



**HAL**  
open science

# Stratégies d'adaptation des diatomées phytoplanctoniques aux variations de l'intensité lumineuse rencontrées dans leur environnement naturel

Johann Lavaud

► **To cite this version:**

Johann Lavaud. Stratégies d'adaptation des diatomées phytoplanctoniques aux variations de l'intensité lumineuse rencontrées dans leur environnement naturel. Sciences du Vivant [q-bio]. UNIVERSITE PARIS VI, 2002. Français. NNT: . tel-04372095

**HAL Id: tel-04372095**

**<https://hal.science/tel-04372095>**

Submitted on 4 Jan 2024

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

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

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS VI**

Spécialité

**SCIENCES DE L'ENVIRONNEMENT D'ILE DE FRANCE**

Présentée par

**Johann LAVAUD**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR de l'UNIVERSITE PARIS VI**

Sujet de la Thèse :

**Stratégies d'adaptation des diatomées phytoplanctoniques aux  
variations de l'intensité lumineuse rencontrées dans leur  
environnement naturel**

---

**Soutenue le 28 juin 2002**

devant le jury composé de :

*Président*

**Mr Paul NIVAL**, Professeur, Université de Paris VI, SZ Villefranche/Mer.

*Rapporteurs*

**Mr Bruno ROBERT**, Expert Senior CEA, Saclay.

**Mr Gérard TREMBLIN**, Professeur, Université du Mans.

*Examineurs*

**Mme Anne-Lise ETIENNE**, Directeur de Recherche CNRS, ENS Paris.

**Mr Michel HAVAUX**, Expert Senior CEA, Cadarache.

**Mr Christian WILHELM**, Professeur, Université de Leipzig, Allemagne.



## RESUME

Les diatomées planctoniques ont un rôle prépondérant dans le cycle du carbone puisqu'elles sont responsables de 40 % de la production primaire océanique. Elles dominent dans les eaux turbulentes où le mélange vertical les expose à des changements d'intensité lumineuse rapides et importants. L'absorption de l'énergie lumineuse utilisée pour la photosynthèse est assurée par des complexes pigments-protéines chlorophylliens (LHCF) qui sont relativement différents de ceux des plantes vertes. Chez ces dernières, les mécanismes de photorégulation sont assez bien connus, contrairement aux diatomées. Mon travail de thèse a porté sur les stratégies d'adaptation des diatomées planctoniques aux variations lumineuses à court terme (la photoprotection) et à long terme (la photoacclimatation).

Dans un premier temps, nous avons obtenu, grâce à des conditions de cultures particulières, des cellules spécifiquement enrichies en diadinoxanthine (DD). Ce pigment est impliqué dans un mécanisme photoprotecteur essentiel qui se manifeste par le passage rapide des LHCF de leur fonction "normale" de transfert efficace de l'énergie absorbée aux centres réactionnels à une fonction de dissipation de l'énergie lumineuse. Ce changement fonctionnel est illustré par un quenching non-photochimique de la fluorescence chlorophyllienne (NPQ) régulé par la dé-époxydation réversible de la DD en diatoxanthine (DT) (cycle des xanthophylles). Il entraîne la diminution de la proportion d'énergie transmise aux centres réactionnels photosystème II (PS II). La comparaison de la dissipation d'énergie et du cycle des xanthophylles dans les deux types de culture a permis de démontrer de manière indubitable l'efficacité du NPQ dans la photoprotection. Ce matériel unique nous a également apporté de précieuses informations sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation du NPQ. Les complexes pigments-protéines ont été purifiés chez les deux types de cultures. Leur contenu polypeptidique et pigmentaire a été caractérisé avec une attention toute particulière pour la localisation de la DD.

Dans un second temps, les processus photoprotecteurs autres ont été examinés et un accent particulier a été donné aux voies alternatives à la voie photosynthétique qui permettent d'utiliser et/ou de stocker l'énergie en excès. Nous avons mis en évidence l'existence d'un transport cyclique des électrons au sein du PS II ainsi que le stockage d'un composé réduit à la lumière utilisé ensuite comme carburant à l'obscurité par la chlororespiration. Ces deux mécanismes sont bien connus pour contribuer à la photoprotection de la cellule.

Nous avons également étudié la photoacclimatation des diatomées planctoniques en axant notre approche sur les capacités de photoprotection des diatomées acclimatées à forte intensité lumineuse. Chez ces algues, la relation entre le cycle de la DD et le développement du NPQ est modifiée. Ceci suggère plusieurs localisations possibles de la DT au sein de l'appareil photosynthétique et un rôle indirect de la DT dans le NPQ.

Enfin, nous avons montré que les mécanismes de photoprotection étudiés en détail chez *Phaeodactylum tricornerutum* poussée dans différentes conditions de lumière existent également à des degrés divers chez plusieurs autres diatomées planctoniques d'importance écologique (tel que *Thalassiosira weissflogii*). Cette comparaison a permis de valider notre choix de *P. tricornerutum* comme organisme modèle.

Une autre partie de ce travail a consisté à la mise en application pratique de l'observable qu'est l'émission de fluorescence chlorophyllienne qui a été utilisée dans l'étude de la photorégulation chez les diatomées. Ceci a abouti à l'élaboration d'un fluorimètre pour le suivi de la dynamique des peuplements phytoplanctoniques d'eau douce en vue de la détection précoce des proliférations algales avec une attention pour les cyanobactéries. L'appareil est capable de mesurer la biomasse, de distinguer entre quatre groupes phytoplanctoniques (algues vertes, diatomées, deux types de cyanobactéries) et d'évaluer la physiologie du peuplement. Ce travail a été réalisé en collaboration avec la société Suez-Ondeo Services.

**Mot clés :** complexe pigments-protéines, cycle des xanthophylles, diatomées planctoniques, fluorescence chlorophyllienne, *Phaeodactylum tricornerutum*, photoacclimatation, photoprotection.

## ABSTRACT

Diatoms play an important role in the carbon cycle. They contribute up to 40 % of the oceanic primary production. They are dominant in turbulent waters where the vertical mixing exposes them to large and rapid changes in light intensity. The collection of solar energy used for photosynthesis is achieved, in diatoms, by light-harvesting complexes (LHCF) which differ in many respects from those of higher plants. For the latter, the photoregulatory mechanisms are rather well known. Such is not the case in diatoms. My thesis project has been to study the adaptation strategies of planktonic diatoms to changing light. On the short term photoprotection takes place, while for longer terms, photoacclimation is occurring.

In a first part of my work, we obtained with special culture conditions, cells specifically enriched in diadinoxanthin (DD). This pigment is involved in a crucial photoprotective mechanism which consists in a switch of the LCHF function from efficient transfer of the absorbed energy to the reaction centers, to dissipation of excess energy. This modification is brought by the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence (NPQ) and regulated by the de-epoxidation of the DD into diatoxanthin (DT) (the so-called xanthophyll cycle). It induces a decrease in the amount of energy transferred to the photosystem II (PS II) reaction centers. The comparison between the NPQ and the xanthophyll cycle developed in the cells with different DD pool sizes led to the conclusion that NPQ is an efficient photoprotective mechanism which is proportional to the DT pool size. This unique material also provided additional informations on the molecular mechanisms involved in the NPQ regulation. The LHCF of the two types of cells have been purified. Their polypeptide composition and pigment content have been analyzed with a special concern about the localization of the DD and DT molecules.

In a second part of my work, other photoprotective mechanisms have been studied with a specific interest for the alternative routes of electron transfer which store or utilize the reducing power generated in excess during high light illumination. We were able to demonstrate the occurrence of a cyclic electron flow around PS II and also the storage of a reduced compound during the high light illumination, used later by chlororespiration at lower intensity or in the dark. These two mechanisms can contribute to photoprotection.

We also studied photoacclimation of planktonic diatoms and more precisely the capacity of energy dissipation in cells acclimated to high light. In these cells, the correlation between NPQ and DT is modified. Our results suggest different possible localizations for DT in the thylakoid membrane and an indirect role for DT in NPQ.

Lastly, we verified that the photoprotective dissipation of energy studied in *Phaeodactylum tricorutum* also occurred in several other planktonic diatoms of ecological interest (such as *Thalassiosira weissflogii*). These results validate the choice of *P. tricorutum* as a model organism.

Another aspect of my work concerned the use of fluorescence as a non invasive method to evaluate the phytoplanktonic content of aquatic ecosystems. A trichromatic fluorometer was conceived and built in the lab. It was used to follow the dynamics of freshwater planktonic populations for an early detection of blooms with a special focus on cyanobacteria. The set-up can be used to discriminate between four phytoplanktonic groups (green algae, diatoms and two types of cyanobacteria). It is also able to evaluate the physiological state of a whole population. This work was done in collaboration with the French company Suez-Ondeo Services.

**Key words :** pigment-protein complex, xanthophyll cycle, planktonic diatoms, chlorophyll fluorescence, *Phaeodactylum tricorutum*, photoacclimation, photoprotection.

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire  
'Organismes Photosynthétiques et Environnement',  
UMR CNRS 8543,  
Département de Biologie,  
Ecole Normale Supérieure de Paris.*

## **REMERCIEMENTS**

Quand on a 22 ans, quatre ans ça paraît être une éternité. On se dit que la thèse qui s'annonce va être bien longue, que l'on va certainement en baver, sans doute s'ennuyer, et aux dires des "anciens" que les moments de doute et de tension seront nombreux et réguliers. On se demande alors si l'allocation de recherche n'est pas un cadeau empoisonné. Je ne sais pas si je suis un "thésard" non conventionnel mais quatre ans c'est un souffle pendant lequel je n'ai pas eu le temps de m'ennuyer ; et finalement les doutes, tensions et Co. n'ont fait que m'effleurer. Ce n'est pas que je sois quelqu'un d'exceptionnel mais c'est plutôt que les personnes qui m'ont accompagné durant ces années, et les ont rendu aussi douces sont, en tout cas à mes yeux, exceptionnelles à bien des égards. J'ai eu grâce à l'équipe du laboratoire mais aussi grâce à d'autres des opportunités d'apprendre, de rencontrer, de voyager, d'enseigner, etc... que je n'aurais jamais eu ailleurs. Ces quatre ans ont constitué une période d'enrichissement personnel et scientifique énorme qui j'espère se poursuivra. Bref, le pari initial et paradoxal de quitter les côtes bretonnes pour aller travailler sur les algues à la capitale s'avère être tout sauf un regret. Et comme on dit, si c'était à refaire...

Quant aux algues, la révélation a eu lieu à Brest alors que rien ne me destinait à travailler sur ces organismes et encore moins sur le milieu marin en général. Je commencerai donc par remercier Jean-Yves Floch qui le premier m'a mis le pied à l'étrier et m'a fait découvrir ce vaste champ scientifique qu'est la Phycologie et pour lequel il reste tant à découvrir. Je tiens à remercier également André Brun et Guy Levavasseur qui m'ont les premiers donné l'occasion de travailler sur les algues.

Mais, je dois avouer que la confirmation de mon intérêt pour ces organismes et plus particulièrement pour leur physiologie a eu lieu lors de mon année de DEA en partie loin de la mer, à Paris, à l'ENS. Je remercie donc l'équipe enseignante de l'option Phycologie et notamment le trio infernal Henri Jupin, Jean-Claude Thomas et Jean-Claude Duval. Je remercie aussi mes compères de promo François, Cécile, Florence, Géraldine qui ont rendu cette année si sympathique, et bien sûr Jérôme dont l'amitié me manque.

Les deux Jean-Claude ont été particulièrement importants. Jean-Claude Duval tout d'abord parce qu'il a été le co-responsable de mon stage de DEA et de ma première année de thèse avant de prendre sa retraite. Jean-Claude a été essentiel car il a su déceler en moi un potentiel que je ne soupçonnais pas et parce qu'il a su le cultiver en me faisant totalement confiance alors que le pari n'était pas gagné d'avance : il a tout simplement fourni le terreau et l'eau à la graine qui avait précédemment été semée et qui ne demandait qu'à germer. Il m'a également donné une recette essentielle à la réussite scientifique : toujours s'amuser (déconner même) et surtout relativiser (nous ne sauvons pas des vies, nous cherchons seulement à comprendre "comment ça marche"). Alors, je n'oublierai évidemment pas les après-midi passés à expérimenter et réfléchir tout en rigolant comme des baleines et écoutant du jazz. A ces moments de bonne poilade, je dois associer Gérard Parésys qui a complété la "fine équipe Lyonnaise-des-Eaux" : la conception du fluorimètre et du logiciel ont été ponctuées de fous rires réguliers et salvateurs.

Jean-Claude Duval et aussi Jean-Claude Thomas ont également été prépondérants dans le parcours de ces dernières années car ils m'ont permis d'effectuer mes premières armes dans l'enseignement. Là encore, je ne me destinais pas du tout à ce type d'activité (pas assez extraverti disait-on). Mais pourtant, ils ont fait appel à moi pour animer les ateliers de deux DEA ; et là encore, confiance totale et carte blanche. Une petite parenthèse pour saluer et remercier Simone Puiseux-Dao et les étudiants de l'option Phycologie du DEA d'Océanologie 00/01 avec qui j'ai eu plaisir à travailler. Je remercie aussi Jean-Claude Thomas pour ses qualités légendaires : gentillesse, disponibilité et connaissances encyclopédiques. Puisque j'en suis à citer les personnes qui m'ont entraîné dans l'enseignement, je tiens à remercier chaleureusement Catherine Bajon qui m'a ouvert les portes de l'équipe enseignante du DEUG SVT de Paris VI d'abord en tant que vacataire puis en tant qu'ATER. Cette position là, je la dois aussi en partie à Thibaut Desquilbet qui m'a "infiltré" à Paris VI. Je le remercie pour cela et aussi pour son aide et ses conseils sur le fond et la forme des enseignements que j'ai dû assurer.

Parallèlement à la recherche fondamentale et à l'enseignement, j'ai également eu la chance de participer à un projet de recherche appliquée. Ce travail ayant été réalisé en collaboration avec Suez-Ondeo Services (ex Suez-Lyonnaise-des-Eaux), j'ai pu découvrir le fonctionnement d'un grand groupe privé aux ramifications internationales et en particulier asiatiques. Je tiens donc aussi à remercier ici les différentes personnes qui m'ont plus



qu'accompagné dans cette histoire et notamment Jean-Pierre Barbier et Thomas Le Vaillant. Comment oublier pêle-mêle les repas portugais arrosés de bière chinoise (!), les taxis de Macao, l'accueil royal de la famille Barbier à Kuala Lumpur, la récolte d'échantillons sur l'Upper Layang, etc... Je retiendrai aussi l'accueil des équipes locales de Macao, en Chine, et de Johor, en Malaisie, et tout particulièrement celui de Addie Wong et de son équipe : la gentillesse est chez eux une seconde nature.

Je n'oublie pas non plus les proches collaborateurs que furent Bernard Rousseau et le fraîchement arrivé Gérard Guglielmi. Sans ces deux personnes, qui regroupent des connaissances pharaoniques et complémentaires, et un savoir-faire si précieux, ce travail n'existerait pas. Je remercie aussi Lise Caron et Dominique Douady qui m'ont toutes deux initié à la biochimie des complexes antennes de diatomées. Dans ce cadre, je citerais également Jean-Pierre Roux et Gérard Parésys pour leur indispensable aide en informatique, ainsi que Nathalie Legoullon pour son aide concernant les petites tracasseries administratives. Toutes ces personnes m'ont tellement facilité la tâche que sans elles j'y serais encore !

Merci également à Jean Houmard pour son intérêt indéfectible pour mon travail malgré ses aspirations relativement éloignées, ainsi que pour ses bons conseils scientifiques et extra-scientifiques. Dans ce cadre, je remercie également Jean-Paul Dubacq, Diana Kirilovsky, Benoît Schoefs, Andy Pascal et Pascal Lopez.

Je remercie chaleureusement toutes les autres personnes du laboratoire qui sont intervenues d'une manière ou d'une autre au cours de ma thèse, par leurs conseils et leurs encouragements. Merci à Catherine, Christiane, Gérard, Irène, Agnès, Annette, Michelle et Sylvie. J'adresse un salut tout particulier aux non permanents que j'ai croisé ici et dont les expériences et parcours divers m'ont enrichi : Alessandra, Mathilde, Estelle, Thibaut, Jean-Michel, Kamal, Ignacio, Jesus, Kiet, Florence, et bien sûr Jean-Charles.

Un grand merci à Alexandre, Jean-Charles, Gérard, Jean-Michel, Claude et Stéphanie pour l'amitié et les bons moments passés à table et ailleurs à parler musique, cinéma, littérature, BD, foot et autres. Un merci particulier à Gérard pour les "pauses Libé" et pour, entre autres, m'avoir fait découvrir la quadrilogie de "l'Odyssée de l'Espace". Un grand merci également à Marie pour son aide précieuse lors de la relecture et de la correction du manuscrit final.

Je souhaite exprimer ma profonde reconnaissance à messieurs G. Tremblin et B. Robert qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail ainsi qu'à messieurs P. Nival, M. Havaux et C. Wilhelm qui ont accepté de faire partie du jury de cette thèse et qui se sont déplacés de parfois bien loin pour venir juger ce travail.

On a l'habitude de commencer les remerciements "professionnels" par la personne la plus importante, j'ai choisi de finir par celle-ci : Anne-Lise Etienne. Quand j'ai commencé mon stage de DEA, j'étais son étudiant et la communication n'était pas toujours facile. Quatre ans après, nous travaillons ensemble sous forme d'une collaboration étroite, extrêmement complémentaire, au sein de laquelle nous nous amusons énormément. Voilà qui résume tout. Anne-Lise regroupe les qualités de toutes les personnes citées avant. Elle a été tout aussi importante que Jean-Claude Duval dans le développement de l'"embryon" de chercheur que j'étais. Elle m'a transmis son enthousiasme, même sa passion pour la recherche. Son soutien a toujours été constant, son intérêt pour mon travail grandissant et sa confiance totale. Bref, sans sa puissance de réflexion, ses idées nombreuses et originales et son courage concernant certaines prises de position ce travail n'aurait pas vu le jour. A Anne-Lise, je dois associer Hans van Gorkom, qui est venu débloquent ce travail à un moment où il en avait bien besoin. J'ai apprécié son enthousiasme, son opiniâtreté, sa sincérité le tout enrobé d'un humour ravageur et ponctué de citations bien senties (brave Occam !). Merci Anne-Lise, merci Hans.

Enfin, je remercie mes proches, ma famille et mes amis, qui ont suivi cette aventure avec intérêt et enthousiasme : ma mère et ma sœur évidemment, mais aussi pêle-mêle, Laurence et ses conseils avisés, Arnault, Nicolas, Sébastien, Géraldine et Yann, Loïc et Raphaëlle, Delphine, Vincent, Claude-Emmanuel, et tous les autres que je n'ai pas la place de citer ici. Et bien sûr, je n'oublie pas ma petite Maëlle qui m'a supporté, réconforté, aidé et bien plus encore pendant ces quatre années.

Pour finir, j'ai une pensée tout particulière pour mon père à qui je dédie ce travail.

\*\*\*\*\*

## TABLES DES MATIERES

<b>LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX</b>	6
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	9
<b><u>CHAPITRE I – INTRODUCTION</u></b>	<b>13</b>
<b>I- L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE ET SON ADAPTATION A LA LUMIERE.</b>	17
<b>I- 1. L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE.</b>	17
<b>I- 1. 1. La photosynthèse oxygénique.</b>	17
I- 1. 1. 1. <u>Origine.</u>	17
I- 1. 1. 2. <u>Fonctionnement.</u>	19
<b>I- 1. 2. Les complexes pigments-protéines.</b>	21
I- 1. 2. 1. <u>La pigmentation.</u>	23
I- 1. 2. 2. <u>Le cœur des photosystèmes.</u>	25
I- 1. 2. 2. a. <i>Le cœur du PS II.</i>	26
I- 1. 2. 2. b. <i>Le cœur du PS I.</i>	27
I- 1. 2. 3. <u>Les antennes collectrices d'énergie lumineuse.</u>	28
I- 1. 2. 3. a. <i>L'antenne du PS I.</i>	28
I- 1. 2. 3. b. <i>L'antenne du PS II.</i>	28
I- 1. 2. 3. c. <i>Origine des complexes antennes.</i>	31
<b>I- 2. UNE APPROCHE BIOPHYSIQUE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE : L'EMISSION DE FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE.</b>	35
<b>I- 2. 1. Origine.</b>	35
<b>I- 2. 2. L'étude de la photosynthèse.</b>	36
<b>I- 2. 3. Niveaux et paramètres de fluorescence.</b>	38
I- 2. 3. 1. <u>Fluorescence minimale et maximale.</u>	38
I- 2. 3. 2. <u>L'induction de fluorescence.</u>	39
I- 2. 3. 3. <u>Le quenching de fluorescence.</u>	41

<b>I- 3. STRATEGIES D'ADAPTATION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE AUX VARIATIONS DE LUMIERE.</b>	42
<b>I- 3. 1. Mécanismes photoprotecteurs à court terme.</b>	42
I- 3. 1. 1. <u>La photoinhibition.</u>	43
I- 3. 1. 2. <u>La dissipation photoprotective de l'excès d'énergie.</u>	44
I- 3. 1. 2. a. <i>Le mécanisme du NPQ.</i>	45
I- 3. 1. 2. b. <i>Le cycle des xanthophylles.</i>	47
I- 3. 1. 2. c. <i>Le rôle des xanthophylles dans le NPQ.</i>	48
I- 3. 1. 2. d. <i>Le NPQ, les xanthophylles et la photoprotection.</i>	51
I- 3. 1. 3. <u>Les autres mécanismes photoprotecteurs.</u>	51
<b>I- 3. 2. Adaptation à long terme.</b>	54
<b>II- PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : LES DIATOMEES PLANCTONIQUES.</b>	57
<b>II- 1. GENERALITES.</b>	57
<b>II- 1. 1. La production primaire.</b>	57
<b>II- 1. 2. La frustule ou "la vie dans un sarcophage de verre".</b>	59
<b>II- 1. 3. Diversité, formes et cycle de vie.</b>	62
<b>II- 1. 4. Les plastes de diatomées : origine et structure.</b>	66
<b>II- 1. 5. Utilisations et nuisances.</b>	70
<b>II- 2. LES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES DES DIATOMEES.</b>	71
<b>II- 2. 1. Un historique.</b>	71
<b>II- 2. 2. Les pigments collecteurs d'énergie lumineuse.</b>	73
II- 2. 2. 1. <u>Les différents pigments collecteurs d'énergie lumineuse.</u>	74
II- 2. 2. 2. <u>La voie de biosynthèse des xanthophylles.</u>	76
<b>II- 2. 3. Les polypeptides LHCF.</b>	79
II- 2. 3. 1. <u>La composition polypeptidique.</u>	79
II- 2. 3. 2. <u>La famille multigénique des polypeptides LHCF.</u>	80
<b>II- 2. 4. La structure tridimensionnelle des LHCF et les sites de fixation des pigments.</b>	82
<b>II- 2. 5. Hétérogénéité structurale et fonctionnelle des LHCF.</b>	84
<b>II- 3. L'ADAPTATION DES DIATOMEES AUX VARIATIONS LUMINEUSES.</b>	86
<b>II- 3. 1. "The phytoplanktonic way of life".</b>	86
<b>II- 3. 2. Les diatomées et les fluctuations de lumière.</b>	89

<b>II- 3. 3. Mécanismes d'adaptation à court terme.</b>	90
II- 3. 3. 1. <u>Le cycle des xanthophylles.</u>	91
II- 3. 3. 2. <u>Le NPQ associé au cycle des xanthophylles.</u>	93
<b>II- 3. 4. Mécanismes d'adaptation à long terme.</b>	94
II- 3. 4. 1. <u>L'acclimatation aux changements spectraux.</u>	95
II- 3. 4. 2. <u>L'acclimatation aux changements d'intensité lumineuse.</u>	97
<i>II- 3. 4. 2. a. La forte lumière.</i>	97
<i>II- 3. 4. 2. b. Les radiations UV.</i>	101
<i>II- 3. 4. 2. c. La faible lumière et la survie à l'obscurité.</i>	102
II- 3. 4. 3. <u>La régulation des gènes <i>lhcf</i> et des protéines LHCF et la perception des signaux lumineux.</u>	106
<b>III- DEMARCHE ADOPTEE AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE.</b>	109
<b>IV- LISTE DES PUBLICATIONS EFFECTUEES PENDANT LA THESE.</b>	112
<b><u>CHAPITRE II – MATERIELS ET METHODES</u></b>	<b>113</b>
<b>I- ALGUES PHYTOPLANCTONIQUES UTILISEES ET CONDITIONS DE CULTURE.</b>	113
<b>I- 1. DESCRIPTION DES GENRES ET/OU ESPECES.</b>	113
<b>I- 2. ORIGINE DES SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE.</b>	114
<b>II- MESURE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE.</b>	117
<b>II- 1. L'EMISSION DYNAMIQUE DE FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE.</b>	117
<b>II- 1. 1. Fluorimètre conventionnel.</b>	117
<b>II- 1. 2. Fluorimètre modulé.</b>	117
II- 1. 2. 1. <u>Principe de la mesure.</u>	117
II- 1. 2. 2. <u>Dispositif de détection de la fluorescence.</u>	118
II- 1. 2. 3. <u>Niveaux de fluorescence.</u>	118
<b>II- 2. L'EMISSION D'OXYGENE PHOTOSYNTHETIQUE.</b>	121
<b>II- 2. 1. Electrode de Clark : la cellule entière.</b>	121
<b>II- 2. 2. Electrode de vitesse : le PS II.</b>	122

<b>II- 3. UTILISATION D’INHIBITEURS.</b>	126
<b>III- PURIFICATION ET CARACTERISATION DES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES.</b>	126
<b>III- 1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES COMPLEXES.</b>	126
<b>III- 1. 1. Solubilisation des complexes et isolement sur gradient de saccharose.</b>	126
<b>III- 1. 2. Purification des sous-complexes LHCF par focalisation isoélectrique non-dénaturante.</b>	129
<b>III- 2. CARACTERISATION POLYPEPTIDIQUE DES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES.</b>	130
<b>III- 2. 1. Technique SDS-PAGE.</b>	130
<b>III- 2. 2. IEF dénaturante.</b>	132
<b>IV- ANALYSES PIGMENTAIRES.</b>	132
<b>IV- 1. SPECTROPHOTOMETRIE D’ABSORPTION.</b>	133
<b>IV- 2. SPECTROFLUORIMETRIE.</b>	133
<b>IV- 3. QUANTIFICATION PIGMENTAIRE PAR HPLC.</b>	134
<b>CHAPITRE III – RESULTATS ET DISCUSSION</b>	136

**1<sup>ère</sup> partie**

<i>1- Influence du régime lumineux sur l’antenne collectrice de lumière et sur la taille du pool de diadinoxanthine chez Phaeodactylum tricornutum – Article 1.</i>	136
<i>2- Influence de la taille du pool de diadinoxanthine sur la photoprotection chez Phaeodactylum tricornutum – Article 2.</i>	156
<i>3- La présence de la diatoxanthine est-elle indispensable à la formation du quenching non-photochimique ? – Article 3.</i>	178
<i>4- Généralisation des résultats concernant le cycle des xanthophylles et le NPQ à plusieurs diatomées planctoniques – Article 4.</i>	190

**2<sup>ème</sup> partie**

*5- Les mécanismes photoprotecteurs alternatifs : transport cycle des électrons au sein du PS II et chlororespiration*– Article 5. 207

**3<sup>ème</sup> partie**

*6- 1. Recherches en cours- Photoacclimatation de Phaeodactylum tricornutum : modifications de l'appareil photosynthétique et de la relation entre la diatoxanthine et le NPQ.* 227

*6- 2. Recherches en cours- Caractérisation biochimique du LHCF de Phaeodactylum tricornutum soumise à différents régimes lumineux.* 239

**CHAPITRE IV – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES** 253

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES** 261

**ANNEXE** 285

*Conception d'un fluorimètre pour le suivi de la dynamique des populations phytoplanktoniques* – Article 6. 285

\*\*\*\*\*

## LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

- p. 18 *Fig. 1* : Schéma de la chaîne de transport d'électrons dans les membranes thylakoïdales eucaryotiques.
- p. 18 *Fig. 2* : Schéma "en Z" représentant la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons depuis l'eau jusqu'à la ferrédoxine.
- p. 24 *Fig. 3* : Structures moléculaires des chlorophylles (ainsi que leur spectres d'absorption), et des carotènes et xanthophylles.
- p. 26 *Fig. 4* : Modèle d'organisation structurale du complexe protéique du PS II.
- p. 27 *Fig. 5* : Modèle d'organisation structural du complexe protéique du PS I.
- p. 29 *Fig. 6 : A-* Structure tridimensionnelle du LHCII des végétaux supérieurs.
- p. 30 *Fig. 6 : B-* Représentation du monomère LHCII dans les membranes photosynthétiques.
- p. 33 *Fig. 7* : Organisation du PS II à différentes échelles.
- p. 34 *Fig. 8* : Schéma de la théorie endosymbiotique primaire et secondaire expliquant l'origine commune des antennes à Chl *a* à 3  $\alpha$ -hélices.
- p. 36 *Fig. 9* : Les trois voies de désactivation de la Chl *a* excitée ( $^1\text{Chl}^*$ ).
- p. 39 *Fig. 10* : Représentation schématique d'une induction de fluorescence (ou phénomènes de Kautsky) chez une feuille.
- p. 43 *Fig. 11 : A-* Représentation schématique des processus photoprotecteurs intervenant dans les plastes ; *B-* Représentation schématique des "safety valves for photosynthesis" permettant de dissiper l'excès de photons et d'électrons.
- p. 44 *Fig. 12* : Voies de désactivation de la  $^1\text{Chl}^*$ .
- p. 46 *Fig. 13* : Modèle du mécanisme du NPQ (qE) chez les plantes supérieures.
- p. 49 *Fig. 14* : Cycles des xanthophylles, cycle de la VX et cycle de la DD.
- p. 49 *Fig. 15* : Représentation schématique de la localisation du cycle des xanthophylles et de sa régulation chez les plantes supérieures.
- p. 50 *Fig. 16* : Représentation schématique du rôle photoprotecteur des caroténoïdes.
- p. 53 *Fig. 17* : Représentation schématique des voies alternatives pour l'utilisation des électrons.



- p. 54 *Fig. 18* : Représentation schématique du transport cyclique des électrons au sein du PS II.
- p. 58 *Fig. 19* : Cartographie en fausses couleurs de la productivité primaire océanique nette durant l'été.
- p. 60 *Fig. 20* : Représentation schématique des différents composants de la frustule d'une diatomée pennée.
- p. 61 *Fig. 21* : Exemple de diatomées possédant des ornements (*Chaetoceros* sp.).
- p. 63 *Fig. 22* : Colonie de *Licmophora* sp. assemblées par des structures mucilagineuses.
- p. 64 *Fig. 23* : Représentation schématique des différentes formes de vie des diatomées en milieu dulçaquicole.
- p. 65 *Fig. 24* : Le cycle de vie des diatomées (*Stephanodiscus* sp., une diatomée centrique).
- p. 67 *Fig. 25* : Schéma hypothétique de l'origine des plastes des organismes photosynthétiques oxygéniques.
- p. 67 *Fig. 26* : Schéma hypothétique de l'évolution des plastes de diatomées.
- p. 69 *Fig. 27* : Coupe transversale d'une cellule de *Phaeodactylum tricornutum* (diatomée pennée).
- p. 70 *Fig. 28* : Affleurement d'une diatomite constituée essentiellement du genre dulçaquicole *Aulacoseira*.
- p. 75 *Fig. 29* : Spectre d'absorption de cellules de *Phaeodactylum tricornutum* à 77 °K montrant les bandes d'absorption des différents pigments.
- p. 77 *Fig. 30* : Modèle hypothétique de la voie de biosynthèse des xanthophylles chez les diatomées.
- p. 85 *Fig. 31* : Complexes macromoléculaires de complexes antennes à Chl *a*/Chl *c*/fucoxanthine de l'algue brune *Petalonia fasciata*.
- p. 88 *Fig. 32* : Exemple de succession écologique en milieu marin en fonction de la concentration en nutriments et de la turbulence des eaux.
- p. 92 *Fig. 33* : Activité de la DD dé-époxydase de *Phaeodactylum tricornutum* et de la VX dé-époxydase d'épinard en fonction du pH.
- p. 93 *Fig. 34* : Niveaux d'énergie des états excités S<sub>1</sub> et S<sub>2</sub> de la DD et de la DT par rapport à celui de la Chl *a* excitée (<sup>1</sup>Chl\*).
- p. 105 *Fig. 35* : Fixation du CO<sub>2</sub> via "la voie en C<sub>4</sub>".
- p. 115 *Fig. 36* : Morphologies des algues phytoplanctoniques utilisées dans ce travail.

- p. 119 *Fig. 37* : Représentation schématique du montage associant le fluorimètre-PAM et l'électrode à O<sub>2</sub> de Clark.
- p. 120 *Fig. 38* : Les différents niveaux de l'émission de fluorescence chlorophyllienne enregistrés au fluorimètre-PAM.
- p. 123 *Fig. 39* : Schéma comparatif des deux types d'électrodes à O<sub>2</sub> utilisées.
- p. 123 *Fig. 40* : Représentation schématique du cycle des états-S de l'"Oxygen Evolving Complex" (ou cycle de Kok).
- p. 124 *Fig. 41* : Exemple de signal dérivé de l'émission d'O<sub>2</sub> (séquence d'O<sub>2</sub>) obtenu à partir de cellules de *Phaeodactylum tricorutum* adaptées à l'obscurité.
- p. 127 *Fig. 42* : Procédure de purification et caractérisation des complexes antennes de *Phaeodactylum tricorutum*.
- p. 131 *Fig. 43* : Procédure utilisée pour caractériser les polypeptides des fractions complexes antennes de *Phaeodactylum tricorutum*.
- 
- p. 22 *Tableau 1* : Principaux pigments caractéristiques des plantes supérieures, des procaryotes photosynthétiques et des différentes classes d'algues.
- p. 25 *Tableau 2* : Description des cœurs des PS I et II chez les eucaryotes photosynthétiques et les cyanobactéries.
- p. 29 *Tableau 3* : Description des complexes antennes à Chl *a/b* des plantes supérieures.
- p. 97 *Tableau 4* : Synthèse des études sur la photoacclimatation des diatomées planctoniques par ordre chronologique.

\*\*\*\*\*

## ABREVIATIONS

Å	angstrom
ADP	adénosine diphosphate
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNr	acide désoxyribonucléique ribosomal
AP	antenne proximale
APS	persulfate d'ammonium
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
Asc	ascorbate
ATP	adénosine triphosphate
CAM	("Crassulacean Acid Metabolism") les Crassulacées ou plantes succulentes.
cDNA	ADN complémentaire
cm	centimètre
Chl	chlorophylle
Car	caroténoïdes
CL	lumière continue ("Continuous Light")
CO <sub>2</sub>	dioxyde de carbone
CR	centre réactionnel
Cyt	cytochrome
DCCD	N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide
DCMU	3-(3,4 Dichlorophényl) 1-1 dyméthylurée
DD	diadinoxanthine
DDM	n-dodécyl-β-D-maltoside
DO	densité optique
DT	diatoxanthine
e <sup>-</sup>	électron
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
ELIP	"Early Light Induced protein"
EST	"Expressed Sequence Tag"

EV	électron volt
F	fluorescence chlorophyllienne
Fd	ferrédoxine
Fig	figure
FNR	ferrédoxine NADP <sup>+</sup> réductase
F <sub>m</sub>	niveau maximal de la fluorescence chlorophyllienne
F <sub>o</sub>	niveau minimal de fluorescence chlorophyllienne
F <sub>v</sub>	fluorescence variable
DTT	dithiothréitol
h	heure
HL	lumière de forte intensité (“High Light”)
HLIP	“High Light Induced Protein”
HPLC	chromatographie liquide haute performance
hν	photons
H <sup>+</sup>	proton
IEF	focalisation isoélectrique
IL	lumière intermittente (“Intermittent Light”)
Kb	kilobase
kDa	kilodalton
LHC	complexe antenne pigments-protéines collecteur de lumière (“Light-Harvesting Complex”)
LHCF	LHC contenant de la fucoxanthine (pour l’ensemble des Hétérokontophytes)
LIL	“Light-harvesting Like proteins”
LL	lumière de faible intensité (“Low Light”)
m	mètre
min	minute
ML	lumière d’intensité moyenne (“Medium Light”)
mL	millilitre
mM	millimolaire
Mn	manganèse
ms	milliseconde
NADP	(ou NADPH, H <sup>+</sup> ) nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
nm	nanomètre
NPQ	(= q <sub>N</sub> ou SV <sub>m</sub> ) quenching non-photochimique du niveau F <sub>m</sub>

ns	nanoseconde
OEC	complexe d'émission de l'oxygène ou d'oxydation de l'eau
O <sub>2</sub>	oxygène
PAGE	gel de polyacrylamide pour électrophorèse
PAM	fluorimètre "Pulse Amplitude Modulated"
Pb	paire de bases
PBS	phycobilisome
PC	plastocyanine
PCC	collection Pasteur ("Pasteur Culture Collection")
Phe	phéophytine
PI	point isoélectrique
PQ	plastoquinone
PQH <sub>2</sub>	plastoquinone réduite
Psbs	(ou CP22), sous-unité des complexes antennes collecteurs de lumière de 22 kDa.
PS I et II	photosystèmes I et II
P680	Chl-centre du PS II
P700	Chl-centre du PS I
Q <sub>A</sub>	quinone du PS II acceptrice primaire d'électrons
Q <sub>B</sub>	quinone du PS II acceptrice secondaire d'électrons
qE	part du NPQ attribué au gradient de protons transthylakoïdal
qI	part du NPQ attribué à la photoinhibition
qP	quenching photochimique de la fluorescence chlorophyllienne
qT	part du NPQ attribué aux transition d'état
RE	réticulum endoplasmique
Rubisco	ribulose bis-phosphate carboxylase oxygénase
s	seconde
sp.	"species"
SDS	sodium dodécyl sulfate
SV <sub>m</sub>	(= NPQ) quenching Stern-Volmer du niveau F <sub>m</sub>
SV <sub>o</sub>	quenching Stern-Volmer du niveau F <sub>o</sub>
S <sub>0</sub> à S <sub>3</sub>	états d'oxydation du complexe d'émission d'oxygène
TCA	acide trichloracétique
TEMED	N, N, N', N'-tetraméthyle-éthylènediamine
Tris	tris (hydroxyméthyl)-aminométhane

UV	radiations ultra-violettes
v/v	volume à volume
VDE	violaxanthine dé-époxydase
VE	violaxanthine époxydase
VX	violaxanthine
Y <sub>D</sub>	tyrosine D du centre réactionnel PS II
Y <sub>SS</sub>	émission d'O <sub>2</sub> moyenne par flash (“Steady-State”)
Y <sub>Z</sub>	tyrosine Z du centre réactionnel PS II donneur d'électrons secondaire
ZX	zéaxanthine
°K	degré Kelvin
°C	degré Celsius
ΔpH	gradient de protons transthylakoïdal
μE	micro Einstein
μg	microgramme
μM	micromolaire
μL	microlitre
μs	microseconde
<sup>1</sup> Chl*	état singulet excité de la Chl
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> *	état singulet excité de l'O <sub>2</sub>
<sup>3</sup> Chl*	état triplet excité de la Chl
3D	trois dimensions

\*\*\*\*\*

# **CHAPITRE I**

## **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION GENERALE

La lumière solaire est à la base des grands cycles de la matière organique. Elle est la source primordiale pour le maintien de la vie sur Terre car elle est le “carburant” d’un des mécanismes biologiques les plus essentiels : la photosynthèse. Les principes généraux de la photosynthèse sont très conservés et consistent chez les plantes, “algues”<sup>1</sup> et procaryotes photosynthétiques à utiliser la lumière solaire comme source d’énergie pour la biosynthèse de molécules utilisées dans les processus vitaux et pour la reproduction de ces organismes. L’absorption de l’énergie lumineuse et sa conversion en énergie chimique s’effectuent au sein de complexes pigments-protéines : les antennes collectrices pigmentées et les centres réactionnels qui sont les véritables “usines” créatrices d’énergie vitale.

Alors que les centres réactionnels ont été très conservés au cours de l’évolution, il n’en est pas de même des antennes collectrices de lumière. Malgré une origine phylogénétique commune, celles-ci présentent des différences majeures au niveau de leur composition, en particulier pigmentaire, et au niveau de leur organisation entre les différents phyla. Ceci est particulièrement remarquable chez les algues alors que les plantes supérieures présentent un schéma d’antenne collectrice relativement stable. En effet, dans les écosystèmes aquatiques, la pression de sélection a favorisé l’émergence de nombreuses lignées d’organismes photosynthétiques procaryotes et eucaryotes capables d’utiliser les radiations de cet environnement lumineux très particulier. Dans le milieu aquatique, marin ou dulçaquicole, les caractéristiques de l’énergie lumineuse incidente sont modifiées par les propriétés optiques de l’eau. Celle-ci agit comme un filtre qui va, dès les premiers mètres de profondeur, atténuer la quantité de lumière disponible. En parallèle, l’eau va également modifier la qualité spectrale de la lumière sous l’effet de la diffusion et de l’absorption par les molécules d’eau et de matières organiques en suspension. Ainsi, les radiations rouges et ultra-violettes sont très rapidement absorbées, et au fur et à mesure que l’on pénètre dans la colonne d’eau, les radiations disponibles pour la photosynthèse tendent vers le bleu et/ou le vert en fonction de la turbidité des eaux.

---

<sup>1</sup> Le terme algues est mis entre guillemets car il n’a aucune signification phylogénétique et systématique. Dans la suite du texte, les guillemets disparaissent pour plus de simplicité.



Ces particularités de l'environnement aquatique soulèvent une question essentielle : comment les organismes photosynthétiques aquatiques se sont-ils adaptés à ces variations à la fois en intensité, et en qualité spectrale ? Cette question est particulièrement cruciale pour les algues unicellulaires microscopiques constituant le phytoplancton qui sont le plus souvent dépourvues de moyens de locomotion et qui subissent donc les mouvements de l'eau, et avec eux les changements d'environnement lumineux. Ces algues doivent donc s'acclimater constamment à des variations d'intensité et de qualité spectrale qui s'étalent sur des échelles de temps variant de plusieurs ordres de grandeur. En l'absence de lumière, la photosynthèse n'a pas lieu, seule la respiration est possible et les réserves cellulaires s'épuisent sans renouvellement suffisant. A l'inverse, l'excès de lumière est néfaste aux organismes photosynthétiques et peut entraîner leur mort. Entre ces deux extrêmes, toutes les variations temporelles de l'environnement lumineux peuvent être rencontrées et sont fonction des facteurs environnementaux.

Les organismes phytoplanctoniques ont su développer des mécanismes de régulation afin de répondre aux changements de lumière et maintenir une utilisation de l'énergie lumineuse efficace. Il existe ainsi des stratégies d'adaptation à court et à long terme pour répondre à des variations rapides ou prolongées. La place prépondérante qu'occupe le phytoplancton dans la production primaire mondiale montre l'efficacité de ces stratégies. Parmi ces algues phytoplanctoniques, un groupe d'organismes est particulièrement important car responsable de près de la moitié de la production primaire océanique : ce sont les diatomées. Les diatomées, et plus précisément les diatomées planctoniques, ont en plus la particularité de dominer les autres groupes du phytoplancton dans les eaux turbulentes, c'est-à-dire les écosystèmes où les fluctuations lumineuses (durée d'exposition, quantité et qualité de la lumière) sont les plus importantes. Ces organismes doivent donc posséder des capacités adaptatives "exacerbées" en termes d'amplitude et en vitesse et des stratégies qui leurs sont propres. Les diatomées planctoniques constituent donc un modèle de choix pour étudier ces questions qui, et ce malgré l'importance écologique de ce groupe, ont été peu développées jusqu'à présent.

C'est le but du travail présenté dans ce manuscrit : explorer les stratégies d'adaptation des diatomées phytoplanctoniques aux changements d'intensité lumineuse sur plusieurs échelles de temps. Les expérimentations menées en laboratoire visent à recréer de manière schématique et extrême les variations de lumière que ces organismes peuvent rencontrer dans leur milieu naturel. L'originalité de ce travail se situe à plusieurs niveaux. Le premier consiste

à comparer les stratégies des diatomées à celle d'autres organismes photosynthétiques pour répondre à la question suivante : certes l'étude des capacités adaptatives des diatomées se suffit à elle-même, mais en quoi les particularités de l'appareil photosynthétique des diatomées peuvent-elles apporter des informations supplémentaires sur les capacités d'adaptation à la lumière des organismes photosynthétiques en général ? Ce travail s'intéresse particulièrement aux mécanismes photoprotecteurs les plus connus (le cycle des xanthophylles et le quenching non-photochimique de la fluorescence chlorophyllienne) mais aussi à d'autres moins connus qui suscitent de plus en plus d'intérêt (chlororespiration et transport cyclique des électrons au sein du photosystème II). Ces processus ont été peu étudiés chez les diatomées mais il existe par contre de nombreux groupes travaillant sur le sujet chez les plantes supérieures. L'un des aspects importants de ce travail a donc été de ne pas se cantonner à la sphère "Océanologie" mais d'élargir le champ de nos recherches, ceci afin de susciter l'intérêt pour le "modèle diatomées", en apportant des réponses et des démonstrations expérimentales claires au débat passionné ayant lieu à l'heure actuelle sur ce sujet chez les plantes supérieures. Une autre originalité concerne les échelles de temps étudiées. La photoacclimatation des diatomées a été, et continue d'être largement étudiée, mais là encore ce travail contribue au sujet en s'axant sur les processus à court terme dans le cadre de l'acclimatation à des variations lumineuses prolongées. Enfin, les complémentarités des méthodologies utilisées (biophysiques et biochimiques), des différentes échelles de temps étudiées et des approches globales considérées (physiologiques par expérimentations *in vivo* - l'organisme dans son ensemble-, les considérations écologiques -l'organisme dans son environnement- restant une préoccupation permanente) ont permis d'acquérir une vision intégrée dans la compréhension des stratégies adaptatives développées par les diatomées planctoniques.

La présentation de ce travail débute par une introduction séparée en deux parties distinctes. La première partie est une description de la photosynthèse oxygénique (son origine et son fonctionnement), de la structure de l'appareil photosynthétique (les complexes pigments-protéines qui le composent) et son adaptation aux variations de la lumière à court et long terme. L'accent sera particulièrement mis sur les différents mécanismes intervenant dans la photoprotection et sur l'utilisation de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne dans l'étude de l'activité photosynthétique. La plupart des informations concerneront essentiellement les plantes et microalgues vertes chez qui ces différents aspects sont les mieux connus. Ces généralités sur la photosynthèse et les particularités de ce processus dans le

milieu aquatique se réfèrent aux trois récents et excellents ouvrages que sont “La Photosynthèse” d’ H. Jupin et A. Lamant (1997, Ed. Masson), “Aquatic Photosynthesis” de P. Falkowski et J. Raven (1997, Ed. Blackwell Science) et “Oxygenic Photosynthesis : The Light Reactions” édité par D. T. Ort et C. F. Yocum (1996, Kluwer Academic Publishers). Le groupe d’organismes sur lequel est basé ce travail, les diatomées planctoniques, est présenté dans une deuxième partie introductive : d’abord quelques généralités sur la biologie, l’écologie, la diversité, etc... puis l’état des connaissances sur l’appareil photosynthétique des diatomées et son adaptation aux lumières fluctuantes. L’accent sera également mis sur les mécanismes intervenants dans l’adaptation des diatomées aux lumières fluctuantes sur le court et le long terme. Ce chapitre introductif se clôt sur une synthèse de la démarche adoptée au cours de ce travail et sur une liste des publications auxquelles il a donné lieu.

Les résultats et leur discussion sont présentés sous forme d’un chapitre constitué de trois parties :

1) quatre sous-chapitres portant sur la photoprotection des diatomées planctoniques à court terme engendrée par la dissipation de l’énergie lumineuse en excès.

2) un sous-chapitre sur les processus photoprotecteurs alternatifs.

3) un sous-chapitre reprenant les recherches en cours sur les mécanismes mis en place à long terme (photoacclimatation) et sur la caractérisation biochimique des antennes collectrices de lumière des diatomées.

Enfin, le tout est synthétisé et élargi dans le dernier chapitre “Conclusions et Perspectives”.

La seconde partie de ce travail de thèse est présentée en Annexe. Elle concerne la conception d’un fluorimètre pour le suivi de la dynamique des populations phytoplanctoniques d’eau douce en vue de la détection précoce des proliférations algales qui dégradent la qualité des eaux de boisson avec une attention toute particulière pour les cyanobactéries. Ce travail a été réalisé en collaboration avec la société Suez-Ondeo Services. Il est totalement indépendant de l’étude des stratégies d’adaptation des diatomées aux variations de la lumière même s’il fait référence à des connaissances techniques et fondamentales déjà largement évoquées dans cette étude.

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE I

## *I- L'appareil photosynthétique*

---

## **I- L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE ET SON ADAPTATION A LA LUMIERE.**

### **I- 1. L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE.**

#### **I- 1. 1. La photosynthèse oxygénique.**

##### **I- 1. 1. 1. Origine.**

Les organismes phototrophiques sont répartis dans les deux grands phyla des domaines eucaryote et eubactérien constituant ainsi un grand groupe polyphylétique. Parmi ces organismes, seules les plantes supérieures, les algues et les cyanobactéries (cyanobactéries “classiques” et oxyphotobactéries du type *Prochlorococcus*) sont capables de photosynthèse oxygénique qui nécessite la coopération de deux photosystèmes (PS). Les bactéries photosynthétiques autres que les cyanobactéries (les bactéries vertes sulfureuses, les bactéries filamenteuses, les bactéries pourpres et les héliobactéries) sont anoxygéniques et ne fonctionnent qu'avec l'un ou l'autre des deux photosystèmes (Schubert *et al.*, 1998). Selon la théorie de l'endosymbiose, une cellule de type cyanobactérien aurait été phagocytée par un organisme unicellulaire eucaryote hétérotrophe, ce qui aurait conduit à l'apparition de la lignée des organismes photosynthétiques eucaryotes à plastes. Plusieurs types d'endosymbioses auraient ensuite suivi aboutissant à l'explosion des lignées photosynthétiques eucaryotes des algues et des plantes supérieures (voir § II- 1. 4. pour une explication détaillée sur l'origine des plastes).

Le processus de photosynthèse oxygénique (exposé dans le § suivant) est apparu il y a environ 3 500 millions d'années. Il est remarquable de constater que les comparaisons de séquences, aussi bien pour les organismes eucaryotes que procaryotes, révèlent un très fort degré de conservation pour de nombreuses protéines photosynthétiques clés. Les processus fondamentaux qui guident le transfert des électrons d'un composant à l'autre sont probablement les mêmes dans chacun des deux types de centres réactionnels. Les principales différences entre les organismes photosynthétiques actuels résident plutôt dans la composition protéique et pigmentaire des complexes collecteurs de lumière (“Light-Harvesting Complex”, LHC).

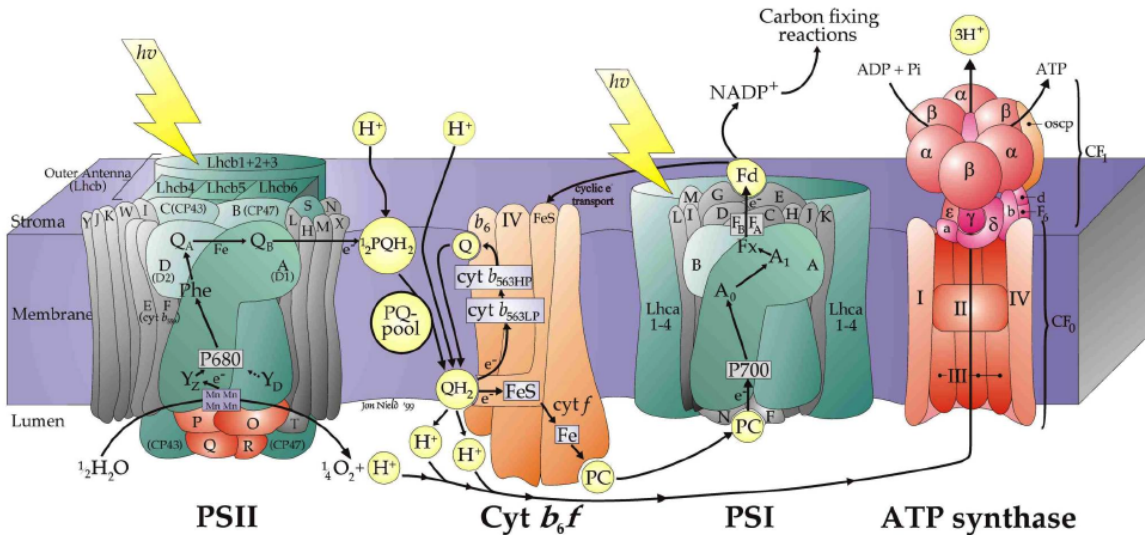


Fig. 1 : Schéma de la chaîne de transport d'électrons dans les membranes thylakoïdales eucaryotiques (Nield J., 1999, [www.bio.ic.ac.uk/research/nield/expertise/psII-images.htm](http://www.bio.ic.ac.uk/research/nield/expertise/psII-images.htm)). PS I et PS II, photosystèmes I et II; Cyt, cytochrome; PQ, plastoquinone; PC, plastocyanine; Fd, ferredoxine.

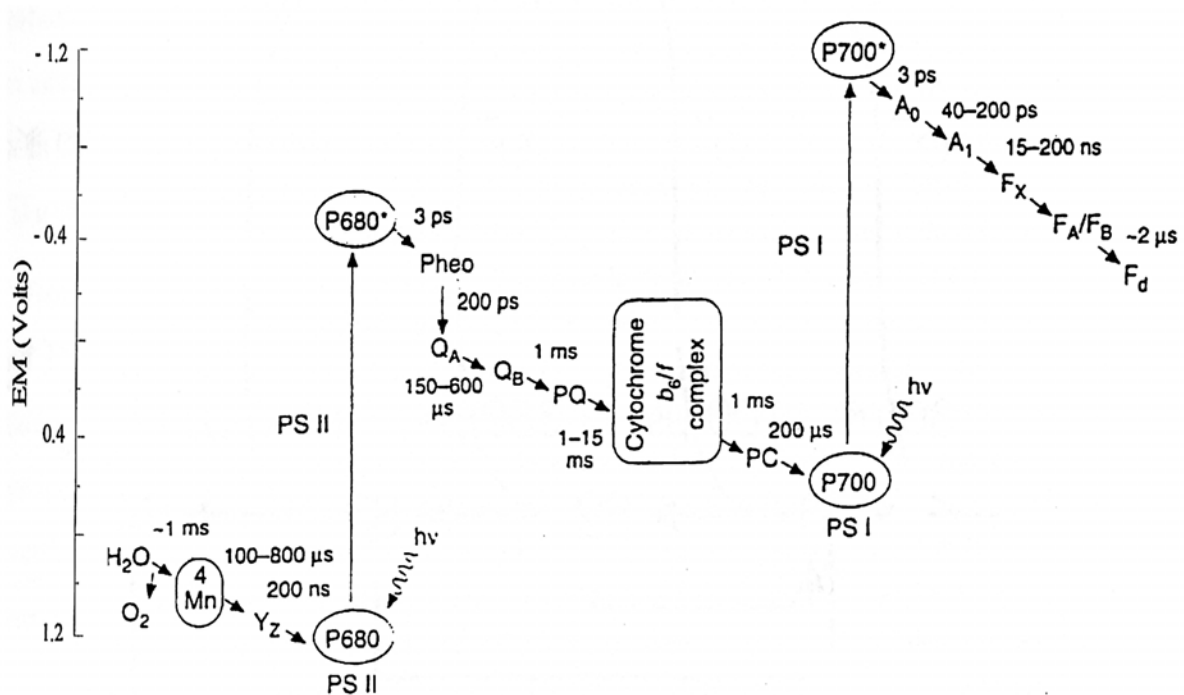


Fig. 2 : Schéma en "Z" représentant la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons depuis l'eau jusqu'à la ferredoxine (Fd) qui réduit le  $\text{NADP}^+$  en  $\text{NADPH}$ . Les durées des réactions d'oxidoréduction entre les différents cofacteurs participant au transfert sont indiquées. L'échelle des ordonnées permet de situer la valeur moyenne du potentiel redox des cofacteurs.  $\text{A}_0$ , Chl intermédiaire;  $\text{A}_1$ , phylloquinone; Mn, complexe manganèse; PS II, photosystème II; P680, Chl-centre du PS II;  $\text{Q}_\text{A}$  et  $\text{Q}_\text{B}$ , quinones; PQ, plastoquinone; PC, plastocyanine; P700, Chl-centre du PS I;  $\text{F}_\text{X}$ - $\text{F}_\text{A}$ - $\text{F}_\text{B}$ , centre Fer-Soufre; hv, photons.

### I- 1. 1. 2. Fonctionnement.

La photosynthèse se déroule en deux étapes. La première a lieu au niveau des thylakoïdes des plastes où se font les réactions photochimiques et le transfert d'électrons. Chez les plantes supérieures, ces thylakoïdes sont accolés et organisés en régions granaires (accolement de plusieurs thylakoïdes) et agraires. La répartition des composants de l'appareil photosynthétique, et en particulier des photosystèmes, est hétérogène au sein de ces régions (on verra dans la deuxième partie introductive qu'il n'en est pas de même pour les diatomées). La première étape est la conversion de l'énergie lumineuse en énergie chimique (transformation de l'énergie électromagnétique de la lumière en molécules de NADPH à fort pouvoir réducteur et en molécules énergétiques d'ATP), nécessitant l'oxydation de l'eau ce qui conduit à l'émission d'oxygène ( $O_2$ ). Lors de cette étape, un transfert de protons est couplé au transport des électrons. La deuxième étape a lieu dans le stroma des chloroplastes et permet l'assimilation (la réduction) du  $CO_2$  sous forme de glucides (substances hydrocarbonées nécessaires à la constitution de la matière organique de la cellule), en particulier grâce aux enzymes du cycle de Calvin, dont la Rubisco (métabolisme du carbone en  $C_3$ ). Lors de ces réactions une partie des molécules d'ATP et de NADPH produites précédemment sont utilisées, ainsi que lors d'autres biosynthèses et réactions consommatrices d'énergie. Quatre complexes sont impliqués dans la séparation primaire de charges et le transfert d'électrons, la production de NADPH et d'ATP. La Figure 1 présente ces quatre complexes intrinsèques, présents dans les membranes thylakoïdales de tout organisme réalisant la photosynthèse oxygénique : le PS II, le complexe plastoquinone-plastocyanine oxydoréductase ou cytochrome *b<sub>6</sub>/f*, le PS I et l'ATP synthase. La Figure 2 présente les différents cofacteurs participant à la chaîne de transfert d'électrons. La chaîne de transfert d'électrons est une suite de réactions d'oxydoréductions qui s'effectuent de proche en proche de l'eau au  $NADP^+$ , les deux photosystèmes fonctionnant en série et fournissant l'énergie nécessaire pour pomper des protons contre un potentiel de 1,2 eV (différence de potentiel d'oxydoréduction entre l'eau et le  $NADP^+$ ). En parallèle, l'ATP synthase utilise le gradient de protons transthylakoïdal pour produire de l'ATP à partir d'ADP.

Chaque photosystème est constitué de deux parties : le cœur des photosystèmes est constitué d'une **antenne proximale** (ou antenne "propre") et d'un **centre réactionnel**. Il est associé à une autre antenne, l'**antenne distale ou périphérique**. Son rôle est d'élargir l'absorption de la lumière quantitativement et qualitativement. Les deux types d'antennes transmettent l'énergie d'excitation au centre réactionnel. L'antenne proximale du PS II est

composée des protéines CP47 et CP43, liées à de la Chl *a* et à des caroténoïdes. Le centre réactionnel du PS II est composé des protéines D1 et D2 portant tous les cofacteurs nécessaires à la séparation initiale de charge, et du cytochrome b-559 ainsi que plusieurs autres petits polypeptides. Les pigments accessoires et la Chl *a* capturent l'énergie lumineuse correspondant à la longueur d'onde d'absorption spécifique à chaque type de pigment : l'énergie d'un photon est convertie en exciton (déplacement d'un électron du niveau singulet fondamental au premier niveau singulet excité); la molécule de pigment est dite à l'état "excité". L'exciton est transféré de pigment en pigment au sein des antennes jusqu'au centre réactionnel. Lorsqu'il est piégé par la chlorophylle-centre du PS II, P680, la séparation de charge a lieu (première étape photochimique): la chlorophylle-centre excitée P680\* (réducteur) cède un électron à une molécule accepteur, la phéophytine (oxydant) par une réaction d'oxydoréduction et devient P680<sup>+</sup>. Les cofacteurs associés aux protéines D1 et D2 participent au transfert d'électrons de la façon suivante: une phéophytine (chlorophylle sans magnésium) est l'accepteur initial transitoire des électrons cédés par P680\* ; les premier et second accepteurs sont des molécules de plastoquinones, dont l'une, Q<sub>A</sub>, est liée au centre et l'autre Q<sub>B</sub>, est mobile. Les électrons portés par Q<sub>B</sub> sont alors pris en charge par la chaîne de transporteurs membranaires alors que P680<sup>+</sup> revient à son état stable par réduction. C'est grâce aux électrons fournis par l'oxydation de l'eau ( $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ), productrice d'O<sub>2</sub>, que la chlorophylle P680<sup>+</sup> revient très rapidement à son état stable P680. Cette oxydation de l'eau a lieu au niveau du complexe de manganèse OEC ("Oxygen Evolving Complex") qui est associé au cœur du PS II.

Q<sub>B</sub> est l'une des molécules du pool de plastoquinones (PQ) membranaires, transitoirement fixée sur D1 et donc mobile. Q<sub>B</sub> est en fait réduite deux fois (après deux séparations de charges) et est protonée par deux H<sup>+</sup> provenant du stroma. C'est cette forme Q<sub>B</sub>H<sub>2</sub> (plastoquinol) qui est mobile. Elle est intégrée au pool de PQ membranaire sous forme PQH<sub>2</sub> alors qu'une molécule de PQ oxydée la remplace sur le site de fixation de la protéine D1. Les électrons sont ensuite transférés des plastoquinones réduites (PQH<sub>2</sub>) au cytochrome *b<sub>6</sub>/f*, puis à la plastocyanine, une protéine hydrophyle soluble, mobile dans le lumen. C'est la plastocyanine qui est le donneur d'électron de la Chl-centre du PS I, le P700. Chez la plupart des organismes photosynthétiques eucaryotes, le PS I possède aussi sa propre antenne proximale. Le cœur du PS I est composé des protéines codées par les gènes *psaA* et *psaB* et de plusieurs autres petits polypeptides auxquels sont associés quatre cofacteurs : P700, une Chl (A<sub>0</sub>), une phylloquinone (A<sub>1</sub>) et trois complexes Fer-Soufre {4Fe-4S} (F<sub>A</sub>, F<sub>B</sub> et F<sub>X</sub>). Après



séparation de charges, P700 cède ses électrons à l'accepteur primaire  $A_0$  qui les transmet aux centres Fer-Soufre et enfin à une ferrédoxine soluble du côté stromatique de la membrane thylakoïdale. L'accepteur terminal d'électrons est le  $NADP^+$  qui est réduit par la ferrédoxine via l'activité d'une flavoprotéine, la ferrédoxine- $NADP^+$  oxydoréductase (FNR). Le NADPH, pouvoir réducteur, est ensuite utilisé, entre autres, par les enzymes du stroma participant à la réduction du  $CO_2$ .

L'énergie fournie par les photons n'est pas seulement stockée dans les molécules de NADPH, mais aussi dans les molécules énergétiques d'ATP. Le transfert d'électrons est couplé à une translocation de protons. Au niveau du PS II, l'oxydation de l'eau produit, pour chaque molécule d' $O_2$  libérée, quatre protons au sein du lumen. De plus, la double réduction de  $Q_B$  en  $PQH_2$  s'accompagne de sa protonation par deux protons du stroma, et sa réoxydation libère deux protons dans le lumen lors d'un cycle à plusieurs étapes au sein du cytochrome *b<sub>6</sub>/f* (voir Jupin et Lamant, 1997 pour une description détaillée). La membrane thylakoïdale étant faiblement perméable aux protons, il se crée un gradient de protons transthylakoïdal, c'est-à-dire une différence de pH ( $\Delta pH$ ) de part et d'autre de la membrane. La force protonotrice générée par le  $\Delta pH$  est utilisée par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP, côté stroma, et produire ainsi l'ATP. Il y a donc couplage entre le transfert d'électrons (source du  $\Delta pH$ ) et la synthèse d'ATP, on parle de phosphorylation couplée.

### **I- 1. 2. Les complexes pigments-protéines.**

La photosynthèse oxygénique est réalisée grâce à des structures très conservées chez les végétaux supérieurs et les algues, à l'exception des antennes collectrices d'énergie liées au PS II et des pigments accessoires qui leurs sont associés (Grossman *et al.*, 1995). En effet, la différence entre les organismes photosynthétiques réside principalement dans la composition et la localisation des pigments accessoires liés à l'antenne périphérique du PS II. La lumière étant souvent un facteur limitant de la photosynthèse (Glazer, 1989), ces antennes photocollectrices abondantes, et efficaces dans le transfert de l'énergie lumineuse sont indispensables à l'utilisation de l'énergie solaire par les organismes photosynthétiques.

Il existe deux types d'antennes périphériques qui diffèrent par leur localisation et leur composition pigmentaire. Chez les plantes supérieures, et la plupart des algues, il s'agit d'un complexe protéines-pigments intramembranaire (LHC), composé de caroténoïdes et de Chl associées à différents polypeptides.

**Tableau 1 : Principaux pigments caractéristiques des plantes supérieures, des procaryotes photosynthétiques et des différentes classes d'algues. DD, diadinoxanthine; DT, diatoxanthine; F, fucoxanthine; H, Hétérokontophytes; PBS, phycobilisomes; \* pour les Oxychlorobactéries, seul le genre *Prochlorococcus* est considéré.**

Code : ++ = pigment majeur (>10%), + = pigment mineur (1-10% de la Chl ou des caroténoïdes totaux), - = pigment absent ou non détecté (d'après van den Hoek, 1995).

