13}C .

Fig. III.7: evolution of a. carbohydrate and b. protein concentrations over the course of the experiment: at T1 (15 d) and T2 (30 d). Treatments were: C: control; DE: diatoms and EPS; 12: ^{12}C ; 13: ^{13}C .

Analyses sur le sédiment

Les concentrations en chlorophylle *a* et *c* ont évolué de manière similaire au cours de l'expérience et selon les traitements (Fig. III.6). À T1 comme à T2, les concentrations étaient significativement différentes entre les traitements (tests de KW, $p < 0,01$). Elles étaient minimales dans les microcosmes C, et maximales dans les traitements DE12. À T1, les concentrations étaient significativement plus élevées dans les microcosmes DE12 que DE13 (test de Wilcoxon Mann Whitney avec correction de Holm-Bonferroni, $p < 0,05$), mais la différence n'était plus significative à la fin de l'expérience (test de Wilcoxon Mann Whitney avec correction de Holm-Bonferroni, $p > 0,05$).

À T1 et T2, les concentrations en glucides étaient significativement différentes entre les traitements (Fig. III.7.a, tests de KW, $p < 0,01$). À T1, elles étaient minimales dans le traitement C, intermédiaires dans DE12 et maximales dans DE13. À T2, elles étaient similaires dans les microcosmes C et DE12, et supérieures dans les DE13. Les concentrations en protéines ne montraient aucune variation significative, ni entre temps ni entre traitements (Fig. III.7.b, tests de KW, $p > 0,05$).

L'analyse de la composition en acides gras du sédiment a montré des différences entre temps et traitements (Fig. III.8, ANOSIM, résultats résumés dans la table III.1).

Table III.1: tableau récapitulatif des résultats de l'ANOSIM (10000 permutations) réalisée sur les compositions en acides gras du sédiment dans les microcosmes.

Table III.1: recap chart of results of ANOSIM (10000 permutations) performed on fatty acid composition of sediment in microcosms.

Facteur	R	p-value	Différences significatives
Temps	0,377	$p < 0,001$	T1 ≠ T2
Traitement	0,459	$p < 0,001$	C ≠ (DE12 DE13)

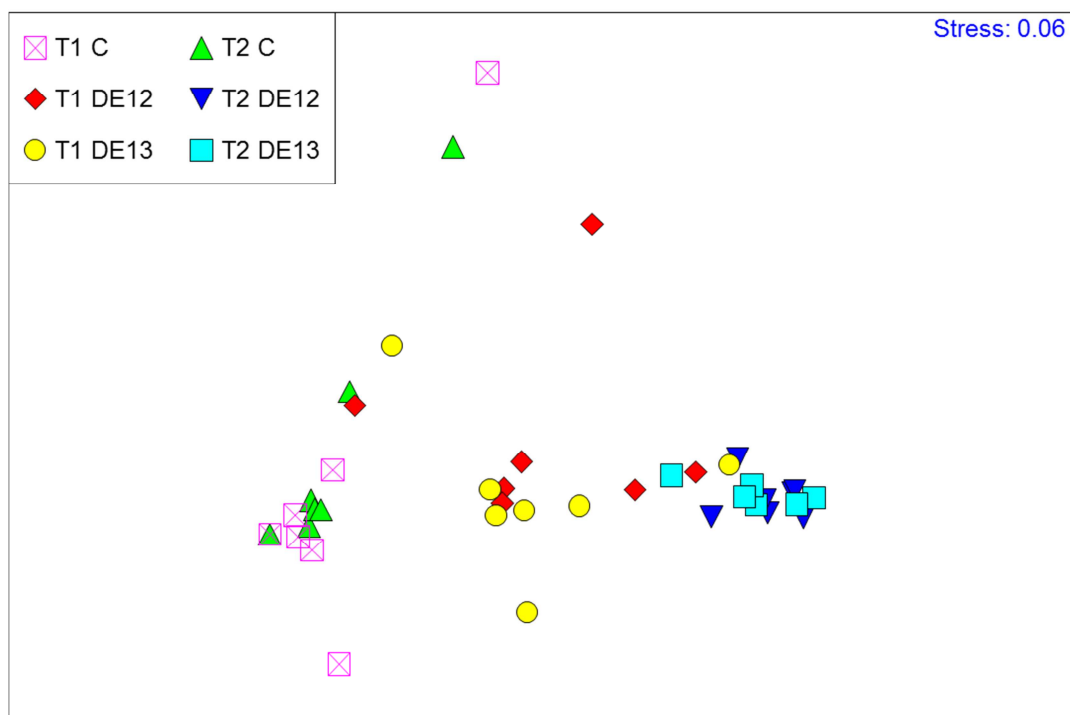


Fig. III.8 : nMDS montrant les différences de composition en acides gras dans les sédiments au cours du temps. Les traitements étaient : C : contrôle ; DE : diatomées et EPS ; 12 : ^{12}C ; 13 : ^{13}C .
 Fig. III.8: nMDS showing differences in FA composition of sediment over time and treatments. Treatments were: C: control; DE: diatoms and EPS; 12: ^{12}C ; 13: ^{13}C .

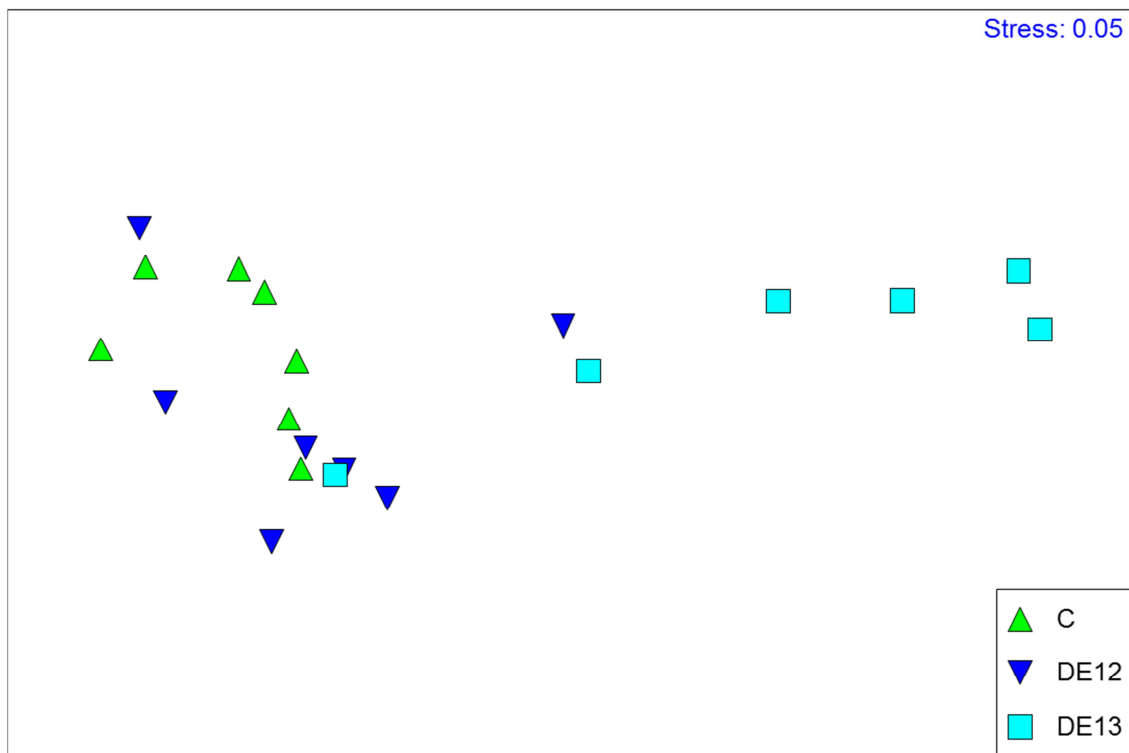


Fig. III.9 : nMDS montrant les différences de composition en acides gras des vers entre traitements.
 Fig. III.9: nMDS showing differences in FA composition of worms between treatments.

Des analyses SIMPER montrent que les acides gras saturés (12:0, 14:0, 16:0 et 18:0) et le monoinsaturé 16:1 ω 7 sont responsables de la majeure partie des dissimilarités entre temps et traitements. Les microcosmes C contenaient plus de 94 % d'acides gras saturés quel que soit le temps d'échantillonnage. Les prélèvements à T1 contenaient plus d'acides gras saturés et moins de 16:1 ω 7 que les prélèvements à T2.

*Analyses sur les vers *H. diversicolor**

L'analyse de la composition en acides gras des vers a montré des différences significatives entre traitements (Fig. III.9, ANOSIM à 10000 permutations, $R = 0,41$, $p < 0,001$). Les vers des traitements C et DE12 avaient des proportions d'acides gras similaires entre elles, mais différentes de celles des vers des microcosmes DE13. Des analyses SIMPER montrent que les acides gras responsables de ces dissimilarités sont le 16:0 et le 16:1 ω 7, en plus forte proportion chez les vers DE13, et le 20:5 ω 3 et le 22:5 ω 3, en plus forte proportion chez les vers C et DE12. Les proportions de 16:1 ω 7 étaient significativement plus fortes dans les vers DE13 que dans les autres (Fig. III.10.c ; test de KW, $p < 0,01$), tandis que les proportions de 20:5 ω 3 et de PUFA étaient plus faibles (Fig. III.10.a et b ; test de KW, $p < 0,05$). Cependant, il est intéressant de noter que les concentrations de 20:5 ω 3 et de polyinsaturés (PolyUnsaturated Fatty Acid, PUFA) étaient similaires entre les traitements. Dans le traitement DE13, 4 vers possédaient des proportions élevées de 16:1 ω 7 et basses de 20:5 ω 3 et de PUFA, tandis que les 2 autres montraient une composition en acides gras similaires à celle des vers des autres traitements.

Les $\delta^{13}\text{C}$ des vers étaient significativement différents entre traitements à la fin de l'expérience (Fig. III.11, test de KW, $p < 0,01$). Ils étaient similaires dans les traitements C et DE12 et bien plus forts dans le traitement DE13.

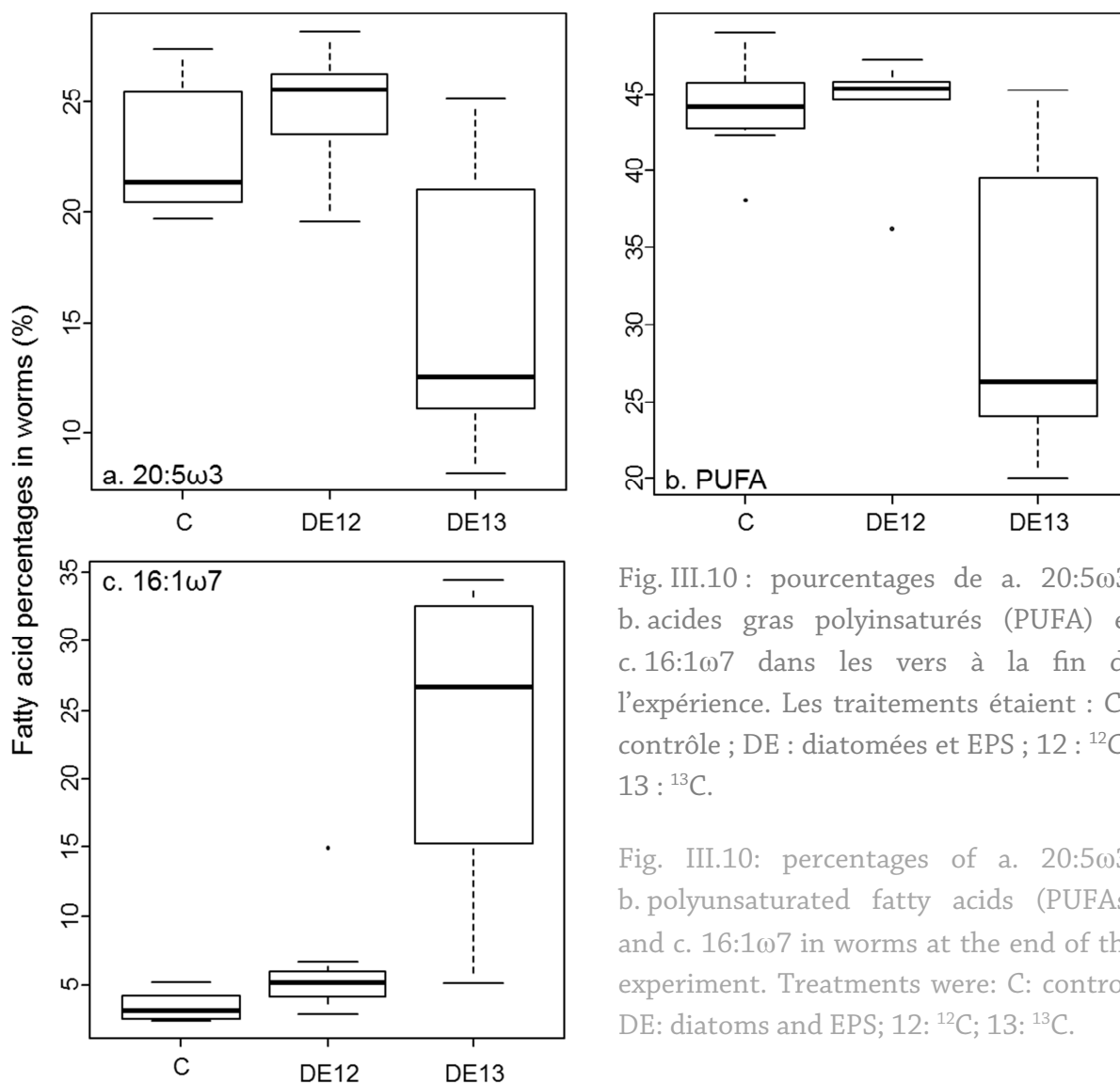
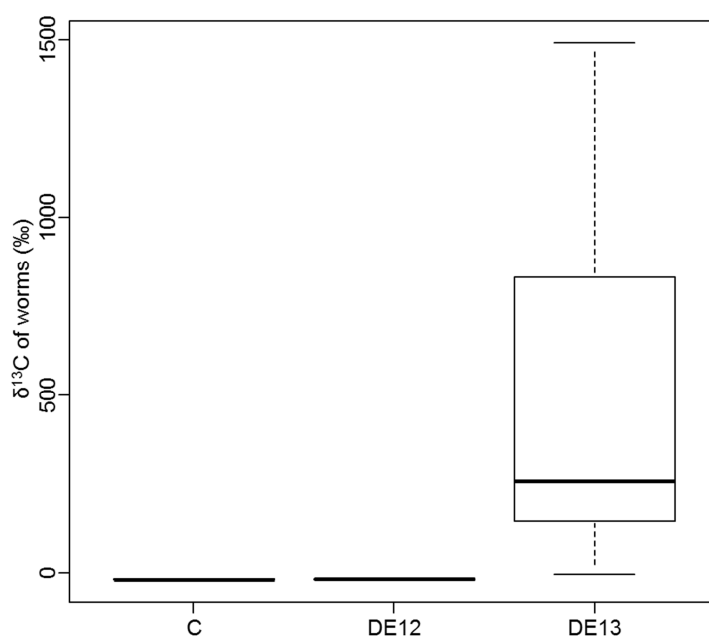


Fig. III.10 : pourcentages de a. 20:5 ω 3, b. acides gras polyinsaturés (PUFA) et c. 16:1 ω 7 dans les vers à la fin de l'expérience. Les traitements étaient : C : contrôle ; DE : diatomées et EPS ; 12 : ^{12}C ; 13 : ^{13}C .

Fig. III.10: percentages of a. 20:5 ω 3, b. polyunsaturated fatty acids (PUFAs) and c. 16:1 ω 7 in worms at the end of the experiment. Treatments were: C: control; DE: diatoms and EPS; 12: ^{12}C ; 13: ^{13}C .

Fig. III.11 : composition isotopique ($\delta^{13}\text{C}$) des vers dans les microcosmes à T2. Les traitements étaient : C : contrôle ; DE : diatomées et EPS ; 12 : ^{12}C ; 13 : ^{13}C .

Fig. III.11: isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) of worms in microcosms at T2. Treatments were: C: control; DE: diatoms and EPS; 12: ^{12}C ; 13: ^{13}C .



Les analyses de GC-IRMS ont permis de déterminer la composition isotopique des différents acides gras sur 2 échantillons de vers du traitement DE12, et 3 du traitement DE13 (Fig. III.12). Quel que soit l'acide gras considéré, le $\delta^{13}\text{C}$ était toujours supérieur pour les vers du traitement DE13 que pour ceux du traitement DE12. Les acides gras les plus enrichis en ^{13}C étaient les monoinsaturés 16:1 ω 7, 18:1 ω 5 et 18:1 ω 7 et les polyinsaturés 18:2 ω 6, 20:4 ω 6, 20:5 ω 3 et 22:6 ω 3.

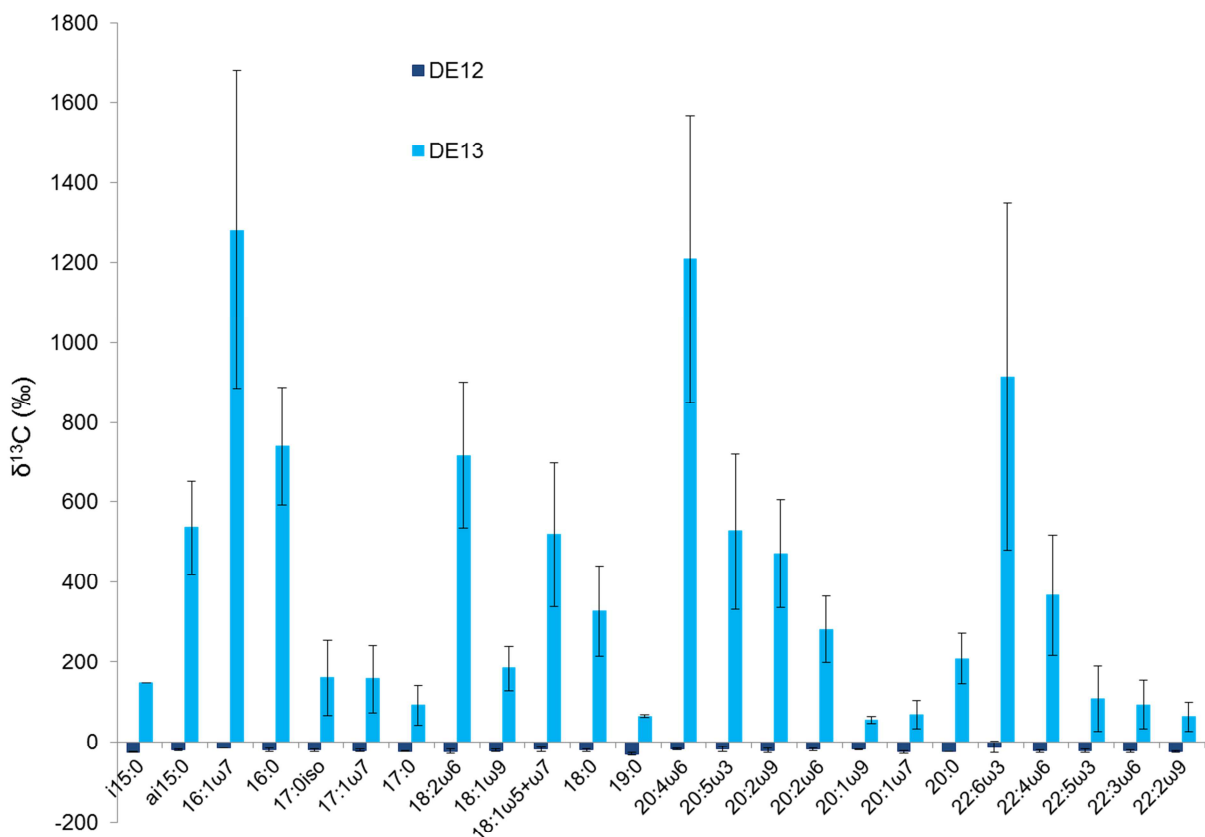


Fig. III.12 : $\delta^{13}\text{C}$ des différents acides gras des vers à la fin de l'expérience. i15:0 : 15:0iso. ai15:0 : 15:0anteiso.

Fig. III.12: $\delta^{13}\text{C}$ of different FAs of worms at the end of the experiment. i15:0 : 15:0iso. ai15:0 : 15:0anteiso.

DISCUSSION

Protocole expérimental

Cette expérience avait pour but de comparer l'assimilation d'EPS disponibles comme seule source alimentaire à l'assimilation d'un mélange de diatomées et d'EPS par les vers *H. diversicolor*. Or, les premières analyses de chlorophylle ont montré une contamination des traitements « EPS seuls » par des microalgues. Les données issues de ces traitements ont donc été exclues de l'analyse. Cependant, les traitements DE (contenant des diatomées et des EPS) ont permis une comparaison de l'assimilation des EPS ou des microorganismes.

Le protocole mis en place a permis d'enrichir le mélange diatomées-EPS en ^{13}C . La culture a poussé 10 j en présence de bicarbonate marqué avant le début de l'expérience ; cette période est considérée comme suffisante pour que les diatomées assimilent le carbone marqué dans leurs molécules (Oakes et al., 2010), en particulier dans leurs acides gras. De plus, plusieurs travaux ont montré que du carbone marqué (^{14}C ou ^{13}C) mis à la disposition des diatomées à la lumière passe rapidement dans les EPS (Smith & Underwood, 1998, Goto et al., 2001). On peut donc supposer qu'à la fois les diatomées et les EPS ont été marqués au ^{13}C .

Nos analyses sur le sédiment montrent que l'enrichissement a pu être maintenu dans le temps, les $\delta^{13}\text{C}$ étant similaires après 2 et 4 semaines d'expérience (Fig. III.5). Ceci peut s'expliquer par l'ajout régulier de diatomées marquées, mais aussi par la dégradation des diatomées ou des EPS par les bactéries, qui incorporent alors le marquage, et éventuellement sécrètent à leur tour des EPS marqués (Oakes et al., 2010).

Microphytobenthos

Les chlorophylles *a* et *c*, pigments principaux des diatomées (Jeffrey et al., 1997b), suivaient la même dynamique, montrant un développement des diatomées dans les microcosmes DE, et pas ou peu dans les microcosmes

contrôles. La culture enrichie en ^{13}C semble s'être développée plus lentement que la culture réalisée avec du bicarbonate non enrichi ; cependant, à la fin de l'expérience les concentrations étaient de nouveau similaires. De plus, quel que soit le temps d'échantillonnage, les compositions en acides gras des sédiments étaient similaires dans les traitements DE12 et DE13. Hormis la rapidité de développement, les cultures des traitements DE12 et DE13 semblent donc avoir eu une croissance similaire.

Le sédiment des microcosmes C n'a pas évolué au cours du temps ; il contenait essentiellement des acides gras saturés, marqueurs de matière organique dégradée (Sun et al., 1997, Lü et al., 2010, Balzano et al., 2011). Dans les autres microcosmes, le sédiment contenait d'autres acides gras en particulier monoinsaturés et polyinsaturés ; en particulier, le sédiment contenant une quantité importante de 16:1 ω 7 (jusqu'à 50 % des acides gras), marqueur de diatomées dans cet environnement (Dunstan et al., 1994, Arts & Wainman, 1999). La quantité de 16:1 ω 7 augmentait au cours du temps dans les microcosmes, alors que les concentrations en chlorophylles restaient identiques. Il semblerait donc que les diatomées produisent en premier lieu des pigments, puis après une période de photosynthèse synthétisent des acides gras membranaires, en particulier le 16:1 ω 7. Le 20:5 ω 3, autre marqueur de diatomées (Dunstan et al., 1994, Arts & Wainman, 1999), était également présent, en faible quantité, dans les microcosmes contenant ces microorganismes.

EPS

Les concentrations de protéines dans le sédiment n'ont pas varié significativement au cours du temps ou entre les traitements ; ceci est cohérent avec une production d'EPS réalisée essentiellement par les diatomées, dont les EPS sont riches en glucides et pauvres en protéines (Decho, 1990). La production de ces dernières dans les microcosmes pourrait avoir été réalisée par

les vers *H. diversicolor*, présents dans chaque microcosme. Leur mucus est en effet riche en protéines (Stabili et al., 2011).

Si les concentrations en protéines sont comparables entre microcosmes, les concentrations en glucides variaient significativement entre les traitements ; elles étaient supérieures dans les microcosmes contenant des diatomées à T1, ce qui est cohérent avec les données de chlorophylles et une production d'EPS par les diatomées. Cependant, à T2, les concentrations de glucides dans les microcosmes DE12 étaient similaires à celles observées dans les microcosmes C, et inférieures à celles des microcosmes DE13 : la concentration de glucides dans les microcosmes DE12 avait diminué. Il semblerait donc que dans ces microcosmes, les glucides aient été dégradés, suffisamment pour que leur concentration soit la même que dans les microcosmes contrôles. Ce n'est pas le cas des glucides marqués au ^{13}C .

Trois hypothèses, qui ne s'excluent pas mutuellement, peuvent expliquer ces différences. La première est que les diatomées, en présence de ^{13}C , ne produisent pas les mêmes polymères qu'en leur absence ; par exemple, la composition des glucides en monosaccharides, ou leur ramification, peut changer. Cependant, les rares données disponibles sur le sujet montrent des compositions en monosaccharides similaires entre EPS marqués et non marqués (Taylor et al., 2013). Une deuxième hypothèse est que les enzymes nécessaires à la dégradation des EPS sont affectées par la présence de ^{13}C : elles ne seraient pas capables de dégrader les EPS marqués au ^{13}C aussi efficacement que les EPS classiques. En effet, il a été démontré que, lorsque les diatomées produisent des glucides en utilisant du bicarbonate marqué au ^{13}C , elles n'intègrent pas le ^{13}C de la même manière dans tous les monosaccharides (Bellinger et al., 2009, Oakes et al., 2010). Cela montre que les enzymes métabolisant les glucides n'ont pas le même comportement vis-à-vis du ^{12}C et du ^{13}C .

Enfin, une troisième hypothèse concerne la dynamique même de la production d'EPS. En effet, il se peut que la dégradation soit la même dans les

deux traitements, mais que la production soit plus forte en présence de ^{13}C . Il se peut en effet que les deux populations n'aient pas la même dynamique de croissance, ce qui est de plus suggéré par les données de chlorophylles. Or, les assemblages de microorganismes ne produisent pas autant d'EPS dans les différentes phases de leur croissance (Decho, 1990, Underwood & Paterson, 2003), ce qui pourrait expliquer une différence de production d'EPS.

Finalement, il reste à savoir si ce sont les bactéries ou les vers qui sont responsables de la dégradation des EPS dans les microcosmes. Les analyses réalisées sur les vers peuvent permettre de répondre à cette question.

*Vers *H. diversicolor**

De manière surprenante, les compositions en acides gras des vers ayant jeûné pendant un mois (traitement C) et des vers nourris aux diatomées et EPS non marqués (traitement DE12) étaient similaires à la fin de l'expérience. Pourtant, les analyses de sédiment montrent l'absence presque totale d'acides gras insaturés dans le sédiment des microcosmes C, au contraire des microcosmes DE12, ainsi que des faibles quantités de chlorophylles et de glucides. Il semble donc que la consommation des diatomées par les vers DE12 a été trop faible pour affecter significativement la composition en acides gras de ces vers. En particulier, ces vers possédaient de très faibles pourcentages en 16:1 ω 7, marqueur de diatomées dans cet environnement. Ceci peut être lié à une activité de nutrition trop faible, ou aux EPS qui empêchent l'assimilation des diatomées par *H. diversicolor* (Decho, 1990, Decho & Moriarty, 1990).

Les vers *H. diversicolor* contiennent naturellement une grande quantité de 20:5 ω 3 et d'autres acides gras polyinsaturés, qu'ils trouvent dans leur alimentation et assimilent sans modification (Luis & Passos, 1995, Meziane et al., 1997). Ils sont capables, en cas de besoin, de synthétiser ces acides gras à partir d'autres (le 18:3 ω 3 et le 20:3 ω 3 pour le 20:5 ω 3), mais cette voie n'est pas privilégiée en conditions normales (Sargent et al., 1999, Sprecher, 2000,

Leonard et al., 2004). Les vers des microcosmes C, comme ceux des microcosmes DE12, présentaient des concentrations en acides gras polyinsaturés supérieures à 35 %, ce qui est révélateur de vers normalement nourris (Bradshaw et al., 1989, Luis & Passos, 1995, Meziane et al., 1997). Toutefois, l'abondance des acides gras insaturés, en particulier du 20:5 ω 3, dans les vers montre que ceux-ci ont peu souffert de ce jeûne.

Les vers des microcosmes DE13, en revanche, montraient des différences significatives de composition en acides gras par rapport aux vers des autres traitements. Ces différences étaient en particulier liées à 4 vers, qui présentaient des faibles proportions de 20:5 ω 3 et d'autres PUFA, ainsi qu'une forte abondance de 16:1 ω 7, marqueur de diatomées dans cet environnement. La forte augmentation du 16:1 ω 7 montre que ces vers du traitement DE13 ont, eux, consommé des diatomées. L'accumulation de cet acide gras dans les vers a fait baissé la proportion relative de 20:5 ω 3 et d'autres polyinsaturés, mais pas leur concentration : les vers ont accumulé des réserves. Les autres vers (deux autres vers de ce traitement, vers des autres traitements), en revanche, sont restés à l'état de jeûne. Les vers *H. diversicolor* sont capables de jeûner de manière prolongée, par exemple en hiver en conditions naturelles ; dans ce cas, la concentration totale de leurs acides gras peut baisser, mais tant que le ver est en bonne santé, les proportions relatives des acides gras sont maintenues. Les polyinsaturés en particulier ont un rôle important dans le maintien de la fluidité membranaire des annélides (Nozawa, 2011).

Les vers se divisent donc en deux groupes : certains ont jeûné alors que d'autres ont consommé des diatomées. Il est surprenant que les vers en présence de diatomées et d'EPS non marqués sont restés à jeun alors que certains en présence de diatomées et d'EPS marqués ont mangé. Ceci peut être lié à des différences de composition des assemblages de diatomées ou d'EPS, qui rendraient cette consommation plus aisée dans les traitements DE13. De plus, dans des conditions de stress, il a été montré que les organismes benthiques ont tendance à assimiler préférentiellement les molécules contenant les isotopes les

plus lourds (Mayor et al., 2011) ; ce phénomène pourrait expliquer en partie les différences observées.

Les analyses isotopiques montrent un fort enrichissement des vers en ^{13}C , avec un $\delta^{13}\text{C}$ pouvant atteindre, dans le traitement DE13, presque 1500 ‰. Ces analyses confirment une consommation des diatomées par *H. diversicolor* ; cependant, le ^{13}C passant également dans les EPS, il se peut que ce marquage soit lié, au moins en partie, à une consommation d'EPS marqués. Les résultats de GC-IRMS permettent de mieux caractériser la nutrition des vers.

La GC-IRMS permet de savoir quels sont les acides gras les plus marqués chez les vers. Étant donné que les EPS ne contiennent que peu de lipides, leur consommation ne peut pas être suivie par la présence d'un acide gras en particulier. En revanche, les résultats précédemment exposés ont montré que le 16:1 ω 7 permettait de tracer la consommation de diatomées par *H. diversicolor*. Si cet acide gras est préférentiellement marqué, cela signifie que les vers consomment directement des diatomées, et intègrent sans modification ces acides gras. Enfin, si la consommation des diatomées et/ou des EPS se fait via la dégradation bactérienne (les bactéries dégradent les microorganismes et leurs EPS puis sont consommées par les vers), on s'attend à ce que les acides gras marqueurs des bactéries hétérotrophes (acides gras ramifiés et 19:0 par exemple ; Arts & Wainman, 1999) soient fortement marqués.

Les résultats (Fig. III.12) montrent un très fort marquage du 16:1 ω 7, dont le $\delta^{13}\text{C}$ atteint en moyenne 1280 ± 400 ‰. C'est l'acide gras le plus marqué, et il représente chez les vers DE13 plus de 25 % des acides gras en moyenne ; ces résultats montrent donc un transfert massif de 16:1 ω 7 marqué des diatomées vers *H. diversicolor*. Le 16:1 ω 7 semble ainsi être assimilé sans modification. Le 22:6 ω 3 et le 20:4 ω 6 sont deux acides gras qui, comme le 20:5 ω 3, proviennent presque exclusivement de la nourriture des vers ; ils peuvent être synthétisés à partir du 18:2 ω 6 et du 20:2 ω 6 en cas de nécessité (Leonard et al., 2004). Tous ces acides gras étaient fortement marqués au ^{13}C ,

suggérant là-encore un transfert direct de ces acides gras des diatomées vers *H. diversicolor*. Ainsi, même si les proportions des acides gras polyinsaturés diminuent dans les vers des traitements DE13, ces acides gras ont tout de même été transmis directement des diatomées aux vers. De manière générale, les consommateurs sont généralement capables d'assimiler les acides gras polyinsaturés de manière préférentielle, avec une très grande efficacité (Mayor et al., 2011).

Les acides gras marqueurs de bactéries hétérotrophes (acides gras ramifiés et 19:0 par exemple ; Arts & Wainman, 1999) présentaient un $\delta^{13}\text{C}$ supérieur à celui des vers des microcosmes DE12, montrant que les bactéries, en dégradant les diatomées et leurs EPS, puis en étant consommées, permettaient le transfert d'une partie du ^{13}C des diatomées vers *H. diversicolor*. Cependant, ces acides gras étaient en faible proportion dans les vers, et moins marqués que les acides gras marqueurs des diatomées ; la dégradation bactérienne n'était donc pas la voie principale de transfert du carbone des microorganismes aux vers. Ce processus peut cependant, en commençant la dégradation des cellules et des EPS, favoriser leur consommation par les vers (Harvey & Luoma, 1984).

Enfin, il convient de noter que tous les acides gras des vers présentaient un $\delta^{13}\text{C}$ significativement supérieur dans le traitement DE13 par rapport aux autres traitements. Les molécules marquées au ^{13}C , qu'elles proviennent des diatomées, des bactéries ou des leurs EPS, étaient donc utilisées dans le métabolisme du vers. Les acides gras ne sont pas tous recyclés à la même vitesse, expliquant que certains, qui sont métabolisés rapidement, soient plus marqués que d'autres, dont le recyclage est plus lent.

Conclusion

En conclusion, nos résultats montrent un transfert important des acides gras de diatomées vers *H. diversicolor* ; les diatomées semblent donc constituer la principale source de nourriture des vers. Cependant, les résultats démontrent également une consommation de bactéries, qui en dégradant diatomées et EPS intègrent le marquage dans leurs acides gras, qui sont transmis aux vers lors de la consommation. Enfin, les résultats montrent l'assimilation de diverses molécules marquées au ^{13}C , qui est alors intégré dans le métabolisme des vers. La consommation des EPS par *H. diversicolor* n'est donc pas à exclure, même si le transfert de carbone semble se faire essentiellement via les diatomées.

Partie 2

DÉGRADATION DES EPS ET TRANSFERT DANS LES RÉSEAUX TROPHIQUES

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Obtention d'EPS marqués au ^{13}C

Une culture de bactéries a été mise en place à partir de vase prélevée à Dinard (Ille-et-Vilaine). Le sédiment a été mélangé à un volume équivalent d'eau de mer et le tout a été mis au bain à ultrasons (37 Khz) pendant 10 min afin de détacher les bactéries des particules. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3000 g pendant 10 min et le surnageant, contenant les bactéries, a été mis en culture avec du Nutrient Broth No 3 (Fluka), qui favorise le développement des microorganismes. La culture a été aérée en permanence par un bulleur et laissée à l'obscurité par 26 °C pendant un mois. Ceci a permis le développement d'une culture bactérienne dense.

Après cela, deux flasques de 300 ml de solution de bactéries ont été enrichies par 250 mg de glucose. Pour la première flasque, c'est du glucose non marqué qui a été utilisé (formé de ^{12}C) ; pour la deuxième, il s'agit de glucose dont 99 % des carbones étaient des ^{13}C (Fig. III.13). Deux ajouts de glucose ont été réalisés, à une semaine d'intervalle. Cette durée est largement suffisante pour que le ^{13}C soit intégré aux EPS, puisque une incorporation de ^{14}C dans les EPS a pu être démontrée en 5 j chez les bactéries (Harvey & Luoma, 1984).

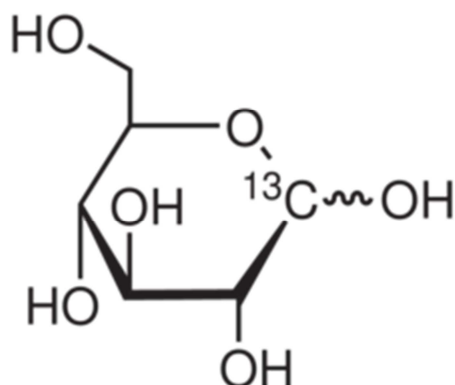


Fig. III.13 : représentation schématique du glucose avec du ^{13}C à la place de l'isotope le plus commun, le ^{12}C .

Fig. III.13: schematic view of glucose with ^{13}C instead of the common ^{12}C .

Après deux semaines d'enrichissement en glucose, les EPS ont été extraits (Fig. III.14). Pour cela, les 300 ml de culture ont d'abord été passés au bain à ultrasons, puis ils ont été répartis en tubes de 50 ml. Ces tubes ont été mis à rouler à l'horizontal pendant 1 h avec de la résine Dowex Marathon C (forme

Pour chaque traitement, 50 ml d'eau de mer autoclavée ont alors été ajoutés à un tube contenant tous les culots de centrifugation ainsi que les filtres. De la résine a été ajoutée, et une nouvelle extraction a été réalisée selon le même protocole.

Les EPS issus des deux extractions ont été regroupés par traitement et conservés à -25 °C.

Dispositif expérimental

On utilise des microcosmes de taille 14 × 14 × 6 cm, dans lesquels on ajoute 190 ± 5 g de sable stérilisé (brûlé 5 h à 550 °C) et 400 ml d'eau de mer autoclavée. Un ver, à jeun depuis 3 jours afin que son intestin soit vide, est ajouté dans chaque microcosme. Chaque jour, le microcosme est complété avec de l'eau distillée autoclavée.

Trois traitements ont été mis en place, avec 5 réplicats par traitement :

- traitement contrôle (C) : les bacs contrôles sont chaque jour complétés avec de l'eau contenant des antibiotiques (streptomycine : 150 mg·l⁻¹ et chloramphénicol : 240 mg·l⁻¹) ;
- traitement ¹²C : chaque semaine, 50 mg d'EPS non marqués au ¹³C ont été ajoutés dans chaque bac ;
- traitement ¹³C : chaque semaine, 50 mg d'EPS marqués au ¹³C ont été ajoutés dans chaque bac.

Prélèvements

L'expérience a duré 4 semaines, avec un ajout d'EPS chaque semaine. Le premier prélèvement a eu lieu après 2 semaines d'expérience, avant le troisième ajout d'EPS (T1), et un autre prélèvement a eu lieu à la fin de l'expérience (T2). À chaque prélèvement, 4 carottes (1,2 cm de diamètre, 1 cm de profondeur) ont été réalisées et immédiatement congelées à l'azote liquide. Ces carottes ont servi au dosage des EPS, à l'analyse de la composition en monosaccharides des sucres,

à l'analyse des acides gras et des compositions isotopiques. Ces analyses ont été réalisées selon les protocoles décrits au chapitre I.

À la fin de l'expérience, les vers ont été récupérés et immédiatement congelés à l'azote liquide. Ils ont ensuite été lyophilisés. 1 mg de chair a été utilisé pour l'analyse des compositions isotopiques, et le reste du ver a été utilisé pour l'extraction des acides gras. Les analyses ont été réalisées selon les protocoles décrits au chapitre I.

Statistiques

Afin de déterminer si des concentrations avaient varié significativement au cours du temps dans le sédiment, des tests de Friedman ont été utilisés, en considérant les données provenant d'un même microcosme comme appariées.