Pigments	Divisions ou classe													
	Chlorophytes (Plantes et algues vertes)	Cyanobactéries à PBS	Cyanobactéries à Chl <i>b</i> (Oxychlorobactéries)*	Rhodophytes (Algues rouges)	Cryptophytes	H / Chrysoptérycées	H / Xanthophycées	H / Eustigmatophycées	H / Bacillariophycées (Diatomées)	H / Raphidophycées	H / Phaeophycées (Algues brunes)	Haptophytes (Prymnesiophytes)	Dinophytes (Dinoflagellés)	Euglenophytes
<b>Chlorophylles (Chl)</b>														
Chl <i>a</i>	++	++	.	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Chl <i>b</i>	++	.	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	++
Chl <i>c</i> (et dérivés)	.	.	++	.	++	++	+	.	++	++	++	++	++	.
Divinyl Chl <i>a</i>	.	.	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Divinyl Chl <i>b</i>	.	.	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
<b>Carotènes (<math>\alpha</math> ou <math>\beta</math>)</b>	+	++	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Xanthophylles</b>														
Alloxanthine	+	.	.	.	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Anthéroxanthine	+	.	.	.	.	+	.	+	+/-	.	+	.	.	.
Lutéine	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Néoxanthine	++	.	.	.	.	.	+	+	.	+	+	.	.	++
Vaucheriaxanthine	.	.	.	.	.	.	++	++	.	+	.	.	.	.
Violaxanthine	++	.	.	.	.	+	.	++	+/-	+	++	.	.	.
Zéaxanthine	+	++	++	++	+	+	.	+/-	+/-	+	+	.	.	+
Fucoxanthine	.	.	.	.	.	++	.	.	++	++	++	++	++	.
DD et DT	.	.	.	.	.	.	++	.	++	++	.	++	++	++
Péridinine (si F -)	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	++	.
<b>Phycobilines</b>														
Allophycocyanine	.	++	.	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Phycocyanine	.	++	.	++	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.
Phycoérythrine	.	++	+/-	++	++	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Chez les Rhodophytes (ou algues rouges) et les cyanobactéries, il s'agit d'un complexe protéines-pigments extramembranaire appelé phycobilisome, composé de protéines-pigments de type phycobiliprotéines et de polypeptides de liaison. Dans les chapitres qui suivent l'accent sera mis sur le complexe antenne des plantes et algues vertes qui est le mieux caractérisé et dans une deuxième partie introductive, un parallèle sera fait avec les connaissances actuelles chez les algues Hétérokontophytes et particulièrement les diatomées. Des informations concernant les complexes antennes des cyanobactéries sont données dans l'autre partie de ce travail présentée en Annexe.

#### I- 1. 2. 1. La pigmentation.

La composition pigmentaire des complexes antennes et particulièrement de l'antenne périphérique du PS II est extrêmement diversifiée entre les plantes supérieures, les différentes classes d'algues et les cyanobactéries (Tableau 1). Tous les pigments photosynthétiques sont capables d'une absorption directe de la lumière solaire. Des exemples de structures moléculaires des principaux pigments (Chl et caroténoïdes) retrouvés chez les plantes et algues vertes et les diatomées sont présentés Figure 3.

Toutes les protéines pigmentaires lient à la fois des Chl et des caroténoïdes (Green et Durnford, 1996). Les Chl assurent seulement la capture de l'énergie lumineuse tandis que les caroténoïdes ont un double rôle, à la fois de capture de l'énergie (Frank et Cogdell, 1996) et de photoprotection de l'appareil photosynthétique contre un excès d'énergie lumineuse (voir § I- 3. 1. ). Les caroténoïdes contribuent également de façon significative à la stabilisation de la structure des protéines antennaires (voir Havaux, 1998, pour une revue récente).

Tous les eucaryotes photosynthétiques ainsi que les cyanobactéries possèdent de la Chl *a* (ou un dérivé) qui se caractérise par un pic d'absorption à environ 440 nm dans la région bleue du spectre de la lumière visible et à environ 675 nm dans le rouge (Fig. 3). L'ajout de pigments supplémentaires, dits "accessoires", tels que la Chl *b*, la Chl *c*, les caroténoïdes ou les phycobiliprotéines permet d'élargir la gamme spectrale dans laquelle l'absorption de la lumière est possible soit parce que les pics d'absorption sont légèrement différents de ceux de la Chl *a* (cas des autres Chl, Fig. 3), soit parce qu'ils peuvent se situer dans des régions du spectre où l'absorption de la Chl *a* est très faible (cas des caroténoïdes et des phycobiliprotéines).

Ces pigments sont essentiels en milieu marin où l'eau agit comme un filtre bleu-vert à partir d'une certaine profondeur. Ainsi, certaines xanthophylles (une classe de caroténoïdes) comme la fucoxanthine ou la péridinine (Fig. 3) sont très abondantes chez les algues Hétérokontophytes et Dinophytes. Elles permettent une absorption importante de la lumière dans la région bleue-verte du spectre où la Chl *a* absorbe très peu (voir également la partie Annexe de ce manuscrit pour une comparaison des propriétés d'absorption des algues et des cyanobactéries).

### I- 1. 2. 2. Le cœur des photosystèmes.

Les cœurs des PS I et PS II sont formés d'une part par le centre réactionnel (lieu de la séparation photochimique primaire de charges) et d'autre part par une antenne proximale permet le transfert de l'énergie d'excitation de l'antenne périphérique vers le centre réactionnel. Ils sont très conservés d'un point de vue structural et fonctionnel chez tous les organismes photosynthétiques oxygéniques. Chez les eucaryotes et la plupart des cyanobactéries, les protéines pigmentaires constituant ces complexes lient presque exclusivement de la Chl *a* et du  $\beta$ -carotène (Tableau 2). Ces protéines sont toutes codées par le génome plastidial chez les eucaryotes (Green et Durnford, 1996).

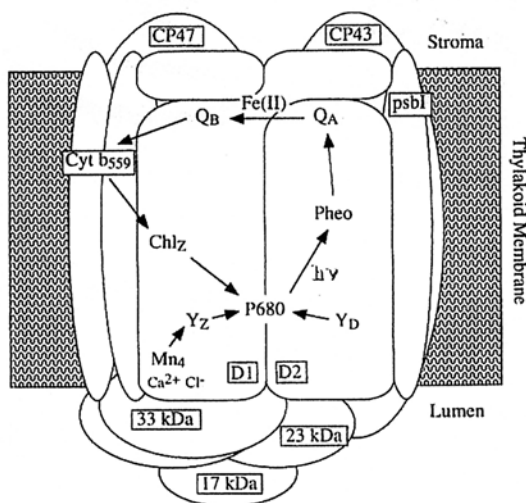
**Tableau 2 : Description des cœurs des photosystèmes I et II chez les eucaryotes photosynthétiques et les cyanobactéries (d'après Green et Durnford, 1996). CR, centre réactionnel; AP, antenne proximale.**

Cœur des PS	Pigment/cofacteurs	Gène	Polypeptide	Masse apparente (kDa)
<b>PS I</b>	75-100 Chl <i>a</i>	<i>psaA</i>	PsaA / PSI-A	58 à 70 kDa
CR+AP	12-15 $\beta$ -carotène Phylloquinone Cluster 4Fe-4S	<i>psaB</i>	PsaB / PSI-B	58 à 70 kDa
Autres CP43'	/	<i>isiA</i>	CP43' / IsiA	34 kDa
<b>PS II</b>	4-6 Chl <i>a</i>	<i>psbA</i>	D1 / PsbA	dimère d'environ
CR	2 Phéophytine 2 PQ 1 Fe sans hème 1-2 $\beta$ -carotène	<i>psbD</i>	D2 / PsbD	60 kDa
CP47 (AP)	20-22 Chl <i>a</i>	<i>psbB</i>	CP47 / PsbB	47 kDa
CP43 (AP)	2-4 $\beta$ -carotène 20 Chl <i>a</i> 5 $\beta$ -carotène	<i>psbC</i>	CP43 / PsbC	43 kDa

***Fig. 3 : Structures moléculaires des chlorophylles (ainsi que leur spectres d'absorption), et des caroténoïdes : carotènes et xanthophylles.***

## I- 1. 2. 2. a. Le cœur du PS II.

Le complexe du cœur du PS II comprend toutes les protéines, les pigments et les cofacteurs nécessaires pour transférer les électrons de l'eau à la PQ. Ce complexe est composé de dix sous-unités protéiques dont la disposition montrée sur la Figure 4 est déduite de la structure 3D du cœur du PS II à une résolution de 8 Å (Rhee *et al.*, 1998) : les polypeptides D1 et D2, les sous-unités  $\alpha$  (*psbE*) et  $\beta$  (*psbF*) du cytochrome  $b_{559}$ , deux protéines transmembranaires CP43 et CP47, le produit du gène *psbI* (environ 4 kDa) et trois polypeptides extrinsèques de 17, 23 et 33 kDa associés côté lumen de la membrane et assurant la stabilité de l'OEC. Chez les diatomées, les polypeptides de 17 et 23 kDa seraient absents et remplacés en partie par le cytochrome  $c_{550}$  comme chez les cyanobactéries (Martinson *et al.*, 1998). Parmi ces polypeptides, seuls quatre d'entre eux fixent des pigments : D1 et D2 qui forment le centre réactionnel et CP43, CP47 qui forment l'antenne proximale (Barber et Kühlbrandt, 1999, pour une revue récente). Les autres protéines sont cependant indispensables pour l'assemblage et la stabilité du centre réactionnel du PS II.



**Fig. 4 :** Modèle d'organisation structurale du complexe protéique du PS II avec le centre réactionnel incluant les cofacteurs du transport d'électrons et l'antenne proximale (Stewart et Brudvig, 1998).

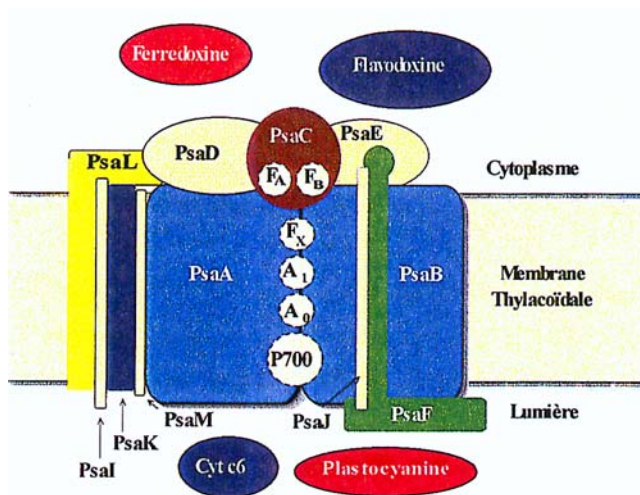
Le centre réactionnel proprement dit est constitué des polypeptides D1 (codé par *psbA*) et D2 (codé par *psbD*) qui possèdent une masse moléculaire d'environ 30 kDa. Un grand nombre de gènes codant pour D1 et D2 ont été séquencés chez plusieurs types d'organismes. *psbA* est présent en un nombre de copies variables. Malgré ce nombre de copies important, les variations des séquences au niveau protéique sont très faibles puisque plus de 60 à 70 % des acides aminés de D1 et D2 sont conservés entre les cyanobactéries et les plantes supérieures. Le plus fort degré de conservation est trouvé au niveau des cinq hélices transmembranaires.

Dans ces régions, les acides aminés susceptibles d'intervenir dans la fixation des pigments et des cofacteurs sont presque tous conservés, de même que pour les résidus intervenant dans la liaison du cluster de manganèse OEC (Debus, 1992).

CP47 et CP43 sont des polypeptides présentant six hélices transmembranaires et constituant l'antenne proximale du PS II. Ils lient un grand nombre de molécules de Chl *a* (12 à 25) et du  $\beta$ -carotène (Rhee *et al.*, 1998). Ils transfèrent l'énergie d'excitation provenant des antennes périphériques vers la Chl-centre P680. Les gènes *psbB* (codant pour CP47) et *psbC* (codant pour CP43) sont très conservés entre les différents organismes examinés (80 à 85 % d'homologie). Les résidus impliqués dans la liaison des Chl au sein des hélices sont très conservés. Chez les cyanobactéries (Bibby *et al.*, 2001a; Boekema *et al.*, 2001) et les oxyphotobactéries (Bibby *et al.*, 2001b), une protéine ayant une forte homologie avec le CP43 (CP43') est également synthétisée autour du PS I lors d'une carence en Fer (Tableau 2).

#### I- 1. 2. 2. b. Le cœur du PS I.

Dans le PS I, le centre réactionnel et l'antenne proximale sont associés en un "super-complexe" pigment-protéine dont le rôle est d'accepter les électrons provenant de la plastocyanine pour les transférer à une molécule de type ferrédoxine. Les cofacteurs du PS I qui participent à la chaîne de transfert d'électrons sont portés par les protéines PsaA, PsaB et PsaC. Le complexe contient huit autres polypeptides qui ne semblent pas fixer de Chl (Fig. 5) (Green et Durnford, 1996). PsaA et PsaB constituent les deux sous-unités majeures du PS I. Il s'agit de deux polypeptides possédant chacun treize hélices, dont onze transmembranaires, dont la masse moléculaire varie de 58 à 70 kDa selon les organismes. Elles lient 75 à 100 Chl *a* et 12 à 15  $\beta$ -carotène (Tableau 2).



**Fig. 5 :** Modèle d'organisation structural du complexe PS I incluant les cofacteurs du transport d'électrons (Krauss *et al.*, 1996).

La structure d'un complexe PS I de cyanobactérie a récemment été déterminée à une résolution de 3 Å (Schubert *et al.*, 1997). Les gènes *psaA* et *psaB* présentent une similitude très élevée entre les organismes (95 % et plus). Les sites de fixation des différents cofacteurs ne sont pas encore déterminés avec certitude si ce n'est pour le complexe Fer-Soufre.

### I- 1. 2. 3. Les antennes collectrices d'énergie lumineuse.

Seuls les complexes antennes des plantes et algues vertes seront considérés pour deux raisons essentielles à la compréhension de ce travail (pour revues sur la diversité des antennes périphériques voir Grossman *et al.*, 1995; Green et Durnford, 1996) :

- les travaux concernant les organismes à Chl *a/b* sont très avancés comparativement aux organismes à Chl *a/c* (dont les diatomées) et les complexes antennes des plantes vertes constituent donc un modèle de référence pour les antennes chlorophylliennes,
- le fait que les plantes supérieures présentent des adaptations aux variations de la lumière proches de celles des diatomées qui est le propos de ce manuscrit.

Les homologues des complexes antennes des diatomées et des organismes à Chl *a/c* au sens large seront exposés dans la seconde partie de cette introduction.

#### I- 1. 2. 3. a. *L'antenne du PS I.*

L'antenne collectrice associée au PS I est constituée de deux complexes dimériques, l'un fluorescent à 730 nm (LHC I-730) l'autre à 680 nm (LHC I-680) à basse température. Le LHC I-680 est lui-même subdivisé en deux sous-complexes pigmentaires, LHC I-680A et B qui diffèrent par leur composition polypeptidique (Tableau 3). De plus, des données obtenues chez *Arabidopsis* suggèrent que deux autres protéines de type LHC (Lhca5, Lhca6) seraient potentiellement associées au PS I, bien que leur localisation n'ait pas été clairement déterminée (Jansson, 1999). Les complexes antennaires PS I contribuent pour 100 à 120 Chl *a* sur un total de 210 associées au PS I (Jansson, 1994).

#### I- 1. 2. 3. b. *L'antenne du PS II.*

Chez les plantes supérieures, six complexes pigments-protéines principaux LHCII, CP29, CP26, CP24, LHCIa, LHCIb ont été identifiés (Green et Durnford, 1996). Chacun de ces complexes est constitué de protéines intrinsèques à la membrane, codées par le génome

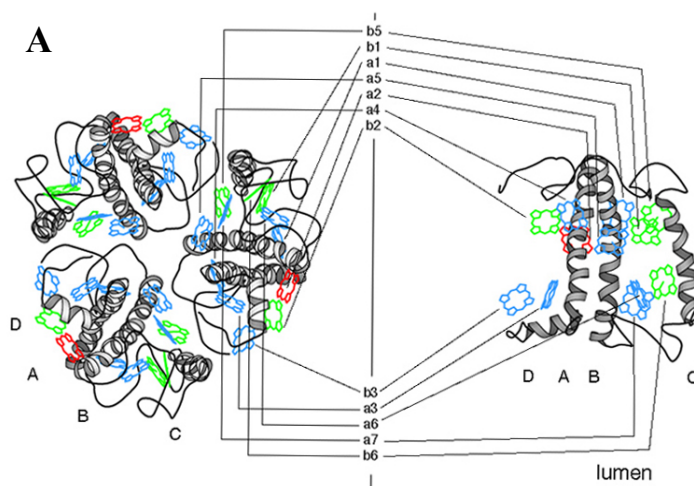


nucléaire. Elles lient la Chl *a* et la Chl *b* dans des rapports variables (Tableau 3), ainsi que des xanthophylles : la lutéine, la néoxanthine et la violaxanthine (VX).

**Tableau 3 : Description des complexes antennes à Chl *a/b* des plantes supérieures (d'après Green et Durnford, 1996).**

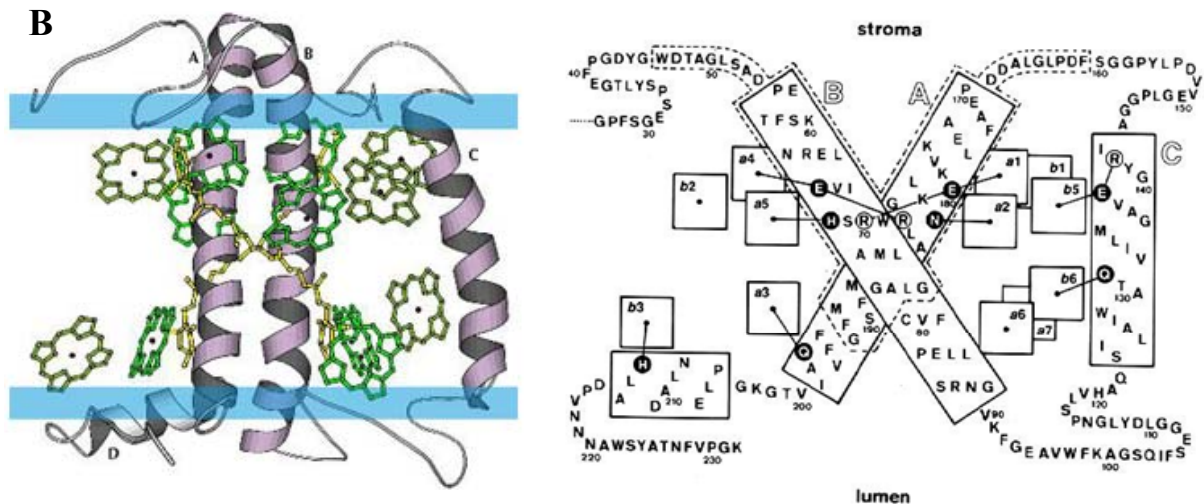
Complexe antenne	Gène	Rapport Chl <i>a/b</i>
LHCI-680A	<i>lhca3</i>	1,4 à 3,1
LHCI-680B	<i>lhca2</i>	/
LHCI-730	<i>lhca1, lhca2</i>	2,3 à 3,2
LHCII	<i>lhcb1, 2, 3</i>	1,3-1,4
CP29	<i>lhcb4</i>	2,3 à 3,1
CP26	<i>lhcb5</i>	1,8 à 3,3
CP24	<i>lhcb6</i>	0,9 à 1,6
CP22	<i>psbS</i>	6

Le premier complexe Chl-protéine à avoir été découvert est le **LHCII** qui constitue l'antenne majeure à Chl *a/b* du PS II. Les protéines de ce complexe présentent une masse moléculaire comprise entre 24 et 29 kDa et représentent environ un tiers du contenu total en protéines des membranes thylakoïdales et environ 50 % de la Chl totale. Chez les plantes supérieures, le LHCII est constitué de trois types de polypeptides étroitement liés (codés par les gènes *Lhcb1*, 2 et 3, Jansson, 1994) dont les rapports varient selon les conditions de croissance. La détermination à une résolution de 6 Å (Kühlbrandt et Wang, 1991) puis de 3,4 Å (Kühlbrandt *et al.*, 1994) de la structure cristallographique du LHCII purifié de pois a permis d'en élucider la structure tridimensionnelle. Celui-ci est constitué de trois polypeptides associés en trimères (Fig. 6A).



**Fig 6 : A- Structure tridimensionnelle du LHCII des végétaux supérieurs. A gauche, le complexe trimérique, vue de haut. A droite, le monomère formé de 3  $\alpha$ -hélices transmembranaires (A, B, C) et d'une quatrième hélice courte en C-terminal (D). Chaque polypeptide porte 12 Chl (a1-a7 et b1-b5) avec en bleu, les cycles porphyrines des Chl *a* et en vert, ceux des Chl *b*. La Chl *a*2, représentée en rouge, aurait un rôle clé dans le transfert d'énergie.**

Chaque polypeptide est formé de trois  $\alpha$ -hélices transmembranaires dont deux (A et B) sont disposées en croix dans la membrane thylakoïdale (Fig. 6B). La région N-terminale du polypeptide, ainsi que les boucles de connexion entre les hélices A et C sont situées à la surface de la membrane, côté stroma, alors que la boucle de connexion entre les B et C ainsi que la partie C-terminale de la protéine se trouvent contre la membrane côté lumen. Une quatrième hélice (D), plus courte, est identifiée juste en amont de l'extrémité C-terminale, à l'interface entre la membrane et le lumen. Les deux hélices A et B sont homologues et en relation étroite au centre de la membrane. A ce niveau, deux paires d'acides aminés, un acide glutamique (E) sur une hélice et une arginine (R) sur l'autre hélice forment des liaisons ioniques inter-hélices et sont considérées comme la principale force permettant de maintenir la structure en croix (Kühlbrandt *et al.*, 1994).



**Fig. 6 : B-** Représentation du monomère LHCII dans les membranes photosynthétiques (vue de profil). En vert, les Chl *a*, en kaki les Chl *b* et en jaune les 2 caroténoïdes des hélices A et B. Séquence polypeptidique du LHCII avec les différents sites putatifs fixant des Chl. Les résidus acides aminés entourés de noir sont les sites fixateurs de Chl. Les résidus acides aminés entourés de blanc (R) sont les compensateurs des résidus fixateurs de Chl chargés (E). Les 2 résidus R situés au centre des hélices A et B stabiliseraient la structure en croix dans la membrane. Les zones entourées de pointillés sont les régions très conservées chez les végétaux verts (d'après Kühlbrandt *et al.*, 1994; Rogl et Kühlbrandt, 1999).

Le LHCII porte douze à treize Chl *a* et *b*, deux lutéines, une néoxanthine et trois violaxanthine/zéaxanthine par trimère (Kühlbrandt *et al.*, 1994; Ruban *et al.*, 1999; Caffari *et al.*, 2001). Huit sites de fixation sont déterminés pour les Chl (Fig. 6B). Pour les caroténoïdes, deux sites sont identifiés avec certitude au centre de la structure en croix. Ils auraient un rôle important dans le repliement de la protéine (Kühlbrandt *et al.*, 1994).

En dehors des polypeptides du LHCII, il existe trois autres complexes monomériques à Chl *a/b* qui possèdent une structure similaire : **CP24, 26 et 29** (ou Lhcb4, 5 et 6) (Grossman *et al.*, 1995; Green et Durnford, 1996). Ces complexes lient une quantité plus faible de Chl *b* et constituent 5 à 10 % de la Chl totale associée au PS II (Tableau 3, Barber et Kühlbrandt, 1999). Ils sont étroitement associés avec le cœur du PS II et permettraient le transfert efficace de l'énergie d'excitation du LCHII vers le centre réactionnel, par l'intermédiaire de l'antenne proximale CP43 et 47.

Concernant **la structure spatiale des PS II** dans son ensemble, il est actuellement admis qu'ils sont organisés en dimères (Fig. 7) (pour revues voir Hankamer *et al.*, 1997 et Rhee, 2001). Les différents composants, le cœur (D1/D2), l'antenne proximale (CP43 et 47), l'antenne périphérique avec ses composants mineurs (CP23, 26 et 29) et majeurs (trimères de LHCII) sont agencés de manière à assurer un transfert directionnel de l'énergie d'excitation du LHCII au centre réactionnel le plus efficace possible. Les antennes périphériques et particulièrement les LHCII sont plus ou moins nombreuses et fortement liées à l'ensemble ce qui peut donner des supercomplexes PSII-LHC II (Boekema *et al.*, 1999), eux-mêmes organisés en mégacomplexes qui sont en fait des associations dimériques de supercomplexes (Boekema *et al.*, 2000a). Ces complexes se présentent sous la forme de macrodomaines d'une vingtaine de nanomètres extrêmement organisés au sein de la membrane thylakoïdale (Fig. 7). L'organisation supra moléculaire des PS II-LHCII se révèle en fait très hétérogène d'une espèce à l'autre (l'épinard et *Arabidopsis*, Boekema *et al.*, 1999, 2000b; Yakushevskaya *et al.*, 2001) et entre les parties granaires et agraires des thylakoïdes (Boekema *et al.*, 2000b). Il a été suggéré l'existence de différents types d'organisation en réponse à la lumière, permettant ainsi une modulation rapide ou à long terme du transfert d'énergie à un niveau supramoléculaire (Boekema *et al.*, 1999, 2000b). Cette hypothèse est à rapprocher de l'étude récente de Rozak *et al.* (2002) qui ont montré des modifications ultrastructurales rapides (de l'ordre de quelques minutes) concernant en particulier le degré d'accolement des thylakoïdes et donc de relation entre les supercomplexes PS II de deux membranes thylakoïdales adjacentes.

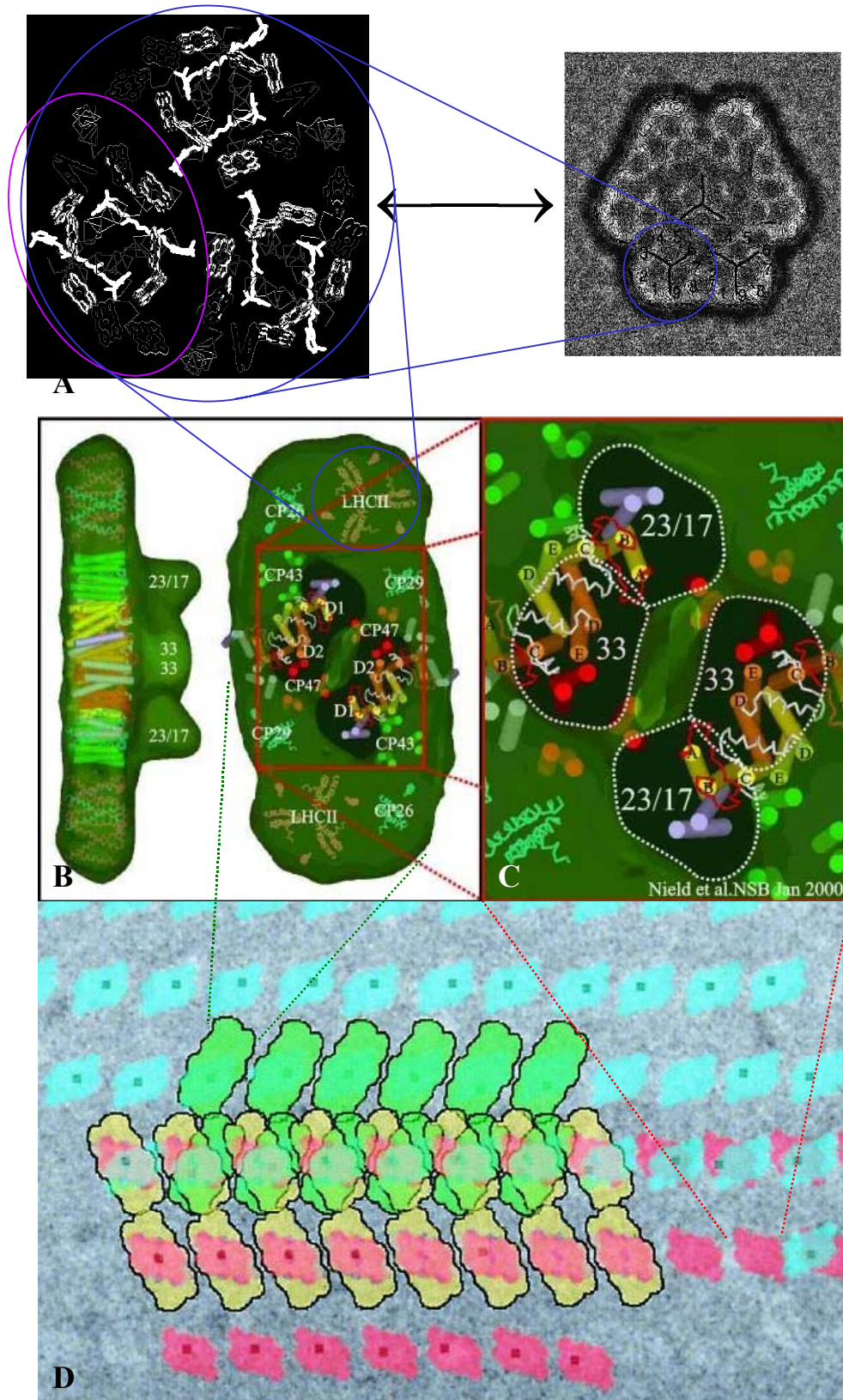
### *I- 1. 2. 3. c. Origine des complexes antennes.*

D'après les homologies de séquences en acides aminés et les profils d'hydrophobicité, il semblerait que toutes les protéines LHC liant la Chl *a* possèdent des séquences primaires

similaires, suggérant une structure commune à trois hélices transmembranaires avec une forte homologie de séquence entre l'hélice A et B (Fig. 6) (pour revue voir Green et Kühlbrandt, 1995). Il est actuellement proposé que la grande majorité des protéines actuelles fixatrices de Chl *a* soient issues d'un ancêtre commun codant pour une protéine à une ou deux hélices qui se serait dupliquée au cours de l'évolution. Récemment, il a été découvert dans le génome de cyanobactéries et le génome chloroplastique d'une algue rouge des gènes codant pour une petite protéine HLIP ("High Light Induced Protein") formée d'une seule  $\alpha$ -hélice transmembranaire. Cette protéine présente de fortes homologies avec les hélices A et B des protéines LHC à Chl *a/b* et Chl *a/c*, en particulier en ce qui concerne les acides aminés intervenant dans la fixation des Chl (Dolganov *et al.*, 1995; Funk et Vermaas, 1999). Elle présente également les deux résidus impliqués dans la liaison des hélices A et B et pourrait donc en théorie former des dimères proches de la structure en croix. De part sa parenté avec toutes les protéines LHC à Chl, cette protéine-hélice renforce l'idée qu'un gène de type *lhc* était présent dans le génome du premier organisme photosynthétique eucaryote (Fig. 8) (Green et Kühlbrandt, 1995).

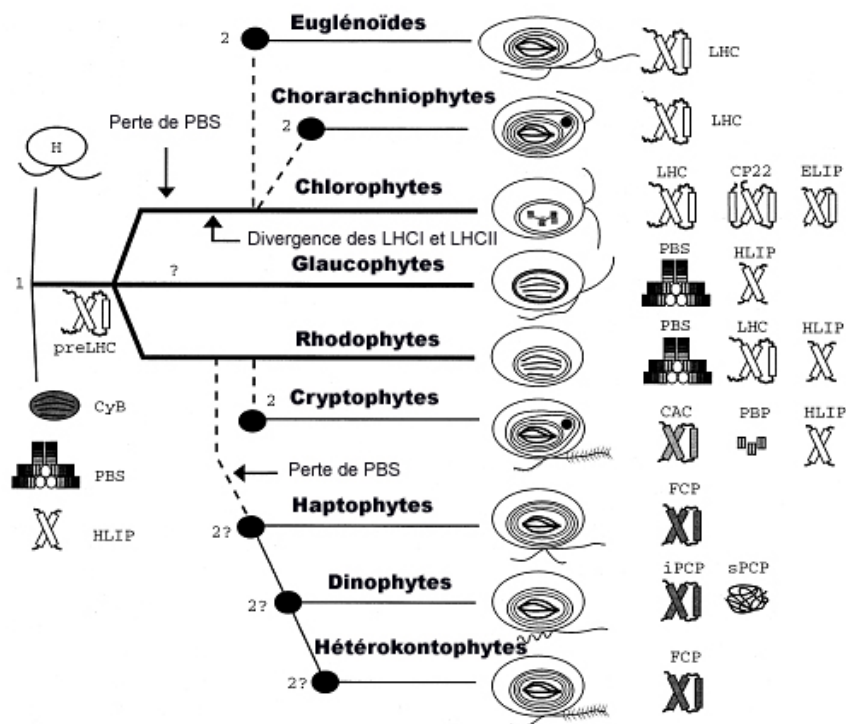
Deux autres types de protéines pigmentaires sont cruciales d'un point de vue évolutif. Le premier type sont les protéines ELIPs ("Early Light Induced Protein") qui sont des protéines à trois hélices transmembranaires observées chez les plantes et algues vertes dont la fonction exacte demeure inconnue et qui pourraient entre autres avoir un rôle dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique (Levy *et al.*, 1993). Ces ELIPs présentent une forte homologie avec les HLIPs. La seconde protéine intéressante est PsbS (ou CP22, Tableau 3) qui est une sous-unité du PS II des plantes et des cyanobactéries. L'intérêt pour cette protéine provient du fait qu'elle possède non pas trois mais quatre hélices transmembranaires et qu'elle présente de fortes homologies de séquences avec les autres protéines LHC (Funk *et al.*, 1995a). De plus les hélices A et B, et C et D de PsbS ont de fortes homologies de séquences entre elles (Green et Pichersky, 1994). Deux copies de PsbS sont présentes par PS II et lient cinq molécules de Chl *a* et *b* et différentes xanthophylles (Funk *et al.*, 1995b). Récemment, il a été montré par mutagenèse dirigée que PsbS interviendrait dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique (voir § I- 3. 1. ).

Ces différentes découvertes ont amené Montane et Klopstech (2000) à élaborer une hypothèse évolutive pour la super famille des LHC (Fig. 8). D'après ces auteurs, les HLIPs à une hélice seraient l'ancêtre commun qui présente une potentialité de formation d'une double



**Fig. 7 :** Organisation du PS II (vue de dessus). *A-* LHCII (dont un monomère est indiqué) peut être isolé de la membrane en forme de trimère ou de rosettes heptamériques de trimères; *B-* Des super-complexes du PSII présentent (*C-*) un dimère de cœur, chaque cœur étant associé aux monomères des antennes mineures (CP 26 et 29) et à un trimère du LHCII; *D-* Les super-complexes du PS II existent en forme de réseau dans la membrane *in vivo*. (D'après Boekema *et al.*, 1999, 2000a, 2000b; Nield *et al.*, 2000a, 2000b).

hélice A et B chez les organismes à Chl *a/b* et Chl *a/c* (Caron *et al.*, 1996; Dolganov *et al.*, 1995). Cette vision est renforcée par la découverte récente de protéine LIL (“Light-harvesting Like proteins”) qui sont soit à simple, soit à double hélice et qui présentent de fortes homologues avec les HLIP et les LHC (Jansson, 1999). Cette double hélice aurait ensuite été dupliquée pour donner une protéine de type LHC à quatre hélices dont PsbS serait un vestige (Green et Pichersky, 1994). A partir de cette structure à quatre hélices auraient tout d’abord évolué les ELIP puis ensuite les LHC (Fig. 8). Connaissant les propriétés de photoprotection possible (mais pas encore indubitablement prouvées) de PsbS et des ELIP, les auteurs proposent que la “première” fonction des protéines pigmentaires élaborées fût non pas d’absorber la lumière mais de la dissiper pour protéger l’appareil photosynthétique. Ensuite, a eu lieu la diversification des protéines LHCI et II à Chl *a/b* et Chl *a/c* dont la quatrième aurait été conservée (PsbS), peu conservée (LHC à Chl *a/b*) ou pas conservée (LHC à Chl *a/c*) (Fig. 8). Des études phylogénétiques récentes indiquent que les antennes à Chl *a/c* ont évolué différemment des antennes à Chl *a/b* et divergé de ces dernières avant la séparation fonctionnelle des LHCI et II des végétaux verts (Fig. 8).



**Fig. 8 :** Schéma de la théorie endosymbiotique primaire (1) et secondaire (2) expliquant l’origine commune des antennes à Chl à 3  $\alpha$ -hélices. Les pointillés reflètent les transferts latéraux hypothétiques de plastides (Durnford *et al.*, 1999). CAC ; chlorophyll *a/c* complex; CyB, cyanobactérie; ELIP, early light induced protein; FCP, fucoxanthin chlorophyll *a/c* protein; H, hôte; HLIP, high light induced protein; iPCP, intrinsic peridinin chlorophyll *a/c* protein; LHC, chlorophyll *a/b* light-harvesting complex; PBS, phycobilisome; PBP, phycobilin; sPCP, soluble peridinin chlorophyll *a/c* protein.

## **I- 2. UNE APPROCHE BIOPHYSIQUE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE : L'EMISSION DE FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE.**

Seront brièvement exposées ici les bases de la fluorescence chlorophyllienne. Elles permettront de mieux comprendre comment cet observable est très utilisé pour l'étude de l'appareil photosynthétique, et en particulier pour l'étude de sa réaction à court terme aux variations de la lumière, en partie parce qu'il est mesurable dans des conditions non-invasives (voir § I- 3. 1. ). Un autre exemple d'application pratique de l'émission de fluorescence chlorophyllienne en écologie est donné en partie Annexe de ce manuscrit et concerne son utilisation dans le suivi de la dynamique des populations naturelles de phytoplancton. Pour des revues plus complètes sur le sujet apportant les points de vue différents du biophysicien, du physiologiste végétal, de l'écophysiologiste végétal ou de l'océanologue voir Prézelin et Bozcar (1986); Krause et Weiss (1991); Dau (1994); Lazar (1999); Maxwell et Johnson (2000).

### **I- 2. 1. Origine.**

Comme nous venons de le voir, tous les organismes photosynthétiques possèdent des complexes pigments-protéines fonctionnant comme des antennes collectrices d'énergie lumineuse. L'organisation fonctionnelle de ces antennes est telle qu'elle conduit à un transfert efficace de l'énergie d'excitation des pigments de l'antenne périphérique vers la Chl-centre. Ainsi, la fluorescence est émise essentiellement au niveau des dernières molécules de la voie de transfert de l'énergie d'excitation, à savoir les Chl *a*. A température ordinaire la plus grande partie de la fluorescence détectable provient du PS II. L'émission émane de son antenne, sans qu'il ait été clairement établi quel(s) complexe(s) ou quelle(s) molécule(s) de Chl étai(en)t impliqué(s) en particulier.

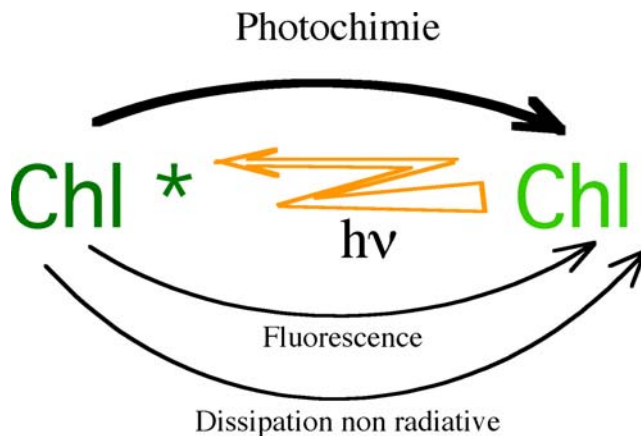
Tout photon absorbé par les pigments des antennes photocollectrices est converti en exciton qui a une grande probabilité d'être piégé par la Chl-centre. La durée de vie de l'état "excité" d'une molécule de pigment n'est que de quelques nanosecondes. Elle se désactive spontanément très rapidement suivant trois voies (Fig. 9) :

*1- La photochimie* : l'énergie est transférée aux Chl-centres. Il se produit alors la séparation de charges: la Chl-centre excitée (état singulet excité de la Chl,  $^1\text{Chl}^*$ ) s'oxyde en cédant un électron à un accepteur primaire et l'électron est ensuite transporté par la chaîne

photosynthétique (voir § I- 1. 1. 2. ). La photochimie est la voie principale (plus de 90 %) de désactivation des excitons.

2- *La fluorescence* : l'énergie est réémise sous forme d'un photon de fluorescence (de niveau d'énergie inférieure à celui du photon absorbé, donc de longueur d'onde plus grande : c'est pourquoi le photon de fluorescence chlorophyllienne est émis dans le rouge).

3- *La dissipation non radiative* : l'énergie est réémise sous forme de chaleur.



**Fig. 9 :** Les trois voies de désactivation de la Chl excitée (Chl\*).

D'après le principe de conservation de l'énergie, la somme des énergies réémises par ces trois voies de désactivation est constante. Quand l'énergie n'est pas utilisée pour la photochimie, les deux autres voies prennent de l'importance. Cela se produit lorsque les centres réactionnels sont incapables de piéger un exciton, c'est-à-dire quand la Chl-centre excitée ne peut transmettre son électron à l'accepteur primaire qui est encore réduit. L'énergie portée par la Chl\* ne pouvant servir pour la photochimie et l'état excité étant très instable, l'énergie est alors réémise via l'une des deux ou les deux autres voies de désactivation. Dans ce cas, les centres sont dits "fermés" car incapables de faire une nouvelle séparation de charges, ce qui produit une augmentation des rendements d'émission de fluorescence et/ou de chaleur. Dans le cas inverse, soit quand les centres sont "ouverts", les voies fluorescence et chaleur sont minimales.

## I- 2. 2. L'étude de la photosynthèse.

Les mesures de l'émission de fluorescence, pour étudier la photosynthèse d'organismes soumis à différents régimes lumineux, sont devenues courantes à partir du milieu des années trente (voir Briantais *et al.*, 1986 pour une revue historique). La mesure et le suivi de la fluorescence dans le temps ont commencé par l'étude de systèmes



photosynthétiques adaptés à l'obscurité illuminés sous une intensité constante. Ces premiers travaux ont mis en évidence ce qui est désormais nommé l'induction de fluorescence (ou phénomène de Kautsky), c'est-à-dire l'ensemble des variations du rendement de fluorescence se produisant pendant quelques minutes après passage du système photosynthétique de l'obscurité à la lumière (voir ci-après).

La fluorescence chlorophyllienne du PS II à température ambiante est un bon moyen d'étude des systèmes photosynthétiques (pour revue voir Büchel et Wilhelm, 1993). Ce paramètre peut se mesurer *in vivo* de façon non-invasive directement sur une suspension d'algues ou une feuille entière par exemple. C'est un paramètre sensible facilement mesurable avec un appareil adéquat et qui reflète, par complémentarité, les événements photochimiques. La fluorescence peut être mesurée de différentes façons, sur la base de ses propriétés intrinsèques et des méthodes utilisées. Le spectre des possibilités est grand grâce au choix qui s'offre pour de nombreux paramètres : échelle de temps de l'observation (des picosecondes jusqu'aux heures), système étudié (*in vivo*, préparations de thylakoïdes, pigments en solution), température à laquelle s'effectue la mesure (ambiante, azote liquide), type de mesure (statique ou dynamique), lumière utilisée pour exciter la fluorescence (intensité et qualité).

L'intensité de la fluorescence mesurée ( $F$ ) est fonction du rendement de fluorescence des pigments ( $\Phi$ ) et de l'intensité lumineuse incidente ( $I$ ) :  $F = \Phi \times I$ . Cette relation, ainsi que la propriété de la lumière à être absorbée par les pigments et à initier une activité photochimique, imposent des contraintes pour la mesure de la fluorescence. Ainsi, il existe deux façons de mesurer la fluorescence, qui dépendent du type de source lumineuse et d'appareil utilisés. Dans les fluorimètres conventionnels (ou "classiques"), une seule source sert à la fois de faisceau actinique (qui induit l'activité de l'appareil photosynthétique et donc la fluorescence) et de faisceau détecteur de la fluorescence (c'est ce type de fluorimètre qui est présenté en partie Annexe). Dans ce cas, si l'on fait varier l'intensité et/ou la qualité du faisceau actinique, on fait varier parallèlement le niveau de détection. Afin de s'affranchir de ce problème et de pouvoir varier le faisceau actinique tout en maintenant constant le niveau de détection, les fluorimètres dits à faisceau modulé (comme le fluorimètre-PAM "Pulse Amplitude Modulated", voir Chapitre II-Matériel et Méthodes, § II- 1. 2. ) ont été mis au point. Pour ce type d'appareil, il existe deux sources lumineuses indépendantes : un faisceau actinique dont on peut faire varier à souhait l'intensité, la qualité spectrale et la durée, et un faisceau détecteur. Ce dernier est modulé et monochromatique rouge (photons de faible énergie absorbés par la Chl) ce qui permet de diminuer au maximum son "actinicité" et donc

de pouvoir détecter, par une amplification accordée, la fluorescence sans modifier l'émission de la fluorescence induite par le faisceau actinique et correspondant à un état physiologique donné. Se surajoute à ces deux sources lumineuses, une troisième qui permet d'envoyer à intervalles réguliers des flashes saturants permettant de mesurer le niveau maximal de fluorescence (voir ci-après) et d'évaluer les différents paramètres impliqués dans les variations de ce niveau maximal (le "quenching" de fluorescence).

### **I- 2. 3. Niveaux et paramètres de fluorescence.**

#### **I- 2. 3. 1. Fluorescence minimale et maximale.**

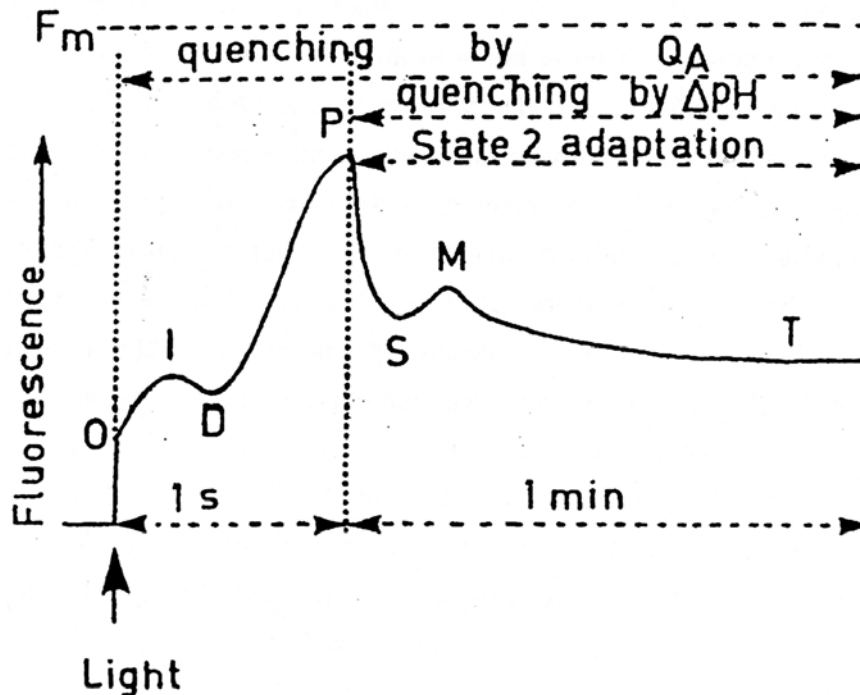
Le signal de fluorescence varie entre deux valeurs extrêmes qui sont la fluorescence minimale ( $F_o$ ) et la fluorescence maximale ( $F_m$ ). Ces niveaux dépendent du rendement de fluorescence  $\Phi$ , sa valeur étant liée à l'état des centres réactionnels : quand les centres sont ouverts (photosynthétiquement actifs), le rendement de fluorescence est minimal et la fluorescence est basse ( $F_o$ ); quand les centres sont fermés (photosynthétiquement inactifs), le rendement de fluorescence est maximal et la fluorescence est haute ( $F_m$ ). De ces deux paramètres, on peut déduire la fluorescence variable  $F_v$  qui est égale à la différence entre  $F_m$  et  $F_o$  :  $F_v = F_m - F_o$ .  $F_v$  correspond à la fraction de centres réactionnels capables de réduire  $Q_A$ , c'est-à-dire la fraction des centres actifs. Le rapport  $F_v/F_m$  donne alors la capacité photosynthétique des photosystèmes ("quantum yield of photochemistry"). Il est très utilisé par les écophysiologistes des plantes et du phytoplancton pour évaluer l'état physiologique de ces organismes : plus le rapport est élevé, plus l'organisme est en "bonne santé" (voir également la partie Annexe).

En fonction du type de fluorimètre utilisé, la détermination des niveaux  $F_o$  et  $F_m$  est sensiblement différente. Dans le cas d'un fluorimètre à faisceau détecteur modulé,  $F_o$  peut être mesuré facilement sur des cellules adaptées à l'obscurité (tous les centres sont ouverts) :  $F_o$  correspond alors à l'infime quantité de fluorescence émise lors du trajet de l'exciton dans les antennes.  $F_m$ , lui, est mesuré en envoyant un flash de lumière saturante pour fermer tous les centres. Avec un fluorimètre conventionnel,  $F_o$  correspond à la première mesure prise par l'appareil au début de l'illumination (ouverture de l'obturateur devant la source lumineuse par exemple) de cellules adaptées à l'obscurité, la fiabilité de cette mesure dépend donc directement de la vitesse d'ouverture du faisceau et de la rapidité de réponse de l'acquisition du signal (voir la partie Annexe).  $F_m$  est atteint seulement si l'intensité lumineuse du faisceau

actinique est suffisamment élevée pour fermer tous les centres (voir la partie Annexe) ou en présence de DCMU (un herbicide inhibiteur du transfert d'électrons entre  $Q_A$  et  $Q_B$ , empêchant la réoxydation rapide de  $Q_A$  et donc la réouverture des centres, voir le Chapitre II-Matériels et Méthodes, § II- 3. ).

### I- 2. 3. 2. L'induction de fluorescence.

Il s'agit de l'ensemble des variations de la fluorescence suivies dans le temps (de quelques millisecondes à quelques centaines secondes), pour des cellules adaptées à l'obscurité et illuminées sous une intensité lumineuse constante (voir également la partie Annexe). Les niveaux transitoires parcourus pendant l'induction de fluorescence peuvent être appelés OI D P S M T ou  $F_0$ ,  $F_i$ ,  $F_d$ ,  $F_p$ ,  $F_s$ ,  $F_M$  (à ne pas confondre avec  $F_m$ ) et  $F_t$  (Fig. 10). Le niveau  $F_0$  correspond à la fluorescence minimale (tous les centres sont ouverts). La montée au niveau  $F_p$  se fait plus ou moins rapidement et à un niveau plus ou moins élevé, en fonction de l'intensité lumineuse. Si l'illumination est saturante, cette montée est très rapide (une seconde environ) et le niveau atteint,  $F_p$ , est proche du niveau  $F_m$  atteint en présence de DCMU. Cette montée correspond à l'accumulation de  $Q_A$  à l'état réduit (fermeture des centres) qui dépend de deux équilibres : la réduction de  $Q_B$  par  $Q_A^-$  et la réduction du pool de plastoquinone PQ (voir I- 1. 1. 2. ).



**Fig. 10 :** Représentation schématique d'une induction de fluorescence (ou phénomènes de Kautsky) chez une feuille (Briantais *et al.*, 1986).

Le niveau de fluorescence P dépend donc du niveau de réduction du pool de PQ sous une lumière donnée. **Sous une forte illumination saturante**, le niveau  $F_m$  (pool de PQ complètement réduit) peut être atteint car la vitesse de réoxydation du pool par le PS I est inférieure à la vitesse de réduction du pool par le PS II. Dans ce cas, la montée est très rapide. On atteint le niveau  $F_m$  plus rapidement encore si les cellules ont été préalablement incubées en présence de DCMU. Il suffit alors d'un exciton piégé par centre réactionnel PS II pour arriver à la réduction complète de  $Q_A$ . Cette méthode, l'induction de fluorescence en présence de DCMU, permet de mesurer l'efficacité de collecte de la lumière des PSII (ou la "taille d'antenne" des PS II). L'induction présente alors une forme sigmoïdale allant de  $F_o$  à  $F_m$  en quelques millisecondes. Le temps de demi-montée permet de mesurer la taille de l'antenne des PS II : plus la taille est grande, plus le niveau  $F_m$  est rapidement atteint et plus le temps de demi-montée est faible et *vice versa*. **Sous une intensité lumineuse limitante**, la montée du niveau de fluorescence est plus lente ( $F_p$  est atteint en quelques centaines de millisecondes) et atteint un niveau  $F_p$  inférieur à  $F_m$  car il s'établit un équilibre entre la vitesse de réduction et la vitesse de réoxydation du pool de PQ. Une partie seulement du pool de PQ est réduite à un temps donné. Plus l'intensité lumineuse est faible, plus la vitesse de réduction et la partie du pool de PQ réduite sont faibles et donc plus le niveau  $F_p$  est bas (voir la partie Annexe).

Des étapes transitoires peuvent être observées lors de la montée du niveau de fluorescence jusqu'à  $F_p$  en lumière non saturante (Fig. 10). Avant le niveau  $F_i$  décrit par Briantais *et al.* (1986), un niveau intermédiaire  $F_j$  peut être observé dans certaines conditions (Strasser *et al.*, 1995). Ces deux niveaux sont des conséquences de l'évolution de l'état d'oxydoréduction de  $Q_A$  et du fait que les vitesses des différentes réactions de  $Q_A$  à PQ sont variables : pour un centre réactionnel donné, la réduction de  $Q_A$  par le PS II est plus rapide que la réduction de  $Q_B$  par  $Q_A^-$  et le remplacement de  $Q_B$  réduit ( $Q_BH_2$ , voir I- 1. 1. 2. ), libéré dans le pool de PQ, par une PQ réoxydée est encore plus lent. Le niveau  $F_i$  est suivi par une petite diminution transitoire de l'intensité de fluorescence (niveau  $F_d$ ) qui correspond à la "mise en route" du PS I qui oxyde le pool de PQ, puis le niveau  $F_p$  est atteint. Une décroissance lente du niveau de fluorescence (de  $F_p$  à  $F_s$  puis  $F_t$ ) a ensuite lieu (en une minute environ) jusqu'à un équilibre, après une ou plusieurs oscillations (différents niveaux  $F_M$  transitoires, Fig. 10) (voir également la partie Annexe).

### I- 2. 3. 3. Le quenching de fluorescence.

Cette diminution de la fluorescence au cours du temps appelée “quenching” (extinction) de fluorescence peut être due à deux phénomènes différents :

- **le quenching photochimique (qP)** : lorsque le pool de PQ (et donc de  $Q_A$ ) est oxydé, les centres sont ouverts, ce qui induit une diminution de la fluorescence.

- **le quenching non-photochimique (qN, NPQ ou  $SV_m$ )** : trois mécanismes majeurs, autres que la photochimie, peuvent être responsables d'une diminution de la fluorescence.

*1- le quenching de fluorescence dépendant du  $\Delta pH$  (qE).* Le  $\Delta pH$ , gradient de protons transthylakoïdal généré lors des réactions photochimiques (voir I- 1. 1. 2. ), est responsable d'une partie du NPQ de façon directe ou indirecte. En effet, l'utilisation de découpleurs tels que le  $NH_4Cl$  (voir Chapitre II-Matériels et Méthodes, § II- 3. ) qui inhibent le gradient de protons transthylakoïdal induit une augmentation du niveau de fluorescence. Ce type de quenching est impliqué dans la photoprotection de l'appareil photosynthétique contre la photoinhibition (voir § I- 3. 1. ).

*2- le quenching de fluorescence dû à la photoinhibition (qI).* A une intensité lumineuse dépassant le seuil de saturation de la photosynthèse, les centres PS II sont endommagés (voir § I- 3. 1. ). La fluorescence de ces centres endommagés reste basse (la nature de ce quenching n'est pas élucidée). Dans ces conditions, le nombre de PS II potentiellement actifs (pouvant être fermés, ce qui correspond à un niveau de fluorescence élevé) diminuant, l'amplitude de la fluorescence variable diminue.

*3- le quenching de fluorescence dû aux transitions d'état (qT).* Les transitions d'état sont des mécanismes qui induisent une redistribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes; phénomène bien caractérisé chez les plantes et algues vertes et les cyanobactéries. Il est absent chez les diatomées (voir II- 2. 5. ). Lorsque la qualité spectrale de l'illumination favorise son absorption par l'antenne du PS II (dont le contenu pigmentaire est différent de celui de l'antenne PS I, Tableau 3), la fluorescence associée au PS II diminue. Lorsque l'appareil photosynthétique reçoit ce type de lumière dite de “type 2”, une partie des excitons créés au niveau de l'antenne du PS II est redirigée vers l'antenne du PS I et *vice versa* (pour une revue récente voir Haldrup *et al.*, 2001).

### I- 3. STRATEGIES D'ADAPTATION DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE AUX VARIATIONS DE LUMIERE.

L'absorption de l'énergie lumineuse et sa conversion en molécules chimiques fournit l'énergie nécessaire aux organismes photosynthétiques pour vivre, se développer et se reproduire. Cependant, cette situation aboutit nécessairement à un paradoxe que l'on peut résumer comme suit **“Too much of good thing : light can be bad for photosynthesis”** (Barber et Andersson, 1992). En effet, d'un côté la capture des photons doit être suffisamment importante afin de produire l'énergie nécessaire à la vie de l'organisme mais d'un autre, l'excès d'énergie absorbée peut générer un endommagement de l'appareil photosynthétique : la photoinhibition. L'énergie lumineuse absorbée est en excès lorsqu'elle dépasse la capacité photosynthétique maximale de l'organisme. Dans l'environnement naturel cette capacité est fonction de divers stress environnementaux comme la température ou la disponibilité en nutriments et ces facteurs tout comme la disponibilité de la lumière sont extrêmement variables (pour revues voir Neale, 1987; Long *et al.*, 1994). Les organismes doivent donc réguler l'absorption de la lumière et son utilisation (Fig. 11A). Lorsque les changements lumineux sont très rapides (de l'ordre de la minute à l'heure), les organismes ont recours à des mécanismes autres que ceux modifiant leur capacité d'absorption : ces mécanismes sont destinés à utiliser l'énergie absorbée en excès à des fins autres que la photosynthèse pour éviter les conséquences néfastes d'une surexcitation des centres réactionnels. Ce sont ces adaptations à court et long terme qui sont décrites dans les paragraphes suivants.

#### I- 3. 1. Mécanismes photoprotecteurs à court terme.

La première “ligne de défense” des organismes photosynthétiques à l'encontre d'un excès de lumière concerne tous les mécanismes photoprotecteurs dont certains sont nommés **“safety valves for photosynthesis”** (Niyogi, 2000). Ils permettent (Fig. 11A, 11B) :

- de dissiper l'énergie en excès sous forme non-radiative (chaleur),
- de fonctionner comme des voies alternatives pour utiliser et/ou stocker les électrons produits en excès,
- de prendre en charge les molécules dont la production résulte de l'excès d'énergie et qui sont susceptibles d'endommager l'appareil photosynthétique
- de réparer rapidement les dommages engendrés.

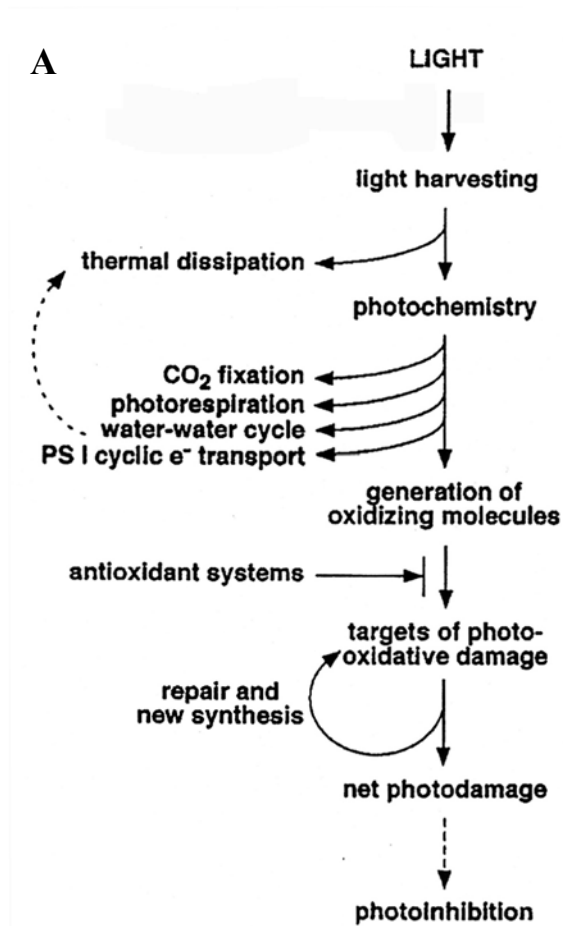
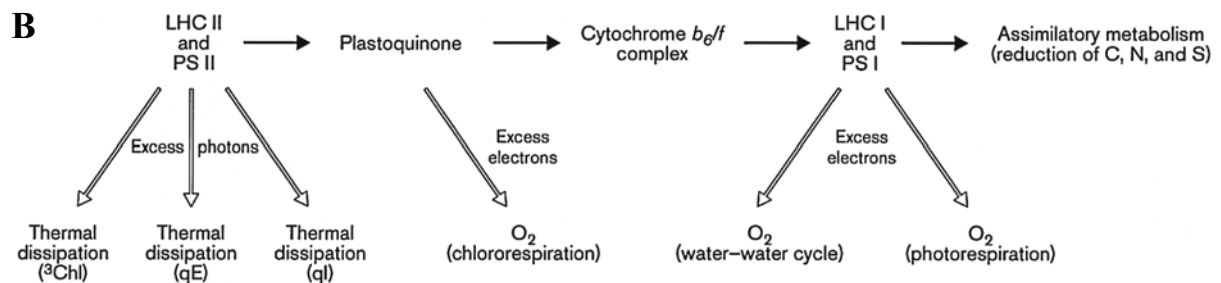
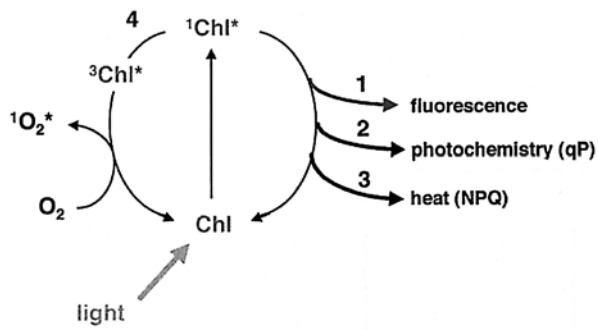


Fig. 11 : A- Représentation schématique des processus photoprotecteurs intervenant dans les plastides ; B- Représentation schématique des “safety valves for photosynthesis” permettant de dissiper l’excès de photons et d’électrons. Ces mécanismes photoprotecteurs sont présentés en détails dans la suite du texte (Niyogi, 1999, 2000).



### I- 3. 1. 1. La photoinhibition.

Comme nous l’avons vu dans le paragraphe précédent, le piégeage d’un photon par une molécule de Chl-centre aboutit à la formation d’une espèce excitée de la Chl ( $^1\text{Chl}^*$ ) qui possède un niveau d’énergie élevé. La voie majoritaire de désactivation de cette Chl excitée consiste à utiliser l’énergie pour la photochimie. L’absorption de lumière en excès peut potentiellement aboutir à une augmentation de la durée de vie du singulet de Chl,  $^1\text{Chl}^*$ , et sa probabilité à former des espèces triplets ( $^3\text{Chl}^*$ ) selon une voie physique de désactivation constitutive (Fig. 12).



**Fig. 12 :** Voies de désactivation de la  $^1\text{Chl}^*$ . En plus des trois voies (1, 2, 3) déjà présentée Fig. 9, il existe une autre voie (4) via laquelle les  $^1\text{Chl}^*$  produisent des  $^3\text{Chl}^*$ . Celles-ci sont capables de réagir avec l' $\text{O}_2$  et de former des espèces oxygéniques toxiques ( $^1\text{O}_2^*$ ) (Müller *et al.*, 2001).

Les  $^3\text{Chl}^*$  ont une durée de vie plus longue et sont incapables d'initier une séparation de charges, et l'énergie qu'elles portent est en général dissipée par les caroténoïdes des antennes (voir plus loin). Ainsi, entre 5 et 25 % des photons absorbés en excès sont dissipés par cette voie "naturelle" qui pourrait être considérée comme une de ces "safety valves" (Fig. 11B) (Niyogi, 2000). Seulement, les  $^3\text{Chl}^*$  peuvent réagir avec l' $\text{O}_2$  photosynthétique et former des singulets d' $\text{O}_2$  ( $^1\text{O}_2^*$ ), une espèce oxygénique hautement toxique (radicaux libres) (Fig. 12). L'appareil photosynthétique produit donc au sein même du plaste deux produits, on pourrait dire déchets, qui peuvent potentiellement courir à sa perte. En effet, les  $^1\text{O}_2^*$  vont réagir avec les protéines, les pigments et les lipides de l'appareil photosynthétique et les détruire (Fig. 11A). Le site d'action le plus connu est la protéine  $\text{D}_1$  du centre réactionnel PS II qui sous forte lumière va voir son taux de destruction devenir supérieur à son taux de réparation. Ceci aboutit à l'inactivation puis la destruction des PS II et donc à la diminution de la capacité photosynthétique encore appelée photoinhibition (pour revue voir Aro *et al.*, 1993).