Des tests de Kruskal-Wallis (KW) ont permis d'estimer si les concentrations étaient significativement différentes entre traitements. Quand les différences étaient significatives, des tests de Wilcoxon Mann-Whitney ont été réalisés pour déterminer quels étaient les traitements différents deux à deux. La correction de Holm-Bonferroni a été utilisée pour ces comparaisons multiples.

Pour comparer les compositions en acides gras entre temps et traitements, un tableau de distance a été construit en utilisant la distance de Bray Curtis sur des données standardisées. Une nMDS a alors été tracée à partir de ce tableau (200 itérations). Une ANOSIM a permis de déterminer si des différences significatives existaient entre les traitements. Une analyse SIMPER a finalement permis d'identifier les acides gras responsables du plus de dissimilarité entre traitements.

RÉSULTATS

Analyses dans le sédiment

Les concentrations en EPS dans le sédiment augmentaient au cours du temps (Fig. III.15, tests de Friedman, $p < 0,01$) mais, à chaque temps, étaient similaires entre traitements (tests de KW, $p > 0,05$).

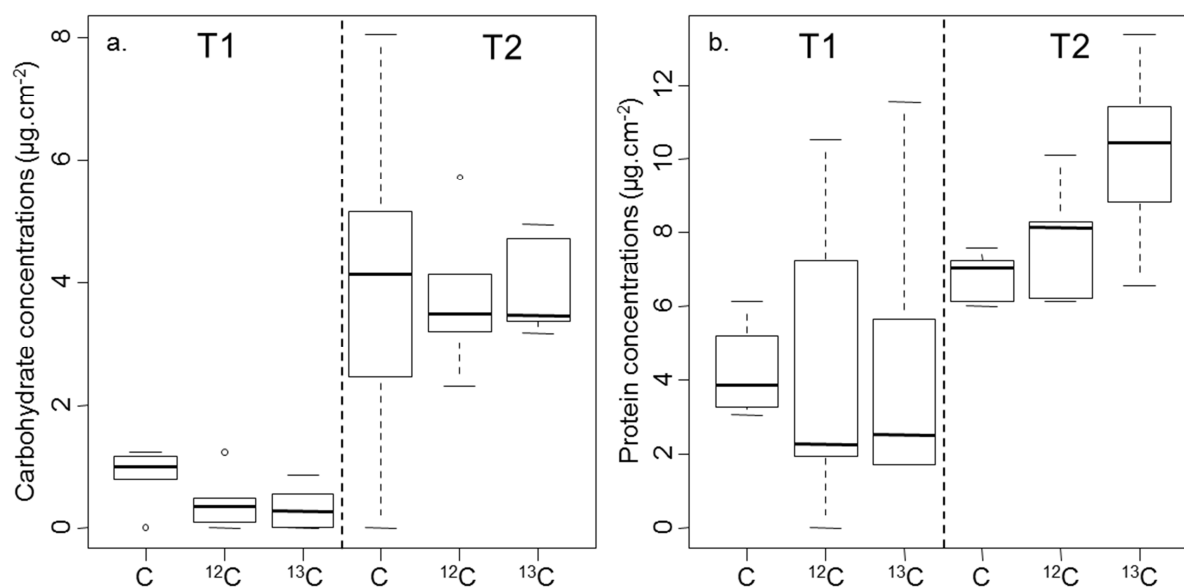


Fig. III.15 : concentrations en EPS dans le sédiment au cours de l'expérience : a. concentration en glucides ; b. concentration en protéines. T1 : 2 semaines après le début de l'expérience. T2 : 4 semaines, fin de l'expérience. Traitement C : contrôle.

Fig. III.15: EPS concentrations in sediment over the course of the experiment: a. carbohydrate concentration; b. protein concentration. T1: 2 weeks after the beginning of the experiment; T2: 4 weeks, end of the experiment. Treatment C: control.

Les $\delta^{13}\text{C}$ du sédiment étaient différents entre traitements à chaque temps d'échantillonnage (Fig. III.16, tests de KW, $p < 0,05$) : ils étaient similaires pour les traitements C et ^{12}C et supérieurs pour le traitement ^{13}C . Pour le traitement ^{13}C , le $\delta^{13}\text{C}$ augmentait significativement au cours de l'expérience (test de Friedman, $p < 0,05$).

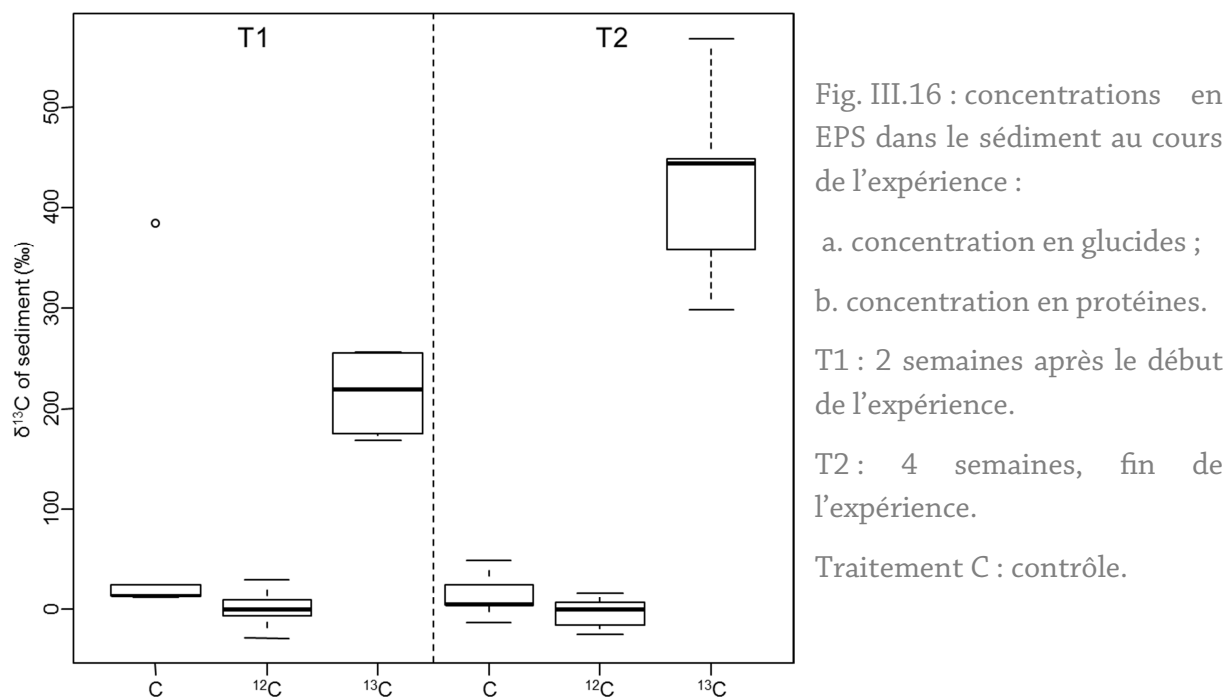


Fig. III.16: EPS concentrations in sediment over the course of the experiment: a. carbohydrate concentration; b. protein concentration. T1: 2 weeks after the beginning of the experiment; T2: 4 weeks, end of the experiment. Treatment C: control.

La composition moyenne des échantillons d'EPS en monosaccharides est présentée sur la Fig. III.17. Le rhamnose, le glucose et le mannose étaient abondants dans tous les échantillons. Les poudres d'EPS ajoutées dans les traitements ^{12}C et ^{13}C avaient des compositions en sucres similaires et ont donc été regroupées pour l'analyse graphique. La nMDS (Fig. III.18) montre que cette poudre avait une composition en monosaccharides très homogène, et différente de celle des échantillons de sédiment ; elle contenait beaucoup de rhamnose et moins de glucose par rapport aux échantillons de sédiment. La composition du sédiment en sucres évoluait significativement au cours du temps (ANOSIM à 10000 permutations, $R = 0,369$, $p < 0,001$, $T0 \neq T1 \neq T2$). À T2, la composition des EPS colloïdaux en sucres était significativement différente entre les traitements (ANOSIM à 10000 permutations, $R = 0,281$, $p < 0,05$, $C \neq (^{12}\text{C } ^{13}\text{C})$). Une analyse SIMPER montre que les monosaccharides expliquant le plus de dissimilarité entre les microcosmes C et les ^{12}C et ^{13}C étaient le glucose et le rhamnose, plus présents dans les microcosmes C, et le xylose et le mannose, plus abondants dans les autres microcosmes.

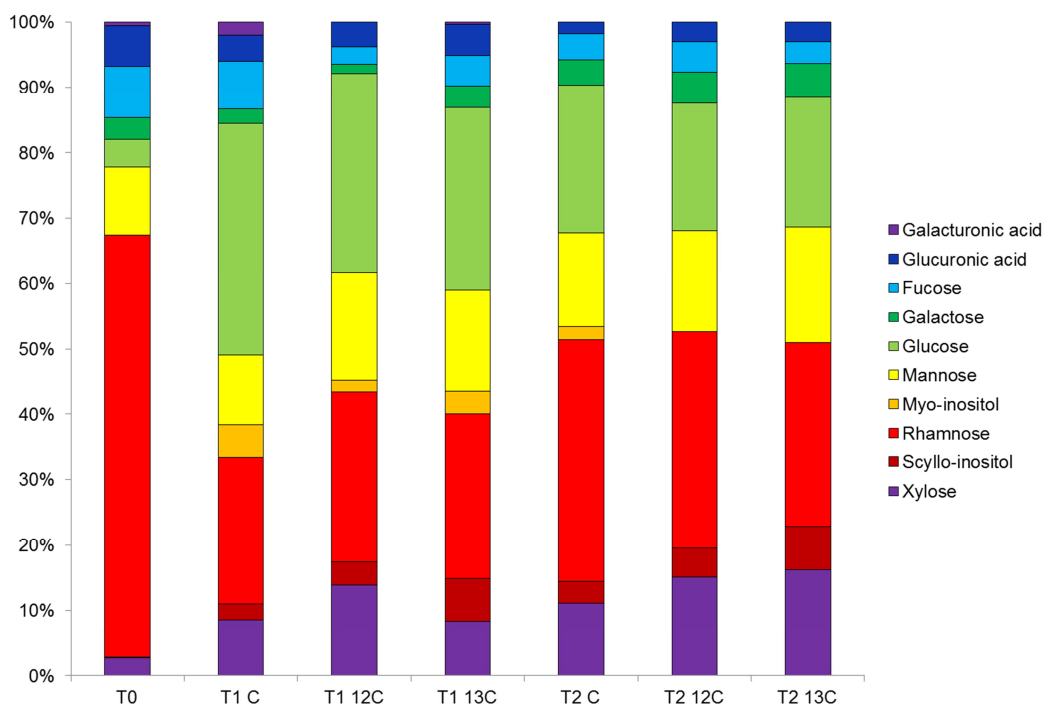


Fig. III.17 : composition en monosaccharides des glucides des EPS au cours de l'expérience. Noter que le « T0 » représente la poudre d'EPS qui a été utilisée pour enrichir les traitements ^{12}C et ^{13}C . Les autres échantillons ont été extraits du sédiment à T1 (2 semaines) et T2 (4 semaines). Les traitements étaient : C : contrôle ; 12C, ^{12}C ; 13C, ^{13}C .

Fig. III.17: sugar composition of EPS carbohydrates over the course of the experiment. Note that « T0 » refers to the EPS powder that was used to enrich ^{12}C and ^{13}C treatments. Other samples are extracted from sediment at T1 (2 weeks) and T2 (4 weeks). Treatments were: C, control; 12C, ^{12}C ; 13C, ^{13}C .

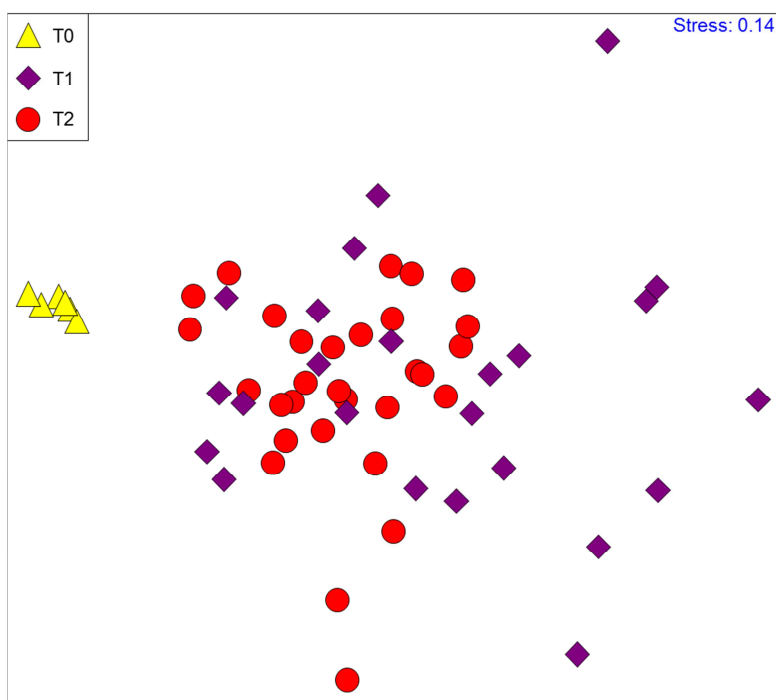


Fig. III.18 : nMDS montrant l'évolution de la composition en monosaccharides des EPS au cours de l'expérience.

Fig. III.18: nMDS showing evolution of sugar composition of EPS carbohydrates over the course of the experiment.

La composition du sédiment en acides gras ne montrait pas de différences entre les traitements (test de KW, $p > 0,05$). Les acides gras saturés représentaient plus de 80 % des acides gras dans tous les échantillons, et les acides gras ramifiés moins de 1 %.

Analyses sur les vers *H. diversicolor*

Les compositions isotopiques des vers variaient significativement entre traitements à la fin de l'expérience (Fig. III.19, test de KW, $p < 0,01$). Le $\delta^{13}\text{C}$ était significativement plus fort dans le traitement ^{13}C par rapport aux autres traitements (test de Wilcoxon Mann Whitney avec correction de Holm-Bonferroni, $p < 0,05$).

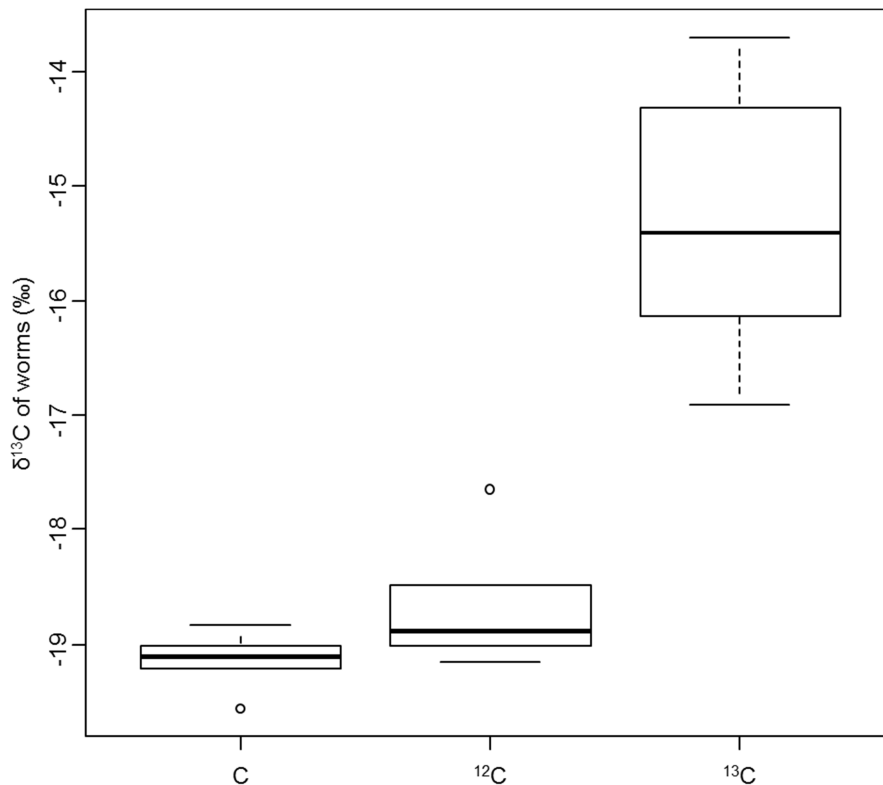


Fig. III.19: composition isotopique ($\delta^{13}\text{C}$) des vers dans les microcosmes à la fin de l'expérience (T2). Traitement C : contrôle.

Fig. III.19: isotope composition ($\delta^{13}\text{C}$) of worms in microcosms at the end of the experiment (T2). Treatment C: control.

La composition des vers en acides gras ne variait pas significativement entre les traitements à la fin de l'expérience (Fig. III.20, ANOSIM à 10000 permutations, $R = 0,135$, $p > 0,05$). Les acides gras polyinsaturés constituaient plus de 37 % des acides gras dans tous les vers.

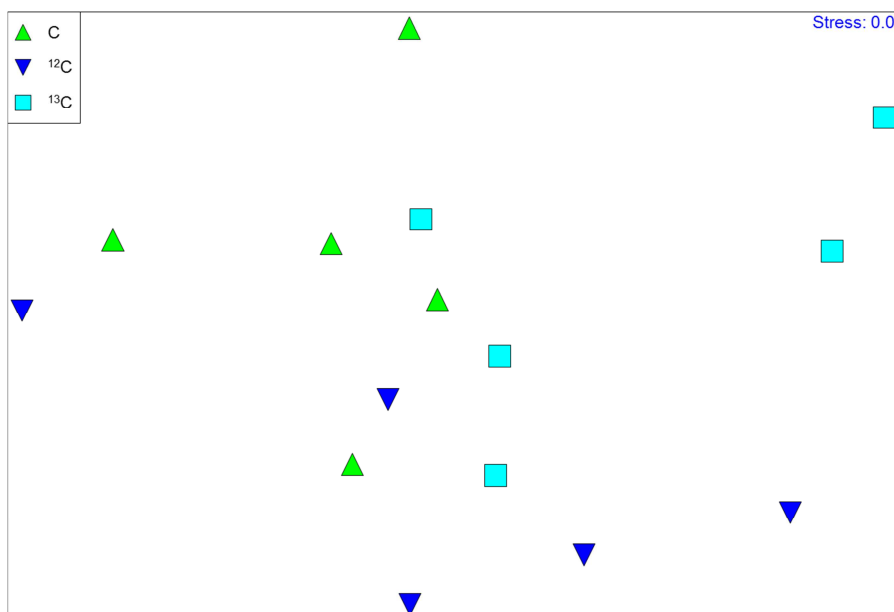


Fig. III.20 : nMDS montrant les différences de composition en acides gras des vers entre traitements à la fin de l'expérience. Traitement C: contrôle.

Fig. III.20: nMDS showing differences in FA composition of worms between treatments at the end of the experiment. Treatment C: control.

La composition isotopique des différents acides gras a été analysée par GC-IRMS sur un petit nombre d'échantillons. Les $\delta^{13}\text{C}$ variaient selon les acides gras, mais de manière similaire entre les traitements. Pour le 20:5 ω 3, les $\delta^{13}\text{C}$ étaient significativement différents entre les traitements (test de KW, $p < 0,01$): ils étaient inférieurs dans le traitement ^{13}C comparé aux autres traitements.

DISCUSSION

Protocole expérimental

Afin d'évaluer la consommation directe d'EPS par les vers, un protocole a été mis en place pour apporter au sédiment des EPS sans les microorganismes associés. Les étapes de filtration (membrane de 0,2 μm) et de lyophilisation ont permis de limiter au maximum l'apport de microorganismes marqués. Les analyses de la composition en acides gras du sédiment, qui montrent un sédiment composé essentiellement de matière organique dégradée (contenant plus de 80 % d'acides gras saturés ; Sun et al., 1997, Lü et al., 2010, Balzano et al., 2011) et contenant peu de bactéries (moins de 1 % d'acides gras ramifiés ; Arts & Wainman, 1999), confirment que l'apport de microorganismes dans les microcosmes était faible.

Cependant, les concentrations en EPS dans le sédiment à T1 et à T2 étaient très faibles (un ordre de grandeur de moins que dans l'expérience précédente) et ne variaient pas significativement entre traitements. Notre apport d'EPS ne semblait donc pas suffisant pour augmenter significativement les concentrations en EPS dans le sédiment. Les EPS présents dans les microcosmes semblent donc provenir essentiellement d'*H. diversicolor*, seul producteur présent. Pourtant, étant donnée la quantité d'EPS ajoutée (4 fois 50 mg) et la surface de sédiment du microcosme (196 cm^2), une augmentation de la concentration du sédiment en EPS semble possible. Il se peut que les EPS soient restés essentiellement dissous dans l'eau ; une autre hypothèse est que les vers ont consommé une grande partie des EPS déposés, si bien que les concentrations dans les traitements avec EPS ne différaient pas des concentrations dans les microcosmes contrôle. De plus, les quantités observées sont très faibles par rapport aux concentrations naturelles (environ 10 fois plus fortes en hiver sur l'archipel de Chausey, cf chapitre II Fig. II.13). Les résultats de cette partie seront donc à manipuler avec précaution.

Malgré ces faibles concentrations en EPS, le sédiment des microcosmes était enrichi en ^{13}C , montrant qu'une partie au moins des EPS s'est déposé et

accumulé dans le sédiment. Dans le traitement ^{13}C , le $\delta^{13}\text{C}$ du sédiment était en effet significativement plus élevé que dans les autres traitements, et il augmentait entre les deux temps de prélèvements, pour atteindre 400 ‰ à la fin de l'expérience (Fig. III.16). Notre protocole a donc permis d'enrichir le sédiment en ^{13}C , malgré les faibles concentrations en EPS observées.

Évolution de la composition des EPS

Les poudres d'EPS utilisées pour enrichir les microcosmes ^{12}C et ^{13}C avaient des compositions similaires, ce qui suggère que la présence de ^{13}C dans le glucose n'a pas affecté le développement bactérien. La communauté cultivée produisait des sucres riches en rhamnose (plus de 60 % des monosaccharides), mannose et fucose, et pauvres en glucose (moins de 10 %). La richesse de ces EPS en rhamnose et fucose est cohérente avec une production bactérienne (Marchand et al., 2005). Cette composition peut aussi être expliquée par une dégradation sélective des EPS produits, le glucose étant en effet plus facilement dégradé et assimilé que les desoxy-monosaccharides que sont le rhamnose et le fucose (Bellinger et al., 2009).

Les analyses de la composition en monosaccharides du sédiment montrent que la composition des glucides a varié au cours du temps dans les microcosmes. La composition des glucides dans les microcosmes était différente de celle de la poudre d'EPS utilisée pour enrichir les traitements ^{12}C et ^{13}C . De plus, aucune différence de composition entre traitements n'était observée à T1. Ces deux observations confirment que les EPS présents dans les microcosmes à T1 proviennent essentiellement des vers. Ceux-ci sont plus riches en glucose que les EPS bactériens.

Cependant, à T2, les EPS colloïdaux montraient des différences entre traitements : les EPS des microcosmes enrichis présentaient une composition différente de celle des microcosmes contrôles, avec en particulier moins de rhamnose et de glucose, et plus de xylose et de mannose (Fig. III.15). Même si la concentration en EPS n'augmentait pas dans ces microcosmes, la composition

est ainsi modifiée. Des EPS se sont donc déposés dans le sédiment, où ils ont pu être dégradés ou assimilés par les vers. La composition observée résulterait donc d'une interaction entre mucus des vers, EPS ajoutés et processus sélectifs de dégradation et d'accumulation.

Transfert des EPS

La composition en acides gras des vers ne variait pas significativement entre traitements : les vers en présence d'EPS avaient la même composition que les vers à jeun depuis un mois. Malgré ceci, tous les vers montraient des pourcentages d'acides gras polyinsaturés proches de 40 %, montrant qu'ils étaient en bonne santé, et non affectés par le jeûne (Bradshaw et al., 1989, Luis & Passos, 1995, Meziane et al., 1997).

Au contraire de la composition en acides gras, l'analyse de la composition isotopique des vers montre un enrichissement en ^{13}C significatif dans les microcosmes ^{13}C . Cependant, cet enrichissement est faible (environ 4 ‰), bien inférieur aux 1500 ‰ observés dans l'expérience précédente avec des microorganismes marqués. Ceci révèle une faible consommation des EPS par *H.diversicolor*, ce qui confirme les résultats obtenus avec les acides gras. Cette faible consommation peut être liée à la difficulté, pour les vers, d'assimiler les EPS, faute par exemple de posséder les enzymes nécessaires (Harvey & Luoma, 1984), ainsi qu'à la faible concentration des EPS dans les sédiments. De plus, il a été montré que des organismes vivant en présence d'EPS marqués intègrent parfois une partie du marquage, même en l'absence de consommation (Baird & Thistle, 1986). Il se peut donc que le faible marquage des vers ne soit pas lié à une consommation des EPS.

De manière surprenante, le 20:5 ω 3 des vers dans les microcosmes ^{13}C était appauvri en ^{13}C (d'environ 10 ‰) par rapport aux vers des autres traitements. Les raisons de cet appauvrissement sont peu claires. Les acides gras polyinsaturés sont souvent assimilés préférentiellement à d'autres nutriments,

mais certains organismes semblent capables de moduler cette absorption selon la composition isotopique des nutriments. Par exemple, Mayor et al. (2011) ont montré que certains copépodes prélèvent préférentiellement, ou retiennent plus, les composés riches en l'isotope le plus lourd dans des conditions défavorables. Il est possible que les vers *H. diversicolor*, en présence d'une grande quantité de ^{13}C , dégradent ou excrètent préférentiellement les acides gras contenant du ^{13}C ; ceci expliquerait l'appauvrissement observé. Une autre hypothèse peut être proposée en s'appuyant sur les résultats d'Abraham et al. (1998) : ces auteurs ont démontré qu'il existait un fractionnement isotopique entre la source trophique et les acides gras de son consommateur, et que ce fractionnement dépend de la nature chimique de la source. Par exemple, les acides gras d'un consommateur se nourrissant de glucose ayant un $\delta^{13}\text{C}$ donné n'auront pas la même composition isotopique que ceux d'un consommateur se nourrissant de mannose ayant le même $\delta^{13}\text{C}$. Les EPS des traitements DE12 et DE13 n'avaient pas la même composition (au moins à T2), ce qui pourrait expliquer la différence de $\delta^{13}\text{C}$ observée chez les vers.

D'autres organismes benthiques sont connus pour leur faible assimilation des EPS. C'est le cas par exemple de *Macoma balthica*, qui ne semble pas posséder les enzymes nécessaires à l'assimilation des EPS (Harvey & Luoma, 1984). En revanche, ces organismes sont capables de se nourrir de bactéries dégradant les EPS et les utilisant comme source de nutriments. Les bactéries sont en effet capables de dégrader efficacement les EPS, si bien que 50 % du carbone fixé par le microphytobenthos peut être transféré en moins de 24 h aux bactéries (Cook et al., 2007, Bellinger et al., 2009). D'autres organismes sont capables d'utiliser directement les EPS, comme les holothuries (Baird & Thistle, 1986), les copépodes (Decho & Moriarty, 1990) ou les ophiures (Hoskins et al., 2003). Ces dernières sont capables d'assimiler les EPS avec une très grande efficacité, qu'ils proviennent de bactéries ou de microalgues.

Conclusion

Les résultats de cette étude montrent une faible consommation d'EPS par les vers *H. diversicolor*, ce qui est cohérent avec les résultats de la partie précédente montrant une consommation plus importante des microorganismes que des EPS. Cependant, ces résultats sont à manipuler avec précaution, car les concentrations d'EPS observées étaient très faibles par rapport aux concentrations naturelles ; en présence de plus d'EPS, un transfert plus conséquent aurait peut-être été observé. Malgré cette faible consommation, il apparaît que ces vers sont capables de modifier la composition des EPS dans le sédiment, via une assimilation ou dégradation sélective, et ainsi potentiellement d'affecter les propriétés du réseau d'EPS, ce qui peut avoir des conséquences sur le fonctionnement du biofilm et son rôle dans l'écosystème.

Le chapitre suivant s'intéresse plus en détail aux effets des consommateurs sur la production d'EPS, et à l'influence combinée des microorganismes et des consommateurs sur la stabilité du sédiment.

Chapitre IV

Production d'EPS et
stabilité du sédiment

ABSTRACT

In intertidal soft-bottom areas, sediment stability is one of the crucial parameters modulating the abundance and composition of benthic assemblages. It is dependent on a wide range of variables, one of them being the EPS content of the sediment. The objective of this chapter is to examine how consumers modify EPS production by microorganisms, and how the association of microorganisms with their consumers influences sediment stability. In this purpose, two experimental studies in controlled microcosms were settled. The first one investigated the influence of bacterivorous nematodes on bacterial proliferation and on their EPS production; this study also assessed whether quorum sensing (QS) molecules are involved in these processes. Results showed that meiofauna stimulated bacterial proliferation, but not EPS production. This last one seemed indeed to be modulated by QS molecules. The second study analysed how the ragworms *Hediste diversicolor* interact with microphytobenthos to alter sediment stability. Sediment stability was therefore maximal when both microphytobenthos and *H. diversicolor* were cultured together. Maximal stability was due to microphytobenthos proliferation, which was stimulated by macrofaunal feeding activity, which also favoured EPS production. Therefore, EPS production by microorganisms seems to be governed by both microorganisms, through their production of QS compound, and their biotic environment, particularly the presence of consumers. These parameters are likely to interact one with each other, so that EPS production by microorganisms can be finely fitted to their needs and their environmental conditions. Finally, this study stresses the need of studies at different scales (microbes, meiofauna, macrofauna, environment), which allow a better characterisation of factors controlling EPS production.

RÉSUMÉ

Dans les zones intertidales, la stabilité du sédiment est un des paramètres déterminant l'abondance et la composition des assemblages benthiques. Or, cette stabilité dépend de nombreux facteurs, dont le contenu en EPS du sédiment. Le but de ce chapitre est d'évaluer comment les consommateurs des microorganismes affectent leur production d'EPS, et quelle influence l'association de microorganismes et de leurs consommateurs peut avoir sur la stabilité du sédiment. Pour cela, deux expériences en milieu contrôlé ont été mises en place. La première a décrypté l'influence de nématodes bactéricivores sur la prolifération bactérienne et la production d'EPS ; elle a évalué dans quelle mesure cette influence mettait en jeu les composés du quorum sensing (QS). Cette expérience a montré que la prolifération bactérienne est stimulée en présence de méiofaune, mais que la production d'EPS ne varie pas. Cette dernière semble en effet modulée par les molécules du QS. La deuxième expérience a analysé la manière dont les vers marins *Hediste diversicolor* interagissaient avec le microphytobenthos pour modifier la stabilité du sédiment. Les résultats ont montré que la stabilité du sédiment était maximale quand à la fois le microphytobenthos et les polychètes étaient cultivés ensemble. Cette augmentation de la stabilité était la conséquence d'une prolifération du microphytobenthos accompagnée d'une plus forte production d'EPS en présence de macrofaune. Ainsi la production d'EPS par les microorganismes semble à la fois contrôlée par les microorganismes eux-mêmes, via par exemple les composés du QS, et par leur environnement biotique, en particulier la présence de consommateurs. Ces différents paramètres sont susceptibles d'interagir entre eux, ce qui permet une modulation fine de la production d'EPS en fonction des besoins des microorganismes et de leurs conditions environnementales. Enfin, cette étude souligne l'intérêt d'études à différentes échelles (microorganismes, méiofaune, macrofaune, environnement) qui permettent de mieux appréhender les différents niveaux de contrôle de la production d'EPS.

INTRODUCTION

La présence d'EPS dans un sédiment marin est un des facteurs déterminant sa résistance à l'érosion (Decho, 1990). En effet, les EPS recouvrent les particules sédimentaires, augmentant leurs capacités adhésives, et forment un réseau qui les lie entre elles. Ainsi, il a souvent été démontré des corrélations positives entre le contenu en EPS d'un sédiment et sa stabilité, aussi bien pour des sédiments vaseux que sableux (Yallop et al., 2000, Underwood & Paterson, 2003, Passarelli et al., 2012b). En conséquence, les facteurs contrôlant le contenu en EPS d'un sédiment affectent également sa stabilité.

La production d'EPS par une communauté de microorganismes varie en fonction de son stade de développement (Decho, 1990). Elle est maximale dans des conditions limitant la croissance microbienne (déficit en nutriments par exemple), ou quand la population atteint une phase stationnaire. Ceci peut indiquer, pour les bactéries, une influence des molécules du quorum sensing (QS) dans la régulation de la production d'EPS. Par exemple, le quorum sensing contrôle la quantité d'EPS émise dans les biofilms de *V. cholerae*, en fonction de son stade de maturation (Zhu & Mekalanos, 2003). Les molécules du QS permettent en effet aux populations bactériennes d'adapter leur fonctionnement à leur densité. Pour le microphytobenthos, la production d'EPS est souvent, mais pas toujours, liée à la production photosynthétique (Smith & Underwood, 1998, Staats et al., 2000, Stal, 2003).

En conditions naturelles, un autre facteur peut affecter la production d'EPS : il s'agit de la présence de consommateurs du biofilm, appartenant à la méiofaune et à la macrofaune par exemple. Ces consommateurs peuvent affecter le contenu en EPS du sédiment de plusieurs manières : directement, car certains organismes produisent du mucus, nécessaire par exemple à leur nutrition ou à leur déplacement ; indirectement, via une action sur les microorganismes ou sur leur conditions de développement.

Les objectifs de ce chapitre sont :

- (1) De déterminer de quelle manière les consommateurs affectent la production d'EPS par les microorganismes ;
- (2) D'estimer si, pour les bactéries, les molécules du QS jouent un rôle dans la modification de la production d'EPS en présence de consommateurs ;
- (3) D'évaluer si cette modification peut affecter la capacité des microorganismes à stabiliser le sédiment.

Deux expériences en milieu contrôlé ont été réalisées afin d'aborder ces différentes questions. L'expérience décrite dans la première partie, présentée sous la forme traditionnelle d'un chapitre de thèse, permettra de répondre aux deux premiers objectifs. La deuxième partie, constituée d'un article publié en 2012 dans *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, est basée sur une autre expérience, et répond aux objectifs 1 et 3.

Partie 1

PRODUCTION D'EPS PAR LES BACTÉRIES EN PRÉSENCE DE MÉIOFAUNE, ET RÔLE DU QUORUM SENSING

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèles expérimentaux

Une culture de bactéries a été mise en place à partir de vase prélevée sur l'archipel de Chausey. Le sédiment a été mélangé à un volume équivalent d'eau de mer artificielle autoclavée (salinité $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) et le tout a été mis au bain à ultrasons (37 kHz) pendant 10 min afin de détacher les bactéries des particules. Le mélange a ensuite été centrifugé à 3000 g pendant 10 min et le surnageant, contenant les bactéries, a été mis en culture avec du Nutrient Broth No 3 ($13 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, Fluka), qui favorise le développement des microorganismes. La culture a été aérée en permanence par un bulleur et laissée à l'obscurité par 25°C pendant 6 semaines. Chaque semaine, du milieu de culture frais (eau de mer et Nutrient Broth) a été ajouté pour stimuler la croissance bactérienne.

Les organismes de la méiofaune utilisés pour cette étude proviennent d'un sédiment sableux de zone intertidale, dont la communauté est dominée par les nématodes. Deux types d'assemblages de nématodes ont été utilisés : un assemblage naturel (extrait du sédiment et placé en microcosme) et une culture bispécifique contenant *Diploilaimelloides meyli* et *D. oschei* (provenant du Laboratoire de Biologie Marine de l'Université de Ghent, Belgique). L'assemblage naturel contenait essentiellement des nématodes prédateurs, si bien que sa pression de broutage sur la population bactérienne était probablement faible. En revanche, *D. meyli* et *D. oschei* sont des espèces bactéricivores, exerçant donc une pression de broutage plus importante que celle de la communauté naturelle. Les nématodes utilisés, vivant en milieu intertidal, sont capables de supporter des salinités comprises entre 20 et $30 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$; ils ont été maintenus dans un milieu salé à $25 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ et à 17°C .

Protocole expérimental

L'expérience a été réalisée en microcosmes, dans des boîtes de Pétri de 5 cm de diamètre. Un disque de coton a été placé au fond de chaque microcosme

pour conserver l'humidité. Il a été recouvert d'une membrane (pores de 40 μm) pour empêcher les nématodes de passer dans le coton. Sur cette membrane ont été ajoutés 20 g de sable stérilisé (brûlé 4 h à 550 °C), avec une taille de particules comprise entre 60 et 100 μm . De l'eau de mer autoclavée à 25 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a ensuite été ajoutée à chaque microcosme.

Six traitements ont été mis en place :

- un traitement contrôle, noté C, contenant uniquement du sable et de l'eau de mer. Des antibiotiques (chloramphénicol à 20 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, streptomycine à 150 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) ont été utilisés pour limiter le développement bactérien ;
- un traitement bactéries, noté B, où 3 ml de culture bactérienne ont été ajoutés aux microcosmes ;
- deux traitements nématodes, notés N1 et N2, où 100 nématodes de la communauté naturelle ou de la culture bispécifique, respectivement, ont été ajoutés aux microcosmes ;
- deux traitements bactéries et nématodes, notés BN1 et BN2, dont les microcosmes contenaient à la fois des bactéries et des nématodes, dans les quantités décrites précédemment.



Fig. IV.1 : photo du dispositif expérimental.

Fig. IV.1: picture of the experimental treatments.

Pour chaque traitement, 15 microcosmes ont été mis en place (Fig. IV.1).

Les bactéries ont d’abord été mises en culture seules dans les microcosmes des traitements B, BN1 et BN2 (Fig. IV.2). Après une semaine, 5 microcosmes de chaque traitement ont été échantillonnés et les nématodes ont été ajoutés dans les microcosmes restants des traitements N1, N2, BN1 et BN2. Après deux autres semaines, les microcosmes restants ont été prélevés. Le prélèvement d’un microcosme correspond à la congélation immédiate, à l’azote liquide, de l’intégralité du sédiment qu’il contient.

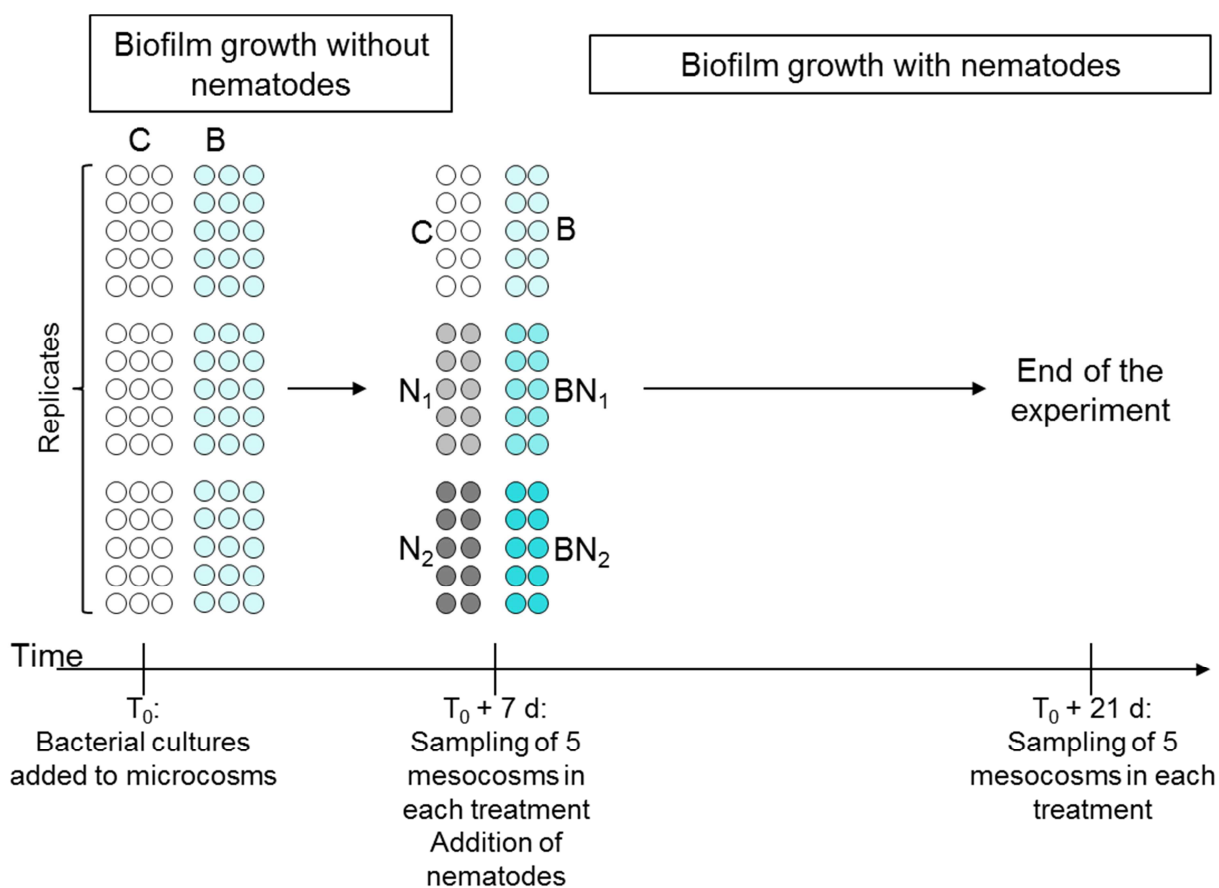


Fig. IV.2 : protocole expérimental.

Fig. IV.2: experimental design.

Analyses

Abondances bactériennes

Un quart du sédiment du microcosme a été utilisé pour cette analyse, qui a été réalisée selon le protocole décrit au chapitre I.

Après extraction des bactéries, le sédiment a été lyophilisé et pesé. Les abondances bactériennes ont ainsi été exprimées en nombre de cellules par gramme de sédiment (bactéries·g_{sédiment}⁻¹).

Concentration en EPS

Un quart du sédiment du microcosme a été utilisé pour cette analyse, qui a été réalisée selon le protocole décrit au chapitre I.

Après extraction des EPS, le sédiment a été lyophilisé et pesé. Les concentrations en EPS ont ainsi été exprimées en µg·g_{sédiment}⁻¹.

Molécules du QS

La moitié du sédiment de chaque microcosme a été utilisé pour cette analyse, qui a été réalisée selon le protocole décrit au chapitre I.

Après extraction des molécules du QS, le sédiment a été lyophilisé et pesé. Les intensités lumineuses sont mesurées en unités arbitraires.

Statistiques

Pour comparer les abondances bactériennes après une semaine (deux traitements seulement), un test t par permutation avec correction de Welch a été effectué. Les permutations (10000) permettent en effet de pallier au faible nombre de réplicats analysés (3 par traitements) ; la correction de Welch permet de prendre en compte une possible hétérogénéité des variances.

Pour comparer les différentes variables après 3 semaines, des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (KW) ont été effectués.

Pour tester la corrélation entre 2 variables, des tests de corrélation de rang (test de Spearman) ont été utilisés.

À la fin de l'expérience, les échantillons du traitement contrôle ont été analysés. Cependant, il semble que la production d'EPS et de molécules du QS était affectée par l'ajout d'antibiotiques, ce qui n'est pas l'objet de notre étude. Ce traitement ne représentait donc pas un vrai contrôle, et les résultats de ces analyses ne seront pas discutés dans ce chapitre.

RÉSULTATS

Prélèvement initial (T_{0+7d})

Après 1 semaine, les bactéries étaient significativement plus abondantes dans les microcosmes B comparés aux microcosmes C (test t unilatéral par permutation, $p < 0,05$). Une période d'une semaine est donc suffisante à la mise en place du biofilm bactérien.

Dernier prélèvement (T_{0+21d})

Après 3 semaines d'expérience, les abondances bactériennes variaient significativement entre les traitements (Fig. IV.3 ; test de KW, $p < 0,05$). Elles étaient minimales dans les microcosmes contenant seulement les nématodes et maximales dans les microcosmes contenant à la fois des bactéries et des nématodes.

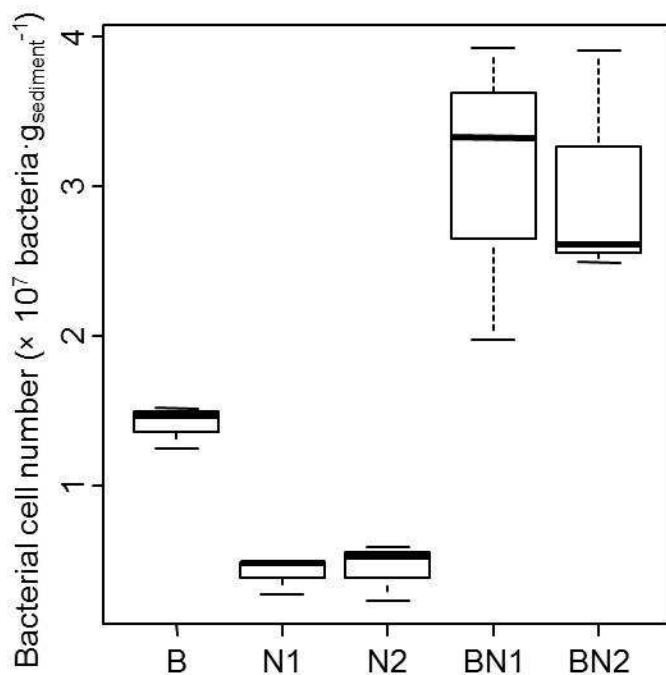


Fig. IV.3 : abondances bactériennes dans les microcosmes à la fin de l'expérience. Les noms des traitements indiquent les organismes cultivés dans les microcosmes : B : bactéries ; N1 : assemblage naturel de nématodes ; N2 : culture de nématodes.

Fig. IV.3: bacterial abundances in experimental treatments after 3 weeks. Treatments are named after the organisms they contain: B: bacteria; N1: natural nematode community; N2: nematode culture.

Les concentrations de glucides dans le sédiment n'étaient pas significativement différentes entre les traitements (test de KW, $p > 0,05$; Fig. IV.4.a). Les concentrations en protéines étaient significativement différentes

entre les traitements (Fig. IV.4.b ; test de KW, $p < 0,05$) ; elles étaient minimales dans les traitements contenant des nématodes, et plus importantes dans les autres traitements.

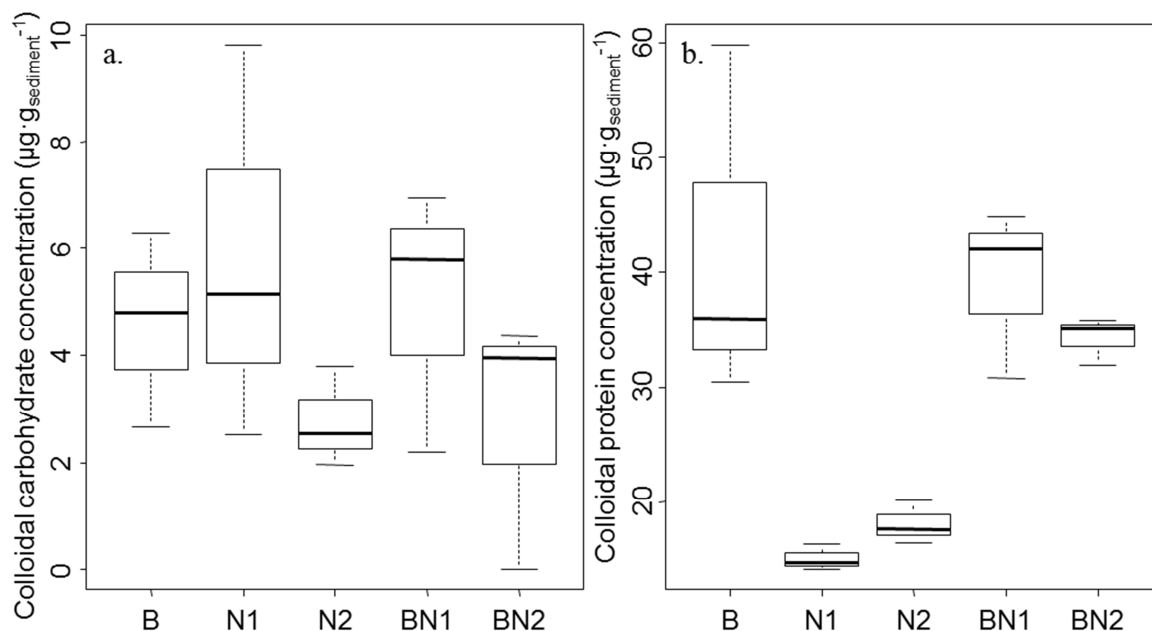


Fig. IV.4 : concentration des a. glucides colloïdaux et b. protéines colloïdales dans les microcosmes à la fin de l'expérience. Les noms des traitements indiquent les organismes cultivés dans les microcosmes : B : bactéries ; N1 : assemblage naturel de nématodes ; N2 : culture de nématodes.

Fig. IV.4: colloidal concentrations of a. carbohydrate and b. protein at the end of the experiment. Treatments are named after the organisms they contain: B: bacteria; N1: natural nematode community; N2: nematode culture.

Afin d'étudier plus en détail l'effet de la consommation sur la production d'EPS par les bactéries, la quantité d'EPS dans le sédiment a été ramenée au nombre de bactéries dans les traitements inoculés avec les bactéries (B, BN₁, BN₂). Malgré une tendance pour les bactéries à produire moins de glucides et de protéines en présence de nématodes (Fig. IV.5), aucune différence significative entre traitements n'a été observée (tests de KW, $p > 0,05$).

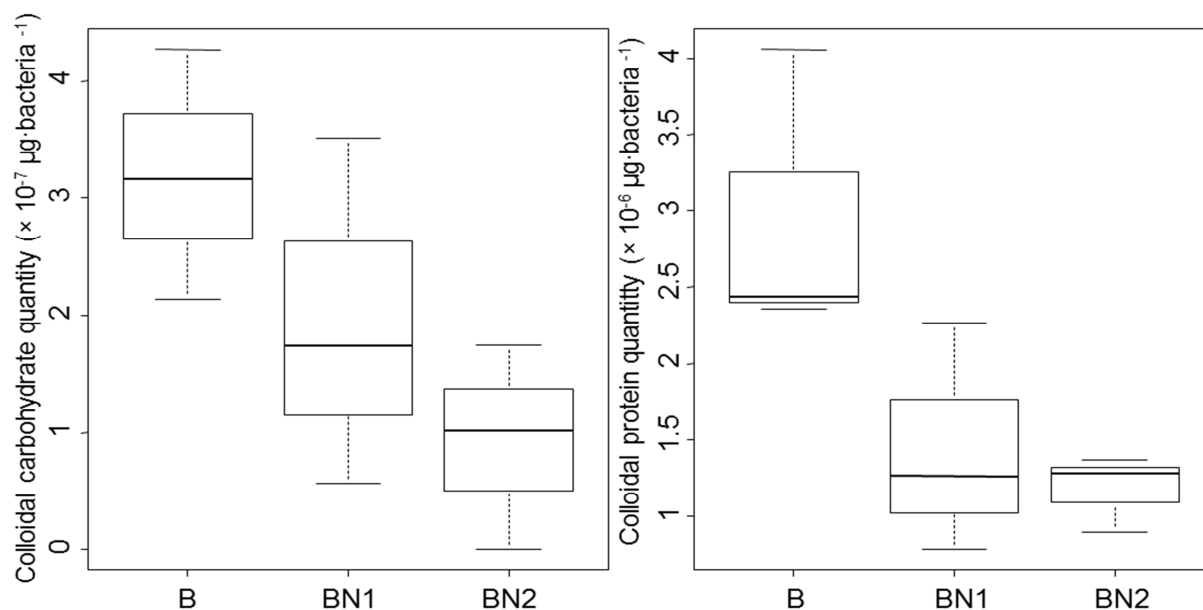


Fig. IV.5 : quantité de a. glucides colloïdaux et b. protéines colloïdales par bactérie à la fin de l'expérience. Les noms des traitements indiquent les organismes cultivés dans les microcosmes : B : bactéries ; N1 : assemblage naturel de nématodes ; N2 : culture de nématodes.

Fig. IV.5: quantities of colloidal a. carbohydrate and b. protein per bacteria at the end of the experiment. Treatments are named after the organisms they contain: B: bacteria; N1: natural nematode community; N2: nematode culture.

L'objectif de l'expérience étant d'analyser l'effet d'une pression de consommation sur un assemblage bactérien donné, le dosage des composés du QS ne sera donc présenté que dans les traitements contenant des bactéries (B, BN1 et BN2).

La quantité de composé du QS (mesurée en unités arbitraires du luminomètre) a été divisée par la quantité de bactéries dans l'échantillon. Ces quantités étaient différentes entre traitements quels que soient les composés dosés (Fig. IV.6, $p \leq 0,05$); elles étaient plus importantes en présence de nématodes, en particulier en présence de la communauté naturelle.

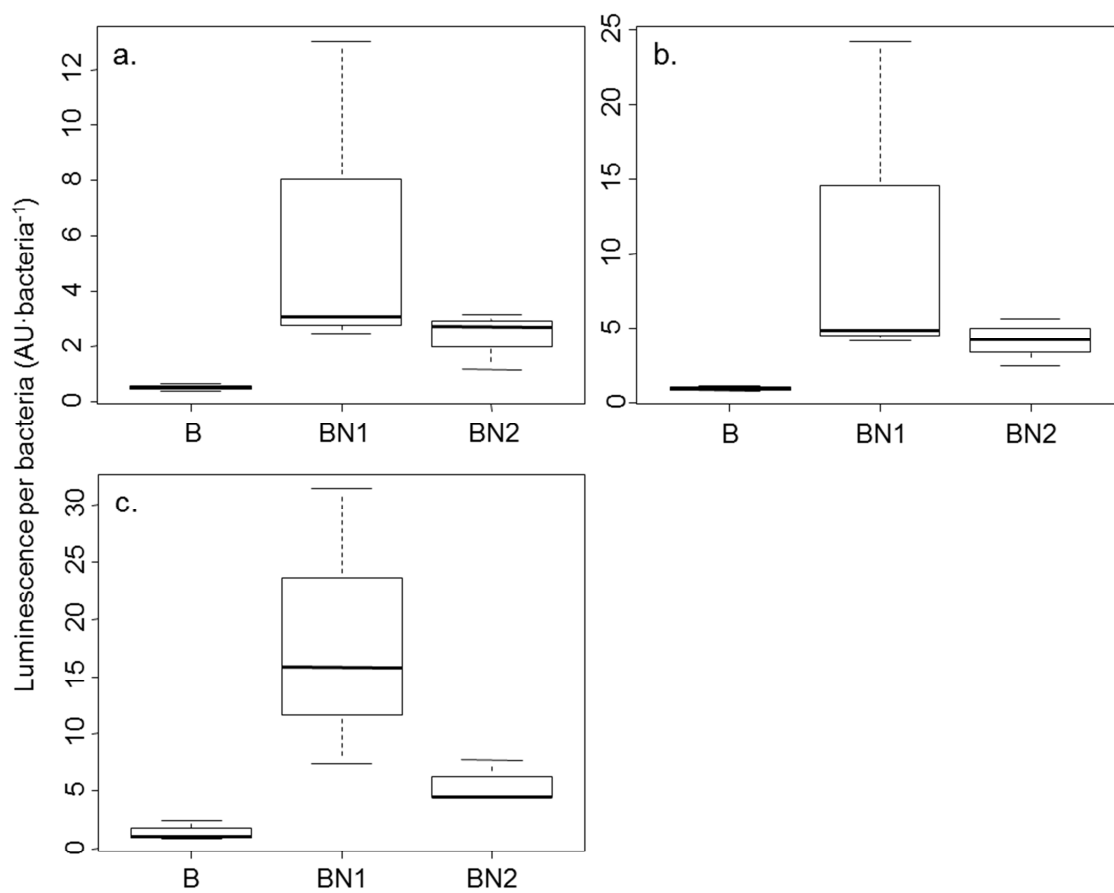


Fig. IV.6 : quantité de a. molécules du QS, b. AI-1 et c. AI-2 par bactérie à la fin de l'expérience. Les noms des traitements indiquent les organismes cultivés dans les microcosmes : B : bactéries ; N1 : assemblage naturel de nématodes ; N2 : culture de nématodes.

Fig. IV.6: quantity of a. QS molecules, b. AI-1 molecules and c. AI-2 molecules per bacteria at the end of the experiment. Treatments are named after the organisms they contain: B: bacteria; N1: natural nematode community; N2: nematode culture.

La quantité de composé AI-2 par bactérie était négativement corrélée à la quantité de protéines par bactérie (test de corrélation de Spearman, $\rho = -0,87$, $p < 0,01$).

DISCUSSION

Stimulation de la croissance bactérienne en présence de nématodes

Les abondances bactériennes ont été modifiées avec succès par l'ajout de notre culture bactérienne. En effet, une semaine après le début de l'expérience, les abondances bactériennes étaient plus fortes dans les microcosmes avec culture que dans les microcosmes sans. Les microcosmes semblaient donc propices à la croissance bactérienne.

Trois semaines après le début de l'expérience, tous les traitements dans lesquels des bactéries avaient été inoculées contenaient plus de bactéries que les autres, indiquant que ces conditions favorables de croissance se sont maintenues pendant la durée de l'expérience.

Les microcosmes où seuls les nématodes étaient présents contenaient des bactéries, ce qui est en partie lié aux conditions de culture, non stériles. Les nématodes ont également pu apporter des bactéries avec eux, en particulier via leur tractus digestif. Certaines bactéries sont en effet capables de survivre à un passage via les voies digestives de leurs prédateurs, et sont ainsi libérées dans le milieu en même temps que les excréments (Decho & Lopez, 1993, Hoagland et al., 1993). Ces microcosmes contenaient cependant moins de bactéries que ceux inoculés avec la culture.

Les microcosmes contenant le plus de bactéries étaient les microcosmes inoculés à la fois par des nématodes et des bactéries. Ce résultat ne peut pas être totalement expliqué par un effet purement additif, car la différence d'abondances bactériennes entre les traitements BN et le traitement B était bien supérieure à l'abondance dans les traitements N (Fig. IV.3). Les nématodes sont donc capables, par leur présence, de stimuler la croissance bactérienne. Ce résultat est cohérent avec des résultats expérimentaux antérieurs, montrant une prolifération bactérienne accrue en présence de consommateurs (Ingham et al., 1985 pour les bactéries du sol, Fu et al., 2005, Moens et al., 2005, Hubas et al., 2010). Dans cette expérience, l'effet des nématodes est visible deux

semaines après leur inoculation dans les microcosmes, alors que Fu et al. (2005) ont montré que cet effet ne dure parfois que quelques jours. Des différences dans les conditions du milieu, en particulier liées aux ressources disponibles pour la croissance bactérienne, peuvent expliquer cette hétérogénéité des effets.

Différents mécanismes ont été évoqués pour expliquer la stimulation de la croissance des bactéries par leurs consommateurs (De Mesel et al., 2004, Moens et al., 2005). Le premier est un effet direct de la consommation, qui permet de libérer dans le milieu des nutriments qui auraient pu, sinon, être stockés dans de la biomasse microbienne. La capacité de charge du milieu (c'est-à-dire la taille maximale de population qu'un milieu donné peut supporter) augmente ainsi. Un autre paramètre pouvant entrer en compte est la bioturbation par les nématodes (Alkemade et al., 1992). En se déplaçant et en perturbant le sédiment, ceux-ci favorisent en effet la diffusion de l'oxygène et des nutriments dans le sédiment, rendant ceux-ci plus disponibles pour la croissance bactérienne. Enfin, les nématodes peuvent fragmenter la matière organique (Coull, 1999), facilitant ainsi son utilisation par les bactéries.

Récemment, il a été montré que la production de mucus par les nématodes est un mécanisme complémentaire de stimulation (Moens et al., 2005). Les nématodes produisent en effet un mucus riche en mucopolysaccharides acides et en molécules azotées, qui constitue donc un milieu de croissance intéressant pour les bactéries. Ceci est d'autant plus vrai que le mucus produit par les nématodes a la capacité d'absorber d'autres molécules, organiques et inorganiques, et ainsi de les mettre à disposition des organismes qui l'ingèrent (Decho & Lopez, 1993, Wotton, 2004).

En plus d'une influence sur la biomasse, les nématodes peuvent avoir un effet sur l'activité bactérienne, qui semble variable puisque différentes études l'ont trouvé soit positif, soit négatif. Fu et al. (2005), par exemple, ont montré une augmentation de la respiration bactérienne en présence de nématodes, avec un décalage temporel par rapport à l'augmentation de la biomasse. La

production de mucus par les nématodes peut jouer un rôle dans ces variations, puisque l'ajout de matière organique fraîche dans un sédiment peut favoriser la dégradation de la matière organique réfractaire par les bactéries (Parmelee, 1995).

Dans notre expérience, les deux communautés de nématodes semblent avoir un effet semblable sur les abondances bactériennes, malgré leur différence de composition. En effet, la communauté N1 est une communauté naturelle, dominée par des nématodes de grande taille essentiellement prédateurs. L'assemblage N2 est formé de deux espèces du genre *Diplolaimelloides* ; ces espèces se développent généralement autour de matière organique en décomposition, en consommant préférentiellement les bactéries (dos Santos et al., 2009).

Or, des études antérieures ont montré que des espèces différant par leur pression de consommation peuvent avoir des effets variables sur les assemblages bactériens. Par exemple, de Mesel et al. (2004) ont comparé l'effet de 4 espèces de nématodes sur la composition taxonomique des assemblages bactériens, étudiée par la technique de « fingerprinting » de DGGE. Leurs résultats suggèrent qu'à forte pression de broutage, la diversité bactérienne diminue. De manière plus générale, les assemblages se développant en présence de chacune des 4 espèces sont différents entre eux, et leur évolution temporelle est différente. Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Moens et al. (2005), qui eux ont montré des communautés différentes entre les zones couvertes du mucus laissé par les nématodes et le reste du sédiment, ainsi qu'entre les zones couvertes du mucus de différentes espèces de nématodes.

Cet effet différent des assemblages des nématodes peut être en partie expliqué par leur mode de consommation (De Mesel et al., 2004). Les nématodes de grande taille ou opportunistes consomment la majorité des bactéries. Seules celles qui survivent au passage dans le tractus digestif du vers vont alors ensemercer le milieu et se développer. Au contraire, les nématodes

de plus petite taille ou spécialistes vont consommer uniquement certaines espèces, par exemple en évitant les bactéries formant de grands filaments. L'assemblage bactérien mis en place sera donc très différent selon les cas. De plus, il est intéressant de noter qu'une même espèce de nématode aura un effet différent sur les assemblages microbiens selon si elle cultivée seule ou en présence d'autres espèces (dos Santos et al., 2009).

Il se peut donc que les assemblages bactériens des microcosmes de cette étude, bien que présentant des densités similaires, étaient de composition taxonomique différente. Des analyses complémentaires de type DGGE pourraient permettre de vérifier cette hypothèse.

Production d'EPS en présence de nématodes

Les EPS présents dans le sédiment ont deux origines possibles. La première est bactérienne (Decho, 1990) : les bactéries, en se développant, produisent des EPS qui permettent la mise en place du biofilm et la réalisation de diverses fonctions cellulaires ; la seconde vient des nématodes (Moens et al., 2005). En effet, comme discuté précédemment, les nématodes produisent lors de leur locomotion un mucus riche en mucopolysaccharides et en molécules azotées. Ce mucus permet aux nématodes de fixer leurs œufs au sédiment, mais on suppose que son principal rôle est trophique. En effet, selon l'hypothèse du « piège à mucus » (*mucus trap hypothesis*, Riemann & Schrage, 1978), les nématodes produisent des mucopolysaccharides qu'ils déposent à la surface du sédiment pour faciliter la croissance bactérienne, puis reviennent et mangent les bactéries développées sur ce mucus.

Cependant, dans notre expérience, la production de glucides colloïdaux n'a pas été significativement affectée par les traitements. Ceci peut être lié au fait que les bactéries produisent des EPS plus riches en protéines qu'en glucides (Decho, 1990). En ce qui concerne les nématodes, leurs densités étaient peut-être trop faibles pour qu'ils produisent assez de mucus pour modifier

significativement les concentrations en EPS du sédiment. Il se peut également que leur activité trophique était trop peu importante, surtout dans les traitements N où la nourriture était absente. Ces nématodes ne sont en effet pas adaptés aux milieux contenant de très faibles quantités de nourriture (dos Santos et al., 2009). Ces deux hypothèses sont compatibles avec les très faibles concentrations en protéines observées dans les traitements N, comparés aux autres traitements.

Afin de comparer au mieux l'effet des nématodes sur la production d'EPS par les bactéries, les quantités d'EPS présentes dans le sédiment ont été ramenées aux nombres de bactéries présentes. Les résultats ne montrent pas de différence significative entre les traitements : les bactéries produisent des EPS de manière similaire en présence ou en absence de nématodes ; ceci est cohérent avec les résultats de Hubas et al. (2010). Cependant, les résultats suggèrent une tendance pour la production d'EPS par bactérie à diminuer en présence de nématodes. Si ces résultats devaient être confirmés par de futures expériences, ils pourraient être mis en lien avec la variation de la production d'EPS au cours du développement d'un biofilm. En effet, les bactéries produisent des quantités maximales d'EPS en phase stationnaire, et non en phase de croissance (Decho, 1990). En l'absence de nématodes, les bactéries atteignent la phase stationnaire rapidement, et produisent donc des quantités importantes d'EPS. La consommation des bactéries par les nématodes les empêche d'atteindre cette phase, maintenant leur prolifération et diminuant ainsi la production d'EPS par cellule. De même que pour l'abondance bactérienne, les concentrations en EPS observées sont similaires entre les différents assemblages de nématodes utilisés.

Production de molécules du QS en présence de nématodes

Trois systèmes de quorum sensing ont été décrits chez les Bactéries (Bassler, 1999, Henke & Bassler, 2004). Tous mettent en jeu des molécules appelées autoinducteurs (AI), car les cellules réagissent à la concentration de

molécules qu'elles produisent elles-mêmes. Le premier système, présent chez les bactéries Gram négatives, est basé sur la production d'acyl-homosérine lactones (AHL) ; toutes les AHL possèdent une partie commune mais, selon les espèces de bactéries, la longueur, saturation et substitution de la chaîne acyl varient. Le deuxième est présent chez les bactéries Gram positives, et est basé sur la production de molécules dérivées d'oligopeptides. Enfin, un certain nombre d'espèces, soit Gram positives soit Gram négatives, possèdent deux systèmes de quorum sensing, mettant en jeu des AHL (nommés AI-1) utilisés plutôt pour la communication intraspécifique, et du furanosyl borate diester (AI-2) pour la communication interspécifique. *V. harveyi*, utilisé comme biosenseur dans notre étude, possède ces deux systèmes, et les souches utilisées permettent de doser chaque type de molécule.

Dans notre expérience, seuls les traitements initialement inoculés de bactéries ont été comparés, car les autres traitements contenaient un faible nombre de cellules, dont la composition taxonomique pouvait être éloignée de notre culture bactérienne. La quantité de molécules du QS par bactérie dans les microcosmes a été modifiée par nos traitements expérimentaux. Pour chaque type de molécules, des tendances similaires ont été observées : les quantités étaient plus importantes en présence de nématodes qu'en leur absence.

Ceci est cohérent avec les densités bactériennes observées, qui sont plus importantes en présence de nématodes qu'en leur absence. Il semblerait qu'à forte densité cellulaire, la production de molécules du QS par bactérie augmente, ce qui est probablement un effet des molécules elles-mêmes. Un autre facteur pouvant rentrer en jeu est la dégradation des molécules du QS. Les AHL par exemple sont fortement dégradées quand le pH augmente, d'autant plus que la chaîne acyl de la molécule est courte (Decho et al., 2009). Or, si l'activité bactérienne est stimulée par les nématodes, la libération de CO₂ dans le milieu augmente, diminuant le pH et limitant ainsi la dégradation des AHL. D'autres mécanismes peuvent rentrer en jeu pour les autres types de molécules.

Les facteurs affectant l'efficacité de la communication par les molécules du QS sont en effet nombreux (Decho et al., 2011) et certains, comme la disponibilité de l'O₂ ou des nutriments par exemple, peuvent être affectés par les nématodes.

Nos observations montrent une tendance, pour les trois types de molécules du QS analysées, à être plus abondantes en présence de la communauté naturelle que de la culture de deux espèces, alors que les abondances bactériennes sont similaires. Or, les nématodes affectent les concentrations de composés du QS de plusieurs manières (effet sur la production via la consommation des bactéries ; modification de l'activité bactérienne par la production de mucus, la bioturbation et la modification des paramètres physico-chimiques du milieu) ; on peut émettre l'hypothèse que chaque assemblage de nématodes influence différemment la quantité de composés du QS. Par exemple, la communauté naturelle, au taux de broutage peu important, peut influencer la dégradation des molécules du QS en modifiant les conditions physico-chimiques du milieu par bioturbation. De plus, les deux communautés de nématodes peuvent avoir sélectionné des assemblages bactériens différents, dont les espèces ne produisent pas forcément les mêmes molécules du QS, ni dans les mêmes quantités.

Molécules du QS et production d'EPS

Les molécules du QS régulent de nombreuses fonctions dont la réussite dépend du nombre de cellules. Par exemple, chez les espèces pathogènes, le QS régule l'expression des protéines de virulence ; ces dernières ne sont exprimées que quand la population atteint une densité suffisante pour que l'infection puisse réussir. Aussi, il a été montré que la présence d'un système de QS fonctionnel est nécessaire à la mise en place d'un biofilm (Davies et al., 1998). Ces auteurs ont montré que quand le QS fonctionne de manière anormale, la quantité d'EPS n'est pas nécessairement affectée, mais leur composition et organisation peuvent changer. D'autres auteurs (Zhu & Mekalanos, 2003) ont

montré que certaines mutations du système de QS empêchent l'arrêt de production d'EPS une fois le biofilm formé, ce qui aboutit à la mise en place de biofilms trop épais, ne permettant pas la colonisation de nouveaux milieux.

Dans notre étude, les quantités de composés du QS n'ont pas pu être mises en relation avec la quantité de glucides contenus dans les EPS. Cependant, ce résultat n'est pas surprenant puisque, comme discuté précédemment, les bactéries produisent essentiellement des protéines dans leurs EPS. En revanche, une corrélation négative significative a été trouvée entre les quantités par bactérie d'AI-2 et de protéines. Les quantités des autres molécules du quorum sensing, que ce soit les molécules AI-1 ou le total des molécules du QS, ne montraient pas une telle relation. Les autoinducteurs de type 2 sont principalement utilisés en communication interspécifique (Bassler, 1999), et ils sont produits par un grand nombre de bactéries. Nos observations suggèrent donc que les bactéries adaptent la quantité d'EPS produite à la densité globale de la population, et pas seulement à la densité de population de leur propre espèce. A forte densité de population, la taille du biofilm augmente, ainsi que la production de composés du QS ; ces derniers inhiberaient alors la production de protéines par les bactéries.

En conclusion, nos résultats montrent une stimulation de la prolifération bactérienne en présence de nématodes, qu'ils appartiennent à une communauté naturelle ou à une culture de deux espèces. Ces derniers semblent limiter la production d'EPS, en particulier de protéines, ce qui peut être lié à une production accrue de certains types de molécules du quorum sensing. Une prochaine étape pourrait être de caractériser la diversité de ces molécules, et de les mettre en lien avec les groupes bactériens présents dans les microcosmes.

Partie 2

PRODUCTION D'EPS PAR LE
MICROPHYTOBENTHOS EN
PRÉSENCE DE MACROFAUNE
ET EFFET SUR LA STABILITÉ
DU SÉDIMENT

RÉSUMÉ

La stabilité du sédiment est un des principaux paramètres contrôlant l'abondance et la composition des assemblages benthiques en zone intertidale. Elle dépend d'un grand nombre de facteurs, biotiques et abiotiques. Caractériser les effets de ces variables et de leurs interactions est donc essentiel pour comprendre comment les assemblages benthiques sont distribués dans leur environnement. Dans ce contexte, nous avons mis en place une étude en microcosmes pour déterminer comment les microorganismes et la macrofaune, en interagissant, affectent la stabilité du sédiment. Nous avons mis en culture dans les microcosmes une communauté microbienne naturelle, enrichie en diatomées, soit seule soit en présence du vers *Hediste diversicolor*. Nous avons alors étudié les effets individuels ou combinés de ces organismes sur la biomasse photosynthétique, les abondances bactériennes, la sécrétion d'EPS et la stabilité du sédiment. Nous avons également tracé la consommation du biofilm par les vers en utilisant les acides gras comme marqueurs. Nos résultats ont montré que même si *H. diversicolor* se nourrissait des diatomées, les vers stimulaient le développement du biofilm en terme de biomasse photosynthétique et de production d'EPS. De plus, la capacité adhésive du sédiment augmentait quand les diatomées et les vers étaient cultivés ensemble ; ce résultat était inattendu puisque la macrofaune est généralement considérée comme globalement déstabilisatrice, puisqu'elle consomme des microorganismes et modifie les propriétés du sédiment. Prévoir l'effet de la macrofaune sur les biofilms microphytobenthiques et l'effet combiné des organismes sur la stabilité du sédiment est donc complexe ; des expériences complémentaires impliquant d'autres organismes ou des assemblages plus complexes pourrait aider à mieux caractériser l'effet des paramètres biotiques sur la stabilité du sédiment.

SURFACE ADHESION OF MICROPHYTOBENTHIC BIOFILMS IS
ENHANCED UNDER *HEDISTE DIVERSICOLOR* (O.F. MÜLLER)
TROPIC PRESSURE

Claire Passarelli, Cédric Hubas, Audrey Nicolas Segui, Julie Grange, Tarik Meziane

Article publié dans la revue *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*
(2012) – 438: 52-60

ABSTRACT

In soft-bottom tidal flats, sediment stability is one of the crucial parameters modulating the abundance and composition of benthic assemblages. It is dependent on a wide range of variables, both abiotic and biotic. Investigating how these variables and their interactions influence sediment stability is therefore essential to understand how benthic assemblages are distributed in their environment. In this context, we designed a microcosm study to examine how microorganisms and macrofauna interact to alter sediment stability. We cultured a natural microbial community, enriched with diatoms, both alone and together with the common ragworm *Hediste diversicolor*, and monitored their effects on photosynthetic biomasses, bacterial abundances, exopolymer secretions and sediment stability. We also assessed the consumption of biofilm by worms using fatty acid biomarkers. Our results demonstrate that even if *H. diversicolor* fed on diatoms, they stimulated biofilm development, in terms of photosynthetic biomass and exopolymer production. Also, sediment cohesiveness was enhanced when both diatoms and *H. diversicolor* were cultured together; this result was unexpected since macrofauna, through consumption of microorganisms and modification of sediment properties, is often considered to have a destabilising effect on sediment. Predicting the effect of macrofauna on microphytobenthic biofilms and their associated influence of sediment stability is therefore not straightforward. Similar experiments including different types of organisms or more complex assemblages might help to further characterise the effect of biota on sediment stability.

INTRODUCTION

Sediment stability is an important feature in ecosystems subjected to physico-chemical gradients, such as intertidal areas or freshwater streams. It determines the occurrence of several macrofaunal and meiofaunal species, which depend, for their settlement and development, on specific environmental conditions (Norkko et al., 2001, Van Colen et al., 2009, Volkenborn et al., 2009). Any parameter promoting either stabilisation or erosion of the sediment may therefore alter the density and the diversity of benthic assemblages.

Sediment stability depends on a large range of variables, both abiotic (grain size and water content for instance) and biotic (Black et al., 2002, Widdows & Brinsley, 2002). Among biotic factors, the presence of microphytobenthic and bacterial biofilms is crucial. Biofilms are formed of an assemblage of microorganisms entangled in a matrix of extracellular polymeric substances (EPS), mainly composed of carbohydrates and proteins. These molecules play many different roles associated with the maintenance of a stable environment, including attachment of microbes to surfaces, protection against high irradiance, UV, pollution and desiccation tolerance (Decho, 1990) and they also have a stabilising effect on the sediment (van Duyl et al., 2000, de Brouwer et al., 2005). EPS can indeed form a network which traps and binds particles together, ultimately increasing sediment adhesion and stability (de Brouwer et al., 2002, Stal, 2010). The EPS composition is highly variable between species, cells, and nutrient availability (Decho, 1990, Stal, 2003) and any change in its arrangement promotes fluctuations in adhesion potential (Sanin et al., 2003).

Another biotic component affecting sediment stability is the presence of macrofaunal organisms. Two kinds of direct effects are well recognised: first, macrofaunal organisms disturb sediment through bioturbation, increasing its water content and surface micro-topography (Andersen, 2001, de Deckere et al., 2001), therefore promoting sediment erosion. On the contrary, most macrofaunal organisms produce mucus in order to facilitate their locomotion and feeding

activity, as well as to solidify burrows; this mucus finally consolidates sediments (Murray et al., 2002, Stabili et al., 2011). Macrofauna also has an indirect negative effect on sediment stability through consumption on biofilms (de Deckere et al., 2001); however, their mucus might be used as a food source by bacteria, so that macrofaunal presence may lead to an increase of biofilm development (Coull, 1999, Fernandes et al., 2006) and hence sediment biostabilisation.

Given these complex interactions between organisms, as well as with physical and chemical variables, it is difficult to investigate in the field the effect of living organisms on sediment stability. We therefore conducted a microcosm experiment with natural microbial communities and one of their potential consumers, the common ragworm *Hediste diversicolor*, alone or in combination. This species was chosen for its ability to display a diversity of feeding modes including deposit feeding on microbial assemblages (Galván et al., 2008, Riisgåard & Larsen, 2010) and also because it produces mucus (Scaps, 2002, Riisgåard & Larsen, 2010), which is generally used to construct burrows. We monitored microbial biomasses in terms of pigment content and bacterial cell number, as well as EPS production and sediment surface adhesion. The composition of organic matter in sediment was characterised through its fatty acid (FA) content and we followed the consumption of microorganisms by *H. diversicolor* with FA biomarkers. We tested the hypothesis that the effective consumption of microorganisms by *H. diversicolor* in combination with its bioturbation will decrease sediment surface adhesion, a proxy for sediment stability.

MATERIAL AND METHODS

Microphytobenthic culture

Muddy intertidal sediment was sampled at low tide (Chausey archipelago, Normand-Breton Gulf, France), mixed with autoclaved seawater (35 g·l⁻¹) and filtered on 5 µm to separate benthic microalgae and bacteria from sediment particles. The filtrate was enriched with Guillard's (f/2) medium to stimulate diatom growth. The culture was grown for 2 weeks at room temperature with natural light.

Hediste diversicolor

Adult worms (Annelids, Polychaetes) were bought from the "Service d'Expédition de Modèles Biologiques" (CNRS/FR2424), of the biological Station of Roscoff (France). They were starved during 1 week before their use for the experiment.

Experimental design

The diatom culture and worms were grown both separately and together in microcosms containing 180 g of sterilised marine sand (40 to 100 µm, Fisher Scientific; burn 4 h at 550 °C) and 500 ml of autoclaved seawater. Four treatments were used (Fig. IV.7): a control treatment (C), without culture or worms; a diatom treatment (D), inoculated with the diatom culture; a *Hediste* treatment (H), with one worm per microcosm; and a last treatment with both diatoms and worm (DH treatment). Five replicate microcosms were used for each treatment (total of 20 microcosms, 14 × 14 × 7 cm, 1 × w × h). In control and *Hediste* microcosms, streptomycin (150 mg·l⁻¹) and chloramphenicol (20 mg·l⁻¹) were added to limit bacterial proliferation. In D and DH treatments, 30 ml of the diatom culture was added to each microcosm. In H and DH treatments, 1 worm was added to each microcosm (equivalent to a density of 51 ind·m⁻²). Microcosms were placed at room

temperature (approximately 20 °C) and subjected to a daily 10 h photoperiod throughout the experiment (at about 180 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}$, PAR 400 to 700 nm).