### I- 3. 1. 2. La dissipation photoprotectrice de l'excès d'énergie.

Tandis que la voie de désactivation des singulets de Chl en triplets est un processus constitutif qui dépend uniquement de la durée de vie moyenne des  $^1\text{Chl}^*$ , il existe chez les plantes et la plupart des algues eucaryotes (vertes, rouges, brunes, diatomées, etc...) un système induit très rapidement qui permet la dissipation thermique de l'excès d'énergie absorbée au niveau des complexes antennes PS II : le quenching non-photochimique ou NPQ. Le NPQ permet donc d'augmenter la voie de désactivation non-radiative (Fig. 12) et diminue le transfert de l'énergie vers les centres réactionnels et donc la probabilité de formation d'espèces toxiques de l' $\text{O}_2$  et potentiellement la photoinhibition (Fig. 11A). Le NPQ peut être divisé en trois composants comme nous l'avons vu précédemment (voir § I- 2. 3. 3.) : le



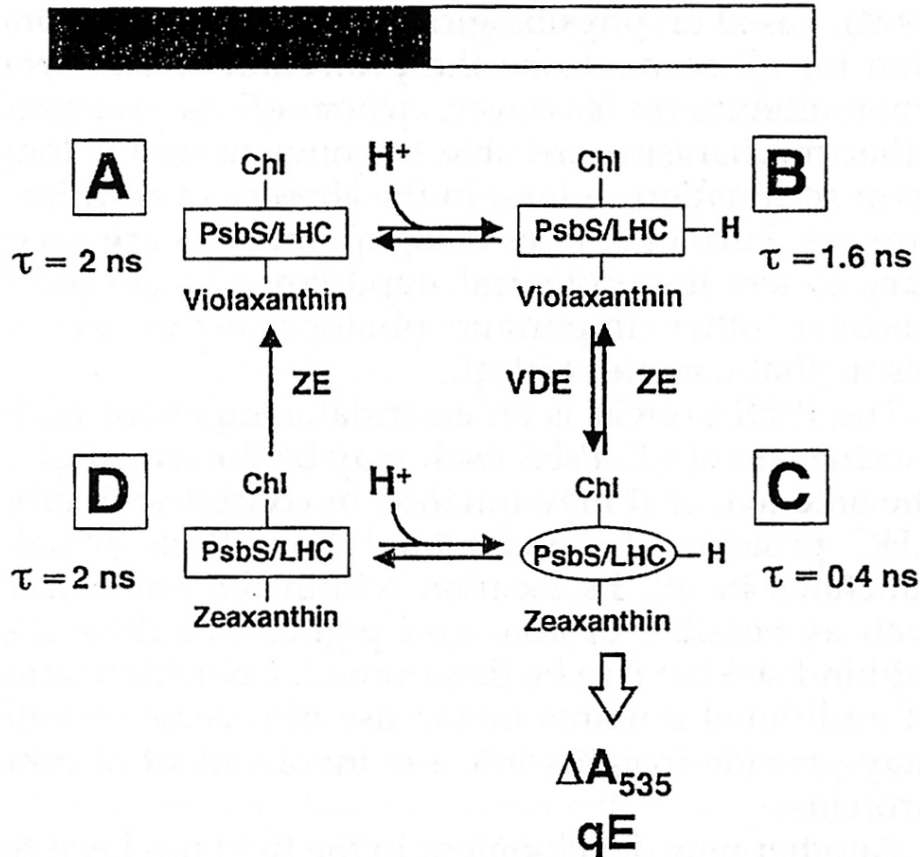
quenching dû à la formation du  $\Delta pH$  (qE), celui dû à la photoinhibition (qI) et celui dû aux transitions d'états (qT). Nous axerons surtout sur qE pour deux raisons : qT n'est pas présent chez les diatomées (voir II- 2. 5.) et il est considéré comme négligeable dans la photoprotection chez la plupart des organismes verts (Müller *et al.*, 2001) (mais pas chez les cyanobactéries) et qI est assez peu connu et mal défini; une part serait due à la photoinhibition mais pourrait également être reconnue comme photoprotectrice (Niyogi, 2000; Müller *et al.*, 2001). qE que nous nommerons NPQ pour plus de facilité, est considéré comme une "back-reaction" du processus de photosynthèse car il est régulé par la formation du gradient de protons transthylakoïdal généré par le transport d'électrons au sein de la membrane du thylakoïde. Il est considéré comme le processus central de la photoprotection (Ort, 2001) et a été très étudié chez les plantes vertes : il existe de nombreuses hypothèses concernant son origine et aucun consensus n'est actuellement établi autour des mécanismes moléculaires de ce phénomène.

La suite se veut donc comme un résumé de la vision actuelle du NPQ chez les plantes supérieures et les algues vertes. Pour des revues récentes reprenant tous les courants de pensées, on consultera Horton *et al.*, 1996; Gilmore, 1997; Bassi et Caffarri, 2000; Muller *et al.*, 2001; Ort, 2001.

### I- 3. 1. 2. a. Le mécanisme du NPQ.

Il est généralement admis que l'implication du  $\Delta pH$  dans le développement du NPQ dépend de deux processus, l'un direct et l'autre indirect sur les complexes antennes, leur conformation spatiale et leur fluorescence (Fig. 13). Le premier est une protonation des sous-unités LHC des complexes antennes, le deuxième est la synthèse de xanthophylles dé-époxydées via l'activation du cycle des xanthophylles. La protonation de sites spécifiques des complexes pigments-protéines et la fixation des xanthophylles dé-époxydées sur ces sites entraîne un changement conformationnel au sein des complexes antennes (visible par un changement d'absorption à 535 nm), qui "convertit" le PS II dans un état "quencher" caractérisé par un temps de vie de  $^1Chl^*$  court et donc un rendement de fluorescence bas (compte tenu de la règle de conservation de l'énergie, la dissipation de l'énergie via la voie photochimique étant inchangée, l'augmentation de la dissipation non-radiative entraîne une diminution de la fluorescence, voir Fig. 9). Chez les plantes supérieures, la protonation des complexes antennes précèdent la dé-époxydation des xanthophylles et un NPQ indépendant de l'accumulation de xanthophylles dé-époxydées peut se développer. Il est ensuite amplifié

par la dé-époxydation des xanthophylles et leur fixation sur les LHC (voir Fig. 13). Ce phénomène est rapidement induit sous une forte illumination (en quelque dizaines secondes) et il est réversible lors du retour à une plus faible intensité ou à l'obscurité (Fig. 13).



**Fig. 13 :** Modèle du mécanisme du NPQ (qE) chez les plantes supérieures.

(A-) En conditions de faible lumière ou obscurité (barre noire), il n'y a pas de NPQ. (B-) Sous forte lumière (barre blanche), des protons se fixent aux protéines LCH entraînant une diminution de la durée de vie de la  $^1\text{Chl}^*$  ( $\tau$ ) de 2 à 1,6 ns (NPQ). (C-) La fixation de la ZX sur les LHC protonés amplifie le NPQ ( $\tau$  passe de 1,6 à 0,4 ns) et provoque un changement d'absorption ( $\Delta A_{535}$ ). La conversion de la VX en ZX (VDE, VX dé-époxydase; ZE, ZX époxydase) est plus lente que la protonation des LHC d'où B- précédant C-. (D-) Quand la forte illumination cesse, les protéines LHC sont rapidement déprotonées tandis que la conversion de la ZX en VX est plus lente : le système revient *en A*-. Ici, PsbS est figuré avec les protéines LHC sachant que sa localisation et son rôle exact dans la formation du NPQ ne sont pas encore éclaircis (Müller *et al.*, 2001).

Récemment, Li *et al.* (2000), ont mis en évidence l'intervention d'un troisième composant : la protéine PsbS (ou CP22). Cette protéine à quatre hélices transmembranaires pourrait lier des Chl et des xanthophylles (Funk *et al.*, 1995a), même si cela n'est pas encore clairement établi (Funk *et al.*, 1995b). Sa localisation semble, elle, plus sûre : cette protéine

serait située non pas au sein du complexe antenne PS II mais à l'interface entre les supercomplexes PS II (voir I- 1. 2. 3. b.) (Nield *et al.*, 2000a; Thildom *et al.*, 2002). Toujours est-il que des mutants PsbS d'*Arabidopsis* sont incapables de développer un NPQ malgré un cycle des xanthophylles actif (la localisation exacte de ces xanthophylles n'a cependant pas été déterminée) (Li *et al.*, 2000; Peterson et Havir, 2001). Cette mutation ne semble pas non plus influencer sur l'organisation des complexes antennes et l'activité photosynthétique (Peterson et Havir, 2001). Ainsi, certains pensent que PsbS est indispensable au NPQ et spécifiquement impliqué dans son apparition (Müller *et al.*, 2001; Ort, 2001). Cependant son rôle exact demeure inconnu, la tendance actuelle étant de lui donner un rôle structural. Sa localisation lui permettrait de moduler les transferts d'énergie à un niveau macromoléculaire, c'est-à-dire entre supercomplexes PS II, facilitant et amplifiant ainsi à une plus grande échelle l'action des changements conformationnels au sein des antennes PS II dus aux protonations et aux xanthophylles dé-époxydées. Récemment, l'ajustement rapide (en quelques minutes) de l'accolement des thylakoïdes a été mis en évidence sous forte lumière (Rozak *et al.*, 2002). Un tel processus pourrait intervenir dans la modulation des transferts d'énergie entre supercomplexes PS II.

### *I- 3. 1. 2. b. Le cycle des xanthophylles.*

Le cycle des xanthophylles résulte en la compétition entre la réaction de dé-époxydation et la réaction inverse d'époxydation de certaines xanthophylles des complexes antennes. Il a lieu en quelques secondes sous une forte illumination. Chez les plantes, algues vertes et algues brunes, ce cycle concerne la dé-époxydation successive de la violaxanthine (VX) en anthéranthine et zéaxanthine (ZX). Chez les diatomées, dinoflagellés et d'autres lignées d'algues, il présente une seule réaction de dé-époxydation de la diadinoxanthine (DD) en diatoxanthine (DT) (Fig. 14). A plus faible lumière et à l'obscurité, la dé-époxydation est nulle et la réaction inverse d'époxydation, dix fois plus lente, a lieu. L'accumulation de xanthophylles dé-époxydées est donc fonction des taux de dé-époxydation et époxydation qui dépendent de l'intensité lumineuse et de l'activité des enzymes impliquées. La régulation et le fonctionnement de ce cycle sont assez bien connus chez les plantes et algues vertes (Fig. 15) (pour revues voir Pfündel et Bilger, 1994; Eskling *et al.*, 1997). La VX dé-époxydase est une enzyme luménale qui s'accroche à la membrane thylakoïdale à bas pH lumenal (c'est-à-dire fort  $\Delta$ pH) ce qui lui permet d'atteindre la VX des complexes antennes intramembranaires. La présence d'un cofacteur, l'ascorbate, est nécessaire à l'activité de la dé-époxydase (pour une

démonstration récente voir Müller-Moulé *et al.*, 2001). L'époxydase est une enzyme du stroma qui fonctionne à pH 8 (elle est en fait continuellement active); l'O<sub>2</sub> et deux cofacteurs : le NADPH et la ferrédoxine réduite qui sont deux "produits" de la photosynthèse lui sont nécessaires (voir I- 1. 1. 2. ).

L'accumulation de la ZX (et de l'anthéroxanthine) est corrélée avec un fort NPQ. Les preuves expérimentales les plus frappantes sont :

- l'utilisation d'un inhibiteur de l'activité dé-époxydase, le dithiothréitol (DTT), qui inhibe l'accumulation de la ZX (et de l'anthéroxanthine) sans modifier le ΔpH; ceci induit une baisse importante du NPQ (pour revue voir Pfündel et Bilger, 1994).

- l'existence de mutants *Arabidopsis* et *Chlamydomonas* ayant une dé-époxydase défectueuse ou inexistante qui entraîne également une diminution du NPQ (pour revue voir Niyogi, 1999). La forme dé-époxydée de la lutéine posséderait également des propriétés l'impliquant dans le NPQ (Müller *et al.*, 2001).

Il subsiste un doute quant à la localisation de ces xanthophylles et donc quelque part celle du NPQ au sein du complexe antenne PS II (pour revue voir Eskling *et al.*, 1997). Gilmore (1997) et Bassi et Caffarri (2000) pensent que la majorité (80 %) de ces xanthophylles est localisée dans les complexes CP24, 26 et 29, la partie mineure de l'antenne périphérique du PS II. Le complexe CP29 a été particulièrement étudié (Yamamoto et Bassi, 1996). Cette vision est contredite par différentes observations : des mutants d'*Arabidopsis* ne présentant ni CP26, ni CP29 développent un NPQ (Andersson *et al.*, 2001) et il semble que les diatomées n'aient ni CP26, ni CP29 alors qu'elles sont capables de développer un NPQ (voir § II- 3. 3. 2. ) (Müller *et al.*, 2001). De plus, d'autres groupes (Horton *et al.*, 1996) pensent, eux, que les xanthophylles sont réparties de façon équivalente dans la partie mineure et majeure (LHCII) de l'antenne périphérique et Jahns (1995) a montré que la dé-époxydation a lieu dans toutes les sous-unités LHC isolées biochimiquement. A l'heure actuelle, aucun consensus n'existe sur cette question. Cependant, l'équipe de Bassi s'est finalement ralliée en partie à cette vision, en particulier en ce qui concerne la stochiométrie de la VX dans le trimère LCHII: une molécule de VX par monomère (Ruban *et al.*, 1999; Caffarri *et al.*, 2001; Ruban *et al.*, 2001).

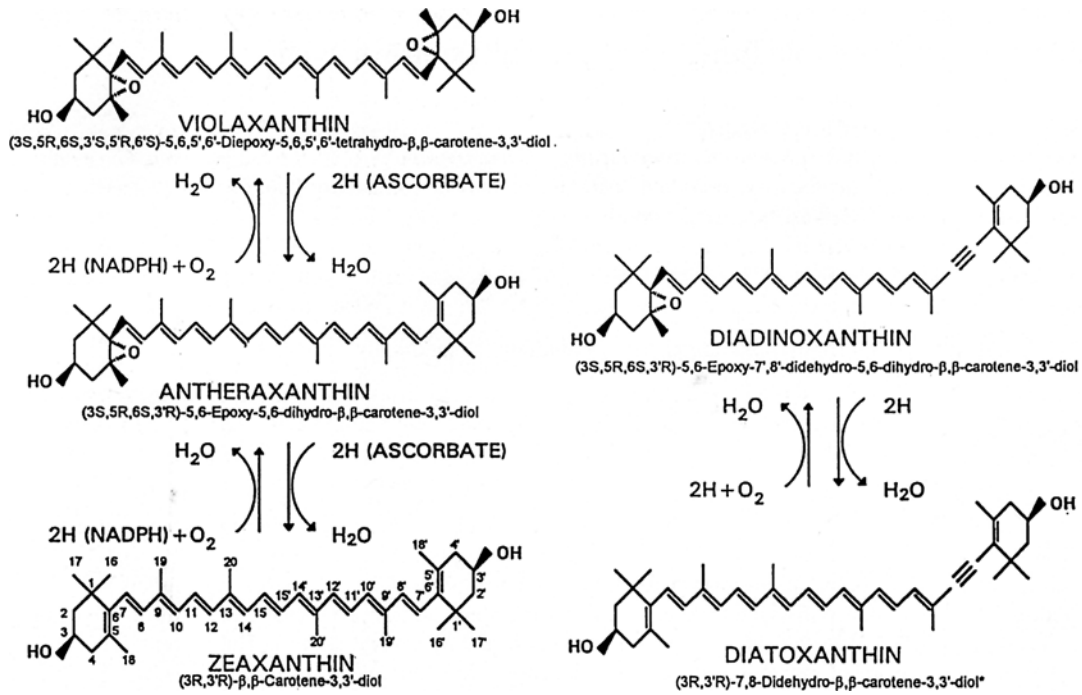


Fig. 14 : Cycles des xanthophylles, cycle de la VX (plantes et algues vertes, algues brunes) et cycle de la DD (entre autres, diatomées et dinoflagellés).

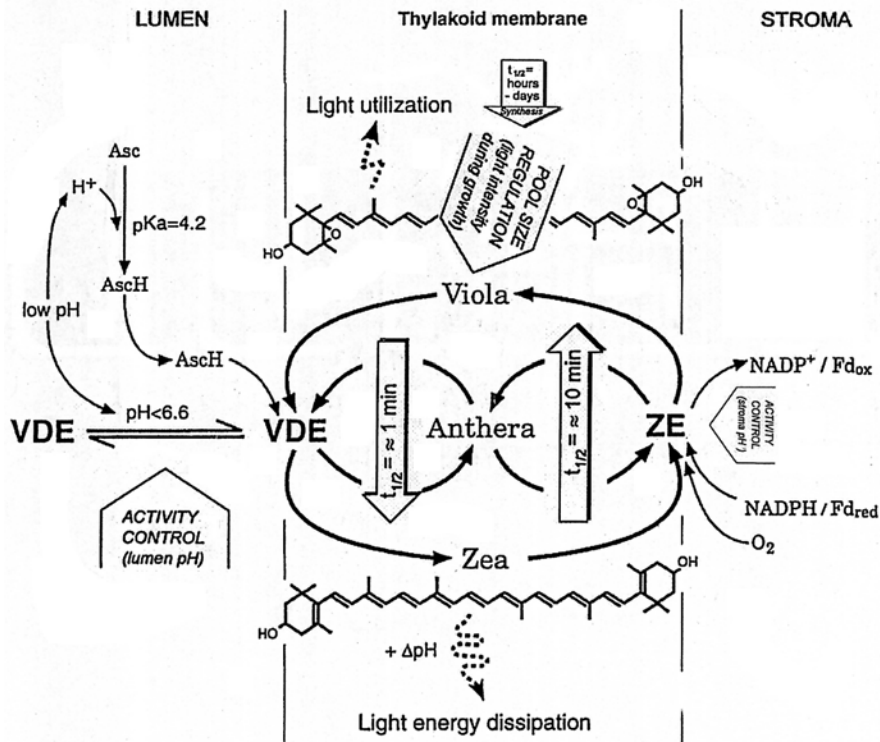
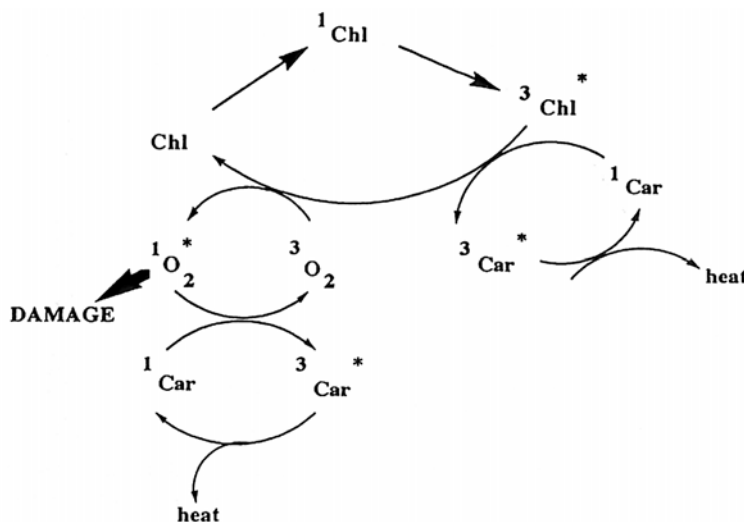


Fig. 15 : Représentation schématique de la localisation du cycle des xanthophylles et de sa régulation chez les plantes supérieures (modifié d'après Pfündel et Bilger, 1994; Eskling *et al.*, 1997). Anthera, anthéroxanthine ; Asc, acorbate ; Fd, ferrédoxine ; VDE, violaxanthine dé-époxydase ; Viola, violaxanthine, ZE ; zéaxanthine époxidase ; Zea, zéaxanthine.

## I- 3. 1. 2. c. Le rôle des xanthophylles dans le NPQ.

En dépit des avancées récentes dans la compréhension du NPQ, le mode d'intervention des xanthophylles dans le NPQ demeure toujours inconnu : les xanthophylles sont-elles impliquées directement ou indirectement dans le NPQ ? Deux visions s'affrontent qui ne sont pas nécessairement exclusives (Ruban *et al.*, 2002). D'un côté les xanthophylles dé-époxydées agiraient indirectement comme des régulateurs allostériques de l'agrégation des complexes antennes (Horton *et al.*, 2000).

Dans ce cas, les xanthophylles dé-époxydées favoriseraient les changements de conformation au sein du complexe antenne PS II et du même coup la désactivation non-radiative des  $^1\text{Chl}^*$ . D'un autre côté, les xanthophylles dé-époxydées pourraient désexciter directement les  $^1\text{Chl}^*$  et les  $^3\text{Chl}^*$  (Fig. 16). En effet, de part les différences de niveaux d'énergie entre les xanthophylles et la Chl *a*, la ZX et la DT pourraient agir comme "quencher" directs de  $^1\text{Chl}^*$  au contraire de la VX et la DD (voir § II- 3. 3. 2. pour une explication plus détaillée) (Frank *et al.*, 1994; Frank *et al.*, 1996). Cependant, ceci n'a été prouvé qu'*in vitro* et des travaux récents ont montré que les niveaux d'énergie ne seraient en réalité peut-être pas suffisamment différents pour expliquer ce processus *in vivo* (Polvika *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2000) même si certains continuent de le penser (Ruban *et al.*, 2002). Ces derniers auteurs expliquent également que les deux rôles pourraient exister *in vivo*, l'agrégation des complexes régulée par les xanthophylles dé-époxydées favorisant les interactions directes xanthophylles- $^1\text{Chl}^*$  et la mise en route du quenching direct entre ces pigments. Enfin, il semblerait que les différences de structure moléculaires entre xanthophylles pourraient également expliquer le rôle des formes dé-époxydées dans le NPQ (pour revues voir Gilmore, 1997; Bassi et Caffarri, 2000; Nayak *et al.*, 2001).



**Fig. 16 :**  
Représentation schématique du rôle photoprotecteur des caroténoïdes (Car) et en particulier des xanthophylles dé-époxydées ZX et DT dans la désactivation des  $^3\text{Chl}^*$  et des  $^1\text{O}_2$  (Young, 1993).

I- 3. 1. 2. d. *Le NPQ, les xanthophylles et la photoprotection.*

L'importance des xanthophylles et du NPQ dans la photoprotection a été largement étudiée chez les plantes supérieures et algues vertes unicellulaires (pour revues voir Demmig-Adams et Adams, 1996; Niyogi, 1999), en particulier les différents mutants d'*Arabidopsis* et *Chlamydomonas* défailants en NPQ et/ou cycle des xanthophylles (Niyogi, 1999). Le rôle central reste la désactivation des  $^1\text{Chl}^*$  et la diminution du transfert d'excitation vers le centre. Il prévient aussi la sur-réduction de l'ensemble de la chaîne photosynthétique et l'acidification trop importante du lumen qui est connue pour sensibiliser le PS II à la photoinhibition (Kramer *et al.*, 1999; Melis, 1999).

Concernant les xanthophylles, plusieurs travaux suggèrent que leur rôle dans la photoprotection ne se réduit pas aux complexes antennes et à l'induction du NPQ (Havaux et Niyogi, 1999; Havaux *et al.*, 2000). En effet, une partie des xanthophylles (VX et DD) semble localisée dans la membrane thylakoïdale. Les formes dé-époxydées sont de puissants anti-oxydants capables de quencher directement les espèces toxiques de l' $\text{O}_2$  (Fig. 16) et ainsi de prévenir la peroxydation des lipides. De plus, la ZX pourrait également avoir un rôle structural important au sein de la membrane thylakoïdale. Elle diminue la fluidité de la membrane, ce qui pourrait réduire la pénétration des radicaux libres dans les thylakoïdes et/ou leur libération dans le stroma (Tardy et Havaux, 1997).

Pour finir, bien que certains mutants déficients en NPQ ou cycle des xanthophylles sont clairement plus sensibles aux stress lumineux, ils arrivent quand même à survivre ce qui suggèrent l'implication d'autres processus capables de compenser en partie l'absence de NPQ et/ou des xanthophylles dé-époxydées (Havaux *et al.*, 2000; Niyogi *et al.*, 2001). Ces mécanismes sont rapidement décrits dans le paragraphe suivant.

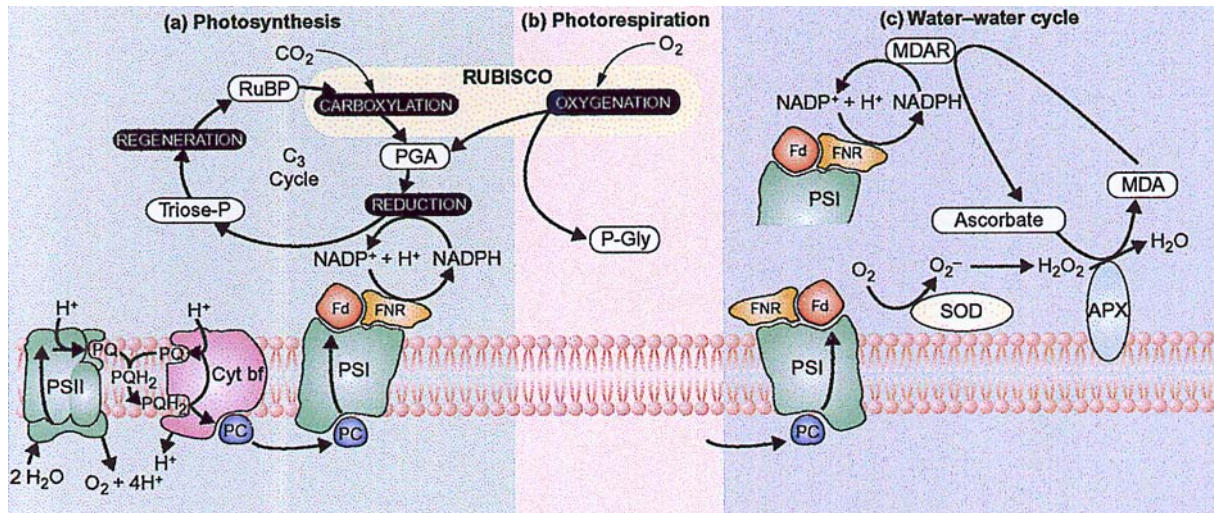
I- 3. 1. 3. Les autres mécanismes photoprotecteurs.

L'ensemble des processus décrits dans cette section sont distincts de la dissipation non-radiative photoprotectrice de l'énergie en excès mais peuvent contribuer de manière aussi efficace à la photoprotection de la cellule. Certains sont illustrés dans la Fig. 11A/B. Il s'agit de tous les processus qui fonctionnent comme des voies alternatives pour utiliser et/ou stocker les électrons produits en excès. Sont également inclus les mécanismes qui prennent en charge les molécules dont la production résulte de l'excès d'énergie et qui sont susceptibles

d'endommager l'appareil photosynthétique et ceux qui interviennent dans la réparation rapide des dommages engendrés fréquemment malgré les différentes "lignes de défense".

Un point crucial de la chaîne photosynthétique est le côté réducteur du PS I au niveau duquel l'énergie est transférée vers les grandes voies assimilatrices aboutissant à la réduction du carbone, de l'azote du soufre, etc... (Fig. 17). Si la disponibilité des accepteurs d'électrons situés en aval de la chaîne photosynthétique (comme le CO<sub>2</sub> atmosphérique ou les bicarbonates dissous dans l'eau) est limitée (Fig. 17a), c'est toute la chaîne qui risque d'être surréduite et des conditions photoinhibitrices peuvent être créées. Pour éviter cette surréduction, il existe donc des voies alternatives qui fonctionnent comme des "puits" à électrons. Les deux voies les plus caractérisées sont la photorespiration et la réduction de l'O<sub>2</sub> par le PS I (ou "water-water cycle") (pour revues récentes voir Asada, 1999; Niyogi, 1999; Foyer et Noctor, 2000; Ort et Baker, 2002). Pour la **photorespiration**, l'O<sub>2</sub> est utilisé par la Rubisco comme substrat final à la place du CO<sub>2</sub> quand celui-ci est limitant (Fig. 17b). Le métabolite issu de cette réaction (le phosphoglycolate, P-Gly) est stocké dans les péroxysomes. Il est ensuite métabolisé au niveau de la chaîne respiratoire des mitochondries. Pour ce qui est du "**water-water cycle**", l'O<sub>2</sub> est directement réduit par les électrons provenant du PS I (Fig. 17c). Le produit ainsi formé, l'O<sub>2</sub><sup>-</sup>, qui est toxique pour la cellule, est pris en charge par un cycle (très bien décrit par Asada, 1999) dont le produit final est l'eau et qui au passage permet la production de NADPH et la régénération de l'ascorbate utilisé comme co-facteur dans le cycle des xanthophylles. La **chlororespiration** est une autre voie O<sub>2</sub>-dépendante pour les électrons. Cette voie permet le transfert d'électrons du NADPH à l'O<sub>2</sub> via le pool de PQ à l'obscurité : c'est la chaîne respiratoire des plastes. Il existe actuellement de nombreux travaux qui s'attachent à caractériser les différents composants de cette chaîne (pour revues voir Niyogi, 1999; Ort et Baker, 2002). L'élément central de cette chaîne est une plastoquinone oxydase qui pourrait puiser des électrons du pool de PQ. Cette voie a deux intérêts. Le premier est d'utiliser à l'obscurité l'énergie en excès stockée à la lumière et ainsi de créer un ΔpH suffisant pour maintenir l'ATP synthase active et produire à l'obscurité des molécules énergétiques permettant de maintenir un métabolisme de base. L'avantage est également évident dans un environnement lumineux variables où lors de brusques retour à la lumière, l'ATP synthase entre immédiatement en action évitant ainsi une trop forte acidification du lumen connue pour sensibiliser le PS II à la photoinhibition (Jakob *et al.*, 1999).



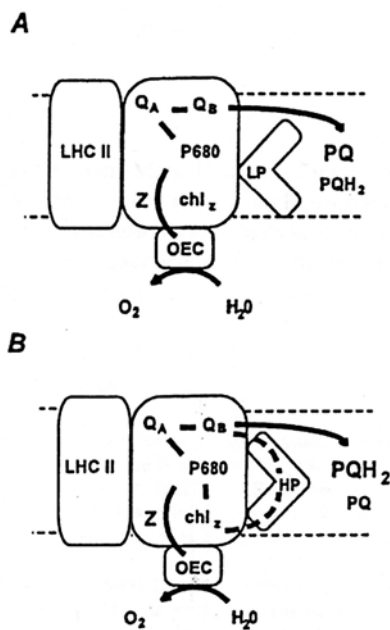


**Fig. 17 :** Représentation schématique des voies alternatives pour l'utilisation des électrons qui pourraient avoir un rôle dans la photoprotection. (a) La réduction photosynthétique du carbone est figurée par un cycle à trois étapes : Carboxylation du  $\text{CO}_2$  en phosphoglycérate (PGA) par la rubisco; Réduction du PGA en Triose-P par utilisation du NADPH et de l'ATP; Régénération du ribulose 1,5 biphosphate (RuBP) grâce à l'ATP. (b) pour la chaîne photorespiratoire, seule l'étape initiale de production du phosphoglycolate (P-Gly) provenant de l'oxygénation du RuBP par la rubisco est montrée. Ensuite, une phosphatase produit à partir du P-Gly du glycolate qui est transporté hors du plaste dans les péroxisomes. (c) Le "water-water cycle".  $\text{O}_2^-$  est produit quand  $\text{O}_2$  est réduit par la ferrédoxine (Fd). Il est ensuite pris en charge par la superoxyde dismutase (SOD) qui produit du  $\text{H}_2\text{O}_2$  qui est réduit par l'ascorbate pour former de l'eau au cours d'une réaction catalysée par l'ascorbate peroxydase (APX). Le monodéhydroascorbate produit (MDA) au cours de cette réaction est impliqué dans un autre "puits" à électrons : il est régénéré en ascorbate par les électrons provenant de la ferrédoxine au cours d'une réaction catalysée par la monodéhydroascorbate réductase (MDAR) (Ort, 2002). Cyt, cytochrome; FNR, ferrédoxine-NADP réductase; PC, plastocyanine; PQ, plastoquinone.

Le deuxième intérêt est un couplage avec la voie de biosynthèse des xanthophylles découvert très récemment (Bennoun, 2001; Carol et Kuntz, 2001). Ces aspects sont détaillés dans la partie introductive concernant les diatomées (voir II- 3. 4. 2. c. ).

En plus de ces trois voies alternatives utilisant le transport d'électrons  $\text{O}_2$ -dépendant, il existe au sein même des PS I et II des voies de **transport cyclique des électrons**. Le transport cyclique des électrons autour du PS I est bien connu et constitue "la phosphorylation cyclique" qui fonctionne en parallèle de "la phosphorylation linéaire" (décrite § I- 1. 1. 2. ) dans certaines conditions d'illumination (voir Jupin et Lamant, 1997). Cette voie métabolique permet d'ajuster la productions des molécules d'ATP et de NADPH. Le transport cyclique des électrons au sein du PS II est moins connu mais peut être quant à lui impliqué dans la photoprotection (pour revue voir Niyogi, 1999). Ce cycle fait intervenir le cytochrome  $b_{559}$ , un des composants du PS II, qui a été montré comme participant à la diversion de l'énergie lumineuse en excès (Canaani et Havaux, 1990; Prasil *et al.*, 1996). Très brièvement, le

cytochrome  $b_{559}$  permettrait la déviation des électrons en excès de  $Q_B$  vers la Chl-centre P680 (Fig. 18) (voir § I- 1. 2. 2. a. ) évitant ainsi la sur-réduction des quinones et plastoquinones qui peut être une des origines de la photoinhibition. Enfin, il existe différentes molécules (comme les xanthophylles ou l'ascorbate, le glutathion et les tocophérols) et enzymes antioxydantes qui vont en parallèle des autres mécanismes éliminer les espèces toxiques de l' $O_2$  ( $^1O_2^*$ ,  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) dont la production est quasi inévitable (pour revues voir Asada, 1999; Niyogi, 1999; Mallick et Mohn, 2000). Malgré toutes ces lignes de défense, l'endommagement de la protéine  $D_1$  des PS II et des lipides membranaires est courant et il existe donc des systèmes très efficaces de réparations rapides de ces dommages (Baier et Dietz, 1999; Melis, 1999; Niyogi, 1999) et également des voies de signalisation systématiques permettant la photoacclimatation de l'organisme lorsque les conditions lumineuses défavorables perdurent. Ce sont ces mécanismes qui sont rapidement décrits dans le paragraphe suivant.



**Fig. 18 :** Représentation schématique du transport cyclique des électrons au sein du PS II. (A) le côté accepteur du PS II est oxydé, (B) il est réduit. Quand le pool de plastoquinones (PQ) est oxydé (à l'obscurité et en faible lumière), le transport linéaire des électrons via les quinones est couplé avec l'émission d' $O_2$ . Le Cyt  $b_{559}$  présente un "faible potentiel" (LP). Quand PQ est très réduit (sous forte lumière), le Cyt  $b_{559}$  est converti en une forme à "fort potentiel" (HP) et le transport cyclique des électrons s'opère alors en parallèle du transport linéaire (modifié d'après Prasil *et al.*, 1996).

### I- 3. 2. Adaptation à long terme.

Les organismes photosynthétiques sont aussi capables d'adapter leur appareil photosynthétique aux conditions de lumière qui prédominent dans leur environnement. C'est ainsi que pour les plantes terrestres, on parle de plantes d'ombre, comme les plantes herbacées qui poussent dans les forêts tropicales et qui ne reçoivent que 0,5 % de la lumière disponible au sommet de la canopée, ou de plantes de soleil comme les plantes poussant dans les régions désertiques. Même si au contraire des algues phytoplanctoniques, les plantes sont immobiles,

elles sont également soumises à des fluctuations de la lumière, dues aux nuages et au vent, qui peuvent être relativement rapides et importantes (pour revues voir Percy, 1990; Yin et Johnson, 2000). Les organismes phytoplanctoniques sont eux soumis à des variations en intensité et en qualité spectrale de la lumière extrêmement importantes et variables en termes d'amplitude et de durée de part les propriétés optiques de l'eau et également de part le fait qu'ils sont le plus souvent passivement transportés par les mouvements de l'eau. La capacité des organismes à s'adapter à ces changements de lumière est génétiquement déterminée : tous les organismes peuvent pousser à plus ou moins forte lumière mais seulement dans une certaine gamme de variations qui va être dépendante de l'espèce.

Les réponses aux variations de la lumière à long terme sont de deux ordres : physiologiques et moléculaires (pour revue voir Larkum et Howe, 1997). Nous ne rentrerons pas ici dans les détails mais rappelleront simplement les grandes lignes pour deux raisons :

- ces deux aspects sont détaillés dans la deuxième partie introductive concernant le groupe d'organismes étudié ici soit les diatomées planctoniques,
- la régulation de l'expression génétique n'a pas été abordée au cours de ce travail.

Au niveau physiologique les principales réponses vont être une modification du nombre de plastes, de thylakoïdes, de la stochiométrie des PS I et PS II, de la taille d'antenne PS II, de la quantité et de l'activité des enzymes fixatrices de carbone (comme la Rubisco), etc... (pour une revue voir Melis, 1991; Anderson, 1995) mais aussi une modification de tous les composants impliqués dans les processus photoprotecteurs listés précédemment (voir la récente revue de Mullineaux et Karpinski, 2002). Ces changements physiologiques à long terme sont induits par la modification du génotype de l'organisme en jouant sur l'expression des gènes impliqués, l'induction ayant lieu grâce à la perception fine du signal lumineux. Ainsi l'expression des gènes photosynthétiques est régulée de façon à produire des quantités appropriées de polypeptides, au moment adéquat, de manière à permettre l'assemblage d'un appareil photosynthétique présentant une efficacité de capture de l'énergie lumineuse et de son utilisation optimale. L'expression des gènes peut être régulée à différents niveaux au cours des étapes nécessaires à l'accumulation des protéines matures, incluant l'initiation de la transcription, la stabilité des ARNm, l'initiation de la traduction et la dégradation des protéines synthétisées. De plus, la biogénèse de l'appareil photosynthétique des eucaryotes requiert l'interaction coopérative de deux ensembles d'informations génétiques localisés dans deux compartiments cellulaires distincts : le noyau et le plaste. La synthèse des protéines constituant les centres réactionnels ainsi que tous les types d'antennes est régulée par la

lumière : son intensité, ses variations (cycle jour/nuit par exemple, voir Piechulla, 1999), sa qualité spectrale. Pour les protéines LHC qui nous intéressent plus particulièrement, la plupart sont codées au niveau du génome nucléaire et sont régulées à la fois au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (Grossman *et al.*, 1995; Green et Durnford, 1996). Un exemple intéressant concernant la régulation de certains gènes *lhc* d'algues phytoplanctoniques à Chl *a/b* est leur dépendance vis-à-vis de l'état d'oxydation de certains transporteurs d'électrons de l'appareil photosynthétique. Cet état d'oxydation étant lui même dépendant de la quantité de lumière et de l'efficacité de l'appareil photosynthétique à l'utiliser, ce signal permettrait un feed-back régulateur direct sur l'expression des gènes *Lhc* et autres codant pour des composants de l'appareil photosynthétique (pour revues récentes voir Pfannschmidt *et al.*, 2001; Mullineaux et Karpinski, 2002).

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE I

## *II- Les diatomées planctoniques*

---

## **II- PRESENTATION DU MODELE D'ETUDE : LES DIATOMEES PLANCTONIQUES.**

La majeure partie de la production primaire océanique est assurée par le phylum des Hétérokontophytes (autrefois appelé Chromophytes) qui regroupe au moins neuf classes d'algues parmi lesquels deux grands groupes :

-les Bacillariophycées (aussi nommées Diatomophycées) ou diatomées qui sont les principaux producteurs primaires océaniques avec 100 000 espèces.

-les Phaeophycées (aussi nommées Fucophycées) ou algues brunes qui sont les principaux producteurs primaires côtiers avec 1500-2000 espèces recensées.

Ces algues sont caractérisées par la présence de Chl *a*, Chl *c* et de la fucoxanthine qui leur donne une coloration brune ou jaune, et de zoïdes (cellules intervenant dans le cycle de reproduction) présentant deux flagelles hétéromorphes. Elles ont également d'autres caractères communs (pour détails voir van den Hoek, 1995) à la fois cytologiques (ultrastructure des plastes) et biochimiques (absence d'amidon intraplastidial mais présence de réserves cytoplasmiques et vacuolaires de natures diverses : lipides, polysaccharides du type chrysolaminarine...). Les niveaux d'organisation de ces organismes sont extrêmement variés pouvant aller de la diatomée unicellulaire de quelques  $\mu\text{m}$  jusqu'aux thalles complexes avec une organisation pseudoparenchymateuse et des structures très spécialisées de certaines algues brunes pouvant atteindre plusieurs mètres voire plusieurs dizaines de mètres de long (ordre des Laminariales).

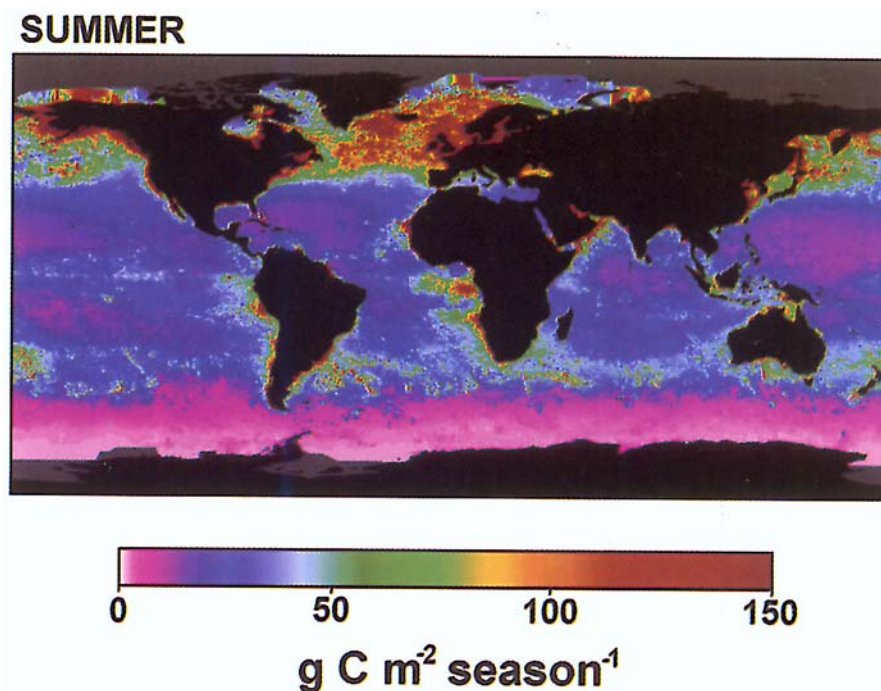
Le chapitre suivant vise à présenter les connaissances actuelles sur la biologie, l'écologie, la diversité et l'utilisation des diatomées avec une attention particulière à l'aspect qui nous concerne ici : l'état de l'art sur les complexes pigments-protéines des diatomées et leur adaptation aux variations lumineuses. Certains aspects (essentiellement dans le § II- 2.) feront référence à des travaux réalisés sur les algues brunes mais qui peuvent être élargis aux diatomées.

### **II- 1. GENERALITES.**

#### **II- 1. 1. La production primaire.**

Le phytoplancton océanique est constitué pour une grande partie de diatomées, et dans les régions tempérées et froides riches en nutriments (particulièrement les "up-wellings" des

côtes Ouest de l'Afrique, de l'Amérique du Sud, et de la Californie), les diatomées sont largement responsables de la forte production primaire locale (Fig. 19). Dans ces régions, la fixation de carbone annuelle atteint 200 à 400 g.m<sup>-2</sup> soit des valeurs similaires atteintes également localement par les grandes algues brunes (Laminariales) (van den Hoek *et al.*, 1995).



**Fig. 19 : Cartographie en fausses couleurs de la productivité primaire océanique nette durant l'été (Falkowski et Raven, 1997).**

Même si dans de grandes régions océaniques, dites oligotrophes, les diatomées sont moins productives (c'est le cas du Pacifique équatorial où la croissance des diatomées est limitée par la disponibilité en fer (Martin *et al.*, 1994; Coale *et al.*, 1996), l'étendue des océans sur terre (70% de la surface du globe) laisse entrevoir le rôle prépondérant des diatomées dans la production de matière organique via la fixation photosynthétique du carbone et dans le cycle du carbone sur terre (Thomas *et al.*, 1978; Falkowski, 1994) (Fig. 19). Ainsi, on estime que la production primaire nette globale est de 105 Pg (105 10<sup>15</sup>) de carbone par an dont 46 % est océanique et 54 % terrestre (Field *et al.*, 1998). Concernant la composante océanique, environ un quart de la production est située dans les régions oligotrophes où les diatomées sont responsables de 25 à 35 % de la production primaire (Nelson *et al.*, 1995; Tréguer *et al.*, 1995). Mais dans les régions eutrophes, jusqu'à 75 % de

la production primaire est due aux diatomées (Nelson *et al.*, 1995; Tréguer *et al.*, 1995). Considérant ces données, Mann (1999), estime (le point flou demeurant la part occupée par les diatomées dans les milieux mésotrophes) que les diatomées pourraient raisonnablement produire 20 Pg de carbone par an, soit plus que toutes les forêts tropicales (17,8 Pg) ou que les savanes (16,8 Pg) qui sont les deux écosystèmes terrestres les plus productifs (Field *et al.*, 1998). Ceci représente 40 à 45 % de la production océanique et 20 à 25 % de la production nette globale (Nelson *et al.*, 1995; Tréguer *et al.*, 1995; Mann, 1999). Cette réestimation récente recoupe l'évaluation plus ancienne de 15 à 20 % faites par Werner (1977).

Ces données illustrent l'importance quantitative des diatomées dans le bon fonctionnement de "l'écosystème Terre" et particulièrement dans le contexte actuel d'augmentation du niveau atmosphérique du CO<sub>2</sub> (Smetacek, 1999). Leur rôle est d'autant plus important si l'on considère que pratiquement toute forme de vie marine est dépendante directement ou indirectement de la production primaire. Ceci est spécialement vrai dans les régions d'"up-welling" citées plus avant où les diatomées sont les principaux organismes producteurs de matériel organique "frais" grâce à la remontée de nutriments des profondeurs en opposition aux nutriments recyclés par la boucle microbienne (Falkowski *et al.*, 1998). Ainsi dans ces régions, elles jouent un rôle prépondérant dans l'abondance du poisson et le maintien des pêcheries.

Dans les écosystèmes dulçaquicoles, les diatomées participent également à une part importante de la production primaire. Ici, comme dans les régions océaniques tempérées, les diatomées abondent quand les eaux sont turbulentes et riches en nutriments (Werner, 1977; Harris, 1986; Fogg, 1991; Reynolds, 2002). Elles forment des proliférations (ou blooms) au début du printemps et de l'automne lorsque les nutriments (nitrates, phosphates et silicates) sont remis en suspension par les coups de vent de fin d'hiver ou de début d'automne (voir également la partie en Annexe).

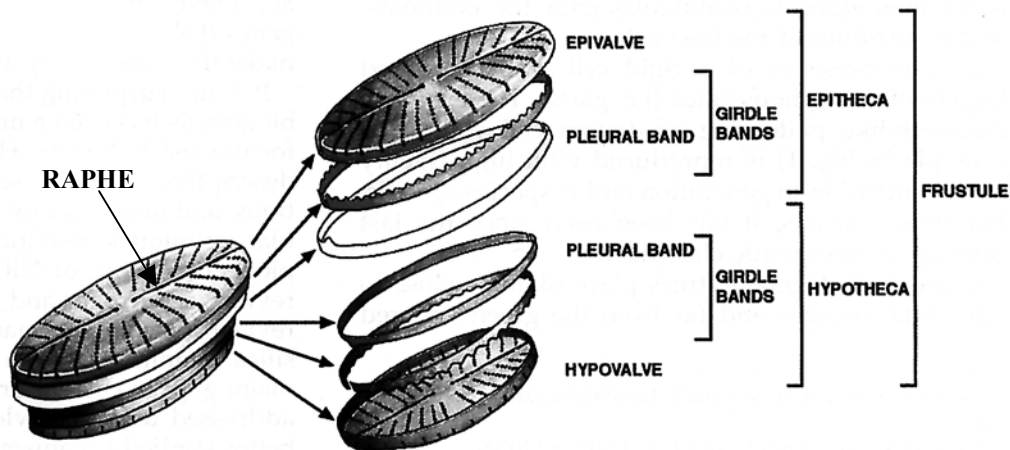
## **II- 1. 2. Le frustule ou "la vie dans un sarcophage de verre".**

En plus de leur rôle dans le cycle du carbone sur terre, mais aussi dans les flux d'azote océanique par sédimentation (Villareal *et al.*, 1999), les diatomées sont la principale source de silice biogénique dans les océans loin devant les silicoflagellés et les radiolaires (Nelson *et al.*, 1995; Tréguer *et al.*, 1995). Après l'O<sub>2</sub>, la silice est le second élément le plus abondant de la croûte terrestre, représentant 27 % de la lithosphère (Rochow, 1987). Récemment, il a été



suggéré que le cycle biogéochimique océanique de la silice aurait modifié la composition spécifique du phytoplancton qui aurait pu elle-même influencer sur les taux de CO<sub>2</sub> atmosphérique (Harrison, 2000; Tréguer et Pondaven, 2000).

La “marque de fabrique” des diatomées est en effet leur paroi cellulaire, ou frustule, principalement constitué de silice amorphe [(SiO<sub>2</sub>)<sub>n</sub>(H<sub>2</sub>O)] qui peut atteindre jusqu’à 60 % du poids sec de la cellule (Lund, 1965). Ce frustule est formé de deux valves, l’épithèque qui recouvre l’hypothèque comme dans une boîte de Petri, les deux étant reliées par des “ceintures” (ou “girdle bands”) (Fig. 20) (pour revue sur la morphogenèse de la frustule voir Round *et al.*, 1990; Gordon et Drum, 1994; van den Hoek *et al.*, 1995; de Vrind-de Jong et de Vrind, 1997; Martin-Jézéquel *et al.*, 2000; Zurzolo et Bowler, 2001 Falciatore et Bowler, 2002).

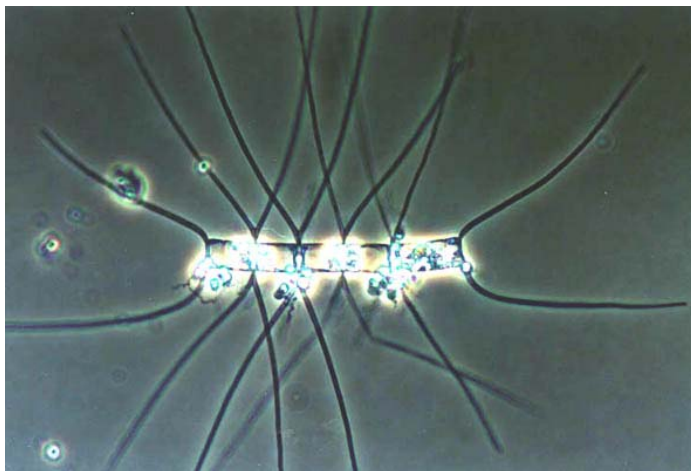


**Fig. 20 :** Représentation schématique des différents composants du frustule d’une diatomée pennée (modifié d’après Zurzolo et Bowler, 2001).

Le frustule peut être extrêmement différencié, la forme, la taille, les pores et les ornements étant le plus souvent fonction du genre ou de l’espèce (Gordon et Drum, 1994; Mann, 1999). La première des différenciations morphologiques permet de distinguer entre les diatomées pennées (essentiellement benthiques, voir § II- 1. 3. ) qui ont une forme allongée suivant un plan de symétrie bilatérale (Fig. 20) et les diatomées centriques qui ont une forme arrondie selon un plan de symétrie radiale. Le frustule des diatomées pennées possèdent une ou deux fente(s) disposée(s) parallèlement au plan de symétrie : le raphé (Fig. 20). Récemment, plusieurs gènes codant pour des protéines impliquées dans la formation des valves du frustule ont été découverts (pour revues voir Kröger et Sumper,

1998; Falciatore et Bowler, 2002). De plus, une famille de gènes codant pour des transporteurs de la silice a été identifiée chez *Cylindrotheca fusiformis* (Hildebrand *et al.*, 1998). Récemment de nouvelles données ont été apportées par la réalisation d'ESTs chez *P. tricorutum* (Scala *et al.*, 2002).

La fonction exacte du frustule et de ses expansions plus ou moins rigides (épines, appendices et ornements divers, voir Fig. 21) reste aujourd'hui sujette à discussion (pour revue voir Sournia, 1982a). Quatre théories existent à l'heure actuelle. Selon la première, les ornements du frustule permettraient de ralentir la sédimentation des cellules en augmentant le rapport surface/volume. Ainsi, lorsque les ornements de chitine de 70 µm de long de *Thalassiosira fluviatis* sont éliminés par digestion enzymatique, le temps de sédimentation est divisé par 2 (Walsby et Reynolds, 1980). Selon la deuxième hypothèse, ces ornements permettraient à la cellule d'utiliser au mieux les microturbulences de l'eau en tournant sur elle-même de façon à augmenter les échanges d'eau à la surface de la cellule et donc une meilleure absorption des nutriments (Walsby, 1988; Fogg, 1991). Les ornements ont également été proposés comme permettant aux cellules de se rassembler en amas par entremêlement, le tout étant accentué et alourdi par la sécrétion abondante de mucilage. Ces amas (ou "mats") sont le plus souvent observés en fin de bloom lorsque les nutriments deviennent limitants. Ils sédimentent ainsi rapidement afin de gagner des zones profondes plus riches en nutriments (le plus souvent à la limite de la thermocline) d'où la population "refuge" pourra recoloniser le milieu par mélange vertical lorsque les conditions seront redevenues favorables à un nouveau bloom (Smetacek, 1985). Une dernière fonction des ornements du frustule serait de réduire le broutage par le zooplancton (Fogg et Thake, 1987; Smetacek, 1999; Smetacek, 2001).



**Fig. 21 : Exemple de diatomées possédant des ornements (*Chaetoceros* sp.).**

Les diatomées planctoniques n'ayant pas de moyens de locomotion, leur frustule les place face au problème de la sédimentation : comment réussissent-elles malgré le "poids" de la silice à se maintenir dans la partie supérieure de la zone euphotique où la lumière est la plus disponible ? La première partie de la réponse est externe et concerne le brassage de l'eau qui réduit la sédimentation. Mais, les diatomées ont également développé des adaptations particulières leur permettant de réduire leur sédimentation (Sournia, 1982a). La première est la petite taille qui peut être considérée comme un avantage vis-à-vis de la sédimentation (pour revue voir Fogg, 1991). Une autre adaptation concerne la forme des diatomées. Les formes cylindriques unicellulaires (*Nitzschia*) ou en chaînettes (*Aulacoseira*) sont considérées comme une adaptation à la vie planctonique. De même, comme détaillé précédemment, les diverses ornementsations du frustule peuvent ralentir la sédimentation. Par ailleurs, plusieurs espèces comme *Dytilum brightwellii*, sont capables de réguler leur densité en excréant des ions lourds ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{+}$ ) contre des ions plus légers ( $\text{Na}^{+}$  et  $\text{K}^{+}$ ) au sein de leurs vacuoles (Yentsch, 1962; Smayda et Boleyn, 1965; Round, 1981; Fischer et Harrison, 1996; Villareal et Lipschultz, 1995). Ces changements de flottaison pourraient faciliter les mouvements verticaux et la capture de nutriments (Anderson et Sweeney, 1978). Cette méthode est par contre totalement inefficace en milieu dulçaquicole où la densité moyenne est moindre (Hutchinson, 1967).

A l'inverse, pour les diatomées épipéliques et endopéliques vivant sur ou dans les sédiments, le sable ou sur les rochers (voir § suivant sur les formes de vie), le frustule et plus particulièrement le raphé leur apporte la mobilité. Il leur permet de "ramper" dans ou sur le substrat parfois en fonction du cycle des marées ou des rythmes endogènes très marqués (van den Hoek *et al.*, 1995). Les explications les plus récentes font état de l'excrétion de mucopolysaccharides et de la présence de microfilaments au niveau du raphé et d'autres orifices du frustule qui faciliterait le "glissement actif" des cellules sur ou dans le substrat (pour revue voir Round *et al.*, 1990).

### II- 1. 3. Diversité, formes et cycle de vie.

Il existe 250 genres et environ 100 000 espèces de diatomées vivantes (Round et Crawford, 1990; Norton *et al.*, 1996). Selon Mann (1999), ce chiffre reste largement sous-estimé. Les diatomées benthiques sont plus diversifiées que les planctoniques. Le plus ancien fossile de diatomée date du début du Crétacé (-120 millions d'années), il concerne une espèce marine appartenant au groupe des diatomées centriques (Tappan, 1980; Meyen, 1987;

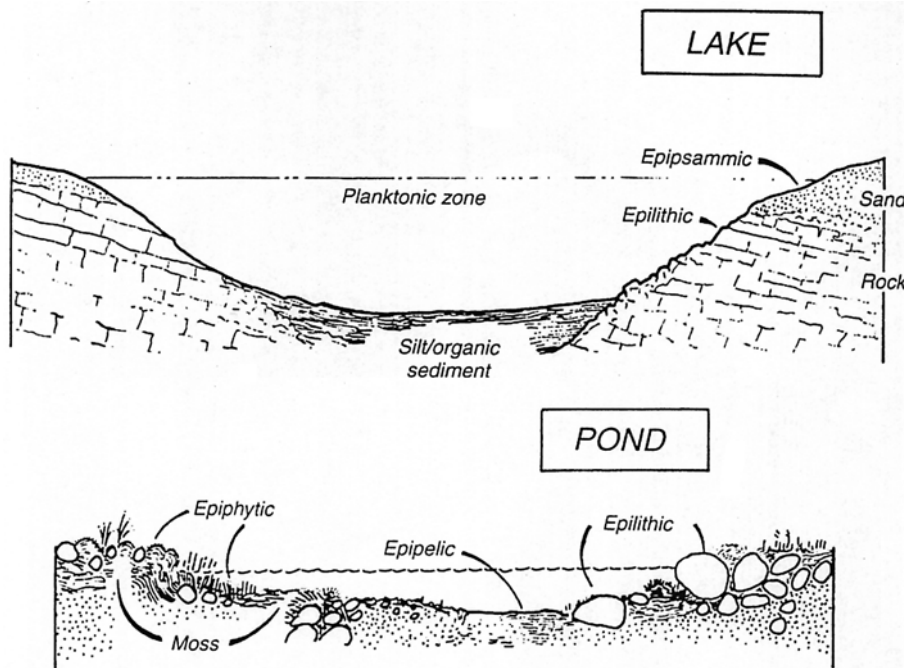
Kooistra et Medlin, 1996; Medlin *et al.*, 1997). Le premier représentant du groupe des pennées sont apparus à la fin du Crétacé (-70 millions d'années) mais les diatomées ne sont devenues vraiment prépondérantes qu'au début du Miocène (-24 millions d'années). Le plus ancien fossile de diatomée dulçaquicole remonte au début du tertiaire (-60 millions d'années) et appartient au groupe des pennées.

Les diatomées sont essentiellement unicellulaires (pour des exemples voir Chapitre II-Matériels et Méthodes, Fig. 36) bien que certaines espèces puissent former des colonies la plupart du temps en chaînettes par liaison de structures silicieuses, mucilagineuses ou polysaccharidiques (pour une description détaillée voir Round et Crawford, 1990), la plus impressionnante étant *Licmophora* sp. (Fig. 22).



**Fig. 22 :** Colonie de *Licmophora* sp. assemblées par des structures mucilagineuses.

Leur taille s'étend sur trois ordres de grandeur de quelques  $\mu\text{m}$  pour les plus petites jusqu'à 5 mm pour les diatomées "géantes" *Ethmodiscus rex* et *Thalassiosithrix* sp. Les diatomées les plus petites (5-50  $\mu\text{m}$ ) sont celles rencontrées surtout en début de printemps et automne, tandis que l'abondance des plus grandes (2-5 mm) montrent une variabilité saisonnière moindre. Elles vivent sous toutes les latitudes dans les eaux marines, saumâtres et dulçaquicoles, exceptées les eaux trop chaudes ou hypersalines. On les rencontre aussi dans divers habitats aériens comme le sol ou les feuilles des arbres où elles cohabitent avec des cyanobactéries (Werner, 1977). Dans le milieu aquatique, elles sont soit planctoniques (libres) soit benthiques (pour revue voir Lee, 1999; Underwood et Kromkamp, 1999; Paterson et Hagerthey, 2001), c'est-à-dire fixées sur les rochers humides (épilithiques), sur les grains de sable (épipsammiques) ou sur d'autres organismes végétaux (épiphytiques) ou animaux (épizoïques) (Fig. 23).

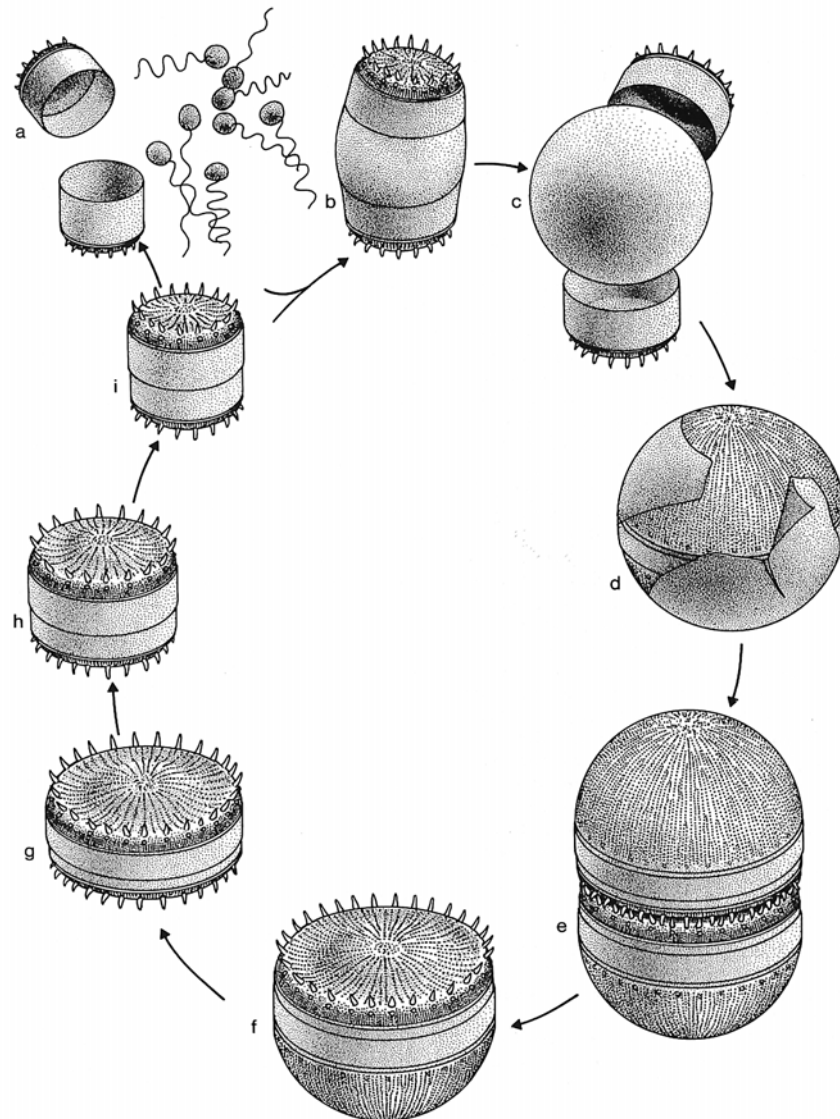


**Fig. 23 :**  
**Représentation**  
**schématique des**  
**différentes formes**  
**de vie des**  
**diatomées en milieu**  
**dulçaquicole : lac**  
**ou mare (“pond”)**  
**(Stoermer et Smol**  
**1999).**

Une forme “intermédiaire” est constituée par les diatomées libres qui passent une partie de leur vie de façon benthique sur (épipeliques) ou dans (endopeliques) les sédiments et une autre partie de leur vie de façon planctonique lors d’une remise en suspension. Beaucoup de diatomées benthiques sont hétérotrophes facultatives (Werner, 1977; Admiraal et Peletier, 1979) voire obligatoires (une dizaine d’espèces) comme *Nitzschia putrida*, une diatomée non-pigmentée qui vit en épiphyte sur l’algue brune *Fucus* sp. Il existe également des diatomées endosymbiontes (pennées pour la plupart) comme certaines espèces du genre *Navicula* et *Nitzschia* qui vivent dans les grands foraminifères benthiques des zones tropicales et subtropicales (Round *et al.*, 1990). Ces diatomées ne synthétisent pas de frustule dans leur état endosymbionte mais restent tout à fait capables de le synthétiser lorsqu’elles sont isolées et cultivées dans un milieu extérieur.

Leur cycle de vie est assez peu connu (voir Round *et al.*, 1990) (Fig. 24). Schématiquement, il implique une multiplication végétative au cours de laquelle chaque cellule fille reçoit une thèque de la cellule mère et en sécrète une nouvelle. Ce processus implique une diminution de la taille globale de la population jusqu’à un seuil critique (30 à 40 % de la taille originelle) qui entraîne une phase de reproduction sexuée avec formation d’un zygote (l’auxospore) dont la division aboutit aux premières cellules de la nouvelle génération dont le frustule présente une morphologie différente (pour revue voir Mann, 1993; Falciatore et Bowler, 2002). Finalement, à la multiplication végétative suivante la forme et la taille originelles du frustule sont récupérées. Ce cycle de vie est intimement lié aux

contraintes imposées par le frustule et sa formation. Il est donc régulé par la concentration en silice dans le milieu (pour revues voir Round *et al.*, 1990; Pickett-Heaps *et al.*, 1990; Martin-Jézéquel *et al.*, 2000). Il implique des processus cellulaires extrêmement fins dont la plupart restent totalement inconnus. Certaines diatomées, essentiellement centriques peuvent également répondre à des variations défavorables des facteurs environnementaux par la formation de kystes leur permettant de survivre en attendant une amélioration des conditions du milieu (Round *et al.*, 1990).



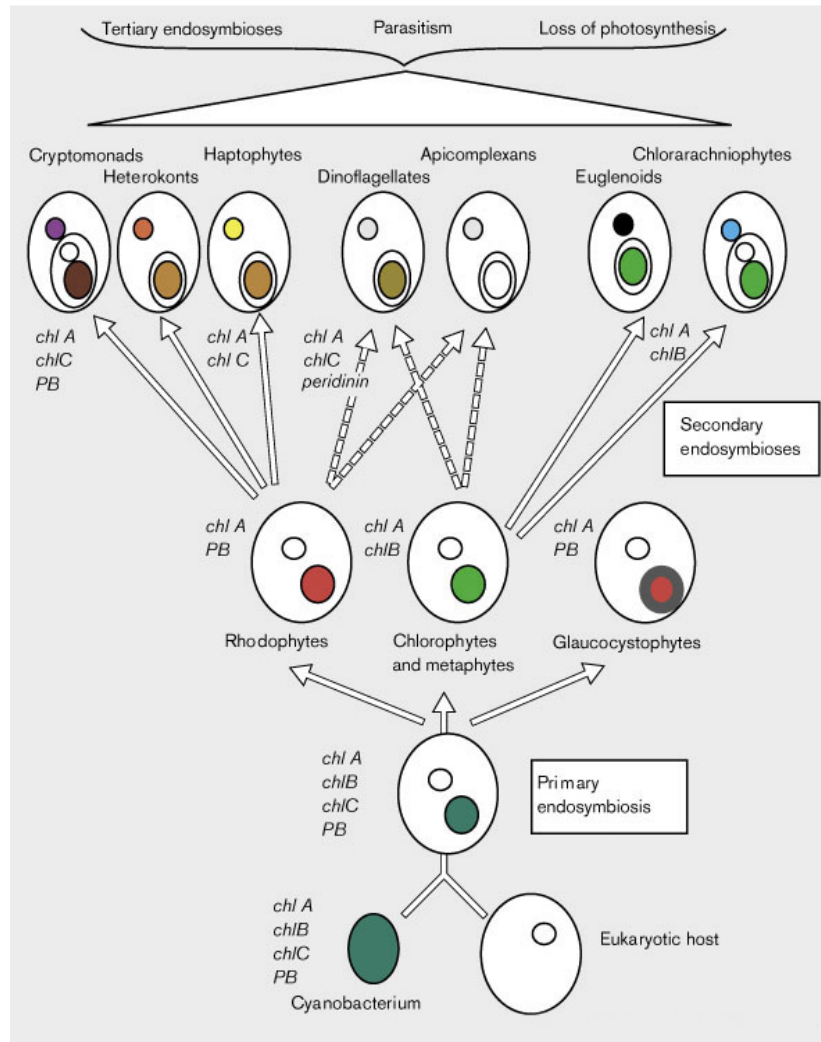
**Fig. 24 :** Le cycle de vie des diatomées (*Stephanodiscus* sp, une diatomée centrique). (a) libération de gamètes flagellés mâles et femelles et fécondation, (b) (c) formation et libération du zygote : l’auxospore, (d) la paroi de l’auxospore se déchire et libère la cellule initiale, (e) première division de la cellule initiale pour former deux valves soudées de morphologie “normales”, (f) les deux cellules ainsi formées se détachent l’une de l’autre avec chacune une valve “normale” et une valve de la cellule initiale, (g) une à plusieurs divisions aboutissent à une cellule de morphologie “normale”, (h) sa taille décroît au cours de la multiplication végétative, (i) jusqu’à atteindre une taille limite qui engendre la reproduction sexuée et la libération de gamètes soit mâles, soit femelles (Round *et al.*, 1990).