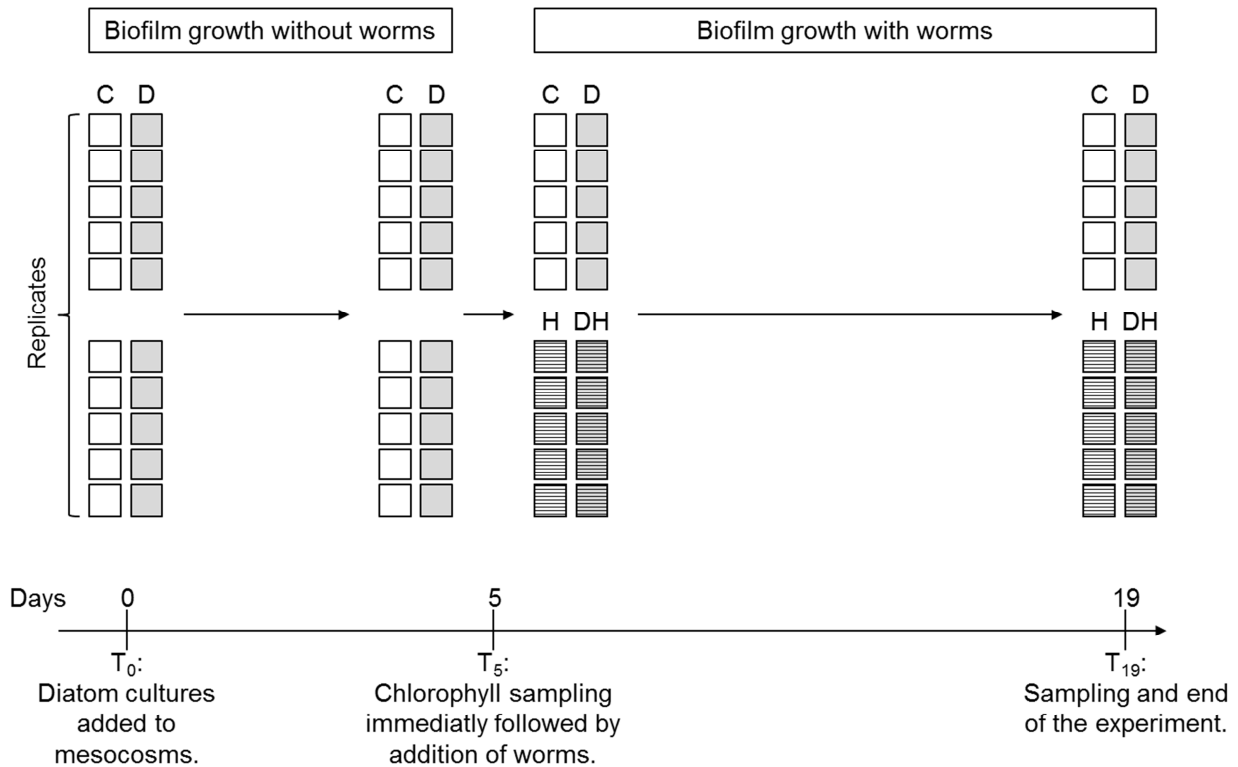


Fig. IV.7: experiment and sampling design. C: control treatment (with antibiotics); D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment (with antibiotics); DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Fig. IV.7: protocole expérimental et d'échantillonnage. C : traitement contrôle (avec ajout d'antibiotiques) ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* (avec ajout d'antibiotiques) ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

Sampling protocol

Diatom culture and antibiotics were added to microcosms at the beginning of the experiment (T₀). Biofilm growth was allowed during 5 days before microcosms were sampled (T₅) for chlorophyll. Worms were then added to microcosms and the experiment was continued for 14 days, after which microcosms were sampled again (T₁₉) and analysed for sediment surface adhesion. 4 sediment cores (1.2 cm diameter, 2 mm depth) per microcosm were taken to measure chlorophyll

concentrations, bacterial cell numbers, EPS concentrations and analyse fatty acid content. They were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -25 °C until analysis. Worms were caught and frozen.

Chlorophyll concentrations

The sampling depth (2 mm) was chosen to target photosynthetically active biomass only (Black & Paterson, 1996, Paterson et al., 1998). 1.5 ml of 90 % acetone was added to each sample for pigment extraction (16 h in darkness). Concentrations of chlorophylls *a*, *b* and *c* were determined by spectrophotometry (Spectronic Genesys 2 spectrophotometer, Milton Roy; Jeffrey et al., 1997a).

Bacterial cell numbers

Sediment cores were fixed with 1.5 ml of 3 % formalin in sterile seawater. Bacteria were separated from sediment with one drop of Tween® 80 (Fisher Scientific) in the sediment slurry. Samples were then placed in a sonication bath for 3 min (35 kHz). Samples were centrifuged 10 minutes at 1700 g and the supernatant containing bacteria was kept. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich) was added to 1 ml of the supernatant, to a final concentration of 2 µg·ml⁻¹. The mixture was filtered on 0.2 µm. Dried filters were mounted on glass slides and bacteria were counted by epifluorescence microscopy.

Fatty acid (FA) analysis

Fatty acids analysis was performed following the modified method of Bligh & Dyer (1959) as described in Meziane et al. (2006). 3 sediment cores and 3 worms per treatment were lyophilised overnight; the whole core or individual was weighted and used for analysis. Before extraction, an internal standard (FA 23:0) was added to every sample for quantification purpose. Lipids were extracted with a 20 min ultrasonication in a mixture of distilled water, chloroform and methanol in ratio

1:1:2 (v:v:v). A mixture of distilled water and chloroform was added to form a two-layer system, and samples were centrifuged 5 min at 2000 g. The lower chloroform phase containing lipids was recovered, and the same volume of clean chloroform was added for a second extraction with ultrasonication and phase separation. The chloroform phase, which contains the lipids, was pooled with the first one. Lipids were concentrated under N₂ flux, and saponified, in order to separate FAs, with a mixture of NaOH (2 mol·L⁻¹) and methanol (1:2 v:v) at 90 °C during 90 min. Saponification was stopped with chlorhydric acid; FAs were recovered with chloroform and concentrated under N₂ flux. Samples were incubated with BF₃-methanol (boron-trifluoride methanol) at 90 °C during 10 min to transform FAs into methyl esters, which were re-extracted and kept frozen in chloroform. Just before analysis, samples were dried under N₂ flux and transferred to hexane. 1 µl of the mixture was injected to a gas chromatograph (GC, Varian CP-3800 equipped with flame ionization detector), which allowed separation and quantification of FAs. Separation was performed with a Supelco OMEGAWAX 320 column (30 m × 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) with He as carrier gas. The following temperature program was used: 60 °C for 1 min, then raise to 150 °C at 40 °C·min⁻¹ (held 3 min), then raise to 240 °C at 3 °C·min⁻¹ (held 7 min). Peaks of FAs were identified either by comparison of the retention time with analytical standards (Supelco™ 37, PUFA-1 Marine Source, and Bacterial Mix, Supelco Inc., USA) and analysis of the sample in a gas chromatograph coupled to mass spectrometer (GC-MS, Varian 450GC with Varian 220-MS). FA concentrations in sediments (C_{FA}, mg_{FA} · g_{sediment}⁻¹) were calculated using the area of their peak compared to the one of the internal standard according to the following formula:

$$C_{FA} = \frac{A_{FA}}{A_{23:0}} \times \frac{C_{23:0}}{W}$$

where A_{FA} is the peak area of the FA, A_{23:0} is the peak area of FA 23:0, C_{23:0} is the weight of FA 23:0 in the sample (mg) and W is the dry weight of sediment used for extraction.

FAs are designated as X:Y ω Z, where X is the number of carbons, Y the number of double bonds and Z the position of the ultimate double bond from the terminal methyl. Branched FAs have a second methyl group on the carbon wearing the terminal methyl (iso FA) or on the carbon before (anteiso FA).

EPS concentrations

Sediment cores were continuously rotated with 2 ml of distilled water for 90 min at room temperature (Horizontal mixer, RM5-30V, Ingenieurbüro CAT), which allowed the extraction of colloidal EPS. Carbohydrates and proteins were analysed according to Dubois method (Taylor & Paterson, 1998) and modified Lowry method (Frolund et al., 1996), respectively. For carbohydrates, 200 μ l of the sample was added to 200 μ l of 5 % phenol and 1 ml of sulphuric acid; the solution was then incubated at 30 °C for 35 min and absorbance was measured at 488 nm. For proteins, 250 μ l of the sample was added to 250 μ l of 2 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) and 700 μ l of a mixture of chemicals as described by Frolund et al. (1996) and incubated 15 min at 30 °C. 100 μ l of Folin reagent (diluted 5:6 with distilled water) was added and samples were incubated again 45 min at 30 °C. Absorbance was measured at 750 nm. Calibration curves were prepared with glucose for carbohydrates and bovine serum albumin (BSA) for proteins.

Sediment surface adhesion

Sediment stability was assessed through the proxy of sediment surface adhesion. The ability of the surface to retain particles was measured by Magnetic Particle Induction (MagPI), a device recently developed by Larson et al. (2009). Briefly, a given amount of ferrous and stained particles were spread onto the sediment surface. Then, the magnetic force needed to detach the particles from the substratum was measured, using a variable electromagnet set at a specific distance from the test surface. The current supplied to the magnet controlled the strength of

the magnetic field and the force required to remove the ferrous particles was recorded (Larson et al., 2009). Ferrous particles (diameter >270 µm) were spread onto the sediment surface of the microcosm in a single layer. The electromagnet was set 4 mm away from sediment surface and connected to a variable voltage power supply (HY3005 DC Power Supply, Mastech). Voltage was increased from 0 V by increments of 0.1 V until all particles detached from sediment. This final voltage was recorded and the magnetic force associated was determined using a calibration curve previously established with a gaussmeter (410-HCAT, LakeShore). This magnetic flux (mTa) was used as a measure of surface adhesive capacity. This measurement has been correlated with Cohesive Strength Meter (CSM) measurements (Lubarsky et al., 2010), which assesses sediment resistance to erosion.

Statistics

Differences in variables in the biofilm were tested using R software with Wilcoxon test for comparison between 2 treatments and with Kruskal-Wallis (KW) tests between 4 treatments. Post hoc tests (non parametric SNK) were performed for pairwise multiple comparisons.

For FA compositions of sediments, Bray-Curtis distance between samples was calculated and n-MDS (nonmetric MultiDimensional Scaling) was performed using Primer software (PRIMER 5 software, version 5.2.9, 2001, PRIMER-E Ltd; 200 iterations). SIMPER (SIMilarity PERcentages) was thereafter performed to isolate FAs explaining the most dissimilarity between treatments. Permutational Multivariate ANOVA (PerMANOVA) was then used to test for significant differences between treatments in terms of global FA content, using R software, after proper verification for multivariate homogeneity of group dispersion (tested with a permutation-based test). Kruskal Wallis (KW) tests were used to analyse differences between treatments for individual FA in sediments. Non parametric SNK tests were performed *a posteriori* for pairwise multiple comparisons. For worms, permutation

t-tests were performed to test for differences between individual FA percentages between treatments.

RESULTS

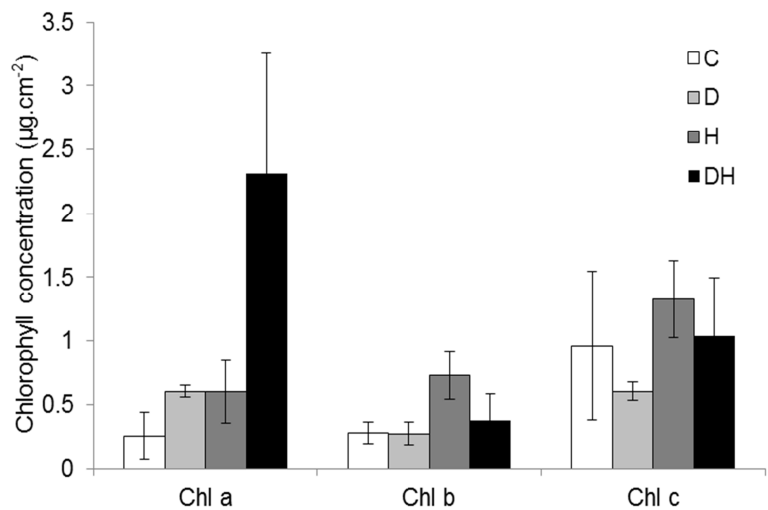
Microbial composition of the biofilm

After 5 days, sediment of microcosms inoculated with diatoms contained more chlorophyll *a* than control microcosms (Wilcoxon test, $p < 0.001$); chlorophyll *a* concentrations reached $1.89 \pm 0.68 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ in microcosms with diatoms. 5 days were therefore enough for biofilm development.

At T_{19} , chlorophyll *a* concentrations in sediment were different between treatments (Table IV1, Fig. IV.8, KW test followed by non parametric SNK tests, $p < 0.05$). Chlorophyll *a* was maximal in treatment DH and minimal in treatment C. Chlorophylls *b* and *c* did not show any differences between treatments.

Fig. IV.8: concentrations of chlorophyll *a*, *b* and *c* in different treatments at T_{19} . Bars are mean \pm se. C: control treatment; D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Fig. IV.8 : concentrations des chlorophylles *a*, *b*, et *c* dans les différents traitements à T_{19} . Les barres représentent les moyennes \pm les erreurs types. C : traitement contrôle ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.



At the end of the experiment, bacterial abundances were significantly different among treatments (Table 1, Fig. IV.9, KW test followed by non parametric SNK tests, $p < 0.05$). They were higher in treatments D and DH compared to treatments C and H.

Table IV.1: results of Kruskal-Wallis (KW) tests and *a posteriori* pairwise tests (non parametric SNK tests) on biofilm variables at T₁₉. The first row displays the p-value of the KW test; the second row displays the differences between treatments demonstrated by pairwise comparison tests (different if p-value < 0.05). Chl.: Chlorophyll. C: control treatment; D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Table IV.1: résultats des tests de Kruskal-Wallis (KW) et des tests *a posteriori* (tests SNK non paramétriques) sur les paramètres du biofilm à T₁₉. La première ligne présente la p-value du test de KW. La deuxième indique les différences entre traitements démontrées par les tests de comparaison 2 à 2 (différent si p < 0,05). Chl. : chlorophylle. C : traitement contrôle ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

	Chl. a	Chl. b	Chl. c	Bacteria	Carbohydrates	Proteins	Stability
KW	0.034	ns	ns	0.039	0.012	ns	0.002
Pairwise comparison	C < DH			C = H < D = DH	C = H = D < DH		C < H < D < DH

Table IV.2: results of Kruskal-Wallis (KW) tests and *a posteriori* pairwise tests (non parametric SNK tests) on fatty acids weights in sediments at T₁₉.

Table IV.2: résultats des tests de Kruskal-Wallis (KW) et des tests *a posteriori* (tests SNK non paramétriques) sur les acides gras dans le sédiment à T₁₉.

	Total	SFA	SFA / PUFA	Branched	16:1ω7	20:5ω3
KW	0.016	0.016	0.022	0.049	0.028	0.033
Pairwise comparison	C<D<H<DH	C<D<H<DH	D<C<DH=H	C=H<D=DH	H=C<DH=D	C=H<D=DH

Table IV.3: results of permutation t-tests on fatty acids proportions in worms (p-values), between treatments H and DH. The first row displays p-value of the test. The second row displays the direction of variation between treatments (different if p-value < 0.05).

Table IV.3 : résultats des tests t par permutation sur les proportions des acides gras dans les vers. La première ligne présente la p-value du test. La deuxième précise le sens de variation (différent si p < 0,05).

	16:1ω7	20:5ω3	18:3ω3	20:3ω3
Perm.t.test	< 2 10 ¹⁶	ns	0.048	0.025
Comparison	H < DH		H < DH	H < DH

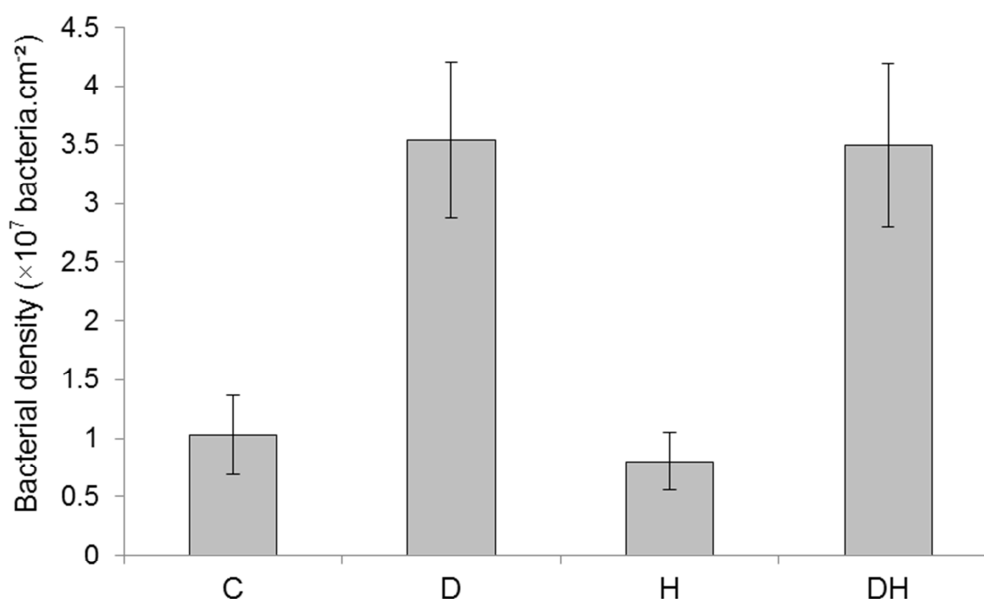


Fig. IV.9: bacterial density in different treatments at T₁₉. Bars are mean \pm se. C: control treatment; D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Fig. IV.9 : densités bactériennes dans les microcosmes à T₁₉. Les barres représentent les moyennes \pm les erreurs types. C : traitement contrôle ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

FA extraction and analysis results are displayed in Table S1. Total content of FAs in sediments was significantly different between treatments at the end of experiment (Table 2, Fig. IV.11.a, KW test followed by non parametric SNK tests, $p < 0.05$); they ranged from $1.30 \pm 0.34 \times 10^{-2}$ mg.g $^{-1}$ sediment for treatment C to $20.26 \pm 3.60 \times 10^{-2}$ mg.g $^{-1}$ in treatments DH. FA concentrations were significantly higher when worms were present (Table 2). FA compositions of the sediments also differed significantly between treatments, with sediments with worms being similar (Fig. IV.10, PerMANOVA, $p < 0.001$). Saturated FAs (SFAs; 16:0, 18:0, 14:0 and 12:0) explained most of the dissimilarity among treatments, as well as 16:1 ω 7 when comparing treatments C or H with D or DH. SFAs were more abundant in treatments with worms compared to other treatments (Table 2, Fig. IV.11.b, KW test followed by non parametric SNK tests, $p < 0.05$), and the ratio between saturated and polyunsaturated FAs (SFA / PUFA) also differed among treatment, being maximal in treatments with worms (Table 2, KW test, $p < 0.05$). The

concentrations of branched FAs (BFA, sum of concentrations of iso and anteiso FAs) were different among treatments (Table 2, Fig. IV.11.c, KW test followed by non parametric SNK tests, $p < 0.05$); they were higher in treatments D and DH. 16:1 ω 7 and 20:5 ω 3 (eicosapentaenoic acid, EPA) concentrations in sediment were different among treatments (Table 2, Fig. IV.11.d and IV.11.e., KW tests followed by non parametric SNK tests, $p < 0.05$), being significantly higher in treatments D and DH compared to other treatments.

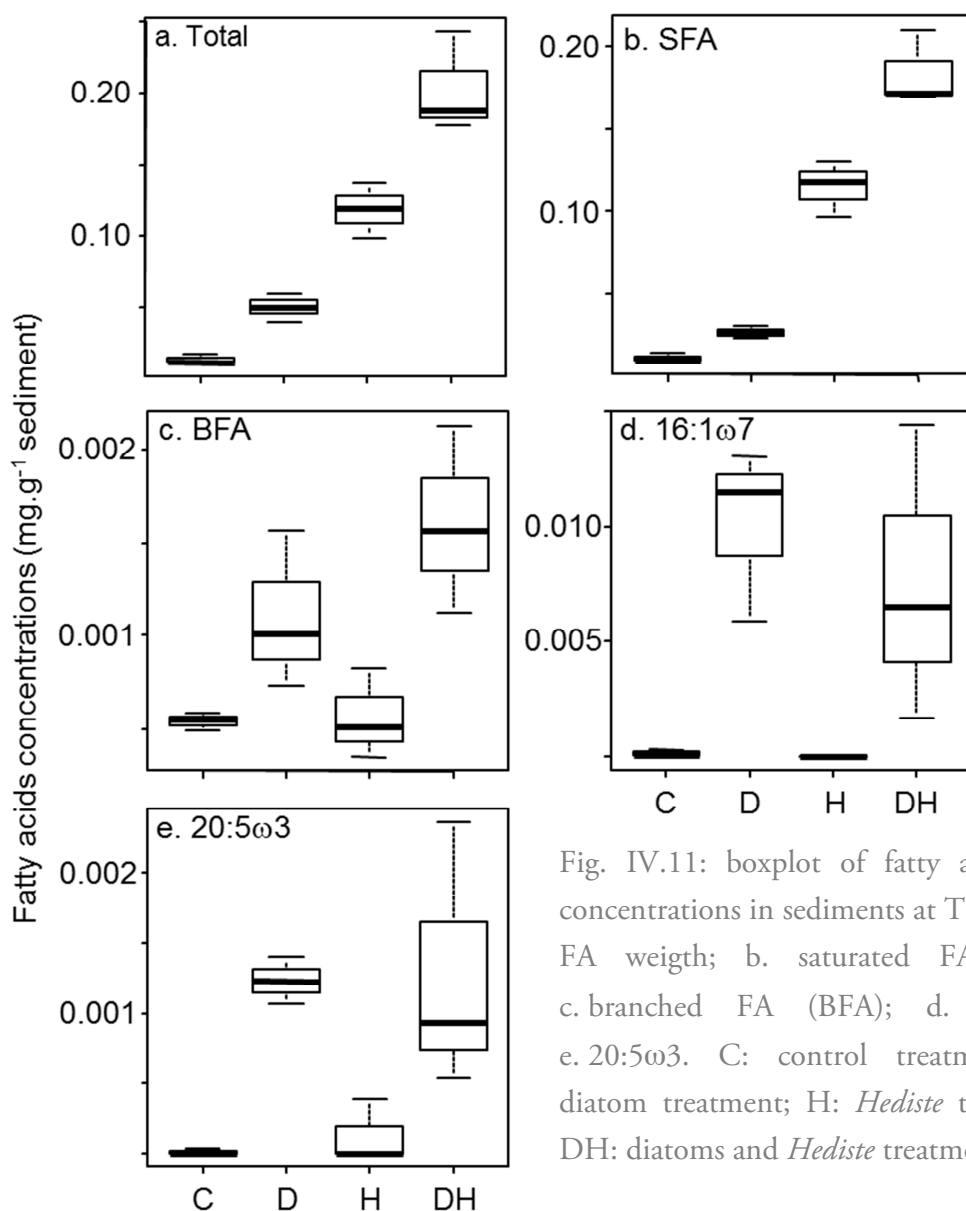


Fig. IV.11: boxplot of fatty acid (FA) concentrations in sediments at T₁₉: a. total FA weight; b. saturated FA (SFA); c. branched FA (BFA); d. 16:1 ω 7; e. 20:5 ω 3. C: control treatment; D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Fig. IV.11 : concentration en acides gras dans les sédiments à T₁₉ : a. concentration totale en acides gras ; b. acides gras saturés (SFA) ; c. acides gras ramifiés (BFA) ; d. 16:1 ω 7; e. 20:5 ω 3. C : traitement contrôle ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

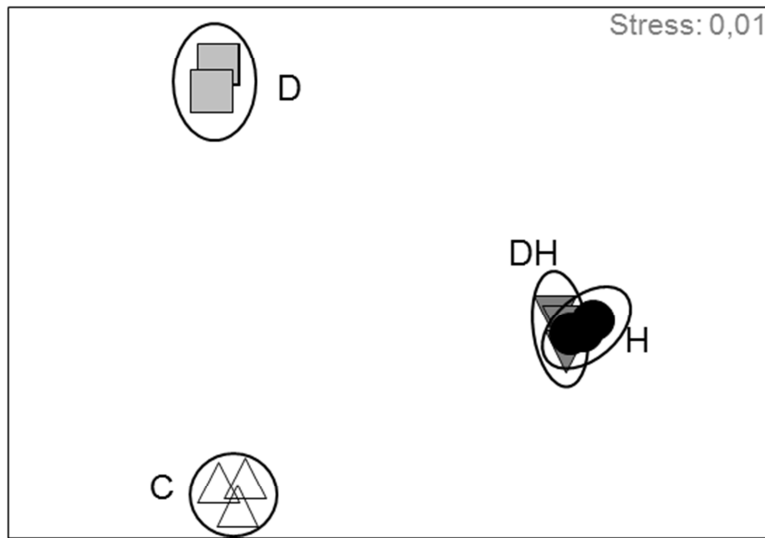


Fig. IV.10: n-MDS of the fatty acid (FA) composition of sediment at T₁₉. C: control treatment; D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Fig. IV.10 : n-MDS illustrant la composition en acides gras du sédiment à T₁₉. C traitement contrôle ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

Fig. IV.12: boxplot of percentages of FAs in worms at T₁₉: a. 16:1 ω 7; b. 20:5 ω 3; c. 18:3 ω 3; d. 20:3 ω 3. H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

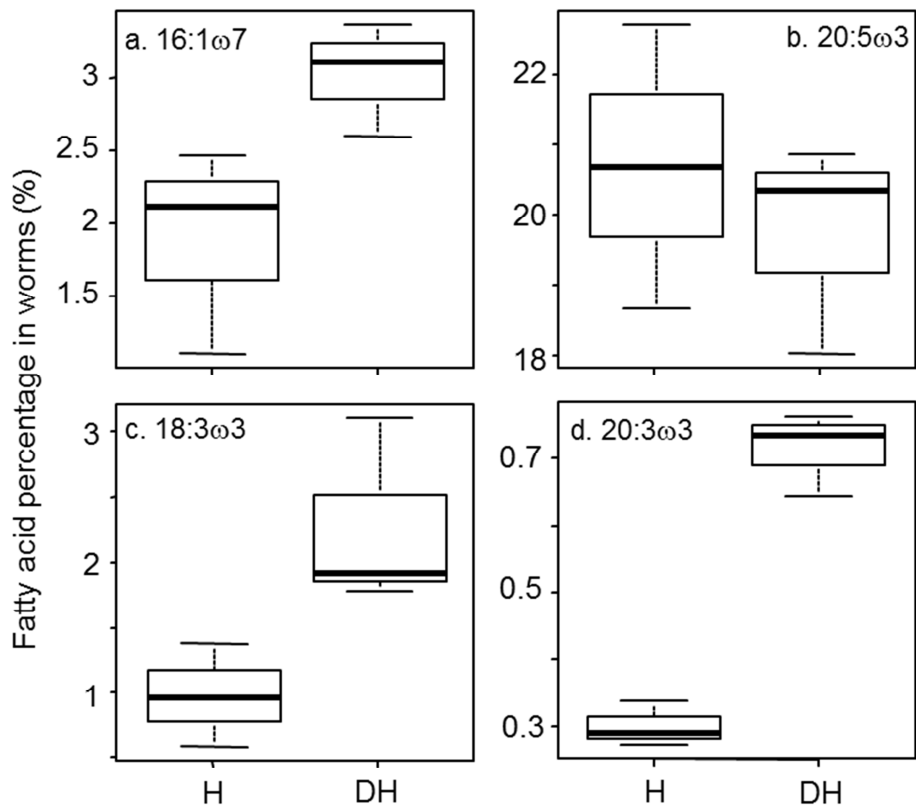


Fig. IV.12 : pourcentages des acides gras dans les vers à T₁₉ : a. 16:1 ω 7; b. 20:5 ω 3; c. 18:3 ω 3; d. 20:3 ω 3. H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

FA composition of worms

FA compositions of the worms are displayed in Table S2. PUFA were abundant as their percentage was $44.2 \pm 0.6\%$ in treatment DH and $48.1 \pm 1.7\%$ in treatment D. 16:1 ω 7 was in significantly higher proportion in worms in treatment DH (Table 3, Fig. IV.12.a, permutation t-test, $p < 0.001$), whereas 20:5 ω 3, or EPA, did not show any differences between treatments (Table 3, Fig. IV.12.b, permutation t.test, $p > 0.05$). 18:3 ω 3 and 20:3 ω 3 proportions were significantly higher in DH worms compared to H worms (Table 3, Fig. IV. 12.c and d, permutation t-test, $p < 0.05$).

EPS and sediment adhesive capacities

Carbohydrates and proteins in colloidal EPS did not show the same pattern at the end of the experiment. Carbohydrates concentrations in sediment were significantly different between treatments (Table 1, Fig. IV.13, KW test followed by non parametric SNK tests, $p < 0.05$), with concentration being maximal in treatment DH. Proteins did not show any differences between treatments (Table 1, Fig. IV.13, KW test, $p > 0.05$).

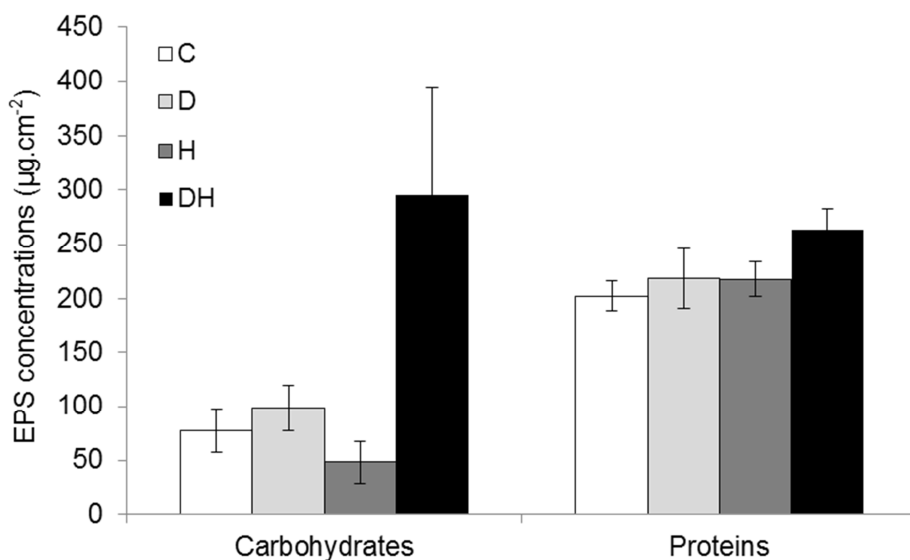


Fig. IV.13: concentrations of colloidal EPS in terms of carbohydrate (left panel) and proteins (right panel) in different treatments at T₁₉. Bars are mean \pm se. C: control treatment; D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Fig. IV.13 : concentration des EPS colloïdaux dans les sédiments à T₁₉ : glucides (à gauche) et protéines (à droite). Les barres représentent les moyennes \pm les erreurs types. C : traitement contrôle ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

Sediment surface adhesion, as measured by MagPI device, was significantly different between treatments at T₁₉ (Table 1, Fig. IV.14, KW test followed by non parametric SNK tests, $p < 0.01$). It was maximal in treatment DH and minimal in treatment C.

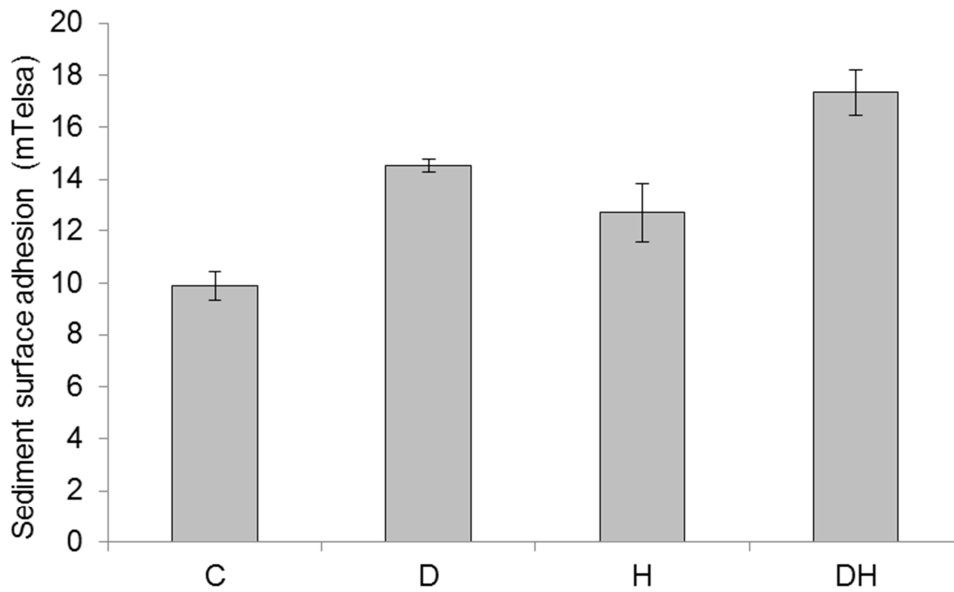


Fig. IV.14: sediment surface adhesion as measured by MagPI in different treatments at T₁₉. Bars are mean \pm se. C: control treatment; D: diatom treatment; H: *Hediste* treatment; DH: diatoms and *Hediste* treatment.

Fig. IV.14 : capacité adhésive du sédiment mesurée par le MagPI à T₁₉. Les barres représentent les moyennes \pm les erreurs types. C : traitement contrôle ; D : traitement diatomées ; H : traitement *Hediste* ; DH : traitement diatomées et *Hediste*.

DISCUSSION

Validation of the experimental procedure

Our experiment displayed a simplified system, with a natural microbial culture and only one species of macrofauna; thus our study does not consider the whole range of interactions that might affect the sediment in the field. Furthermore, in order to control precisely which microorganisms were added to every treatment, sediment was burned to remove OM, and antibiotics were applied to treatments C and H. These steps therefore make the results less applicable to field situation, as *H. diversicolor* usually occur in sediment rich in OM. Our results have therefore to be considered with caution before to be extrapolated to natural systems (Braeckman et al., 2010). Yet, our experiment was appropriate to separate the effect of these groups of interest from other factors, and therefore to test hypothesis of what might be the global influence of these groups in the field.

In the present experiment, microphytobenthic development was assessed through two complementary parameters: chlorophylls and FA concentrations. Each microcosm inoculated with diatoms displayed in its sediment significantly higher chlorophyll *a* concentration than microcosms without diatoms, as well as 16:1 ω 7 and 20:5 ω 3 (also called eicosapentaenoic acid, or EPA), which are biomarkers of diatoms in this environment (Dunstan et al., 1994, Arts & Wainman, 1999). The microbial culture and light supply were therefore appropriate to promote microphytobenthic growth in the microcosms.

At the end of the experiment, mean proportions of PUFA in *H. diversicolor* were higher than 40 %, thus demonstrating that worms were still in a good shape (Bradshaw et al., 1989, Luis & Passos, 1995, Meziane et al., 1997). The FA compositions of worms also differed between starved individuals and those fed with diatoms; particularly, the proportion of 16:1 ω 7 was significantly higher in worms fed with diatom. On the contrary, 20:5 ω 3 (EPA) was in similar proportion in both treatments. EPA, considered as an important FA for this animal (Luis & Passos,

1995, Meziane et al., 1997), was in high proportion in every worm (exceeding 18 %), and can be synthesised by them from intermediate FAs such as 18:3 ω 3 and 20:3 ω 3 if not abundant in available food sources (Sargent et al., 1999, Sprecher, 2000, Leonard et al., 2004). FAs 18:3 ω 3 and 20:3 ω 3 were found in significantly lower proportions in starved worms than in those fed with diatoms, thus suggesting that EPA was synthesised *de novo* in these animals, whereas it was directly assimilated from diatoms grazing when available. We can therefore conclude that worms actively fed on diatoms in the present experiment.

Bacterial abundances, as well as the contributions of branched FAs in sediments, which are biomarkers of these microorganisms in this environment (Arts & Wainman, 1999), were minimal in both treatments C and H, which confirms that the antibiotic cocktail used was sufficient to inhibit bacterial development.

Stimulation of microphytobenthic development in presence of worms

Chlorophyll *a* concentrations in sediment were significantly higher when diatoms and worms were present together, compared to the treatment with diatoms only. This was surprising as *H. diversicolor* had in fact assimilated microphytobenthos. Several processes might explain this increase; first, the addition of worms seem to have brought some chlorophyll *a* to microcosm, as the chlorophyll *a* concentrations in treatments H and D were similar. This contamination presumably occurred as worms brought some photosynthetic organisms along. Yet, FA analysis showed that FAs 16:1 ω 7 and 20:5 ω 3, or EPA, which are biomarkers of diatoms in this environment (Dunstan et al., 1994, Arts & Wainman, 1999), were virtually absent from sediments in H treatments. Also, as measured in our experiment, chlorophyll *a* concentrations may include degradation products of chlorophyll, named phaeophytin (Yentsch & Menzel, 1963). These results suggest that worms did not bring viable diatoms along, and therefore the provision of

chlorophyll or phaeophytin by worms cannot explain the threefold increase of chlorophyll *a* concentrations in treatment DH.

Another process to take in consideration is the bioturbation by worms, which is known to enhance the aeration of sediment, thereby allowing the diatoms to settle and photosynthesise deeper than they would without worms (Scaps, 2002, Braeckman et al., 2011). Also, bioturbation increases geochemical fluxes and therefore facilitates the recycling of nutrients in the environment (Coull, 1999, Scaps, 2002, Braeckman et al., 2010). Such nutrients will stimulate diatom proliferation (de Jonge, 1985, Underwood & Kromkamp, 1999, Schäfer et al., 2002, Stal, 2003).

Furthermore, in our experiment, the concentration of saturated FAs (SFA) and their ratio to polyunsaturated FAs (PUFA) increase dramatically in sediments when worms were present. SFA, present in all organisms, are also the end products of organic matter (OM) degradation in sediment (Sun et al., 1997, Lü et al., 2010, Balzano et al., 2011); on the contrary, PUFA are quickly used / degraded as soon as producing organisms die (Grossi et al., 2006). The increase in SFA / PUFA ratio in treatments H and DH demonstrated that OM, particularly worms faecal pellets and dead microflora, was quickly degraded when worms were present. Worms initiate OM degradation through consumption, reducing the size and complexity of molecules which can afterwards more easily be regenerated into nutrients by bacteria, as shown before with nematodes (Hubas et al., 2010) and macrofauna (Werry & Lee, 2005). We suggest that this increase in nutrient recycling, promoted by worms, is another process explaining the stimulation of microphytobenthic growth when these macroorganisms are present.

This stimulation explains the threefold increase of chlorophyll *a* when both diatoms and worms were present together. Simultaneously, the consumption of diatoms by worms in treatment DH maintained the concentration of fatty acid biomarkers at the same level than when diatoms are alone. Indeed, in contrary to

chlorophyll *a*, FAs 16:1 ω 7 and 20:5 ω 3, or EPA, were of similar abundance in treatments D and DH. Therefore, when worms were present, sediment got enriched by degradation products of chlorophyll and more generally OM, as shown by the total content of FA in sediment (Meziane et al., 1997), which was maximal when both diatoms and worms were present. It is interesting to notice that a similar pattern had already been observed with meiofauna, which was shown to stimulate the development of bacteria and diatoms (Hubas et al., 2010).