## II- 1. 4. Les plastes de diatomées : origine et structure.

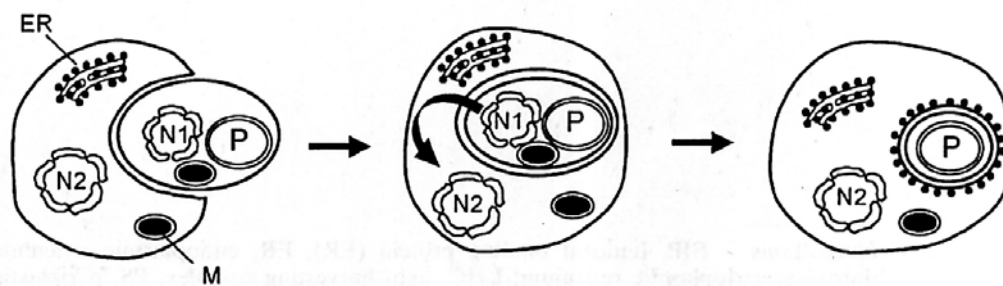
Le séquençage du génome plastidial de *Odontella sinensis* (Kowallik *et al.*, 1995) a apporté de nouvelles données concernant l'origine évolutive des diatomées et de leurs plastes (Martin *et al.*, 1998). Un des caractères le plus remarquable des plastes des algues Hétérokontophytes est qu'ils sont entourés d'une enveloppe à quatre membranes contrairement à celle des Chlorophytes (plantes et algues vertes) et des Rhodophytes (algues rouges) qui n'est constituée que de deux membranes.

Pour les plastes à deux membranes, l'hypothèse actuellement admise est qu'ils résultent d'une endosymbiose (dite primaire), c'est-à-dire le phagocytage d'un procaryote photosynthétique (similaire aux cyanobactéries actuelles) par un hôte eucaryote non-photosynthétique ayant eu lieu il y a 1,5 milliards d'années (pour revues voir Gray, 1992 ; Douglas, 1998) (Fig. 25). Pour les plastes possédant une enveloppe à plus de deux membranes (plastes "complexes", Sitte, 1993) et particulièrement ceux possédant quatre membranes la vue la plus répandue consiste à les considérer comme le résultat d'une endosymbiose secondaire (Gibbs, 1981; Delwiche et Palmer, 1997). Ainsi, les plastes des diatomées seraient issus du phagocytage d'un organisme eucaryote photosynthétique (possédant noyau, chloroplastes, mitochondries et diverses organelles), par un organisme hôte eucaryote (Fig. 26). Au cours de l'évolution la plupart voire toutes les organelles de la cellule phagocytée auraient disparu excepté le plaste et un transfert massif de gènes du noyau endosymbionte au noyau hôte aurait eu lieu (pour revue voir Falciatore et Bowler, 2002). Cette hypothèse s'appuie sur le fait que les Cryptophytes, qui sont relativement proches des Hétérokontophytes et qui résulteraient également d'une endosymbiose secondaire, possèdent un nucléomorphe, c'est-à-dire un vestige de noyau, entre les deux paires de membranes, résultant sans doute du noyau du symbionte ancestral (Delwiche et Palmer, 1997; Douglas *et al.*, 2001).

Hauber *et al.* (1994) ont proposé que la cellule hôte soit photosynthétique plutôt qu'hétérotrophe et qu'elle ait perdu ses propres plastes en faveur de ceux du symbionte mais ceci n'a pas été confirmé depuis. L'hypothèse la plus favorisée est que cet hôte serait un petit flagellé unicellulaire hétérotrophe appartenant aux Oomycètes (des champignons "inférieurs" Hétérokontophytes) et similaire à *Cafeteria roenbergensis* (van den Hoek *et al.*, 1995; Medlin *et al.*, 2000). Chez les diatomées (comme chez les Rhodophytes), le transfert de gènes a été vraisemblablement moins important (Reith, 1995) vu la grande taille du génome plastidial.



**Fig. 25 :** Schéma hypothétique de l'origine des plastides des organismes photosynthétiques oxygéniques, à partir d'un ancêtre commun, basé sur la théorie de l'endosymbiose primaire et secondaire. Les noyaux sont représentés par un cercle blanc et les plastides par un cercle coloré. Chaque cercle entourant les plastides équivaut à une double membrane (Douglas, 1998).



**Fig. 26 :** Schéma hypothétique de l'évolution des plastides de diatomées. Après phagocytage d'une algue rouge par un hôte eucaryote, un transfert de gènes massif (représenté par la flèche) a lieu entre le noyau de l'endosymbionte (N<sub>1</sub>) et celui de l'hôte (N<sub>2</sub>). La disparition des différentes organelles de l'endosymbionte, dont le noyau N<sub>1</sub> et les mitochondries (M), aboutit à un plaste (P) avec quatre membranes, la plus externe résultant d'une transformation du réticulum endoplasmique de la cellule hôte (ER) (Kroth et Strotmann, 1999).

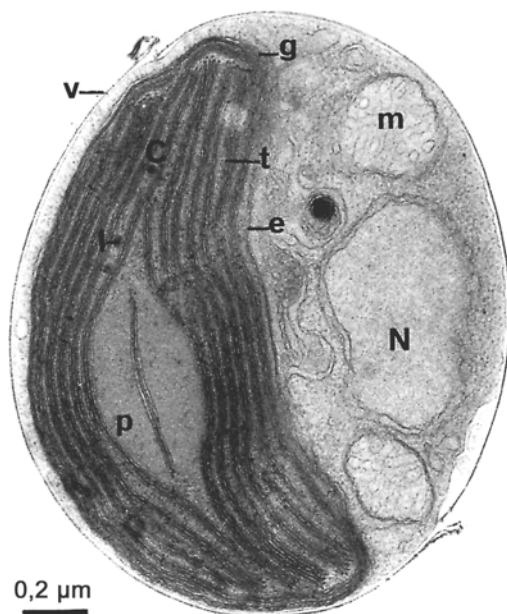


Chez *Odontella sinensis*, le génome plastidial est de 118 Kpb (Kowallik *et al.*, 1995) (pour comparaison, la taille du génome nucléaire de *P. tricornutum*, le plus petit des diatomées mesuré jusqu'ici, est d'environ 15 Mpb, Falciatore et Bowler, 2002). En outre, le génome plastidial de *O. sinensis*, comme celui de *P. tricornutum* (Scala *et al.*, 2002), montre une forte similarité avec celui de l'algue rouge unicellulaire *Porphyra purpurea* (Reith, 1995; Dunford *et al.*, 1999; Grabowski *et al.*, 2001) ce qui indique clairement que l'ancêtre commun des plastes de diatomées est une Rhodophyte (Kowallik, 1992; Battacharya et Medlin, 1995; Delwiche et Palmer, 1997; Martin *et al.*, 1998). Enfin, les analyses phylogénétiques d'une algue biflagellée de la classe des Bolidophycées (Guillou *et al.*, 1999), qui apparaît comme un groupe frère des diatomées, suggèrent fortement que le genre *Bolidomonas* pourrait être similaire à l'organisme ayant résulté de cette endosymbiose secondaire, soit l'ancêtre commun des Hétérokontophytes il y a 259 à 285 millions d'années (Medlin *et al.*, 1997; Baldauf *et al.*, 2000; Medlin *et al.*, 2000). Ainsi, les diatomées ont "perdu contact" depuis longtemps (650 millions d'années) avec la lignée des algues vertes d'où dérivent les plantes supérieures. L'analyse de milliers d'ESTs chez *P. tricornutum* a curieusement démontré que le génome des diatomées est plus proche de celui des "animaux" (également proches des "champignons") que de celui des "végétaux" soulignant ainsi les histoires phylogénétiques différentes des diatomées et des plantes vertes et suggérant qu'une bonne part du génome des diatomées dérive de leur ancêtre hétérotrophe flagellé qui fut sans doute l'hôte de l'endosymbiose secondaire (Scala *et al.*, 2002).

Les deux membranes internes du plaste des diatomées proviennent de l'enveloppe à deux membranes du plaste de l'organisme eucaryote endosymbionte. L'origine des deux membranes externes reste à déterminer. D'après la théorie de l'endosymbiose secondaire, elles devraient provenir de la membrane plasmique de l'endosymbionte et de la membrane de phagocytose de l'hôte (Whatley *et al.*, 1979). Cependant chez les diatomées, la membrane la plus externe ressemble à du réticulum endoplasmique (RE) avec ribosomes attachés (Fig. 26) ("RE du chloroplaste", Gibbs, 1981). Cette membrane proviendrait soit d'une transformation du RE de la cellule hôte (Gibbs, 1979), soit d'une fusion de la membrane de phagocytose et du RE (Whatley *et al.*, 1979). Cette particularité du plaste des diatomées et des algues Hétérokontophytes en général implique un processus bien particulier d'adressage au plaste des protéines chloroplastiques codées par le génome nucléaire (pour revues voir Grossman *et al.*, 1995; Kroth et Strotmann, 1999). Le modèle proposé repose sur celui très étudié chez les végétaux verts (pour revue voir Keegstra et Cline, 1999) mais en plus complexe : les protéines

seraient soumises à un transport co-translationnel impliquant une traduction au niveau du RE de la membrane externe du plaste et un transport simultané vers le stroma. Ces protéines possèdent d'ailleurs deux peptides d'adressage, un pour franchir chaque paire de membranes du plaste (Bhaya et Grossman, 1991; Apt *et al.*, 1994; Grossman *et al.*, 1995).

Généralement, les diatomées centriques possèdent un grand nombre de petits plastes discoïdes tandis que les pennées possèdent seulement quelques plastes, plus grands, voire un seul (Fig. 27). L'ultrastructure des thylakoïdes des plastes des algues Hétérokontophytes est également très différente de celle des végétaux verts (Gibbs, 1970; Sweeney, 1981; Dwarthe et Vesk, 1982; Berkaloff *et al.*, 1983; Dwarthe, 1983; Lichtlé *et al.*, 1986, 1992; Pyszniaç et Gibbs, 1992). Les thylakoïdes sont groupés par faisceau de trois sur toute la longueur du plaste et sont séparés par un espace de 2 nm et donc peu accolés entre eux (Pyszniaç et Gibbs, 1992). Ils sont entourés par une bande de trois thylakoïdes (la "Girdle stack") (Fig. 27). Il n'y a pas comme chez les végétaux verts de différenciation entre des zones granaires et agraires présentant une distribution hétérogène des PS I et II (voir § I- 1. 1. 2. ). Au contraire, chez les diatomées et les algues à Chl *a/c* en général, les PS I et II, tout comme les complexes antennes, ne sont pas ségrégués entre les zones accolées et externes (face au stroma), même si les PS I sont légèrement plus concentrés côté stroma (Dwarthe et Vesk, 1982; Berkaloff *et al.*, 1990; Pyszniaç et Gibbs, 1992; Lichtlé *et al.*, 1992, 1995). Des protocoles permettant d'isoler des plastes de diatomées fonctionnels ont récemment été proposés mais l'activité photosynthétique est assez faible et ne permet pas des approches physiologiques fiables (Martinson *et al.*, 1998; Wittpoth *et al.*, 1998).



**Fig. 27 :** Coupe transversale d'une cellule de *Phaeodactylum tricorutum* (diatomée pennée) possédant un seul chloroplaste (c) contenant les faisceau de trois thylakoïdes (t) entourés de la "girdle band" (g). (e) enveloppe du thylakoïde, (l) gouttelette lipidique, (m) mitochondrie, (n) noyau, (p) pyrénioïde. Photo : C. Lichtlé.

## II- 1. 5. Utilisations et nuisances.

Ce point sera peu détaillé car traité de façon complète dans le récent ouvrage “The Diatoms : Applications for the Environmental et Earth Sciences” (édité par Stoermer et Smol, Cambridge University Press, 1999). La plus ancienne utilisation pratique connue des diatomées concerne l’usage médicinal des blooms du genre *Gomphoneis* par les Indiens d’Amérique du Nord.

La sédimentation constante des frustules de diatomées mortes résulte en la formation d’une couche sédimentaire particulièrement importante dans les régions océaniques où elles sont prépondérantes (voir § II- 1. 1. ). Les énormes dépôts fossiles accumulés depuis le Tertiaire sont appelés “diatomites” (Fig. 28).



**Fig. 28 :**  
**Affleurement d’une diatomite constituée essentiellement du genre dulçaquicole *Aulacoseira*. Photo : E. F. Stoermer.**

Ces diatomites furent utilisées comme substitutif alimentaire pendant les périodes de famines. Elles ont été et sont utilisées dans 300 à 500 applications commerciales diverses telles que la fabrication de filtres, de déodorants, d’agents décolorants, d’agents abrasifs comme le dentifrice, etc... L’une des applications de pointe potentielle concerne le domaine des nanocristaux de silice. En effet, la précision avec laquelle les diatomées sont capables de créer la fine architecture de leur frustule en générant des nanoparticules (de 100 nm à 1 µm) (Kroger *et al.*, 1999; Kroger *et al.*, 2000) supplante largement les capacités actuelles de confection par l’homme de matériaux de cette taille. La compréhension de ce mécanisme permettra certainement son exploitation dans les nanotechnologies et des applications possibles en biologie médicale et en informatique (pour revues voir Alivisatos, 1996; Mann et Ozin, 1996; Morse, 1999; Parkinson et Gordon, 1999; Brott *et al.*, 2001).

Ces dépôts sédimentaires, de part les informations fossilisées qu'ils contiennent, permettent de reconstruire l'histoire des grands événements climatiques qui ont bouleversés à la fois les milieux dulçaquicoles continentaux et les milieux marins. Ils sont donc très utilisés pour les études de paléo-écologie (perturbations écologiques), -climatologie (changements climatiques), -océanographie (cycles biogéochimiques), etc... Ces données fossiles sont également utilisées pour la découverte de gisements de pétrole et de gaz naturel (paléo-bathimétrie et chimie). Les diatomées actuelles sont considérées comme des indicateurs biologiques très fiables (Dixit *et al.*, 1992) car elles sont très répandues (voir § II- 1. 3. ) et de nombreuses espèces sont sensibles aux variations des facteurs environnementaux comme l'augmentation de certains nutriments. Elles sont utilisées pour étudier les problèmes d'eutrophication, d'acidification des lacs, de modifications hydrologiques, etc... Une autre utilisation (plus proche celle-ci du Ministère de la Justice que de celui de l'Environnement) consiste à utiliser les diatomées pour les expertises médico-légales et particulièrement comme diagnostic de mort par noyade.

Les diatomées peuvent, à l'opposé, être source de nuisances pour les pêcheries, l'aquaculture et la santé publique (voir la revue de Fryxell et Villac, 2001). En effet, certaines espèces (comme *Pseudo-Nitzschia*) sont connues pour produire des blooms potentiellement toxiques pour les poissons, les oiseaux, les mammifères marins mais aussi pour l'homme (via l'ingestion de fruits de mer) (Fritz *et al.*, 1992; Scholin *et al.*, 2000). Le nombre d'espèces toxiques décrites est pour l'instant faible comparé à celui connu chez les Dinophytes et cyanobactéries toxiques. Ces espèces toxiques, toutes pennées et marines, sont considérées comme plus "évoluées" que leurs pendants non-toxiques et produisent toutes un seul type de toxine : l'acide domoïque, une neurotoxine. Cette toxine serait un agent chélateur du Fer (Fryxell et Villac, 2001), élément indispensable à la croissance des diatomées (Martin *et al.*, 1994; Coale *et al.*, 1996). Si tel est le cas le potentiel toxique chez les diatomées est certainement plus répandu que l'on ne le pense à l'heure actuelle.

## II- 2. LES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES DES DIATOMEES.

### II- 2. 1. Un historique.

Les complexes pigments-protéines collecteurs d'énergie des algues Hétérokontophytes ("Light-Harvesting Complexe with Fucoxanthin", LHCF ou "Fucoxanthin Chl *a/c* Protein", FCP) sont intégrés dans les membranes thylakoïdales des chloroplastes (Berkaloff *et al.*,

1983) et par conséquent l'utilisation de détergent est nécessaire pour isoler et purifier de tels complexes (pour revue sur les détergents voir Garavito et Ferguson-Miller, 2001). L'état natif de ces complexes et la distribution exact des pigments est donc difficile à déterminer d'autant que les diatomées sont connues pour posséder des chlorophyllases, enzymes qui vont s'attaquer aux pigments, les détruire et perturber la structure native des complexes antennes (Terpstra, 1980; Lambers *et al.*, 1986).

La première purification de LHCF d'algues à Chl *a/c* et fucoxanthine a été réalisée par Anderson et Barrett (1977). Ils ont montré qu'il était difficile de purifier ces complexes car les membranes thylakoïdales des algues Hétérokontophytes sont relativement plus résistantes aux détergents communément utilisés pour les complexes antennes des végétaux verts, alors que les liaisons pigments-protéines sont particulièrement labiles (Kirk, 1977; Friedman et Alberte, 1984). Par exemple, le Triton X-100, détergent non ionique utilisé pour extraire les complexes membranaires des végétaux supérieurs, décroche les pigments des antennes des diatomées et algues brunes (Kirk, 1977; Gugliemelli *et al.*, 1981; Friedman et Alberte, 1984; Douady *et al.*, 1994). Le sodium lauryl sarcosinate fut également utilisé mais ne permettait pas une solubilisation suffisante des complexes antennes (Gugliemelli, 1984). D'autres purifications de complexes pigment-protéines d'algues à Chl *a/c* ont été réalisées par action de détergents non ioniques doux et séparation soit par électrophorèse non dénaturante (Alberte *et al.*, 1981; Duval *et al.*, 1983; Peyrière *et al.*, 1984, pour revue Anderson et Barrett, 1985) soit par centrifugation sur gradient de densité (Barrett et Anderson, 1980; Friedman et Alberte, 1984; Fawley et Grossman, 1986; Caron et Brown, 1987; Fawley, 1987; Brown, 1989; De Martino *et al.*, 1997; De Martino *et al.*, 2000). Pour les travaux les plus récents, la digitonine utilisée comme détergent, s'est avérée efficace pour obtenir des complexes pigments-protéines ayant conservé des transferts d'énergie entre pigments intacts, c'est-à-dire présentant une conformation relativement proche de celle existant *in vivo*. Contrairement aux végétaux verts, une seule fraction complexe antenne dépourvue de centre réactionnel peut être isolée sur gradient de saccharose après une seule étape de traitement avec la digitonine.

Concernant plus précisément les diatomées, la première purification d'un complexe antenne quasi-natif eut lieu au début des années 80 (Gugliemelli *et al.*, 1981). Suivirent des travaux jusqu'à la fin de cette décennie, principalement sur *P. tricornutum* et *Skeletonema costatum* (Alberte *et al.*, 1981; Friedman et Alberte, 1984; Gugliemelli, 1984; Owens et Wold, 1986; Caron et Brown, 1987). Le travail de Brown (1989), et Boczar et Prézélin (1989), étendit les diatomées étudiées aux genres *Chaetoceros*, *Nitzschia* et

*Thalassiosira* et celui de Boczar et Palmisano (1990) aux diatomées Antarctique vivant dans la glace comme *Nitzschia stellata*. En fonction des techniques utilisées, le nombre de complexes antennes obtenus fût variable ainsi que leur composition pigmentaire. A ce jour seulement deux complexes vraiment natifs et donc susceptibles d'être retrouvés *in vivo* ont été isolés. Il s'agit d'un complexe antenne "majeur" enrichi en Chl *c* et fucoxanthine, renfermant environ 50 % de la Chl *a* présente dans les chloroplastes et 75 % des protéines thylakoidales. Un second complexe, dit "mineur", à Chl *a/c* sans fucoxanthine dans des proportions 1/0,5 a également été isolé. Il a été proposé que ce complexe mineur soit un intermédiaire dans le transfert d'énergie entre le complexe majeur périphérique et le centre réactionnel comme chez les Dinophytes (Friedman et Alberte, 1984; Owens, 1986). Cette hypothèse n'a cependant pas été confirmée. Le même style de profil a été obtenu chez des algues brunes à partir duquel a été proposé un modèle d'organisation du LHCF qui n'a pas non plus été confirmé depuis (Peyrière *et al.*, 1984). Ces travaux n'ont cependant pas traité la question de la proportion de DD au sein des complexes antennes si ce n'est ceux de Caron et Brown (1987) et Brown (1989) qui apportent relativement peu d'informations.

Des complexes pigments-protéines ont été également isolés et partiellement purifiés chez d'autres organismes Hétérokontophytes et plus généralement d'autres algues à Chl *a/c* (pour revue voir Wilhelm, 1990) : les Phaeophycées (Anderson et Barrett, 1985; Caron et Brown, 1987; Brown, 1989; Katoh *et al.*, 1989; Katoh et Ehara, 1990; Passaquet *et al.*, 1991; Douady *et al.*, 1994; De Martino *et al.*, 1997; Pascal *et al.*, 1998; De Martino *et al.*, 1997, 2000), les Chrysophycées (Wiedemann *et al.*, 1983; Lichtlé *et al.*, 1995), les Xanthophycées (Wiedemann *et al.*, 1983; Wilhelm *et al.*, 1988) et les Haptophytes (Hiller *et al.*, 1987; Fawley, 1987; Boczar et Prézelin, 1989) et Dinophytes (Prézelin et Haxo, 1976; Boczar et Prézelin, 1987). Ces complexes présentent des homologues importantes, voire sont très similaires à ceux isolés chez les diatomées. Ces travaux doivent donc être pris en compte.

## II- 2. 2. Les pigments collecteurs d'énergie lumineuse.

Parmi les algues Hétérokontophytes et plus largement les algues à Chl *a/c*, la purification des complexes antennes majeurs et la détermination de leur contenu pigmentaire a montré que ceux-ci sont enrichis en Chl *c* et en xanthophylles de diverses natures, et plus particulièrement en fucoxanthine et DD chez les diatomées (pour revues voir Stauber et Jeffrey, 1988; Brown, 1989; Wilhelm, 1990). Il est important de noter que les xanthophylles associées aux protéines des LHCF sont présentes en proportions bien plus importantes

(rapportées à la Chl *a*) que dans les complexes antennes des végétaux verts. Alors que les monomères de LHCIIB des plantes vertes contiennent 2 à 3 molécules de xanthophylles pour 12-13 Chl (Green et Durnford, 1996), les Chl et les xanthophylles sont en quantités équimolaires dans les LHCF (Kato *et al.*, 1989; Wilhelm, 1990; Berkaloff *et al.*, 1990; Passaquet *et al.*, 1991; Douady *et al.*, 1994; Pascal *et al.*, 1998; Ritz *et al.*, 2000). On attribue actuellement à ces xanthophylles trois rôles principaux:

- un rôle majeur dans l'absorption de l'énergie lumineuse.
- un deuxième rôle est attribué à certaines xanthophylles comme la DD et la VX (pour les algues brunes) dans la régulation de la dissipation de la lumière à court terme (voir § I-3. 1. 2. et II-3. 3. ).
- un rôle dans la stabilisation de la structure des complexes pigments-protéines au sein de la membrane thylakoïdale (voir § II-2. 4. ).

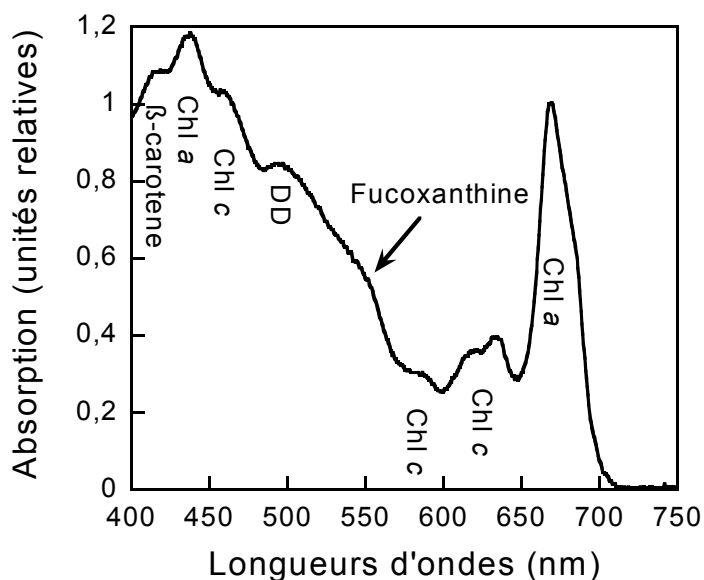
#### II- 2. 2. 1. Les différents pigments collecteurs d'énergie lumineuse.

Chez les diatomées, l'énergie lumineuse est collectée majoritairement par la Chl *a*, la Chl *c* et des xanthophylles (Goedheer, 1970; Stauber et Jeffrey, 1988). La xanthophylle responsable de la majeure partie de l'énergie collectée est la fucoxanthine (Kirk, 1977). La DD est également capable d'absorber la lumière et de la transférer efficacement à la Chl *a* (Wilhelm, 1990).

Comme la Chl *a*, et la Chl *b* des végétaux verts, **la Chl *c*** est constituée principalement d'un macrocycle de porphyrine insaturé, mais elle se distingue par l'absence d'hydrogénation sur ce cycle (contrairement à la Chl *a* qui en possède une, et la Chl *b* deux) (voir § I- 1. 2. 1. , Fig. 3, p 25). La structure de la Chl *c* est donc plus proche de celle d'un hème et ces propriétés moléculaires et spectrales sont différentes des Chl *a* et *b*. Les molécules de Chl *c* sont ainsi caractérisées par une symétrie plus marquée et des propriétés ioniques et donc des propriétés d'absorption d'énergie différentes de celles de la Chl *a*. Ceci se traduit par une très nette diminution de l'absorption dans les longueurs d'onde rouges (600-700 nm) en comparaison avec le pic très fortement marqué de la Chl *a*. Par ailleurs, le pic d'absorption de la Chl *c* dans la région bleue du spectre de la lumière visible (400-500 nm) est décalé vers les plus grandes longueurs d'onde par rapport au pic de la Chl *a* : 441 nm au lieu de 432 nm *in vitro* (voir § I- 1. 2. 1. , Fig. 3, p 25), 460 au lieu de 435 nm *in vivo* (Fig. 29). Il existe deux types de molécules de Chl *c* (Chl *c*<sub>1</sub> et Chl *c*<sub>2</sub>) qui diffèrent par un simple résidu sur le macrocycle ne modifiant que très peu les propriétés d'absorption.

**La fucoxanthine** est un caroténoïde de type xanthophylle allénique (voir § I- 1. 2. 1. , Fig. 3, p 25) qui est totalement absent chez les végétaux verts. L'acquisition de ce pigment par les Hétérokontophytes et particulièrement les diatomées est considérée, au même titre que la présence de phycobilisomes chez les Cyanobactéries et Rhodophytes, comme une adaptation au milieu marin où, à partir d'une certaine profondeur, les radiations bleues-vertes dominant (Kirk, 1977). La caractéristique principale de ce pigment collecteur est le décalage important de sa bande d'absorption vers les grandes longueurs d'onde entre des conditions *in vitro* où il absorbe autour de 460 nm et *in vivo*, lié aux protéines, où il absorbe entre 520 et 560 nm (Fig. 29) (Goedheer, 1970; Kirk, 1977). Jusqu'à présent, ce phénomène est mal compris mais est très utilisé pour s'assurer que les transferts d'énergie au sein des complexes pigments-protéines ne sont pas perturbés lors des procédures de purification. En effet, la comparaison entre les spectres d'excitation de fluorescence et les spectres d'absorption permettent d'apprécier l'efficacité de transferts d'énergie de la fucoxanthine à la Chl *a* et donc l'état de connexion des pigments sur les protéines (voir Chapitre II-Matériels et Méthodes, § IV- 2. 2. ).

**La DD** (aussi présente chez les Raphidophycées et Xanthophycées (Hétérokontophytes), Dinophytes et Haptophytes) est également un caroténoïde de type xanthophylle allénique (voir § I- 1. 2. 1. , Fig. 14, p 49). Comme la plupart des caroténoïdes, il absorbe entre 400 et 500 nm et son maximum d'absorption *in vivo* est à 495 nm (Fig. 29) (Wilhelm, 1990). La part que prend la DD dans la collecte de l'énergie lumineuse n'est pas encore déterminée. Il est possible que, comme pour la VX chez les plantes vertes, le pool de DD non convertible en DT participe à la capture de la lumière contrairement au pool de DD convertible (S. Ruban, com. pers.).



**Fig. 29 :**  
Spectre d'absorption de cellules de *Phaeodactylum tricornutum* à 77 °K montrant les bandes d'absorption des différents pigments.



Au vue de la durée du transfert estimée entre 0,5 et 2,5 ps chez *P. tricornutum*, il est admis que les distances entre les caroténoïdes et les molécules de Chl *a* doivent être de quelques Angstroms seulement (Mimuro *et al.*, 1990; Trautman *et al.*, 1990). Les Dinophytes possèdent des complexes antennes contenant de la péridinine qui présente également un déplacement de bande d'absorption *in vivo*. La détermination de la structure du complexe par cristallographie à haute résolution (2 Å) a permis de mieux comprendre l'efficacité de transfert d'énergie entre les xanthophylles et la Chl *a* : les régions conjuguées de toutes les molécules de péridinine sont en contact de type van der Waals avec le cycle tétrapyrrole des Chl *a* (Hoffman *et al.*, 1996). Ce domaine a été largement développé grâce au modèle Dinophyte et au modèle bactéries photosynthétiques (pour revues voir Cogdell et Frank, 1987; Ritz *et al.*, 2000).

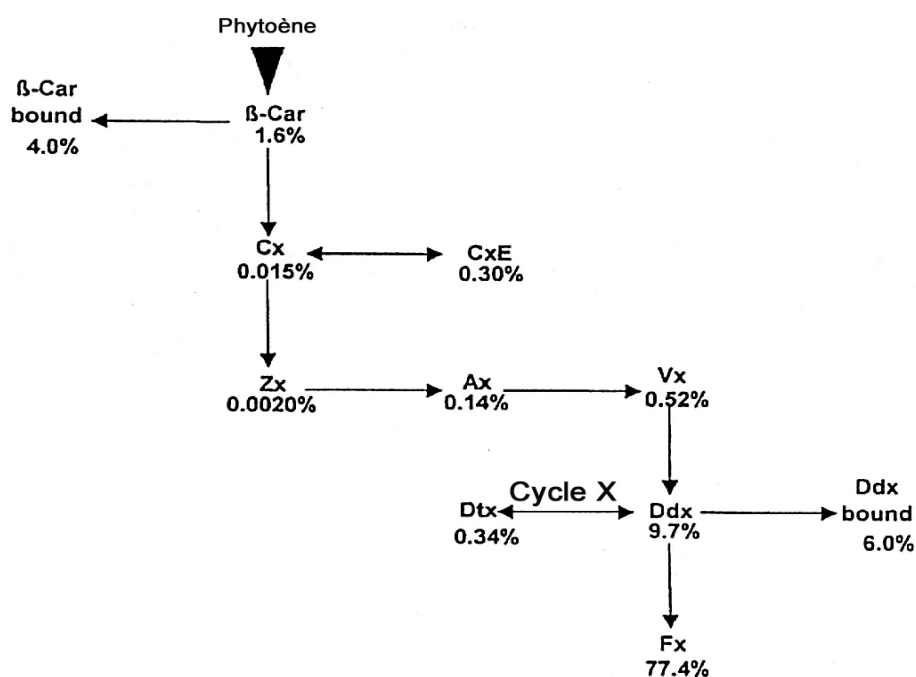
#### II- 2. 2. 2. La voie de biosynthèse des xanthophylles.

Cet aspect a été peu abordé chez les diatomées et mériterait certainement un meilleur sort. On citera le travail précurseur de Goericke et Welschmeyer (1992) basé sur les cinétiques de synthèse et disparition de xanthophylles radioactivement marquées chez *Thalassiosira weissflogii* et ceux plus récents de Lohr et Wilhelm, (1998, 1999, 2001) chez *P. tricornutum* et *Cyclotella meneghiniana*.

Les résultats de ces travaux peuvent être résumés comme suit (Fig. 30). Le  $\beta$ -carotène provenant indirectement du phytoène est le précurseur indirect des différentes xanthophylles détectées chez les diatomées et plus particulièrement de la DD et de la fucoxanthine. La synthèse de DD passe tout d'abord par celle de la cryptoxanthine, voie découverte récemment (Lohr et Wilhelm, 2001). La cryptoxanthine aboutit à la formation des trois pigments impliqués dans le cycle des xanthophylles chez les végétaux verts mais aussi chez les algues brunes : la ZX, l'anthéroxanthine et la VX (voir § I- 3. 1. 2. b. , Fig. 14). Le fait que le  $\beta$ -carotène aboutisse par hydroxylation à la ZX et non directement à la VX est comparable à ce qui est observé chez les plantes supérieures. L'accumulation significative de ces pigments a été établie chez plusieurs organismes possédant le cycle de la DD et que l'on croyait donc dépourvus du cycle de la VX : des diatomées mais aussi des Dinophytes, des Haptophytes et des Xanthophycées (Lohr et Wilhelm, 1999). Ainsi chez ces organismes et dans des conditions de lumière particulières (forte intensité pendant plusieurs heures), non seulement l'accumulation de ces pigments a été mise en évidence mais également le fonctionnement du cycle correspondant. En effet, la DD dé-époxydase s'est avérée capable de dé-époxyder aussi

bien la DD que la VX et ce aussi efficacement (Jakob et Wilhelm, 2001). Cependant, il semblerait que l'accumulation provisoire de ZX durant une longue période de forte lumière soit plus une résultante inévitable de la voie de biosynthèse et des propriétés de la DD dé-époxydase qu'une réelle fonctionnalité de deux cycles photoprotecteurs simultanés, même si le rôle de la ZX dans la photoprotection lors d'une illumination forte prolongée est tout a fait envisageable chez ce type d'organisme comme c'est le cas chez les algues brunes et les Cryptophycées par exemple (Lichtlé *et al.*, 1995; Lohr et Wilhelm, 1999).

La VX est le précurseur immédiat de la DD (Lohr et Wilhelm, 1999; Lohr et Wilhelm, 2001). D'ailleurs chez un Dinophytes, la ZX avait été précédemment montrée comme étant le précurseur possible de la DD et de la péridinine (voir Lohr et Wilhelm, 1999). La VX peut également être le précurseur direct de la DT dans des conditions de forte lumière prolongée, résultant en une synthèse *de novo* de DT et non pas par l'intermédiaire de la DD. Ceci a été indubitablement montré par l'utilisation du dithiothréitol, un inhibiteur de la DD dé-époxydase, en présence duquel la synthèse *de novo* n'est pas inhibée (Olaizola *et al.*, 1994).



**Fig. 30 :** Modèle hypothétique de la voie de biosynthèse des xanthophylles chez les diatomées. Les pourcentages correspondent à la proportion de chaque pigment par rapport aux caroténoïdes totaux mesurée chez *Phaeodactylum tricorutum* poussée en conditions de lumière standard. "bound" signifie qu'une partie du pool pour un pigment donné est liée aux complexes antenne alors qu'une autre est libre. Ax, anthéroxanthine; β-car, β-carotène; Cx, cryptoxanthine; CxE, cryptoxanthine époxydée; Cycle X, cycle des xanthophylles; Ddx, diadinoxanthine; Dtx, diatoxanthine; Fx, fucoxanthine; Vx, violaxanthine; Zx, zéaxanthine (Lohr et Wilhelm, 2001).

Le pool de DD est hétérogène et composé de deux parties aux propriétés distinctes : un pool avec un turn-over faible voire nul (Goericke et Welschmeyer, 1992) non convertible en DD, constitutif, et sans doute stabilisateur des complexes antennes (voir § II- 2. 4. ) et représentant moins de la moitié du total (Lohr et Wilhelm, 2001). Un tel pool est également présent chez les plantes vertes pour la VX dans des proportions voisines (Pfundel et Bilger, 1994) et effectivement intimement liée aux complexes antennes (Britton, 1993; Eskling *et al.*, 1997). Ainsi la VX est présente mais non dé-époxydable en des stochiométries différentes dans tous les types de complexes identifiés chez les plantes (pour revue voir Horton *et al.*, 1996 ; Eskling *et al.*, 1997). Ce pool est non convertible en ZX car tout simplement inaccessible à l'enzyme (Pfundel et Bilger, 1994) ce qui serait dû selon Horton *et al.* (1996) à l'organisation macromoléculaire des complexes antennes au sein de la membrane thylakoïdale.

Le second pool de DD qui représente 50 à 60 % du total (Lohr et Wilhelm, 2001) et qui a un turn-over beaucoup plus rapide (Goericke et Welschmeyer, 1992) a deux rôles importants. Premièrement, il est impliqué dans le cycle des xanthophylles et est donc convertible en DT. La localisation exacte de ce pool est encore discutée, la situation la plus probable restant sa localisation à la périphérie des complexes antennes, en contact avec les lipides membranaires, de façon à être accessible à la dé-époxydase qui est fixée sur la surface interne de la membrane thylakoïdale (Eskling *et al.*, 1997). Cette même localisation a été suggérée pour la VX (Horton *et al.*, 1996; Gilmore, 1997; Ruban *et al.*, 2002). Cependant, l'énorme différence entre la DD et la VX réside dans le nombre de dé-époxydation, la DD n'étant dé-époxydée qu'à une seule extrémité au contraire de la VX qui subit deux dé-époxydation. Ceci implique certainement des différences dans la localisation et le positionnement de ces pigments au sein des LHC qui ne sont pas encore bien comprises (Gilmore, 1997).

Ce deuxième pool de DD est également considéré comme le précurseur de la xanthophylle collectrice de lumière la plus importante chez les diatomées, algues brunes et bien d'autres algues : la fucoxanthine (Goericke et Welschmeyer, 1992; Lohr et Wilhelm, 1998, 1999, 2001). Ainsi, sous forte lumière le cycle des xanthophylles est un compétiteur direct de la synthèse de fucoxanthine (Goericke et Welschmeyer, 1992; Lohr et Wilhelm, 1998, 1999). Cependant, les xanthophylles DD et DT accumulées dans ces conditions de stress lumineux, soit via la VX (Lohr et Wilhelm, 1998, 1999), soit via une synthèse *de novo* de DT servent non seulement à la photoprotection des cellules (voir § II- 3. ) mais aussi à

l'accumulation du précurseur de la fucoxanthine. Ce précurseur peut ensuite être converti à faible lumière en fucoxanthine, un pigment collecteur d'énergie efficace (Lohr et Wilhelm, 1998, 1999). Ceci a clairement été démontré par des expériences de photoacclimatation (Anning *et al.*, 2000). Ainsi les diatomées seraient capables de se protéger de l'excès d'énergie lumineuse en le dissipant (voir § I- 3. 1. 2. et II- 3. 3. ) mais également en l'utilisant pour la confection au "moindre coût" d'une partie des complexes antennes indispensables dans des conditions de plus faible lumière : plus de DT synthétisée sous excès de lumière correspondant à plus de photoprotection mais aussi plus de précurseur potentiellement utilisable pour la synthèse de complexes collecteurs de lumière dans l'éventualité d'un retour à faible lumière. On comprend immédiatement l'intérêt d'une telle flexibilité dans un environnement où la lumière disponible est extrêmement variable.

Chez les algues brunes, la fucoxanthine est présente de façon constitutive mais la DD est remplacée par la ZX. La DD reste un précurseur obligatoire de la fucoxanthine; elle est toujours présente mais dans de très faibles quantités (B. Rousseau, com. pers.). Donc, les algues brunes ont évolué vers l'acquisition du cycle de la VX plutôt que celui de la DD. La même remarque peut être faite pour les Chrysophycées (Hétérokontophytes) (Lichtlé *et al.*, 1995). Par contre, les Dinophytes possèdent eux le cycle de la DD; pour certaines espèces la fucoxanthine étant "remplacée" par la péricidine (pour une revue récente sur les liens évolutifs entre les Hétérokontophytes et les Dinophytes, voir Morden et Sherwood, 2002).

## II- 2. 3. Les polypeptides LHCF.

### II- 2. 3. 1. La composition polypeptidique.

Les premiers travaux concernant la composition polypeptidique des complexes à Chl *a/c* et fucoxanthine ont porté sur les diatomées. Chez *P. tricornutum*, le nombre et les masses moléculaires apparentes des composants polypeptidiques de base varient suivant la technique employée de deux à quatre apoprotéines de masses moléculaires variant entre 15 et 20 kDa (Gugliemelli, 1984; Friedman et Alberte, 1984, 1986; Fawley et Grossman, 1986; Owens et Wold, 1986; Caron et Brown, 1987; Fawley, 1987; Hsu et Lee, 1987; Wilhelm, 1990; Passaquet *et al.*, 1991). L'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre une de ces apoprotéines chez *P. tricornutum* a permis de montrer qu'elles sont retrouvées chez plusieurs espèces de diatomées marines et dulçaquicoles (Friedman et Alberte, 1987). Des travaux, sur différentes espèces d'algues brunes ont également été réalisés. Ils ont montré que les LHCF

de ces algues sont constitués de plusieurs polypeptides de masses moléculaires apparentes variant de 17 à 21 kDa (Barrett et Anderson, 1980; Caron *et al.*, 1988; Passaquet *et al.*, 1991) formant deux populations distinctes différenciées seulement par leur hydrophobicité (Douady *et al.*, 1994). Ces polypeptides, comme ceux des Haptophytes (proches des Hétérokontophytes), réagissent avec un anticorps monoclonal d'apoprotéine LHCF de *P. tricornutum* (Fawley, 1987; Friedman et Alberte, 1987). Il en est de même pour les polypeptides de *P. tricornutum* qui réagissent avec un anticorps LHCF de l'algue brune *Fucus serratus* (Caron *et al.*, 1988). Ceci suggère une similarité de structure entre les LHCF de diatomées, d'algues brunes et d'autres organismes à Chl *a/c* et fucoxanthine (Friedman et Alberte, 1987). Chez une Raphidophycées (*Heterosigma sinensis*) qui est une algue Hétérokontophyte présentant la même composition pigmentaire que les diatomées à laquelle s'ajoute quelques xanthophylles mineures, jusqu'à huit bandes polypeptidiques de masses moléculaires apparentes de 17 à 23 kDa ont été identifiées (Durnford et Green, 1994). Pour les Dinophytes, par contre, la taille est plus variable avec des formes autour de 15 et de 32 kDa (Hiller *et al.*, 2001) et la structure des complexes antennes semble plus éloignée de celle des diatomées (Friedman et Alberte, 1987).

Les LHCF sont donc composés de polypeptides de masses moléculaires moins élevées que celles des polypeptides des complexes antennes des végétaux verts, qui varient de 25 à 30 kDa (Wilhelm, 1990; Bassi *et al.*, 1993). Cependant, une homologie partielle (une soixantaine d'acides aminés) avec les polypeptides des antennes des végétaux supérieurs a été montrée par immunoréaction avec des anticorps polyclonaux (Fawley et Grossman, 1986; Fawley, 1987; Caron *et al.*, 1988; Manodori et Grossman, 1990; Wilhelm, 1990; Passaquet *et al.*, 1991; Durnford et Green, 1994; Paulsen, 1995) ou par séquençage partiel de polypeptides LHCF de diatomée et d'algue brune (Grossman *et al.*, 1990; Manodori et Grossman, 1990; Douady *et al.*, 1994; voir également § suivant). Une homologie a également été démontrée entre les polypeptides des complexes antennes de diatomées et de Dinophytes (Manodori et Grossman, 1990).

Les LHCF étant codés par des gènes nucléaires (voir § suivant), comme pour les protéines LHC des plantes vertes, les mécanismes de transport et d'adressage des protéines matures dans le plaste sont différents (pour revues voir Grossman *et al.*, 1995; Falciatore et Bowler, 2002) car l'enveloppe plastidiale est composée de quatre membranes au lieu de deux (voir § II- 1. 4. ).

## II- 2. 3. 2. La famille multigénique des polypeptides LHCF.

Chez les Hétérokontophytes, seul un petit nombre de gènes a été séquencé jusqu'à présent. La présence de polysaccharides en proportion élevée surtout chez les algues brunes et les Chrysophycées rend difficile l'extraction d'acides nucléiques et n'a certainement pas encouragé les premiers auteurs à travailler sur le génome de ces organismes. Récemment, un protocole d'extraction des acides nucléiques, permettant l'élimination des polysaccharides des algues à Chl *a/c* a été décrit (Apt *et al.*, 1994). Depuis, plusieurs gènes ont été caractérisés.

Les séquences nucléiques des protéines LHCF ont été obtenues dans un premier temps à partir de clones de cDNA de *P. tricornutum* (Grossman *et al.*, 1990; Manodori et Grossman, 1990; Bhaya et Grossman, 1991). Puis leur structure et leur organisation sur le génome ont été déterminées à partir d'une banque génomique (Bhaya et Grossman, 1993; Apt *et al.*, 1994). Par la suite, les gènes *lhcf* (ou *fcp*) ont été étudiés chez plusieurs organismes Hétérokontophytes, mais le nombre total de gènes présents n'est pas encore établi. Les structures complètes d'un gène de *Laminaria saccharina* (algue brune) (Caron *et al.*, 1996) et d'un gène de *Isochrysis galbana* (Laroche, 1994) et de *Gyraudyopsis stellifer* (Crysophycées) (Passaquet et Lichtlé, 1995) ont été décrites à partir de clones génomiques nucléaires. D'autres séquences ont été obtenues à partir d'une banque de cDNA : il s'agit des diatomées *Odontella sinensis* (Kroth-Pancic, 1995), *Cyclotella cryptica* (Eppard et Rhiel, 1998), d'une algue brune (*Macrocystis Pyrifera*, Apt *et al.*, 1995), d'une Chrysophycée (*Isochrysis galbana*, Laroche *et al.*, 1994) et d'une Raphidophycée (*Heterosigma sinensis*, Durnford et Green, 1995). D'autre part, des séquences de gènes *lhcf* ont été décrites chez une espèce de Dinophyte (*Amphidinium carterae*, Hiller *et al.*, 2001).

Ces études ont montré que les polypeptides des antennes à Chl *a/c* sont codés par une famille de plusieurs gènes (*lhcf* ou *fcp*) dont les séquences en acides aminés sont très proches. Les différentes séquences de gènes de *P. tricornutum* présentent toutes un fort degré d'identité entre elles (86-99% d'identité), 60 % d'identité avec les séquences en acides aminés déduites des séquences codantes de gènes *lhcf* des algues brunes *M. pyrifera* (Apt *et al.*, 1995) et *L. saccharina* (Caron *et al.*, 1996; De Martino *et al.*, 2000) et également une forte similarité avec les gènes *lhcf* des plantes supérieures (Grossman *et al.*, 1990; Manodori et Grossman, 1990). Les séquences des protéines matures sont également similaires et la plupart des différences sont des mutations nucléotidiques conservatives ou neutres. Chez *P. tricornutum*, la séquence de six gènes *lhcf* différents a été décrite (Bhaya et Grossman, 1993). Ces gènes sont organisés

en deux clusters ou groupes de gènes (un de quatre et un de eux). Chez *L. saccharina* et *G. stellifer*, cette organisation n'a pas été mise en évidence (Passaquet et Lichtlé, 1995; Caron *et al.*, 1996). Il existe certainement plus de six gènes *lhcf* chez les diatomées car huit cDNAs ont été décelés chez *S. costatum* (Janssen *et al.*, 2001), deux nouveaux *lhcf* en plus des six déjà identifiés chez *P. tricornutum* ont été trouvés chez *C. cryptica* (Janssen *et al.*, 2001) et enfin environ une vingtaine ont été révélés par la réalisation d'ESTs chez *P. tricornutum* (Scala *et al.*, 2002).

#### **II- 2. 4. La structure tridimensionnelle des LHCF et les sites de fixation des pigments.**

La structure tridimensionnelle des protéines des complexes antennes des plantes supérieures a déjà été présenté (voir § I- 1. 2. 3. b. , Fig. 6, p 29-30). L'environnement protéique confère une orientation bien précise aux pigments afin d'assurer l'efficacité du transfert de l'énergie lumineuse absorbée depuis les caroténoïdes jusqu'à l'accepteur terminal d'énergie, la Chl *a* des centres réactionnels.

Les profils d'hydrophobicité des séquences polypeptidiques déduites des séquences codantes des différents gènes *lhcf* d'algues à Chl *a/c*, prédisent tous trois domaines hydrophobes. Les séquences révèlent suffisamment d'homologies avec les gènes des complexes antennes des plantes vertes pour conclure à l'existence d'une structure tridimensionnelle de même type pour tous les complexes antennes (pour revue voir Green et Durnford, 1996). De plus, chez la diatomée *P. tricornutum* et l'algue brune *Pavlova lutherii*, une structure secondaire du complexe antenne similaire à celle des plantes vertes est trouvée : 40 % d'hélices  $\alpha$  et 15 % d'hélices  $\beta$  (Hiller *et al.*, 1987). En comparaison de la structure découverte chez les végétaux verts (voir § I- 1. 2. 3. b. , Fig. 6, p 29-30) (Kühlbrandt *et al.*, 1994), les régions les plus conservées chez les organismes à Chl *a/c* concernent deux régions des deux hélices A et B (les hélices "croisées"), qui comprennent la première moitié de chaque hélice ainsi que les séquences situées juste en amont correspondant à l'extrémité des boucles de connexions (35 et 60 % d'identité). Plus précisément, les paires d'acides aminés E180/R70 et E65/R185 fixant quatre molécules de Chl *a* et impliquées dans la stabilisation de la structure en croix entre les deux hélices A et B (Kühlbrandt *et al.*, 1994) sont strictement conservées chez les organismes à Chl *a/c*.

Le reste des boucles de connexion entre les hélices transmembranaires est moins conservé, mais ces régions ont la particularité d'être composées de 20 à 25 acides aminés chez tous les gènes *lhcf* à Chl *a/c* étudiés, alors que chez les organismes à Chl *a/b*, ces boucles sont composées d'un nombre variable d'acides aminés (8 à 31 acides aminés) selon l'espèce et la protéine considérée. D'autre part, contrairement aux plantes vertes, une forte identité est trouvée entre les séquences de l'hélice C des différents organismes à Chl *a/c* (Passaquet et Lichtlé, 1995). La quatrième hélice courte (hélice D) identifiée à l'extrémité C-terminale de la protéine LHCII, n'est pas présente chez les organismes à Chl *a/c*.

Chez l'algue brune *Laminaria saccharina*, la plupart des sites de fixation des Chl identifiés sur les séquences de gènes *lhcf* sont conservés (7 sur 8) par rapport à la structure atomique du LHCII des végétaux verts (Scala *et al.*, 2002). Ces sites pourraient lier la Chl *a* ou la Chl *c*. Ceci confirme le fait que les protéines fixatrices de Chl *a* présentent des caractéristiques structurales communes, notamment au niveau des sites de fixation de la Chl *a* (Grossman *et al.*, 1990; Green et Kuhlbrandt, 1995). De plus des données de dichroïsme linéaire et circulaire chez les diatomées et autres organismes à Chl *a/c* ont montré que les Chl sont organisées de façon quasi-similaire à ce que l'on observe chez les organismes à Chl *a/b* (Hsu et Lee, 1987; Hiller et Breton, 1992; Paulsen, 1995). Si les sites de fixation des Chl semblent relativement conservés, la localisation des xanthophylles est beaucoup plus floue et n'a pas encore été déterminée. Pour les protéines LHC des plantes supérieures, un certain nombre de séquences très conservées trouvées dans les boucles reliant les hélices sont considérées comme les sites de fixation des xanthophylles (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Ces sites sont seulement partiellement conservés pour les complexes LHCF. Un site nécessaire à la fixation d'une xanthophylle dans l'hélice B des plantes vertes est conservé dans l'hélice B des LHCF.

Chez les algues brunes, un monomère de LHCF comporte 2 Chl *c* et 8 fucoxanthine pour 7 Chl *a* (De Martino *et al.*, 1997; Pascal *et al.*, 1998; De Martino *et al.*, 2000) soit un nombre beaucoup plus important de xanthophylles que les plantes vertes. La proportion de xanthophylles par rapport à la Chl *a* semble encore plus élevée chez les diatomées avec deux fois plus de fucoxanthine par Chl *a* (Alberte *et al.*, 1981; Gugliemelli *et al.*, 1981; Friedman et Alberte, 1984; Owens et Wold, 1986). La spectroscopie Raman a montré que parmi les huit molécules de fucoxanthine, deux sont déformées par une torsion autour d'une liaison carbone-carbone (Pascal *et al.*, 1998). Ceci indique des interactions entre la protéine et les molécules de fucoxanthine tout le long de la chaîne carbonée des pigments comme cela a été montré

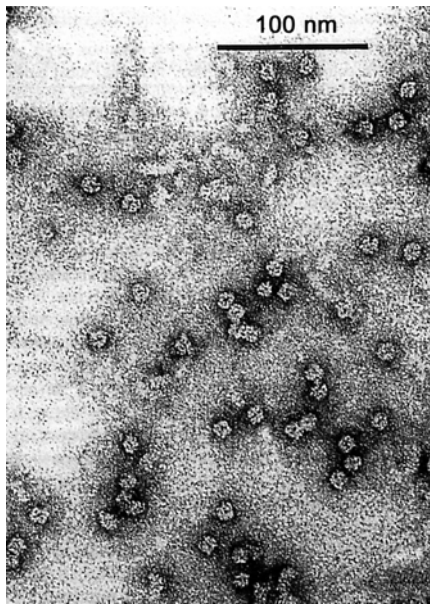


pour deux molécules de lutéine impliquées dans la stabilisation du complexe antenne des végétaux verts (Kühlbrandt *et al.*, 1994). Ainsi, deux molécules de fucoxanthine auraient une localisation centrale dans le complexe antenne LHCF. Qu'en est-il des autres molécules de fucoxanthine ? Leur localisation est sans doute plus périphérique (B. Robert et A. Pascal, com. pers.) et proche de molécules de Chl *a* ou *c* vu la rapidité du transfert d'énergie (Trautman *et al.*, 1990; Mimuro et Katoh, 1991). Les sites exacts de fixation de la DD au sein du complexe LHCF demeurent inconnus.

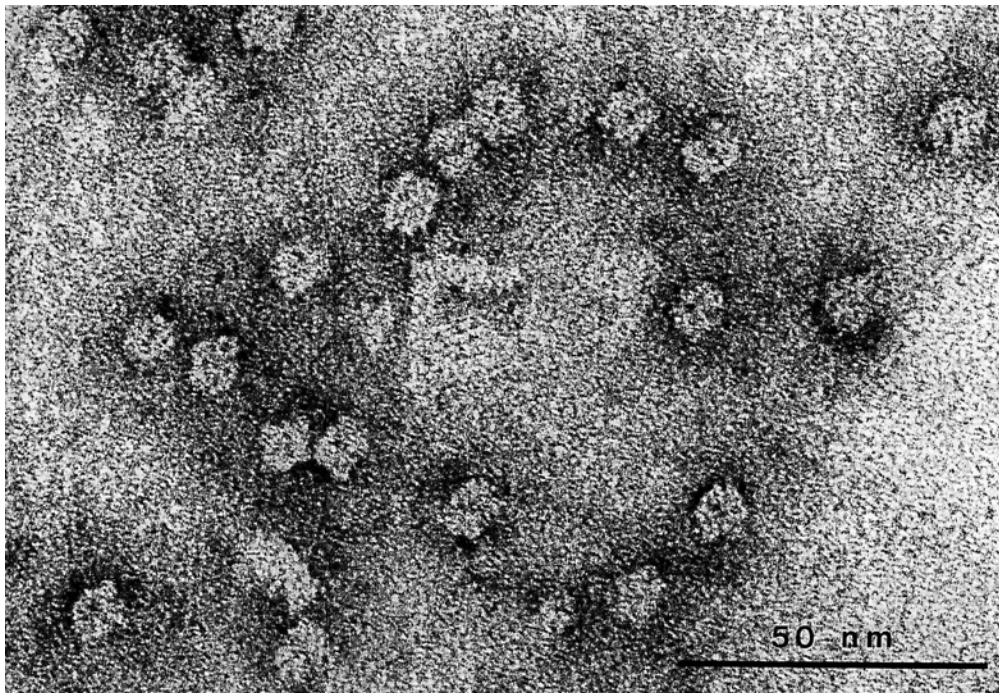
## II- 2. 5. Hétérogénéité structurale et fonctionnelle des LHCF.

Malgré une similarité importante entre les protéines LHCF des diatomées et LHC des plantes vertes, les complexes LHCF ne peuvent être comparés directement aux complexes antennes des végétaux supérieurs à cause de différences ultrastructurales et fonctionnelles importantes. Les différences de structure des plastes et notamment l'absence de grana au niveau des thylakoïdes ont déjà été mentionnées : les complexes antennes et les PS I et II sont répartis de façon relativement homogène le long des thylakoïdes (voir § II- 1. 4. ).

L'organisation macromoléculaire exacte des LHCF dans la membrane thylakoïdale n'est pas connue. Les études par microscopie électronique de cryofractures de thylakoïdes d'algues brunes ont montré que les complexes antennes formaient, *in vivo*, des particules relativement grosses insérées dans les membranes thylakoïdales (Berkaloff *et al.*, 1983). Des formes oligomériques LHCF de masses moléculaires apparentes de 120 à 240 kDa (Passaquet *et al.*, 1991) et même des formes encore plus lourdes (jusqu'à 380 kDa) (Gugliemelli, 1984; Katoh *et al.*, 1989; Katoh et Ehara, 1990) ont été isolées en utilisant des détergents très doux. Chez les végétaux supérieurs le phosphatidyl-glycérol est impliqué dans la stabilité des trimères de LHCF (Trémolières *et al.*, 1981). Cet acide gras est également présent dans le macrocomplexe LHCF isolé sur gradient de saccharose, d'une algue brune (*Fucus serratus*) (Caron *et al.*, 1985). Cependant, l'existence d'associations trimériques analogues à celles décrites pour les LHCF des plantes supérieures (voir § I- 1. 2. 3. b. , Fig. 7) n'a pas été mise en évidence. Au contraire, les macrocomplexes LHCF isolés chez des algues brunes (*Dictyota dichotoma* et *Petalonia fascia*) sont discoïdes et présentent un diamètre de 11 nm, une hauteur de 10 nm et un trou au centre du disque (Fig. 31). Ils sont composés de sept unités de 54 kDa contenant chacune 13 Chl *a*, 3 Chl *c*, 10 fucoxanthine et 1 VX (Katoh *et al.*, 1989; Katoh et Ehara, 1990). Les transferts d'énergie entre pigments au sein de ces macrocomplexes sont très efficaces. Ils sont unidirectionnels et concernent la Chl *c* et la Chl *a*, et la fucoxanthine et la



**Fig. 31 :**  
Complexes macromoléculaires de complexes antennes à Chl *a*/Chl *c*/fucoxanthine de l'algue brune *Petalonia faschia*. Chaque macrocomplexe a une forme discoïde de 11 nm de diamètre et 10 nm de hauteur percée d'une petite dépression en son centre. Il est composé de 7 sous-unités de 54 kDa (Kato et Ehara, 1990).



Chl *a* (Mimuro *et al.*, 1990). Chez les diatomées, aucune information n'est disponible concernant l'organisation exacte des oligomères de LHCF.

Jusqu'à maintenant, la présence de plusieurs types de LHCF (associés ou non aux photosystèmes, voir § I-1.2.3.) n'a pas été établie que ce soit par des méthodes biochimiques et/ou spectroscopiques. Malgré la mise en évidence de deux pools LHCF plus intimement liés à chaque photosystème, il semble qu'il n'existe pas clairement chez les algues à Chl *a/c* de complexes LHCI ou LHCII différenciés comme chez les Chlorophytes et Rhodophytes (Scmitt *et al.*, 1993; Douady *et al.*, 1994; De Martino *et al.*, 1997, 2000). En

effet, chez *Laminaria saccharina*, la purification par action d'un second détergent non ionique des complexes restant liés aux photosystèmes après l'action du premier détergent, n'a pas permis de distinguer les fractions ainsi obtenues du LHCF majeur. Les caractéristiques pigmentaires, polypeptidiques et immunologiques de ces deux fractions sont très proches de celles du LHCF majeur (Berkaloff *et al.*, 1990; Douady *et al.*, 1994; De Martino *et al.*, 1997, 2000). La seule distinction concerne l'hydrophobicité plus forte des polypeptides du complexe lié au PS I (Douady *et al.*, 1994). De manière similaire aux algues à Chl *a/c*, chez les Prasinophycées, une classe primitive des Chlorophytes contenant de la Chl *a/b/c*, il n'y a pas de grana et les complexes antennes sont répartis de façon homogène le long des thylakoïdes (Dwarte et Vesk, 1982; Krämer *et al.*, 1988). Dans ce cadre, il est intéressant de noter que chez une de ces algues Prasinophycées, *Mantoniella squamata*, il n'existe pas de distinction biochimique d'antennes spécifiques à chaque photosystème mais une antenne majeure capable de distribuer l'énergie collectée aux deux photosystèmes (Schmitt *et al.*, 1993).

L'absence d'antennes propres aux deux photosystèmes est également à rapprocher avec le fait que le LHCF majeur est capable de transmettre équitablement l'énergie lumineuse absorbée aux molécules de Chl des deux photosystèmes (Owens, 1986; Smith et Melis, 1987). Ceci implique une absence de transition d'états chez les diatomées et algues brunes (Owens, 1986; Smith et Melis, 1987; Wilhelm, 1990; Fork *et al.*, 1991). Il est intéressant de noter que selon certains auteurs (Caron *et al.*, 1996; Dunford *et al.*, 1999), les gènes codant pour les LHCF auraient divergés de ceux codant pour les LHC de plantes supérieures avant la séparation fonctionnelle des deux classes de gènes *lhcl* et *lhcll* codant pour les antennes associées spécifiquement aux PS I et PS II chez les végétaux verts (voir § I- 1. 2. 3. ).

## II- 3. L'ADAPTATION DES DIATOMEES AUX VARIATIONS LUMINEUSES.

### II- 3. 1. "The phytoplanktonic way of life".

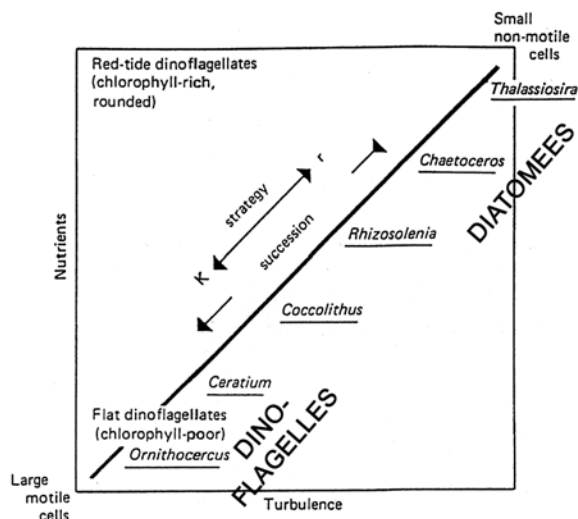
Les diatomées planctoniques sont particulièrement abondantes dans les eaux marines ou dulçaquicoles turbulentes (Werner, 1977; Malone *et al.*, 1983; Harris, 1986; Fogg, 1991; Reynolds, 2002). Ainsi, en milieu marin vont-elles dominer les autres groupes phytoplanktoniques dans les régions d'"up-welling" (van den Hoek *et al.*, 1995) et dans les écosystèmes aquatiques continentaux au début du printemps et de l'automne lors du mélange de la colonne d'eau par les coups de vent de fin d'hiver ou de début d'automne (Reynolds,

2002). Par contre lorsque la colonne d'eau est stratifiée, les diatomées disparaissent, généralement au profit des algues vertes, des cyanobactéries et/ou des dinoflagellés, parce qu'elles sédimentent plus ou moins lentement à une vitesse de 0,1 à 1 m/j (Bienfang, 1980). Cependant, en milieu marin, les marges continentales sont soumises à des "coups de vent" (en moyenne tous les quatre à cinq jours) qui mélangent la colonne d'eau. Ceci engendre à nouveau une dominance des diatomées le long de la colonne (Falkowski et Wirick, 1981; Malone *et al.*, 1983). Cette vision est bien à l'évidence simplificatrice et l'on observe des diatomées, particulièrement les plus petites, dans des eaux stratifiées comme certaines espèces de cyanobactéries et de dinoflagellés dans des eaux turbulentes (Fogg, 1991). Cependant la prépondérance des diatomées dans les eaux turbulentes est un fait établi. Par exemple, le degré de turbulence optimal des diatomées est de 2 à 100  $\text{cm}^2.\text{s}^{-1}$  alors qu'il est cent fois moindre pour les dinoflagellés (Fogg, 1991).

Les variations de deux facteurs environnementaux sont essentielles pour expliquer la dominance des diatomées planctoniques en milieu turbulent : les nutriments et la lumière (Litchman, 2000). En effet, lorsque la colonne d'eau est stratifiée (stratification thermique ou saline), les organismes phytoplanctoniques "bloqués" en surface peuvent absorber la lumière nécessaire à la photosynthèse mais finissent par épuiser le milieu en nutriments. Apparaissent alors des organismes capables de nager comme les dinoflagellés, ou de réguler efficacement leur flottaison, comme les cyanobactéries possédant des vacuoles à gaz. Cette capacité à se mouvoir apporte à ces deux groupes un avantage évident qui leur permet de ne pas sédimenter mais aussi de profiter de la lumière disponible en surface tout en pouvant accéder aux profondeurs plus riches en nutriments. Ainsi, les dinoflagellés et les cyanobactéries montrent des profils de migration journaliers très précis : vers la surface le jour pour absorber la lumière nécessaire à la photosynthèse, vers les profondeurs la nuit pour absorber les nutriments (pour revue voir Fogg, 1991 et également la partie en Annexe). Les diatomées ne possédant pas de capacités motrices suffisantes (comme les dinoflagellés et cyanobactéries avec vacuoles) et présentant une densité importante à cause de leur frustule (contrairement aux cyanobactéries sans vacuoles et aux algues vertes) ne peuvent se maintenir dans la colonne et donc accéder à la lumière indispensable pour leur photosynthèse que si l'eau est mélangée. Elles profitent d'autant plus de cette situation que le mélange a tendance à remettre en suspension les nutriments accumulés dans les sédiments et qui vont enrichir les eaux. Cependant, la différence cruciale ne se situe pas au niveau des nutriments (on pourrait imaginer les diatomées moins aptes à absorber les sels nutritifs lorsque ceux-ci sont en

concentration faible contrairement aux cyanobactéries par exemple (voir partie en Annexe) mais bien au niveau du mélange des eaux en lui-même : de façon générale, les diatomées se complaisent dans les milieux chaotiques et “fuient” les milieux trop stables car elles sédimentent à cause de leur frustule. Ceci a clairement été démontré *in situ* en imposant, dans un milieu enrichi en nutriments pour éviter toute carence, des périodes alternées de 3 à 4 semaines de mélanges/(re)stratification (Fogg, 1991). On a pu ainsi observer des eaux dominées par les diatomées lors du mélange et à l’autre extrémité une prépondérance de dinoflagellés et cyanobactéries à vacuoles lors d’une stratification complète.

Ces différentes caractéristiques expliquent par exemple la succession saisonnière observée dans les écosystèmes eau douce dès lors que la colonne d’eau est thermiquement stratifiée, et qui peut être schématisée comme suit : après le bloom printanier de diatomées lorsque le régime de mélange des eaux est encore important, les algues vertes et les cyanobactéries sans vacuoles deviennent plus abondantes (elles profitent à la fois de leur petite taille et de leur faible densité qui les empêchent de sédimer et des nutriments encore abondants dans la couche de surface), puis les cyanobactéries à vacuoles et les dinoflagellés prennent le dessus lorsque la couche en surface est épuisée en nutriments jusqu’à un retour à une colonne mélangée à la fin de l’été, début de l’automne qui voit le retour possible des diatomées si la force de mélange est suffisante pour maintenir les diatomées dans la colonne et pour remettre en suspension suffisamment des nutriments accumulés dans les sédiments pendant plusieurs mois (pour des études *in situ* récentes voir Huszar et Caraco, 1998; Oliver et Ganf, 2000). Ce type de succession est également envisageable en milieu marin (Fig. 32) (Sournia, 1982a). Au lieu de se succéder dans un même milieu, ces groupes d’organismes peuvent également co-exister en milieu marin au niveau d’un front dû par exemple aux courant de marées (Fogg, 1991).



**Fig. 32 : Exemple de succession écologique en milieu marin en fonction de la concentration en nutriments et de la turbulence. Les diatomées sont typiquement rencontrées dans des eaux turbulentes et riches en nutriments au contraire des dinoflagellés (modifié d’après Sournia, 1982a).**

### II- 3. 2. Les diatomées et les fluctuations de lumière.

Ce succès adaptatif des diatomées planctoniques dans les eaux turbulentes est directement lié à un autre facteur environnemental important : la lumière dont la disponibilité même est soumise à la force de mélange des eaux. En effet, les diatomées dépendant de la turbulence des eaux pour se maintenir dans la colonne et particulièrement dans la zone euphotique, elles doivent faire face à un inconvénient majeur pour un organisme photosynthétique dans ce type d'habitat : les variations de l'intensité lumineuse auxquelles elles sont exposées. En fonction de la force de mélange des eaux, que ce soit en milieu océanique (Denman et Gargett, 1983; Neale, 1987; Long *et al.*, 1994; MacIntyre *et al.*, 2000) ou dans un lac (Harris, 1986), les déplacements verticaux du phytoplancton peuvent énormément varier et peuvent être très rapides : de 0,5 à 100 h pour un déplacement vertical de 10 m. Lorsque la colonne d'eau est stratifiée, la force de mélange de la couche de surface répond très rapidement à une induction météorologique comme le vent et les organismes se voient entraînés de la surface à la base de cette couche en 1 h seulement et vice versa (Denman et Gargett, 1983; Imberger, 1985). Si le coup de vent est fort, le mélange atteint une zone plus profonde que la thermocline. Durant ces périodes alternatives de mélange-stratification/sédimentation-mélange, les cellules sont exposées à des variations d'intensité lumineuse auxquelles se surimpose le cycle journalier de la lumière (Falkowski et Wirick, 1981; Denman et Gargett, 1983). De ce fait, des algues acclimatées à des faibles intensités comme celles rencontrées au bas de la zone euphotique peuvent être rapidement transportées vers la surface où, en fonction des conditions d'ensoleillement, elles peuvent être exposées à de fortes intensités lumineuses synonymes de stress lumineux et de photoinhibition potentielle (Neale, 1987; Fogg, 1991; Long *et al.*, 1994).

C'est ainsi que les diatomées présentent une capacité à survivre à de fortes variations de l'intensité lumineuse (rayonnements visibles et ultraviolets), du plein soleil en surface jusqu'à l'obscurité totale sous la zone euphotique (Fogg, 1991; Reynolds, 2002). A l'inverse, les dinoflagellés et les cyanobactéries ont une marge de manœuvre plus restreinte et ne peuvent supporter de fluctuations trop importantes (Fogg, 1991). Il a également été montré que le taux de croissance et la capacité photosynthétique des diatomées ne sont pas affectés par les lumières fluctuantes voire sont même augmentés (Litchman, 1998; Nicklisch, 1998; Litchman, 2000). Ces observations sont opposées aux résultats obtenus chez la plupart des espèces représentant les autres groupes d'organismes : algues vertes, cyanobactéries et dinoflagellés (pour revue voir Litchman, 2000). Ainsi, les diatomées croissent mieux et fixent

plus de carbone sous un régime lumineux alternant des périodes de 2 h de lumière, 2 h d'obscurité que sous un régime alternant des périodes de 12 h ou sous un régime de lumière continue (Marra, 1978; Mortain-Bertrand *et al.*, 1987; Caron *et al.*, 1988). Les périodes d'obscurité fréquentes dans un régime lumineux fluctuant seraient également nécessaires aux diatomées pour aboutir à un meilleur équilibre entre l'absorption de l'énergie lumineuse et son utilisation (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987). Ainsi, Hobson *et al.* (1985) ont montré que la concentration en Rubisco chez *Thalassiosira fluviatilis* est plus grande en lumière fluctuante que sous un régime continu. Cette propriété serait également liée à une voie de fixation du carbone spécifique aux diatomées impliquant la voie classique en C<sub>3</sub> (cycle de Calvin) à laquelle se surimpose une voie dite de "β-carboxylations" en régime lumineux fluctuant (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987, 1988).

Post *et al.* (1984) ont suggéré une meilleure capacité des diatomées par rapport aux autres groupes d'algues non seulement de résister mais aussi d'optimiser l'utilisation d'une soudaine augmentation de l'intensité lumineuse. Ces observations sont interprétées de façon générale *in situ* comme suit : les fluctuations lumineuses dues au mélange des eaux stimulent la croissance des diatomées et au contraire inhibent celle des algues vertes et cyanobactéries tandis que lors d'une stratification de la colonne d'eau, la croissance des cyanobactéries est favorisée tandis que celle des diatomées et algues vertes n'est pas affectée (Litchman, 2000). Ainsi, non seulement les diatomées (de façon générale) semblent capables d'utiliser les fluctuations lumineuses mais elles sont aussi capables de supporter des expositions à des intensités fortes ou faibles plus longues. Elles régulent donc le flux d'énergie lumineuse à court terme mais aussi à plus long terme; l'échelle de temps étant considérée comme inférieure à 2 h pour le court terme et supérieure à 5 h pour le long terme (Fogg, 1991). Que connaissons nous actuellement des mécanismes d'adaptation sur ces deux échelles de temps chez les diatomées ?

### II- 3. 3. Mécanismes d'adaptation à court terme.

Les stratégies adaptatives classées dans cette catégorie correspondent à des phénomènes physiologiques au sein de l'appareil photosynthétique qui n'impliquent pas de régulation au niveau des gènes, protéines et pigments contrairement aux mécanismes d'adaptation à long terme. Les travaux conduits dans ce cadre chez les diatomées sont relativement peu nombreux spécialement en ce qui concerne le rôle du cycle des xanthophylles et du quenching non-photochimique de fluorescence (NPQ) dans la dissipation

photoprotectrice de l'énergie lumineuse en excès (voir § I- 3. 1. 2. ) qui nous intéressent plus particulièrement. Owens (1986) a le premier suggéré que l'organisation particulière du complexe antenne des diatomées (un macrocomplexe transférant l'énergie aux deux photosystèmes) pourrait expliquer leur succès dans l'optimisation de l'utilisation des intensités fluctuantes grâce notamment au contrôle du transfert de l'énergie d'excitation au sein de l'antenne qui pourrait faire intervenir le cycle des xanthophylles et la dissipation de l'énergie en excès.

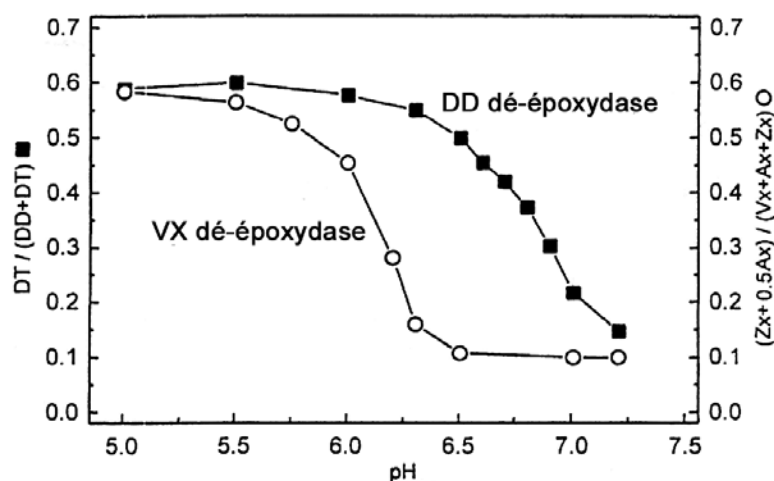
### II- 3. 3. 1. Le cycle des xanthophylles.

Chez les diatomées, la mise en évidence d'un cycle des xanthophylles différent de celui observé chez les plantes et algues vertes et les algues brunes (entre autres) date de 1970 (Hager et Stransky, 1970). Nous savons que ce cycle correspond à la conversion enzymatique rapide de la xanthophylle mono-époxydée DD en la forme dé-époxydée DT sous forte lumière et la réaction inverse plus lente sous faible lumière et à l'obscurité de façon comparable au cycle largement étudié chez les plantes vertes (Demers *et al.*, 1991; Willemoës et Monas, 1991; Arsalane *et al.*, 1994; Casper-Lindley et Bjorkman, 1998). Les mesures du cycle de la DD *in situ* sont peu nombreuses (du fait des difficultés techniques) mais rejoignent, mis à part quelques exceptions (Olaizola *et al.*, 1992), les observations réalisées en laboratoire. Le cycle a été observé au cours d'un bloom de diatomées au début de l'été en région tempérée (Klein et Sournia, 1987) et au printemps dans une région subarctique (Olaizola *et al.*, 1992). L'accumulation de la DT dépend de l'intensité lumineuse locale et varie donc avec les saisons, au cours de la journée, avec la profondeur et la turbidité des eaux (Olaizola *et al.*, 1992; Brunet *et al.*, 1993; Rmiki *et al.*, 1996). Au cours de la journée, une proportion importante de DT est observée dès le lever du soleil si les eaux sont claires et un pic de DT a souvent lieu vers midi ou dans l'après-midi. Cette DT est ensuite époxydée en DD au cours de la nuit mais peut persister pendant 3 à 4 heures (Willemoës et Monas, 1991; Brunet *et al.*, 1993; Rmiki *et al.*, 1996).

Pour le reste, c'est-à-dire la localisation des enzymes, leur régulation et particulièrement les cofacteurs impliqués, la localisation du cycle, etc... l'on doit se référer aux nombreux travaux réalisés sur les plantes supérieures (voir § I- 3. 1. 2. c. , pour revues voir Pfündel et Bilger, 1994; Eskling *et al.*, 1997). Une seule étude concernant cet aspect du cycle de la DD est à mettre au crédit de Jakob et Wilhelm (2001). Ces auteurs ont montré, *in vitro*, que la DD dé-époxydase nécessite tout comme son homologue, la VX dé-époxydase, le



cofacteur ascorbate pour fonctionner. Par ailleurs, la DD dé-époxydase est capable de dé-époxyder aussi bien la DD que la VX ce qui explique la présence des deux cycles chez les diatomées dans des conditions d'illumination particulières (Lohr et Wilhelm, 1999). Enfin, cette enzyme est activée par un pH relativement basique en comparaison de son homologue VX dé-époxydase (Fig. 33). Ainsi, la DD dé-époxydase est activée par un faible gradient de protons transthylakoïdal ( $\Delta pH$ ) et à pH 6,3 alors que la dé-époxydation de la DD est quasi maximale, celle de la VX n'a qu'à peine débuté. Ce résultat très important signifie que chez les diatomées l'accumulation de la DT débute pour des intensités plus faibles ou pour des temps d'illumination plus courts que pour la VX chez les plantes vertes.

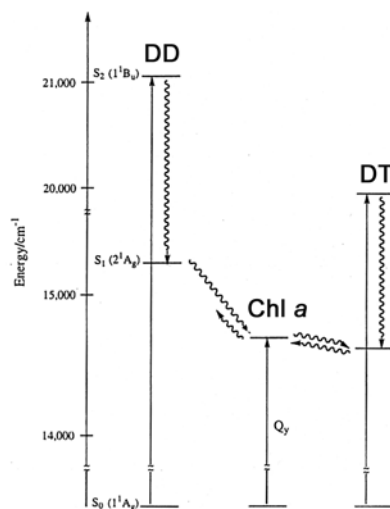


**Fig. 33 :** Activité de la DD dé-époxydase de *Phaeodactylum tricornutum* et de la VX dé-époxydase d'épinard en fonction du pH. Le Taux de dé-époxydation est mesuré par le ratio entre les formes dé-époxydées et le pool total de xanthophylles ( $DT/DD+DT$  et  $ZX+0,5AX/VX+AX+ZX$ ) (modifié d'après Jakob *et al.*, 2001).

Il a été récemment montré que le  $Ca^{2+}$  aurait un rôle indirect dans la régulation de la dé-époxydase en influant sur l'activité de l'ATP synthase et donc sur l'étendue du gradient de protons transthylakoïdal qui agit directement sur l'activité de la dé-époxydase (voir § I-3. 1. 2. c.). Dans ce cadre, il est intéressant de noter que les ions  $Ca^{2+}$  interviennent chez les diatomées dans la perception des signaux environnementaux, comme la force de mélange des eaux et la concentration en certains nutriments comme le Fer (Falciatore *et al.*, 2000). Le  $Ca^{2+}$  est également soupçonné de participer à la perception des signaux lumineux ainsi qu'à la transduction de ces signaux afin de réguler certaines voies physiologiques et métaboliques chez les diatomées en fonction de l'intensité et la qualité de la lumière (Falciatore *et al.*, 2000).

II- 3. 3. 2. Le NPQ associé au cycle des xanthophylles.

La première corrélation entre l'accumulation de la DT et le développement du NPQ en comparaison des observations faites chez les plantes vertes date de la fin des années 80, début des années 90. Sakshaug *et al.* (1987) notent pour la première fois que chez la diatomée *Thalassiosira pseudonana*, une plus forte concentration de DT semble liée à un quenching de fluorescence plus important et ce quenching semble lié à la formation du gradient de protons transthylakoïdal. Plus tard, d'autres font la même observation (Mortain-Bertrand et Falkowski, 1989 ; Demers *et al.*, 1991) mais en utilisant une instrumentation mal adaptée (la cytométrie de flux) pour mesurer le quenching de fluorescence. Ce n'est qu'ensuite, avec l'utilisation de la fluorescence modulée (voir § I- 2. 2. ), que la relation entre ces deux phénomènes est clairement établie (Arsalane *et al.*, 1994; Olaizola et Yamamoto, 1994; Olaizola *et al.*, 1994; Casper-Lindley et Bjorkman, 1998). Ainsi l'accumulation de la DT est corrélée de façon linéaire au développement d'un quenching de fluorescence des centres réactionnels PS II fermés ( $F_m$ ) mais aussi des centres ouverts ( $F_o$ ) (voir § I- 2. 3.). De plus des études *in vitro* sur les différences de niveaux d'énergie entre la DD, la DT et la Chl *a* ont été réalisées à l'instar de ce qui a été effectué pour le cycle de la VX (voir § I- 3. 1. 2. c. ). Ces expérimentations montrent qu'il est possible d'envisager une interaction directe entre les xanthophylles et la Chl *a* avec des rôles différents pour la DD et la DT dus à leur différence de niveaux d'énergie par rapport à la Chl *a*. Ainsi, la DT serait capable de "quencher" directement la Chl *a* au contraire de la DD qui absorberait seulement les photons pour les transmettre à la Chl *a* (Fig. 34) (Frank *et al.*, 1996). Cette vision a été récemment remise en cause pour l'ensemble des xanthophylles des deux cycles (VX et DD), la différence entre les niveaux d'énergie étant trop faible pour que ce modèle soit totalement valide *in vivo* (voir § I- 3. 1. 2. c. ) (Polvika *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 2000).



**Fig. 34 :** Niveaux d'énergie des états excités  $S_1$  et  $S_2$  de la DD et de la DT par rapport à celui de la Chl *a* excitée ( $^1\text{Chl}^*$ ). Les flèches droites représentent les changements de niveaux d'énergie après l'absorption d'un photon, les flèches torsadées représentent les voies hypothétiques des transferts d'énergie entre pigments. Ainsi, la DT peut "quencher" la  $^1\text{Chl}^*$  car son niveau d'énergie  $S_1$  est plus bas que celui de la Chl *a* au contraire de la DD (Frank *et al.*, 1996).

Le rôle de la DT et du NPQ dans la photoprotection des diatomées a d'abord été abordé de manière théorique (Olaizola et Yamamoto, 1994) puis expérimentale en partie à l'ENS Paris (Arsalane *et al.*, 1994; Olaizola *et al.*, 1994). Les premiers auteurs arrivèrent à la conclusion qu'un plus grand pool de DD (et donc de DT) entraîne un NPQ plus grand et une meilleure photoprotection. Cependant, deux points sont critiquables : l'enrichissement en DD et la mesure de la photoprotection. En effet, le plus grand pool de DD est obtenu par vieillissement de la culture (cellules en phase stationnaire) ce qui entraîne également la modification de la physiologie générale des cellules (et plus particulièrement une diminution du potentiel photosynthétique). D'autre part, les conclusions concernant la photoprotection sont basées sur l'observation que, sous une forte intensité lumineuse, le temps pour atteindre le point de compensation entre l'émission d'O<sub>2</sub> photosynthétique et sa consommation par la respiration est plus long quand la concentration en DT est plus importante. Bien que j'ai moi-même reproduit cette mesure de la photoinhibition avec succès sur du matériel biologique plus fiable (voir Chapitre III-Résultats et Discussion, § 2-), celle-ci reste peu reproductible et surtout très indirecte. En effet, il est bien connu que chez les organismes phytoplanctoniques en général, la diminution de l'émission d'O<sub>2</sub> due à la photoinhibition est simultanée avec une augmentation du taux de respiration soit avec l'intensité lumineuse, soit avec la durée de l'éclairement (Falkowski et Owens, 1978; Beardall *et al.*, 1994). Pour les seconds (Olaizola *et al.*, 1994), le pool de DT est modulé en ajoutant du dithiothréitol, un inhibiteur de la dé-époxydase connu pour avoir d'autres effets sur l'appareil photosynthétique (Pfündel et Bilger, 1994). De plus, pour cette étude, les algues étant cultivées (photoacclimatées) à une intensité lumineuse relativement forte, les résultats obtenus sont difficilement exploitables et semblent dérouter les auteurs eux-mêmes ! Au début de ce travail de thèse, la situation concernant le rôle potentiel de la DT, et du NPQ associé, dans la photoprotection des diatomées était donc relativement floue et le sujet peu abordé à l'inverse de la situation existante pour les phénomènes similaires chez les plantes vertes.

### **II- 3. 4. Mécanismes d'adaptation à long terme.**

Dans le milieu aquatique, les changements d'intensité lumineuse sont toujours liés aux changements de qualité spectrale; avec la diminution de l'intensité en profondeur, le spectre se réduit aux radiations bleues-vertes et le spectre solaire n'est pas le même à l'aube, au crépuscule et lorsque le soleil est au zénith. L'acclimatation des organismes photosynthétiques à la qualité et la quantité de lumière a été compilée pour les végétaux verts

(voir § I- 3. 2. ) et les algues (Falkowski et Laroche, 1991). Ici, nous traiterons seulement des diatomées planctoniques en ne considérant que l'acclimatation de l'appareil photosynthétique à un changement lumineux progressif ou brutal mais prolongé (en excluant les rythmes circadiens qui forment un autre ensemble de variations; Post *et al.*, 1984). Ce processus d'acclimatation a lieu relativement rapidement puisqu'il est en général inférieur ou comparable au temps de génération (Falkowski et Laroche, 1991). Il permet aux diatomées et organismes photosynthétiques en général d'ajuster leur performance photosynthétiques et donc leur croissance (voir Cosper, 1982) et leur survie aux variations lumineuses de faible fréquence (de quelques heures à quelques jours). La plupart des travaux réalisés chez les diatomées ont eu pour sujet l'acclimatation aux changements d'intensité lumineuse (du plein soleil à l'obscurité), moins aux changements de qualité spectrale.

#### II- 3. 4. 1. L'acclimatation aux changements spectraux.

Chez les diatomées, il semble que l'intensité lumineuse joue un rôle plus important que la qualité de la lumière dans la photoacclimatation (Falkowski et Laroche, 1991). Cependant de récents résultats suggèrent l'existence de photorécepteurs de lumière bleue, verte et rouge chez les diatomées et leur possible implication dans la régulation de l'expression des gènes *lhcf* et de la synthèse des protéines des complexes antennes (voir § II- 3. 4. 3. ).

La culture des diatomées *Detonula* sp. et *P. tricorutum* en lumière rouge s'accompagne d'une augmentation du nombre de thylakoïdes, une augmentation du nombre de PS I couplée à une diminution des PS II et une diminution de la Chl *c* et de la fucoxanthine (*Detonula* sp.) ou pas de diminution de la Chl *c* (*P. tricorutum*) sans changement du rapport Chl *a*/caroténoïdes (Jupin, 1973; Caron *et al.*, 1983) et une diminution du taux de croissance (Caron *et al.*, 1983). On observe également, l'apparition d'une nouvelle forme chlorophyllienne qui résulterait d'un réarrangement de sous-unités LHCF déconnectées du complexe antenne majeur mais dont la fonction demeure inconnue (Jupin et Giraud, 1971; Caron *et al.*, 1983).

La culture de *Stephanopyxis turris* et *Cyclotella nana* en lumière bleue-verte entraîne également une diminution du taux de croissance, une augmentation du nombre de plastes, une augmentation et réarrangement des thylakoïdes (ils sont plus arrondis et rassemblés en groupes supérieurs à trois thylakoïdes), une augmentation de la Chl *a* sans modification du

rapport Chl *a*/caroténoïdes (Jeffrey et Vesk, 1977; Caron *et al.*, 1983). Comme déjà suggéré (Jeffrey et Vesk, 1977), il n'existe pas chez les diatomées de processus similaire à l'adaptation chromatique complémentaire des cyanobactéries visant à favoriser les pigments (ici les caroténoïdes) qui absorbent la lumière bleue-verte. Au contraire, sous une telle lumière, on observe une forte augmentation des pigments totaux (100 %) qui correspond au niveau structural à une augmentation du nombre de thylakoïdes et de plastes. L'augmentation du pool total de pigments serait également accompagnée d'un réarrangement des complexes antennes permettant une collecte de la lumière par la fucoxanthine plus efficace et qui entraînerait une augmentation de la fixation du CO<sub>2</sub> (Jeffrey et Vesk, 1977; Holdsworth, 1985). Une autre explication serait une augmentation des concentrations d'enzymes intervenant dans la fixation du carbone comme la phosphoenolpyruvate carboxylase dont la concentration est fonction de la lumière bleue chez les algues vertes (voir Jeffrey et Vesk, 1977). Ces phénomènes ne sont pas nécessairement communs à toutes les diatomées : ils existent chez *S. turris*, *Biddulphia aurita*, *Cylindrotheca closterium* et *P. tricornutum* tandis que certaines espèces comme *Lauderia annulata*, *Asterionella glacialis*, *Gyrosigma* sp. et *Nitzschia closterium* montrent une augmentation des pigments totaux qui reste faible, et *Thalassiosira gravida* et *T. rotula* ne montrent pas de modification des contenus pigmentaires et de changements ultrastructuraux parallèles (Vesk et Jeffrey, 1977, à voir également pour une comparaison avec d'autres organismes comme les Haptophytes, Cryptophytes, Dinophytes et algues vertes). Ces différences sont cependant à moduler selon Holdsworth (1985). En effet, ces auteurs pensent que les résultats obtenus par Vesk et Jeffrey (1977) sont à mettre en partie sur le compte d'un stress nutritif. En reprenant le même type d'approche, ces auteurs concluent que la lumière bleue-verte n'induit pas de baisse du taux de croissance mais au contraire une augmentation, pas de modification de la concentration des pigments et de l'ultrastructure plastidiale mais il confirme l'augmentation d'activité photosynthétique due à une meilleure utilisation des photons bleus. Ces modifications induites en lumière bleue-verte refléteraient une adaptation des diatomées aux radiations lumineuses bleues-vertes rencontrées à partir d'une certaine profondeur (Vesk et Jeffrey, 1977; Holdsworth, 1985). Ainsi, selon certains auteurs, dans le milieu naturel, l'acclimatation aux faibles intensités lumineuses entraînant une augmentation des pigments et des thylakoïdes serait activée par le signal "lumière bleue" comme chez les plantes d'ombre (Vesk et Jeffrey, 1977).

II- 3. 4. 2. L'acclimatation aux changements d'intensité lumineuse.II- 3. 4. 2. a. *La forte lumière.*

Les travaux réalisés sur l'acclimatation des diatomées à l'intensité de la lumière sont plus nombreux, plus récents et ont porté sur diverses espèces listées dans le Tableau 4. Ils peuvent être divisés en deux parties : l'acclimatation aux fortes intensités (radiations visibles et UV) et aux faibles intensités voire à l'obscurité. Cependant, aucun de ces travaux ne considère les processus d'adaptation à court terme des diatomées photoacclimatées à différentes intensités à une augmentation brutale de la lumière (cycle des xanthophylles et NPQ), approche que nous avons adoptée dans le Chapitre III, § 6- I. .

**Tableau 4 : Synthèse des études sur la photoacclimatation des diatomées planctoniques par ordre chronologique. Sont précisées les espèces étudiées ainsi que le type de lumière et l'échelle d'intensité utilisée.**

Espèce	Intensité lumineuse ( $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	Référence
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	4 - 250	Beardall et Morris, 1976
<i>Stephanopixis turris</i>	100 - 500	Jeffrey et Vesk, 1978
<i>Skeletonema costatum</i>	30 - 200 - 600	Falkowski <i>et al.</i> , 1981
<i>Chaetoceros danicus</i> <i>C. gracilis</i> <i>Thalassiosira fluviatis</i> <i>T. pseudonana</i> <i>Dytilum brightwellii</i> <i>S. costatum</i>	4 - 300	Perry <i>et al.</i> , 1981
<i>S. costatum</i> plusieurs clones	30 - 270	Gallagher <i>et al.</i> , 1984
<i>Cyclotella meneghiniana</i>	10 - 110	Rosen et Lowe, 1984
<i>T. weissflogii</i>	70 - 600	Post <i>et al.</i> , 1984, 1985
<i>T. weissflogii</i>	30 - 600	Dubinsky <i>et al.</i> , 1986
<i>P. tricornutum</i>	30 - 400	Friedman et Alberte, 1986
<i>P. tricornutum</i>	30 - 300	Owens et Wold, 1986
<i>T. oceanica</i> <i>T. pseudonana</i>	70 - 300 lumière naturelle (jusqu'à 2000)	Sakshaug <i>et al.</i> , 1987
<i>Cylindrotheca fusiformis</i>	30 - 200	Smith et Melis, 1988
<i>Nisztchia palea</i>	40 - 500	Willemoës et Monas, 1991
<i>Haslea ostrearia</i>	20 - 750	Mouget <i>et al.</i> , 1999
<i>S. costatum</i>	50 - 1200	Anning <i>et al.</i> , 2000
<i>Cyclotella cryptica</i> <i>P. tricornutum</i>	40 - 400	Janssen <i>et al.</i> , 2001
<i>Dytilum brightwellii</i>	100 - 400 UV	Rijstenbil, 2001
<i>T. weissflogii</i>	UV faible/fort	Zudaire et Roy, 2001

On a longtemps cru que les algues phytoplanctoniques pouvaient être classées selon deux stratégies de photoacclimatation à une augmentation prolongée de l'intensité lumineuse (Falkowski et Owens, 1980; Perry *et al.*, 1981). La première consiste en une diminution spécifique de la taille des antennes, sans modification du nombre de photosystèmes comme chez les diatomées, la seconde consiste en une réduction globale de l'appareil photosynthétique dans son entier comme chez les algues vertes (Falkowski et Owens, 1980). Cette vision est trop contrastée puisque les deux types de stratégies peuvent coexister (voir ci-après pour les diatomées) : elles ont été retrouvées parmi la plupart des grands groupes algaux (Falkowski et Laroche, 1991; Perry *et al.*, 1981) et même parmi les clones d'une même espèce (Gallagher *et al.*, 1984). Les travaux effectués sur la photoacclimatation des diatomées et présentés Tableau 4 sont à considérer avec prudence car les observations qui y sont relatées sur l'existence, l'amplitude et la cinétique des phénomènes sont fortement dépendantes des conditions de culture (Beardall et Morris, 1976) et n'aboutissent pas nécessairement aux mêmes conclusions. La liste suivante est une tentative de synthèse des informations sur les modifications des paramètres les plus importants de l'appareil photosynthétique rapportées chez les diatomées suite à une augmentation prolongée de l'intensité lumineuse :

- *l'ultrastructure.*

Une augmentation de l'intensité lumineuse engendre une diminution du nombre de plastes (dans le cas d'espèces possédant plusieurs plastes), du volume du plaste d'à peu près 20 % et du nombre de thylakoïdes (Rosen et Lowe, 1984; Post *et al.*, 1985; Mouget *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 2001). Ceci peut s'accompagner ou pas d'une désorganisation des thylakoïdes qui n'apparaissent plus regroupés par trois sur toute leur longueur mais entortillés et séparés les uns des autres (Jeffrey et Vesk, 1978; Post *et al.*, 1985). On note également une perte de densité du stroma et du pyrénéoïde (Jeffrey et Vesk, 1978). Les modifications d'organisation des thylakoïdes sont interprétées soit comme la résultante du stress lumineux (Jeffrey et Vesk, 1978), soit comme un réarrangement permettant une modification du "package effect" (Post *et al.*, 1985) (l'absorption de la lumière par un plaste est fonction de l'accolement des thylakoïdes, de la concentration des pigments, etc...; Falkowski et Raven, 1997).

- *les contenus pigmentaires.*

Tous les auteurs ont rapporté une diminution des quantités de Chl *a* par cellule qui est fonction des espèces et peut aller jusqu'à un facteur 2,7 (Post *et al.*, 1985). Cette diminution n'est pas due à une dégradation du pigment mais à un arrêt de la synthèse et une "dilution" du

pigment par division des cellules (Post *et al.*, 1984). La quantité de Chl *c* par cellule diminue également soit à la même vitesse, soit plus vite que la Chl *a* : le rapport Chl *a*/Chl *c* ne varie pas ou augmente en fonction des espèces. Dans les cas où il augmente, la diminution en Chl *c* reste faible, c'est-à-dire de l'ordre de 10-20 % et exceptionnellement jusqu'à 35 % (Owens et Wold, 1986). Les premières études ne comportent pas d'informations sur les caroténoïdes ou n'ont pas fait le distinguo entre la fucoxanthine, la DD et le  $\beta$ -carotène; les résultats sont donc peu exploitables (Dubinsky *et al.*, 1986; Smith et Melis, 1988). Les études plus récentes notent une diminution de la quantité de fucoxanthine par cellule qui suit celle de la Chl *a*; le rapport Chl *a*/fucoxanthine varie donc peu. Les quantités de  $\beta$ -carotène par cellule varient peu, le rapport Chl *a*/ $\beta$ -carotène diminue donc. Les mesures spectrales (Janssen *et al.*, 2001) ou par HPLC (Mouget *et al.*, 1999; Anning *et al.*, 2000) montrent une augmentation de la quantité de DD par cellule qui peut être multipliée par cinq. Cette observation a également été réalisée en milieu naturel (Olaizola *et al.*, 1992; Brunet *et al.*, 1993). Cette DD additionnelle est convertie en DT de sorte qu'au delà de  $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , la conversion de la DD en DT entre en compétition avec la synthèse de fucoxanthine à partir de la DD à la lumière (voir § II-2.2.2.) (Willemoës et Monas, 1991; Goericke et Welschmeyer, 1992).

- la taille "physique" de l'antenne et le nombre de photosystèmes.

Tous les travaux ou presque se sont attachés à mesurer les variations de la taille du complexe antenne à l'aide de différentes méthodes. Les modifications pigmentaires vues plus haut s'accompagnent d'une diminution de la taille d'antenne sous forte lumière jusqu'à 50 % (Falkowski *et al.*, 1981). La plupart des auteurs rapportent soit une augmentation, soit une diminution du nombre de PS I couplée à une diminution du nombre de PS II. Cette diminution serait le fait de la baisse de la concentration en Chl *a* par cellule. Ainsi le rapport PS I/PS II qui est d'environ 1 à faible intensité peut varier d'un facteur 3 avec l'augmentation de l'intensité lumineuse (Smith et Melis, 1988).

Curieusement chez les diatomées, malgré une variation en fonction de l'intensité lumineuse aussi importante que chez les plantes et algues vertes, la taille d'antenne et le nombre relatif de photosystèmes restent importants (Perry *et al.*, 1981). Ceci conférerait aux diatomées un avantage en milieu turbulent lors d'un passage de la surface aux profondeurs; les diatomées étant alors capables de supporter et d'utiliser immédiatement les faibles intensités lumineuses. Cela apparaît d'autant plus important que la cinétique d'acclimatation d'une forte à une faible lumière est dix fois plus lente que la cinétique inverse chez les diatomées (Post *et al.*, 1985). Quoiqu'il en soit, il faut un système de protection efficace qui



permette aux cellules de conserver à forte intensité une grande taille d'antenne ce qui peut engendrer une absorption excessive d'énergie lumineuse.

- *la capacité photosynthétique.*

Elle est mesurée par les courbes d'émission d'O<sub>2</sub> en fonction de l'intensité lumineuse pour des diatomées acclimatées à une intensité donnée (courbes P-E; pour revues voir Henley, 1993; MacIntyre et Kana, 2002; voir également le Chapitre II-Matériels et Méthodes, § II-2.1.). De nombreux paramètres qui sont pour la plupart liés aux changements ultrastructuraux ou de concentrations pigmentaires peuvent être exploités à partir de ces courbes, en particulier la pente initiale qui renseigne sur la taille d'antenne, le "package effect", etc... (Anning *et al.*, 2000). Le taux de photosynthèse maximal (capacité photosynthétique) est soit stable, soit augmenté en fonction des espèces. L'augmentation de la capacité photosynthétique permet aux diatomées une meilleure utilisation des fortes intensités lumineuses. Ce phénomène est quant à lui corrélé à l'augmentation des quantités et activités de l'ATP synthase, de la Rubisco et de la malate déshydrogénase fortement impliquées dans le métabolisme du carbone (Beardall et Morris, 1976; Smith et Melis, 1988).

Concernant les cinétiques d'acclimation proprement dites, il existe peu d'études (pour revues voir Post *et al.*, 1984, 1985). On considère généralement que l'acclimation faible lumière/forte lumière est achevée en 10-12 h soit à peu près un temps de génération. Les vitesses des cinétiques d'acclimation observées sont en adéquation avec les taux de mélanges des eaux rencontrés dans l'habitat naturel des diatomées (Denman et Gargett, 1983; Richardson *et al.*, 1983). Ce temps est également dépendant de l'alternance jour-nuit dans le milieu naturel. Plus intéressantes sont les comparaisons de deux espèces de diatomées d'un même genre (Sakshaug *et al.*, 1987) et de plusieurs clones d'une même espèce (Gallagher *et al.*, 1984) vis-à-vis de la photoacclimation. La première montre que l'espèce côtière *Thalassiosira pseudonana* a une stratégie photoadaptative plus souple que sa comparse océanique *T. oceanica* moins sujette à des variations lumineuses importantes. Ceci se traduit entre autres par une cinétique d'acclimation concernant le taux de croissance, la concentration en Chl *a* et en DD plus rapide chez *T. pseudonana*. Cette dernière présente également un taux de dé-époxydation et un quenching de fluorescence plus importants sous des conditions de forte illumination. Les auteurs suggèrent que la photoprotection plus efficace de *T. pseudonana* serait en partie responsable de son acclimation plus aisée. La seconde étude compare des clones de *Skeletonema costatum* isolés à différentes périodes de l'année et dans des environnements aquatiques différents. Ces clones démontrent des

stratégies d'acclimatation à des variations d'intensités lumineuses différentes et qui peuvent être expliquées d'un point de vue écologique (période de prolifération (été/hiver), type d'habitat). Ces différences incluent des changements pigmentaires et en particulier ceux concernant la Chl *c* et la fucoxanthine, et des changements de taille d'antenne et d'efficacité du transfert d'énergie à la Chl *a* aussi bien en cinétique d'apparition que d'amplitude. Les auteurs suggèrent que la variabilité génétique des espèces de diatomées pourraient expliquer leur capacités adaptatives et leur ubiquité, un peu comme pour les cyanobactéries.

#### II- 3. 4. 2. b. Les radiations UV.

Concernant l'acclimatation des diatomées aux radiations UV (UV-A et -B), qui dans l'environnement marin vont de pair avec une augmentation prolongée de l'intensité lumineuse lorsque les cellules sont transportées en surface, il existe deux études récentes (Rijstenbil, 2001; Zudaire et Roy, 2001) qui donnent un très bon aperçu des capacités des diatomées *Ditylum brightwellii* et *Thalassiosira weissflogii*. Dès les premiers jours, les radiations UV entraînent un stress oxydatif responsable de la diminution du taux de croissance, de la capacité photosynthétique et de la peroxydation des lipides membranaires (Behrenfeld *et al.*, 1992; Goss *et al.*, 1999). Les diatomées réagissent par une augmentation de la concentration des enzymes impliquées dans la prévention de ce stress comme la superoxyde dismutase, atténuant ainsi la production d'espèces radicalaires de l'O<sub>2</sub> dans le plaste. Après plusieurs jours, elles produisent également des "microsporine-like amino acids (MAAs)" qui sont spécifiques de la réponse au stress UV mais dont la fonction reste encore relativement floue. Enfin, alors que les concentrations des pigments impliqués majoritairement dans la collecte de la lumière ne sont pas modifiées, une forte augmentation de la quantité de DD est observée. Ceci entraîne une augmentation de la DT et du NPQ et une photoprotection plus efficace chez *P. tricornutum* (Goss *et al.*, 1999) et dans des populations phytoplanctoniques naturelles (Döhler et Hagmeier, 1997). Cette photoprotection aboutit à une inactivation réversible de la photosynthèse différent d'un véritable endommagement de l'appareil photosynthétique (photoinhibition au sens classique). De plus, il a été montré que la DD dé-époxydase est plus active en présence de radiations UV, ce qui engendre une conversion de la DD en DT plus rapide et plus importante (Goss *et al.*, 1999). A l'inverse chez les plantes et algues vertes, la VX dé-époxydase est inhibée par les radiations UV (Pfündel et Bilger, 1994).

## II- 3. 4. 2. c. La faible lumière et la survie à l'obscurité.

Certaines diatomées sont bien connues pour vivre dans des écosystèmes peu éclairés comme les diatomées antarctiques (Boczar et Palmisano, 1990) et constituant la “flore d'ombre” qui vit à une profondeur de 100 m (Sournia, 1982b). Certaines espèces ont également été trouvées à une profondeur de 3000 m dans le sud des océans Indien et Pacifique en grand nombre et en bon état physiologique (Fogg, 1991; Sournia, 1982b). Enfin, il a été montré qu'après un bloom de diatomées, 44 % de la biomasse constituée de onze espèces phytoplanctoniques appartenant notamment aux genres *Chaetoceros*, *Thalassiosira* et *Skeletonema* peut survivre au moins trois mois dans les sédiments avant de “resurgir” en surface sous forme d'un bloom (Hansen et Josefson, 2001). La survie des diatomées à très faible lumière (quelques photons) et à l'obscurité est également bien documentée par des expérimentations en laboratoire (pour revues voir Griffiths, 1973; Geider *et al.*, 1985). Les diatomées, comme *P. tricornutum*, sont capables de survivre à l'obscurité plusieurs semaines (25 !) sans acquisition hétérotrophique de carbone (Griffiths, 1973). Dans ces conditions, comme dans celles d'une très faible luminosité, les cellules sont capables de maintenir de façon prolongée un certain taux de croissance qui est évidemment diminué (Post *et al.*, 1985), et leur capacité photosynthétique ainsi que leur contenu en Chl *a* ne sont pas altérés. De plus, lorsque les diatomées sont remises dans des conditions lumineuses plus favorables, elles retrouvent immédiatement un taux de croissance “habituel”. De même, lorsque les conditions environnementales sont vraiment défavorables, les diatomées (comme *Skeletonema costatum*) se “transforment” en formes de résistance (ou “resting spores”) à différentier d'un enkystement dont elles sont également capables comme les cyanobactéries et les Dinophytes notamment (Fogg, 1991). Ces formes de résistance présentent une accumulation de réserves carbonées, un taux de respiration plus faible et sont capables de maintenir leur capacité photosynthétique durant au moins un mois à l'obscurité (Fogg, 1991).

Ces capacités sont très différentes des observations réalisées chez les algues vertes phytoplanctoniques qui, malgré leur capacité à s'adapter à de faibles intensités (Falkowski et Owens, 1980), sont incapables de survivre à des périodes prolongées d'obscurité et présentent une phase de latence importante après leur retour dans des conditions lumineuses favorables (Griffiths, 1973; Richardson *et al.*, 1983). Les Dinophytes sont également fréquemment trouvés dans la zone aphotique mais sont, eux, capables d'hétérotrophie (Fogg, 1991). Cette vue n'est évidemment pas complètement généralisable (Geider *et al.*, 1985; Fogg, 1991); l'algue verte *Scenedesmus* sp., par exemple, survit très bien à de longues périodes (12

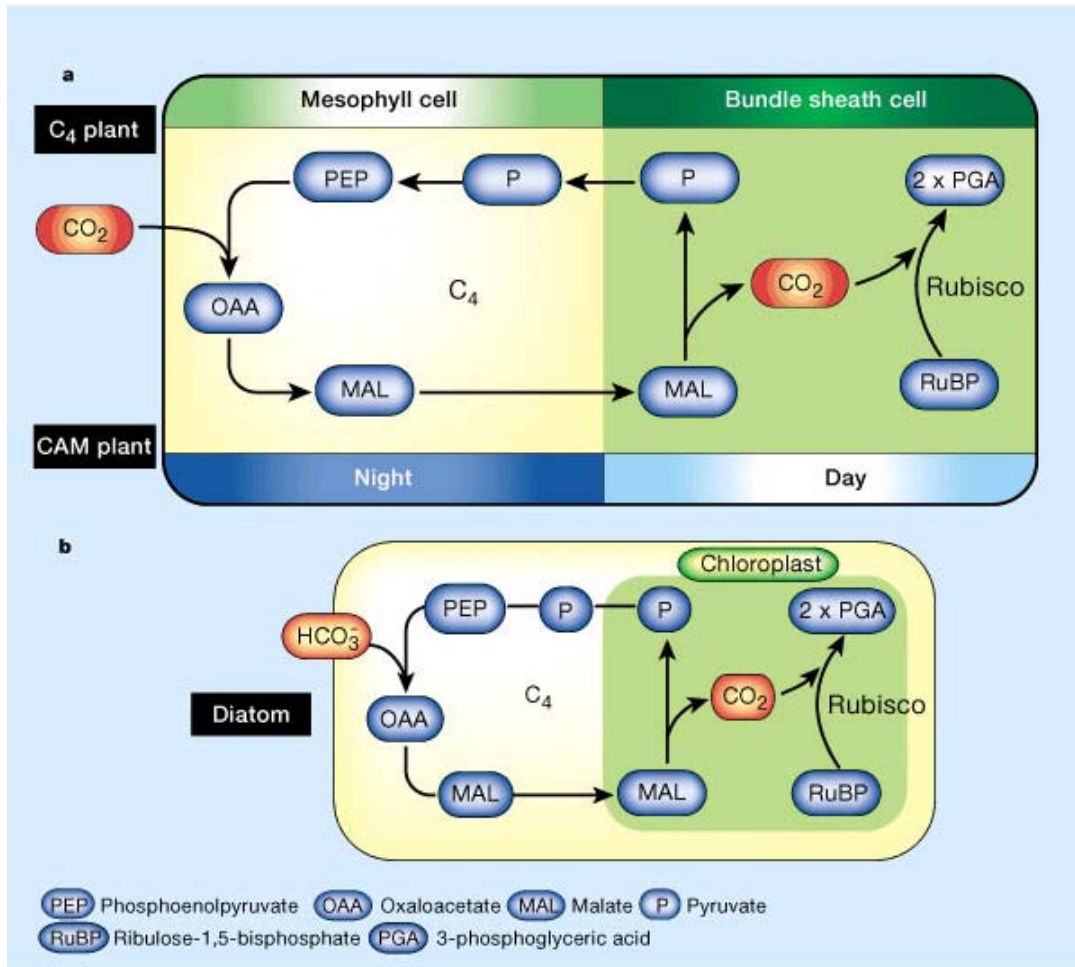
semaines) d'obscurité. Cependant, dans ce cas précis, les capacités photosynthétiques de l'algue ainsi que le métabolisme général sont réduits et après retour à des conditions favorables, une phase de latence importante du taux de croissance est observée (Dehning et Tlzer, 1989).

Cette caractéristique des diatomées est due pour ce qui concerne les faibles intensités à leur capacité de photoacclimatation, que l'on retrouve également chez la plupart des organismes du phytoplancton (Richardson *et al.*, 1983). Les travaux présentés dans le chapitre précédent traitent également de l'acclimatation aux faibles intensités lumineuses comme celles rencontrées au bas de la zone euphotique. La cinétique d'acclimatation forte lumière/faible lumière est beaucoup plus longue et jusqu'à dix fois plus lente (Post *et al.*, 1985). Cependant, les vitesses d'acclimatation observées et calculées sont considérées comme étant adaptées aux vitesses de sédimentation des diatomées lors d'une stratification de la colonne d'eau (exemple avec *T. Weisflogii*; Post *et al.*, 1985). Très brièvement, l'acclimatation se traduit par une augmentation du volume du plaste, du nombre de thylakoïdes, de la concentration en Chl *a*, Chl *c* et fucoxanthine, du nombre de photosystèmes, de la taille d'antenne, bref une modification de l'appareil photosynthétique permettant d'utiliser au mieux les faibles intensités (pour exemple, voir Falkowski et Owens, 1980). Cette augmentation de la quantité de fucoxanthine est directement reliée à l'accumulation de son précurseur direct, la DD, à forte lumière pour la photoprotection déjà exposée (voir § II- 2. 2. 2. et II- 3. 4. 2. a. ).

Plus intéressant est la manière dont les diatomées sont capables d'utiliser (et pas seulement de supporter) les intensités lumineuses plus fortes pour leur survie à faible lumière et même dans la totale obscurité. Ainsi, elles semblent capables de profiter au maximum d'une augmentation soudaine de la lumière (lors du mélange de la colonne d'eau par exemple) en augmentant rapidement leur taux de division (Post *et al.*, 1984). Le fait qu'elles soient capables de maintenir leur capacité photosynthétique à l'obscurité et de retrouver un taux de croissance "normal" après retour à de meilleures conditions le démontre : les cellules sont capables d'utiliser l'énergie absorbée à la lumière en vue d'une utilisation subséquente durant une période d'obscurité plus ou moins longue (Griffiths, 1973; Geider *et al.*, 1985). On a vu dans le chapitre précédent que la taille d'antenne, même si elle varie, reste toujours importante chez les diatomées de façon à pouvoir maximiser immédiatement, c'est-à-dire en dehors de toute photoacclimatation, la collecte de la lumière à faible et forte intensités tout en dissipant l'excès de lumière dans le deuxième cas, synonyme de photoinhibition potentielle.

L'autre aspect concerne le stockage de l'énergie absorbée en excès par augmentation de l'utilisation de l'énergie photochimique par différentes voies de fixation du carbone. Non seulement ce stockage évite la sursaturation de l'appareil photosynthétique en conditions de forte lumière (Post *et al.*, 1985) mais les produits stockés sont ensuite utilisés lors d'une éventuelle période de faible intensité ou d'obscurité qui peut suivre. On comprend l'avantage d'un tel système dans un environnement lumineux fluctuant. Cet aspect, déjà évoqué dans le § II-3.2., ferait intervenir selon certains auteurs (pour une revue historique voir Mortain-Bertrand *et al.*, 1988) une voie de fixation du carbone spécifique aux diatomées impliquant la voie classique en C<sub>3</sub> (cycle de Calvin) à laquelle se surimpose une voie dite de "β-carboxylations" se rapprochant du métabolisme carboné en C<sub>4</sub> en fonction du régime lumineux (voir Fig. 35) (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987, 1988). Ainsi, chez *S. costatum* et *Nitzschia turgiduloides*, la voie "β-carboxylations" devient prépondérante lorsque les conditions lumineuses sont défavorables. Ceci permet un maintien de la capacité de fixation du carbone quelque soit le régime lumineux et un stockage des produits de synthèse dans le chloroplaste et l'utilisation de ces métabolites à l'obscurité (Mortain-Bertrand *et al.*, 1987). Cette utilisation aboutit à une assimilation du carbone à l'obscurité, en particulier via la voie "β-carboxylations", dans les acides aminés pour la synthèse de protéines (Casper, 1982; Post *et al.*, 1985) et d'intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques eux-mêmes couplés à l'incorporation des nitrates et de l'ammonium (Mortain-Bertrand *et al.*, 1988). Cette fixation du carbone à l'obscurité pourrait avoir lieu dans les péroxysomes, organites intermédiaires entre la production de métabolites dans le plaste et leur utilisation dans les mitochondries (Winkler et Stabenau, 1995). De plus, ce pool de carbohydrates est utilisé chez *T. weissflogii* comme source d'énergie et réservoir de carbone pour supporter les variations importantes de l'intensité lumineuse et faciliter la photoacclimatation (Post *et al.*, 1985). L'excès d'énergie sous forte lumière est stocké et utilisé ensuite à faible lumière ou à l'obscurité pour permettre aux cellules de s'adapter sans dégrader les réserves protéiques de la cellule (du moins dans un premier temps) (Post *et al.*, 1984, 1985). Récemment, la possibilité d'une "vraie" voie en C<sub>4</sub> comme chez certaines plantes terrestres (maïs, canne à sucre, pour revue voir Hatch, 1987; Jupin et Lamant, 1997) a été mise en évidence chez les diatomées (Reinfelder *et al.*, 2000) et constitue la première observation de la photosynthèse en C<sub>4</sub> chez un organisme photosynthétique unicellulaire (Fig. 35). Cette voie de fixation du carbone est connue pour permettre une utilisation optimale du CO<sub>2</sub> atmosphériques (ou des bicarbonates dissous dans l'eau) disponible en stockant des molécules carbonées pour utilisation ultérieure dans des

conditions défavorables. Ceci ajouterait également une voie supplémentaire d'utilisation de l'énergie lumineuse qui, lorsqu'elle est en excès éviterait une saturation de la chaîne photosynthétique en aval et donc une situation de stress lumineux (Riebesell, 2000). Cependant, cette découverte et les différentes interprétations sur le rôle de la voie  $C_4$  chez les diatomées ont été fortement remises en question et sont actuellement sujettes à discussion (Johnston *et al.*, 2001; Reinfelder, 2001).



**Fig. 35 :** Fixation du CO<sub>2</sub> via “la voie en C<sub>4</sub>”. (a) Chez les plantes supérieures les mécanismes compétiteurs des voies en C<sub>4</sub> (gauche) et en C<sub>3</sub> (droite) sont séparés soit dans l’espace (plantes C<sub>4</sub>, canne à sucre et maïs) soit dans le temps (plantes CAM, plantes succulentes). (b) Cycle équivalent hypothétique chez une diatomée. Ici, les deux voies C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub> pourraient être simultanées car la voie C<sub>4</sub> serait cantonnée au cytoplasme de cet organisme unicellulaire et la voie en C<sub>3</sub> au plaste. Le produit final de ce cycle (le PGA) peut être utilisé pour produire des acides gras, des acides aminés et des sucres (Riebesell, 2000).

Enfin, il existe chez les diatomées un processus métabolique de forte amplitude : la chlororespiration (voir § I- 3. 1. 3.) (Caron et Brown, 1987; Ting et Owens, 1993; Jakob *et al.*, 1999; Dijkman & Kroon, 2002). Ce phénomène métabolique qui se déroule dans le plaste à l'obscurité permet la formation d'un gradient de protons transthylakoïdal (Ting et Owens, 1993) utilisé de plusieurs manières. Premièrement, il permet de conserver l'ATP synthase active à l'obscurité ce qui dans un environnement lumineux variable permettrait une mise en route immédiate de l'ATP synthase lors d'un brusque retour à la lumière (Jakob *et al.*, 1999). Ceci entraîne une meilleure utilisation de l'énergie et évite une trop forte acidification du lumen connue pour sensibiliser le PS II à la photoinhibition. Deuxièmement, le  $\Delta pH$  ainsi créé est suffisant pour activer la DD dé-époxydase (Jakob et Wilhelm, 2001), et conduit à la formation d'un NPQ à l'obscurité et l'accumulation de DT. Un tel processus permettrait aux diatomées de prévenir un éventuel retour à forte lumière et une mise en action immédiate de la photoprotection au niveau des complexes antennes grâce au maintien de l'activité dé-époxydase à l'obscurité (Jakob *et al.*, 1999). Finalement, il a récemment été montré chez les plantes vertes que la chlororespiration active une enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des xanthophylles (voir § II- 2. 2. 2.). Compte tenu de la forte amplitude de la chlororespiration chez les diatomées, un tel rôle, s'il existe, serait évidemment d'importance majeure pour l'ajustement des quantités de xanthophylles impliquées dans la collecte de la lumière et/ou dans la photoprotection. La source d'énergie utilisée par la chlororespiration reste inconnue et le lien entre le stockage de métabolites à la lumière, leur assimilation à l'obscurité et leur utilisation par la chlororespiration, même s'il a été évoqué par certains auteurs, reste à prouver. Si ce lien existe, on entrevoit alors comment les diatomées peuvent procéder pour utiliser de façon optimale les variations de l'intensité lumineuse de leur habitat naturel. La chlororespiration pourrait alors jouer un rôle central dans le succès adaptatif des diatomées aux eaux turbulentes en intervenant indirectement dans la photoprotection et la photoacclimatation.

#### II- 3. 4. 3. La régulation des gènes *lhcf* et des protéines LHCF et la perception des signaux lumineux.

Tandis que les études descriptives de la photoacclimatation chez les diatomées sont relativement nombreuses, il existe très peu de données sur les bases moléculaires de l'acclimatation et plus particulièrement en ce qui concerne la régulation de l'expression des gènes *lhcf* et de la synthèse des protéines LHCF. Le contrôle par l'intensité de la lumière de

l'expression de certains gènes *lhcf* a été mis en évidence chez les deux diatomées *P. tricornutum* (Friedman et Alberte, 1986) et *Thalassiosira weissflogii* (Leblanc *et al.*, 1999), chez l'algue brune *Macrocystis pyrifera* (Apt *et al.*, 1995) et chez la Crypsophycée (Hétérokontophytes) *Gyraudiospis. stellifer* (Passaquet et Lichtlé, 1995) mais les données restent peu nombreuses comparées à l'abondante littérature parue sur ce sujet chez les végétaux verts. On notera également le travail réalisé sur un dinoflagellé concernant la régulation par la lumière de la transcription des gènes codant pour le complexe antenne majeur Chl *a/c* et le complexe mineur Chl *a*/peridinine (ten Lohuis et Miller, 1998).

Chez *T. weissflogii*, le taux de transcrits *lhcf* diminue pendant une période d'obscurité prolongée pour augmenter fortement lors d'un passage à la lumière (Leblanc *et al.*, 1999). Le même processus est retrouvé chez les dinoflagellés et les Chrysophycées concernant les gènes codant pour les protéines du complexe Chl *a/c* (Passaquet et Lichtlé, 1995; ten Lohuis et Miller, 1998). Chez les plantes et algues vertes, les gènes *lhcf* sont également photorégulés. Cette régulation est sous le contrôle de l'état redox du chloroplaste (voir § I- 3. 2. ). Elle permettrait une augmentation de la production de complexes pigments-protéines à faible lumière et contribuerait à optimiser l'absorption de la lumière sous un large éventail d'intensités. Cette fonction reste largement à étudier chez les diatomées (Falkowski et Laroche, 1991). Les travaux réalisés sur *P. tricornutum* et *Cylindrotheca fusiformis* tendent à confirmer cette interprétation (Friedman et Alberte, 1986; Smith et Melis, 1988). En effet, ces auteurs ont montré une régulation des apoprotéines LHCF en fonction de l'intensité lumineuse : leur synthèse diminue de 30 % en quelques heures lors d'une augmentation brutale de l'intensité lumineuse alors qu'elle augmente de 20 % lors du transfert des diatomées de forte à faible lumière (Friedman et Alberte, 1986). Une seule étude a porté sur la proportion des complexes majeur à Chl *a/c*-fucoxanthine et mineur à Chl *a/c* (Owens et Wold, 1986). Elle montre une diminution de 30 % du premier et un doublement du second avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Il a récemment été montré que la régulation des apoprotéines LHCF est différentielle chez une même espèce en fonction de l'intensité lumineuse, entre deux souches de la même espèce (*P. tricornutum*) et entre deux espèces différentes (*P. tricornutum* et *Cyclotella cryptica*) (Janssen *et al.*, 2001). Il semble clair que la synthèse de certaines sous-unités LHCF est induite ou inhibée lors de variations de l'intensité lumineuse.

Certains résultats suggèrent également la possible régulation de l'expression des gènes *lhcf* par la qualité de la lumière via l'intervention de récepteurs spécifiques de lumière UV et



bleue (type cryptochrome), verte (type rhodopsine) et rouge/rouge lointain (type phytochrome) (Scala *et al.*, 2002). Chez l'algue brune *M. pyrifera*, les gènes *lhcf* sont également exprimés de façon différentielle en fonction de la qualité de la lumière (Apt *et al.*, 1995). L'existence de tels photorécepteurs impliqués dans la perception de l'environnement lumineux est confirmée par la mise en évidence de la réorientation des plastes en fonction de la qualité de la lumière incidente chez une diatomée (Furukawa *et al.*, 1998). Cette réponse au niveau de l'organisation des plastes implique deux types de photorécepteurs : un sensible à la lumière verte qui contrôle la dispersion des plastes et un sensible à la lumière UV-bleue qui contrôle leur rassemblement. Ce genre de réponse à la qualité de la lumière existe également chez les plantes où il implique un photorécepteur de type phototrophine (pour revues voir Batschauer, 1998; Walters *et al.*, 1999).

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE I

*III- Démarche adoptée  
au cours de ce travail de thèse*

---

### III- DEMARCHE ADOPTEE AU COURS DE CE TRAVAIL DE THESE.

Etant donné la dominance des diatomées planctoniques, aussi bien marines que dulçaquicoles, sur les autres groupes du phytoplancton dans les eaux turbulentes où les fluctuations lumineuses en termes de durée d'exposition, et de quantité et qualité de la lumière sont très variables, nous avons abordé les questions fondamentales suivantes :

- Existe-t-il des stratégies d'adaptation spécifiques aux diatomées planctoniques qui pourraient expliquer, au moins en partie, leur succès adaptatif dans les eaux turbulentes ? Ces stratégies sont-elles différentes en fonction de la durée d'exposition à une augmentation de l'intensité lumineuse incidente ? A quels niveaux interviennent les adaptations : les antennes collectrices de lumière, les centres réactionnels, les thylakoïdes ?

- D'autre part, les particularités de l'appareil photosynthétique des diatomées peuvent-elles apporter des informations supplémentaires sur les capacités d'adaptation à la lumière des organismes photosynthétiques en général ? Plus précisément, et du fait de la relative simplicité de l'organisation moléculaire des complexes pigment-protéines chez les diatomées, les données obtenues avec ces organismes permettent-elles de mieux comprendre le processus photoprotecteur de dissipation de l'énergie en excès dont l'étude chez les plantes supérieures et les algues vertes se heurte à la complexité de l'organisation des complexes pigment-protéines ? Plus fondamentalement, comment des organismes appartenant (diatomées/algues brunes) ou non (diatomées/organismes "verts") au même phylum et présentant des antennes collectrices de lumière avec des compositions pigmentaires et protéiques, une organisation macromoléculaire et un cycle des xanthophylles différents sont capables de répondre de la même manière à une augmentation brutale de l'intensité lumineuse ?

Dans un premier temps, nous avons abordés ces questions à travers la description de stratégies d'adaptation aux variations lumineuses à court terme (de la seconde à la minute) au niveau des complexes collecteurs de lumière (**Chapitre III, § 1- à 4-**). Nous avons étudié les modifications physiques rapides engendrées par un stress lumineux et qui aboutissent au processus photoprotecteur de dissipation de l'énergie en excès. Nous avons obtenu, grâce à des conditions de culture bien particulières, des cellules de *P. tricornutum* avec un pool augmenté et important de DD, en comparaison d'une culture "classique", sans autres modifications de l'appareil photosynthétique. Ce matériel unique, comparable à certains mutants obtenus chez *Arabidopsis thaliana* ou *Chlamydomonas reinhardtii* nous a permis de

préciser pour la première fois l'ajustement du pool de DD en fonction des conditions de lumière (**Chapitre III, § 1-**). Il nous a également permis de tester l'influence de la taille du pool de DD sur le phénomène de dissipation de l'énergie et de confirmer de façon indubitable l'importance du cycle des xanthophylles et du NPQ dans la photoprotection (**Chapitre III, § 2-**). L'utilisation de ce matériel a enfin été approfondie au travers de l'étude des particularités concernant la relation cycle des xanthophylles-NPQ propres aux diatomées et qui diffère notablement de ce qui existe chez les plantes supérieures et algues vertes (**Chapitre III, § 3-**). Enfin, nous avons étudié cette relation chez plusieurs espèces de diatomées planctoniques d'importance écologique (**Chapitre III, § 4-**); le but étant de dégager des caractéristiques générales propres aux diatomées malgré certaines différences interspécifiques.

Dans un second temps, nous avons mis à jour deux autres processus photoprotecteurs alternatifs à la dissipation de l'énergie lumineuse en excès (**Chapitre III, § 5-**). Le premier, un transport cyclique des électrons au sein du PS II, permet de "dévier" le trop plein d'énergie. Il était connu chez les algues vertes mais pas chez les diatomées planctoniques chez lesquelles ce mécanisme présente une ampleur inhabituelle. Un processus photoprotecteur servant de voie d'utilisation des électrons alternative à la photosynthèse déjà connu chez les diatomées est la chlororespiration. Nous avons éclairci le sujet en mettant en évidence l'accumulation sous forte intensité lumineuse d'un composé réduit lui-même impliqué dans le transport cyclique d'électrons au sein du PS II. Ce pool de réducteur sert à l'obscurité de "carburant" à la chlororespiration dont l'importance chez les diatomées a été exposée en Introduction.

Fort de ces informations nouvelles concernant les stratégies d'adaptation à court terme, nous nous sommes attachés à caractériser les processus mis en place cette fois sur le plus long terme (de l'heure au jour) lors des cinétiques de photoacclimatation de cellules de *P. tricornutum* à la forte lumière (**Chapitre III, § 6- 1.**). Nous avons étudié la régulation de la collecte d'énergie lumineuse au sein des complexes collecteurs et les capacités de photoprotection des cellules photoacclimatées à forte intensité lumineuse, ce qui n'avait jamais été réalisé jusqu'ici.

Enfin, des recherches actuellement en cours concernent la caractérisation biochimiques des antennes collectrices des cultures de *P. tricornutum* cultivées sous différents régimes lumineux. Cette étude va nous permettre de compléter le travail déjà réalisé sur la photoacclimatation et de préciser la localisation exacte de la DD au sein de ces antennes en

utilisant les cellules enrichies en DD. Les premiers résultats obtenus sont présentés dans le **Chapitre III, § 6- 2.** .