Enhanced sediment adhesives capacity in presence of both diatoms and worms

In addition to bacteria and diatoms, microphytobenthic biofilms are mainly composed of EPS, which are known to be of crucial importance for microorganisms themselves (e. g. protection, attachment), but also for ecosystem functioning (Decho, 1990, 2000). For example, they are able to trap pollutants and provide cues for the settlement of a wide range of organisms (Decho, 1990, Wotton, 2004, Stocum & Plante, 2006). In the present study, colloidal EPS concentrations showed different responses to treatments in terms of protein and carbohydrate contents. Protein levels were similar among treatments: sediment in treatments D, H and DH did not contain more proteins than in the control treatment. We can therefore conclude that neither diatoms, nor bacteria, nor *H. diversicolor* produced a significant amount of extracellular proteins in the time frame of the present experiment.

Moreover, carbohydrate concentrations were significantly higher when both diatoms and worms were present, in comparison to other treatments. This pattern, similar to what was observed for chlorophyll *a* concentrations, suggested that diatoms were the main EPS producers. Indeed, not only diatoms are well known contributors to EPS in soft-bottom environments, but also their EPS are mainly composed of carbohydrates (Hoagland et al., 1993, Underwood et al., 2004). Other possible contributors to EPS secretion in our experiment were bacteria (Decho,

1990, Lundkvist et al., 2007) and also *H. diversicolor*, which produces mucus helping their locomotion and feeding behaviours (Scaps, 2002, Stabili et al., 2011). Yet, bacterial EPS are mainly made of proteins (Bhaskar et al., 2005, Lubarsky et al., 2010), as well as mucus of annelids (Stabili et al., 2011). If one of these organisms was responsible for a significant part of EPS production in our experiment, then an increase in protein concentrations would be expected where these organisms were present, which was not the case in the present study. This confirms that diatoms were the main EPS producers.

Two complementary hypotheses can explain the increase in carbohydrate concentrations when diatoms were cultured with worms. First, an increase of photosynthetic biomass was demonstrated in this treatment; secondly, worms can modulate the EPS secretion by each diatom (Wotton, 2004, Czaczyk & Myszka, 2007). Indeed, EPS production depends on a large range of variables, such as nutrient concentrations in the environment (Decho, 1990, Underwood & Paterson, 2003, Underwood et al., 2004), which was modified when worms were present.

Sediment adhesive ability, as measured by MagPI, is a proxy for sediment stability (Larson et al., 2009, Lubarsky et al., 2010). Sediment adhesive ability varied significantly among treatments at the end of the present experiment, being minimal in control treatment. As demonstrated by treatment H, worms alone increased sediment stability in microcosms, in spite of their expected activity of bioturbation. They are known to compact the sediment and build burrows (Murray et al., 2002, Fernandes et al., 2006), which appeared to increase sediment cohesion in our experiment. Similarly, the development of microphytobenthic biofilms in microcosms intensified sediment adhesive capacities, through EPS production (Sutherland et al., 1998, Yallop et al., 2000, Stal, 2010). These molecules, due to their stickiness, help microorganisms to coagulate with sediment particles, which finally bind these particles together, increasing therefore cohesion inside sediment (van Duyl et al., 2000, de Brouwer et al., 2002, de Brouwer et al., 2005). When

both organisms were present, all individual effects added, and stabilisation was further increased as diatom development and EPS secretion were stimulated by worms. Therefore, we need to reconsider our initial hypotheses as worms do not only consolidate sediment by their own secretions; they also stimulate microphytobenthic development, which further increases sediment adhesive ability through extra EPS secretion.

Conclusion

In conclusion, our study demonstrates that predicting the effect of macrofauna on microphytobenthic biofilms and their associated influence of sediment stability is not straightforward. Even if the consumption of diatoms by *H. diversicolor* was significant, they stimulated, through an increased input of nutrients in the environment, the proliferation of microphytobenthos. Biofilm development was also stimulated in terms of secretion of exopolymers, which in turn affected sediment properties such as cohesion. Also, *H. diversicolor* had a dual effect on sediment surface adhesion; directly through the consolidation of sediment, and indirectly through the stimulation of biofilm development. Further investigations may help in elucidating the influence of diverse organisms and their interactions on sediment stability. For instance, although bacteria were not a significant contributor to EPS secretion in our experiment, their presence considerably facilitates the development of microphytobenthic biofilms on sediment (Schäfer et al., 2002, Bruckner et al., 2008, Buhmann et al., 2012). Meiofauna is also known to stimulate microbial development and EPS secretion (Hubas et al., 2010), but the combined effect of meiofauna and macrofauna on biostabilisation has still to be characterised. Analysing how different types of organisms and stabilising mechanisms interact to modulate both the development and functioning of microbial communities may help in understanding the properties determining sediment stability and the

ecosystem function of habitat stabilisation (Paterson et al., 2009, Gingold et al., 2011).

ACKNOWLEDGEMENT



The authors thank Najet Thiney for her precious help with fatty acid extraction and analysis. We thank Pr. David M. Paterson for providing the MagPI device. The comments of two anonymous referees substantially improved the manuscript. This work received support from the “ATM Biodiversité des Microorganismes” and their support is gratefully acknowledged.

Table IV.S1: fatty acid (FA) concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{sédiment}}^{-1}$, mean \pm sd) in sediments at T₁₉. Treatments were C (control), D (diatoms), H (*Hediste diversicolor* alone) and DH (diatoms and H. diversicolor). SFA: saturated FAs; BFA: branched FAs; MUFA: monounsaturated FAs; PUFA: polyunsaturated FAs.

Table IV.S1 : concentrations en acides gras ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{sédiment}}^{-1}$, moyenne \pm écart type) dans les sédiments à T₁₉. Les traitements étaient C : contrôle ; D : diatomées ; H : *Hediste* ; DH : diatomées et *Hediste*. SFA : acides gras saturés ; BFA : acides gras ramifiés ; MUFA : acides gras monoinsaturés ; PUFA : acides gras polyinsaturés.

	C	D	H	DH
12:0	0.52 \pm 0.33	1.25 \pm 0.35	25.76 \pm 4.97	42.26 \pm 7.33
13:0	0.12 \pm 0.04	0.17 \pm 0.01	0.11 \pm 0.10	0.27 \pm 0.03
14:0	1.16 \pm 0.13	4.13 \pm 0.77	10.82 \pm 2.72	24.51 \pm 4.11
15:0	0.53 \pm 0.11	1.24 \pm 0.15	0.69 \pm 0.23	1.60 \pm 0.52
16:0	4.72 \pm 1.21	14.89 \pm 2.65	37.49 \pm 7.17	66.94 \pm 9.02
17:0	0.16 \pm 0.01	0.23 \pm 0.03	0.38 \pm 0.07	0.56 \pm 0.15
18:0	2.82 \pm 1.14	3.35 \pm 0.14	38.67 \pm 4.60	45.75 \pm 10.17
19:0	0.12 \pm 0.01	0.18 \pm 0.01	0.17 \pm 0.03	0.78 \pm 0.32
20:0	0.07 \pm 0.03	0.14 \pm 0.01	0.44 \pm 0.05	0.50 \pm 0.16
22:0	0.05 \pm 0.04	0.13 \pm 0.02	0.08 \pm 0.14	0.21 \pm 0.19
24:0	0.08 \pm 0.01	0.24 \pm 0.05	0.10 \pm 0.08	0.35 \pm 0.31
ΣSFA	10.36 \pm 2.70	25.94 \pm 4.02	114.71 \pm 17.30	183.73 \pm 22.93
14:0iso	0.11 \pm 0.04	0.28 \pm 0.10	0.25 \pm 0.08	0.46 \pm 0.17
15:0iso	0.07 \pm 0.01	0.17 \pm 0.08	0.04 \pm 0.07	0.29 \pm 0.07
15:0anteiso	0.14 \pm 0.02	0.30 \pm 0.09	0.14 \pm 0.13	0.51 \pm 0.16
16:0iso	0.12 \pm 0.02	0.23 \pm 0.13	0.12 \pm 0.12	0.36 \pm 0.13
17:0anteiso	0.10 \pm 0.01	0.13 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
ΣBFA	0.54 \pm 0.05	1.11 \pm 0.43	0.56 \pm 0.24	1.61 \pm 0.50
14:1	0.04 \pm 0.01	0.25 \pm 0.12	0.26 \pm 0.32	0.18 \pm 0.17
15:1	0.03 \pm 0.01	0.13 \pm 0.06	0.10 \pm 0.18	0.27 \pm 0.03
16:1 ω 7	0.12 \pm 0.15	10.16 \pm 3.77	0.00 \pm 0.00	7.55 \pm 6.46
16:1 ω 9	0.44 \pm 0.14	2.56 \pm 0.66	0.35 \pm 0.61	1.41 \pm 1.24
17:1 ω 7	0.00 \pm 0.00	0.12 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.12 \pm 0.21
18:1 ω 5	0.03 \pm 0.02	0.12 \pm 0.02	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
18:1 ω 7	0.05 \pm 0.02	1.33 \pm 0.20	0.00 \pm 0.00	0.33 \pm 0.29
18:1 ω 9	0.46 \pm 0.23	5.10 \pm 1.10	0.99 \pm 1.72	4.31 \pm 3.64
20:1 ω 5	0.09 \pm 0.02	0.12 \pm 0.00	0.14 \pm 0.01	0.32 \pm 0.05
ΣMUFA	1.26 \pm 0.55	19.88 \pm 5.78	1.85 \pm 2.45	14.51 \pm 11.73
16:2 ω 4	0.02 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
18:2 ω 6	0.29 \pm 0.31	0.51 \pm 0.04	0.29 \pm 0.26	0.52 \pm 0.53
18:3 ω 3	0.09 \pm 0.02	0.18 \pm 0.01	0.04 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00
20:3 ω 3	0.37 \pm 0.16	0.17 \pm 0.13	0.47 \pm 0.48	0.45 \pm 0.05
20:4 ω 3	0.00 \pm 0.00	0.05 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
20:4 ω 6	0.00 \pm 0.00	0.22 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	0.18 \pm 0.31
20:5 ω 3	0.01 \pm 0.02	1.23 \pm 0.17	0.13 \pm 0.22	1.28 \pm 0.96
22:5 ω 3	0.03 \pm 0.00	0.02 \pm 0.03	0.11 \pm 0.19	0.15 \pm 0.26
22:6 ω 3	0.00 \pm 0.00	0.14 \pm 0.01	0.06 \pm 0.11	0.16 \pm 0.15
ΣPUFA	0.81 \pm 0.18	2.59 \pm 0.06	1.10 \pm 0.46	2.74 \pm 1.90
Total FA	12.96 \pm 3.39	49.51 \pm 9.89	118.23 \pm 19.29	202.59 \pm 35.95

Table IV.S2: fatty acid (FA) percentages (% \pm sd) in worms in treatments H (*Hediste diversicolor* alone) and DH (diatoms and *H. diversicolor*). SFA: saturated FAs; BFA: branched FAs; MUFA: monounsaturated FAs; PUFA.

Table IV.S2 : pourcentages en acides gras (% , moyenne \pm écart type) dans les vers à T₁₉. Les traitements étaient H : *Hediste* et DH : diatomées et *Hediste*. SFA : acides gras saturés ; BFA : acides gras ramifiés ; MUFA : acides gras monoinsaturés ; PUFA : acides gras polyinsaturés.

	Worms H	Worms DH
12:0	0.04 \pm 0.07	0.20 \pm 0.04
14:0	0.68 \pm 0.18	0.87 \pm 0.03
15:0	0.59 \pm 0.06	0.94 \pm 0.07
16:0	14.15 \pm 1.56	15.77 \pm 0.61
17:0	1.27 \pm 0.12	1.69 \pm 0.23
18:0	7.36 \pm 1.89	6.51 \pm 0.70
19:0	0.00 \pm 0.00	0.11 \pm 0.01
22:0	0.07 \pm 0.06	0.12 \pm 0.01
ΣSFA	24.16 \pm 1.82	26.21 \pm 0.15
15:0iso	0.09 \pm 0.07	0.12 \pm 0.01
16:0iso	0.11 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01
17:0iso	0.44 \pm 0.09	0.42 \pm 0.10
17:0anteiso	0.10 \pm 0.08	0.12 \pm 0.00
18:0iso	0.11 \pm 0.10	0.07 \pm 0.13
ΣBFA	0.85 \pm 0.35	0.84 \pm 0.24
15:1	0.54 \pm 0.15	0.55 \pm 0.14
16:1 ω 5	0.07 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00
16:1 ω 7	1.90 \pm 0.70	3.03 \pm 0.40
16:1 ω 9	0.19 \pm 0.16	0.22 \pm 0.09
17:1 ω 7	0.15 \pm 0.04	0.23 \pm 0.03
18:1 ω 5	0.21 \pm 0.05	0.22 \pm 0.05
18:1 ω 7	3.62 \pm 1.02	4.70 \pm 0.47
18:1 ω 9	6.33 \pm 0.55	3.79 \pm 0.59
18:1 ω 11	4.80 \pm 1.52	6.68 \pm 0.82
20:1 ω 5	0.25 \pm 0.09	0.62 \pm 0.09
20:1 ω 9	2.37 \pm 0.56	1.39 \pm 0.11
20:1 ω 11	5.85 \pm 0.01	6.65 \pm 0.38
22:1 ω 9	0.04 \pm 0.07	0.05 \pm 0.08
22:1 ω 11	0.36 \pm 0.20	0.19 \pm 0.20
24:1 ω 9	0.25 \pm 0.20	0.37 \pm 0.11
ΣMUFA	26.93 \pm 0.92	28.70 \pm 0.74
18:2 ω 6	3.71 \pm 0.74	1.17 \pm 0.12
18:3 ω 3	0.98 \pm 0.40	2.27 \pm 0.73
20:2 ω 6	3.34 \pm 0.34	1.70 \pm 0.35
20:2 ω 9	0.84 \pm 0.48	0.73 \pm 0.15
20:3 ω 3	0.30 \pm 0.03	0.71 \pm 0.06
20:3 ω 6	0.20 \pm 0.19	0.13 \pm 0.13
20:3 ω 9	0.31 \pm 0.07	0.24 \pm 0.08
20:4 ω 3	0.14 \pm 0.13	0.35 \pm 0.13
20:4 ω 6	1.96 \pm 0.70	2.97 \pm 0.07
20:5 ω 3	20.70 \pm 2.03	19.74 \pm 1.51
22:2 ω 9	4.44 \pm 1.33	3.61 \pm 0.24
22:3 ω 6	0.95 \pm 0.11	1.03 \pm 0.10
22:4 ω 6	2.63 \pm 0.53	3.92 \pm 0.13
22:5 ω 3	4.77 \pm 1.17	5.04 \pm 0.15
22:6 ω 3	2.80 \pm 1.01	0.63 \pm 0.05
ΣPUFA	48.06 \pm 1.67	44.25 \pm 0.61

CONCLUSION

En conclusion, cette étude a démontré que la prédiction des effets de la macrofaune sur les biofilms microphytobenthiques, et de leur influence combinée sur la stabilité du sédiment est complexe. Même si la consommation des diatomées par *H. diversicolor* était significative, les vers stimulaient la prolifération du microphytobenthos en augmentant le recyclage des nutriments dans l'environnement. Le développement du biofilm était également stimulé en termes de sécrétion d'exopolymères, ce qui modifiait alors les propriétés sédimentaires comme la cohésion. *H. diversicolor* avait un effet double sur le sédiment : un effet direct de consolidation du sédiment, un effet indirect via la stimulation du développement du biofilm. Des études complémentaires permettraient de mieux caractériser l'influence de différents organismes, et de leur interaction, sur la stabilité du sédiment. Par exemple, les bactéries ne semblaient pas contribuer significativement à la production d'EPS dans notre expérience, mais il est connu que leur présence facilite le développement des biofilms microphytobenthiques sur le sédiment (Schäfer et al., 2002, Bruckner et al., 2008, Buhmann et al., 2012). La méiofaune stimule le développement microbien et la sécrétion d'EPS (Hubas et al., 2010), mais l'effet combiné de la méiofaune et de la macrofaune sur la biostabilisation n'a pas encore été caractérisé. Analyser comment les différents types d'organismes et mécanismes de biostabilisation interagissent pour moduler le développement et le fonctionnement des communautés microbiennes pourrait aider à comprendre les propriétés déterminant la stabilité du sédiment, et l'importance de cette stabilisation pour l'écosystème (Paterson et al., 2009, Gingold et al., 2011).

Les résultats de cette partie sont résumés sur la Fig. IV.15.

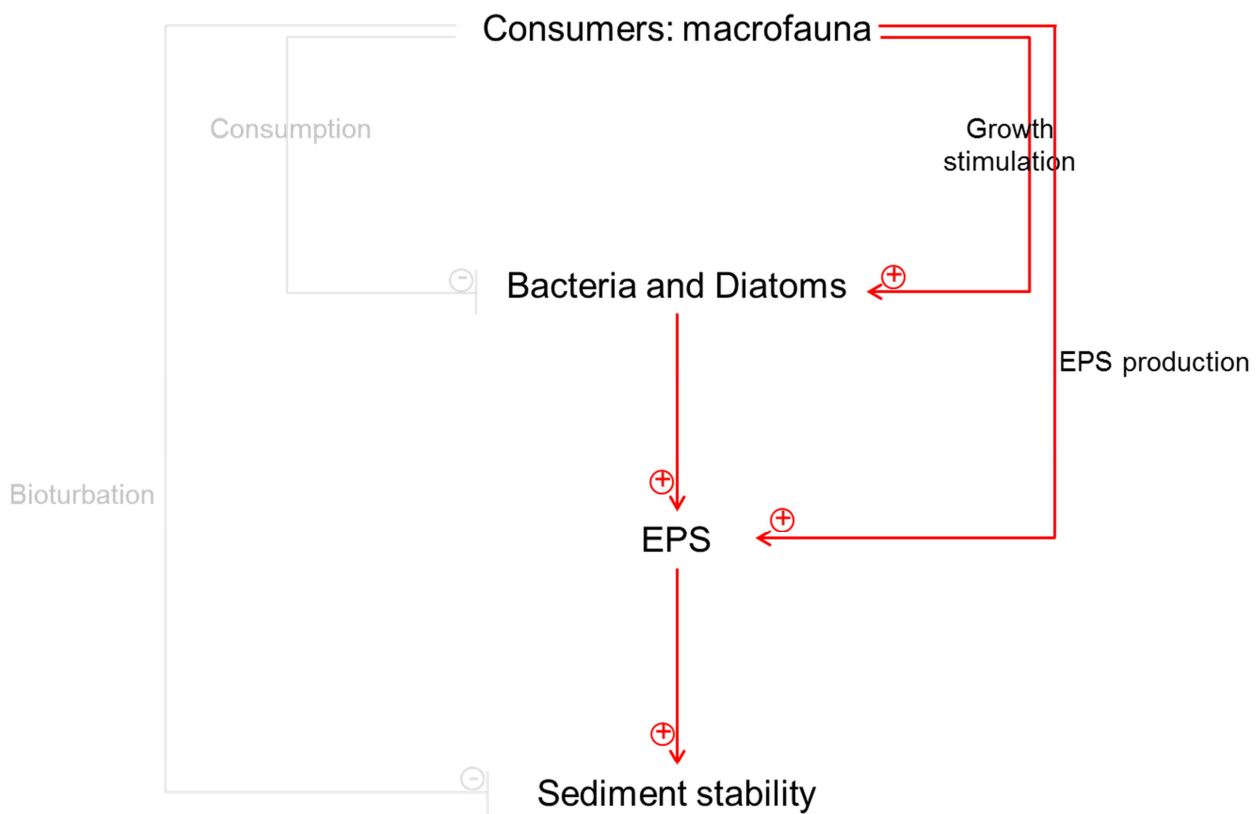


Fig. IV.15 : stimulation de la production d'EPS et augmentation de la stabilité du sédiment en présence de vers *H. diversicolor*. Les interactions potentielles sont présentées ; les flèches rouges montrent les interactions prédominantes, comme démontré par cette partie.

Fig. IV.15: stimulation of EPS production and sediment stability by worms *H. diversicolor*. Different possible interactions are displayed. In red are presented main structuring interactions, as demonstrated by this part.

Discussion générale

Les biofilms constituent la forme de vie la plus répandue sur Terre ; ils sont présents dans tous les environnements terrestres et marins, à la fois naturels (zone côtière, sources hydrothermales, milieux hypersalés, épithéliums...) et artificiels (coques des bateaux, cathéters...). Les biofilms sont particulièrement présents en zone intertidale, sur les sédiments meubles qui constituent un milieu de vie difficile car extrêmement variable. Le succès écologique de cette forme de vie est liée à la diversité métabolique et à la plasticité des organismes qui les composent, mais aussi à la protection que leur fournit les EPS qu'ils produisent.

Cette étude avait pour but de mieux comprendre les facteurs biotiques et abiotiques contrôlant la production et la composition des EPS dans les biofilms des sédiments marins côtiers, leurs rôles dans les systèmes benthiques et leur devenir dans les réseaux trophiques. Pour cela, des expériences en milieu contrôlé ont complété un suivi de plus d'un an des sédiments de surface en zone intertidale.

LA DYNAMIQUE DES EPS AU CŒUR D'UN RÉSEAU D'INTERACTIONS COMPLEXE

Production des EPS

La mise en place d'un biofilm fonctionnel nécessite la synthèse d'EPS en quantité contrôlée : si la quantité est trop faible, l'adhésion des microorganismes au sédiment sera compromise ; si elle est trop importante, cela peut empêcher la colonisation d'autres milieux. Cette étude a montré que la production d'EPS par les microorganismes est contrôlée à la fois par des facteurs abiotiques et biotiques.

Le suivi réalisé sur l'archipel de Chausey a montré que les concentrations en EPS (glucides et protéines) du sédiment suivent une dynamique saisonnière : un pic de concentration au début de l'été, et des concentrations minimales en hiver. Cette dynamique a pu être démontrée dans d'autres sites d'études et semble être liée à l'augmentation de la biomasse du microphytobenthos, et/ou

de sa production photosynthétique (Underwood & Paterson, 2003). En effet, même si tous les environnements ne suivent pas la même dynamique (Brotas et al., 1995), la biomasse et la production photosynthétiques augmentent généralement en été, du fait de l'augmentation de la température et de la photopériode. Une grande partie du carbone fixé par la production primaire étant sécrété sous forme d'EPS (1 à 73 %, selon les études, dans les EPS colloïdaux ; médiane vers 40 % ; Underwood & Paterson, 2003), il est logique d'observer que les paramètres contrôlant la production primaire influencent également la production d'EPS.

D'autres facteurs sont également à prendre en compte. L'étude à Chausey montre ainsi un possible impact de la consommation du biofilm sur les concentrations d'EPS ; en effet, à certaines périodes, ces concentrations étaient supérieures en présence de structures biogéniques (qui protègent le biofilm de la consommation ; Woodin, 1978) qu'en leur absence. Les expériences en laboratoire présentées dans le chapitre IV ont permis de mieux caractériser cet effet. De manière surprenante, la présence de consommateurs n'a pas toujours un effet négatif sur la présence des microorganismes et la production d'EPS. La première expérience a montré qu'en présence de nématodes, qui constituent souvent l'essentiel de la méiofaune (Higgins & Thiel, 1988), la prolifération bactérienne est stimulée ; cependant, les bactéries ne produisent pas plus d'EPS, ce qui peut être liée à une régulation par les molécules du quorum sensing. La deuxième expérience s'est intéressée au rôle des vers *Hediste diversicolor*, qui appartiennent à la macrofaune, sur des biofilms microphytobenthiques. La présence de vers semble, malgré leur consommation du biofilm, stimuler à la fois la croissance du microphytobenthos et leur production d'EPS, grâce en particulier à leur activité de bioturbation.

Cependant, l'expérience présentée dans le chapitre IV utilisait les vers *H. diversicolor* à une densité d'environ 50 ind·m⁻², alors que ces vers peuvent atteindre des densités de 35000 ind·m⁻² (Scaps, 2002). À ces fortes densités, la pression de consommation est intense et l'effet inverse peut être observé, avec

une diminution de la quantité de microorganismes et d'EPS dans le sédiment, voire une disparition totale du biofilm (Bernhard & Bowser, 1992). Les densités et comportements des consommateurs du biofilms sont eux-mêmes affectés par la présence de leurs prédateurs, ce qui peut aboutir à des effets de cascades écologiques. Daborn et al. (1993) ont par exemple démontré que la présence saisonnière d'oiseaux migrateurs peut modifier la stabilité du sédiment, via leurs relations trophiques. En effet, les oiseaux modifient l'abondance et le comportement du copépode *Corophium volutator*, lui-même consommateur et perturbateur du biofilm. Ces oiseaux influencent ainsi, indirectement, la quantité d'EPS dans le sédiment, et par là même la stabilité de ce dernier.

Composition des EPS

La composition des EPS est extrêmement variable, ce qui est lié en partie à la diversité de l'assemblage producteur (Decho, 1990, Hoagland et al., 1993). Cette composition varie également de manière saisonnière, ce qui a pu être mis en évidence par le suivi annuel réalisé sur l'archipel de Chausey (chapitre II). Deux paramètres montrent cette évolution : d'une part, le rapport des concentrations en glucides et en protéines (Fig. II.13.c) ; d'autre part, la composition en monosaccharides des glucides (Fig. II.8). Le rapport glucides / protéines peut être révélateur de la part relative des bactéries et du microphytobenthos dans la production d'EPS, les bactéries produisant plus de protéines que le microphytobenthos (Decho, 1990). Notre étude a démontré que cette observation, réalisée essentiellement en laboratoire, est également valable *in situ*, et qu'une diminution du rapport glucides / protéines peut être mise en relation avec une dégradation accrue dans le sédiment. La composition en monosaccharides peut également être révélatrice de l'identité des producteurs (Oakes et al., 2010) ; cependant, les résultats du chapitre II montrent que cette composition est davantage liée à des paramètres environnementaux, en particulier ceux contrôlant la photosynthèse, qu'à la composition de l'assemblage microbien. Les deux fractions étudiées (colloïdale

et liée) s'enrichissent ainsi fortement en glucose en été, ce qui semble être une conséquence de l'augmentation de la production photosynthétique (de Brouwer & Stal, 2001, Bellinger et al., 2005, Hanlon et al., 2006) et de la sénescence des diatomées, qui libèrent alors dans le milieu leur polymère de réserve, la chrysolaminarine, essentiellement composée de glucose (Chiovitti et al., 2004).

Ce suivi a également démontré que les deux fractions étudiées (glucides colloïdaux et liés) ont des compositions différentes en monosaccharides, quelle que soit la saison observée, ce qui rejoint les autres observations effectuées à ce jour en milieu naturel (Taylor et al., 1999, Pierre et al., 2010) ou en culture (Hoagland et al., 1993, Underwood & Paterson, 2003). Comme le suggèrent les comportements différents des fractions colloïdales et liées par rapport à la lumière, ces deux fractions semblent donc contrôlées de manière indépendante. Par ailleurs, ces variations de composition leur confèrent des propriétés variables, qui expliquent leurs différences de structure et de fonction. Par exemple, les EPS colloïdaux, qui contiennent plus de glucose, sont généralement plus faciles à dégrader que les EPS liés (Taylor et al., 1999).

Par ailleurs, la composition des EPS n'est pas déterminée uniquement par les organismes producteurs. En effet, la dégradation et/ou l'assimilation dont les EPS font l'objet va affecter non seulement leur concentration dans le sédiment, mais également leur composition chimique. L'expérience présentée dans le chapitre III, partie 2, a montré que la composition des EPS contenus dans un sédiment (telle que caractérisée par la composition en monosaccharides des glucides) évolue au cours du temps en présence de consommateurs : ceci est le résultat de la dégradation et de l'assimilation préférentielle de certains monomères par rapport à d'autre, ainsi que de la production éventuelle de mucus par les consommateurs.

Dégradation des EPS

Une fois excrétés dans le sédiment, les EPS ont plusieurs devenir possibles. Les premiers mettent en jeu des processus purement abiotiques. Par

exemple, la quantité d'EPS dans le sédiment tend à diminuer à l'immersion, ce qui est lié au lessivage du sédiment : les EPS passent dans l'eau et sont ainsi exportés vers la colonne d'eau (Orvain et al., 2003, Hanlon et al., 2006). Ce processus dépend de la composition des EPS et de l'assemblage producteur (Cook et al., 2007). Les EPS peuvent également être dégradés par la lumière (Moran et al., 2000).

Les paramètres biotiques vont aussi influencer le devenir des EPS. Une première étape possible est la dégradation des EPS par les bactéries, grâce à la sécrétion dans le milieu d'exo-enzymes d'hydrolyse (Hoppe, 1983, Laspidou & Rittmann, 2002). Ces enzymes en particulier peuvent servir à dégrader glucides et protéines ; leur rôle dans la dégradation des EPS apparaît crucial puisqu'il semble que la dégradation par la β -glucosidase soit l'étape limitant la dégradation des glucides dans les EPS (McKew et al., 2013). Notre étude en milieu naturel (chapitre II, partie 2) a permis de montrer une évolution saisonnière des activités exo-enzymatiques de dégradation des glucides et des protéines, avec une augmentation des activités en été, et un pic à la fin de l'automne. Les analyses en parallèle de la concentration et de la composition en EPS des sédiments suggèrent que les activités exo-enzymatiques dépendent à la fois de la quantité et de la qualité des EPS. Par exemple, les portions de glucides contenant certains monosaccharides, comme le glucose, sont plus aisément dégradés et assimilés que d'autres, comme celles contenant beaucoup de desoxy-monosaccharides (Girollo et al., 2003, Bellinger et al., 2009). Le glucose et le galactose constituent en effet des points faibles dans les polymères, c'est-à-dire des points d'accès pour les exo-enzymes de dégradation (Taylor et al., 2013). La dégradation va aussi dépendre de la structure du polymère (Haynes et al., 2007, Bellinger et al., 2009).

Les conditions physicochimiques du sédiment vont aussi influencer la dégradation ; par exemple, la dégradation de la matière organique est généralement plus lente en conditions anoxiques (Sun et al., 1997), sauf pour les composés réfractaires (McKew et al., 2013). L'effet de l'environnement

physicochimique peut être lié à une modification du métabolisme des organismes, mais aussi à la mise en place d'une communauté spécifique à ces conditions (McKew et al., 2013).

LES EPS DANS LES ÉCOSYSTÈMES : INTERACTIONS TROPHIQUES ET NON TROPHIQUES

Les EPS, ressources trophiques

La dégradation des EPS est essentiellement réalisée par les bactéries, qui sont ainsi les principaux consommateurs d'EPS : le recyclage se fait au sein même du biofilm (Cook et al., 2007). Ce transfert de carbone a pu être analysé grâce à des isotopes marqués ; ces expériences ont montré un transfert massif et rapide du carbone fixé par les diatomées vers les bactéries (Middelburg et al., 2000, Cook et al., 2007, Oakes et al., 2010, Taylor et al., 2013). Ainsi, en présence d'EPS marqués, 4 à 6 h seulement sont nécessaires pour que les acides gras des membranes bactériennes incorporent le marquage (Taylor et al., 2013). Plus de 60 % du carbone fixé par le microphytobenthos est ainsi transféré vers les bactéries en 36 h (Oakes et al., 2010). Au sein du biofilm, les EPS peuvent également être consommés par les diatomées, qui sont capables d'incorporer du carbone marqué à partir d'EPS (Taylor et al., 2013). Cette consommation est cependant très faible par rapport à celle des bactéries. En cas de limitation en nutriments dans le biofilm, le couplage entre diatomées et bactéries, via d'une part la sécrétion et d'autre part la consommation des EPS, devient plus fort (Cook et al., 2007). La dégradation des EPS est réalisée à la fois par des bactéries généralistes et par quelques groupes de bactéries spécialistes (Haynes et al., 2007, Taylor et al., 2013). L'ajout d'EPS dans un sédiment modifie ainsi la structure, la production et l'abondance des assemblages bactériens présents et actifs (Haynes et al., 2007).

Les bactéries ayant assimilé les EPS peuvent ensuite être consommées par des organismes des niveaux trophiques supérieurs ; ces derniers peuvent également se nourrir directement sur les EPS. Cependant, les résultats

présentés au chapitre III montrent que, dans nos conditions environnementales, la consommation d'EPS par l'annélide polychète *Hediste diversicolor* est très faible, les vers se nourrissant essentiellement du microphytobenthos. Un transfert de carbone via les bactéries a été mis en évidence, mais il impliquait une moindre quantité de carbone. Pour cette espèce, les EPS ne semblent donc pas constituer une ressource trophique. Des résultats similaires avaient été démontrés chez le bivalve déposivore et suspensivore *Macoma balthica* (Harvey & Luoma, 1984). Pourtant, l'espèce *Hediste diversicolor* est assez opportuniste (Scaps, 2002) ; on s'attendait à ce que ces vers qui ont une grande plasticité trophique consomment des EPS quand ceux-ci constitue la seule ressource trophique possible, même s'ils préfèrent les microorganismes si ces derniers sont présents. Ces résultats montrent que la consommation d'EPS requière non seulement un type trophique permettant de les ingérer, mais également les enzymes digestives nécessaires à leur assimilation (Harvey & Luoma, 1984).

Les EPS ne constituent donc pas une source trophique universelle, mais peuvent être consommés directement par certains organismes de la méiofaune (Decho & Moriarty, 1990) et de la macrofaune (Baird & Thistle, 1986), ou indirectement via la consommation de bactéries ayant dégradé les EPS. En milieu naturel, il semble ainsi que le carbone fixé par les diatomées et sécrété sous forme d'EPS soit utilisé dans les réseaux trophiques. En effet, du carbone marqué fixé par les diatomées et sécrété peut être transféré aux consommateurs supérieurs en moins de 2 h (Middelburg et al., 2000). Ce marquage dure dans le temps, ce qui semble être lié à une consommation initiale du microphytobenthos et de ses sécrétions, puis à une consommation des bactéries marquées car ayant consommé des EPS (Middelburg et al., 2000). Les nématodes, qui constituent souvent une grande partie de la méiofaune (Higgins & Thiel, 1988), peuvent également consommer ces EPS (Middelburg et al., 2000). Enfin, les bactéries qui dégradent les EPS transfèrent ensuite le carbone vers les détritus (Veuger et al., 2012), qui peuvent alors être consommés par des

détritivores. Ces bactéries peuvent également produire des EPS, qui sont alors dégradés et assimilés par d'autres bactéries (Bellinger et al., 2009).

EPS et stabilité du sédiment

La stabilité du sédiment est un des paramètres gouvernant la composition des assemblages benthiques ; les organismes ayant un effet sur la stabilité du sédiment ont tendance à exclure les organismes ayant un effet inverse, et à favoriser le recrutement et la croissance d'organismes ayant le même effet qu'eux (Woodin & Jackson, 1979). Ainsi, l'exclusion d'un organisme bioturbateur d'une zone intertidale expérimentale peut radicalement modifier les propriétés sédimentaires et les assemblages benthiques dans cette zone (Volkenborn & Reise, 2006, Volkenborn et al., 2007, Volkenborn & Reise, 2007, Volkenborn et al., 2009).

La stabilité du sédiment est généralement mise en relation avec le contenu en EPS de ce dernier, la stabilité augmentant avec la concentration de ces molécules aux propriétés adhésives (Paterson et al., 2000, Yallop et al., 2000, de Brouwer et al., 2002, Friend et al., 2003, Andersen et al., 2010). Les résultats présentés dans le chapitre IV, partie 2, sont cohérents avec ces observations : la stabilité du sédiment est maximale là où les concentrations d'EPS sont maximales, malgré la présence d'un organisme bioturbateur. En stimulant la croissance du microphytobenthos, cet organisme contribue de fait à la stabilisation du sédiment, ce qui n'aurait pu être déduit de l'observation de son seul comportement. Les résultats du suivi en milieu naturel (chapitre II) suggèrent également une stabilité qui évolue saisonnièrement, en parallèle des concentrations en EPS ; ceci est vrai pour le printemps et le début de l'été, les comparaisons n'ayant pu être réalisées pour la suite du suivi. Cependant, ces résultats montrent également des différences de stabilités entre enceintes expérimentales, malgré des concentrations en EPS similaires. De même, la composition des EPS ne semble pas expliquer des variations de stabilité, ce qui pointe l'importance de considérer d'autres facteurs pour comprendre les

mécanismes de contrôle de la stabilité du sédiment. Par exemple, la composition de l'assemblage microbien ou des autres assemblages benthiques peut altérer le lien entre EPS et stabilité. Enfin, les résultats présentés dans le chapitre IV, partie 2, montrent que les différents acteurs influençant la stabilité interagissent de manière complexe.

Du fait de leur effet sur la stabilité du sédiment, via la sécrétion de leurs EPS, les microorganismes modifient l'habitat disponible pour les autres organismes benthiques ; ils sont donc considérés comme des espèces ingénieures (Jones et al., 1994). Cette appellation a été proposée à la fois pour les diatomées et pour les bactéries (Gerbersdorf et al., 2008, Gerbersdorf et al., 2009, Lubarsky et al., 2010, Stal, 2010). Il est de plus intéressant de noter que ces différents groupes d'ingénieurs ne sont pas indépendants les uns des autres. En effet, outre le couplage trophique décrit précédemment, il apparaît que les bactéries sont nécessaires à la mise en place des biofilms de diatomées (Bruckner et al., 2008) et que la composition des assemblages bactériens dépend de celle des assemblages de diatomées (Schäfer et al., 2002).

Ainsi, EPS et microorganismes se trouvent au cœur de réseaux d'interactions complexes, qui vont affecter non seulement la dynamique des EPS dans le sédiment, mais également le rôle de ces derniers dans les écosystèmes. Une vue schématique de ces interactions est présentée dans la Fig. 1.

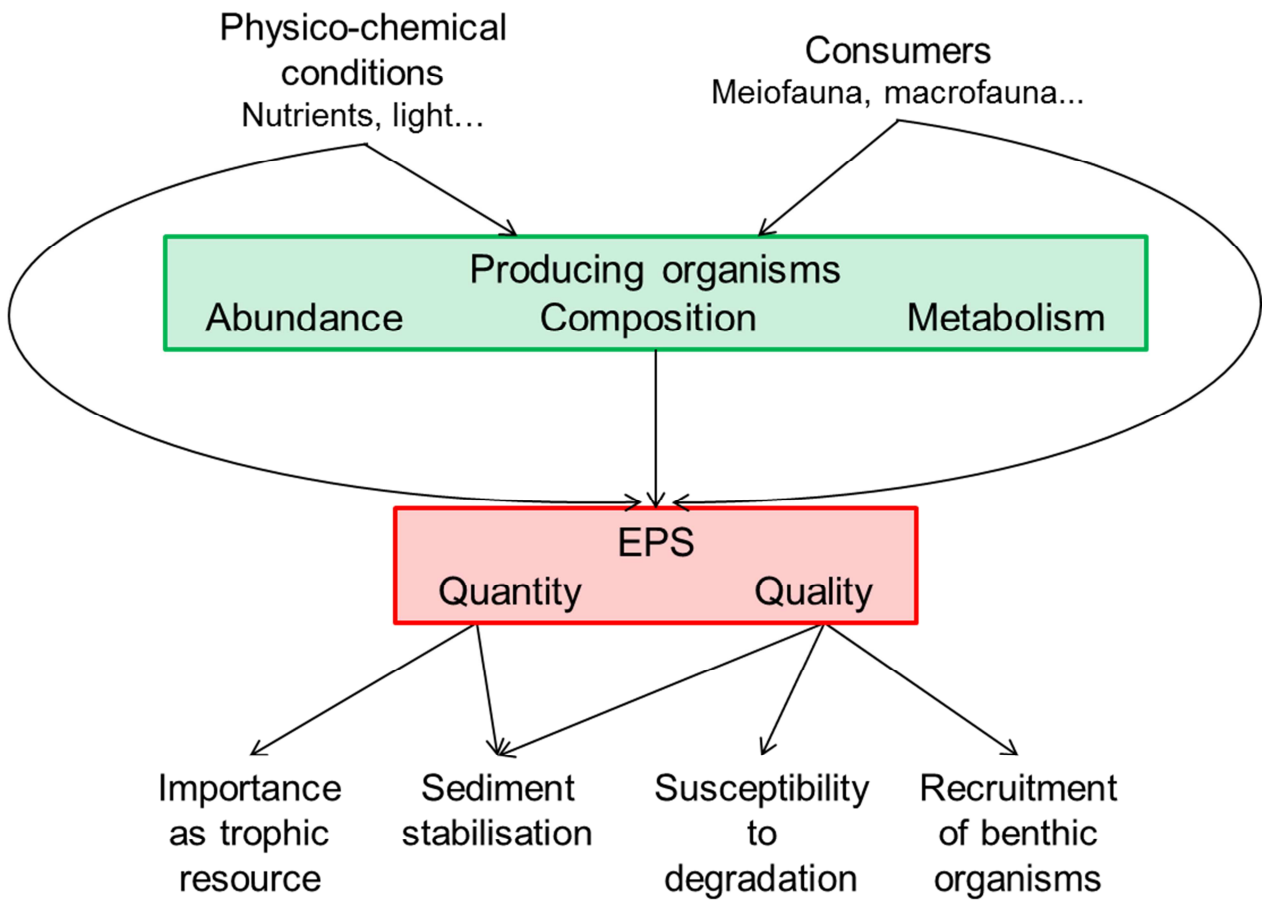


Fig. 1 : schéma simplifié résumant les liens entre EPS, organismes producteurs, conditions environnementales et rôles des EPS dans les écosystèmes.

Fig. 1: simplified diagram illustrating the links between EPS, producing organisms, environmental conditions and EPS roles in ecosystems.

LES MICROORGANISMES DU BIOFILM, DES ESPÈCES INGÉNIEURES COOPÉRATIVES

Les nombreuses interactions trophiques et non trophiques mises en évidence dans la thèse, ainsi que dans des résultats antérieurs (stage de master) ont permis de démontrer l'implication des biofilms dans des cascades de modification d'habitat (habitat cascade ; Thomsen et al., 2010), ainsi que de proposer le concept d'espèces ingénieures coopératives (cooperative exosystem engineers; Passarelli et al., 2013) dans un article publié dans *Journal of Sea Research* et reproduit ci-après.

RÉSUMÉ

L'importance des interactions positives et des espèces ingénieuses dans la structuration des communautés est de plus en plus reconnue pour de nombreux écosystèmes. Par exemple, de nombreuses espèces ingénieuses se développent en zone intertidale à sédiments meubles, où elles jouent un rôle crucial dans la structuration des communautés et le fonctionnement de l'écosystème ; cela est probablement lié aux conditions de vie difficiles dans ces milieux, où la facilitation va donc être un processus important. La zone intertidale est donc un milieu intéressant pour décrypter comment les espèces ingénieuses interagissent, et les conséquences de ces interactions sur la dynamique des communautés. Dans cette revue, nous commençons par examiner l'influence de deux types d'espèces ingénieuses particulièrement communes en zone intertidale sur les systèmes benthiques. D'abord, nous examinons les espèces qui construisent des structures biogéniques, ces structures constituant souvent les seules sources de complexité de l'habitat dans ces environnements. Puis, nous nous intéressons aux espèces dont l'activité influence la stabilité du sédiment, qui est un facteur structurant crucial pour la dynamique des communautés en zone intertidale. Les impacts de ces espèces ingénieuses sur leur environnement biotique et abiotique sont décrits, de même que les interactions potentielles entre ces espèces. Une « cascade d'habitat » (habitat cascade) se met en place quand une espèce ingénieuse favorise le développement d'une deuxième, qui à son tour crée ou modifie l'habitat d'autres espèces. De plus, les interactions non-hiérarchiques aboutissent généralement au développement d'effets non additifs, si bien que l'effet de l'association ne peut être prédit à partir des effets de chaque espèce individuellement. Dans cette revue, nous proposons l'expression « d'espèces ingénieuses coopératives » (cooperative ecosystem engineering) pour décrire ce qu'il se passe quand deux espèces interagissent de manière à ce que l'effet combiné des deux espèces structure d'avantage l'habitat que ce qui pourrait être attendu de la somme des effets individuels. Finalement, nous concluons en décrivant des menaces potentielles pour les espèces ingénieuses en zone intertidale, leurs effets sur l'interaction entre ces espèces, leur influence sur les communautés et le fonctionnement de l'écosystème.

ORGANISMS AS COOPERATIVE ECOSYSTEM ENGINEERS IN INTERTIDAL FLATS

Claire Passarelli, Frédéric Olivier, David M. Paterson, Tarik Meziane, Cédric Hubas

ABSTRACT

The importance of facilitative interactions and organismal ecosystem engineering for establishing the structure of communities is increasingly being recognised for many different ecosystems. For example, soft-bottom tidal flats host a wide range of ecosystem engineers, probably because the harsh physico-chemical environmental conditions render these species of particular importance for community structure and function. These environments are therefore interesting when focusing on how ecosystem engineers interact and the consequences of these interactions on community dynamics. In this review, we initially detail the influence on benthic systems of two kinds of ecosystem engineers that are particularly common in tidal flats. Firstly, we examine species providing biogenic structures, which are often the only source of habitat complexity in these environments. Secondly, we focus on species whose activities alter sediment stability, which is a crucial feature structuring the dynamics of communities in tidal flats. The impacts of these engineers on both environment and communities were assessed but in addition the interaction between ecosystem engineers was examined. Habitat cascades occur when one engineer favours the development of another, which in turn creates or modifies and improves habitat for other species. Non-hierarchical interactions have often been shown to display non-additive effects, so that the effects of the association cannot be predicted from the effects of individual organisms. Here we propose the term of “cooperative ecosystem engineering” when two species interact in a way which enhances habitat suitability as a result of a combined engineering effect. Finally, we conclude by describing the potential threats for ecosystem engineers in intertidal areas, potential effects on their interactions and their influence on communities and ecosystem function.

INTRODUCTION

Interspecific competition has long been considered as the main process structuring communities. Yet, in the last decades, the potential role of positive interactions between species has been increasingly recognised. Positive interactions involve at least two organisms, and benefit one or more organisms without negatively affecting any other organism (Bertness & Leonard, 1997). Positive interactions can be direct or indirect, obligatory or facultative and may be trophic or not. Among them, facilitative interactions describe non-trophic interactions where organisms promote, through their presence or activity, the settlement or development of other species. Facilitation and competition often occur simultaneously in communities, and the nature of the interaction between two individuals can even change according to growth stage or environmental conditions (Callaway & Walker, 1997). Also, indirect facilitation of a species by another can offset the negative effects of competition between these organisms.

In this context, species contributing to the creation, modification or maintenance of habitats, and therefore having a crucial effect on other species, have been defined as ecosystem engineers by Jones et al. (1994). Ecosystem engineers can be found in terrestrial and aquatic ecosystems: for instance, earthworms that alter the composition of soils, beavers that create dams and seagrasses that modify local hydrodynamics (Fonseca et al., 1982), stabilise sediment (Gacia & Duarte, 2001), and provide a substratum for epibionts, are often referred to as ecosystem engineers. These can either transform living or non-living material in the environment from one physical state to another, or modify, through their physical presence and activity, the access to resources for other organisms. For instance, benthic macrofauna change the physical, chemical and biological properties of sediment through bioturbation (Braeckman et al., 2010), and thus are defined as allogenic ecosystem engineers. In contrast, submerged macrophytes, through their own

structure, attenuate the light available for benthic organisms (Lee et al., 2001) and are therefore defined as autogenic ecosystem engineers.

The engineering effect may vary according to the considered species, and is therefore not always positive for the community in terms of diversity or abundance. For example, the exclusion of the lugworm *Arenicola marina* from intertidal sediment facilitates the development of tube-building worms, but hinders the settlement and growth of subsurface deposit feeders (Volkenborn & Reise, 2007). However, at large spatial and temporal scales, the overall impact of ecosystem engineers on ecosystems is generally positive (Jones et al., 1997). The global effect of an ecosystem engineer will mainly depend on 6 factors: the spatial distribution of its population; its density; the time period over which a population has been present at a site; the durability of impacts in the absence of the original engineer; the *per capita* activity of individual organisms and its lifetime; and, finally, the number and type of resources modulated by the engineer, and the number of species depending on these flows (Jones et al., 1994, 1997). Most engineers modify their environment with small-scale processes, which ultimately affect ecosystem functioning; yet, there are still questions about the links between effects at small or large spatial scales.

When considering the importance on these non-trophic interactions, it might be appropriate to replace the well-known food web by a more complete interaction web (Lawton & Jones, 1995, Kéfi et al., 2012). For instance, the influence of bioturbating worms on microphytobenthos cannot be easily predicted without considering non-trophic interactions (Fig. 2, Passarelli et al., 2012a). These authors demonstrated that while worms consume microphytobenthos, they also stimulate microalgal growth through indirect facilitation, including mechanisms such as bioturbation redistributing nutrients.

Habitat creation, modification, and facilitation processes are crucial in some specific ecosystems. Indeed, biogenic habitat alterations can increase local diversity by allowing immigration of less well-adapted species by moderating harsh conditions

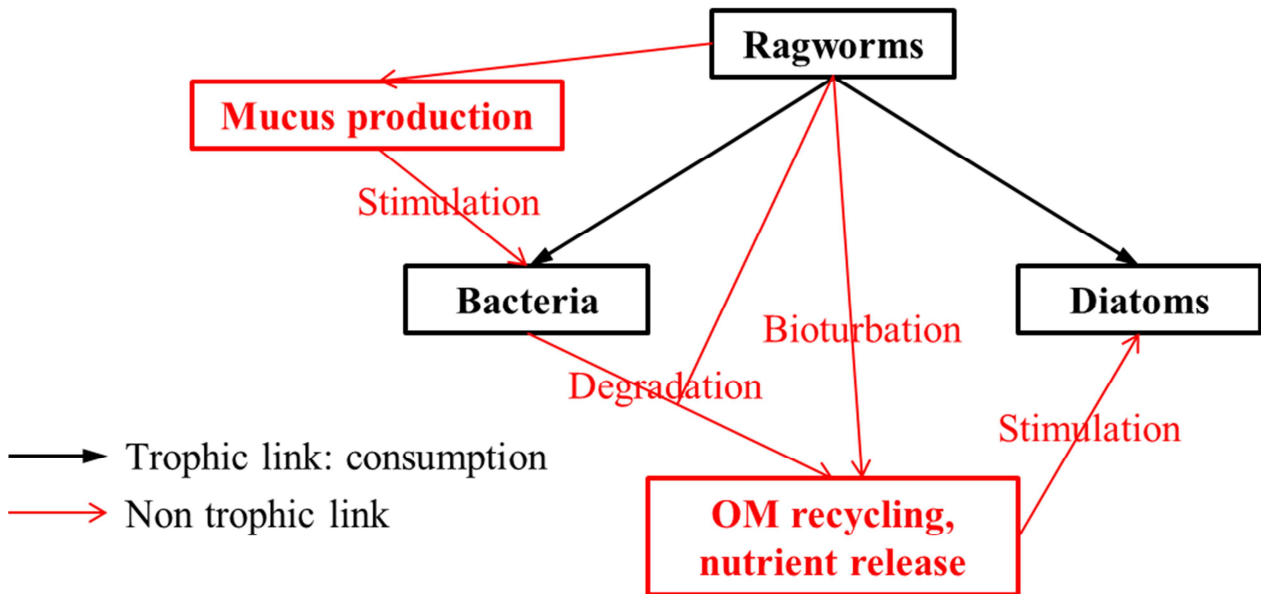


Fig. 2: trophic web (in black) and interaction web (whole diagramm) in a simplified benthic system with ragworms, diatoms and bacteria. Results from Passarelli et al., 2012a.

Fig. 2 : réseaux trophique (en noir) et d'interactions (schéma entier) dans un système benthique simplifié contenant des vers *Hediste diversicolor*, des diatomées et des bactéries. Résultats issus de Passarelli et al., 2012a.

(Bertness & Leonard, 1997, Hacker & Gaines, 1997). Therefore, ecosystem engineers play critical roles in intertidal areas, where species are subject to a large range of physical stresses: desiccation, variations of salinity and temperature (Little & Kitching, 1996). Also, numerous studies have shown the importance of facilitation and ecosystem engineering in these environments (Bertness & Leonard, 1997). The presence or absence of a single critical species can completely alter the structure of the whole community. For instance, the long-term exclusion of the bioturbating worm, *A. marina*, from a tidal flat modifies sediment properties, microbial and macrofaunal communities, by stimulating the development of sediment-stabilising organisms which are naturally excluded where *A. marina* is dominant (Volkenborn et al., 2007, Volkenborn & Reise, 2007, Volkenborn et al., 2009). Such transitions between two stable ecosystem states are often prompted by positive feedback mechanisms, where organisms belonging to each community stimulate the development of its own community (Wilson & Agnew, 1992). For

instance, the development of diatom biofilms on tidal flats will contribute to sediment stabilisation, therefore limiting the erosion of their own habitat, and stimulating their own population growth (van der Heide et al., 2007).

The common occurrence of ecosystem engineers in intertidal flats makes it an interesting system to study such interactions. These species are likely to interact in a manner which makes it difficult to differentiate the overall engineering effect of the association from the contribution of the individual species. This review focuses on soft-bottom intertidal areas in temperate waters, where numerous ecosystem engineers have been studied and described (Table 1). In this short review, we do not try to address every possible example but concentrate on systems that, in our experience, serve to highlight the co-engineering concept. Once introduced, this approach should be relevant to many other systems not considered in detail here, such as coral reef (Bozec et al., 2013), mussel and oyster beds (Lejart & Hily, 2011, Grant et al., 2012) among others. In addition, there is no reason to limit the approach to marine systems and expect terrestrial examples to emerge. Therefore, the role of some biogenic structures, which provide habitat complexity, is described first as spatial complexity that is important in maintaining local diversity (Zühlke et al., 1998, Bouma et al., 2009). The second part of the review will then focus on the ecosystem engineers which promote sediment stabilisation or destabilisation, and affect the settlement and growth of a large range of other species. Finally, the interaction of the engineers and the consequences that can be expected at a community level will be discussed. In each of the first two sections, diversity of engineers will be quickly addressed but most attention will be given to common engineers, whose interactions with other species are numerous, and this will be discussed in the third section. Specifically, the influence of annelid tubes and biofilms as ecosystem engineers will be thoroughly investigated, and their possible cooperative engineering effect will be demonstrated.

Table 1: some examples of ecosystem engineers in tidal flats and their impact on their environment. Associated references.

Table 1 : exemples d'espèces ingénieures en zone intertidale, et effet sur leur environnement. Références associées.

Engineer	Activity	Impact	References
Polychaete <i>Lanice conchilega</i>	Tube building	Modification of hydrodynamics	Rabaut et al., 2007
	Piston pumping of O ₂ into sediment	Modification of O ₂ repartition in sediment	Forster and Graf, 1995
Meiofauna	Bioturbation	Increase of nutrient fluxes in sediment	Aller and Aller, 1992
Macrofauna	Bioturbation	Increase in OM remineralisation and nutrient turnover	Braeckman et al., 2010
Polychaete <i>Nereis diversicolor</i>	Burrow construction	Increase in O ₂ concentrations in sediment Increase of nutrients fluxes towards water column	Scaps, 2002
Kelp macroalgae	Presence	Modification of wave and current dynamics	Eckman et al., 2003
<i>Zostera</i> sp.	Presence	Modification of hydrodynamics	Lee et al., 2001; van der Heide et al., 2007
Bacteria	Biofilm production	Sediment stabilisation	Gerbersdorf et al., 2008
Microphytobenthos	Biofilm production	Sediment stabilisation	Holland et al., 1974 Lubarsky et al., 2010
Polychaete <i>Arenicola marina</i>	Bioturbation and bioirrigation	Modification of physico-chemical properties of sediment	Volkenborn et al., 2007
	Formation of coiled faecal casts	Modification of hydrodynamics	Friedrichs and Graf, 2009
Salt marsh plants	Presence	Increase of habitat complexity Buffer of salinity and temperature Modification of hydrodynamics	van der Wal and Herman, 2012
Polychaete <i>Diopatra cuprea</i>	Tube building	Supply of substrata Predation refugia	Berke, 2012
Oyster <i>Crassostrea giga</i>	Reef formation	Increase of substratum complexity Supply of substrata	Lejart and Hily, 2011

ECOSYSTEM ENGINEERS PROVIDING BIOGENIC STRUCTURES

For numerous benthic organisms, access to oxygen, nutrients or food resources is highly dependent on fluid dynamics at the sediment water interface. Any organism capable of locally modifying the pattern of benthic boundary layer (BBL) flows by its presence or activity is therefore likely to act as an ecosystem engineer in an intertidal system. For instance, blades of the seagrass *Zostera marina* are able to modify the BBL dynamics within the seagrass bed affecting a large range of macrofaunal organisms (Lee et al., 2001). For tube-building species, such as the polychaete *Owenia fusiformis*, tube density will control characteristics of BBL flows in intertidal areas (Eckman et al., 1981); polychaete tubes are often the main structuring elements of soft-bottom tidal flats and have therefore been extensively studied in the past decades (Luckenbach, 1986, Zühlke et al., 1998). More recently the importance of maerl beds, created by the branching of calcareous algae, has been recognised as important on a European scale (Wilson et al., 2004). Like tube-fields these habitats enhance local biodiversity (Jackson et al., 2004) and often provide protection for commercially important species (Kamenos et al., 2004, Nelson, 2009). It should be noted that in some instances it is not necessary for the structuring organism to be alive to have the effect. Relict tube-fields still influence hydrodynamics while the calcareous remain of coralline algae from the maerl beds still protect benthic habitat although no longer active. The structures built by organisms have been defined as biogenic structures; polychaete tubes are a well-known example but illustrations are much more diverse, including mollusc shells, coiled faecal casts, maerl and furrows (Fig. 3).

Some of these engineers have a dual effect on benthic ecosystems: one is related to their impact on the surface roughness element, which modifies water flow at the BBL; while the second is related to the organism's biological activity. For instance, kelp macroalgae produce large quantities of exudates (Abdullah & Fredriksen, 2004) which can be consumed by other organisms and *Lanice conchilega* pumps water into



Fig. 3: diversity of biogenic structures. a. Mollusc shell. b. Macroalgal fragment. c. Tube of *L. conchilega*. d. *Z. marina*.

Fig. 3 : diversité des structures biogéniques. a. Coquille de mollusque. b. Fragment de macroalgue. c. Tube de *L. conchilega*. d. *Z. marina*.

the sediment thus affecting O_2 distribution and the turnover of organic matter (Forster & Graf, 1995, Braeckman et al., 2011). However, most studies comparing the net effect of the whole organism with the influence of the roughness elements alone showed that the effect of these engineers was mainly due to the physical structure (Thistle et al., 1984, Callaway, 2003). Therefore, the influence of different artificial structures, or roughness elements, on water flow has been extensively used as model system to characterise the nature of such effects in flume experiments (Eckman et al., 1981, Nowell & Jumars, 1984, Luckenbach, 1986, Friedrichs et al., 2000, Wilkie et al., 2012). Three distinct patterns have been demonstrated to occur, depending ultimately on the density of roughness elements. At very low densities, the overall effect of a given cluster of biogenic structures (individual elements) can be considered as the sum of individual effects: every structure modifies the near-bed flow dynamics but these perturbations do not interact with each other; however the individual local effect on the sediment (scour) can be severe. When densities increase, interactive flow is established within the group of elements. When this becomes significant, which induces turbulence, an overall destabilisation of the substratum occurs. At higher element densities, most of the flow passes above the biogenic structures, and water velocity at the sediment surface is reduced, the

turbulence being induced above the structure of the element (Paterson & Black, 1999). This “skimming flow” regime promotes both particle deposition and protection of the sediment. The threshold density of elements for reaching skimming flow will vary with the ambient velocity: for instance, Friedrichs et al. (2000) demonstrated that, for a current velocity of $5 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, skimming flow will develop as soon as roughness elements cover 2 % of the surface of sediment. Yet, further studies showed that effects on water flow may vary according to the shape of the structures, as well as their stiffness (Peralta et al., 2008, Friedrichs & Graf, 2009) making absolute prediction problematic.

Because of their effect on hydrodynamics, sediment stability and nutrient availability, biogenic structures affect both recruitment and growth of benthic organisms. The effects of these structures on macrofaunal communities have been extensively characterised, with special attention to annelid tubes. These structures modulate the recruitment of benthic macrofauna, mostly by facilitating their settlements (Gallagher et al., 1983). Yet, the effect is species-specific, and inhibitory interactions have also been demonstrated (Whitlatch & Zajac, 1985, Bolam & Fernandes, 2002). The abundance and diversity of macrofaunal assemblages increase within and upon biogenic structures, both in the short and long-term (Callaway, 2003, 2006, Rabaut et al., 2007). There are species specific variations, so that the structure of the community also changes when tubes are present (Zühlke, 2001, Callaway, 2003). Similar effects on macrofauna have been demonstrated for other engineers, such as *Z. marina* (Thistle et al., 1984, Lee et al., 2001). Other assemblages, particularly meiofauna, are also affected by polychaete tubes, but a general pattern is difficult to interpret as the effect of tubes on a species may vary according to its specific requirements regarding current velocity and organic matter content (Eckman, 1983). For instance, Zühlke et al. (1998) demonstrated that the abundance of a specific group of nematodes increases when tubes are present, while Passarelli et al. (2012b) showed a reverse tendency for most meiofaunal groups

excepting the foraminiferal assemblages. Finally, biogenic structures were shown to prompt a short-term increase of bacterial abundances in flume experiments (Eckman, 1985), while no effect of these structures was demonstrated *in situ* at a longer temporal scale (Passarelli et al., 2012b). Nevertheless, polychaete tubes were shown to stimulate the development of microalgal biofilms (Passarelli et al., 2012b).

The effects of roughness elements on hydrodynamics can explain most of their influence on communities; however, these general patterns can become more intricate as some biogenic structures may also act as a refuge (Woodin, 1978), and the associated species richness may increase when biogenic structures becomes more complex (Bell, 1985). Also, many studies demonstrated that the engineering effects on communities may vary according to seasons: similar experiments that run at different times of the year generated different results, but patterns of variations were difficult to decipher (Eckman, 1983, Bolam & Fernandes, 2002). Differential effects on recruitments and development may explain why the influence of the engineers on both abundance and composition vary seasonally (Callaway, 2006). In addition, temporal effects may be accentuated, as the ecosystem engineer itself is likely to show seasonal development or variations in growth. For instance, *L. conchilega* tubes may be destroyed by waves, storms or freezing events and this may have an impact even when tubes are often rebuilt in the following 24 hours (Zühlke, 2001). The seasonal and interannual dynamics of the engineer itself is likely to influence the composition and structure of benthic communities. For example, kelp forests damaged by winter storms take much longer to recover, and this can be affected by climatic conditions such as El Niño events (Dayton & Tegner, 1984).

SEDIMENT STABILITY IN COASTAL SEDIMENTS: A COMBINATION OF PHYSICO-CHEMICAL FACTORS AND ENGINEERING EFFECTS

In coastal habitats, sediment erodibility depends ultimately on the balance between multiple erosive and resistive forces. Though it is well known that hydrodynamics is the major erosive driver in coastal habitats as flow generates shear stress on surface sediment layers; sediment also displays various physical, geochemical and biological characteristics that promote resistance to erosion (Dade et al., 1992, Black et al., 2002, Grabowski et al., 2011). Assessing which factors are the major resistive forces is not straightforward as they have complex and sometimes antagonistic effects on sediment stability. In addition, how the different factors may interact to promote resistance to sediment erosion has seldom been studied.

Average particle grain size and particle size distribution (i.e., percentages of clay, silt and sand) are important physical variables in the sediment that reflect mostly the exposure to water movements due to wave action and currents (Raffaelli & Hawkins, 1996). Notably, sediment cohesion increases with the amount of clays because fine particles with a high surface to volume ratio are subject to hydrogen bonding and this inter-particle attraction is important in bed cohesion (Grabowski et al., 2011). The extent of the attraction varies with packing and physico-chemical conditions so pore-water content (which is correlated to bulk density and porosity of the sediment, Avnimelech et al., 2001) and salinity are crucial.

Furthermore, microbial secretions of extracellular polymeric substances (EPS: a general term for polymers secreted from cells) have been increasingly recognised as a major stabilising factor in coastal sediments (Decho, 1990). In intertidal ecosystems, earlier studies have shown that persistent diatoms' vertical-migrations rhythms within the sediment (Fauvel & Bohn, 1907, Palmer & Round, 1967) produce a mucilage that is responsible for the observed increased sediment stability (Paterson, 1989). This secretion induces the formation of an extensive matrix throughout the

sediment surface as well as fine strands that attach grains together (Fig. 4). Coastal ecosystems are indeed characterised by strong physical and geochemical gradients under varied geomorphological settings, which create a multitude of habitats and niches (Raffaelli & Hawkins, 1996). In response to these environmental stresses, microbes have developed different strategies. In this context, EPS secretion can be seen as a protection mechanism against resuspension but has many other important roles (Decho, 1990). The demonstration of this hitherto unrecognised capacity of microorganisms to promote resistance to erosion (and particularly of diatoms in tidal ecosystems and estuaries), gave rise to numerous studies and the general acceptance that microbial EPS are a major stabilising force in coastal ecosystems (Raffaelli & Hawkins, 1996, Gerbersdorf et al., 2008, Lubarsky et al., 2010, Stal, 2010); therefore organisms responsible for these secretions are now considered as crucial ecosystem engineers in tidal environments.

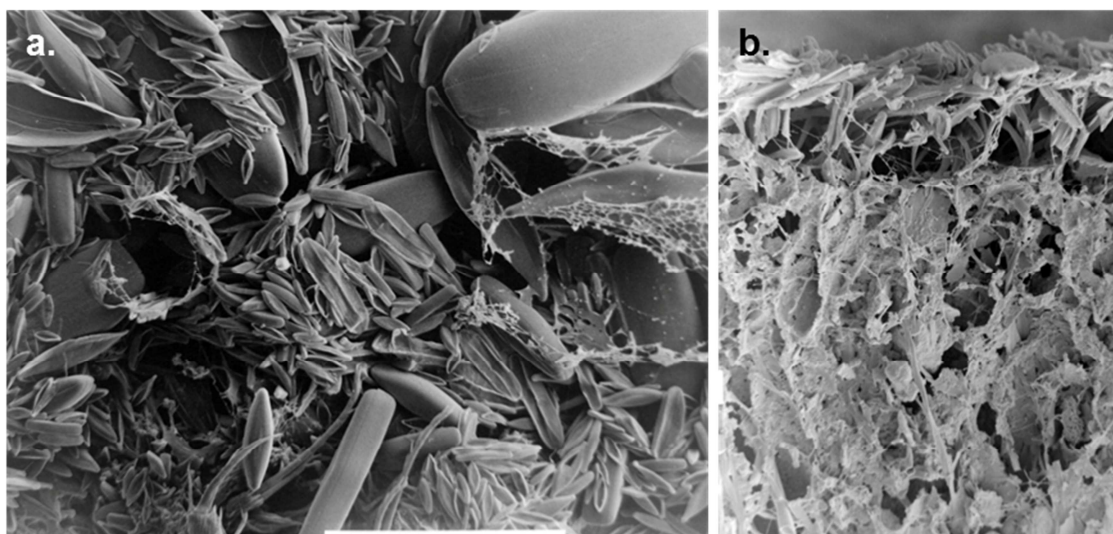


Fig. 4: LTSEM images of a microphytobenthic biofilm on sediment, showing the links between sediment particles through EPS. a. Surface of the biofilm. White bar: 100 μm . b. Fracture face; the sediment surface is at the top. White bar: 10 μm .

Fig. 4 : images en LTSEM (Low Temperature Scanning Electron Microscopy) d'un biofilm microphytobenthique sur du sédiment. Les EPS lient les particules sédimentaires entre elles sont visibles. a. Surface du biofilm. Bande blanche : 100 μm . b. Coupe ; la surface du sédiment est en haut de l'image. Bande blanche : 10 μm .

Extracellular Polymeric Substances (EPS) have multiple roles in aquatic systems: attachment to substrata, feeding sources, protection against desiccation / UV / pollution, adhesion of microbes to surfaces, development of biofilms, cell to cell communication (Decho, 1990, Leppard, 1995, Underwood & Paterson, 2003, Wotton, 2004, Hori & Matsumoto, 2010). In the Arctic Ocean, it is suggested that EPS play an important buffering and cryoprotectant role for diatoms, against harsh winter conditions of high salinity and potential ice-crystal damage (Krembs et al., 2002). EPS are primarily composed of polysaccharides, proteins, various glycoconjugates and other macromolecules such as nucleic acids and humic acids. EPS are classified into bound EPS (including tightly bound EPS such as capsular polymer or loosely bound EPS such as mucilage) and soluble EPS or colloidal fractions released into bulk water. Thus EPS display a great molecular complexity and diversity, and have a multitude of forms, size, and activities (Decho, 1990). Nevertheless, regardless of the diversity of specific structure, species diversity and chemistry of coastal biofilms, EPS are a unifying biofilm component on which the integrity of the assemblages depend. In coastal ecosystems, EPS that enhance mineral inter-particle cohesion consist mainly of colloidal high-molecular weight compounds and also of tightly wound capsules at the microbial cell surface (Decho, 1990). Other molecules such as exoenzymes (e.g., β -D-glycosidase, aminopeptidase) or signalling molecules (e.g., N-Acyl homoserine lactone which enables the coordination of group-based behavior based on bacterial population density) are also secreted outside the cell wall and thereby indirectly influence sediment stability (Decho, 2000).

Microorganisms are not the only engineers capable of altering sediment stability. Meiofauna are small benthic invertebrates that live in both marine and fresh water environments (McIntyre, 1969, Higgins & Thiel, 1988). The term was first introduced in 1942 by Mare and refers to a size class of organisms (between c.a. 45/63 μm and 500 μm /1 mm) rather than to a taxonomic group (Mare, 1942).

They are classically divided into two main categories (Giere, 2009): the permanent (which correspond to organisms that spent their entire life cycle in this size category) and temporary meiofauna (which corresponds to juvenile stages of larger organisms: i.e., macrofauna). Macrofauna refers therefore to larger organisms (i.e., retained on a mesh of 500 μm /1 mm) that live on or in sediment. These benthic organisms have contrasting effects on sediment biofilms; depending on their size, abundance and behaviour they can cause a destabilisation of the sediment and therefore of the associated biofilms.

Bioturbation refers to the biological reworking of sediments. Faunal activities, such as burrowing, ingestion and egestion of sediment particles (e.g. such as by the lugworm *A. marina*), construction and maintenance of galleries and burrows, alter bed topography and are highly destructive for biofilms and therefore increase erodibility (Andersen, 2001, de Deckere et al., 2001). But any attempt to classify macrofaunal organisms as a net destabiliser would be spurious. It has been proved that, despite an intense burrowing activity and a strong trophic pressure, the common ragworm *Hediste diversicolor* was able to enhance microbial activity and biofilm surface adhesion (Passarelli et al., 2012a). Indeed, bioturbators have strong implications for the biogeochemistry of sediments as they induce a modification of sediment texture, sediment compaction and porosity which in turn affect diffusion of solutes (Rhoads & Young, 1970, Gerino et al., 2003, Meysman et al., 2006). Bioturbation is therefore a major factor for molecular diffusion and solute transport in cohesive sediments, so that bioturbators have long been considered as engineers (Levinton, 1995). However, bioturbatory effects are likely to be less important in permeable sediments where wind, wave and tide driven currents are believed to be major drivers (Huettel & Webster, 2001). High levels of bioturbation may, in addition, make it difficult for juvenile macrofauna to remain in sediments or may otherwise mediate the immigration of new settlers (Olivier et al., 1996). Due to their small size, meiofauna organisms are generally not referred to as bioturbators

but there is evidence that they also change sediment texture, induce a bio-irrigation and displacement of microorganisms and sediment particles. Nematodes, for instance, may improve oxygen and nutrient distribution in sediments by microbioturbation (Alkemade et al., 1992) and Harpacticoid copepods have been shown to be significant bioturbators (Hicks & Coull, 1983). These irrigation activities by meiofauna organisms generally promote microbial remineralisation of organic matter (Aller, 1994).

Another modifying effect of macrofauna and meiofauna on biofilm may result from grazing on microbes and egestion of faeces and nutrients. For instance, nematodes affect bacterial activity and organic matter degradation. Even at relatively low densities, they can significantly impact bacterial community composition in a very species-specific way (De Mesel et al., 2004). In addition, modifications of microbial assemblages by macrofauna grazing pressure have also been recorded by *Hydrobia ulvae* and *Corophium arenarium* (Hagerthey et al., 2002). This can have important implications for food-web interactions and ecosystem functions such as sediments stability (Orvain et al., 2004), and may result from differential food preferences or from more indirect interactions (Moens et al., 2005). However, grazing by meiofauna organisms on microbes is generally not considered sufficient to hamper biofilm development (Montagna, 1984). In contrast, grazing can significantly enhance microbial development and EPS secretions (Hubas et al., 2010), by fragmentation of organic matter particles, by preventing bacterial assemblages from rapidly reaching carrying capacity, and, most probably, by excretion of N-rich compounds which stimulate microbial growth (Ingham et al., 1985, Ferris et al., 1998), particularly by diatoms.

During locomotion and/or feeding, many meiofauna and macrofauna species secrete significant amounts of mucus, which, depending on their diverse properties such as their solubility, may bind sediment particles together and thus improve cohesion (or nematode mucus secretion: Riemann & Schrage, 1978, e.g., mucus-net

feeding polychaetes: Jørgensen et al., 1984). It was suggested that nematode mucus tracks contain a substantial amount of polysaccharides which facilitate the development of specific strains of microbes (Moens et al., 2005), which are then grazed upon by the nematodes (i.e. mucus-trap hypothesis). Riemann and Helmke (2002) also suggested that several mucus secreting nematodes invest in a common enzyme pool with their “gardened” bacteria to enhance organic matter decomposition and therefore maximise nutrition and growth of both parties.

The complex interactions between different sediment physical, chemical and biological properties, which finally determine sediment stability, have been summarised (Fig. 5). It should be noted that the diverse organisms affecting sediment stability are likely to display seasonal variations, so that their effects and interactions might be temporally varied. Yet, if effects are strong enough, they will affect sediment stability on a yearly average basis. Stability is a critical factor for tidal flats because it modifies in depth the composition and depth of benthic communities (Reise, 2002) and the stability of surface biogeochemical gradients which dominate the microbial ecology of benthic systems. First, sediment stabilisation is often associated with an increase of the fine particle fraction, and grain size is a key factor determining the composition of meiofaunal assemblages (Giere, 1993), which can in turn affect macrofaunal recruitment (Watzin, 1983). Also, stabilising and destabilising species tend to exclude each other (Woodin & Jackson, 1979, Volkenborn et al., 2009), so that communities are highly dependent on the stabilisation state of the sediment, and therefore on the ecosystem engineers which determine this state.

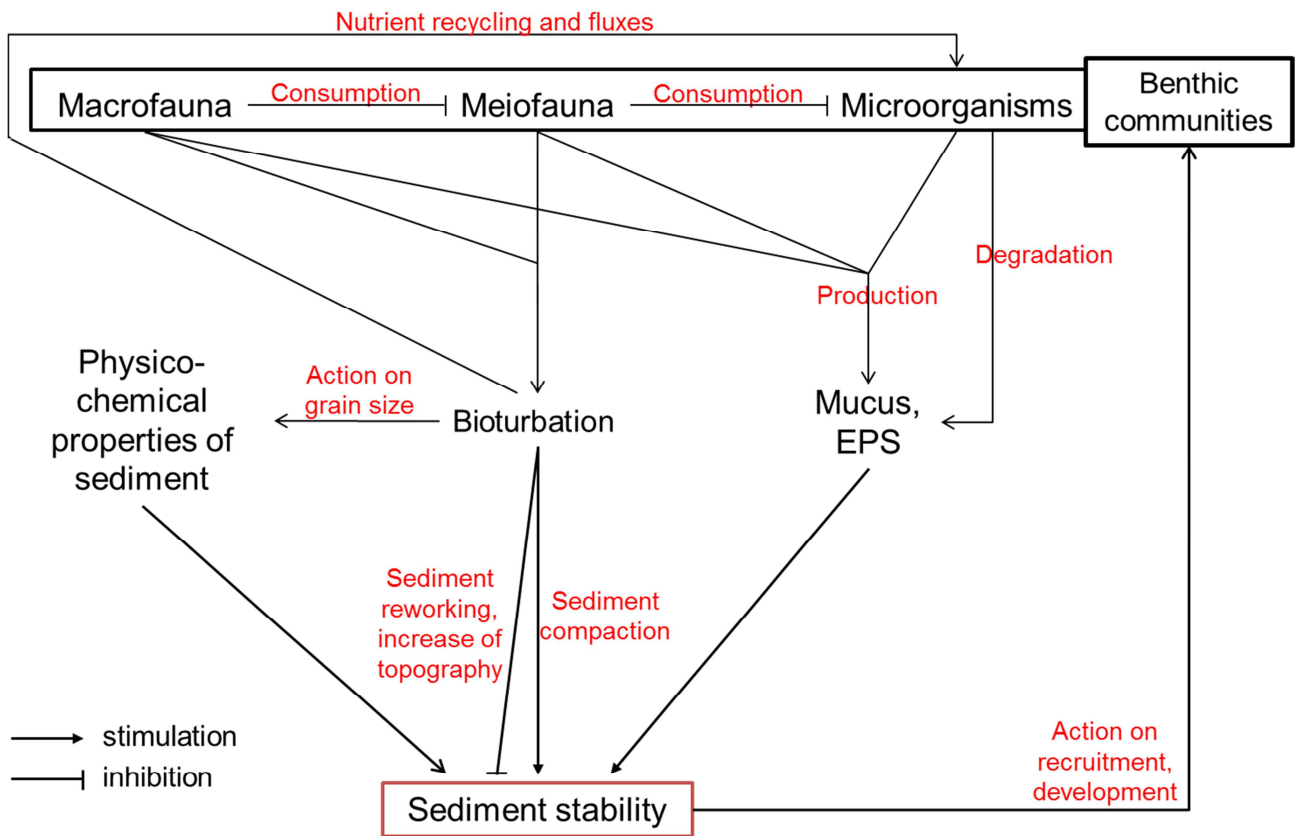


Fig. 5: interplay between sediment stability and benthic communities in intertidal environments. Hydrodynamic features have not been displayed.

Fig. 5 : interactions entre stabilité du sédiment et communautés benthiques. Les paramètres hydrodynamiques n'ont pas été représentés.

ASSOCIATIONS OF ECOSYSTEM ENGINEERS

The importance of ecosystem engineers for ecosystem functioning is now recognised, but data are missing on the potential interactions between two or more species of ecosystem engineers. The presence of one engineer may depend on the presence of others, forming what is called a “habitat cascade” (Altieri et al., 2007, Thomsen et al., 2010): a species promotes, through the modification of habitats, the development of another that in turn creates living space for different organisms. For instance, Altieri et al. (2007) demonstrated that cordgrass, by stabilising sediment with their roots, baffling wave impact and providing shade, promotes the development of a large assemblage of benthic organisms, including ribbed mussels. Those, in turn, provide a hard substratum and physical space for organisms like barnacles and amphipods. Such cascades are likely to have a crucial role for the development of benthic communities and examples are numerous. In the 1980s, Eckman et al. (1981) proposed that annelid tubes, by modifying the settlement of bacteria, may alter the recruitment of benthic organisms, as bacterial secretions often provide settlement cues. Invasive species may also drive large changes in benthic communities, by influencing the development or behaviour of a native ecosystem engineer, thereby transforming its influence on benthic assemblages (Gribben et al., 2009).