La seconde partie de ce travail de thèse a concerné la conception d'un fluorimètre pour le suivi de la dynamique des populations phytoplanctoniques d'eau douce en vue de la détection précoce des proliférations algales qui dégradent la qualité des eaux de boisson, avec une attention toute particulière pour les cyanobactéries. Ce travail a été réalisé en collaboration avec la société Suez-Ondeo Services (ex Suez-Lyonnaise-des-Eaux). Il est indépendant de l'étude des stratégies d'adaptation des diatomées aux variations de la lumière même s'il fait référence à des connaissances techniques (sur l'émission de fluorescence chlorophyllienne et l'analyse pigmentaire par HPLC) et fondamentales (sur les complexes pigments-protéines, leur pigmentation, la photoinhibition, la photoprotection et la photoacclimatation) déjà largement évoquées dans la première partie du manuscrit. Dans un premier temps, un modèle mathématique a été développé en laboratoire afin d'évaluer trois paramètres principaux d'une population phytoplanctonique : sa biomasse, sa composition (distinction entre les cyanobactéries, les diatomées et les algues vertes) et sa potentialité à réaliser un bloom. Dans un deuxième temps, la précision du fluorimètre et du modèle ont été confrontées à celle de techniques plus classiques comme le comptage d'algues par microscopie optique et l'HPLC, toujours en laboratoire. Dans un troisième temps, la fiabilité du fluorimètre a été testée sur le terrain en Malaisie et en Chine en collaboration avec des laboratoires locaux travaillant sur le sujet, et également confrontée avec d'autres fluorimètres moins "complets" et des comptages soit manuels par microscopie soit automatiques par des compteurs de particules. Cette partie ainsi que l'article l'accompagnant sont présentés dans **l'Annexe.**

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE I

## *IV- Publications*

---

## IV- LISTE DES PUBLICATIONS EFFECTUES PENDANT LA THESE.

- En prep **Lavaud J.**, Rousseau B. and Etienne A.-L. “Kinetics of photoacclimation in response to a shift to high light of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* adapted to low irradiance with special reference to the xanthophyll cycle”. **Présentée dans le Chapitre III, § 6- 1. .**
- Soumis **Lavaud J.**, Rousseau B. and Etienne A.-L. “Relationship between diadinoxanthin cycle and non-photochemical fluorescence quenching in five species of marine planktonic diatoms (Bacillariophyceae)”. Soumise à *Journal of Phycology*. **Présentée dans le Chapitre III, § 4- .**
- Soumis **Lavaud J.**, Rousseau B. Lichtlé C. and Etienne A.-L. “Partial replacement of fucoxanthin by diadinoxanthin in the light-harvesting complex of a diatom (Bacillariophyceae) grown under intermittent light”. Soumise à *Journal of Phycology*. **Présentée dans le Chapitre III, § 1- .**
- 2002 **Lavaud J.**, van Gorkom H. and Etienne A.-L. “Photosystem II electron transfer cycle and chlororespiration in planktonic diatoms”. *Photosynthesis Research*, 74 (1), 49-57. **Présentée dans le Chapitre III, § 5- .**
- 2002 **Lavaud J.**, Rousseau B. and Etienne A.-L. “In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching”. *FEBS Letters*, 523, 163-166. **Présentée dans le Chapitre III, § 3- .**
- 2002 **Lavaud J.**, Rousseau B. van Gorkom H. and Etienne A.-L. “Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum*”. *Plant Physiology*, 129, 1398-1406. **Présentée dans le Chapitre III, § 2- .**

## HORS “STRATEGIES D’ADAPTATION DES DIATOMEES...”

- Soumis **Lavaud J.**, Parésys G., Rigart C., Rousseau B., Fan F., Wong A., Barbier J.-P. and Etienne A.-L. “Quantitative and qualitative evaluation of phytoplanktonic populations by trichromatic fluorescence excitation with special focus on cyanobacteria”. Soumise à *Applied and Environmental Microbiology*. **Présentée en Annexe.**

\*\*\*\*\*

**CHAPITRE II**

**MATERIELS**

**ET**

**METHODES**



## I- ALGUES PHYTOPLANCTONNIQUES UTILISEES ET CONDITIONS DE CULTURE.

### I- 1. DESCRIPTION DES GENRES ET/OU ESPECES.

En plus des six espèces de diatomées planctoniques, d'une espèce épipélique (*Cyclotella cryptica*) et d'une espèce benthique (*Navicula* sp.) étudiées, une espèce d'algue verte planctonique a été utilisée (d'après Ricard, 1987) :

→ **Bacillariophycées (Diatomophycées) ou diatomées (Hétérokontophytes) :**

Pennales :

- *Phaeodactylum tricornerutum* Böhlin (Pennales, Phaeodactylacées).
- *Cylindrotheca fusiformis* Reimann et Lewin (Pennales, Bacillariacées).
- *Dytilum brightwellii* (T. West) Grunow (Pennales, Lythodesmiacées).
- *Navicula* sp. (Bory) Cox (Pennales, Naviculacées).

Centrales :

- *Cyclotella cryptica* Reimann, Lewin et Guillard (Centrales, Thalassiosiracées).
- *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (Centrales, Thalassiosiracées).
- *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hasle (Centrales, Thalassiosiracées).

→ **Chlorophycées ou algues vertes (Chlorophytes) :**

- *Chlorella fusca*. Beijerinck (Chlorococcales, Chlorococcacées).

Ces différents genres sont représentées Fig. 36.

- *P. tricornerutum* est une diatomée du plancton littoral des eaux marines à saumâtres des zones tempérées. Elle vit sous forme de cellules isolées ou regroupées en colonies formant des chaînettes. Cette espèce a la particularité d'être polymorphe (Lewin *et al.*, 1958). Elle peut se présenter sous trois formes différentes en fonction des conditions environnementales : forme triradiée, fusiforme ou ovale. Selon la morphologie, la teneur en silice du frustule est plus ou moins importante. La forme ovale est benthique contrairement aux deux autres morphologies. Dans nos conditions de culture, *P. tricornerutum* est fusiforme.

- *C. fusiformis* est une diatomée fréquente dans le plancton estuarien et littoral des mers tempérées; elle est toujours solitaire.

- *D. brightwellii* est une des quatre espèces marines de ce genre. Elle est planctonique côtière et vraisemblablement cosmopolite. On la rencontre rarement sous forme coloniale.

- *Navicula* sp. est une diatomée solitaire, benthique et mobile, présente aussi bien en milieu marin, saumâtre que dulçaquicole.
- *C. cryptica* est une des quatre à cinq espèces marines à saumâtres de ce genre. C'est une espèce épipélique, c'est-à-dire vivant sous forme benthique sur les sédiments ou tout autre substrat mais de manière non fixée. A la moindre remise en suspension, on la retrouve donc dans le plancton.
- *S. costatum* est une diatomée cosmopolite du plancton littoral rencontrée dans les eaux marines à saumâtres. Cette espèce est représentée par de nombreux clones qui ont des exigences environnementales différentes, en particulier concernant la lumière (Gallagher *et al.*, 1984).
- *T. weissflogii* est une diatomée cosmopolite du plancton rencontrée dans les eaux marines. Les cellules sont habituellement coloniales et reliées entre elles par des liens chitineux (Fig. 36G).

L'autre organisme (utilisé dans le Chapitre III, § 5-) est une algue verte planctonique, *Chlorella fusca*, qui est un organisme "modèle" jugé représentatif de son groupe (voir également la partie en Annexe). Elle vit plutôt dans des milieux dulçaquicoles ou elle est relativement fréquente.

## I- 2. ORIGINE DES SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE.

Les six genres de diatomées planctoniques ainsi que le genre benthique sont tous marins. Pour les souches planctoniques, les cellules sont cultivées dans 300 mL de milieu de culture F/2 à base d'eau de mer naturelle stérile (Guillard et Ryther, 1962). Le milieu est constamment agité par bullage d'air stérile et maintenu à 18 °C. Les algues sont illuminées à une intensité de  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  produite par des tubes fluorescents blancs (36 W/133-D26 Claude, Blanc Industrie, Allemagne) sous une photopériode 16 h lumière / 8 h obscurité. Les cellules sont réensemencées en milieu frais toutes les semaines à une concentration de  $0,30 \mu\text{g Chl } a\cdot\text{mL}^{-1}$ . Pour la souche benthique, les conditions sont identiques si ce n'est que les cellules sont cultivées en Erlenmeyer de 200 mL sans bullage. L'agitation se fait manuellement plusieurs fois par semaine. Le réensemencement a lieu tous les mois à une concentration de  $0,30 \mu\text{g Chl } a\cdot\text{mL}^{-1}$ .

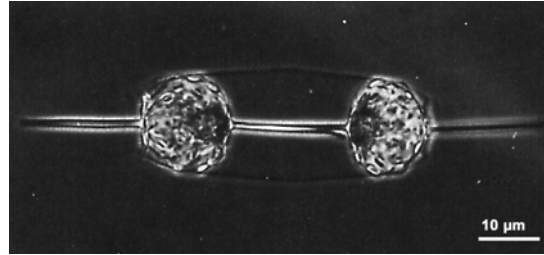
A



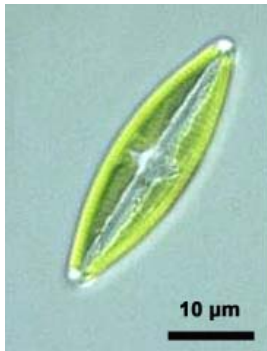
B



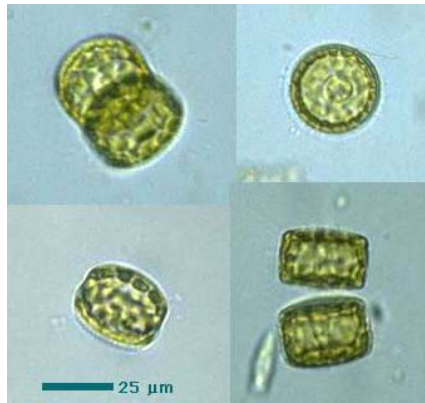
C



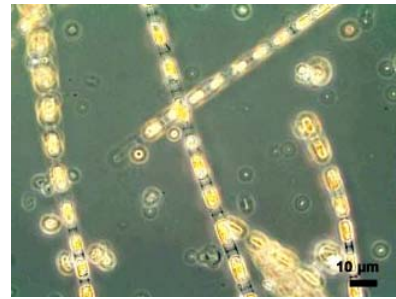
D



E



F



G



H



I



**Fig. 36 : Morphologies des algues phytoplanctoniques utilisées dans ce travail.**

**De A à H : Bacillariophycées, I : Chlorophycées.**

**(A) *Phaeodactylum tricornutum*.; (B) *Cylindrotheca fusiformis* ; (C) *Dytilum brightwellii*; (D) *Navicula* sp.; (E) *Cyclotella* sp. ; (F) *Skeletonema costatum* ; (G) *Thalassiosira* sp.; (H) *Thalassiosira* sp. ; (I) *Chlorella* sp.**

Concernant les conditions particulières de culture de *P. tricorutum* utilisées dans le Chapitre III, § 1- , 2- , 3- et 6- , les conditions de culture peuvent être décrites comme suit :

- pour les cultures en lumière intermittente (§ 1- , 2- , 3- ), les conditions sont identiques sauf au niveau de l'éclairage qui présente la même intensité mais un cycle de 5 min de lumière par heure. Elles sont repiquées tous les mois à une concentration de  $1 \mu\text{g Chl } a.\text{mL}^{-1}$ .
- pour les cultures photoacclimatées à forte intensité (§ 6- ), les conditions sont identiques sauf au niveau de l'éclairage qui présente le même régime lumineux avec une intensité de 500 ou  $1000 \mu\text{E}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ . Les détails concernant le maintien et le suivi des cultures sont donnés dans le Chapitre III, § 6- 1. .

L'origine des souches est diverse. *Phaeodactylum tricorutum* et *Skeletonema costatum* proviennent de la collection du Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, France. *Cylindrotheca fusiformis* CCMP343, *Thalassiosira weissflogii* CCMP1051, *Ditylum brightwellii* CCMP359, *Cyclothella cryptica* CCMP332 et *Navicula* sp. CCMP544 proviennent du Provasoli-Guillard National Center for Culture of marine Phytoplankton (CCMP), West Boothbay Harbor, Maine, USA.

*Chlorella fusca* est cultivée dans les mêmes conditions d'illumination, de température et de bullage que les diatomées planctoniques si ce n'est dans un milieu de culture eau douce Bold Basal (Nichols, 1965).

Pour toutes les souches, de plus amples détails (sur les prélèvements et la préparation des cellules) sont donnés dans les chapitres "Résultats" correspondants. De façon générale, les cellules sont prélevées en phase exponentielle de croissance (en général quatre jours après le réensemencement sauf pour les cellules cultivées en lumière intermittente qui ont un taux de croissance dix fois moindre et qui sont donc prélevées un mois après le repiquage), faiblement centrifugées (10 min à 2 000 g) et remises en suspension dans leur milieu de culture de façon à obtenir différentes concentrations finales en fonction du type de mesure à réaliser, la plus utilisée étant de  $10 \mu\text{g Chl } a.\text{mL}^{-1}$ . Les cellules sont ensuite maintenues à 18 °C et constamment agitées sous une faible lumière continue (lumière ambiante) ou intermittente (uniquement pour les cellules de *P. tricorutum* cultivées en lumière intermittente).

## II- MESURE DE L'ACTIVITE PHOTOSYNTHETIQUE.

### II- 1. L'EMISSION DYNAMIQUE DE FLUORESCENCE CHLOROPHYLLIENNE.

Les principes fondamentaux de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne ayant été exposés en introduction (voir Chapitre I, § I- 2. ), ne seront détaillés ici que les aspects pratiques.

#### II- 1. 1. Fluorimètre conventionnel.

Pour ce qui concerne cette partie du travail de thèse, cet appareil a seulement été utilisé pour réaliser des mesures de taille d'antenne PS II par la méthode des inductions de fluorescence en présence de DCMU (voir Chapitre I, § I- 2. 3. 2. ). L'appareil est décrit en détail en Annexe. *Une application pratique de ce type d'appareil est présentée en partie Annexe de ce manuscrit et a constitué une part importante de ce travail de thèse.*

#### II- 1. 2. Fluorimètre modulé.

##### II- 1. 2. 1. Principe de la mesure.

Les mesures du rendement de fluorescence et de ses variations (quenching non-photochimique en particulier) ont été réalisées grâce à un fluorimètre à faisceau détecteur modulé ("Pulse Amplified Modulated fluorometer" ou fluorimètre-PAM 101, Walz Effeltrich, Allemagne) (Schreiber *et al.*, 1986) qui combine la méthode des impulsions de lumière saturante et celle d'un faisceau modulé pour détecter la fluorescence (voir Chapitre I, § I- 2. 2. ). La fluorescence émise est mesurée de façon synchrone sous forme d'un signal modulé qui, grâce à une détection accordée, est quantifié séparément de la lumière actinique d'intensité et de longueurs d'onde variables qui peuvent être appliquées à l'échantillon afin d'établir divers états physiologiques associés à des variations de rendement de fluorescence. Durant la mesure, des impulsions de lumière saturante (flashes ou pulses) peuvent être envoyées et permettent à tout moment de mesurer le niveau maximal de fluorescence  $F_m$ . Les changements de rendement de fluorescence engendrés au cours de l'illumination actinique sont déterminés par la diminution des niveaux de fluorescence (voir plus loin) due au quenching non-photochimique de fluorescence (voir Chapitre I-Introduction, § I- 2. 3. 3. ).

### II- 1. 2. 2. Dispositif de détection de la fluorescence.

Le fluorimètre-PAM modifié utilisé ici est schématiquement présenté Figure 37. Le faisceau détecteur rouge ( $\lambda$  max = 690 nm) de très faible intensité ( $0,026 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) modulé à une fréquence de 1600 impulsions. $\text{s}^{-1}$  (1,6 KHz) d'une durée de 1  $\mu\text{s}$  chacune est produite par une diode lumineuse (LED : Light -Emitting Diode) (Stanley HPG 5566X). La fluorescence rouge émise ( $\lambda$  max = 680 nm) est détectée par une photodiode dont le signal de sortie est transmis à un amplificateur synchrone. Différents régimes lumineux actiniques d'intensité variables ont été établis grâce à une source lumineuse (lampe quartz-iode Schott KL-1500, Mainz, Allemagne) blanche pour des intensités allant de 50 à 2000  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . Les flashes de lumière blanche saturante ont une intensité de 4000  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  et une durée de 800 ms. Ils sont générés par un obturateur électronique (Uniblitz, Vincent, USA) dont le temps d'ouverture de 3 ms est contrôlé par ordinateur. L'obturateur est placé devant une lampe quartz-iode (Schott KL-1500) allumée en continu. Pour la détermination du niveau  $F_m$ , les mesures sont moyennées à une fréquence de 30 KHz sur la portion stable de la courbe d'induction de fluorescence, c'est-à-dire entre 200 et 800 ms. Les différentes sources lumineuses incidentes (faisceau détecteur, lumière continue et flashes saturants) sont conduites par un guide optique à quatre branches relié à l'enceinte d'une électrode à  $\text{O}_2$  de Clark (Fig. 37). La fluorescence émise est collectée via l'une des branches de ce guide optique. L'ensemble des expériences, l'acquisition et le traitement des données sont contrôlés par un micro-ordinateur grâce à une interface et un logiciel ("Continu") mis au point au laboratoire par G. Parésys (Arsalane *et al.*, 1993).

### II- 1. 2. 3. Niveaux de fluorescence.

La nomenclature adoptée est celle de van Kooten et Snel, 1990 (Fig. 38). Comme déjà précisé en Introduction (voir Chapitre I-§ I- 2. 3. 1. ), deux niveaux extrêmes de fluorescence peuvent être mesurés sur des algues préincubées à l'obscurité :

- $F_o$  : niveau minimal de fluorescence en présence du faisceau détecteur seul.
- $F_m$  : niveau maximal de fluorescence engendré par les flashes saturants.

Ces niveaux permettent de calculer la fluorescence variable  $F_v$  ( $F_v = F_m - F_o$ ) qui correspond au nombre de centres réactionnels PS II actifs.

Durant et à la fin de l'éclairement actinique, sont mesurés respectivement :

- $F_m'$  : niveau maximal de fluorescence engendré par les flashes saturants.

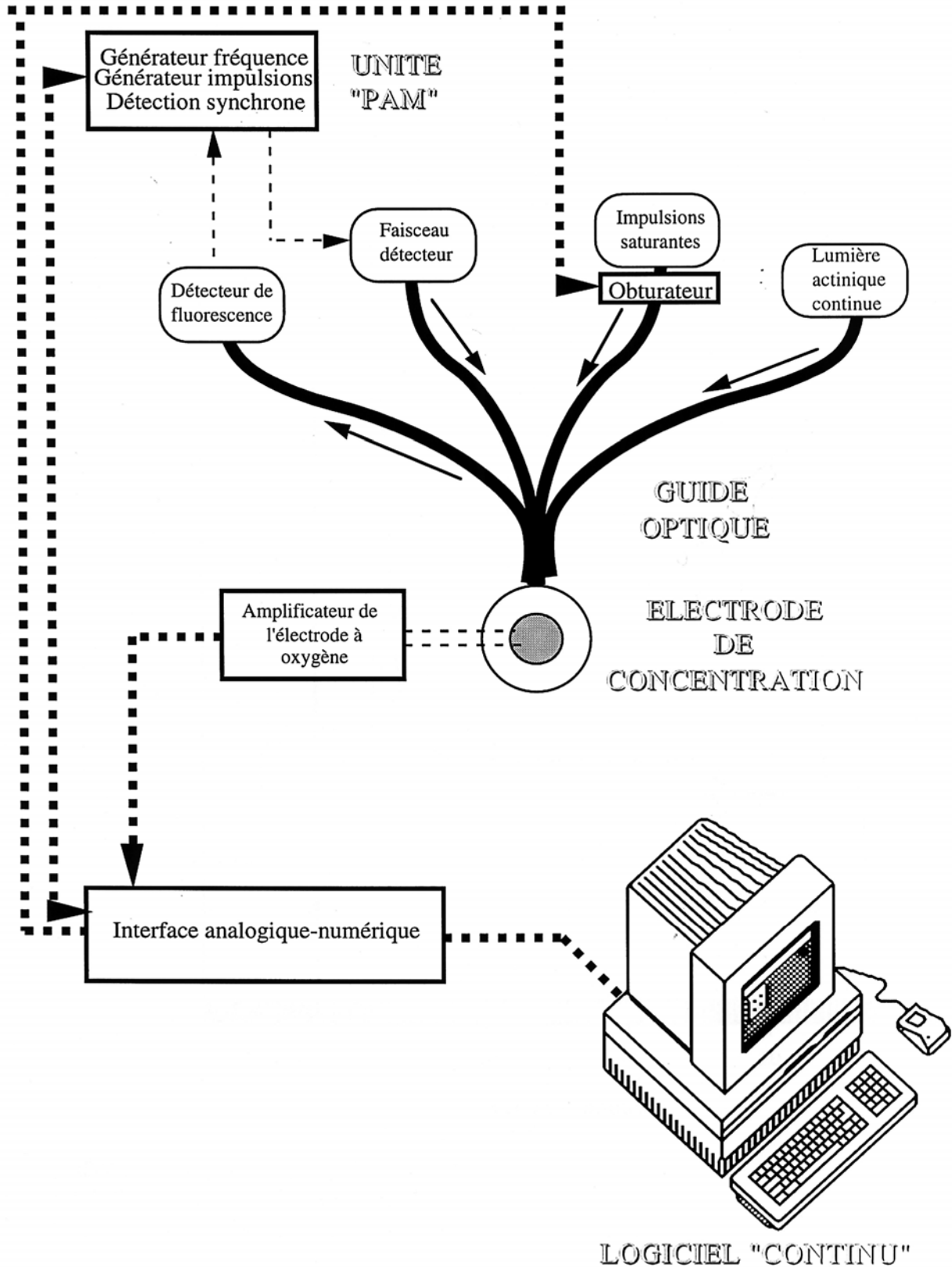


Fig. 37 : Représentation schématique du montage associant le fluorimètre-PAM et l'électrode à oxygène de Clark.

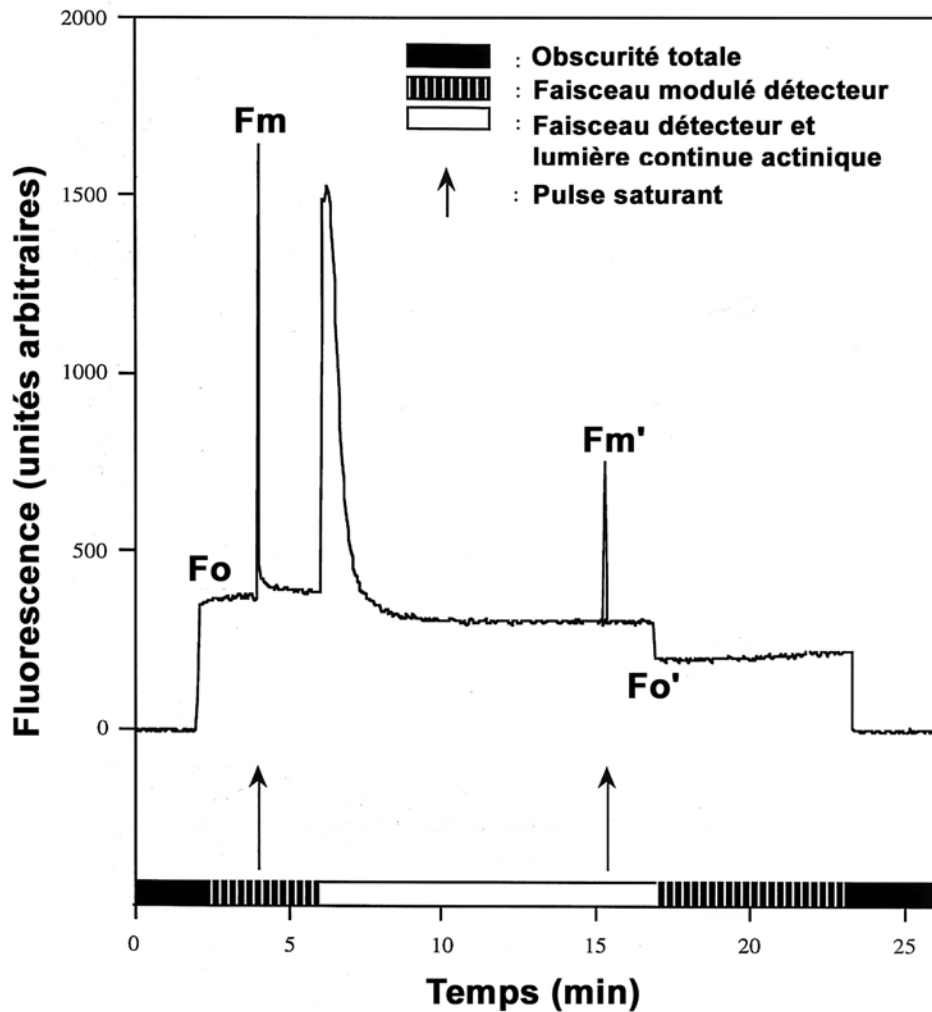
-  $F_o'$  : niveau minimal de fluorescence en présence du faisceau détecteur seul.

Ces niveaux permettent d'évaluer le quenching non-photochimique de fluorescence (des précisions supplémentaires sont également apportées dans le Chapitre III-Résultats et Discussion). L'amplitude de ce quenching est déterminée en utilisant la relation de Stern-Volmer :

- pour  $F_m$  :  $SV_m = NPQ = F_m - F_m' / F_m'$

- pour  $F_o$  :  $SV_o = F_o - F_o' / F_o'$

Cette relation permet de relier l'amplitude du NPQ à la concentration de la molécule ou de l'état "quencher". La validité stricte de cette formulation ne s'applique que pour des pigments en solution mais la migration rapide de l'excitation au sein des complexes antennes permet de l'utiliser pour l'émission de fluorescence chlorophyllienne des complexes antennes.



**Fig. 38** : Les différents niveaux de l'émission de fluorescence chlorophyllienne enregistrés au fluorimètre-PAM.



## II- 2. L'EMISSION D'OXYGENE PHOTOSYNTHETIQUE.

Les électrodes à O<sub>2</sub> permettent une mesure polarographique de l'évolution de la quantité d'O<sub>2</sub> dégagée lors des réactions photosynthétiques (voir I- 1. 1. 2. ).

### II- 2. 1. Electrode de Clark : la cellule entière.

L'électrode de concentration (Hansatech DW1) est une électrode de type Clark (Delieu et Walker, 1972) qui permet de mesurer la concentration en O<sub>2</sub> dissout dans la suspension algale (Fig. 39). L'O<sub>2</sub> dégagé par les algues diffuse à travers une membrane de téflon, imperméable à l'eau et aux ions, recouvrant une électrode de platine reliée à une électrode d'argent chlorurée par un pont KCl. La concentration en O<sub>2</sub> est déterminée par mesure du courant ampérométrique produit par la réduction de l'O<sub>2</sub> au niveau de l'électrode de platine polarisée négativement (-0,7 V) par rapport à l'électrode d'argent. L'intensité de ce courant est proportionnelle à la concentration en O<sub>2</sub>. La mesure est donc limitée par le temps de diffusion de l'O<sub>2</sub> à travers la membrane de téflon, ce qui donne un temps de réponse de l'ordre de 0,5 s. Avant chaque utilisation, l'électrode est étalonnée de 0% à 100% avec respectivement une solution d'hydrosulfite de sodium et de l'eau à 18°C saturée en air.

Cette méthode permet d'obtenir directement les variations de la concentration en O<sub>2</sub> donc de la photosynthèse nette et de la respiration et donne une mesure de l'activité photosynthétique globale de la suspension d'algues. Sous une illumination continue de faible intensité, la quantité d'O<sub>2</sub> émise est fonction de l'intensité lumineuse, alors qu'en lumière saturante c'est une étape du transfert d'électrons et de protons qui devient l'étape limitante : la photosynthèse est saturée et une intensité d'illumination plus forte ne conduit pas à plus d'O<sub>2</sub> émis. Elle permet ainsi de réaliser des courbes d'activité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse (courbes P-E) qui sont utilisées pour établir divers paramètres dont l'intensité de saturation de l'émission d'O<sub>2</sub> et la photosynthèse maximale (pour revues voir Henley, 1993; MacIntyre et Kana, 2002; voir également le chapitre III-Résultats et Discussion, § 6- I. ).

Grâce au dispositif du fluorimètre-PAM déjà décrit (voir § II- 1. 2. , Fig. 37), la concentration en O<sub>2</sub> et le rendement de fluorescence de la suspension algale sont enregistrés simultanément par un micro-ordinateur via un convertisseur 12 bit, un multiplexeur huit voies et le logiciel "Continu".

## II- 2. 2. Electrode de vitesse : le PS II.

Dans le centre réactionnel du PS II, après la séparation de charges, la réduction de la chlorophylle P680<sup>+</sup> se fait grâce aux électrons provenant de l'oxydation de l'eau ( $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ ), qui a lieu au niveau du cluster de manganèse OEC ("oxygen-evolving complex") (voir Chapitre I-Introduction, § I- 1. 1. 2. ). Entre le complexe OEC et la Chl P680 il y a un intermédiaire, une tyrosine monovalente appelée tyr Z, qui appartient à la protéine D1 et qui participe au transfert d'électrons. Quatre étapes sont nécessaires à l'oxydation de deux molécules d'eau (Fig. 40). Chaque étape correspond à la libération d'un électron qui réduit la Chl-centre P680<sup>+</sup>. Il y a cinq "états S de l'oxydation de l'eau": S<sub>0</sub>, état non oxydé; S<sub>1</sub>, premier électron cédé; S<sub>2</sub>, deuxième électron cédé; S<sub>3</sub>, troisième électron cédé; S<sub>4</sub>, quatrième électron cédé et libération d'une molécule d'O<sub>2</sub> (Joliot *et al.*, 1969; Kok *et al.*, 1970). Seuls les deux premiers niveaux d'oxydation de l'OEC, S<sub>0</sub> et S<sub>1</sub> sont stables à l'obscurité.

Afin de mesurer la séquence d'O<sub>2</sub> correspondant aux divers états d'oxydation du complexe d'oxydation de l'eau (OEC) (Fig. 40), il est indispensable de disposer d'un appareil dont le temps de réponse est situé dans le domaine de la milliseconde. L'O<sub>2</sub> est en effet produit en quelques millisecondes par les centres réactionnels PS II. L'électrode de vitesse mise au point par Joliot permet d'atteindre cette résolution. Le montage expérimental employé dans cette étude a été décrit pour la première fois par Lemasson et Etienne (1975) (Fig. 39). Pour ce type d'électrode, les algues disposées en monocouche sont directement en contact avec l'électrode de platine dont elles recouvrent toute la surface. Elles y sont maintenues par une membrane de dialyse et un milieu circule au-dessus de cette membrane afin de maintenir constante la concentration d'O<sub>2</sub> au niveau de la membrane. Il s'établit donc un gradient de concentration entre la surface de la membrane et celle de l'électrode de platine où elle est quasi nulle puisque l'O<sub>2</sub> est très rapidement réduit par l'électrode. Ici, c'est donc la vitesse d'émission de l'O<sub>2</sub> qui est mesurée.

En signal direct, on observe la production d'O<sub>2</sub> à chaque flash tandis que la concentration d'O<sub>2</sub> croît globalement. En effet, bien que l'O<sub>2</sub> produit au flash n soit d'une part évacué par une circulation continue d'eau de mer au-dessus de la membrane de dialyse qui maintient l'échantillon sur l'électrode et d'autre part réduit au niveau de l'électrode, la quantité d'O<sub>2</sub> dans la chambre n'est pas nulle lors du flash n+1. C'est pourquoi, pour s'affranchir de cette augmentation de la concentration d'O<sub>2</sub> au cours de la série de flashes, on utilise le signal dérivé (Fig. 41). Le pic positif de la dérivée correspond au point

Electrode de concentration

Electrode de vitesse

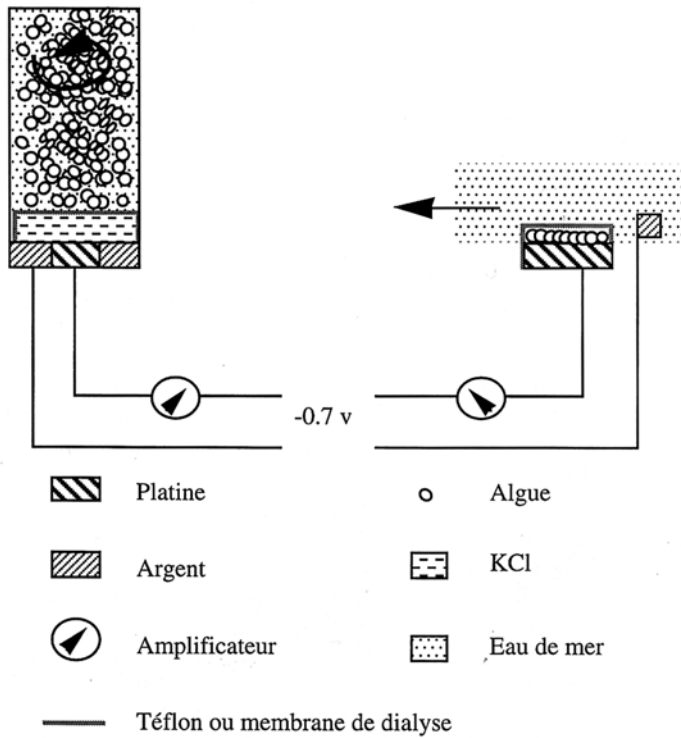


Fig. 39 : Schéma comparatif des deux types d'électrodes à O<sub>2</sub> utilisées.

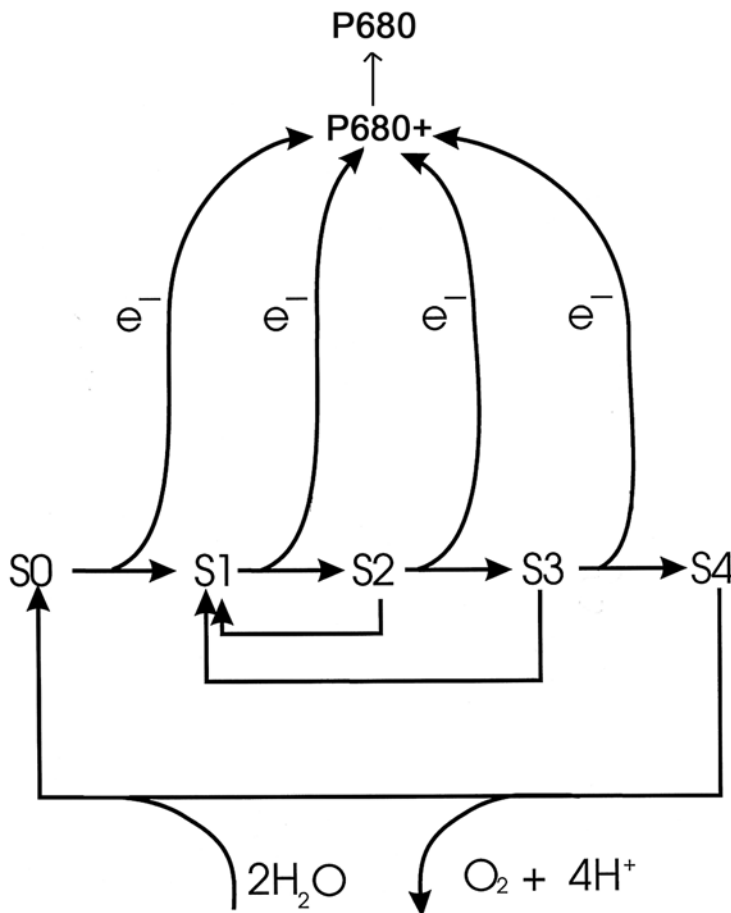
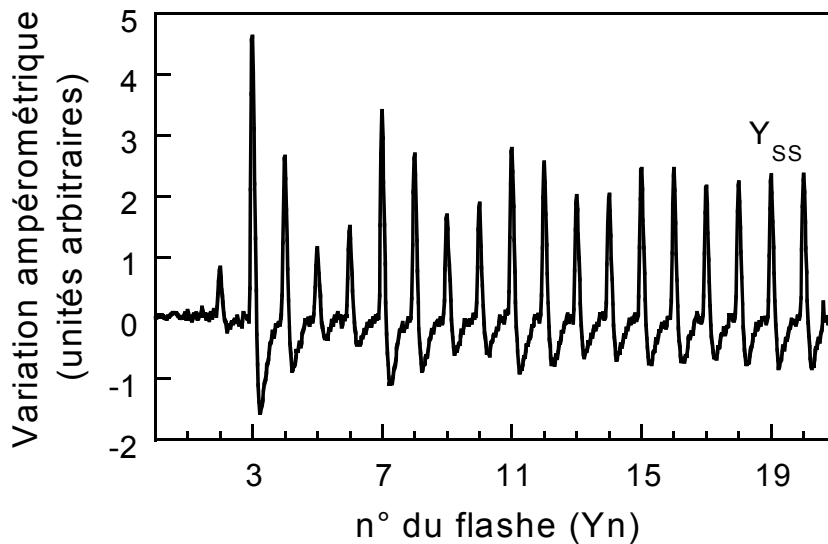


Fig. 40 : Représentation schématique du cycle des états-S de l'“Oxygen Evolving Complex” (ou cycle de Kok). A l'obscurité, seuls les états S<sub>0</sub> et S<sub>1</sub> sont stables d'où la désactivation de S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> en S<sub>1</sub>. P680 est la Chl-centre du PS II.

d'inflexion de la montée du signal direct; ce pic est d'autant plus grand que la pente du signal direct est forte. Le pic négatif correspond au point d'inflexion du déclin du signal direct. L'amplitude totale de la dérivée, notée  $Y_n$  pour le flash  $n$ , ainsi obtenue est proportionnelle à la surface du signal et donc à la quantité d' $O_2$  dégagée à chaque flash (Joliot *et al.*, 1969). Afin d'obtenir un temps de réponse optimal, les cellules doivent être réparties en couche monocellulaire sur l'électrode de platine (sinon elles ne reçoivent pas toutes la même énergie lumineuse et le temps de diffusion de l' $O_2$  augmente car la distance cellule-électrode de platine augmente). Une couche monocellulaire est obtenue en délimitant une chambre de faible épaisseur grâce à un morceau de scotch disposé autour de l'électrode de platine et en appliquant sur la surface de l'électrode une membrane de dialyse au-dessus de laquelle circule en continu de l'eau de mer thermostatée à 18°C.



**Fig. 41 :**  
Exemple de signal dérivé de l'émission d' $O_2$  (séquence d' $O_2$ ) obtenu à partir de cellules de *Phaeodactylum tricornutum* adaptées à l'obscurité.

Les flashes sursaturants d'une durée de 8  $\mu s$  et séparés de 500 ms sont produits par une lampe (Stroboslave, General Radio Company). Les flashes utilisés ici sont dits "single turn-over" (contrairement aux flashes du fluorimètre PAM qui sont "multi turn-over"). Leur brièveté et leur intensité sont telles que chaque PS II ne reçoit qu'un seul photon par flash. Chaque état S de l'OEC correspond ainsi à l'absorption d'un seul photon : on parle de "simple coup". Cependant, bien que la durée des flashes électroniques ne soit que de quelques microsecondes, ils possèdent une "queue" qui dure plusieurs dizaines de microsecondes. Certains PS II peuvent donc capter un second photon au cours du même flash et le cycle des états S avance alors de deux crans : on parle alors de "double coups". Au contraire, certains

PS II ne captent pas de photon pendant un flash : on parle de “manques”. On définit ainsi trois paramètres :

- $\alpha$  qui correspond à la proportion de manques.
- $\beta$  qui correspond à la proportion de simples coups.
- $\gamma$  qui correspond à la proportion de doubles coups.

Suivant le modèle matriciel de Lavorel (1976), un logiciel (“Oxygène”) mis au point au laboratoire par Barbet et Roux permet de calculer les trois paramètres ci-dessus et  $Y_n$ , la quantité d’oxygène produit au flash  $n$ . Selon ce modèle, on admet que :

- $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  sont identiques pour chacun des états S.
- la quantité d’O<sub>2</sub>  $Y_n$  dégagée lors de l’étape de transition S<sub>3</sub>-S<sub>0</sub> au flash  $n$  est proportionnelle à  $\beta$  et au nombre de centres à l’état S<sub>3</sub> au flash  $n-1$  :  $Y_n = \beta (S_3)_{n-1}$ . Selon le modèle théorique de Kok, 75 % des centres réactionnels PS II sont à l’état S<sub>1</sub> et 25 % à l’état S<sub>0</sub> à l’obscurité. Ces proportions expliquent la périodicité de type quatre observée pour une séquence d’O<sub>2</sub> typique réalisée sur des cellules adaptées à l’obscurité (Fig. 41). Sur cette séquence, la quantité d’O<sub>2</sub>  $Y_3$  produite au flash 3 est supérieure à  $Y_4$  et  $Y_7$  à  $Y_{11}$ . Après une vingtaine de flashes, les oscillations de la séquence tendent à s’amortir autour d’une valeur moyenne  $Y_{SS}$  (“Steady-State”) du fait des manques et des doubles coups; les états S sont alors théoriquement présents dans les mêmes proportions (25 %).  $Y_{SS}$ , la quantité moyenne d’O<sub>2</sub> dégagée pendant chaque flash est la somme des quatre derniers flashes d’une séquence de vingt.

Pendant une série de flashes saturants, les centres réactionnels PS II fonctionnent de manière quasiment synchrone et la quantité moyenne d’O<sub>2</sub> produite ( $Y_{SS}$ ) est proportionnelle à la quantité de centres réactionnels PS II actifs. Donc pour des flashes saturants, la quantité d’O<sub>2</sub> produite ne dépend pas de la taille de l’antenne PS II et les périodes d’obscurité entre les flashes sont suffisantes (500 ms) pour qu’aucune accumulation d’électrons n’ait lieu entre les deux photosystèmes (c’est-à-dire que  $Q_A$  a le temps d’être réoxydée entre chaque flash). Ainsi, cette méthode permet de mesurer le nombre de centres PS II actifs et donc de réaliser des cinétiques de photoinhibition (c’est-à-dire de perte d’activité PS II). De plus, si l’on fait varier l’intensité des flashes à l’aide de filtres neutres, il est possible de mesurer le dégagement d’O<sub>2</sub> en fonction de l’intensité des flashes, c’est-à-dire la taille d’antenne PS II des cellules : plus la taille de l’antenne PS II est grande, plus faible sera l’intensité des flashes permettant d’obtenir 50 % du dégagement maximal d’O<sub>2</sub>.

### II- 3. UTILISATION D'INHIBITEURS.

La phosphorylation due à l'ATP synthase couplée au transport d'électrons le long de la membrane thylakoïdale (voir Chapitre I-Introduction, § I- 1. 1. 2. ) peut être altérée par l'action d'agents découplants (Schonfeld et Schickler, 1988; Finazzi *et al.*, 1993). Un premier type d'agent comme le  $\text{NH}_4\text{Cl}$  facilite la perte du gradient de protons transthylakoïdal de façon électriquement neutre ce qui permet de diminuer le  $\Delta\text{pH}$ . Le DCCD (N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide) est un agent chimique sélectif des groupes carboxyles qui inhibe l'activité de l'ATP synthase et donc l'utilisation et la dissipation du  $\Delta\text{pH}$  (McCarty et Racker, 1967) : il permet d'augmenter le  $\Delta\text{pH}$ . Le DTT (dithiothréitol) est un inhibiteur spécifique de la dé-époxydase (Pfündel et Bilger, 1994). Ces trois produits chimiques ont été utilisés pour modifier :

- le  $\Delta\text{pH}$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  et DCCD),
- l'activité de la dé-époxydase soit de façon directe sans modification du  $\Delta\text{pH}$  (DTT), soit de façon indirecte via la modification du  $\Delta\text{pH}$  ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  et DCCD),
- l'activité de l'ATP synthase (DCCD).

De plus amples détails sont fournis quant à la "fiche technique" de ces agents (origine, concentrations utilisées, possibles effets indésirés, etc...) dans le Chapitre III-Résultats et Discussion, § 3- et 5- .

## III- PURIFICATION ET CARACTERISATION DES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES.

### III- 1. ISOLEMENT ET PURIFICATION DES COMPLEXES.

Les expériences d'isolement et de purification des complexes pigments-protéines sont effectuées le plus possible au froid et à l'obscurité pour préserver l'état natif de ces complexes. Tous les tampons utilisés contiennent des inhibiteurs de protéases (1mM Benzamidine et 1 mM phényl-méthane).

#### III- 1. 1. Solubilisation des complexes et isolement sur gradient de saccharose.

Le LHCF majeur de *P. tricornutum* a été isolé selon la méthode de Passaquet *et al.* (1991) (résumé de la procédure, Fig. 42). Les cellules ( $\approx 5 \mu\text{g Chl } a.\text{mL}^{-1}$ ) sont collectées par

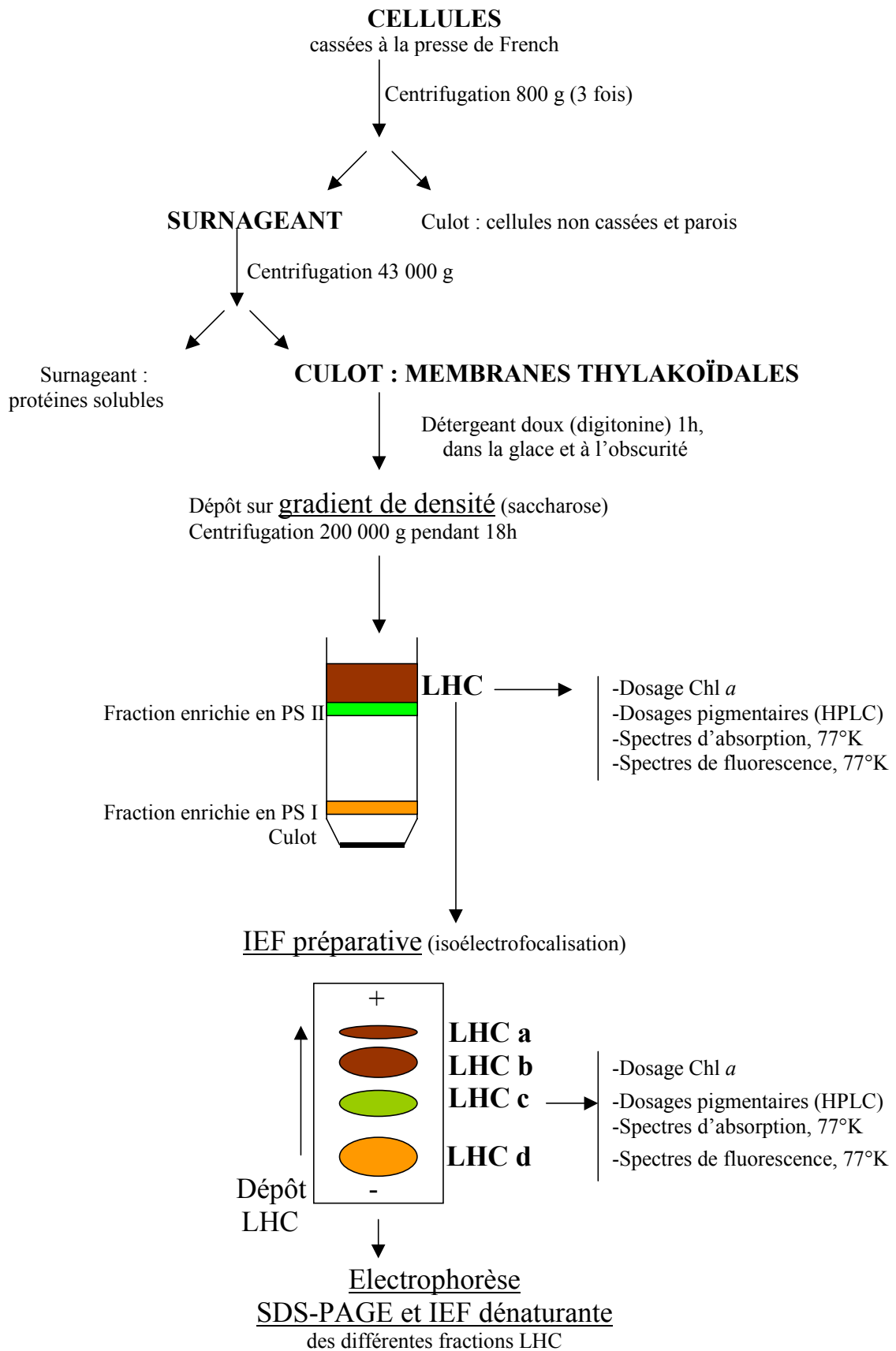


Fig. 42 : Procédure de purification et caractérisation des complexes antennes (LHC) de *Phaeodactylum tricornerutum*.

par centrifugation (3 000 g, 10 min) et resuspendues dans le tampon de cassage (50 mM Hepes-KOH (pH 7,6) avec 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 mM MnCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl; 6 mM Na<sub>2</sub>-EDTA; 5 mM acide amino caproïque; 0.6 M sorbitol et des inhibiteurs de protéases (1 mM phenylmethanesulfonylfluoride et 1 mM benzamidine). Les cellules sont ensuite cassées à la presse de French, à 3500 psi, et la suspension lavée trois fois : après chaque passage à la presse, la suspension est centrifugée 10 min à 800 g, le surnageant conservé à l'obscurité et à 4°C et le culot repris dans 10 mL de tampon de cassage. Les surnageants sont rassemblés et centrifugés 10 min à 43 000 g. Le culot est repris dans 2 mL de tampon de lavage (tampon de cassage sans sorbitol), homogénéisé avec un Potter de Thomas à 4°C. La concentration en Chl *a* et *c* est déterminée afin de pouvoir ajouter le détergeant (digitonine) dans un rapport digitonine/Chl, 80/1. Ce détergent doux permet de libérer les complexes pigments-protéines dans un état proche de leur état natif au sein des membranes (voir Chapitre I-Introduction, § II-2.1.).

La Chl totale est extraite par l'acétone à 90 % (centrifugation 15 min à 27 000 g) et sa concentration est estimée à partir des densités optiques (DO) à 664 nm et 630 nm au moyen d'un spectrophotomètre Varian DMS 90. Le dosage est réalisé selon les formules de Jeffrey et Humphrey (1975) :

$$\text{Chl } a \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = 11,47 \times \text{DO}_{664} - 0,40 \times \text{DO}_{630}$$

$$\text{Chl } c \text{ (mg.L}^{-1}\text{)} = 24,36 \times \text{DO}_{630} - 3,70 \times \text{DO}_{664}$$

Une technique plus rapide consiste à doser la Chl *a* par son pic d'absorption *in vivo* à environ 673 nm. Il a été vérifié que les deux techniques se recoupent. Ainsi, chez les diatomées, une DO<sub>673</sub> de 1 équivaut à une concentration de 16 µg Chl *a*.mL<sup>-1</sup>. Cette dernière méthode est utilisée en routine pour déterminer et ajuster la concentration en Chl *a* des cellules *in vivo* avant les mesures d'activité photosynthétique. Pour les algues vertes, la première méthode est préconisée pour doser les Chl *a* et *b*.

La digitonine est préparée dans un tampon Hépes amené à ébullition. Le détergent est mis en contact avec la suspension de membranes thylakoïdales à 4°C, à l'obscurité et sous agitation douce pendant 1 h. Le tout est ensuite centrifugé à 43 000 g pendant 10 min et le surnageant déposé sur un gradient discontinu de saccharose (10 %-5 mL, 15 %-5 mL, 20 %-5 mL, 30 %-4 mL, 40 %-4 mL, 50 %-4 mL). Le gradient est centrifugé dans une ultracentrifugeuse (L8-M Beckman) à 4°C, 140 000 g pendant 18 h dans un rotor à godets SW28 (Beckman). Les complexes pigments-protéines vont se séparer en fonction de leur taille et de leur densité. Les bandes colorées obtenues correspondent (Fig. 42), du bas vers le haut du



gradient, à une fraction enrichie en PS I (PS I+LHCF), en PS II (PS II+LHCF); la bande la plus haute, à 10-15 % du gradient, est composée du LHCF majeur (LHCF "libre"). Les trois fractions sont récoltées à l'aide d'un collecteur de fractions ISCO (modèle 1220+185) couplé à un détecteur UA-5 avec lecture de DO à 660 nm. Les fractions enrichies en PS I et PS II sont congelées pour des expérimentations ultérieures.

### **III- 1. 2. Purification des sous-complexes LHCF par focalisation isoélectrique non-dénaturante.**

La focalisation isoélectrique ou IEF est une technique permettant de séparer les complexes protéiques en fonction de leur point isoélectrique (pI). L'IEF préparative sépare les complexes pigments-protéines en les conservant (pour certains) dans une conformation proche de leur état natif et en conservant particulièrement les liaisons pigments-protéines. La méthode utilisée ici est inspirée de celle appliquée chez les plantes supérieures (Ruban *et al.*, 1994). Le gel de migration est un gel Ultrodex à 4 % contenant 0,05 % de  $\beta$ -dodécyl maltoside (un détergent très doux); 1 % de glycine; 0,2 % d'antiprotéases. Le gradient de pH 3-7, est assuré par des ampholines (Serva). Le gel est coulé dans un moule possédant à chaque extrémité des bornes en mousse puis soumis à une déshydratation partielle (30 %) dans une étuve à 40 °C selon les instructions du fabricant (Amersham). Le moule est déposé sur un appareil Multiphor II (Amersham) sur lequel est préalablement appliquée une solution de Triton 20 % afin d'assurer au mieux le contact. Une des bornes en mousse est imbibée avec de la soude 1 M, ce sera la borne négative et l'autre (borne positive) avec de l'acide phosphorique à 85 %. Le tout est maintenu à 4°C et à l'obscurité. Le gradient de pH est établi par une focalisation "à vide" pendant 45 min avant le dépôt de l'échantillon LHCF.

En parallèle, la bande LHCF est dialysée contre un tampon de glycine 1 %, pH 6,2. Ceci permet de neutraliser l'échantillon et d'éliminer la digitonine et les sels qui pourraient gêner la migration sur le gel d'IEF. L'échantillon LHCF dialysé est concentré environ vingt fois sur des colonnes Centricon 10 (Biorad) par centrifugation à 3 000 g à 4°C pendant 2 à 3 h. L'échantillon concentré ( $\approx$  250  $\mu$ g de Chl *a*), de volume 1 mL dans de la glycine 1 %, est mis à incuber avec 0,05 % de  $\beta$ -dodécyl maltoside sur la glace et à l'obscurité pendant 1 h. Ceci permet de conserver les complexes à l'état dissous et d'en redissocier certains de façon à favoriser la migration sur le gel d'IEF. L'échantillon est ensuite déposé à quelques cm de la cathode. La migration est effectuée à puissance constante (7 W) et elle est stoppée à quelques

centimètres de l'anode dont l'acidité pourrait dégrader les pigments. Quatre bandes IEF sont ainsi obtenues (LHCF a, b, c et d). Elles sont récupérées à l'aide d'une spatule et éluées sur des colonnes d'éluion avec un volume minimum de glycine 1 % pH 6,2 conservée à 4 °C (en général entre 0,5 et 2 mL en fonction de la largeur de la bande) au cours d'une centrifugation (5 min, 800 g, 4 °C).

### **III- 2. CARACTERISATION POLYPEPTIDIQUE DES COMPLEXES PIGMENTS-PROTEINES.**

Les protéines des différentes fractions LHCF sont précipitées par traitement à l'acétone absolu (2 vol) pendant 30 min sur la glace afin d'éliminer les pigments qui pourraient gêner la migration. Les culots protéiques sont récupérés après centrifugation en tube Eppendorf (8 000 g, 30 min). Deux méthodes d'analyse polypeptidique sont employées : la technique SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS) qui permet de séparer les polypeptides selon leur masse moléculaire et densité, et la technique de l'IEF dénaturante qui sépare les polypeptides selon leur pI. La seconde est utilisée en complément de la première afin d'affiner l'analyse (voir Fig. 43 pour un résumé de la procédure).

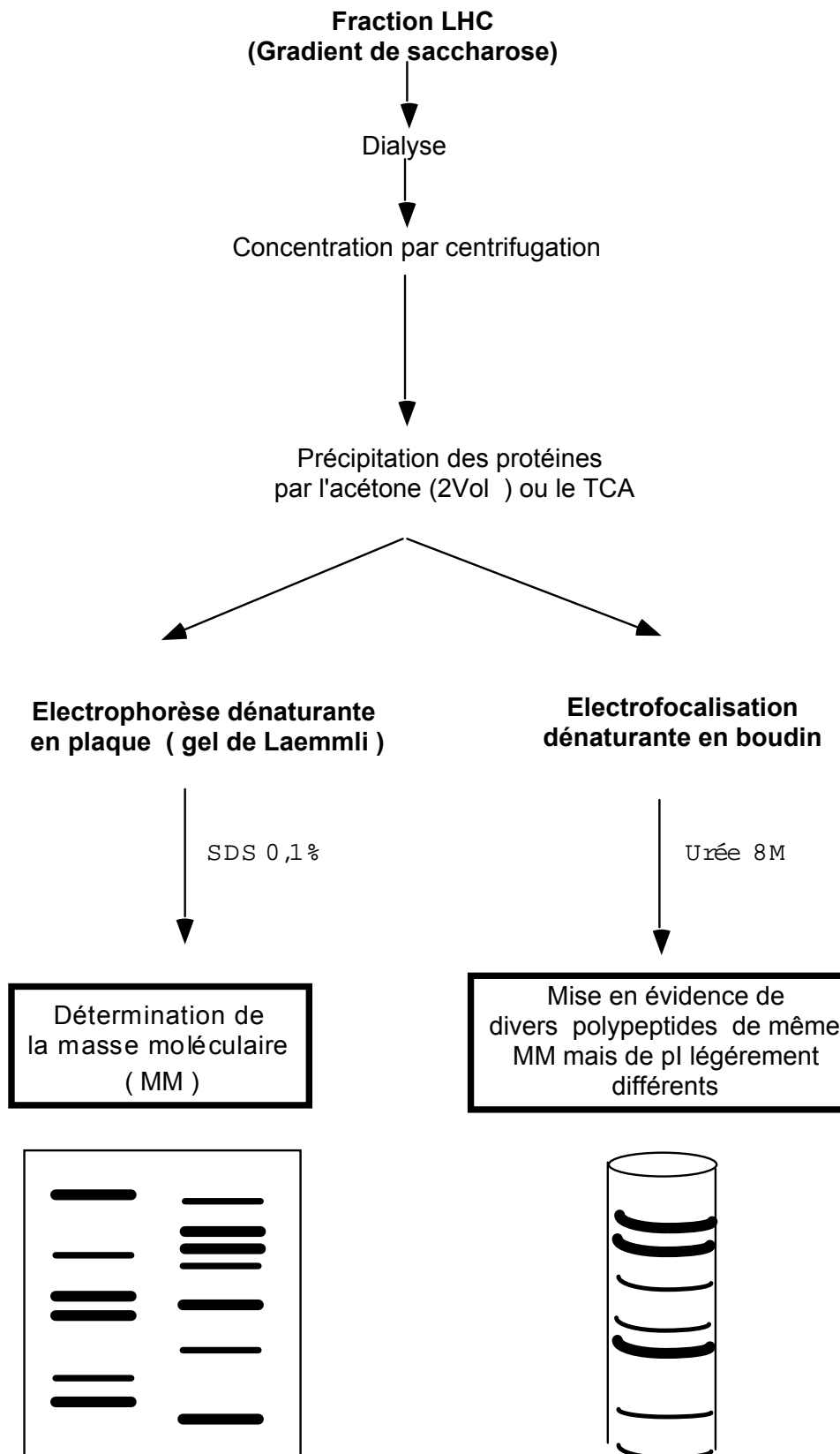
#### **III- 2. 1. Technique SDS-PAGE.**

La méthode mise au point par Laemmli (0,1 % SDS) (Laemmli, 1970) est utilisée. Le gel est constitué d'un gel supérieur de concentration à 5 % d'acrylamide et d'un gel inférieur de séparation en gradient continu d'acrylamide de 15 à 20 % :

- gel de concentration : Acrylamide/Bis-acrylamide (30/0,8); Tris 0,125 M pH 6,8; SDS 0,1 %; Temed 0,075 %; persulfate d'ammonium 0,05 %.

- gel de séparation : idem sauf Tris 0,375 M pH 8,8, Temed 0,015 %, persulfate 0,025 %.

Les protéines sont dénaturées par un tampon Tris 0,065 M pH 6,8; SDS 2 %;  $\beta$ -mercapto-éthanol 5 %; glycérol 10 %. La migration s'effectue par application d'un courant à ampérage constant dans un tampon Tris 0,25 M/glycine 1,92 M. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (0,02 %) dans une solution éthanol/acide acétique/H<sub>2</sub>O (45/10/45; v/v/v) et décoloré dans une solution à 10 % d'acide acétique.



**Fig. 43** : Procédure utilisée pour caractériser les polypeptides des fractions complexes antennes (LHC) de *Phaeodactylum tricornutum* (pI, point isolélectrique).

### III- 2. 2. IEF dénaturante.

Les IEF dénaturantes sont réalisées dans des gels en boudin de 0,6 mL (diamètre de 2 mm), présentant un gradient de pH 3-5 majoritaire, sur lequel sont déposés les polypeptides précipités à l'acétone et redissous dans un tampon de dénaturation urée 8 M :

- gel de migration : Acrylamide/Bis-acrylamide (30/0,8; v/v) 6,6 %; urée 8 M; ampholines (Serva) pH 3-5 3,5 %; ampholines pH 3-10 1,5 %; Triton X100 0,1 %; Temed 0,1 %; persulfate d'ammonium 1,5 %; H<sub>2</sub>O qsp 10 mL.

- tampon de dénaturation : urée 8M; ampholines pH 3-7 1 %; ampholines pH 3-10 0,2 %; glycérol 25 %; Triton X100 0,1 %.

Par dessus le gel de migration est déposé un tampon identique au tampon de dénaturation mais en urée 6 M; ampholines pH 3-7 5 %; ampholines pH 3-10 0,5 %. Ce tampon permet de séparer l'échantillon de la solution de l'anode (acide phosphorique 66 %) qui est déposé par dessus le tout. Le tube est ensuite placé dans une cuve à électrophorèse appropriée contenant la solution de la cathode (Tris 60 %). La migration se fait par augmentation graduelle du voltage (250 V pendant 1h, 500 V pendant 1h 30 et 750 V pendant 4 h) afin d'éviter l'échauffement du gel par élimination progressive des sels. Après migration, les protéines sont fixées 30 min dans une solution acide trichloracétique 12,5 %; méthanol 30 %. Le gel est ensuite coloré au bleu de Coomassie (0,04 %) dans une solution isopropanol 27 % ; acide acétique 10 %; CuSO<sub>4</sub> 0,5 % et décoloré dans une solution isopropanol 12 %; acide acétique 7 %; CuSO<sub>4</sub> 0,5 %.

### IV- ANALYSES PIGMENTAIRES.

Trois méthodes ont été utilisées dans ce cadre. Elles permettent de quantifier avec exactitude les contenus pigmentaires, chlorophylles et caroténoïdes, des complexes antennes et de déterminer si les connexions pigments-protéines ont été conservées au cours de la purification et donc si les complexes obtenus sont proches de leur état *in vivo*. Ces trois méthodes ont également été utilisées pour caractériser les contenus pigmentaires des cellules entières et également pour mesurer la dé-époxydation de la DD en DT (voir le Chapitre III-Résultats et Discussion).

#### IV- 1. SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION.

Les spectres d'absorption des cellules entières ou des fractions LHCF correspondent à la somme des spectres des complexes pigments-protéines soit *in vivo*, soit isolés. Il sont effectués à l'aide d'un spectrophotomètre Aminco DW2 entre 750 et 400 nm avec une bande passante de 30 nm et à une vitesse de 1 nm.s<sup>-1</sup>. Le zéro est calibré sur la longueur d'onde 750 nm. Lorsqu'ils sont réalisés à température ambiante (293 °K), la suspension de cellules ou de complexes pigments-protéines est placée dans des cuves en verre. Un système mis au point au laboratoire permet de réaliser des spectres à température de l'azote liquide (77 °K) ce qui permet une meilleure définition des pics d'absorption. Dans ce cas, les cellules ou les complexes isolés sont déposés de façon homogène sur un filtre millipore (AP20) et immédiatement congelés.

#### IV- 2. SPECTROFLUORIMETRIE.

Les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence ont été réalisés à 77 °K avec un fluorimètre Hitachi F-4500. Les cellules entières ou les complexes-pigments protéines isolés sont déposés de façon homogène sur un filtre millipore (AP20) et immédiatement congelés. La concentration en Chl *a* doit être suffisamment importante pour avoir un signal correcte et suffisamment basse pour éviter les phénomènes de réabsorption de la fluorescence émise. Pour les cellules entières, la concentration utilisée est de 1 µg Chl *a*.mL<sup>-1</sup>, pour les fractions LHCF, on dépose environ 80 µg de Chl *a* sur le filtre.

Les spectres d'émission de fluorescence sont obtenus en excitant l'échantillon à une longueur d'onde de 440 nm (pic d'absorption de la Chl *a* dans le bleu) avec une bande passante de 2,5 à 5 nm en fonction de l'échantillon utilisé. Le fluorescence chlorophyllienne émise est mesurée entre 600 et 800 nm à une vitesse de 1 nm.s<sup>-1</sup>. Les bandes d'émission de fluorescence observée sont celle de la Chl *a* et celle, éventuellement, de la Chl *c* si celle-ci est déconnectée au sein des complexes pigments-protéines isolés.

Les spectres d'excitation de fluorescence, en comparaison des spectres d'absorption à 77 °K, permettent d'apprécier le degré de connexion des pigments collecteurs d'énergie au sein des complexes et donc le transfert d'énergie à l'accepteur terminal Chl *a*. Si les pigments accessoires (comme la Chl *c* et la fucoxanthine) sont correctement connectés, ils transmettent leur énergie à la Chl *a*. S'ils sont mal connectés, soit ils fluorescent (Chl *c*), soit leur bande d'absorption est totalement décalée (fucoxanthine). On mesure donc l'émission de

fluorescence à 680 nm (maximum d'émission de la Chl *a*) en excitant l'échantillon aux longueurs d'ondes d'absorption comprise entre 400 et 665 nm avec une bande passante de 2,5 à 5 nm. Les échantillons sont préparés comme précédemment. Afin de corriger les spectres d'excitation, c'est-à-dire de maintenir un nombre de photons constant aux diverses longueurs d'onde (les radiations rouges sont moins énergétiques que les bleues), ce qui en pratique est impossible, on applique aux données brutes une matrice correctrice établie à partir d'une solution saturée en colorants, quasiment "noire" (méthode de Nothgamel, 1987).

#### IV- 3. QUANTIFICATION PIGMENTAIRE PAR HPLC.

L'appareil HPLC (Chromatographie Liquide Haute Performance) est un chromatographe en phase liquide à haute pression équipé d'une précolonne de 5 cm et d'une colonne pour la phase inverse Zorbax ODS C<sub>18</sub> de porosité 5 µm. Il permet de séparer les pigments par ordre de polarité décroissante suivant le principe de la chromatographie de partage en phase inverse. Ces analyses pigmentaires ont été réalisées au laboratoire par B. Rousseau selon la méthode de Arsalane *et al.* (1994).