Non-hierarchical interactions between ecosystem engineers have also been demonstrated in the past years and studies show non-additive effects when two engineers impact the same habitat or resource (Crowe et al., 2011). For instance, Boyer and Fong (2005) studied the combined effects of the snail *Cerithidea californica* and the crab *Pachygraspus crassipes* on macroalgal cover and functional properties of a salt marsh. These authors demonstrated that crabs alone decrease macroalgal cover, while snails tend to increase it when macroalgae are at low density. Surprisingly, macroalgal cover was completely removed when both engineers were together. The authors pointed out that effects of both engineers together were not

possible to predict from the knowledge of individual effects. These non-additive influences on benthic assemblage properties (over and under yielding) and ecosystem functions are difficult to assess and yet, are likely to occur commonly in natural systems (Emmerson et al., 2001). Also, these non-additive effects have been demonstrated to vary according to environmental conditions and context (Bulling et al., 2008, Caliman et al., 2011): for instance, the interactions between three different bioturbators change with the available sediment volume. Temporal variations of these interactions have also been demonstrated (Berkenbusch & Rowden, 2007, Berkenbusch et al., 2007).

No authors have, to the best of our knowledge, tried to formally characterise the different kinds of interactions between ecosystem engineers and their potential effects on community composition and ecosystem functioning. However, Passarelli et al. (2012b) describe an association between two ecosystem engineers, whose engineering effect has been assessed through an *in situ* experimental study. These authors tested the influence of artificial mimics of polychaete tubes on diatom development and sediment stability. When tubes reached a skimming flow density, they promoted the development of microphytobenthic biofilms in terms of both diatom and EPS content. Also, sediment adhesive capacity, which has been demonstrated to be a proxy for sediment stability (Lubarsky et al., 2010), was higher when these tubes were present.

These results show two different processes (Fig. 6.a). First, biogenic structures produced by benthic macrofauna facilitate the development of biofilms, which in turn stabilise the sediment. This stabilisation then facilitates the development of a specific benthic community, which differs from the assemblages present in non-stable sediments (Volkenborn & Reise, 2007, Volkenborn et al., 2009). The macrofauna and the biofilm are thus integral parts of a habitat cascade: an ecosystem engineer (infaunal worms) promotes, through the modification of habitats, the development of another one (diatom assemblages) that in turn creates niche capacity

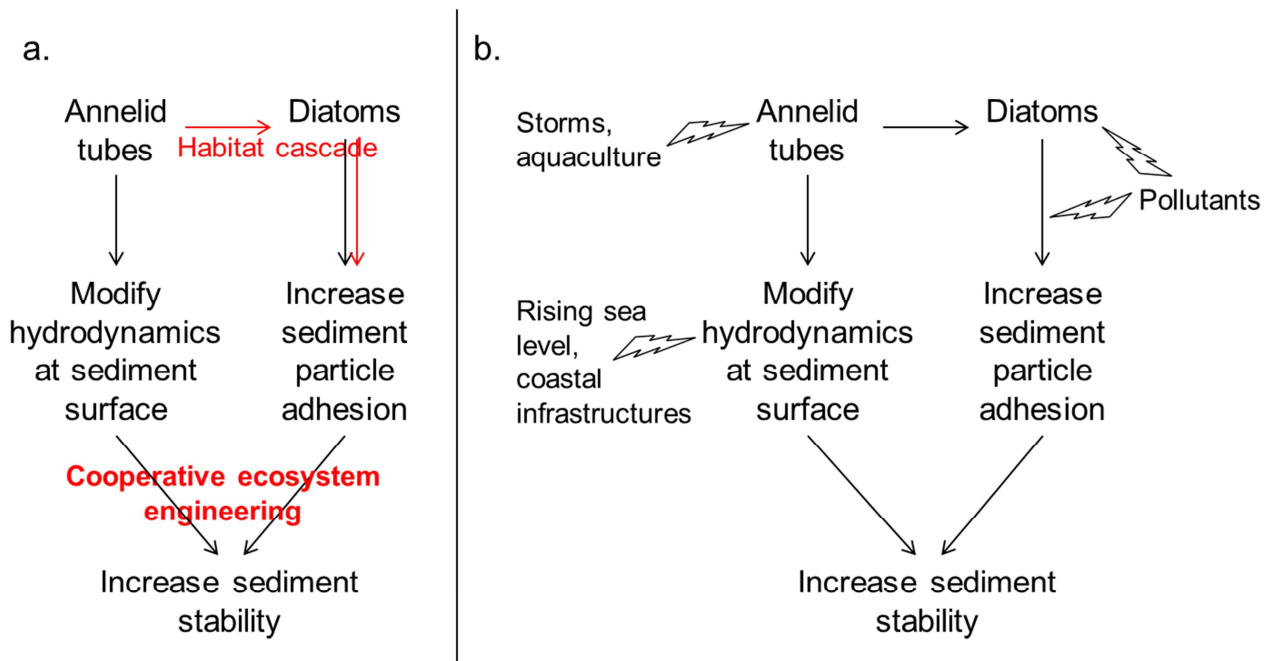


Fig. 6: a. habitat cascade (red arrows) and cooperative ecosystem engineering (black arrows) as illustrated by the interactions between biogenic structures and biofilms (Passarelli et al., 2012b). b. potential threats on these species and process due to habitat change.

Fig. 6 : a. notions de cascade d'habitat (flèches rouges) et espèces ingénieures coopératives (flèches noires), illustrées par les interactions entre structures biogéniques et biofilms (Passarelli et al., 2012b). b. menaces potentielles sur ces espèces et processus, du fait de modifications de l'habitat.

for different organisms (Altieri et al., 2007, Thomsen et al., 2010). Secondly, it is interesting to consider that sediment stability is affected by the hydrodynamic pattern at sediment surface and by the adhesion of sediment particles (Madsen et al., 1993). In this experiment, tubes modified near bed flow dynamics, and microbial communities produced EPS which coated sand grains and increased their cohesion. This association resulted in an overall increase of sediment stability within the biogenic structure bed but also in an enhanced capture of water born particles by the bed. These two groups of ecosystem engineers, although very different by size, organisation, and phylogeny, thus act as cooperatively in a way which increases the engineering effect. Here we propose these groups to be called “cooperative ecosystem engineers”, and hypothesise that other similar interactions are common in marine ecosystems.

CONCLUSION & POSSIBLE THREATS ON ECOSYSTEM ENGINEERS

Ecosystem engineers, while modifying habitat for other organisms, may also provide what has been called “ecosystem services” for human populations (Millenium Ecosystem Assessment, 2005). Purification of water, stabilisation of soils and protection against natural catastrophes are some examples of ecosystem services provided by assemblages governed by ecosystem engineers. In this context, Odling-Smee (2005) highlighted that the limited resources available for nature conservation might be better invested in preserving species because of their functional value for the community or for humans. Ecosystem engineers are therefore potentially interesting conservation targets (Crain & Bertness, 2006, Godet et al., 2008b). For instance, erosions of soils and sediments are increasingly recognised as an environmental hazard for human development and well-being. The development of intensive agriculture for land and rising sea levels for coasts are some of the main drivers whereby erosion may increase in the next decades. An estimate of 1,500 houses, and the land on which they stand, are lost due to coastal erosion in the U.S. each year; a loss of approximately \$530 million per year for owners (Heinz Centre for Science Economics and the Environment, 2000).

Threats for ecosystem engineers are diverse (for examples, see Fig. 6.b). First, natural catastrophes may destroy populations of engineers, and effects on community will then depend on the ability of these engineers to recover from such events. Also, long-term processes, such as global climate changes, will durably influence the functioning of systems. For instance, rising sea level will increase coastal erosion; this physical process could be enhanced by a diminished capacity for biofilms to stabilise sediment in response to antibiotics discharge in coastal waters (Lubarsky et al., 2012). Moreover, some biological invasions have been shown to produce great effects on the composition and functioning of some systems (see

Boogert et al., 2006 for examples). These effects are not necessarily negative for biodiversity *per se*, but some alter either the development of the ecosystem engineer itself, or its ability to modulate resources fluxes and habitat for other organisms. A final example is the direct destruction of ecosystem engineers; for instance, the development of Manila clam aquaculture leads to the destruction of the bed of *L. conchilega*, which is known to have a major structuring role in intertidal flats (Toupoint et al., 2008).

Loss of local diversity, change in ecosystem functioning and decrease in ecosystem services are among the main potential consequences of such threats. More durable and dramatic effects may occur if the perturbation of the ecosystem engineer is sufficient to prompt a switch to another stable state of the system (Eklöf et al., 2011). For instance, van der Heide et al. (2007) studied the non-recovery of *Z. marina* after the wasting disease in the 1930's. When present, these marine angiosperms decreased the nutrient concentration in seawater and limited the erosion of sediment by waves, thereby limiting the development of phytoplankton and epiphytes and reducing the amount of suspended sediment. After the disease, due to the destruction of the plants, turbidity dramatically increased in coastal waters. In turn, this increase in turbidity hindered the settlement and development of *Z. marina*, which prevent any recovery of these populations. This catastrophic switch is a good example of what might happen to current crucial ecosystem engineers due to environmental hazard combined with changes in their environmental conditions. In other conditions, *Z. marina* recovered well since the disease (Godet et al., 2008a), pointing out the complexity of interactions at stake.

Predicting how multiple changes in environmental conditions influence diverse ecosystem engineers and their interactions is an ongoing challenge for ecologists. A good understanding of how ecosystem engineers interact and, for instance, cooperate is therefore crucial in determining the key processes for ecosystem functioning and their future in changing conditions.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Fournier for providing pictures of *Z. marina* and I. Davidson for LTSEM pictures. This work received support from the ‘ATM Biodiversité des microorganismes’.



DMP proposed the concept of cooperative ecosystem engineering with support from MASTS (The Marine Alliance for Science and Technology for Scotland) and this is gratefully acknowledged. MASTS is funded by the Scottish Funding Council (grant reference HR09011) and contributing institutions. The comments of two anonymous referees substantially improved the manuscript.

CONCLUSION

Les organismes construisant des structures affectant l'écoulement de l'eau à la surface du sédiment constituent un groupe important d'espèces ingénieuses en zone intertidale à sédiments meubles. Ces espèces sont susceptibles d'interagir avec d'autres espèces ingénieuses, en particulier celles contrôlant la stabilité du sédiment. Par exemple, les polychètes construisant des tubes affectent le développement du biofilm à la surface du sédiment, ce qui influence la stabilité du sédiment et par là le recrutement et développement de nombreuses espèces benthiques. Cette cascade d'habitat n'est pas la seule interaction entre les deux groupes d'espèces. En effet, les polychètes affectent l'écoulement de l'eau à la surface du sédiment, tandis que le biofilm augmente sa cohésion ; ensemble, les polychètes construisant des tubes et les microorganismes du biofilm ont donc un effet fort de stabilisation du sédiment. Nous proposons ici le terme « d'espèces ingénieuses coopératives » pour décrire cette interaction, et suggérons que ce type d'interactions est commun en zone intertidale. Les modifications anthropiques de l'environnement sont susceptibles d'affecter l'une ou l'autre de ces espèces, ou bien leur interaction, si bien que de grands bouleversements de la structure et du fonctionnement des écosystèmes sont à attendre dans un milieu changeant.

PERSPECTIVES

Composition des EPS et recrutement

Le recrutement des organismes benthiques est généralement stimulé en présence de biofilms, même si l'effet contraire a été parfois démontré dans la littérature. Cet effet semble cependant spécifique : les différents biofilms semblent permettre le recrutement de différentes espèces de larves (Decho, 1990). De plus, un même biofilm peut, selon son âge, stimuler ou non le recrutement larvaire (Olivier et al., 2000). Certains biofilms produits par des souches mutantes sont incapables de stimuler le recrutement des larves, même leur développement est similaire à celui des biofilms des souches sauvages (densité bactérienne, quantité d'EPS ; Huang et al., 2012). La qualité des EPS semble ainsi influencer fortement le recrutement des organismes benthiques, et, en conséquence, la composition et l'abondance des communautés. Dans la colonne d'eau, il a été montré que la composition des glucides en monosaccharides affectait le recrutement des coraux, empêchant la croissance de ces derniers en présence d'exsudats de macroalgues (Nelson et al., 2013). Il serait intéressant d'étudier comment la composition des biofilms en monosaccharides peut affecter le recrutement des assemblages benthiques, et d'analyser à quel point la variation de la composition du biofilm en fonction des conditions environnementales influence la composition de ces assemblages. Par exemple, il serait possible de faire pousser, à partir d'un même assemblage microbien, des biofilms dans différentes conditions de nutriments, de température ou de luminosité, afin d'avoir des biofilms de composition variée ; par la suite, le recrutement et le développement de différentes espèces de larve sur ces biofilms pourrait être déterminée.

EPS dans les réseaux trophiques

Les expériences mises en place au cours de la thèse ont permis de montrer que l'annélide polychète *Hediste diversicolor* n'est pas un modèle adapté à l'étude des modes de transfert des EPS dans les réseaux trophiques ; en effet, les EPS ne

semblent pas constituer une ressource trophique pour ce ver. En revanche, ces études utilisant le carbone marqué sont en accord avec celles d'autres auteurs (par exemple, Bec et al., 2011) qui ont montré l'intérêt d'étudier les rapports isotopiques naturels des acides gras des consommateurs (GC-IRMS) pour tracer les voies de transfert de la matière organique dans les réseaux trophiques. Une prochaine étape pourrait consister à enrichir des sédiments naturels en EPS marqués au ^{13}C , puis d'analyser les $\delta^{13}\text{C}$ des microorganismes, de la méiofaune et de la macrofaune, ainsi que de leurs acides gras. Une approche similaire pourrait être menée en microcosmes, avec quelques organismes benthiques, pour limiter la perte de carbone marqué et tirer les premières conclusions. En particulier, cela permettrait, grâce à l'analyse du $\delta^{13}\text{C}$ des consommateurs, de vérifier l'hypothèse selon laquelle les consommateurs des niveaux trophiques supérieurs consomment d'abord directement les EPS, puis les bactéries ayant dégradé les EPS (Middelburg et al., 2000). Une expérience de « pulse-chase », avec ajout d'EPS marqués puis d'EPS non marqués dans un sédiment, permettrait d'étudier l'évolution des rapports isotopiques des acides gras au cours du temps, et ainsi de mieux caractériser le transfert des EPS dans les réseaux trophiques.

EPS, réseaux d'interactions et stabilité du sédiment

L'expérience présentée dans le chapitre IV, partie 2, montre des liens inattendus entre microorganismes et macrofaune, ces interactions aboutissant à une modification de la stabilité du sédiment. Les liens trophiques et non trophiques entre les microorganismes, les EPS et leur environnement biotique et abiotique sont à prendre en compte pour mieux caractériser l'effet global des organismes sur la capacité adhésive du sédiment. Des expériences en milieu contrôlé avec un plus grand nombre de guildes trophiques, différentes densités d'organismes ou une variation des paramètres abiotiques (microcosmes à marée par exemple) serait intéressantes pour mieux comprendre les paramètres gouvernant la stabilité du sédiment en milieu naturel. Ce type d'expérience

pourrait également permettre de définir d'autres types d'interactions entre espèces ingénieuses (stabilisateurs et bioturbateurs par exemple), et d'analyser comment les conditions environnementales influencent ces interactions. Il a en effet été démontré que les paramètres abiotiques peuvent modifier les relations entre espèces ingénieuses (Caliman et al., 2011). De telles expériences seraient un pas supplémentaire dans la compréhension des interactions entre espèces ingénieuses, et de leur rôle dans la mise en place des communautés en zone intertidale.

Références

- Abdullah, M.I. & Fredriksen, S., 2004. Production, respiration and exudation of dissolved organic matter by the kelp *Laminaria hyperborea* along the west coast of Norway. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **84**(5), 887-894.
- Abraham, W.-R., Hesse, C. & Pelz, O., 1998. Ratios of Carbon Isotopes in Microbial Lipids as an Indicator of Substrate Usage. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(11), 4202-4209.
- Alkemade, R., Wielemaker, A., de Jong, S.A. & Sandee, A.J.J., 1992. Experimental evidence for the role of bioturbation by the marine nematode *Diplolaimella dievengatensis* in stimulating the mineralization of *Spartina anglica* detritus. *Marine Ecology Progress Series*, **90**, 149-155.
- Aller, R.C., 1994. Bioturbation and remineralization of sedimentary organic matter: effects of redox oscillation. *Chemical Geology*, **114**(3-4), 331-345.
- Aller, R.C. & Aller, J.Y., 1992. Meiofauna and Solute Transport in Marine Muds. *Limnology and Oceanography*, **37**(5), 1018-1033.
- Altieri, A.H., Silliman, B.R. & Bertness, M.D., 2007. Hierarchical organization via a facilitation cascade in intertidal cordgrass bed communities. *American Naturalist*, **169**(2), 195-206.
- Andersen, T.J., 2001. Seasonal variation in erodibility of two temperate, microtidal mudflats. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **53**(1), 1-12.
- Andersen, T.J., Lanuru, M., van Bernem, C., Pejrup, M. & Riethmüller, R., 2010. Erodibility of a mixed mudflat dominated by microphytobenthos and *Cerastoderma edule*, East Frisian Wadden Sea, Germany. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **87**, 197-206.
- Anderson, A.M., Spears, B.M., Lubarsky, H.V., Davidson, I., Gebersdorf, S.U. & Paterson, D.M., 2011. Magnetic Particle Induction and Its Importance in Biofilm Research. In *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenge*, (ed. R. Fazel), pp. 189-216. InTech.
- Arts, M.T. & Wainman, B.C., 1999. *Lipids in Freshwater Ecosystems*. New York: Springer-Verlag.
- Austen, I., Andersen, T.J. & Edolvang, K., 1999. The influence of benthic diatoms and invertebrates on the erodibility of an intertidal mudflat, the Danish Wadden Sea. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **49**(1), 99-111.

- Avnimelech, Y., Ritvo, G., Meijer, L.E. & Kochba, M., 2001. Water content, organic carbon and dry bulk density in flooded sediments. *Aquacultural Engineering*, **25**, 25-33.
- Azam, F., 1998. Microbial control of oceanic carbon flux: The plot thickens. *Science*, **280**(5364), 694-696.

- B -

- Bachofen, R. & Schenk, A., 1998. Quorum sensing autoinducers: Do they play a role in natural microbial habitats? *Microbiological Research*, **153**, 61-63.
- Baird, B.H. & Thistle, D., 1986. Uptake of bacterial extracellular polymer by a deposit-feeding holothurian (*Isostichopus badionotus*). *Marine Biology*, **92**(2), 183-187.
- Balzano, S., Pancost, R.D., Lloyd, J.R. & Statham, P.J., 2011. Changes in fatty acid composition in degrading algal aggregates. *Marine Chemistry*, **124**(1-4), 2-13.
- Barranguet, C., Herman, P.M.J. & Sinke, J.J., 1997. Microphytobenthos biomass and community composition studied by pigment biomarkers: importance and fate in the carbon cycle of a tidal flat. *Journal of Sea Research*, **38**(1-2), 59-70.
- Bassler, B.L., 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, **2**(6), 582-587.
- Bassler, B.L., 2002. Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell*, **109**(4), 421-424.
- Bec, A., Perga, M.-E., Koussoroplis, A., Bardoux, G., Desvillettes, C., Bourdier, G. & Mariotti, A., 2011. Assessing the reliability of fatty acid-specific stable isotope analysis for trophic studies. *Methods in Ecology and Evolution*, **2**(6), 651-659.
- Bell, S.S., 1985. Habitat complexity of polychaete tube-caps: Influence of architecture on dynamics of a meioepibenthic assemblage. *Journal of Marine Research*, **43**, 647-671.
- Bellinger, B.J., Abdullahi, A.S., Gretz, M.R. & Underwood, G.J.C., 2005. Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquatic Microbial Ecology*, **38**, 169-180.

- Bellinger, B.J., Underwood, G.J.C., Ziegler, S.E. & Gretz, M.R., 2009. Significance of diatom-derived polymers in carbon flow dynamics within estuarine biofilms determined through isotopic enrichment. *Aquatic Microbial Ecology*, **55**(2), 169-187.
- Berke, S.K., 2012. Biogeographic variability in ecosystem engineering: patterns in the abundance and behavior of the tube-building polychaete *Diopatra cuprea*. *Marine Ecology Progress Series*, **447**, 1-13.
- Berkenbusch, K. & Rowden, A.A., 2007. An examination of the spatial and temporal generality of the influence of ecosystem engineers on the composition of associated assemblages. *Aquatic Ecology*, **41**, 129-147.
- Berkenbusch, K., Rowden, A.A. & Myers, T.E., 2007. Interactions between seagrasses and burrowing ghost shrimps and their influence on infaunal assemblages. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **341**, 70-84.
- Bernhard, J.M. & Bowser, S.S., 1992. Bacterial biofilms as a trophic resource for certain benthic foraminifera. *Marine Ecology-Progress Series*, **83**(2-3), 263-272.
- Bertness, M.D. & Leonard, G.H., 1997. The role of positive interactions in communities: Lessons from intertidal habitats. *Ecology*, **78**(7).
- Bhaskar, P.V. & Bhosle, N.B., 2005. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Current Science*, **88**(1), 45-53.
- Bhaskar, P.V., Grossart, H.-P., Bhosle, N.B. & Simon, M., 2005. Production of macroaggregates from dissolved exopolymeric substances (EPS) of bacterial and diatom origin. *FEMS Microbiology Ecology*, **53**(2), 255-264.
- Black, K.S. & Paterson, D.M., 1996. LISP-UK: an holistic approach to the interdisciplinary study of tidal flat sedimentation *Terra Nova*, **8**(4), 304-308.
- Black, K.S., Tolhurst, T.J., Paterson, D.M. & Hagerthey, S.E., 2002. Working with natural cohesive sediments. *Journal of Hydraulic Engineering*, **128**(1), 2-8.
- Bligh, E.G. & Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, **37**(8), 911-917.

- Bolam, S.G. & Fernandes, T.F., 2002. Dense aggregations of tube-building polychaetes: response to small-scale disturbances. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **269**(2), 197-222.
- Boogert, N.J., Paterson, D.M. & Laland, K.N., 2006. The implications of niche construction and ecosystem engineering for conservation biology. *Bioscience*, **56**(7), 570-578.
- Bouma, T.J., Olenin, S., Reise, K. & Ysebaert, T., 2009. Ecosystem engineering and biodiversity in coastal sediments: posing hypotheses. *Helgoland Marine Research*, **63**(1).
- Boyer, K.E. & Fong, P., 2005. Co-occurrence of habitat-modifying invertebrates: effects on structural and functional properties of a created salt marsh. *Oecologia*, **143**, 619-628.
- Bozec, Y.-M., Yakob, L., Bejarano, S. & Mumby, P.J., 2013. Reciprocal facilitation and non-linearity maintain habitat engineering on coral reefs. *Oikos*, **122**, 428-440.
- Bradshaw, S.A., Ohara, S.C.M., Corner, E.D.S. & Eglinton, G., 1989. Assimilation of dietary sterols and fecal contribution of lipids by the marine invertebrates *Neomysis integer*, *Scrobularia plana* and *Nereis diversicolor*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **69**(4), 891-911.
- Braeckman, U., Provoost, P., Gribsholt, B., Van Gansbeke, D., Middelburg, J.J., Soetaert, K., Vincx, M. & Vanaverbeke, J., 2010. Role of macrofauna functional traits and density in biogeochemical fluxes and bioturbation. *Marine Ecology Progress Series*, **399**, 173-186.
- Braeckman, U., Provoost, P., Moens, T., Soetaert, K., Middelburg, J.J., Vincx, M. & Vanaverbeke, J., 2011. Biological vs. Physical Mixing Effects on Benthic Food Web Dynamics. *PLoS ONE*, **6**(3), e180178.
- Brotas, V., Cabrita, T., Portugal, A., Serodio, J. & Catarino, F., 1995. Spatio-temporal distribution of the microphytobenthic biomass in intertidal flats of Tagus Estuary (Portugal). *Hydrobiologia*, **300**, 93-104.
- Brotas, V. & Plante-Cuny, M.-R., 1996. Identification et quantification des pigments chlorophylliens et caroténoïdes des sédiments marins: un protocole d'analyse par HPLC. *Oceanologica Acta*, **19**(6), 623-634.
- Bruckner, C.G., Bahulikar, R., Rahalkar, M., Schink, B. & Kroth, P.G., 2008. Bacteria Associated with Benthic Diatoms from Lake Constance: Phylogeny and Influences on Diatom Growth and Secretion of

Extracellular Polymeric Substances. *Applied and Environmental Microbiology*, **74**(24), 7740-7749.

- Buhmann, M., Kroth, P.G. & Schleheck, D., 2012. Photoautotrophic-heterotrophic biofilm communities: a laboratory incubator designed for growing axenic diatoms and bacteria in defined mixed-species biofilms. *Environmental Microbiology Reports*, **4**(1), 133-140.
- Bulling, M.T., Solan, M., Dyson, K., Hernandez-Milian, G., Luque, P., Pierce, G., Raffaelli, D., Paterson, D.M. & White, P.C.L., 2008. Species effects on ecosystem processes are modified by faunal responses to habitat composition. *Oecologia*, **158**, 511-520.

- C -

- Caliman, A., Carneiro, L.S., Bozelli, R.L., Farjalla, V.F. & Esteves, F.A., 2011. Bioturbating space enhances the effects of non-additive interactions among benthic ecosystem engineers on cross-habitat nutrient regeneration. *Oikos*, **120**(11).
- Callaway, R., 2003. Long-term effects of imitation polychaete tubes on benthic fauna: they anchor *Mytilus edulis* (L.) banks. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **283**(1-2), 115-132.
- Callaway, R., 2006. Tube worms promote community change. *Marine Ecology-Progress Series*, **308**, 49-60.
- Callaway, R.M. & Walker, L.R., 1997. Competition and facilitation: A synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology*, **78**(7).
- Cariou-Le Gall, V. & Blanchard, G.F., 1995. Monthly HPLC measurements of pigment concentration from an intertidal muddy sediment of Marennes-Oléron Bay, France. *Marine Ecology Progress Series*, **121**, 171-179.
- Chiovitti, A., Molino, P., Crawford, S.A., Teng, R.W., Spurck, T. & Wetherbee, R., 2004. The glucans extracted with warm water from diatoms are mainly derived from intracellular chrysolaminaran and not extracellular polysaccharides. *European Journal of Phycology*, **39**(2), 117-128.
- Chrost, R.J., 1989. Characterization and significance of α -glucosidase activity in lake water. *Limnology and Oceanography*, **34**(4), 660-672.
- Cole, J.J., 1999. Aquatic microbiology for ecosystem scientists: New and recycled paradigms in ecological microbiology. *Ecosystems*, **2**(3), 215-225.
- Colijn, F. & Dejonge, V.N., 1984. Primary production of microphytobenthos in the Ems-Dollard Estuary. *Marine Ecology-Progress Series*, **14**(2-3), 185-196.

- Cook, P.L.M., Reville, A.T., Clementson, L.A. & Volkman, J.K., 2004. Carbon and nitrogen cycling on intertidal mudflats of a temperate Australian estuary. III. Sources of organic matter. *Marine Ecology Progress Series*, **280**, 55-72.
- Cook, P.L.M., Veuger, B., Böer, S. & Middelburg, J.J., 2007. Effect of nutrient availability on carbon and nitrogen incorporation and flows through benthic algae and bacteria in near-shore sandy sediment. *Aquatic Microbial Ecology*, **49**(2), 165-180.
- Coull, B.C., 1999. Role of meiofauna in estuarine soft-bottom habitats. *Australian Journal of Ecology*, **24**(4), 327-343.
- Cox, E.J., 2010. Morphogenetic information and the selection of taxonomic characters for raphid diatom systematics. *Plant Ecology and Evolution*, **143**(3), 271-277.
- Crain, C.M. & Bertness, M.D., 2006. Ecosystem Engineering across Environmental Gradients: Implications for Conservation and Management. *Bioscience*, **56**(3), 211-218.
- Crowe, T.P., Frost, N.J. & Hawkins, S.J., 2011. Interactive effects of losing key grazers and ecosystem engineers vary with environmental context. *Marine Ecology Progress Series*, **430**, 223-234.
- Czaczyk, K. & Myszka, K., 2007. Biosynthesis of Extracellular Polymeric Substances (EPS) and Its Role in Microbial Biofilm Formation. *Polish Journal of Environmental Studies*, **16**(6), 799-806.

- D -

- Daborn, G.R., Amos, C.L., Brylinsky, M., Christian, H., Drapeau, G., Faas, R.W., Grant, J., Long, B., Paterson, D.M., Perillo, G.M.E. & Piccolo, M.C., 1993. An ecological cascade effect: Migratory birds affect stability of intertidal sediments. *Limnology and Oceanography*, **38**(1), 225-231.
- Dade, W.B., Nowell, A.R.M. & Jumars, P.A., 1992. Predicting erosion resistance of muds. *Marine Geology*, **105**(1-4), 285-297.
- Dalsgaard, J., St John, M., Kattner, G., Muller-Navarra, D. & Hagen, W., 2003. Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, **46**, 225-340.
- Danovaro, R., Armeni, M., Dell'Anno, A., Fabiano, M., Manini, E., Marrale, D., Pusceddu, A. & Vanucci, S., 2001. Small-scale distribution of bacteria, enzymatic activities, and organic matter in coastal sediments. *Microbial Ecology*, **42**(2), 177-185.

- Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. & Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, **280**(5361), 295-298.
- Dayton, P.K. & Tegner, M.J., 1984. Catastrophic Storms, El Niño, and Patch Stability in a Southern California Kelp Community. *Science*, **224**(4646).
- de Brouwer, J.F.C., de Deckere, E. & Stal, L.J., 2003. Distribution of extracellular carbohydrates in three intertidal mudflats in Western Europe. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **56**(2), 313-324.
- de Brouwer, J.F.C., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R. & Stal, L.J., 2002. Sorption of EPS to sediment particles and the effect on the rheology of sediment slurries. *Biogeochemistry*, **61**(1), 57-71.
- de Brouwer, J.F.C. & Stal, L.J., 2001. Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Marine Ecology-Progress Series*, **218**, 33-44.
- de Brouwer, J.F.C. & Stal, L.J., 2002. Daily fluctuations of exopolymers in cultures of the benthic diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Nitzschia* sp. (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, **38**, 464-472.
- de Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., Ruddy, G.K., Jones, T.E.R. & Stal, L.J., 2005. Biogenic stabilization of intertidal sediments: The importance of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms. *Microbial Ecology*, **49**(4), 501-512.
- de Deckere, E., Tolhurst, T.J. & de Brouwer, J.F.C., 2001. Destabilization of cohesive intertidal sediments by infauna. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **53**(5), 665-669.
- de Jonge, V.N., 1985. The Occurrence of "Epipsammic" Diatom Populations: A Result of Interaction between Physical Sorting of Sediment and Certain Properties of Diatom Species. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **21**, 607-622.
- De Mesel, I., Derycke, S., Moens, T., Van Der Gucht, K., Vincx, M. & Swings, J., 2004. Top-down impact of bacterivorous nematodes on the bacterial community structure: a microcosm study. *Environmental Microbiology*, **6**(7), 733-744.
- de Winder, B., Staats, N., Stal, L.J. & Paterson, D.M., 1999. Carbohydrate secretion by phototrophic communities in tidal sediments. *Journal of Sea Research*, **42**(2), 131-146.

- Decho, A.W., 1990. Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. In *Oceanography and Marine Biology: an Annual review*, vol. 28 (ed. M. Barnes), pp. 73-153. Aberdeen University Press.
- Decho, A.W., 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview *Continental Shelf Research*, **20**, 1257-1273.
- Decho, A.W., Frey, R.L. & Ferry, J.L., 2011. Chemical Challenges to Bacterial AHL Signaling in the Environment. *Chemical Reviews*, **111**, 86-99.
- Decho, A.W. & Lopez, G.R., 1993. Exopolymer microenvironments of microbial flora: Multiple and interactive effects on trophic relationships. *Limnology and Oceanography*, **38**(8), 1633-1645.
- Decho, A.W. & Moriarty, D.J.W., 1990. Bacterial exopolymer utilization by a harpacticoid copepod: A methodology and results. *Limnology and Oceanography*, **35**(5), 1039-1049.
- Decho, A.W., Norman, R.S. & Visscher, P.T., 2010. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends in Microbiology*, **18**(2), 73-80.
- Decho, A.W., Visscher, P.T., Ferry, J., Kawaguchi, T., Lijian, H., Przekop, K.M., Norman, R.S. & Reid, R.P., 2009. Autoinducers extracted from microbial mats reveal a surprising diversity of N-acylhomoserine lactones (AHLs) and abundance changes that may relate to diel pH. *Environmental Microbiology*, **11**(2), 409-420.
- Defew, E.C., Tolhurst, T.J. & Paterson, D.M., 2002. Site-specific features influence sediment stability of intertidal flats. *Hydrology and Earth System Sciences*, **6**(6), 971-981.
- Delmas, D. & Garet, M.J., 1995. SDS-preservation for deferred measurements of exoproteolytic kinetics in marine samples. *Journal of Microbiological Methods*, **22**(3), 243-248.
- dos Santos, G.A.P., Derycke, S., Genevois, V.G.F., Coelho, L., Correia, M.T.S. & Moens, T., 2009. Interactions among bacterial-feeding nematode species at different levels of food availability. *Marine Biology*, **156**(4), 629-640.
- Dunstan, G.A., Volkman, J.K., Barrett, S.M., Leroi, J.-M. & Jeffrey, S.W., 1994. Essential polyunsaturated fatty acids from 14 species of diatom (Bacillariophyceae). *Phytochemistry*, **35**(1), 155-161.

- Eckman, J.E., 1983. Hydrodynamic processes affecting benthic recruitment. *Limnology and Oceanography*, **28**(2), 241-257.
- Eckman, J.E., 1985. Flow disruption by an animal-tube mimic affects sediment bacterial colonization. *Journal of Marine Research*, **43**, 419-435.
- Eckman, J.E., Duggins, D.O. & Siddon, C.E., 2003. Current and wave dynamics in the shallow subtidal: implications to the ecology of understory and surface-canopy kelps. *Marine Ecology-Progress Series*, **265**, 45-56.
- Eckman, J.E., Nowell, A.R.M. & Jumars, P.A., 1981. Sediment destabilization by animal tubes. *Journal of Marine Research*, **39**(2), 361-374.
- Eklöf, J.S., Van der Heide, T., Donadi, S., van der Zee, E.M., O'Hara, R. & Eriksson, B.K., 2011. Habitat-Mediated Facilitation and Counteracting Ecosystem Engineering Interactively Influence Ecosystem Responses to Disturbance. *PLoS ONE*, **6**(8), e23229.
- Emmerson, M., Solan, M., Emes, C., Paterson, D.M. & Raffaelli, D., 2001. Idiosyncratic effects of species diversity on ecosystem function. *Nature*, **411**, 73-77.

- F -

- Fauvel, P. & Bohn, G., 1907. Le rythme des marées chez les diatomées littorales. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, **62**, 121-123.
- Fernandes, S., Sobral, P. & Costa, M.H., 2006. *Nereis diversicolor* effect on the stability of cohesive intertidal sediments. *Aquatic Ecology*, **40**(4), 567-579.
- Ferris, H., Venette, R.C., van der Meulen, H.R. & Lau, S.S., 1998. Nitrogen mineralization by bacterial-feeding nematodes: verification and measurement. *Plant and Soil*, **203**(2), 159-171.
- Flemming, H.C. & Wingender, J., 2001. Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, **43**(6), 1-8.
- Fonseca, M.S., Fisher, J.S., Ziemann, J.C. & Thayer, G.W., 1982. Influence of the seagrass, *Zostera marina* L., on current flow. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **15**(4), 351-358.
- Forster, S. & Graf, G., 1995. Impact of irrigation on oxygen flux into the sediment: intermittent pumping by *Callianassa subterranea* and "piston-pumping" by *Lanice conchilega*. *Marine Biology*, **123**, 335-346.
- Franks, J. & Stolz, J.F., 2009. Flat laminated microbial mat communities. *Earth-Science Reviews*, **96**, 163-172.

- Friedrichs, M. & Graf, G., 2009. Characteristic flow patterns generated by macrozoobenthic structures. *Journal of Marine Systems*, **75**(3-4), 348-359.
- Friedrichs, M., Graf, G. & Springer, B., 2000. Skimming flow induced over a simulated polychaete tube lawn at low population densities. *Marine Ecology-Progress Series*, **192**, 219-228.
- Friedrichs, M., Leipe, T., Peine, F. & Graf, G., 2009. Impact of macrozoobenthic structures on near-bed sediment fluxes. *Journal of Marine Systems*, **75**(3-4), 336-347.
- Friend, P.L., Ciavola, P., Cappucci, S. & Santos, R., 2003. Bio-dependent bed parameters as a proxy tool for sediment stability in mixed habitat intertidal areas. *Continental Shelf Research*, **23**(17-19), 1899-1917.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. & Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, **30**(8), 1749-1758.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K. & Nielsen, P.H., 1996. Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, **30**(8), 1749-1758.
- Fu, S., Ferris, H., Brown, D. & Plant, R., 2005. Does the positive feedback effect of nematodes on the biomass and activity of their bacteria prey vary with nematode species and population size? *Soil Biology & Biochemistry*, **37**, 1979-1987.
- Fuqua, W.C., Winans, S.C. & Greenberg, E.P., 1994. Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulators. *Journal of Bacteriology*, **176**(2), 269-275.

- G -

- Gacia, E. & Duarte, C.M., 2001. Sediment Retention by a Mediterranean *Posidonia oceanica* Meadow: The Balance between Deposition and Resuspension. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **52**(4), 505-514.
- Gallagher, E.D., Jumars, P.A. & Trueblood, D.D., 1983. Facilitation of Soft-Bottom Benthic Succession By Tube Builders. *Ecology*, **64**(5), 1200-1216.
- Galván, K., Fleeger, J.W. & Fry, B., 2008. Stable isotope addition reveals dietary importance of phytoplankton and microphytobenthos to saltmarsh infauna. *Marine Ecology-Progress Series*, **359**, 37-49.

- Gerbersdorf, S.U., Bittner, R., Lubarsky, H.V., Manz, W. & Paterson, D.M., 2009. Microbial assemblages as ecosystem engineers of sediment stability. *Journal of Soils and Sediments*, **9**(6), 640-652.
- Gerbersdorf, S.U., Manz, W. & Paterson, D.M., 2008. The engineering potential of natural benthic bacterial assemblages in terms of the erosion resistance of sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, **66**, 282-294.
- Gerino, M., Stora, G., François-Carcaillet, F., Gilbert, F., Poggiale, J.-C., Mermillod-Blondin, F., Desrosiers, G. & Vervier, P., 2003. Macro-invertebrate functional groups in freshwater and marine sediments: a common mechanistic classification. *Vie et Milieu*, **53**(4), 221-231.
- Giere, O., 1993. *Meiobenthology*. Berlin.
- Giere, O., 2009. *Meiobenthology: The Microscopic Motile Fauna of Aquatic Sediments*. Springer.
- Gingold, R., Rocha Olivares, A., Moens, T. & Hubas, C., 2011. Integrating Different Organizational Levels in Benthic Biodiversity - Ecosystem Functioning (BEF) Studies. In *Ecosystems Biodiversity*, (eds. O. Grillo and G. Venora), pp. 464. InTech.
- Giroldo, D., Vieira, A.A.H. & Paulsen, B.S., 2003. Relative increase of deoxy sugars during microbial degradation of an extracellular polysaccharide released by a tropical freshwater *Thalassiosira sp* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, **39**(6), 1109-1115.
- Godet, L., Fournier, J., Van Katwijk, M.M., Olivier, F., Le Mao, P. & Retière, C., 2008a. Before and after wasting disease in common eelgrass *Zostera marina* along the French Atlantic coasts: a general overview and first accurate mapping. *Diseases of Aquatic Organisms*, **79**, 249-255.
- Godet, L., Toupoint, N., Olivier, F., Fournier, J. & Retière, C., 2008b. Considering the functional value of common marine species as a conservation stake: The case of sandmason worm *Lanice conchilega* (Pallas 1766) (Annelida, Polychaeta) beds. *Ambio*, **37**(5), 347-355.
- Goto, N., Mitamura, O. & Terai, H., 2001. Biodegradation of photosynthetically produced extracellular organic carbon from intertidal benthic algae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **257**(1), 73-86.
- Grabowski, R.C., Droppo, I.G. & Wharton, G., 2011. Erodibility of cohesive sediment: The importance of sediment properties. *Earth-Science Reviews*, **105**(3-4), 101-120.