Pour les cellules entières, celles-ci sont déposées sur un filtre millipore (AP20) et gelées dans l'azote liquide avant d'être fixées dans un mélange de solvants acétone/méthanol (30/70; v/v) pour extraire les pigments. Après élimination des débris cellulaires et des protéines par centrifugation, le surnageant est évaporé sous vide. Dans le cas de fractions LHCF pigments-protéines, l'échantillon est directement traité par le mélange de solvants. Les extraits pigmentaires sont redissous dans du méthanol puis filtrés à travers une membrane de porosité 0,5 µm (Millipore, PTFE). Un volume de 100 µL d'extrait, contenant au moins 1 µg de Chl, est injecté dans la colonne pour chaque analyse. La phase mobile est constitué d'un gradient des deux solvants suivants:

- solvant A : eau (13 %) + méthanol (51 %) + acétonitrile (36 %) + acétate d'ammonium (0,3 M)

- solvant B : acétonitrile (30 %) + acétate d'éthyle (70 %).

Un gradient linéaire entre 100 % du solvant A et 100 % du solvant B à 20 mn est appliqué avec un débit de 1,4 mL.min<sup>-1</sup> (méthode adaptée de Kraay *et al.*, 1992).

Pour calibrer l'appareil, des pigments témoins ont été utilisés et des paramètres de quantification relatifs à chaque pigment (coefficients d'extinction et spectres d'absorption) sont mémorisés par un logiciel de traitement des données. Les profils d'élution représentent

l'absorption pour des longueurs d'onde données (pour une exemple voir la partie Annexe). Pour chaque pigment élué, le spectre d'absorption entre 300 et 600 nm est enregistré à la sortie de la colonne et comparé aux spectres des pigments témoins.

\*\*\*\*\*

# **CHAPITRE III**

## **RESULTATS**

### **ET**

## **DISCUSSION**



# CHAPITRE III

## 1<sup>ère</sup> PARTIE

*1- Influence du régime lumineux  
sur l'antenne collectrice de lumière  
et sur la taille du pool de diadinoxanthine  
chez Phaeodactylum tricornutum*

---

**INFLUENCE DU REGIME LUMINEUX  
SUR L'ANTENNE COLLECTRICE DE LUMIERE  
ET SUR LA TAILLE DU POOL DE DIADINOXANTHINE  
CHEZ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM***

Arsalane *et al.* (1994), avaient remarqué que la taille du pool de DD augmentait lorsque la vitesse de croissance des cellules diminuait. Cette diminution était due au fait que la culture atteignait la phase stationnaire de croissance entraînant d'autres modifications de l'appareil photosynthétique ce qui rendait difficile la comparaison des capacités de photoprotection entre les cellules pauvres et enrichies en DD (voir Chapitre I-Introduction, § II- 3. 3. 1. ). Une autre façon de ralentir la croissance des cellules est de diminuer la quantité de lumière disponible par jour sans diminuer l'intensité lumineuse (qui on l'a vu engendre d'autres modifications), c'est-à-dire de les cultiver en lumière intermittente. La seconde intention était également de tenter de mimer grossièrement un milieu turbulent extrême afin d'observer la réponse des diatomées. Ce type de régime lumineux nous a permis d'obtenir des cellules de *Phaeodactylum tricornutum* spécifiquement enrichies en DD et donc extrêmement précieuses pour étudier en détail le rôle du cycle des xanthophylles et du NPQ dans la photoprotection. Le chapitre suivant décrit l'influence d'un régime de lumière intermittente sur l'antenne collectrice de lumière et la taille du pool de DD chez *P. tricornutum*. Il est présenté sous la forme d'une publication soumise à **Journal of Phycology**.

**RESUME DES RESULTATS.**

*Le régime de lumière intermittente ne modifie que la taille du pool des xanthophylles participant au cycle.*

Comme expliqué dans l'Introduction, les diatomées sont réputées capables de supporter de longues périodes d'obscurité et nous avons constaté que c'est effectivement le cas. En utilisant la même intensité faible que pour le cycle classique de 16 h lumière/8 h obscurité et en limitant la durée de l'illumination à cinq minutes par heure (soit 2 h de lumière par jour), la croissance est fortement ralentie (d'un facteur 10). Les conséquences sur

l'appareil photosynthétique de *P. tricornutum* sont tout à fait intéressantes (Tableau 1). Il semble en effet qu'à l'intensité lumineuse utilisée ( $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , sous un régime lumineux "classique"), le chloroplaste ait déjà atteint sa taille maximale (Fig. 1). En conséquence, les concentrations de Chl *a* et *c*, et de fucoxanthine sont quasi-invariantes avec néanmoins une légère diminution de la fucoxanthine (Tableau 2). La taille de l'antenne du PS II (évaluée d'une part par le demi-temps de montée de l'induction de fluorescence en présence de DCMU, et d'autre part par la courbe de saturation du rendement d' $\text{O}_2$  par flash) reste la même (Fig. 2 et 3). Le changement le plus remarquable concerne le contenu de la cellule en DD. En effet la quantité de DD (rapportée à la Chl *a*) double en lumière intermittente (Tableau 2, Fig. 4 et 5). Les questions sur la localisation de ce pool, sa capacité de participer au cycle et surtout à intervenir dans la photoprotection viennent immédiatement à l'esprit.

***La quantité supplémentaire de diadinoxanthine participe au cycle des xanthophylles.***

Comme illustré Figure 6, le pool important de DD chez les cellules cultivées en lumière intermittente (IL) participe au cycle des xanthophylles et nous avons même trouvé un taux de dé-époxydation plus important pour le pool dont la taille est doublée (63% contre 50%).

***La quantité supplémentaire de diadinoxanthine se fixe sur le complexe antenne majeur (LHCF).***

Ce fait important est basé sur deux observations :

1) Il est possible de purifier biochimiquement le complexe antenne dont une partie est copurifiée avec les deux photosystèmes mais dont la majeure partie peut être isolée sous forme d'une large bande sur un gradient de densité après traitement des membranes avec un détergent doux (la digitonine). La purification du LHCF majeur de cellules préilluminées ou non montre que la dé-époxydation concerne bien la DD liée au LHCF et ce dans une proportion de 67 % soit un taux de dé-époxydation proche de celui déterminé dans les cellules entières (Tableau 2, Fig. 7). A ce stade de nos recherches, le nombre de xanthophylles par sous-unité de LHCF n'a pas encore été déterminé. Cependant, nous avons constaté que la concentration de fucoxanthine baisse de façon proportionnelle à l'augmentation de la concentration de DD puisque la somme des deux reste constante. Nous émettons donc

l'hypothèse que la DD, quand elle est abondante, remplace la fucoxanthine dans une certaine proportion des sites, la fucoxanthine restant largement majoritaire. Une telle hypothèse est tout à fait possible si on s'en réfère aux résultats connus sur le LHC des plantes supérieures (Bassi et Caffarri, 2000).

2) Pour avoir une influence sur la dissipation non-radiative de l'énergie absorbée en excès, il est fort la DT formée lors d'une forte illumination soit liée aux LHCF (ce n'est cependant pas obligatoire ; il peut en effet exister des transferts d'énergie entre le complexe antenne et des complexes protéines-pigments localisés dans la membrane thylakoïdale mais non liées au complexe antenne. Dans le chapitre suivant, nous montrerons que pour les cellules IL, les valeurs maximales du NPQ sont largement supérieures à celles obtenues dans les cellules poussées sous un cycle "classique" lumière/obscurité (CL). C'est une preuve supplémentaire que malgré l'invariance de la taille d'antenne, le nombre de molécules de DD qui sont liées au LHCF peut doubler. L'invariance de la taille d'antenne ne signifie pas nécessairement que les sous-unités dont est composé le LHCF soient strictement les mêmes pour les cellules IL ou CL. Les gènes *lhcf* connus ne sont pas strictement identiques et la régulation de leur expression est différente. Des résultats préliminaires indiquent l'existence d'une dizaine de bandes protéiques individualisées par IEF dénaturante pour les cellules CL (voir Chapitre III, § 6- 2. ). Il est possible que pour les cellules IL, la proportion et la nature des gènes exprimés soient différentes.

## Partial replacement of fucoxanthin by diadinoxanthin in the light-harvesting complex of a diatom (Bacillariophyceae) grown under intermittent light

Johann Lavaud, Bernard Rousseau, Christiane Lichtlé and Anne-Lise Etienne

Laboratoire 'Organismes Photosynthétiques et Environnement', UMR CNRS 8543, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm 75230 PARIS Cedex 05, France

### Abstract

Marine planktonic diatoms *Phaeodactylum tricornutum* Böhlin were grown at a low irradiance of 40  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  under two light regimes: 'continuous light' (CL) (16 h light / 8 h dark) and 'intermittent light' (IL) (5 min light / 55 min dark). We observed that the IL regime induces a specific increase in the pool size of the photoprotective xanthophyll, diadinoxanthin (DD). The cell size and chloroplast ultrastructure were unaltered by the IL regime, as were the photosystem stoichiometry, the antenna size of photosystem II and the chlorophyll and fucoxanthin content. The increased DD pool corresponds to an increase percentage of molecules accessible to de-epoxidation. The major part of DD was found associated to the major light-harvesting complex. For an increased amount of DD, some of the fucoxanthin molecules bound to the periphery of the light-harvesting complex could be replaced by DD molecules. Under high light, these additional molecules are de-epoxidized into diatoxanthin and participate in the formation of non-photochemical fluorescence quenching. The intermittent light-grown diatoms provide a unique material to study the localization of photoprotective xanthophylls and the mechanisms of photoprotection in algae and plants.

*Key Index Words:* diadinoxanthin; diatoms; diatoxanthin; intermittent light; light-harvesting complex, *Phaeodactylum tricornutum*; xanthophyll cycle.

*Abbreviations:* Chl, chlorophyll; CL, continuous light; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; IL, intermittent light; NPQ, non-photochemical fluorescence quenching; PS II and I, photosystem II and I

## **Introduction**

Diatoms, which account for 40 % of the oceanic carbon primary production (Field et al. 1998), flourish in turbulent waters (Harris 1986; Fogg 1991). The deep vertical mixing exposes them to very large short-term changes in light intensity (Lewis et al. 1984; MacIntyre et al. 2000). Under these conditions, they may experience high light intensities when rapidly transported to the surface where a decline in their photosynthetic quantum yield efficiency, called photoinhibition, may occur (Neale 1987; Long et al. 1994).

Photosynthetic organisms have developed a number of strategies to cope with fluctuating light in order to minimize photoinhibition that could result from their periodic exposure to high light intensities (MacIntyre et al. 2000). Among the short time scale 'safety valves', the photoprotective non-radiative dissipation of the light energy absorbed in excess is an important mechanism (Niyogi 2000). This phenomenon is attributed to rapid modifications within the light-harvesting complexes of photosystem II (PS II) leading to a decrease in the fluorescence yield (Horton et al. 1996; Müller et al. 2001). It is referred to as the non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) and measured by variations in chlorophyll (Chl) fluorescence emission under high light. In green plants, NPQ is controlled by the formation of a proton gradient across the thylakoid membrane and by reversible conversion of epoxidized to de-epoxidized forms of xanthophylls (the so-called xanthophyll cycle, Eskling et al. 1997; Gilmore 1997).

NPQ exists also in diatoms and is associated with a related xanthophyll cycle which converts the light-harvesting pigment diadinoxanthin (DD) into diatoxanthin (DT) under high light, while DT is reconverted to DD under low light or darkness (Arsalane et al. 1994; Olaizola et al. 1994; Olaizola and Yamamoto 1994; Casper-Lindley and Bjorkman 1998). The organization of the photosynthetic apparatus in diatoms differs in many aspects from that of green plants (Pyszniak and Gibbs 1992). Their light-harvesting complex subunits are made of several highly homologous proteins encoded by a multigene family (Fucoxanthin Chlorophyll Proteins, FCPs, Bhaya and Grossman 1993). Their exact supramolecular organization within the membrane remains however unknown; only one major chlorophyll *a* (Chl *a*)/Chl *c*/fucoxanthin and a minor Chl *a*/Chl *c* complex have been described (Friedman and Alberte 1984; Owens and Wold 1986). In addition, very little is known about the localization of xanthophylls, and especially DD and DT, in the light-harvesting complexes of fucoxanthin-containing organisms (De Martino et al. 2000a). No evidence has been found for state-transitions (Owens 1986).

In a recent study, we showed that the specific properties of DD-cycling and the associated NPQ was common to several planktonic diatom species, and that under a ‘classic’ light regime of 16 h light / 8 h dark at low light intensity ( $40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ), the DD content was species dependent (Lavaud et al., submitted). A precise control of the culture conditions and especially of the light regime to which cells are exposed enabled us to define conditions for a specific increase in the DD content. An intermittent light regime led, in cells of the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum* Böhlin, to a dramatic increase in the DD content without modification of the other components of the photosynthetic machinery. The additional DD was found to be convertible to DT under high light exposure and this correlated with an increase in photoprotective energy dissipation (Lavaud et al. 2002a).

A comparison of the light-harvesting system and xanthophyll cycle of *P. tricornutum* cells grown under a ‘classic’ light regime with those of cells grown under an intermittent one brought useful new informations on the flexibility of the light-harvesting complex of diatoms, its role in energy transfer and dissipation, and on the binding of the different xanthophylls to the major light-harvesting complex.

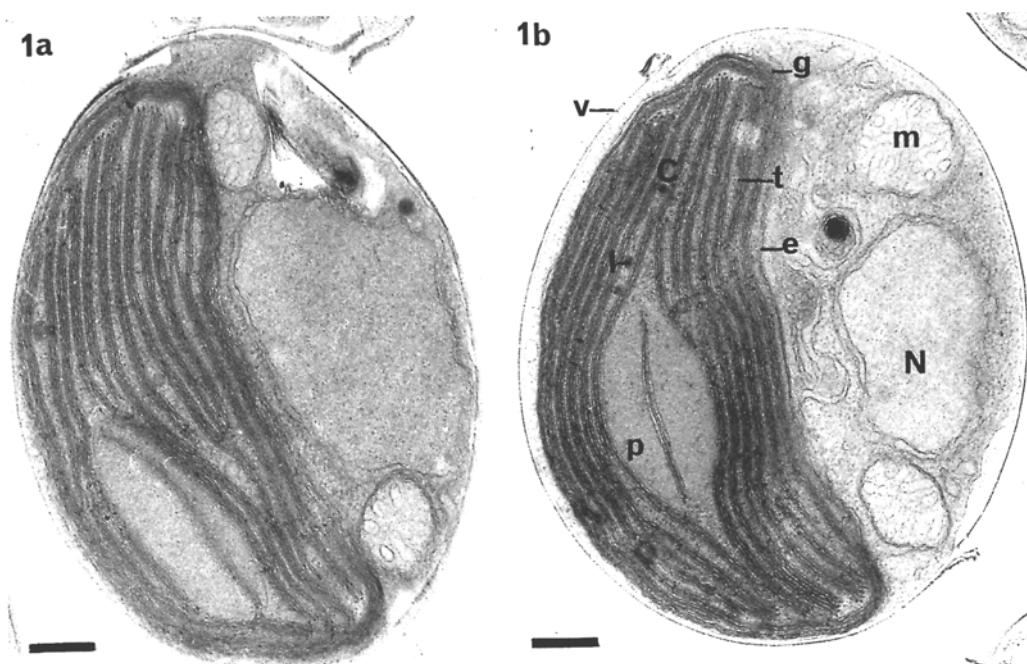
## Results

### *Ultrastructure of the CL and IL cells.*

*Phaeodactylum tricornutum* Böhlin cells were grown at low light intensity ( $40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) under two different light regimes: a 16 h light / 8 h dark cycle for ‘continuous light’ (CL) cultures and a 5 min light / 55 min dark cycle for ‘intermittent light’ (IL) cultures. The growth rate under IL illumination was reduced by a factor 10, due in part to the 8-fold lower total amount of light supplied (Table 1).

*P. tricornutum* have different morphotypes which vary with culture conditions (Borowitzka and Volcani 1978; Gutenbrunner et al. 1994). Under our growth conditions, CL and IL cells appeared fusiform and of similar sizes of  $3 \times 15 \mu\text{m}$ . Sections of the CL and IL cells are shown in Fig. 1. In *P. tricornutum*, the valves (v) which form the foundation of the external wall (the frustule) are only partially or even not silicated (Lewin et al. 1958; Borowitzka and Volcani 1978). In these thin sections of the central plan, the single chloroplast (C) occupies about half of the cell and no vacuoles are visible because they are located at the extremities of the cell (Borowitzka and Volcani 1978). Thylakoids (t) show no granar and intergranar regions. Instead, they are loosely appressed and organized in extended bands of three thylakoids along the length of the plastid, the whole system being surrounded

by a four membrane envelope (e). The outer three thylakoids band, the girdle stack (g) goes all around the plastid. The chloroplast is equipped with a pyrenoid (p) with an internal band of thylakoids. It also contains small spherical lipid droplets (l). Chloroplast ultrastructure, as illustrated by the number of thylakoids and their organization, is similar for cells under the two light regimes (Fig. 1a and 1b).



**Figure 1.** *Phaeodactylum tricornutum* cells grown under continuous light (CL, 1a) and intermittent light (IL, 1b). C, chloroplast; e, chloroplast envelope; g, thylakoid girdle stack; l, lipid droplets; m, mitochondrion; N, nucleus; p, pyrenoid; t, thylakoids, associated in threes; v, frustule valve. Scale bar = 0.2  $\mu\text{m}$ .

**Table 1.** Growth rate and photosynthetic properties of CL and IL cells.

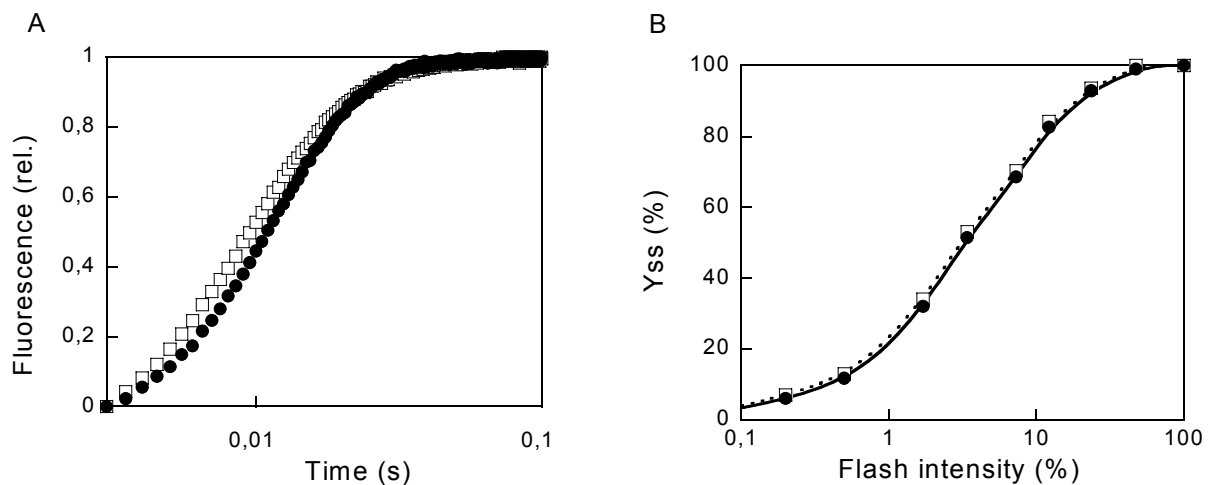
	CL cells	IL cells
Growth rate ( $\text{d}^{-1}$ )	$\cong 0.65$	$\cong 0.065$
$P_{700}$	$0.16 \pm 0.01^a$	$0.17 \pm 0.01$
$Y_{SS}$ (arbitrary units) <sup>b</sup>	$29 \pm 1.8$	$31 \pm 1.2$
$F_v/F_m^c$	$0.77 \pm 0.02$	$0.78 \pm 0.01$
$t_{1/2}$ of $F_v$ with DCMU (ms) <sup>d</sup>	9	10
$I_{1/2}$ of $Y_{SS}$ (%) <sup>e</sup>	3.8	4.0

(<sup>a</sup>) All data ( $\pm$  SD) are the average of 3 measurements. (<sup>b</sup>) Steady-state  $\text{O}_2$  yield per single-turnover flash, a measure of the concentration of oxygen-evolving PS II reaction centers. (<sup>c</sup>) Quantum yield of photochemistry by PS II. (<sup>d</sup>) Half rise-time of fluorescence induction at a given light intensity in the presence of DCMU—a measure of PS II antenna size. (<sup>e</sup>) Flash intensity required for half-saturation of  $Y_{SS}$ -reciprocal measure of PS II antenna size.

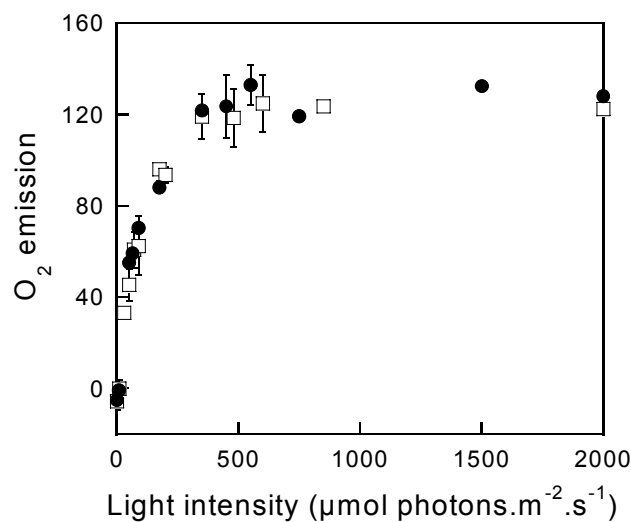


*Photosynthetic parameters and pigment content.*

For both types of cells the number of  $P_{700}$ , of oxygen evolving PS II reaction centers as measured by the steady-state  $O_2$  yield per flash ( $Y_{SS}$ ), as well as the quantum yield of excitation trapping by PS II ( $F_v/F_m$ ) were similar (Table 1). The PS II antenna of dark-adapted cells measured by the half rise-time of the fluorescence induction and by the flash intensity required for half-saturation of  $Y_{SS}$  were also similar (Fig. 2, Table 1). The rate of  $O_2$  emission as a function of light intensity (P-E curves) were similar for the two types of cells (Fig. 3). The maximal rate of  $O_2$  emission, 120-125  $\mu\text{mol } O_2 \cdot \mu\text{g Chl } a^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , was reached for a light intensity of 450  $\mu\text{mol photons} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .



**Figure 2.** PS II antenna size of CL (squares) and IL (circles) cells measured by (A) the half rise-time of fluorescence induction at a given light intensity in the presence of DCMU, (B) the flash intensity required for half-saturation of the steady-state oxygen yield per flash.



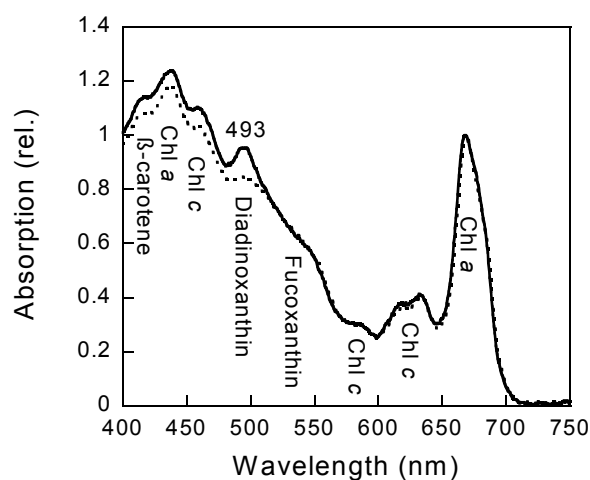
**Figure 3.**  $O_2$  emission ( $\mu\text{mol } O_2 \cdot \text{mg Chl } a^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) as a function of light intensity (photosynthetic light-response curves) of CL (squares) and IL (circles) cells measured with a Clark electrode. Values are the average ( $\pm$  SD) of three measurements.

In contrast, the DD content of IL cells was more than twice that of CL cells, as determined by HPLC analysis (Table 2), corresponding to an increase in absorption between 400 and 500 nm (Fig. 4, note in particular the peak at 493 nm). No other significant differences were found in whole cells (Table 2 and Fig. 4). Fluorescence emission spectra showed two maxima at 687 and 711 nm; the F687 / F711 ratio was lower for IL cells (Fig. 5A). The 711 nm peak is attributed to PS I (Berkaloff et al. 1990). The fluorescence excitation spectra for the emission at 687 nm were similar (Fig. 5B), apart from an increased contribution in the Soret region for IL cells (note in particular the 493 nm band, marked with an arrow). The same increased contribution is observed for the excitation spectra of the 711 nm emission (not shown).

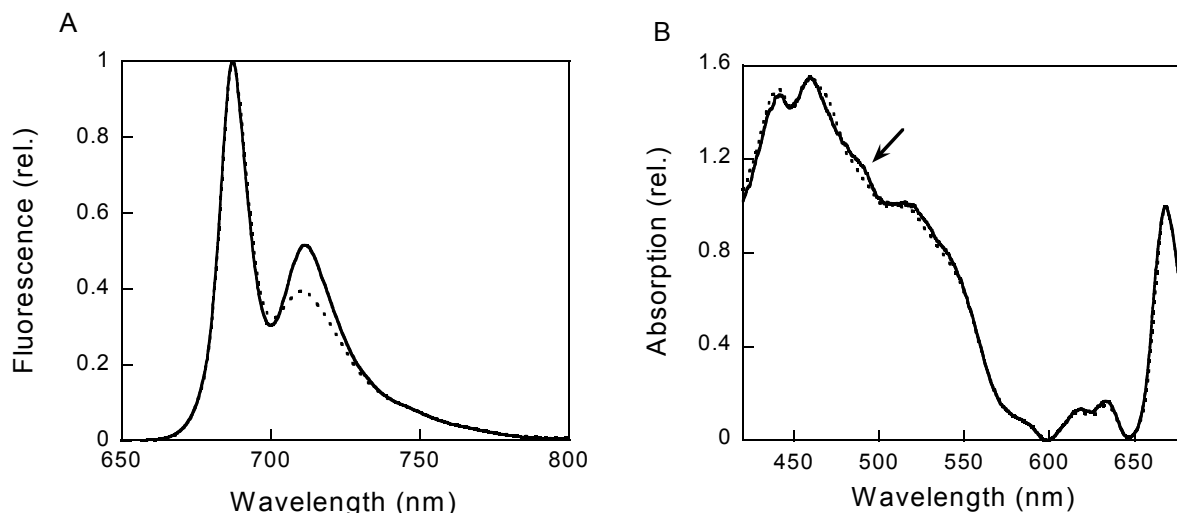
**Table 2.** Pigment composition (in mol per 100 mol Chl *a*) of CL and IL cells and of their respective major light-harvesting complex (LHC).

Pigments	CL cells	IL cells	CL LHC	IL LHC	IL LHC
	dark-adapted	dark-adapted	dark-adapted	dark-adapted	illuminated <sup>b</sup>
Chl <i>a</i> .cell <sup>-1</sup> (pg)	0.38 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.05	/	/	/
<b>DD</b>	<b>9.5 ± 1.5</b>	<b>21.6 ± 1.8</b>	<b>9.6 ± 2.3</b>	<b>27.0 ± 3.5</b>	<b>9.3</b>
<b>DT</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>19.1</b>
Fucoxanthin (F)	68.4 ± 3.0	65.5 ± 3.5	110.0 ± 5.9	95.2 ± 3.6	93.2
<b>F+DD+DT</b>	<b>77.9 ± 4.5</b>	<b>87.1 ± 5.3</b>	<b>119.6 ± 6.0</b>	<b>123.0 ± 6.5</b>	<b>121.6</b>
Chl <i>c</i>	15.9 ± 0.3	13.4 ± 0.4	24.8 ± 1.0	19.7 ± 1.2	18.2
β-carotene	8.0 ± 1.1	8.4 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.7	2.1

(<sup>a</sup>) Data (± SD) are the average of three to four measurements. (<sup>b</sup>) 5300 μmol photons.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, 20 min



**Figure 4.** 77 K absorption spectra of CL (dotted line) and IL (continuous line) cells. The absorption peak of diadinoxanthin at 493 nm is indicated.



**Figure 5.** 77 K fluorescence emission spectra of CL (dotted line) and IL (continuous line) cells. Inset: 77 K excitation spectra of the fluorescence emission at 687 nm. The arrow indicates the absorption peak of diadinoxanthin.

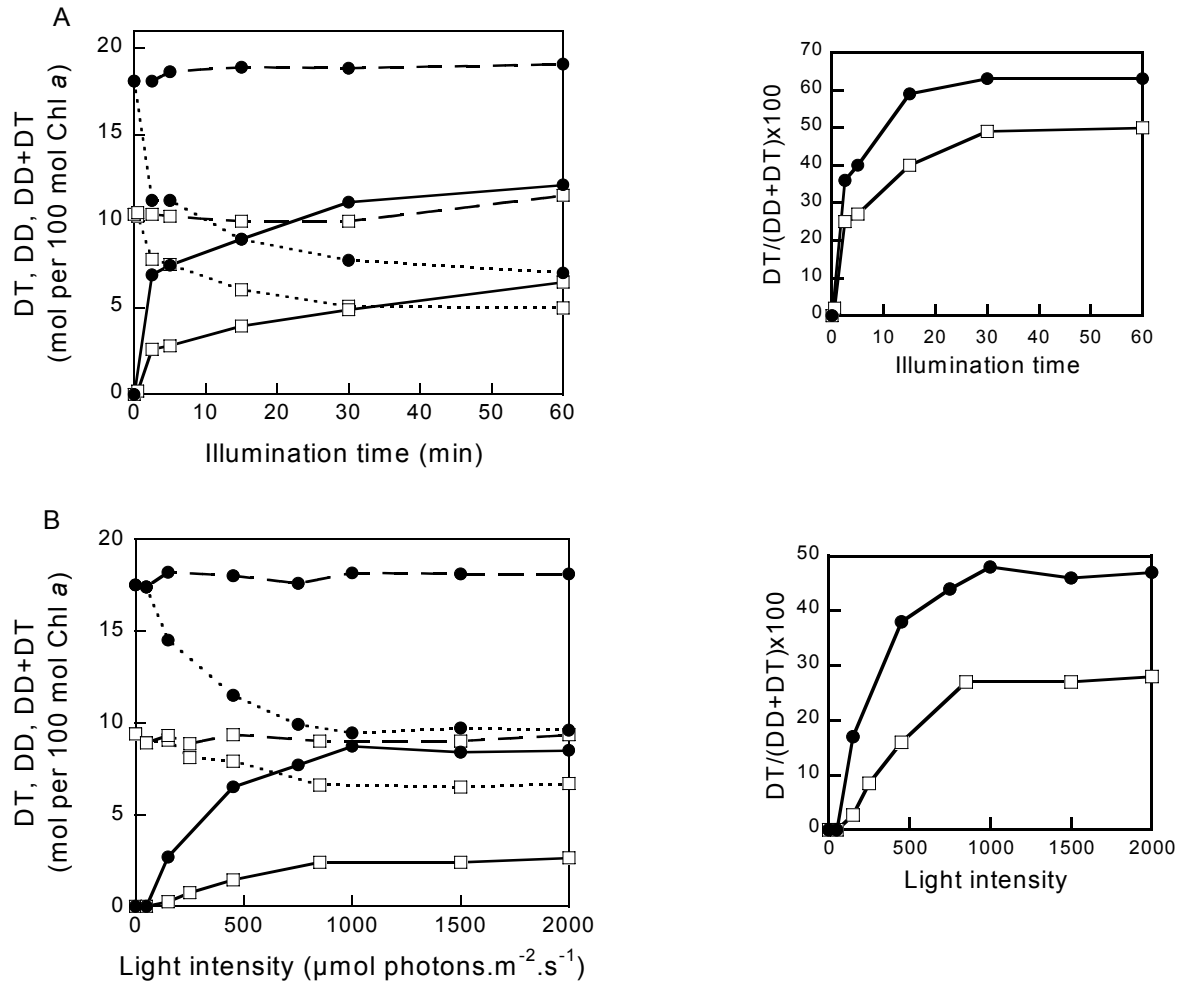
#### *High light de-epoxidation rates.*

Both cultures were grown at a light intensity low enough not to induce any DD de-epoxidation (Table 2). Shifting the cells to higher light resulted in a rapid de-epoxidation of DD into DT, such as is shown in Fig. 6A with a light intensity of  $2000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (full sunlight, Long et al. 1994). The accumulation of DT was clearly biphasic corresponding to the de-epoxidation of DD. In both cultures, the amount of DD available for de-epoxidation was limited and a minimum level of DD was reached after 1 h illumination. In both cases, for the first rapid de-epoxidation phase, the decrease of DD could be fitted with an exponential decay according to equation 1:

$$DD_t = (DD_{\text{initial}} - DD_{\text{min}}) \times e^{-kt} \quad \text{Eq. 1}$$

where  $DD_{\text{initial}}$  is the initial amount,  $DD_{\text{min}}$ , the remaining amount after 1 h illumination (asymptotic level) and  $k$  the rate constant of de-epoxidation. Under these conditions,  $k$  increased from 2.8 to 4 and the convertible DD from 50 % to 63 % (Fig. 6A, inset) when the initial amount of DD was doubled.

Since the rapid phase of de-epoxidation was achieved within a few minutes (Fig. 6A), we studied the influence of light intensity on the extent of de-epoxidation for a fixed illumination time of 5 min (Fig. 6B). The extent of de-epoxidation was again larger in IL cells. Above an intensity of  $1000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , the amount of DT formed by 5 min illumination was light saturated for both types of cells.



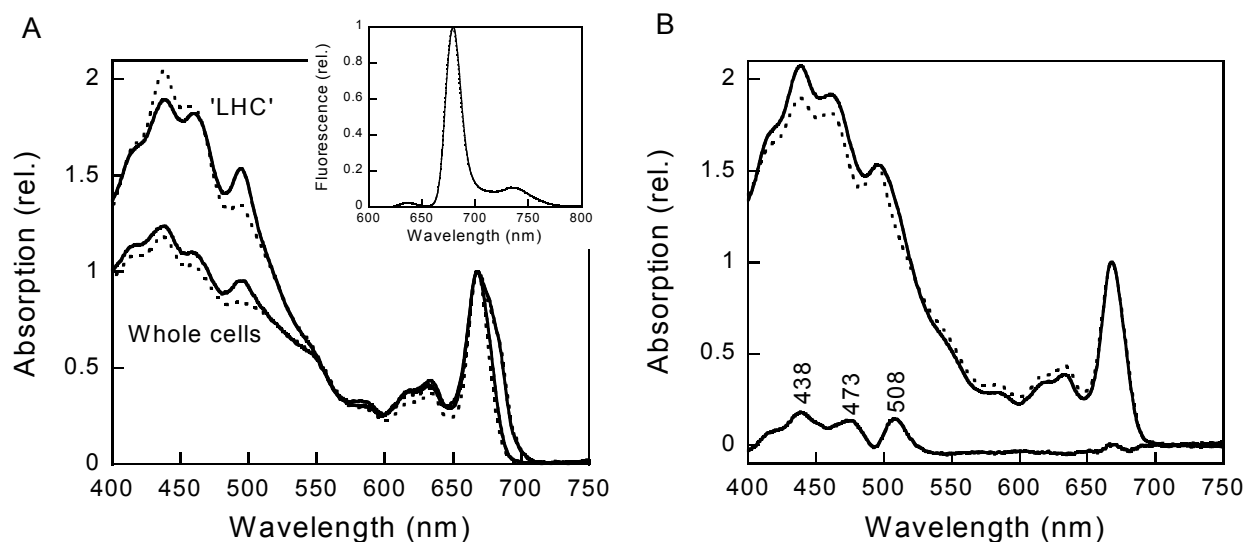
**Figure 6.** DD (dotted line), DT (continuous line) and DD+DT (dashed line) (A) as a function of illumination time at  $2000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  and (B) as a function of light intensity for a 5 min illumination in CL (squares) and IL (circles) cells. Insets:  $\text{DT}/(\text{DD}+\text{DT}) \times 100$ .

#### *Light-harvesting complexes.*

After disruption of the chloroplasts in presence of mild detergent, the homogenate was loaded onto a sucrose gradient and centrifuged. Since only a small portion of pigments (10 to 15 % of the total Chl *a* loaded) was released during solubilization, the pigment composition of the major light-harvesting band obtained can be considered representative of the native state of the complexes. The light-harvesting band represented  $49 \pm 5 \%$  and  $52 \pm 4 \%$  of the total Chl *a* loaded on the gradient in CL and IL cells, respectively. Compared to whole cells, this light-harvesting fraction was enriched in fucoxanthin, Chl *c* and DD while its content in  $\beta$ -carotene (specific to PS I and II fractions) decreased (Table 2). The enrichment in fucoxanthin, Chl *c* and DD was also visible in the absorption spectra of the light-harvesting fractions when compared to those of the whole cells (Fig. 7A). It is noticeable that although the light-harvesting fraction of IL cells was less enriched in fucoxanthin than that of CL cells,

when the fucoxanthin and DD concentrations were added, the sum was constant (CL and IL major light-harvesting complexes, Table 2). The fluorescence emission spectra of the major light-harvesting complex of CL and IL cells were identical, peaking at 680 nm with a satellite at 735 nm (Fig. 7A, inset). Excitation spectra presented the same differences as those of the whole cells (not shown). In these isolated light-harvesting complexes, fucoxanthin and Chl *c* were still connected. The contribution of fucoxanthin was shown as a shoulder at 550 nm in the absorption spectra (Fig. 7A), which is indicative of protein-bound fucoxanthin (Kirk 1977) and it participated in the fluorescence excitation spectra (not shown). Chl *c* is also functional. It still transferred its energy to Chl *a* in the isolated major light-harvesting complex. Indeed, the peak at 635 nm of the fluorescence emission spectra, which is attributed to Chl *c*, remained very low (Fig. 7A, inset).

When IL cells were strongly illuminated shortly before purification, a 67 % conversion of DD into DT was observed in the light-harvesting complex (Table 2). This conversion was illustrated by the appearance of three peaks in the difference spectrum (Fig. 7B, bottom) at 440, 470 and 508 nm. These bands are very similar to those observed in the zeaxanthin-minus-violaxanthin difference spectrum in higher plants (Yamamoto et al. 1972). The 508 nm peak was also attributed to DT (Olaizola and Yamamoto 1994).



**Figure 7.** 77 K absorption spectra of (A) dark-adapted whole CL (dotted line) and IL (continuous line) cells and of their respective isolated major light-harvesting complex ('LHC'). Inset: 77 K fluorescence emission spectra of CL and IL 'LHC'. (B). 77 K absorption spectra of 'LHC' of dark-adapted (dotted line) and illuminated (continuous line) IL cells. The appearance of the three bands due to the conversion of diadinoxanthin in diatoxanthin during light exposure is indicated on the difference spectrum between the spectrum of illuminated and dark-adapted cells in the bottom part of figure 7B.

## Discussion

*The intermittent light regime only modifies the xanthophyll cycle.*

Diatoms prosper under a wide variety of light intensities (Richardson et al. 1983; Harris 1986). They are able to adapt to very low light (a few  $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , Falkowski and Owens 1980) and to maintain a high metabolic rate under such light conditions (Geider et al. 1985). They can also survive in complete darkness for several weeks without assimilation of organic compounds (Griffiths 1973 and citations within). They have been shown to grow better under alternate periods of 2 h light / 2 h darkness than under alternate longer periods (12 h) or continuous light (Caron et al. 1988). Mortain-Bertrand et al. (1987) reported that for diatoms, dark periods are necessary for a better balance between light energy absorption and utilization, and they proposed a specific pathway for carbon fixation in diatoms. Recently, we showed (Lavaud et al. 2002a) that planktonic diatoms can store a reduced compound during light exposure for further use in darkness via chlororespiration, an important pathway in these organisms allowing continued ATP synthesis in the dark (Caron et al. 1987, Jakob et al. 1999). In comparison, green algae are not well adapted to highly fluctuating light or prolonged darkness (Griffiths 1973 and citations within; Litchman 2000; Lavaud et al. 2002c). It is perhaps not surprising therefore that an intermittent light regime does not have the same consequences in diatoms as in green plants. In the latter, an intermittent light regime leads to a number of modifications of the photosynthetic apparatus and in particular a drastic reduction of the PS II antenna size (Jahns and Junge 1992) while in *P. tricornutum*, it remains constant. The other important difference is that the pool of photoprotective xanthophyll per PS II remains constant in green plants (Gilmore 1997). In *P. tricornutum*, the size of the DD pool increased under the intermittent light regime. The increased DD content corresponds to a larger percentage of the pool accessible to de-epoxidation (50 % in CL cells, 65 % in IL cells). The additional amount of DT which can be formed under high-light in IL cells was shown to correlate with an increased dissipation of excess excitation energy within the light-harvesting complex and hence with photoprotection of PS II (Lavaud et al. 2002a). The higher values reached for DT/DT+DD in IL cells could be due to an increased concentration of accessible DD and/or to a larger concentration of the de-epoxidase. Recent results tend to suggest that the de-epoxidase amount was not enhanced in IL cells. The same dithiothreitol concentration (an inhibitor of the de-epoxidase) is needed to fully inhibit de-epoxidation in both types of cells (Lavaud et al. 2002b). Another partner of the de-epoxidase, the ascorbate cofactor was also shown to play an important concentration-dependent role in the activity of the enzyme (Bratt et al. 1995). An increased ascorbate concentration could also explain the

higher de-epoxidation rates. In higher plants, an increase in violaxanthin (the analog of DD) concentration was shown to be associated with a parallel increase in chloroplast ascorbate concentration (Eskling and Akerlund 1998).

The specific features of *P. tricornutum* under intermittent light, (unaltered antenna size, larger DD pool and higher de-epoxidation rates) represents a unique opportunity to investigate the binding of DD to diatom light-harvesting complexes.

*Additional DD binds to the major light-harvesting complex.*

Since the antenna size was conserved while DD concentration increased, one important point was to demonstrate that the additional DD molecules were bound to the major light-harvesting complex since they participate to dissipation of excess energy (Lavaud et al. 2002a). Additional DD is indeed bound to the light-harvesting fraction of IL cells, correlated with a parallel decrease in fucoxanthin content of this fraction. The sum of both xanthophylls (fucoxanthin + DD) is similar for both CL and IL light-harvesting complexes. Based on this observation, we propose that the additional DD molecules in IL cells occupy some of the binding sites normally occupied by fucoxanthin. DD is the immediate precursor for fucoxanthin and as such, their structures are closely related (Lohr and Wilhelm 1999; Lohr and Wilhelm 2001). The possibility that a given site of a light-harvesting protein could bind different xanthophylls was demonstrated for higher plants both *in vitro* (Bassi and Caffarri 2000) and *in vivo* (Pascal et al. 1999). Despite the different absorption spectra of DD and fucoxanthin, they both participate in light-harvesting in the blue-green region of the visible spectrum and they both transfer the absorbed energy to Chl *a* (as illustrated by excitation spectrum of Chl fluorescence emission for IL cells). Thus, the replacement of some fucoxanthin molecules by DD molecules would have no significant effect on the PS II absorption cross-section.

Under high light exposure, the respective role of fucoxanthin and DD become totally different. While fucoxanthin absorbs light, part of the DD pool is converted into DT, a de-epoxidized form involved in the photoprotective dissipation of excess energy (NPQ). The fact that DT is bound to isolated light-harvesting complexes gives an indication on the localization of DD. Indeed, to be de-epoxidized, xanthophylls have to be accessible to the de-epoxidase which is bound to the lipid matrix (Eskling et al. 1997) so it may be located at the periphery of the pigment-protein complexes (Gilmore 1997; Ruban et al. 2002). When comparing the amount of non-xanthophyll cycle pigments (expressed in mol per mol Chl *a*) in the light-harvesting complex of diatoms and green plants, it is obvious that there are more molecules of

fucoxanthin per light-harvesting complex in diatoms than molecules of lutein+neoxanthin in higher plants (Wilhelm 1990). Therefore, fucoxanthin could be partly localized at the periphery of the complex. Under intermittent light, these molecules are likely to be the ones that are replaced by DD then easily accessible to the de-epoxidase. The replacement of some fucoxanthin molecules by DD could result from an inhibition of the last step in the xanthophyll biosynthetic pathway in which DD is the immediate precursor of fucoxanthin (Lohr and Wilhelm 2001).

The exact reason for which diatoms can accumulate large concentrations of DD and DT when grown under an intermittent light regime remains to be elucidated and will require studies on the light regulation of xanthophyll biosynthesis. One possibility is that DD synthesis is inversely related to growth-rate as already observed (Wilhelm et al. 1991 and Arsalane et al. 1994). Several studies also mention an increase in DD in planktonic species (*Phaeodactylum*, *Chaetoceros*, *Thalassiosira*, *Nitzschia*) as a response to environmental stresses such as high light (Willemoës and Monas 1991, Casper-Lindley and Bjorkman 1998, Mouget et al. 1999, Anning et al. 2000), UV-radiation (Zudaire and Roy 2001) and nutrient-starvation (Geider et al. 1993). Long period of darkness could also be a stress. A modulation of the DD pool size was also reported in their natural habitat (Olaizola et al. 1992; Brunet et al. 1993). By a fine-tuning of their xanthophyll-content and antenna size regulation, diatoms can avoid the serious damages that may result from light stresses coupled to other unfavorable environmental conditions. Intermittent light-grown diatoms provide a unique model for further studies on the precise localization of xanthophylls and on photoprotective mechanisms.

### **Acknowledgements**

We thank J-C. Thomas for his assistance with spectroscopic measurements and Drs A. Pascal, J. Houmard and P. Lopez for critical reading and improvement of the manuscript. JL thanks the French Ministry of Education, Research and Technology for its financial support. The paper is dedicated to J-C. Duval, who initiated this work, for his sixtieth anniversary.

### **Materials and Methods**

#### *Cultures.*

*Phaeodactylum tricornutum* Böhlin (algal culture collection of Laboratoire Arago, Banyuls, France) cells were grown photoautotrophically in sterile natural seawater F/2 medium (Guillard and Ryther 1962). Cultures of 300 mL were incubated at 18 °C in airlifts continuously flushed with sterile air. They were illuminated at a light intensity of 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with white fluorescent tubes (Claude, Blanc Industrie, France) with a 16 h light/8 h dark cycle for



continuous light (CL) cells, or with 5 min light/55 min dark cycle for intermittent light (IL) cells. For the fluorescence and spectrophotometric experiments, cells were harvested during the exponential growth phase, centrifuged at 3000 g for 10 min and resuspended in their culture medium to a final concentration of 10  $\mu\text{g Chl } a \cdot \text{mL}^{-1}$ . The concentrated suspension was then stirred continuously at 18 °C under low continuous light for CL cells and under intermittent light for IL cells before use.

#### *Growth rates.*

Cell density was determined daily by optical density measurement at 674 nm (Chl *a* absorption maximum) with a DW-2 Aminco spectrophotometer. The relationship between Chl *a* concentration and absorption at 674 nm was verified by Chl *a* extraction in 90 % acetone.

#### *Cell preparation for electron microscopy.*

*Phaeodactylum tricornutum* CL and IL cells were fixed at 4 °C for 60 min in 2 % glutaraldehyde, 0.4 M sucrose, 0.2 M sodium phosphate buffer pH 7.4 and post-fixed in 1 % OsO<sub>4</sub> for 120 min. The fixed cells were embedded in Spurr resin after dehydration for obtaining cell sections.

#### *Pigment content.*

Pigment analyses were performed by HPLC as described previously (Arsalane et al. 1994). Cell counts were performed with a Thoma hematocytometer, using the public domain NIH Image program (US National Institute of Health). Cells were frozen in liquid nitrogen. Pigments were extracted with a methanol:acetone solution (70:30, v/v) (for the studies on the xanthophyll cycle, cells were collected from the PAM-fluorometer, see below). For isolated light-harvesting complexes, pigments were extracted with a methanol:acetone (50:50, v/v) solution plus ether (1 v) and water (2 v). Published extinction coefficients for chlorophylls (Chl) (Berkaloff et al. 1990) and for diadinoxanthin (DD) and diatoxanthin (DT) (Johansen et al. 1974) were used.

#### *Spectroscopy.*

77 K absorption spectra were performed with a DW-2 Aminco spectrophotometer with a home-made Dewar holder. 77 K fluorescence emission and excitation spectra were measured with a F-4500 Hitachi spectrophotometer. Half-band width for emission and excitation was 2.5 nm. Samples were dark-adapted and then concentrated on a Millipore AP-20 prefilter that was immediately frozen in liquid nitrogen before measurement.

#### *Photosystem I reaction center ( $P_{700}$ ) concentration.*

$P_{700}$  was determined as described in (Newman and Sherman 1978). Cells were first adjusted to the same Chl *a* concentration then broken by sonication and kept on ice. The light-induced absorption decrease at 700 nm was measured with a DW-2 Aminco spectrophotometer (American Instrument Co., USA) in dual beam mode (reference at 730 nm) in the presence of 6 mM sodium ascorbate and 300 to 600  $\mu\text{M}$  methylviologen; 30  $\mu\text{M}$  DCMU (3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) was added to prevent  $P_{700}^+$  reduction due to linear electron flow. Stock solutions of sodium ascorbate (Sigma, 0.2 M in distilled water), methylviologen (Sigma, 10 mM in distilled water) and DCMU (Sigma, 10 mM in absolute ethanol) were freshly prepared just prior to the measurement.

#### *PS II antenna size.*

PS II Chl fluorescence induction kinetics of dark-adapted cells were measured at room temperature in a laboratory-built continuous fluorometer. The set-up and data acquisition have

been described previously (Ritz et al. 1999). Samples were adjusted to a final concentration of  $4 \mu\text{g Chl } a \cdot \text{mL}^{-1}$  and dark-adapted for 20 min prior to the experiment.  $20 \mu\text{M}$  DCMU was added 5 min before the end of the dark period.

#### *O<sub>2</sub> concentration and P-E curves.*

O<sub>2</sub> concentration was measured with a DW1-Clark electrode (Hansatech Ltd., England) at 18 °C. Light of adjustable intensity (measured with a PAR-sensor, Licor inc., USA) was provided by a KL-1500 quartz iodine lamp (Schott, Mainz, Germany). Cells were dark-adapted for 20 min before measurement. Photosynthetic light-response curves were obtained by illuminating a 2 mL sample for 5 min at various intensities. A fresh sample was used for each intensity.

#### *Chl fluorescence yield.*

Chl fluorescence yield was monitored with a modified PAM-101 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) as described previously (Lavaud et al. 2002a). The Clark electrode used to monitor oxygen concentration was adapted to the PAM-light guides in order to allow simultaneous measurement of Chl fluorescence. For each experiment, 2 mL of cell suspension was used. Sodium bicarbonate was added at a concentration of 4 mM from a freshly prepared 0.2 M stock solution in distilled water to prevent any limitation of the photosynthetic rate by carbon supply.  $F_0$  and  $F_m$  are defined as the fluorescence yield of dark-adapted cells and the maximum fluorescence reached in such cells during a saturating multi-turnover 600 ms pulse of white light, respectively. The quantum yield of excitation trapping by PS II is the ratio  $F_v/F_m$  where  $F_v$  is the variable part of the fluorescence emission and is equal to  $F_m - F_0$ .

#### *O<sub>2</sub> yield per flash.*

The relative O<sub>2</sub> yield produced per flash during a sequence of single-turnover saturating flashes at a frequency of 2 Hz was measured at 18 °C with a rate electrode described by (Lemasson and Etienne 1975). Short (5  $\mu\text{s}$ ) saturating flashes were produced by a Strobotac (General Radio Co., Concord, MA). Cells were first dark-adapted for 20 min, deposited on the electrode and allowed to settle for 7 min in the dark before measurement. The steady-state O<sub>2</sub> yield per flash ( $Y_{SS}$ ) was taken to be the average yield of the last four of a sequence of twenty flashes when the classical four-step oscillations due to the S-states cycle (Kok et al. 1970) has been damped.  $Y_{SS}$  was used to assess the relative concentration of O<sub>2</sub>-evolving PS II reaction centers. For the saturation curves of  $Y_{SS}$ , the intensity of the flashes was varied with neutral density filters. For each flash intensity a new sample was used.

#### *Isolation of the major light-harvesting complex.*

The major light-harvesting complex was isolated according to the protocol of Passaquet et al. 1991. Chloroplasts were extracted and suspended in a 50 mM Hepes-KOH buffer (pH 7.6) with 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 6 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, 5 mM amino caproic acid, 0.6 M sorbitol and protease inhibitors (1 mM phenylmethanesulfonylfluoride and 1 mM benzamidine). They were disrupted in a French pressure cell, then resuspended in the same buffer, without sorbitol, in the presence of digitonin at a detergent/Chl *a* ratio of 80:1 and incubated for 1 h at 4 °C. The homogenate was loaded on top of a sucrose gradient (10-55 %) and centrifuged at  $140\,000 \times g$  for 15 h at 4 °C. The three bands obtained corresponded, from the bottom to the top of the gradient, to PS I and PS II enriched fractions, and the higher band corresponding to the major light-harvesting was found in the 10-15 % sucrose layers.

## References

- Anning, T., MacIntyre, H. L., Pratt, S. M., Sammes, P. J., Gibb, S. & Geider, R. J. 2000. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.* 45:1807-17.
- Arsalane, W., Rousseau, B. & Duval, J.-C. 1994. Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: Competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* 60:237-43.
- Bassi, R. & Caffarri, S. 2000. LHC proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting function by xanthophylls. *Photosynth. Res.* 64:243-56.
- Berkaloff, C., Caron, L. & Rousseau, B. 1990. Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigments analysis. *Photosynth. res.* 23:181-93.
- Bhaya, D. & Grossman, A. R. 1993. Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Res.* 21:4458-66.
- Borowitzka, M. A. & Volcani, B. E. 1978. The polymorphic diatom *Phaeodactylum tricorutum*: ultrastructure of its morphotypes. *J. Phycol.* 14:10-24.
- Bratt, C. E., Arvidsson, P.-O., Carlsson, M. & Akerlund, H.-E. 1995. Regulation of violaxanthin de-epoxidase activity by pH and ascorbate concentration. *Photosynth. Res.* 45:169-75.
- Brunet, C., Brylinski, J. M. & Lemoine, Y. 1993. *In situ* variations of the xanthophylls diatoxanthin and diadinoxanthin: photoadaptation and relationships with a hydrodynamical system in the eastern English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 102:69-77.
- Caron, L., Berkaloff, C., Duval, J.-C. & Jupin, H. 1987. Chlorophyll fluorescence transients from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* : relative rates of cyclic phosphorylation and chlororespiration. *Photosynth. Res.* 11:131-139.
- Casper-Lindley, C. & Bjorkman, O. 1998. Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth. Res.* 56:277-89.
- De Martino, A., Douady, D., Quinet-Szely, M., Rousseau, B., Crépineau, F., Apt, K. E. & Caron, L. 2000a. The light-harvesting antenna of brown algae: almost identical proteins encoded by a multigene family. *Eur. J. Biochem.* 267:5540-5549.
- Eskling, M. & Akerlund, H.-E. 1998. Changes in the quantities of violaxanthin de-epoxidase, xanthophylls and ascorbate in spinach upon shift from low to high light. *Photosynth. Res.* 57:41-50.
- Eskling, M., Arvidsson, P. O. & Akerlund, H. E. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plantarum* 100:806-16.
- Falkowski, P. G. & Owens, T. G. 1980. Light-shade adaptation. *Plant Physiol.* 66:592-595.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281:237-40.
- Fogg, G. E. 1991. The phytoplanktonic ways of life. *New Phytol.* 118:191-32.
- Friedman, A. L. & Alberte, R. S. 1984. A diatom light-harvesting pigment-protein complex. Purification and characterization. *Plant Physiol.* 76:483-489.
- Geider, R. J., La Roche, J., Greene, R. M. & Olaizola, M. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.* 29:755-66.
- Geider, R. J., Osborne, B. A. & Raven, J. A. 1985. Light dependence of growth and photosynthesis in *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 21:609-619.
- Gilmore, A. M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plantarum* 99:197-209.
- Griffiths, D. J. 1973. Factors affecting the photosynthetic capacity of laboratory cultures of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Biol.* 21:91-97.
- Guillard, R. R. R. & Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.* 8:229-38.
- Gutenbrunner, S. A., Thalhamer, J. & Schmid, A.-M. M. 1994. Proteinaceous and immunochemical distinctions between the oval and fusiform morphotypes of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30:129-136.
- Harris, G. P. 1986. *Phytoplankton Ecology: Structure, Function, and Fluctuation*. Chapman & Hall, London, UK, pp.
- Horton, P., Ruban, A. V. & Walters, R. G. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:655-84.
- Jahns, P. & Junge, W. 1992. Thylakoids from pea seedlings grown under intermittent light: biochemical and flash-spectrophotometric properties. *Biochemistry* 31:7390-7.
- Jakob, T., Goss, R. & Wilhelm, C. 1999. Activation of diadinoxanthin de-epoxidase due to a chlororespiratory proton gradient in the dark in

- the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Biol.* 1:76-82.
- Johansen, J. E., Wa, S., Liaaen-Jensen, S. & Haxo, F. T. 1974. Carotenoids of the Dinophyceae. *Phytochem.* 13:2261-71.
- Kirk, J. 1977. Thermal dissociation of fucoxanthin protein binding in pigment complexes from chloroplasts of *Hormosira* (Phaeophyta). *Plant Science Lett.* 9:373-380.
- Kok, B., Forbush, B. & Mc Gloin, M. 1970. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11:457-75.
- Lavaud, J., Rousseau, B., van Gorkom, H. J. & Etienne, A.-L. 2002a. Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 129:1398-1406.
- Lavaud, J., Rousseau, B. & Etienne, A.-L. 2002b. In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching. *FEBS Lett.* 523:163-66.
- Lavaud, J., Rousseau, B., van Gorkom, H. J. & Etienne, A.-L. 2002c. Photosystem II transfer cycle and chlororespiration in planktonic diatoms. *Photosynth. Res.*, 74:49-57.
- Lemasson, C. & Etienne, A.-L. 1975. Photo-inactivation of system II centers by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 408:135-42.
- Lewin, J. C., Lewin, R. A. & Philpott, D. E. 1958. Observations on *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Gen. Microbiol.* 18:418-426.
- Lewis, M. R., Horne, E. P. W., Cullen, J. J., Oakey, N. S. & Platt, T. 1984. Turbulent motions may control phytoplankton photosynthesis in the upper ocean. *Nature* 311:49-50.
- Litchman, E. 2000. Growth rates of phytoplankton under fluctuating light. *Freshwater Biol.* 44:223-235.
- Lohr, M. & Wilhelm, C. 1999. Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Natl. Acad. USA* 96:8784-8789.
- Lohr, M. & Wilhelm, C. 2001. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 212:382-91.
- Long, S., Humphries, S. & Falkowski, P. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:633-62.
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M. & Geider, R. J. 2000. The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci.* 5:12-17.
- Mortain-Bertrand, A., Descolas-Gros, C. & Jupin, H. 1987. Short term <sup>14</sup>C incorporation in *Skeletonema costatum* as a function of light regime. *Phycologia* 26:262-269.
- Mouget, J.-L., Tremblin, G., Morant-Manceau, A., Morançais, M. & Robert, J.-M. 1999. Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *Eur. J. Phycol.* 34:109-115.
- Müller, P., Li, X.-P. & Niyogi, K. K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125:1558-66.
- Neale, P. J. 1987. Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. In Kyle, D. J., Osmond, C. B. & Arntzen, C. J. [Ed.] *Photoinhibition*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 39-62.
- Newman, P. J. & Sherman, L. A. 1978. Isolation and characterization of photosystem I and II membrane particles from the blue-green alga, *Synechococcus cedrorum*. *Biochim. Biophys. Acta* 503:343-361.
- Niyogi, K. K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:455-60.
- Olaizola, M., Bienfang, P. K. & Ziemann, D. A. 1992. Pigment analysis of phytoplankton during a Subarctic spring bloom: xanthophyll cycling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 158:59-74.
- Olaizola, M., Laroche, J., Kolber, Z. & Falkowski, P. G. 1994. Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.* 41:357-70.
- Olaizola, M. & Yamamoto, H. Y. 1994. Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30:606-12.
- Owens, T. G. 1986. Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol.* 80:739-746.
- Owens, T. G. & Wold, E. R. 1986. Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. I. Isolation and characterization of pigment-protein complexes. *Plant Physiol.* 80:732-38.
- Pascal, A. A., Gradinaru, C., Wacker, U., Peterman, E., Calkoen, F., Irrgang, K.-D., Horton, P., Renger, G., van Grondelle, R., Robert, B. & van Amerongen, H. 1999. Spectroscopic characterization of the spinach Lhcb4 protein (CP29), a minor light-harvesting complex of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 262:817-823.
- Passaquet, C., Thomas, J. C., Caron, L., Hauswirth, N., Puel, F. & Berkaloff, C. 1991. Light-harvesting complexes of brown algae :

- biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS Lett.* 21-26.
- Pyszniak, A. M. & Gibbs, S. P. 1992. Immunocytochemical localisation of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophyll *a/c* light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protoplasma* 166:208-17.
- Richardson, K., Beardall, J. & Raven, J. A. 1983. Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.* 93:157-191.
- Ritz, M., Neverov, K. V. & Etienne, A.-L. 1999.  $\Delta$ pH-dependent fluorescence quenching and its photoprotective role in the unicellular red alga *Rhodella violacea*. *Photosynthetica* 37:267-80.
- Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B. & Horton, P. 2002. Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J. Biol. Chem.* 277:7785-7789.
- Wilhelm, C., Rudolph, I. & Renner, W. 1991. Changes in pigmentation of different phytoplankton species during growth and steady state culture conditions. *J. Applied Phycol.* 3:305-310.
- Willemoës, M. & Monas, E. 1991. Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiol. Plantarum* 83:449-56.
- Yamamoto, H. Y., Kamite, L. & Wang, Y.-Y. 1972. An ascorbate-induced absorbance change in chloroplasts from violaxanthin de-epoxidation. *Plant Physiol.* 49:224-228.
- Zudaire, L. & Roy, S. 2001. Photoprotection and long-term acclimation to UV in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 62:26-34.

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE III

## 1<sup>ère</sup> PARTIE

*2- Influence de la taille du pool de diadinoxanthine  
sur la photoprotection  
chez Phaeodactylum tricornutum*

---

## **INFLUENCE DE LA TAILLE DU POOL DE DIADINOXANTHINE SUR LA PHOTOPROTECTION CHEZ *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM*.**

Nous nous étions fixé plusieurs objectifs pour cette étude. En effet, les travaux de Arsalane *et al.* (1994), suggéraient un rôle primordial de la taille du pool de la DD dans le mécanisme de photoprotection chez les diatomées (voir Chapitre I-Introduction, § II- 3. 3. 1. ) et ils méritaient d'être poursuivis et approfondis.

Beaucoup d'incertitudes persistent sur l'efficacité de la dissipation de l'énergie en excès et des questions pertinentes méritent d'être soulevées :

- Quel est le rôle joué par le cycle des xanthophylles dans l'établissement sous forte lumière du NPQ ?
- Y a-t-il une stricte corrélation entre la quantité de DT présente et le NPQ ?
- Peut-on en tirer des renseignements sur la localisation de DT ?
- Les phénomènes observés diffèrent-ils de ce qui est connu chez les plantes supérieures?

L'existence des deux types de cultures décrites dans le chapitre précédent constitue une opportunité unique d'approfondir ces questions. Seul le contenu en DD varie d'une culture à l'autre; la taille des cellules, de leur chloroplaste, la stochiométrie des deux photosystèmes et le contenu en Chl étant très similaires. L'invariance de la taille de l'antenne du PS II est primordiale pour la validité de la comparaison. Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication publiée dans **Plant Physiology**, vol. 129, pp 1398-1406.

### **RESUME DES RESULTATS.**

***Le NPQ est plus important chez les cellules riches en diadinoxanthine (cellules IL).***

Dans la Figure 1 nous montrons des exemples de l'enregistrement au fluorimètre modulé (le fluorimètre-PAM) de la variation des niveaux de fluorescence pour les cellules CL (cycle 16h lumière/8h obscurité) et les cellules IL (5 min de lumière/h). Ce qu'il convient de remarquer, c'est la baisse très significative des niveaux de fluorescence ( $F_0$  et  $F_m$ ) chez les

cellules IL comparées à une baisse plus modérée des mêmes niveaux chez les cellules CL. Chez les cellules IL, cette baisse dépasse de loin tout ce qui est habituellement enregistré chez les plantes supérieures, alors que le comportement des cellules CL en est plus proche. Si à partir de ces données brutes on calcule le NPQ qui se développe sous forte illumination dans les deux types de cellules, on s'aperçoit (Figure 2) que les valeurs atteintes dépendent de l'intensité de l'illumination ( $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pour la Fig. 2A et  $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pour la Fig. 2B). Elles sont plus élevées chez les cellules IL que chez les CL et le niveau de fluorescence maximum est plus "quenché" que le niveau de fluorescence minimum (c'est vrai pour les deux types de cellules). La Figure 3 montre que pour une illumination de 5 min, le NPQ formé dépend de l'intensité utilisée. Cette figure confirme les résultats déjà montrés sur la Figure 2 en les généralisant à un domaine d'intensités allant de 50 à  $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Le choix de la durée de 5 min découle du fait que la cinétique de formation du NPQ est très biphasique, la majeure partie étant formée en quelques minutes pendant la phase rapide. Il est donc correct d'étudier la dépendance en fonction de l'intensité en fixant une durée de l'illumination de 5 min. La Figure 3 montre que la courbe d'augmentation du NPQ en fonction de l'intensité atteint une valeur quasi-stationnaire à partir de  $1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; cette valeur correspond à la moitié d'un ensoleillement maximum dans le milieu naturel.

***Le développement du NPQ est corrélé à l'accumulation de la diatinoxanthine.***

Après détermination de la quantité de DT formée dans les diverses conditions utilisées dans les figures précédentes, une corrélation entre les valeurs de NPQ et les valeurs de DT est montrée dans la Figure 4, à la fois pour les niveaux maxima et minima de fluorescence. Plusieurs choses méritent d'être soulignées :

- la corrélation est linéaire et démarre de l'origine,
- les pentes pour  $\text{SV}_m$  sont supérieures aux pentes pour  $\text{SV}_o$ ,
- alors que la pente pour  $\text{SV}_m$  est la même chez les cellules CL et IL, elle est plus grande pour  $\text{SV}_o$  chez les cellules IL que chez les cellules CL.

La formulation de Stern-Volmer n'est strictement applicable que lorsque la molécule "quencher" et la molécule fluorescente sont en solution. Néanmoins, cela fait plusieurs décennies qu'elle est utilisée pour la fluorescence des antennes chlorophylliennes du PS II. A ce niveau, son application donne de bonnes corrélations à la fois pour le quenching photochimique exercé par le centre réactionnel ouvert qui piège l'excitation que dans le cas de "quenchers" exogènes (comme le dinitrobenzène) ou du NPQ que la majorité des auteurs



attribue à la formation d'une entité dissipatrice de l'énergie au sein même de l'antenne. Nous sommes conscients des limites de ce traitement global et des dangers de surinterprétation des corrélations obtenues. Ainsi, même si la corrélation entre NPQ et la concentration de DT semble excellente, cela ne signifie pas pour autant que DT soit effectivement le "quencher". C'est la présence de DT au sein du LHCF qui en modifie les propriétés de fluorescence mais le mécanisme moléculaire de ce phénomène reste à préciser.