- Grant, L., Archambault, P., Olivier, F. & McKindsey, C., 2012. Influence of 'bouchot' mussel culture on the benthic environment in a dynamic intertidal system. *Aquaculture Environment Interactions*, **2**, 117-131.
- Gribben, P.E., Byers, J.E., Clements, M., McKenzie, L.A., Steinberg, P.D. & Wright, J.T., 2009. Behavioural interactions between ecosystem engineers control community species richness. *Ecology Letters*, **12**(11), 1127-1136.
- Gross, W. & Meyer, A., 2003. Distribution of *myo*-inositol dehydrogenase in algae. *European Journal of Phycology*, **38**, 191-194.
- Grossi, V., Cuny, P., Caradec, S., Nerini, D., Pancost, R. & Gilbert, F., 2006. Impact of feeding by *Arenicola marina* (L.) and ageing of faecal material on fatty acid distribution and bacterial community structure in marine sediments: An experimental approach. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**(1), 54-64.

- H -

- Hacker, S.D. & Gaines, S.D., 1997. Some implications of direct positive interactions for community species diversity. *Ecology*, **78**(7), 1990-2003.
- Hagerthey, S.E., Defew, E.C. & Paterson, D.M., 2002. Influence of *Corophium volutator* and *Hydrobia ulvae* on intertidal benthic diatom assemblages under different nutrient and temperature regimes. *Marine Ecology-Progress Series*, **245**, 47-59.
- Hall, D., Lee, S.Y. & Meziane, T., 2006. Fatty acids as trophic tracers in an experimental estuarine food chain: Tracer transfer. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **336**, 42-53.
- Hamsher, S.E., Evans, K.M., Mann, D.G., Poulickova, A. & Saunders, G.W., 2011. Barcoding Diatoms: Exploring Alternatives to COI-5P. *Protist*, **162**(3), 405-422.
- Handelsman, J., 2004. Metagenomics: Application of Genomics to Uncultured Microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**(4), 669-685.
- Hanlon, A.R.M., Bellinger, B., Haynes, K., Xiao, G., Hofmann, T.A., Gretz, M.R., Ball, A.S., Osborn, A.M. & Underwood, G.J.C., 2006. Dynamics of extracellular polymeric substance (EPS) production and loss in an estuarine, diatom-dominated, microalgal biofilm over a tidal emersion-immersion period. *Limnology and Oceanography*, **51**(1), 79-93.

- Harvey, R.W. & Luoma, S.N., 1984. The role of bacterial exopolymer and suspended bacteria in the nutrition of the deposit-feeding clam, *Macoma balthica*. *Journal of Marine Research*, **42**(4), 957-968.
- Haynes, K., Hofmann, T.A., Smith, C.J., Ball, A.S., Underwood, G.J.C. & Osborn, A.M., 2007. Diatom-Derived Carbohydrates as Factors Affecting Bacterial Community Composition in Estuarine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(19), 6112-6124.
- Heinz Centre for Science Economics and the Environment, 2000. Evaluation of Erosion Hazards. In *Report for Federal Emergency Management Agency*, pp. 252. Washington, DC.
- Henke, J.M. & Bassler, B.L., 2004. Bacterial social engagements. *Trends in Cell Biology*, **14**(11), 648-656.
- Hicks, G.R.F. & Coull, B.C., 1983. The ecology of marine meiobenthic harpacticoid copepods. In *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, vol. 21 (eds. H. Barnes, A.D. Ansell and R.N. Gibson), pp. 67-175. London: University College London Press.
- Higgins, R.P. & Thiel, H.e., 1988. *Introduction to the Study of Meiofauna*. Washington, D. C.: Smithsonian Institution Press.
- Hoagland, K.D., Rosowski, J.R., Gretz, M.R. & Roemer, S.C., 1993. Diatom extracellular polymeric substances: function, fine structure, chemistry, and physiology. *Journal of Phycology*, **29**, 537-566.
- Hofmann, T.A., Hanlon, A.R.M., Taylor, J.D., Ball, A.S., Osborn, A.M. & Underwood, G.J.C., 2009. Dynamics and compositional changes in extracellular carbohydrates in estuarine sediments during degradation. *Marine Ecology-Progress Series*, **379**, 45-58.
- Holland, A.F., Zingmark, R.G. & Dean, J.M., 1974. Quantitative Evidence Concerning the Stabilization of Sediments by Marine Benthic Diatoms. *Marine Biology*, **27**(3), 191-196.
- Hoppe, H.-G., 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Marine Ecology-Progress Series*, **11**(3), 299-308.
- Hori, K. & Matsumoto, S., 2010. Bacterial adhesion: From mechanism to control. *Biochemical Engineering Journal*, **48**(3), 424-434.
- Hoskins, D.L., Stancyk, S.E. & Decho, A.W., 2003. Utilization of algal and bacterial extracellular polymeric secretions (EPS) by the deposit-feeding

- brittlestar *Amphipholis gracillima* (Echinodermata). *Marine Ecology Progress Series*, **247**, 93-101.
- Huang, Y., Callahan, S. & Hadfield, M.G., 2012. Recruitment in the sea: bacterial genes required for inducing larval settlement in a polychaete worm. *Scientific Reports*, **2**(228).
- Hubas, C., Davoult, D., Cariou, T. & Artigas, L.F., 2006. Factors controlling benthic metabolism during low tide along a granulometric gradient in an intertidal bay (Roscoff Aber Bay, France). *Marine Ecology-Progress Series*, **316**, 53-68.
- Hubas, C., Jesus, B., Passarelli, C. & Jeanthon, C., 2011. Tools providing new insight into coastal anoxygenic purple bacterial mats: review and perspectives. *Research in Microbiology*, **162**, 858-868.
- Hubas, C., Sachidhanandam, C., Rybarczyk, H., Lubarsky, H.V., Rigaux, A., Moens, T. & Paterson, D.M., 2010. Bacterivorous nematodes stimulate microbial growth and exopolymer production in marine sediment microcosms. *Marine Ecology Progress Series*, **419**, 85-94.
- Huettel, M. & Webster, I.T., 2001. Porewater flow in permeable sediment. In *The Benthic Boundary Layer: Transport Processes and Biogeochemistry*, pp. 144-179. Oxford: Oxford University Press.

- I -

- Ingham, R.E., Trofymow, J.A., Ingham, E.R. & Coleman, D.C., 1985. Interactions of Bacteria, Fungi, and Their Nematode Grazers - Effects on Nutrient Cycling and Plant-Growth. *Ecological Monographs*, **55**(1), 119-140.

- J -

- Jackson, C.M., Kamenos, N.A., Moore, P.G. & Young, M., 2004. Meiofaunal bivalves in maerl and other substrata; Their diversity and community structure. *Ophelia*, **58**(1), 49-60.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Whright, S.W., 1997a. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. . Paris: UNESCO.
- Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C. & Wright, S.W., 1997b. *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Paris: UNESCO.

- Jeffrey, S.W., Wright, S.W. & Zapata, M., 1999. Recent advances in HPLC pigment analysis of phytoplankton. *Marine and Freshwater Research*, **50**, 879-896.
- Jesus, B., Brotas, V., Ribeiro, L., Mendes, C.R., Cartaxana, P. & Paterson, D.M., 2009. Adaptations of microphytobenthos assemblages to sediment type and tidal position. *Continental Shelf Research*, **29**(13), 1624-1634.
- Jones, C.G., Lawton, J.H. & Shachak, M., 1994. Organisms as ecosystem engineers. *Oikos*, **69**(3), 373-386.
- Jones, C.G., Lawton, J.H. & Shachak, M., 1997. Positive and negative effects of organisms as physical ecosystem engineers. *Ecology*, **78**(7), 1946-1957.
- Jørgensen, C.B., Kiørboe, T., Møhlenberg, F. & Riisgård, H.U., 1984. Ciliary and mucus-net filter feeding, with special reference to fluid mechanical characteristics. *Marine Ecology Progress Series*, **15**, 283-292.

- K -

- Kamenos, N.A., Moore, P.G. & Hall-Spencer, J.M., 2004. Maerl grounds provide both refuge and high growth potential for juvenile queen scallops (*Aequipecten opercularis* L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **313**, 241-254.
- Kéfi, S., Berlow, E.L., Wieters, E.A., Navarrete, S.A., Petchey, O.L., Wood, S.A., Boit, A., Joppa, L.N., Lafferty, K.D., Williams, R.J., Martinez, N.D., Menge, B.A., Blanchette, C.A., Iles, A.C. & Brose, U., 2012. More than a meal... integrating non-feeding interactions into food webs. *Ecology Letters*, **15**, 291-300.
- Knapp, D.R., 1979. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. New York: John Wiley & Sons.
- Kraay, G.W., Zapata, M. & Veldhuis, M.J.W., 1992. Separation of chlorophylls *c1*, *c2* and *c3* of marine phytoplankton by reversed-phase-C18-high-performance liquid chromatography. *Journal of Phycology*, **28**(5), 708-712.
- Krembs, C., Eicken, H., Junge, K. & Deming, J.W., 2002. High concentrations of exopolymeric substances in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, **49**(12), 2163-2181.

- L -

- Larson, F., Lubarsky, H.V., Gerbersdorf, S.U. & Paterson, D.M., 2009. Surface adhesion measurements in aquatic biofilms using magnetic particle induction: MagPI. *Limnology and Oceanography-Methods*, **7**, 490-497.
- Laspidou, C.S. & Rittmann, B.E., 2002. A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Research*, **36**(11), 2711-2720.
- Lawton, J.H. & Jones, C.G., 1995. Linking Species and Ecosystems: Organisms as Ecosystem Engineers. In *Linking species & ecosystems*, (eds. C.G. Jones and J.H. Lawton), pp. 141-150. London: Chapman & Hall.
- Le Hir, P., Monbet, Y. & Orvain, F., 2007. Sediment erodability in sediment transport modelling: Can we account for biota effects? . *Continental Shelf Research*, **27**, 1116-1142.
- Lee, S.Y., Fong, C.W. & Wu, R.S.S., 2001. The effects of seagrass (*Zostera japonica*) canopy structure on associated fauna: a study using artificial seagrass units and sampling of natural beds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **259**(1), 23-50.
- Lejart, M. & Hily, C., 2011. Differential response of benthic macrofauna to the formation of novel oyster reefs (*Crassostrea gigas*, Thunberg) on soft and rocky substrate in the intertidal of the Bay of Brest, France. *Journal of Sea Research*, **65**, 84-93.
- Leonard, A.E., Pereira, S.L., Sprecher, H. & Huang, Y.S., 2004. Elongation of long-chain fatty acids. *Progress in Lipid Research*, **43**(1), 36-54.
- Leppard, G.G., 1995. The characterization of algal and microbial mucilages and their aggregates in aquatic ecosystems. *The Science of the total environment*, **165**(1-3), 103-131.
- Levinton, J., 1995. Bioturbators as Ecosystems Engineers: Control of the Sediment Fabric, Inter-Individual Interactions, and Material Fluxes. In *Linking species & ecosystems*, (eds. C.G. Jones and J.H. Lawton), pp. 29-36. London: Chapman & Hall.
- Little, C. & Kitching, J.A., 1996. *The Biology of Rocky Shores*. Oxford: Oxford University Press.
- Lorenzen, C.J., 1967. Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations. *Limnology and Oceanography*, **12**(2), 343-346.

- Lü, D., Song, Q. & Wang, X., 2010. Decomposition of algal lipids in clay-enriched marine sediment under oxic and anoxic conditions. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, **28**(1), 131-143.
- Lubarsky, H.V., Gerbersdorf, S.U., Hubas, C., Behrens, S., Ricciardi, F. & Paterson, D.M., 2012. Impairment of the Bacterial Biofilm Stability by Triclosan. *PLoS ONE*, **7**(4), e31183.
- Lubarsky, H.V., Hubas, C., Chocholek, M., Larson, F., Manz, W., Paterson, D.M. & Gerbersdorf, S.U., 2010. The stabilisation potential of individual and mixed assemblages of natural bacteria and microalgae. *PLoS ONE*, **5**(11), e13794.
- Luckenbach, M.W., 1986. Sediment stability around animal tubes: The roles of hydrodynamic processes and biotic activity. *Limnology and Oceanography*, **31**(4), 779-787.
- Luis, O.J. & Passos, A.M., 1995. Seasonal changes in lipid content and composition of the polychaete *Nereis (Hediste) diversicolor*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **111**(4), 579-586.
- Lundkvist, M., Gangelhof, U., Lunding, J. & Flindt, M.R., 2007. Production and fate of extracellular polymeric substances produced by benthic diatoms and bacteria: A laboratory study. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **75**(3), 337-346.

- M -

- Madsen, K.N., Nilsson, P. & Sundbäck, K., 1993. The influence of benthic microalgae on the stability of a subtidal sediment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **170**, 159-177.
- Malej, A. & Harris, R.P., 1993. Inhibition of copepod grazing by diatom exudates: a factor in the development of mucus aggregates? *Marine Ecology-Progress Series*, **96**(1), 33-42.
- Marchand, C., Disnar, J.R., Lallier-Vergès, E. & Lottier, N., 2005. Early diagenesis of carbohydrates and lignin in mangrove sediments subject to variable redox conditions (French Guiana). *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **69**(1), 131-142.
- Mare, M.F., 1942. A study of a marine benthic community with special reference to the micro-organisms. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **25**(3), 517-554.

- Mayor, D.J., Cook, K., Thornton, B., Walsham, P., Witte, U.F.M., Zuur, A.F. & Anderson, T.R., 2011. Absorption efficiencies and basal turnover of C, N and fatty acids in a marine Calanoid copepod. *Functional Ecology*, **25**, 509-518.
- McIntyre, A.D., 1969. Ecology of marine meiobenthos. *Biological Reviews*, **44**(2), 245-288.
- McKew, B.A., Dumbrell, A.J., Taylor, J.D., McGenity, T.J. & Underwood, G.J.C., 2013. Differences between aerobic and anaerobic degradation of microphytobenthic biofilm-derived organic matter within intertidal sediments. *FEMS Microbiology Ecology*, **84**, 495-509.
- McLean, R.J.C., Whiteley, M., Stickler, D.J. & Fuqua, W.C., 1997. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, **154**, 259-263.
- Meadows, P.S. & Meadows, A., 1991. The geotechnical and geochemical implications of bioturbation in marine sedimentary ecosystems. In *The environmental impact of burrowing animals and animal burrows*, (eds. P.S. Meadows and A. Meadows), pp. 157-181. Oxford: Oxford Science Publications.
- Méléder, V., Rincé, Y., Barillé, L., Gaudin, P. & Rosa, P., 2007. Spatiotemporal changes in microphytobenthos assemblages in a macrotidal flat (Bourgneuf bay, France). *Journal of Phycology*, **43**(6), 1177-1190.
- Meyer-Reil, L.-A., 1994. Microbial life in sedimentary biofilms - the challenge to microbial ecologists. *Marine Ecology-Progress Series*, **112**(3), 303-311.
- Meysman, F.J.R., Middelburg, J.J. & Heip, C.H.R., 2006. Bioturbation: a fresh look at Darwin's last idea. *Trends in Ecology & Evolution*, **21**(12), 688-695.
- Meziane, T., Bodineau, L., Retiere, C. & Thoumelin, G., 1997. The use of lipid markers to define sources of organic matter in sediment and food web of the intertidal salt-marsh-flat ecosystem of Mont-Saint-Michel Bay, France. *Journal of Sea Research*, **38**(1-2), 47-58.
- Meziane, T., d'Agata, F. & Lee, S.Y., 2006. Fate of mangrove organic matter along a subtropical estuary: small-scale exportation and contribution to the food of crab communities. *Marine Ecology-Progress Series*, **312**, 15-27.
- Meziane, T., Lee, S.Y., Mflinge, P.L., Shin, P.K.S., Lam, M.H.W. & Tsuchiya, M., 2007. Inter-specific and geographical variations in the fatty acid composition of mangrove leaves: implications for using fatty acids as a

- taxonomic tool and tracers of organic matter. *Marine Biology*, **150**(6), 1103-1113.
- Middelburg, J.J., Barranguet, C., Boschker, H.T.S., Herman, P.M.J., Moens, T. & Heip, C.H.R., 2000. The fate of intertidal microphytobenthos carbon: An in situ C-13-labeling study. *Limnology and Oceanography*, **45**(6), 1224-1234.
- Migné, A., Davoult, D., Spilmont, N., Menu, D., Boucher, G., Gattuso, J.P. & Rybarczyk, H., 2002. A closed-chamber CO₂-flux method for estimating intertidal primary production and respiration under emersed conditions. *Marine Biology*, **140**(4), 865-869.
- Millenium Ecosystem Assessment, 2005. *Ecosystems and Human Well-Being: Synthesis*. Washington, DC: Island Press.
- Miller, M.B. & Bassler, B.L., 2001. Quorum Sensing in Bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **55**, 165-199.
- Moens, T., dos Santos, G.A.P., Thompson, F., Swings, J., Fonseca-Genevois, V., Vincx, M. & De Mesel, I., 2005. Do nematode mucus secretions affect bacterial growth? *Aquatic Microbial Ecology*, **40**(1), 77-83.
- Montagna, P.A., 1984. Measurement of meiobenthic grazing rates on sediment bacteria and edaphic diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, **18**, 119-130.
- Moran, M.A., Sheldon, W.M. & Zepp, R.G., 2000. Carbon loss and optical property changes during long-term photochemical and biological degradation of estuarine dissolved organic matter. *Limnology and Oceanography*, **45**(6), 1254-1264.
- Mortillaro, J.M., Abril, G., Moreira-Turcq, P., Sobrinho, R.L., Perez, M. & Meziane, T., 2011. Fatty acid and stable isotope (¹³C, ¹⁵N) signatures of particulate organic matter in the lower Amazon River: Seasonal contrasts and connectivity between floodplain lakes and the mainstem. *Organic Geochemistry*, **42**, 1159-1168.
- Murray, J.M.H., Meadows, A. & Meadows, P.S., 2002. Biogeomorphological implications of microscale interactions between sediment geotechnics and marine benthos: a review. *Geomorphology*, **47**(1), 15-30.
- Muyzer, G., De Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(3), 695-700.

- Nealson, K.H., Platt, T. & Hastings, J.W., 1970. Cellular Control of the Synthesis and Activity of the Bacterial Luminescent System. *Journal of Bacteriology*, **104**(1), 313-322.
- Nelson, C.E., Goldberg, S.J., Wegley Kelly, L., Haas, A.F., Smith, J.E., Rohwer, F. & Carlson, C.A., 2013. Coral and macroalgal exudates vary in neutral sugar composition and differentially enrich reef bacterioplankton lineages. *The ISME Journal*, **7**, 962-979.
- Nelson, W.A., 2009. Calcified macroalgae - critical to coastal ecosystems and vulnerable to change: a review. *Marine and Freshwater Research*, **60**, 787-801.
- Norkko, A., Cummings, V.J., Thrush, S.F., Hewitt, J.E. & Hume, T., 2001. Local dispersal of juvenile bivalves: implications for sandflat ecology. *Marine Ecology-Progress Series*, **212**, 131-144.
- Novitsky, J.A., 1987. Microbial Growth Rates and Biomass Production in a Marine Sediment: Evidence for a Very Active but Mostly Nongrowing Community. *Applied and Environmental Microbiology*, **53**(10), 2368-2372.
- Nowell, A.R.M. & Jumars, P.A., 1984. Flow environments of aquatic benthos. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 303-328.
- Nozawa, Y., 2011. Adaptive regulation of membrane lipids and fluidity during thermal acclimation in *Tetrahymena*. *Proceedings of the Japan Academy, Ser. B, Physical and Biological Sciences*, **87**(8), 450-462.

- O -

- Oakes, J.M., Eyre, B.D., Middelburg, J.J. & Boschker, H.T.S., 2010. Composition, production, and loss of carbohydrates in subtropical shallow subtidal sandy sediments: Rapid processing and long-term retention revealed by C-13-labeling. *Limnology and Oceanography*, **55**(5), 2126-2138.
- Odling-Smee, L., 2005. Dollars and sense. *Nature*, **437**, 614-616.
- Olivier, F., Desroy, N. & Retière, C., 1996. Habitat selection and adult-recruit interactions in *Pectinaria koreni* (Malmgren) (Annelida: Polychaeta) post-larval populations: results of flume experiments. *Journal of Sea Research*, **36**(3/4), 217-226.
- Olivier, F., Tremblay, R., Bourget, E. & Rittschof, D., 2000. Barnacle settlement: field experiments on the influence of larval supply, tidal level, biofilm quality and age on *Balanus amphitrite* cyprids. *Marine Ecology Progress Series*, **199**, 185-204.

- Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G. & Sauriau, P.-G., 2003. Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: An integrated approach in a tidal mesocosm. *Microbial Ecology*, **45**(3), 237-251.
- Orvain, F., Sauriau, P.-G., Sygut, A., Joassard, L. & Le Hir, P., 2004. Interacting effects of *Hydrobia ulvae* bioturbation and microphytobenthos on the erodibility of mudflat sediments. *Marine Ecology Progress Series*, **278**, 205-223.

- P -

- Palmer, J.D. & Round, F.E., 1967. Persistent, vertical-migration rhythm in benthic microflora. VI. The tidal and diurnal nature of the rhythm in the diatom *Hantzschia virgata*. *The Biological bulletin*, **132**, 44-55.
- Palmer, M.A., 1988. Dispersal of marine meiofauna: a review and conceptual model explaining passive transport and active emergence with implications for recruitment. *Marine Ecology-Progress Series*, **48**(1), 81-91.
- Panagiotopoulos, C. & Sempere, R., 2005. Analytical methods for the determination of sugars in marine samples: A historical perspective and future directions. *Limnology and Oceanography-Methods*, **3**, 419-454.
- Parmelee, R.W., 1995. Soil Fauna: Linking Different Levels of the Ecological Hierarchy. In *Linking species & ecosystems*, (eds. C.G. Jones and J.H. Lawton), pp. 107-116. London: Chapman & Hall.
- Passarelli, C., Hubas, C., Nicolas Segui, A., Grange, J. & Meziane, T., 2012a. Surface adhesion of microphytobenthic biofilms is enhanced under *Hediste diversicolor* (O. F. Müller) trophic pressure. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **438**, 52-60.
- Passarelli, C., Olivier, F., Paterson, D.M. & Hubas, C., 2012b. Impacts of biogenic structures on benthic assemblages: microbes, meiofauna, macrofauna and related ecosystem functions. *Marine Ecology Progress Series*, **465**, 85-97.
- Passarelli, C., Olivier, F., Paterson, D.M., Meziane, T. & Hubas, C., 2013. Organisms as cooperative ecosystem engineers in intertidal flats. *Journal of Sea Research*, in press.
- Paterson, D.M., 1989. Short-term changes in the erodibility of intertidal cohesive sediments related to the migratory behavior of epipelagic diatoms. *Limnology and Oceanography*, **34**(1), 223-234.

- Paterson, D.M., Aspden, R.J. & Black, K.S., 2009. Ecosystem functioning of soft sediment systems. In *Coastal wetlands: An Integrated Ecosystem approach*, (eds. G. Perillo, E. Wolanski, D. Cahoon and M. Brinson): Elsevier Academic Press.
- Paterson, D.M. & Black, K.S., 1999. Water Flow, Sediment Dynamics and Benthic Biology. *Advances in Ecological Research*, **29**, 155-193.
- Paterson, D.M. & Hagerthey, S.E., 2001. Microphytobenthos in Contrasting Coastal Ecosystems: Biology and Dynamics. In *Ecological Comparisons of Sedimentary Shores*, (ed. K. Reise): Springer.
- Paterson, D.M., Tolhurst, T.J., Kelly, J.A., Honeywill, C., de Deckere, E., Huet, V., Shayler, S.A., Black, K.S., de Brouwer, J.F.C. & Davidson, I.R., 2000. Variations in sediment properties, Skeffling mudflat, Humber Estuary, UK. *Continental Shelf Research*, **20**(10-11), 1373-1396.
- Paterson, D.M., Wiltshire, K.H., Miles, A., Blackburn, J., Davidson, I., Yates, M.G., McGrorty, S. & Eastwood, J.A., 1998. Microbiological mediation of spectral reflectance from intertidal cohesive sediments. *Limnology and Oceanography*, **43**(6), 1207-1221.
- Peralta, G., van Duren, L.A., Morris, E.P. & Bouma, T.J., 2008. Consequences of shoot density and stiffness for ecosystem engineering by benthic macrophytes in flow dominated areas: a hydrodynamic flume study. *Marine Ecology-Progress Series*, **368**, 103-115.
- Perkins, R.G., Underwood, G.J.C., Brotas, V., Snow, G.C., Jesus, B. & Ribeiro, L., 2001. Responses of microphytobenthos to light: primary production and carbohydrate allocation over an emersion period. *Marine Ecology Progress Series*, **223**, 101-112.
- Pierre, G., Graber, M., Orvain, F., Dupuy, C. & Maugard, T., 2010. Biochemical characterization of extracellular polymeric substances extracted from an intertidal mudflat using a cation exchange resin. *Biochemical Systematics and Ecology*, **38**(5), 917-923.
- Potts, M., 1994. Desiccation Tolerance of Prokaryotes. *Microbiological Reviews*, **58**(4), 755-805.

- R -

- Rabaut, M., Guilini, K., Van Hoey, G., Magda, V. & Degraer, S., 2007. A bio-engineered soft-bottom environment: The impact of *Lanice conchilega* on

- the benthic species-specific densities and community structure. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **75**(4), 525-536.
- Raffaelli, D. & Hawkins, S., 1996. *Intertidal Ecology*. Springer.
- Reise, K., 2002. Sediment mediated species interactions in coastal waters. *Journal of Sea Research*, **48**, 127-141.
- Rhoads, D.C. & Young, D.K., 1970. The Influence of Deposit-Feeding Organisms on Sediment Stability and Community Trophic Structure. *Journal of Marine Research*, **28**(2), 150-178.
- Riemann, F. & Helmke, E., 2002. Symbiotic relations of sediment-agglutinating nematodes and bacteria in detrital habitats: The enzyme-sharing concept. *Marine Ecology-Pubblicazioni Della Stazione Zoologica Di Napoli I*, **23**(2), 93-113.
- Riemann, F. & Schrage, M., 1978. The Mucus-Trap Hypothesis on Feeding of Aquatic Nematodes and Implications for Biodegradation and Sediment Texture. *Oecologia*, **34**(1), 75-88.
- Riisgåard, H.U. & Larsen, P.S., 2010. Particle capture mechanisms in suspension-feeding invertebrates. *Marine Ecology Progress Series*, **418**, 255-293.

- S -

- Sanin, S.L., Sanin, F.D. & Bryers, J.D., 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochemistry*, **38**(6), 909-914.
- Sargent, J., Bell, G., McEvoy, L., Tocher, D. & Estevez, A., 1999. Recent developments in the essential fatty acid nutrition of fish. *Aquaculture*, **177**(1-4), 191-199.
- Sauer, K., Rickard, A.H. & Davies, D.G., 2010. Biofilms and Biocomplexity. *Microbe*, **2**(7), 347-353.
- Sawall, Y., Richter, C. & Ramette, A., 2012. Effects of Eutrophication, Seasonality and Macrofouling on the Diversity of Bacterial Biofilms in Equatorial Coral Reefs. *PLoS ONE*, **7**(7), e39951.
- Scaps, P., 2002. A review of the biology, ecology and potential use of the common ragworm *Hediste diversicolor* (O.F. Muller) (Annelida: Polychaeta). *Hydrobiologia*, **470**(1-3), 203-218.

- Schäfer, H., Abbas, B., Witte, H. & Muyzer, G., 2002. Genetic diversity of 'satellite' bacteria present in cultures of marine diatoms. *FEMS Microbiology Ecology*, **42**(1), 25-35.
- Smith, D.J. & Underwood, G.J.C., 1998. Exopolymer production by intertidal epipelagic diatoms. *Limnology and Oceanography*, **43**(7), 1578-1591.
- Spilmont, N., Davoult, D. & Migné, A., 2006. Benthic primary production during emersion: In situ measurements and potential primary production in the Seine Estuary (English Channel, France). *Marine Pollution Bulletin*, **53**, 49-55.
- Sprecher, H., 2000. Metabolism of highly unsaturated n-3 and n-6 fatty acids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1486**(2-3), 219-231.
- Staats, N., Stal, L.J., de Winder, B. & Mur, L.R., 2000. Oxygenic photosynthesis as driving process in exopolysaccharide production of benthic diatoms. *Marine Ecology-Progress Series*, **193**, 261-269.
- Stabili, L., Schirosi, R., Di Benedetto, A., Merendino, A., Villanova, L. & Giangrande, A., 2011. First insights into the biochemistry of *Sabella spallanzanii* (Annelida: Polychaeta) mucus: a potentially unexplored resource for applicative purposes. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **91**(1), 199-208.
- Stal, L.J., 2003. Microphytobenthos, their Extracellular Polymeric Substances, and the Morphogenesis of Intertidal Sediments. *Geomicrobiology Journal*, **20**(5), 463-478.
- Stal, L.J., 2010. Microphytobenthos as a biogeomorphological force in intertidal sediment stabilization. *Ecological Engineering*, **36**(2), 236-245.
- Stocum, E.T. & Plante, C.J., 2006. The effect of artificial defaunation on bacterial assemblages of intertidal sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **337**(2), 147-158.
- Sun, M.Y., Wakeham, S.G. & Lee, C., 1997. Rates and mechanisms of fatty acid degradation in oxic and anoxic coastal marine sediments of Long Island Sound, New York, USA. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **61**(2), 341-355.
- Sutherland, I.W., 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, **147**, 3-9.
- Sutherland, T.F., Grant, J. & Amos, C.L., 1998. The effect of carbohydrate production by the diatom *Nitzschia curvilineata* on the erodibility of sediment. *Limnology and Oceanography*, **43**(1), 65-72.

- T -

- Taylor, I.S. & Paterson, D.M., 1998. Microspatial Variation in Carbohydrate Concentrations with Depth in the Upper Millimetres of Intertidal Cohesive Sediments. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **46**, 359-370.
- Taylor, I.S., Paterson, D.M. & Mehlert, A., 1999. The quantitative variability and monosaccharide composition of sediment carbohydrates associated with intertidal diatom assemblages. *Biogeochemistry*, **45**(3), 303-327.
- Taylor, J.D., Mc Kew, B.A., Kuhl, A., McGenity, T.J. & Underwood, G.J.C., 2013. Microphytobenthic extracellular polymeric substances (EPS) in intertidal sediments fuel both generalist and specialist EPS-degrading bacteria. *Limnology and Oceanography*, **58**(4), 1463-1480.
- Thistle, D., Reidenauer, J.A., Findlay, R.H. & Waldo, R., 1984. An experimental investigation of enhanced harpacticoid (Copepoda) abundances around isolated seagrass shoots. *Oecologia*, **63**(3), 295-299.
- Thomsen, M.S., Wernberg, T., Altieri, A., Tuya, F., Gulbransen, D., McGlathery, K.J., Holmer, M. & Silliman, B.R., 2010. Habitat Cascades: The Conceptual Context and Global Relevance of Facilitation Cascades via Habitat Formation and Modification. *Integrative and Comparative Biology*, **50**(2), 158-175.
- Toupoint, N., Godet, L., Fournier, J., Retière, C. & Olivier, F., 2008. Does Manila clam cultivation affect habitats of the engineer species *Lanice conchilega* (Pallas, 1766)? *Marine Pollution Bulletin*, **56**(8), 1429-1438.
- Turner, B.L., Mahieu, N., Condron, L.M. & Chen, C.R., 2005. Quantification and bioavailability of scyllo-inositol hexakisphosphate in pasture soils. *Soil Biology & Biochemistry*, **37**, 2155-2158.

- U -

- Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A. & Waldron, K., 2004. Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: Dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology*, **40**(2), 293-304.
- Underwood, G.J.C. & Kromkamp, J., 1999. Primary Production by Phytoplankton and Microphytobenthos in Estuaries. *Advances in Ecological Research*, **29**, 93-163.

Underwood, G.J.C. & Paterson, D.M., 2003. The Importance of Extracellular Carbohydrate Production by Marine Epipelagic Diatoms. *Advances in Botanical Research*, **40**, 183-239.

- V -

Van Colen, C., Lenoir, J., De Backer, A., Vanellander, B., Vincx, M., Degraer, S. & Ysebaert, T., 2009. Settlement of *Macoma balthica* larvae in response to benthic diatom films. *Marine Biology*, **156**(10), 2161-2171.

van der Heide, T., van Nes, E.H., Geerling, G.W., Smolders, A.J.P., Bouma, T.J. & van Katwijk, M.M., 2007. Positive feedbacks in seagrass ecosystems: Implications for success in conservation and restoration. *Ecosystems*, **10**(8), 1311-1322.

van der Wal, D. & Herman, P.M.J., 2012. Ecosystem Engineering Effects of *Aster tripolium* and *Salicornia procumbens* Salt Marsh on Macrofaunal Community Structure. *Estuaries and Coasts*, **35**, 714-726.

van Duyl, F.C., de Winder, B., Kop, A.J. & Wollenzien, U., 1999. Tidal coupling between carbohydrate concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats. *Marine Ecology-Progress Series*, **191**, 19-32.

van Duyl, F.C., de Winder, B., Kop, A.J. & Wollenzien, U., 2000. Consequences of diatom mat erosion for carbohydrate concentrations and heterotrophic bacterial activities in intertidal sediments of the Ems-Dollard estuary. *Continental Shelf Research*, **20**(10-11), 1335-1349.

Van Gemerden, H., 1993. Microbial mats: A joint venture. *Marine Geology*, **113**, 3-25.

Veuger, B., van Oevelen, D. & Middelburg, J.J., 2012. Fate of microbial nitrogen, carbon, hydrolysable aminoacids, monosaccharides, and fatty acids in sediment. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **83**, 217-233.

Volkenborn, N., Hedtkamp, S.I.C., van Beusekom, J.E.E. & Reise, K., 2007. Effects of bioturbation and bioirrigation by lugworms (*Arenicola marina*) on physical and chemical sediment properties and implications for intertidal habitat succession. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **74**, 331-343.

Volkenborn, N. & Reise, K., 2006. Lugworm exclusion experiment: Responses by deposit feeding worms to biogenic habitat transformations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **330**, 169-179.

- Volkenborn, N. & Reise, K., 2007. Effects of *Arenicola marina* on polychaete functional diversity revealed by large-scale experimental lugworm exclusion. *Journal of Sea Research*, **57**, 78-88.
- Volkenborn, N., Robertson, D.M. & Reise, K., 2009. Sediment destabilizing and stabilizing bio-engineers on tidal flats: cascading effects of experimental exclusion. *Helgoland Marine Research*, **63**(1), 27-35.
- Volkman, J.K., Johns, R.B., Gillan, F.T., Perry, G.J. & Bavor, H.J., 1980. Microbial lipids of an inter-tidal sediment. 1. Fatty-acids and hydrocarbons. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **44**(8), 1133-1143.

- W -

- Watson, J.D. & Crick, F.H.C., 1953. Genetical Implications of the Structure of Deoxyribonucleic Acid. *Nature*, **171**, 946-967.
- Watzin, M.C., 1983. The effects of meiofauna on settling macrofauna: meiofauna may structure macrofaunal communities. *Oecologia*, **59**(2-3), 163-166.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J., 1991. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, **173**(2), 697-703.
- Werry, J. & Lee, S.Y., 2005. Grapsid crabs mediate link between mangrove litter production and estuarine planktonic food chains. *Marine Ecology-Progress Series*, **293**, 165-176.
- Whitchurch, C.B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P.C. & Mattick, J.S., 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*, **295**(5559), 1487-1487.
- Whitlatch, R.B. & Zajac, R.N., 1985. Biotic interactions among estuarine infaunal opportunistic species. *Marine Ecology-Progress Series*, **21**(3), 299-311.
- Widdows, J. & Brinsley, M., 2002. Impact of biotic and abiotic processes on sediment dynamics and the consequences to the structure and functioning of the intertidal zone. *Journal of Sea Research*, **48**(2), 143-156.
- Wilkie, L., O'Hare, M.T., Davidson, I., Dudley, B. & Paterson, D.M., 2012. Particle trapping and retention by *Zostera noltii*: A flume and field study. *Aquatic Botany*, **102**, 15-22.
- Wilson, J.B. & Agnew, D.Q., 1992. Positive-feedback Switches in Plant Communities. *Advances in Ecological Research*, **23**, 263-336.

- Wilson, S., Blake, C., Berges, J.A. & Maggs, C.A., 2004. Environmental tolerances of free-living coralline algae (maerl): implications for European marine conservation. *Biological Conservation*, **120**, 279-289.
- Woodin, S.A., 1978. Refuges, Disturbance, and Community Structure: A Marine Soft-Bottom Example. *Ecology*, **59**(2), 274-284.
- Woodin, S.A. & Jackson, J.B.C., 1979. Interphyletic Competition Among Marine Benthos. *American Zoologist*, **19**(4), 1029-1043.
- Wotton, R.S., 2004. The essential role of exopolymers (EPS) in aquatic systems. In *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, vol. 42 (eds. R.N. Gibson, R.J.A. Atkinson and J.D.M. Gordon), pp. 57-94. Aberdeen University Press.
- Woulds, C., Middelburg, J.J. & Cowie, G.L., 2012. Alteration of organic matter during infaunal polychaete gut passage and links to sediment organic geochemistry. Part I: Amino acids. *Geochimica Et Cosmochimica Acta*, **77**, 396-414.

- Y -

- Yallop, M.L., Paterson, D.M. & Wellsbury, P., 2000. Interrelationships between rates of microbial production, exopolymer production, microbial biomass, and sediment stability in biofilms of intertidal sediments. *Microbial Ecology*, **39**(2), 116-127.
- Yentsch, C.S. & Menzel, D.W., 1963. A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep-Sea Research*, **10**, 221-231.

- Z -

- Zhou, J., Mopper, K. & Passow, U., 1998. The role of surface-active carbohydrates in the formation of transparent exopolymer particles by bubble adsorption of seawater. *Limnology and Oceanography*, **43**(8), 1860-1871.
- Zhu, J. & Mekalanos, J.J., 2003. Quorum Sensing-Dependent Biofilms Enhance Colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental Cell*, **5**(4), 647-656.
- Zühlke, R., 2001. Polychaete tubes create ephemeral community patterns: *Lanice conchilega* (Pallas, 1766) associations studied over six years. *Journal of Sea Research*, **46**(3-4), 261-272.

Zühlke, R., Blome, D., van Bernem, K.H. & Dittmann, S., 1998. Effects of the tube-building polychaete *Lanice conchilega* (Pallas) on benthic macrofauna and nematodes in an intertidal sandflat. *Senckenbergiana Maritima*, **29**(1-6), 131-138.

Annexes