### ***Le NPQ engendre une dissipation de l'énergie lumineuse.***

En déterminant la courbe de saturation de rendement d'O<sub>2</sub> par flash pour les deux types de cellules avec des valeurs différentes de NPQ persistant après une forte illumination, nous avons montré que le NPQ provoque bien une diminution de la proportion de l'énergie absorbée qui est transmise au centres réactionnels PS II (Figure 5). En d'autres termes le NPQ engendre effectivement une dissipation de l'énergie donc une diminution de l'efficacité quantique du PS II. De plus en utilisant les équations de Stern-Volmer, on peut montrer une équivalence entre la valeur de l'intensité nécessaire à la demi-saturation du rendement d'O<sub>2</sub> par flash et le rapport  $F_0'/F_0$  (insert de la Figure 5). On peut alors déterminer pour toutes les valeurs de NPQ la quantité d'énergie dissipée. On obtient ainsi des pourcentages tout à fait remarquables avec des valeurs très élevées pour les cellules IL chez qui 90 % de l'énergie absorbée peut être dissipée (c'est-à-dire non transmise aux centres réactionnels) (Figure 6). Si le NPQ n'existait pas, il faudrait que la taille de l'antenne soit réduite par un facteur 10 pour obtenir un résultat similaire. Même dans les plus beaux exemples de réduction de taille d'antenne par photoacclimatation, de tels résultats n'ont jamais été atteints car la plasticité de l'appareil photosynthétique ne le permet pas. Cela souligne l'importance de ce NPQ qui s'établit en quelques minutes au sein d'un complexe antenne dont seules les propriétés fluorescentes changent. La réversibilité du phénomène est remarquable car en quelques dizaines de minutes d'incubation à l'obscurité ou en faible lumière, le NPQ disparaît totalement, les capacités de transfert de l'antenne au centre réactionnel demeurant intactes.

### ***Le NPQ photoprotège les centres réactionnels PS II.***

La dernière partie de l'article concerne la preuve que les cellules à fort NPQ (IL) sont mieux photoprotégées que celles chez qui le NPQ est moindre (CL). Il faut pour ce faire mesurer la cinétique d'inactivation des centres réactionnels PS II au cours d'une illumination intense. On utilise pour cela le rendement stationnaire de la quantité d'O<sub>2</sub> émise

par flash au cours d'une séquence de flashes qui permet aux centres réactionnels PS II d'"avancer" d'une manière synchrone. La Figure 7 montre les cinétiques d'inactivation pour les deux types de cellules et pour deux intensités de lumière ( $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et  $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Il est clair que l'inactivation est beaucoup plus lente chez les cellules IL que chez les CL. De plus, l'inactivation chez les cellules IL est surestimée car le NPQ est tel que l'intensité des flashes utilisée n'est plus suffisante pour assurer la saturation (*cf* Figure 5). La correction est moindre pour les CL où le NPQ formé est plus faible.

Enfin, nous n'avons pas mentionné dans cet article le fait que l'inactivation des centres réactionnels est en fait rapidement réversible à l'obscurité et ne nécessite pas de néosynthèse de la protéine D1. Cette observation est illustrée plus tard (voir Chapitre III, § 4-). Ceci est très important car la photoprotection est donc suffisante pour éviter l'endommagement des centres réactionnels. La réversibilité rapide de l'inactivation des centres réactionnels permet aux diatomées d'utiliser de manière optimale des éclaircissements moins intenses très vite après la fin du stress lumineux.

## **Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum*.**

Lavaud J.<sup>1</sup>, Rousseau B.<sup>1</sup> van Gorkom H. J.<sup>2</sup> and Etienne A.-L.<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire 'Organismes Photosynthétiques et Environnement', UMR CNRS 8543, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm 75230 PARIS Cedex 05, France.

<sup>2</sup> Department of Biophysics, Huygens Laboratory, Leiden University, P. O. Box 9504, 2300 RA Leiden, The Netherlands.

### **Abstract**

The pool size of the xanthophyll cycle pigment diadinoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* depends on illumination conditions during culture. Intermittent light caused a doubling of the diadinoxanthin pool without significant change in other pigment contents and photosynthetic parameters, including the Photosystem II (PS II) antenna size. On exposure to high light intensity extensive de-epoxidation of diadinoxanthin to diatoxanthin rapidly caused a very strong quenching of the maximum chlorophyll fluorescence yield ( $F_m$ , PS II reaction centers closed), which was fully reversed in the dark. The non-photochemical quenching of the minimum fluorescence yield ( $F_o$ , PS II centers open) decreased the quantum efficiency of PS II proportionally. For both  $F_m$  and  $F_o$ , the non-photochemical quenching expressed as  $F/F' - 1$  (with  $F'$  the quenched level) was proportional to the diatoxanthin concentration. However, the quenching of  $F_o$  relative to that of  $F_m$  was much stronger than random quenching in a homogeneous antenna could explain, showing that the rate of photochemical excitation trapping was limited by energy transfer to the reaction center rather than by charge separation. The cells can increase not only the amount of diatoxanthin they can produce, but also its efficiency in competing with the PS II reaction center for excitation. The combined effect allowed intermittent light grown cells to down-regulate PS II by 90 % and virtually eliminated photoinhibition by saturating light. The unusually rapid and effective photoprotection by the xanthophyll cycle in diatoms may help to explain their dominance in turbulent waters.

## **Introduction**

Photosynthetic organisms have developed strategies to optimize light harvesting at low intensities while minimizing photoinhibitory damage due to excess energy at high light intensity. From hours onwards, they regulate the quantity and composition of the light-harvesting complexes and of a number of other components of their photosynthetic machinery (reviewed by Falkowski and Laroche, 1991; Anderson et al., 1995). On shorter time scales, they react to an unbalance between light intensity and photosynthetic capacity (e.g. due to a change in light intensity, temperature, or nutrient supply) by rapid structural modifications within the light-harvesting complex of photosystem II (PS II) (Horton et al., 1996; Bassi and Caffarri, 2000). These modifications lead to a decrease in the fluorescence yield designated as the “non-photochemical quenching” of chlorophyll (Chl) *a* fluorescence (NPQ). NPQ is supposed to dissipate excess excitation energy through a harmless non-radiative pathway. The partitioning of absorbed energy between transfer to the reaction center and photoprotective non-radiative dissipation is controlled by the trans-thylakoid pH gradient (for a recent review see Müller et al., 2001) and by the reversible conversion of epoxidized to de-epoxidized forms of xanthophylls (the so-called xanthophyll cycle, Gilmore, 1997). The molecular mechanisms of photoprotection have mostly been studied in higher plants (Demmig-Adams and Adams, 1996). Several mutants of *Arabidopsis* and *Chlamydomonas* with modified violaxanthin (the epoxidated xanthophyll cycle pigment form) content and NPQ extent have been investigated and a specific role has been attributed to the PsbS protein (Niyogi, 1999, Müller et al., 2001). However, the field remains controversial due to the obvious complexity of photoprotective mechanisms. In this sense, the use of diatoms to study the role of xanthophylls in photoprotection may have important advantages.

Diatoms are well known to flourish in turbulent waters (Harris, 1986), where the amount of light available to the phytoplanktonic unicellular organisms is highly unpredictable. The deep vertical mixing continuously sweeps them up and down, exposing the cells to very large short-term changes in light intensity on a time scale of minutes to hours. The organization of the photosynthetic apparatus in diatoms differs in many respects from that of higher plants. The thylakoids are loosely appressed and organized in extended bands of three, and the photosystems I and II are not segregated in different domains (Pyszniak and Gibbs, 1992). The light-harvesting complexes, which contain Chl *a*, Chl *c*, fucoxanthin and the xanthophyll cycle pigment diadinoxanthin (DD) (Brown, 1988), are equally distributed among appressed and non appressed regions (Pyszniak and Gibbs, 1992) and there is no evidence of any state-transitions (Owens, 1986). The light-harvesting complexes sub-units are

made of several highly homologous proteins encoded by a multigene family (Fucoxanthin Chlorophyll Proteins, FCPs, Bhaya and Grossman, 1993). The CP26 and CP29 subunits present in higher plants are not found in diatoms (Müller et al., 2001) and the existence of the PsbS protein has yet to be proven. The supramolecular organization of photosystem II within the membrane remains unknown. When the cells are suddenly exposed to high light intensity, a NPQ is rapidly developed (Demers et al., 1991; Ting and Owens, 1993; Arsalane et al., 1994; Olaizola et al., 1994; Olaizola and Yamamoto, 1994; Casper-Lindley and Bjorkman, 1998). NPQ is associated with a xanthophyll cycle (the DD-cycle) which differs from that of higher plants. The DD cycle converts the mono-epoxide carotenoid DD into the de-epoxide form diatoxanthin (DT) under high light, and DT back into DD under low light or in darkness (Arsalane et al., 1994; Casper-Lindley and Bjorkman, 1998).

In diatoms, the DD content can be modulated by the light regime to which culture is exposed (Willemoës and Monas, 1991; Arsalane et al., 1994; Casper-Lindley and Bjorkman, 1998; Mouget et al., 1999). We were able to define an intermittent light regime in which cells of the diatom *Phaeodactylum tricornerutum* had an increased DD content but unchanged PS II antenna size. By comparing cells with either a low or high DD content, we studied the influence of the DD pool size on the DD-cycle activity and NPQ formation under high light and investigated its functional role in protecting PS II from over-excitation. All results obtained demonstrate that a larger pool of DD leads to a more effective photoprotection.

## **Results**

### *Comparison of the photosynthetic apparatus of CL and IL cells.*

*Phaeodactylum tricornerutum* cells with different DD contents were obtained from cultures grown under different illumination regimes. ‘Continuous light’ (CL) cultures were grown using a 16 h light / 8 h dark cycle. ‘Intermittent light’ (IL) cultures were grown under a 5 min light / 55 min dark cycle. In both cases the light intensity was  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , which was weak enough not to induce any de-epoxidation of DD. The growth rate under IL illumination was reduced by a factor of 10, which is nearly accounted for by the 8-fold lower total amount of light supplied.

The DD content of IL cells was two times higher than that of CL cells (Table I). Otherwise no significant differences were found in their pigment contents. Cell size and chloroplast ultrastructure were similar for the two types of cells. It is important to note that the PS II antenna size was the same in the two types of cells, in their dark-adapted state, as indicated by their equal fluorescence yield rise-time upon illumination in the presence of

DCMU (Table I). This was confirmed by the fact that equal flash intensities were required for half-saturation of the steady-state O<sub>2</sub> yield per flash with dark-adapted IL and CL cells (open symbols in Fig. 5, see below).

**Table 1. Pigment composition and PS II properties of the CL and IL cells.**

Pigment contents<sup>a</sup> and PS II properties of *P. tricornutum* grown under CL and IL illumination are compared. Y<sub>SS</sub> is the steady-state O<sub>2</sub> yield per single-turnover flash, a measure of the concentration of active PS II reaction centers. F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> (F<sub>v</sub>=F<sub>m</sub>-F<sub>o</sub>) is the quantum yield of excitation trapping by PS II. The half rise-time of the fluorescence induction at a given light intensity in presence of DCMU is a measure of the PS II antenna size. I<sub>1/2</sub> of Y<sub>SS</sub> is the flash intensity required for half-saturation of Y<sub>SS</sub>, reciprocal measure of the PS II antenna size. I<sub>sat</sub> is the minimum intensity of continuous light that saturates the rate of O<sub>2</sub> emission. Data (± SD) are the average of 6 measurements for pigment contents and 3 measurements for other parameters. All data except I<sub>sat</sub> refer to samples without DT and NPQ.

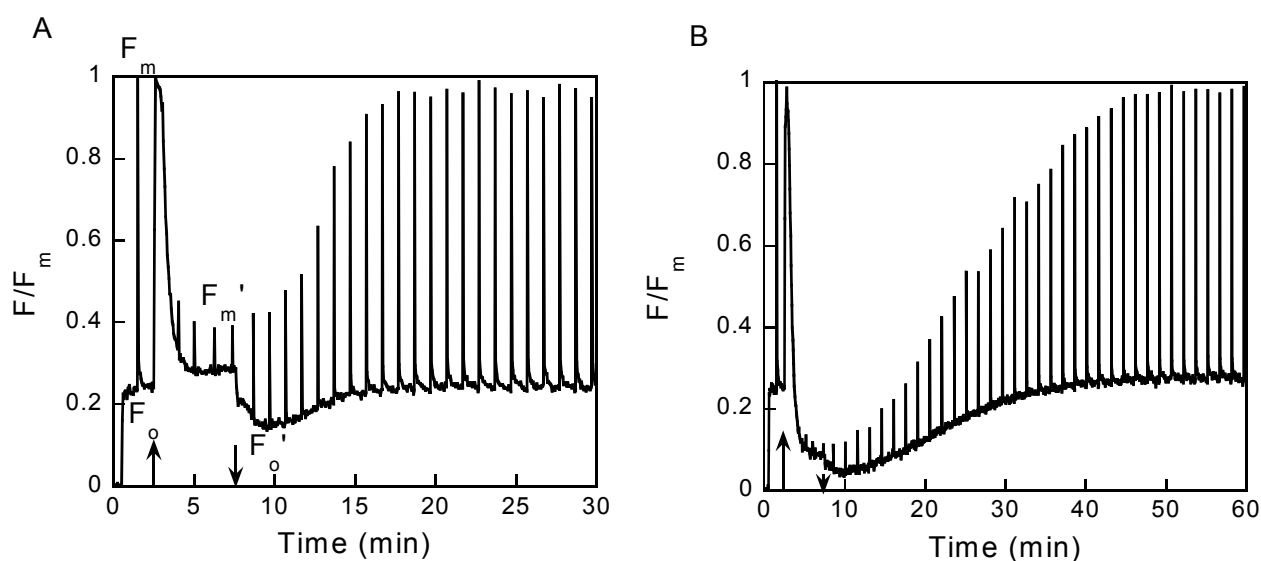
Pigment/Parameter	CL cells	IL cells
<b>DD<sup>b</sup></b>	<b>8.4 ± 1.1</b>	<b>15.4 ± 1.3</b>
Fucoxanthin	68 ± 8.0	64 ± 4.4
Chl <i>c</i>	13.5 ± 1.4	12.0 ± 0.9
β-carotene	7.6 ± 1.3	9.0 ± 0.7
P <sub>700</sub>	0.16 ± 0.01	0.17 ± 0.01
Y <sub>SS</sub> (arbitrary units)	29 ± 1.8	31 ± 1.2
F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	0.77 ± 0.02	0.78 ± 0.01
t <sub>1/2</sub> of F <sub>v</sub> with DCMU (ms)	9	10
I <sub>1/2</sub> of Y <sub>SS</sub> (%)	3.8	4.0
I <sub>sat</sub> (mE.m <sup>-2</sup> .s <sup>-1</sup> )	0.5 ± 0.05	0.5 ± 0.05

<sup>a</sup> Pigment contents are given in mol per 100 mol Chl *a*. Total Chl *a*.cell<sup>-1</sup> was 0.38 ± 0.05 pg for CL cells and 0.35 ± 0.05 pg for IL cells. <sup>b</sup> The light intensity used for cell culture was weak enough to prevent any de-epoxidation of DD to DT.

#### *Non-photochemical quenching (NPQ) evaluated by SV<sub>o</sub> and SV<sub>m</sub> in CL and IL cells.*

Figure 1 shows typical PAM-fluorometer recordings of the chlorophyll fluorescence yield changes induced by illumination of CL cells (A) and IL cells (B), as detected by a non-actinic modulated beam. The cells were illuminated for 5 min, indicated by up and down arrows, at an intensity of 450 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> that was just saturating for the rate of oxygen

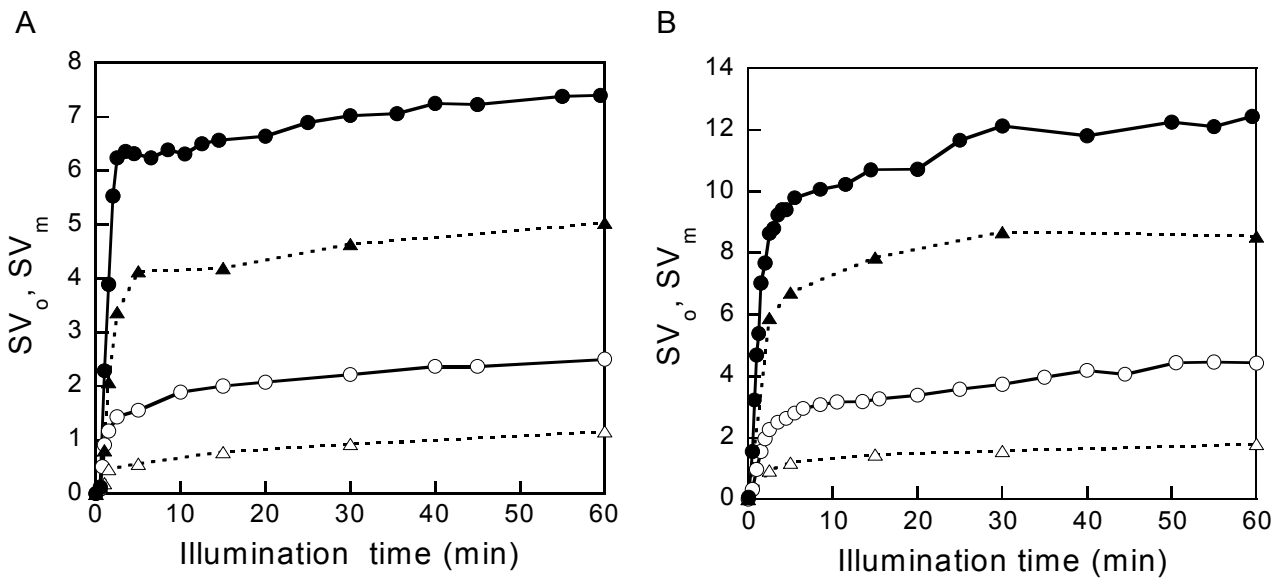
evolution. The spikes result from temporary accumulation of  $Q_A^-$  (reduced primary acceptor of PS II) by short pulses of much stronger illumination, applied at regular intervals to probe the fluorescence yield in the absence of photochemical quenching. The data are normalized to the maximum fluorescence yield,  $F_m$ , reached when such a pulse is applied to dark-adapted cells that show only photochemical quenching and have a low fluorescence yield  $F_o$ . During the 5 minutes illumination a large non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) rapidly developed, as shown by the lower maximum yields reached by the high intensity pulses ( $F_m'$ ). This NPQ also affects the fluorescence yield of 'open' PS II, as seen by the lower minimum yield ( $F_o'$ ). We will use this value to indicate  $F_o'$  but note that its real value might be even somewhat lower because the presence of some remaining  $Q_A^-$  at this point in time cannot be ruled out. The minimum of  $F_o'$  variations is reached in less than two minutes. Some NPQ may already have disappeared but the corresponding  $F_m'$  values show that NPQ relaxation is still small at this point. Recovery of the dark-adapted state took about 15 min in CL cells (Fig. 1A). In IL cells, NPQ induced by the same illumination was much more pronounced, appeared more rapidly, and disappeared more slowly than in CL cells (Fig. 1B).



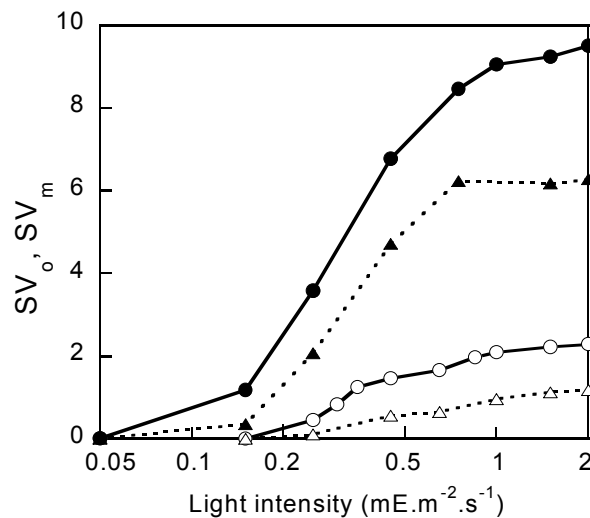
**Figure 1.** Fluorescence yield recordings by the PAM-fluorometer of CL cells (A) and IL cells (B). After a few minutes darkness (with the modulated detecting beam on), cells were illuminated for 5 min at  $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (between up and down arrows). At regular intervals strong light pulses were fired to probe the fluorescence yield without photochemical quenching.

The extent of NPQ is usually quantified as  $F/F_o' - 1$ , which should be proportional to the quencher concentration if a simple Stern-Volmer relation applies (see materials and methods section). We will use the 'Stern-Volmer coefficients'  $SV_o$  and  $SV_m$  to denote  $F_o/F_o' - 1$  and

$F_m/F_m'-1$ , respectively. The induction kinetics of  $SV_o$  and  $SV_m$  in the two types of cells is shown in Figure 2 for light intensities of  $450 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$  (A, just saturating light, Table I) and  $2 mE.m^{-2}.s^{-1}$  (B, full sunlight, Long et al., 1994). The open and solid symbols refer to CL and IL cells, respectively, circles and triangles to  $SV_o$  and  $SV_m$ . In all conditions the kinetics were similar: the major fast phase already visible in Fig. 1 was followed by a much slower increase. Figure 3 shows  $SV_o$  and  $SV_m$  induced by 5 min illumination as a function of light intensity. CL cells required a somewhat higher light intensity for NPQ induction than IL cells, but for both a large part of the maximum NPQ was already induced at a light intensity of  $0.5 mE.m^{-2}.s^{-1}$  that was just saturating for oxygen evolution.



**Figure 2.** Non-photochemical quenching as a function of illumination duration for two light intensities:  $450 \mu E.m^{-2}.s^{-1}$  (A), and  $2 mE.m^{-2}.s^{-1}$  (B). Quenching of  $F_m$  (circles,  $SV_m$ ) and of  $F_o$  (triangles,  $SV_o$ ) in CL cells (open symbols) and IL cells (solid symbols). The data were obtained from measurements as in Fig. 1.



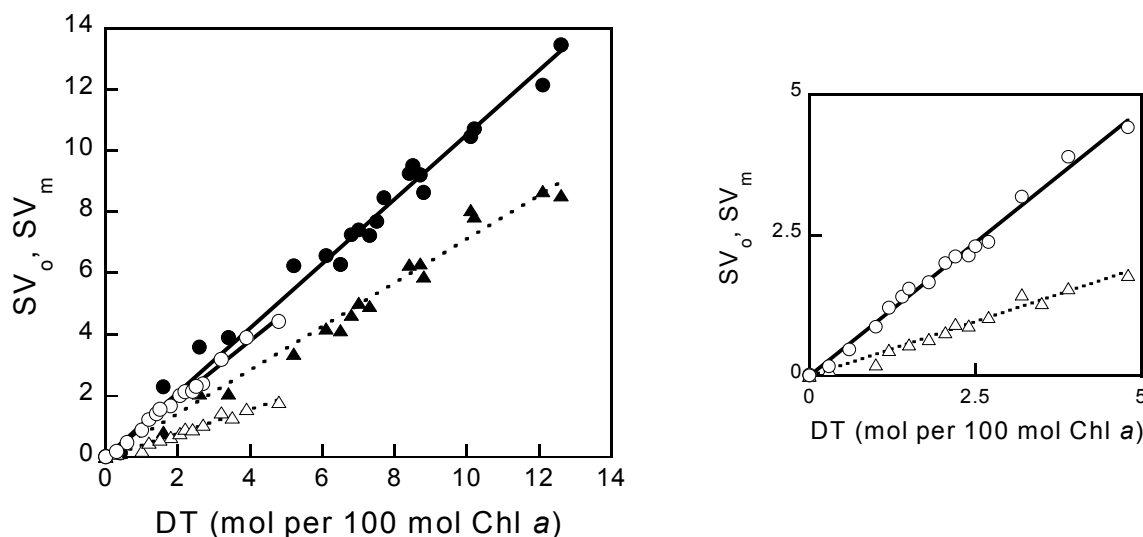
**Figure 3.** NPQ as a function of light intensity for a fixed illumination duration of 5 min.  $SV_m$  (circles) and  $SV_o$  (triangles) for CL cells (open symbols) and IL cells (solid symbols).



### Correlation of NPQ and diatoxanthin accumulation.

The kinetics of DT accumulation was similar to that of NPQ formation. No DT could be detected in dark-adapted cells. The amount of DT formed by de-epoxidation of DD results from the competition between epoxidation and de-epoxidation (activated by the proton gradient). At the onset of light the first phase corresponds to the rapid transformation of DD to DT. The equilibrium reached at the end of the five minutes illumination depends on the light intensity: at low light epoxidation competes efficiently with de-epoxidation then de-epoxidation becomes more efficient with increasing light intensities and a quasi steady state is reached when the equilibrium is strongly shifted in favour of DT.

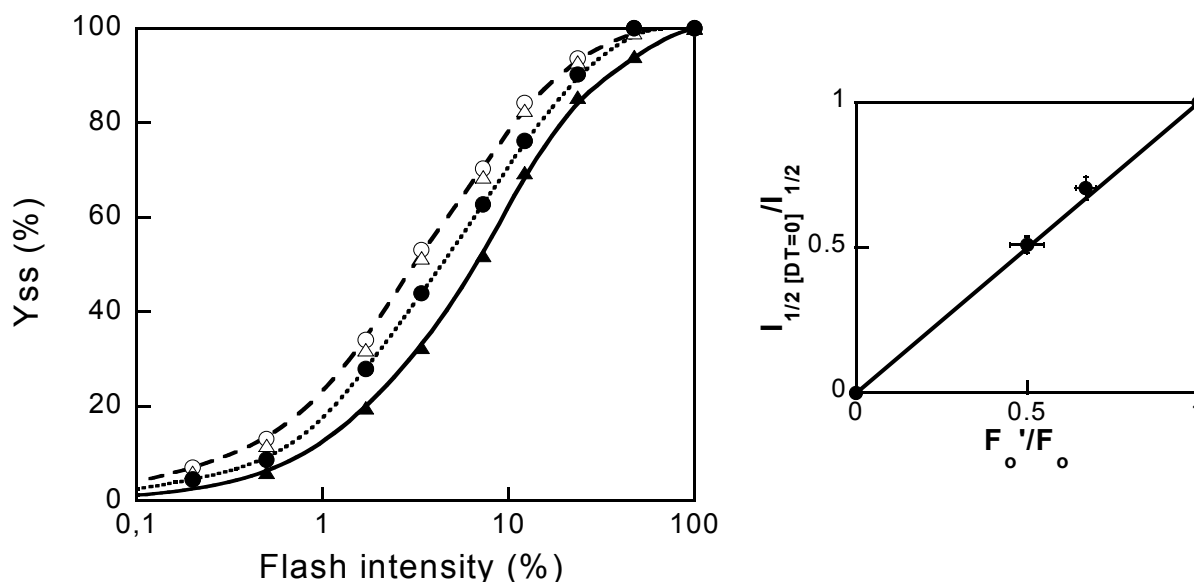
The maximum amount of DT formed, measured after 1 h illumination at  $2 \text{ mE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , was 5 and 12.5 mol DT.(100 mol Chl *a*)<sup>-1</sup> for CL and IL cells, respectively, corresponding to the de-epoxidation of 50 and 65 % of the total DD pool. As shown in Figure 4,  $SV_o$  and  $SV_m$  were found to be proportional to the DT concentration for both types of cells. While the regression coefficients for  $SV_m$  were very similar (0.95 for CL and 1.04 for IL cells), those for  $SV_o$  were quite different for the two types of cells: 0.39 for CL and 0.72 for IL cells. The ratio of  $SV_o/SV_m$  would have been equal to  $F_o/F_m$  (near 0.22 in both cell types) if the photochemical and non-photochemical quenchers were randomly competing for excitations in the same, homogeneous pigment bed. The ratio  $SV_o/SV_m$  is, however, 0.41 for CL cells and 0.69 for IL cells. If the values used for  $F_o'$  were slightly overestimated, even larger values of  $SV_o$  would result after correction.



**Figure 4.** Correlation of NPQ and DT concentration.  $SV_m$  (circles) and  $SV_o$  (triangles) for CL cells (open symbols, shown enlarged in the inset) and IL cells (solid symbols). Linear regressions were:  $SV_m(\text{CL}) = 0.95 [\text{DT}]$ ;  $SV_m(\text{IL}) = 1.04 [\text{DT}]$ ;  $SV_o(\text{CL}) = 0.39 [\text{DT}]$  and  $SV_o(\text{IL}) = 0.72 [\text{DT}]$  with  $0.98 < R^2 < 0.99$ .  $[\text{DT}]/[\text{Chl } a]$  was determined by HPLC on cells sampled at the end of the light treatment. The duration of light was varied from 30 s to 60 min and the light intensity from 0.05 to  $2 \text{ mE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

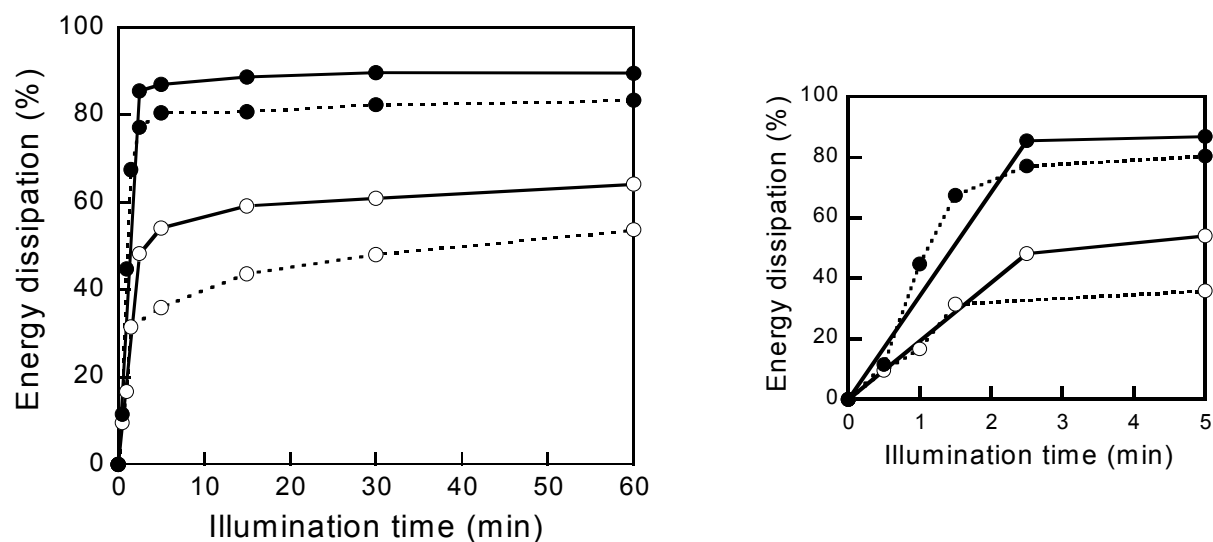
### Decrease of the quantum efficiency of PS II by NPQ.

Since NPQ dissipates part of the excitation energy, it is expected to decrease the quantum efficiency of PS II. This was verified by measurements of the amount of oxygen produced in short flashes as a function of flash energy (Fig. 5). The saturation curves of dark-adapted CL and IL cells (open symbols) were almost identical, confirming that the PS II antenna size was the same in both culture conditions. The flash illumination used, 20 single turn-over flashes in 10 s, corresponds to a very low continuous intensity and did not induce any NPQ. After exposure to high light intensity the saturation curves for flash-induced oxygen evolution were indeed shifted to higher flash energies (solid symbols). These measurements were taken 7 min after the light treatment (the time required for sedimentation on the electrode) and were compared to the fluorescence yield measured at the same time after illumination, which is already substantially less quenched by NPQ than 2 min after illumination (c.f. Fig. 1). The remaining quenching of  $F_0$  at this time was equal to the decrease of the quantum yield of  $O_2$  evolution as indicated by the reciprocal of the half-saturating flash intensity (inset, Fig. 5). This result is consistent with equation 3 in Materials and Methods and may indicate that PSI fluorescence does not significantly contribute to  $F_0$  or is similarly quenched by NPQ.



**Figure 5.** Steady-state  $O_2$  yield per flash ( $Y_{SS}$ ) as a function of flash intensity. Dark-adapted ( $SV_0 = 0$ ) CL cells (open circles) and IL cells (open triangles), CL cells at  $SV_0 = 0.5$  (solid circles) and IL cells at  $SV_0 = 1$  (solid triangles).  $SV_0$  was measured simultaneously to  $Y_{SS}$  (after 7 min darkness) with the PAM-fluorometer. The intermediary curve correspond to CL cells with a maximal  $SV_0$  value of 1.5 after cessation of illumination (15 min at  $2000 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) lowered to 0.5, when the flash series was fired 7 minutes later. The curve to the right corresponded to IL cells with a maximal  $SV_0$  value of 4 after cessation of illumination (5 minutes at  $450 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) lowered to 1, when the flash sequence was fired. Inset: relative reciprocal light intensity needed for half-saturation of  $Y_{SS}$  ( $I_{1/2 [DT=0]}^{-1/2}$ ) versus  $F'_o/F_o$ .

If NPQ decreases the quantum yields of fluorescence and O<sub>2</sub> evolution equally also at stronger quenching, when the available flash energies were insufficient to determine the half-saturating intensity, the energy dissipation measured by  $1-F_0'/F_0$  equals the down-regulation of PS II by NPQ. Fig. 6 shows the development of the energy dissipation in the antenna of open PS II centers for the two types of cells as a function of illumination time at 0.45 and at 2 mE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. The energy dissipation reached values up to 90 % and was much higher for IL cells than for CL cells at both light intensities, especially after short illumination times (enlarged in the inset).



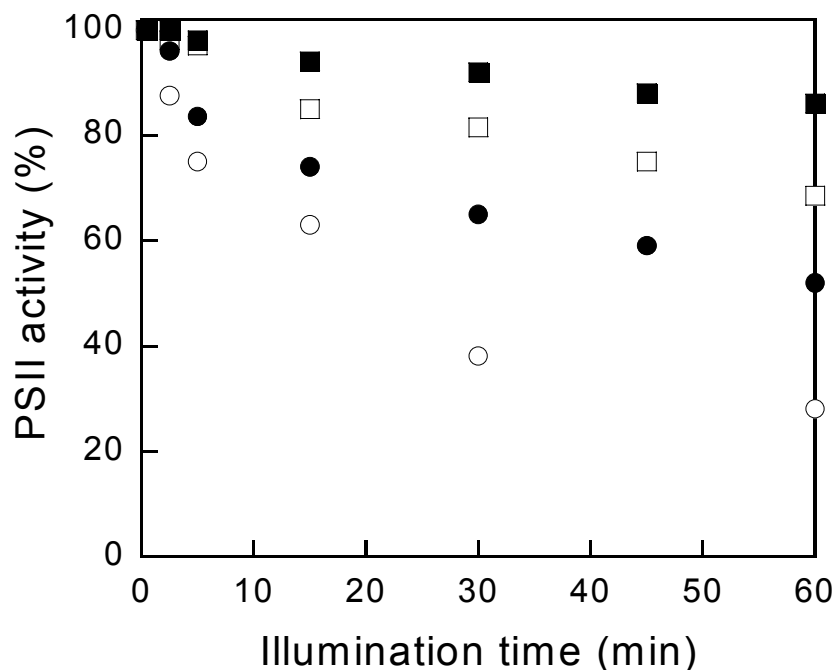
**Figure 6.** Energy dissipation in the antenna of open PSII reaction centers ( $1-F_0'/F_0$ ) as a function of illumination duration. CL cells (open symbols) and IL cells (solid symbols) at  $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (dashed lines) and  $2 \text{mE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (solid lines). Inset: first 5 min enlarged.

#### *Protection by NPQ against photoinhibition.*

Since CL and IL cells appeared to differ only in the capacity of energy dissipation by DT, their comparison provides a unique opportunity to verify the functional role of this process in protecting PS II against photoinhibition. Photoinhibition was evaluated by monitoring O<sub>2</sub> evolution at the Clark electrode and measuring the time needed to reach the compensation point (Arsalane et al., 1994). As predicted by Arsalane et al., 1994, the larger the DD content, the longer time is needed to reach the compensation point (not shown).

An additional method for evaluation of photoinhibition was used. Fig. 7 shows the decrease of PS II activity measured as the steady-state O<sub>2</sub> yield per flash ( $Y_{SS}$ ) after illumination at 0.45 or 2 mE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> followed by 7 min dark-adaptation. Photoinhibition kinetics were indeed faster for CL cells (open symbols) than for IL cells (solid symbols),

especially during the first 5 min. After 1 h of illumination, the remaining percentage of active PS II centers was lower for CL cells under the two light intensities. The difference between IL and CL cells is actually larger than Fig. 7 suggests, because especially for IL cells the recovery from NPQ is much slower than 7 min (Fig. 1) and saturation of  $Y_{SS}$  could not be reached with the available flash energy. Since 85 or 90 % of the energy was dissipated by NPQ after 1 h at 0.45 or 2  $\text{mE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , respectively (Fig. 6), the flash saturation curve for dark-adapted cells in Figure 5 indicates that only 87 or 79 % saturation of  $Y_{SS}$  could be reached. The exact correction has not been done because combining the information from the different data in Figures 5, 6 and 7 in this way seems too daring, but the corrections may obviously be large for IL cells. The correction would leave essentially no evidence for photoinhibition of IL cells at 0.45  $\text{mE}$  at all. For CL cells no such correction applies because NPQ largely disappeared in 7 min and even at 65 % energy dissipation (Fig. 6) the flashes would still be more than 95 % saturating (Fig. 5). The fast phase of photoinhibition seen during the first few minutes at high light intensity correlates with the time required for accumulation of DT and NPQ and illustrates the importance of the photoprotective effect. Such a short delay in the build-up of the protection is unlikely to be of consequence even in the turbulent native environment of *P. tricornutum*.



**Figure 7.** Photoinhibition kinetics of PSII as a function of illumination duration. CL cells (open symbols) and IL cells (solid symbols) at 450  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (squares) and 2  $\text{mE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (circles). After the light treatment, cells were allowed to settle on a rate electrode for 7 min in darkness. PSII activity was estimated by measurement of the steady-state  $\text{O}_2$  yield per flash after a sequence of twenty single-turnover flashes.

## Discussion

### *DD enrichment and the light-induced DT accumulation.*

*P. tricornutum* cultures in stationary phase show an inverse relation between growth rate and DD content (Arsalane et al., 1994). To slow down the growth rate and to keep the cells in the exponential phase of growth, we grew *P. tricornutum* under an intermittent light regime. When *P. tricornutum* are grown under such a regime the chlorophyll and fucoxanthin content per cell do not change, while the size of the DD pool is increased, in striking contrast to the effect of intermittent illumination on higher plants which leads to a drastic reduction of PS II antenna size. Intermittent light grown peas are devoid of all LHCII proteins with the exception of CP26 one of the minor inner antenna chlorophyll binding proteins (Jahns and Junge, 1992). This way a specific increase in DD content could be induced without significant change in the amounts of other pigments, PS I/PS II ratio, or PS II antenna size and quantum yield.

Upon exposure to high light intensity, a substantial de-epoxidation of DD occurred, largely within a few minutes. This is in agreement with DD-cycle activity previously reported (Arsalane et al., 1994; Olaizola et al., 1994; Casper-Lindley and Bjorkman, 1998). The larger pool of DD in IL cells, and its more extensive de-epoxidation, led to much larger accumulation of DT during high light illumination. The maximal DT accumulation is of  $5 \text{ mol DT} \cdot (100 \text{ mol Chl } a)^{-1}$  in CL cells and  $12.5 \text{ mol DT} \cdot (100 \text{ mol Chl } a)^{-1}$  in IL cells. In higher plants, Ruban et al., (1999) have estimated that each LHCII monomer can bind at least one violaxanthin. Upon activation of the violaxanthin de-epoxidase, the highest de-epoxidation state was found for the main LHCII components and the lowest for CP29. Very little is known about the nature of the subunits of LHC in diatoms (Bhaya and Grossman, 1993) and it seems premature to speculate on their DT binding sites at this stage.

### *Correlation of light-induced DT accumulation and NPQ.*

The Stern-Volmer parameters  $SV_o$  and  $SV_m$  relate the non-photochemical quenching on  $F_o$  and  $F_m$  to the quencher concentration (Bilger and Björkman, 1990; Gilmore and Yamamoto, 1991; Olaizola and Yamamoto, 1994). Random quenching in a homogenous antenna would produce a normalized fluorescence yield as depicted by equation 2 (see materials and methods section). For the quenching of  $F_m$ , DT is the only quencher present in the light-harvesting complex of PS II, the photochemical quenching being totally suppressed. In that case, the slope of  $SV_m$  is the same for IL and CL cells.  $(SV_m)_{IL}$  can reach values higher than  $(SV_m)_{CL}$ , the difference being only due to the difference in the maximal concentration of

DT which can be formed (see Fig. 4). For the  $F_o$  level, the photochemical quencher (Q) is present (PS II centers are open) and the two types of quenchers compete for the trapping of the excitation. If the quenchers were randomly competing in a homogeneous antenna, the slope of  $SV_o$  should be  $F_o/F_m$  times the slope of  $SV_m$  (see equation 2 in Material and Methods). It is not the case: the observed  $SV_o/SV_m$  ratios were much larger than  $F_o/F_m$ , especially for IL cells. The discrepancy is far too large to be substantially affected by possible errors in the determination of the extent of photochemical quenching due quenching by the plastoquinone pool or incomplete oxidation of  $Q_A^-$  after illumination. Our results provide an additional indirect proof that excitation transfer to the open PS II reaction centers becomes rate-limiting for trapping by open PS II reaction centers, causing a heterogeneity of the Chl fluorescence yield in the PS II antenna. The selective increase of  $SV_o$  indicates that the Chls involved contribute a larger fraction of the emission at  $F_o$  than at  $F_m$ .

*Functional significance of energy dissipation by DT and photoinhibition.*

Most studies on NPQ consider only the quenching of  $F_m$ . While the quenching of  $F_m$  presumably helps to diminish singlet oxygen production in the antenna by reducing the yield of Chl triplet formation, the quantitative significance of this protective effect under physiological conditions is probably negligible. The triplet yield of Chl *a* is twice the fluorescence yield and in an aerobic environment its very fast transfer to carotenoids followed by intersystem crossing to the ground state is essential anytime. Only the reaction center Chl itself cannot be protected this way (van Gorkom and Schelvis, 1993), but at  $F_m$  the PS II reaction center does not quench fluorescence (Thielen and van Gorkom, 1981). Hence the probability that the triplet state is formed there, rather than in the antenna, is as small as the fraction of Chl *a* contained in the reaction center. At  $F_o$ , on the other hand, most excitations cause a charge separation. If that cannot be stabilized by secondary electron transfer reactions due to saturation of electron transport, it will most likely recombine to the reaction center triplet state (van Gorkom, 1985; van Gorkom, 1986). Any mechanism to avoid that would be physiologically significant and could bring a decisive advantage under continually and widely changing light intensity. Our results show that the xanthophyll cycle in *P. tricornutum* provides such a mechanism.

The quenching of  $F_o$  is a direct measure of the extent of down-regulation of PS II electron transport resulting from NPQ. We have shown that energy dissipation by DT equally decreases the quantum yield of  $O_2$  evolution and the quantum yield of fluorescence emission when the PS II centers are open. The corresponding effect in higher plants may be small (c.f.

Santabarbara et al., 2001), but our results clearly confirm the large decrease of PS II quantum efficiency by NPQ in *P. tricornutum*, reported by Koblizek et al., (2001). Moreover, this unusual capacity for down-regulation of PS II is adjusted to the illumination conditions during growth.

Finally, we note an intriguing observation: after 1 h at  $2 \text{ mE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , CL cells lost up to 70 % of their  $\text{O}_2$  evolving PS II reaction centers, and yet no deviation from the proportionality between  $\text{SV}_o$ ,  $\text{SV}_m$  and [DT] is seen in the inset of Fig. 4. Apparently there is nothing special about the fluorescence yield, including the variable fluorescence, of this ‘inactivated PS II’. This indicates that these diatoms are not photoinhibited in the classical sense and in fact Olaizola et al., 1994 already mentioned the absence of D1 photodamage in *P. tricornutum*. Evidence for the induction of an electron transport cycle around PS II that competes with oxygen evolution at high light intensity will be presented elsewhere (Lavaud et al., 2002).

The phenomena reported here are probably not restricted to *P. tricornutum*. Other marine planktonic diatoms like *Chaetoceros* (Olaizola et al., 1994), *Thalassiosira* (Demers et al., 1991), *Haslea* (Mouget et al., 1999) and freshwater planktonic diatoms like *Nitzschia* (Willemoës and Monas, 1991) are able to synthesize large amounts of de-epoxidizable xanthophylls. It seems likely that the large and adjustable capacity of DT accumulation, and the fast and efficient photoprotection by the associated NPQ, are general properties of planktonic diatoms and play an important role in their successful adaptation to the strongly fluctuating light intensity in their natural habitat (Harris, 1986).

## Acknowledgements

Lavaud J. was supported by a grant from the French Ministry of National Education, Research, and Technology. H. J. van Gorkom was supported by an invited professorship from the Ecole Normale Supérieure. We thank Prof. J.-C. Duval for experimental assistance and helpful discussions, C. Lichtlé for electron microscopic photographs and Dr K. Niyogi and A. Pascal for critical reading of the manuscript.

## Materials and methods

### *Cells cultivation and preparation.*

*Phaeodactylum tricornutum* Böhlin cells were grown photoautotrophically in sterile natural seawater F/2 medium (Guillard and Ryther, 1962). Cultures of 300 mL were incubated at  $18^\circ\text{C}$  in airlifts continuously flushed with sterile air. They were illuminated at a light intensity of  $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  with white fluorescent tubes (Claude, Blanc Industrie, France) with a 16 h light/8 h dark cycle for continuous light (CL) cells or with 5 min light/55 min dark cycle for intermittent light (IL) cells. Cells were harvested during the exponential phase of growth, centrifuged at 3000 g for 10 min and resuspended in their culture medium to a final chlorophyll *a* (Chl *a*)

concentration of  $10 \mu\text{g Chl } a.\text{mL}^{-1}$ . The algae were continuously stirred at  $18^\circ\text{C}$  under low continuous light for CL cells and under intermittent light for IL cells until measurement.

*Pigment contents.*

Pigment analyses were performed by HPLC as previously described Arsalane et al., 1994. Cells collected from the PAM-fluorometer vial (see below) were frozen in liquid nitrogen. Pigments were extracted with a methanol:acetone (70:30, v/v) solution. The extinction coefficients used were the same as in (Berkaloff et al., 1990) for chlorophyll and as (Johansen et al., 1974) for diadinoxanthin (DD) and diatoxanthin (DT). Cell counts were performed with a Thoma hematocytometer, using the public domain NIH Image program (US National Institute of Health).

*Photosystem I reaction center ( $P_{700}$ ) concentration.*

$P_{700}$  was determined as described in (Newman and Sherman, 1978). Cells were first adjusted to the same Chl *a* concentration and then broken by sonication and kept on ice. The light-induced absorption decrease at 700 nm was measured with a DW-2 Aminco spectrophotometer (American Instrument Co., USA) in dual beam mode (reference at 730 nm) in presence of 6 mM sodium ascorbate and 300 to 600  $\mu\text{M}$  methylviologen; 30  $\mu\text{M}$  DCMU (3-(3',4'-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea) was added to prevent  $P_{700}^+$  reduction by linear electron flow. Stock solutions of sodium ascorbate (Sigma, 0.2 M in distilled water), methylviologen (Sigma, 10 mM in distilled water) and DCMU (Sigma, 10 mM in absolute ethanol) were freshly prepared.

*Photosystem II (PS II) antenna size assessed by fluorescence emission induction in presence of DCMU.*

PS II Chl fluorescence induction kinetics of dark-adapted cells, were measured at room temperature in a laboratory-built continuous fluorometer. The set-up and the data acquisition were previously described by (Ritz et al., 1999). Samples were adjusted to a final concentration of  $4 \mu\text{g Chl } a.\text{mL}^{-1}$  and were dark-adapted for 20 min prior to the experiment. 20  $\mu\text{M}$  DCMU was added 5 min before the end of the dark period.

*Oxygen ( $O_2$ ) concentration and photosynthetic light-response curves.*

$O_2$  concentration was measured with a DW1-Clark electrode (Hansatech Ltd., England) at  $18^\circ\text{C}$ . White light of adjustable intensity (measured with a PAR-sensor, Li-cor inc., USA) was provided by KL-1500 quartz iodine lamp (Schott, Mainz, Germany). Cell culture samples were dark-adapted for 20 min before measurement. Photosynthetic light-response curves were obtained by illuminating a 2 mL sample during 5 min at various intensities. A new sample was used for each intensity.

*Chlorophyll (Chl) fluorescence yield measurements.*

The Clark electrode set-up was modified to allow simultaneous measurement of oxygen concentration and Chl fluorescence by a PAM-101 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) as described previously (Ritz et al., 1999). The fluorescence excited by a very weak (non-actinic) modulated 650 nm light was measured. After 20 min dark-adaptation, continuous actinic light of adjustable intensity was switched on. 600 ms pulses of white light ( $4 \text{ mE}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) were admitted by an electronic shutter (Uniblitz, Vincent, USA, opening time 2 ms) placed in front of a KL-1500 quartz iodine lamp continuously switched on in order to monitor the NPQ evolution. The average fluorescence (acquisition time 33  $\mu\text{s}$ ) measured during the last 400 ms of the pulse was taken as  $F_m$  or  $F_m'$ . Data were recorded with a microcomputer through a 12 bit analogue-digital interface and the system was driven by home-made software (Arsalane et al., 1993). For each



experiment, 2 mL of cell suspension was used. Sodium bicarbonate (Labosi) was added at a concentration of 4 mM from a freshly prepared 0.2 M stock solution in distilled water to prevent any limitation of the photosynthetic rate by carbon supply.

Standard fluorescence nomenclature was used (van Kooten and Snel, 1990).  $F_o$  and  $F_m$  are defined as the fluorescence yield of dark-adapted cells and the maximum fluorescence reached in such cells during a saturating pulse of white light, respectively. The quantum yield of excitation trapping by PS II is the ratio  $F_v/F_m$  where  $F_v$  is the variable part of the fluorescence emission and is equal to  $F_m - F_o$ . Non-photochemical quenching (NPQ) is quantified as  $F/F' - 1$ , where  $F'$  is the fluorescence yield in the presence of quenching (Gilmore and Yamamoto, 1991; Bilger and Björkman, 1990; Gilmore and Yamamoto, 1991). We use the 'Stern-Volmer parameters'  $SV_o$  and  $SV_m$  to indicate NPQ of  $F_o$  and NPQ of  $F_m$ , respectively. The fluorescence yields  $F_o$ ,  $F_m$ ,  $F_o'$  and  $F_m'$  are indicated in Figure 1A.

The following formalism was used to relate the Stern-Volmer equations with the amounts of photochemical (Q for quinones) and non-photochemical (DT) quenchers. The decay rate of the excited state of Chl *a* molecules in PS II is

$$\frac{d[*]}{dt} = \sum k[*] \quad \text{with} \quad \sum k = k_F + k_{IC} + k_Q[Q] + k_{DT}[DT]$$

where  $k_F$ : rate constant of fluorescence emission.  
 $k_{IC}$ : rate constant of intersystem crossing to the Chl *a* triplet state  
 + rate constant of internal conversion to the ground state.  
 $k_Q[Q]$ : rate constant of photochemical quenching.  
 $k_{DT}[DT]$ : rate constant of non-photochemical quenching.

The fluorescence yield is

$$F = \frac{k_F}{\sum k}$$

In the absence of non-photochemical quenching, Q is the only quencher and

$$F_m = \frac{k_F}{k_F + k_{IC}} = k'_F \quad \text{when } Q = 0$$

and when Q is at its maximal concentration

$$F_o = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_Q[Q]}$$

then,

$$\frac{F_m}{F_o} = 1 + \frac{k_Q}{k_F + k_{IC}}[Q] = 1 + k'_Q[Q]$$

In the presence of the quencher DT, if  $Q = 0$ ,

$$\frac{F_m}{F_m'} = 1 + k'_{DT}[DT] \quad \text{and} \quad SV_m = \frac{F_m}{F_m'} - 1 = k'_{DT}[DT] \quad (1)$$

In the presence of both quenchers

$$\frac{F_m}{F_o'} = 1 + k'_Q[Q] + k'_{DT}[DT] = \frac{F_m}{F_o} + k'_{DT}[DT] \quad \text{and} \quad \frac{F_o}{F_o'} = \frac{F_o \times F_m}{F_m \times F_o'} = 1 + \frac{F_o}{F_m} k'_{DT}[DT]$$

Then,

$$SV_o = \frac{F_o}{F_o'} - 1 = \frac{F_o}{F_m} k'_{DT}[DT] = \frac{F_o}{F_m} SV_m \quad (2)$$

*O<sub>2</sub> yield per flash.*

The relative O<sub>2</sub> yield produced per flash during a sequence of single-turnover saturating flashes at a frequency of 2 Hz was measured with a rate electrode described by (Lemasson and Etienne, 1975). Short (5 μs) saturating flashes were produced by a Strobotac (General Radio Co., Concord, MA). O<sub>2</sub> evolution was monitored at 18°C. For the control sequences, cells were first dark-adapted during 20 min and then deposited on the electrode. Both control and illuminated samples taken from the PAM-fluorometer were allowed to settle on the electrode for 7 min in darkness before measurement. The steady-state O<sub>2</sub> yield per flash (Y<sub>SS</sub>) was taken to be the average yield of the last 4 flashes of a series of twenty flashes when the classical four-step oscillations due to the S-states cycle (Kok et al., 1970) was almost damped. Y<sub>SS</sub> was used to assess the relative concentration of O<sub>2</sub> evolving PS II reaction centers. For the saturation curves of Y<sub>SS</sub>, the intensity of the flashes was varied with neutral density filters. Samples were taken from the PAM-fluorometer after illumination and deposited on the electrode. For each flash intensity a new sample was used. In parallel, fluorescence yield was measured with the PAM set-up at the same time after illumination.

The reciprocal of the half-saturating flash intensity as a measure of the antenna size was expressed as follows. The quantum yield of photochemistry is given by the equation: and should be inversely proportional to the amount of light needed to activate a given fraction of the reaction centers,

$$\Phi_Q = \frac{k_Q[Q]}{k_F + k_{IC} + k_Q[Q] + k_{DT}[DT]}$$

so that:

$$\frac{I_{1/2}}{I_{1/2}[DT=0]} = \frac{\Phi_Q[DT=0]}{\Phi_Q} = \frac{k_F + k_{IC} + k_Q[Q] + k_{DT}[DT]}{k_F + k_{IC} + k_Q[Q]} = \frac{F_o}{F_o'} \quad (3)$$

with I<sub>1/2</sub>: the light intensity needed for half-saturation of Y<sub>SS</sub> in presence of DT and I<sub>1/2</sub> [DT=0]: the light intensity needed for half-saturation of Y<sub>SS</sub> in absence of DT.

## References

- Anderson JM, Chow WS, Park Y-I (1995) The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth Res* 46: 129-139
- Arsalane W, Paresys G, Duval J-C, Wilhelm C, Conrad R, Büchel C (1993) A new fluorometric device to measure the *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence yield in microalgae and its use as a herbicide monitor. *Eur J Phycol* 28: 247-252
- Arsalane W, Rousseau B, Duval J-C (1994) Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: Competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem Photobiol* 60: 237-243
- Bassi R, Caffarri S (2000) LHC proteins and the regulation of photosynthetic light harvesting

- function by xanthophylls. *Photosynth Res* 64: 243-256
- Berkaloff C, Caron L, Rousseau B (1990) Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigments analysis. *Photosynth res* 23: 181-193
- Bhaya D, Grossman AR (1993) Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Res* 21: 4458-4466
- Bilger W, Björkman O (1990) Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. *Photosynth Res* 25: 175-185
- Brown JS (1988) Photosynthetic pigment organization in diatoms (Bacillariophyceae). *J Phycol* 24: 96-102
- Caron L, Mortain-Bertrand A, Jupin H (1988) Effect of photoperiod on photosynthetic characteristics of two marine diatoms. *J Exp Mar Biol Ecol* 123: 21-226
- Casper-Lindley C, Bjorkman O (1998) Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth Res* 56: 277-289
- Demers S, Roy S, Gagnon R, Vignault C (1991) Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Mar Ecol Prog Ser* 76: 185-193
- Demmig-Adams B, Adams WW (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci* 1: 21-26
- Falkowski PG, Laroche J (1991) Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27: 8-14
- Gilmore AM (1997) Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol Plantarum* 99: 197-209
- Gilmore AM, Yamamoto HY (1991) Zeaxanthin formation and energy-dependent fluorescence quenching in pea chloroplasts under artificially mediated linear and cyclic electron transport. *Plant Physiol* 96: 635-643
- Guillard RRR, Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. 1. *C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Gran Can J Microbiol* 8: 229-238
- Harris GP (1986). *Phytoplankton Ecology: Structure, Function, and Fluctuation*. London: Chapman & Hall.
- Horton P, Ruban AV, Walters RG (1996) Regulation of light harvesting in green plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 655-684
- Jahns P, Junge W (1992) Thylakoids from pea seedlings grown under intermittent light: biochemical and flash-spectrophotometric properties. *Biochemistry* 31: 7390-7
- Johansen JE, Wa S, Liaaen-Jensen S, Haxo FT (1974) Carotenoids of the Dinophyceae. *Phytochem* 13: 2261-2271
- Koblizek M, Kaftan D, Nebdal L (2001) On the relationship between the non-photochemical quenching of the chlorophyll fluorescence and photosystem II light harvesting efficiency. A repetitive flash fluorescence induction study. *Photosynth Res* 68: 141-152
- Kok B, Forbush B, McGloin M (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol* 11: 457-475
- Lavaud J., Rousseau B., van Gorkom, H. J., Etienne A.-L. (2002) Photosystem II transfer cycle and chlororespiration in planktonic diatoms. *Photosynth Res* 74: 49-57.
- Lemasson C, Etienne A-L (1975) Photo-inactivation of system II centers by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim Biophys Acta* 408: 135-142
- Long S, Humphries S, Falkowski P (1994) Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 45: 633-662
- Mouget J-L, Tremblin G, Morant-Manceau A, Morançais M, Robert J-M (1999) Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *Eur J Phycol* 34: 109-115
- Müller P, Li X-P, Niyogi KK (2001) Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol* 125: 1558-1566
- Newman PJ, Sherman LA (1978) Isolation and characterization of photosystem I and II membrane particles from the blue-green alga, *Synechococcus cedrorum*. *Biochim Biophys Acta* 503: 343-361
- Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 50: 333-359
- Olaizola M, Laroche J, Kolber Z, Falkowski PG (1994) Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth Res* 41: 357-370
- Olaizola M, Yamamoto HY (1994) Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 30: 606-612
- Owens TG (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. II.

- Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol* 80: 739-746
- Pyszniak AM, Gibbs SP (1992) Immunocytochemical localisation of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophyll *a/c* light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protoplasma* 166: 208-217
- Ritz M, Neverov KV, Etienne A-L (1999)  $\Delta$ pH-dependent fluorescence quenching and its photoprotective role in the unicellular red alga *Rhodella violacea*. *Photosynthetica* 37: 267-280
- Ruban AV, Lee PJ, Wentworth M, Young AJ, Horton P (1999) Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J Biol Chem* 274: 10458-10465
- Santabarbara S, Barbato R, Zuccheli G, Garlasch FM, Jennings RC (2001) The quenching of photosystem II fluorescence does not protect the D1 protein against light induced degradation in thylakoids. *FEBS Lett* 505: 159-162
- Thielen APM, van Gorkom HJ (1981) Energy transfer and quantum yield in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 637: 439-446
- Ting CS, Owens TG (1993) Photochemical and non-photochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol* 101: 1323-1330
- van Gorkom HJ (1985) Electron transfer in photosystem II. *Photosynth Res* 6: 97-112
- van Gorkom HJ (1986) Photochemistry of photosynthetic reaction centers. *Bioelectroch Bioen* 16: 77-87
- van Gorkom HJ, Schelvis JPM (1993) Kok's oxygen clock: What makes it tick? The structure of P<sub>680</sub> and consequences of its oxidizing power. *Photosynth Res* 38: 297-301
- van Kooten O, Snel JFH (1990) The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth Res* 25: 147-150
- Wilhelm, C (1990) The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll *b*- and chlorophyll *c*-containing algae. *Plant Physiol Biochem* 28: 293-306
- Willemoës M, Monas E (1991) Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiol Plantarum* 83: 449-456

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE III

## 1<sup>ère</sup> PARTIE

*3- La présence de la diatoxanthine  
est-elle indispensable  
à la formation du quenching non-photochimique ?*

---

## **LA PRESENCE DE LA DIATOXANTHINE EST-ELLE INDISPENSABLE A LA FORMATION DU QUENCHING NON-PHOTOCHIMIQUE ?**

Chez les plantes supérieures, une petite partie du NPQ peut être détectée en l'absence des xanthophylles dé-époxydées. D'autre part, *in vitro*, le groupe de Horton a clairement montré que l'agrégation du LHCII provoquait un "quenching" de fluorescence qui était augmenté par l'addition de zéaxanthine. Ces observations ont conduit à un modèle dans lequel c'est le gradient de protons transthylakoïdal (ou  $\Delta pH$ ) qui produit un changement de conformation du complexe antenne périphérique entraînant un changement de sa fluorescence; la diminution de fluorescence étant amplifiée par les xanthophylles dé-époxydées. Dans le chapitre précédent, nous avons constaté que la corrélation linéaire entre NPQ et DT passait par l'origine alors que chez les plantes supérieures elle aboutit à une valeur positive de NPQ lorsque la concentration de zéaxanthine + anthéranthine est nulle mais cette observation n'était pas suffisante pour affirmer que chez les diatomées, il n'existait pas de NPQ induit par le  $\Delta pH$  et indépendant de la présence de DT. Nous avons donc tenté de perturber la relation entre DT et NPQ chez *P. tricornutum*. Ce chapitre est présenté sous la forme d'une publication publiée dans **FEBS Letters**, vol. 523, pp 163-166.

### **RESUME DES RESULTATS.**

#### ***L'action du $NH_4Cl$ : la diatoxanthine peut être présente sans NPQ.***

Dans un premier temps, la relation NPQ/DT a été perturbée en diminuant le  $\Delta pH$  formé par une illumination donnée, par l'action d'un découpleur le  $NH_4Cl$ . La Figure 1 montre que dans ce cas, le NPQ diminue plus rapidement que le DT dont une faible quantité persiste après l'abolition totale du NPQ. Nous avons également suivi la disparition de NPQ et l'époxydation de DT en DD à l'obscurité après la fin de l'éclairage intense (Figure 2). Le même phénomène se reproduit, une faible quantité de DT persiste après l'abolition du NPQ.

***L'action du DCCD et du DTT : l'accumulation de la diatoxanthine et le développement NPQ sont strictement corrélés.***

La tentative suivante a consisté à augmenter le  $\Delta pH$  formé pendant une illumination par l'action de faibles concentrations de DCCD qui inhibent l'ATP synthase et augmentent par voie de conséquence le  $\Delta pH$ . Pour que l'expérience soit claire nous avons choisi une illumination suffisamment faible pour qu'elle ne provoque ni NPQ ni DT en l'absence de DCCD. Puis, nous avons mesuré ces deux variables après différents temps d'incubation avec le DCCD (Tableau 1). Dans ce cas la proportionnalité entre NPQ et DT reste conservée. Enfin nous avons utilisé le DTT pour bloquer spécifiquement la dé-époxydase et nous avons observé l'effet de concentrations croissantes de DTT sur le NPQ et le DT pour les deux types de cellules : IL et CL. La Figure 3 montre deux choses :

1) le NPQ s'annule pour la valeur de DTT qui empêche toute dé-époxydation de DD en DT, 2) pour les deux types de cellules (et malgré la différence de taille du pool de DD), c'est la même concentration de DTT est nécessaire pour inhiber totalement la dé-époxydation.

***Comparé aux plantes supérieures, le développement du NPQ est régi différemment chez les diatomées.***

Donc, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une partie du NPQ qui ne dépendrait pas de la présence de DT et cela nous a conduit à proposer pour les diatomées l'hypothèse suivante. Pour produire un NPQ, la DT doit être liée aux LHCF. Cette liaison se fait après protonation des sites de fixation. Dans le cas de la Figure 1, la dé-époxydation de DT peut encore se produire pour des  $\Delta pH$  qui n'induisent pas de protonations donc la DT existe mais sa liaison aux LHCF est soit inexistante soit inefficace et le NPQ n'est pas formé. Dans le cas de la Figure 2 la déprotonation des sites est plus rapide que la dé-époxydation et on se retrouve dans une situation similaire. Donc un certain niveau de  $\Delta pH$  et une fixation correcte de DT sur des sites protonés sont nécessaires à la formation du NPQ.

Il n'est pas étonnant que ce type de différence existe entre les diatomées et les plantes supérieures. En effet le complexe antenne périphérique des diatomées est assez différent de celui des plantes supérieures et il en est de même pour l'arrangement des thylakoïdes et la répartition des deux photosystèmes. Il est possible qu'un autre type de macrocomplexe antennaire, formé de sous-unités assez semblables, différent de celui des plantes supérieures permette aux diatomées une bonne collecte et un transfert efficace de l'énergie absorbée vers

les centres en faible lumière tout en permettant de dissiper très rapidement et très efficacement l'énergie absorbée en excès pour éviter un endommagement des centres PS II (comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent).



**In diatoms, a transthylakoid proton gradient alone is not sufficient to induce a non-photochemical fluorescence quenching.**

*J. Lavaud, B. Rousseau, A.-L. Etienne*

Laboratoire 'Organismes Photosynthétiques et Environnement', UMR CNRS 8543, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm 75230 PARIS Cedex 05, France

**Abstract**

Non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) in diatoms is associated with a xanthophyll cycle involving diadinoxanthin (DD) and its de-epoxidized form, diatoxanthin (DT). In higher plants, an obligatory role of de-epoxidized xanthophylls in NPQ remains controversial and the presence of a transthylakoid proton gradient ( $\Delta pH$ ) alone may induce NPQ. We used inhibitors to alter the amplitude of  $\Delta pH$  and/or DD de-epoxidation, and coupled NPQ. No  $\Delta pH$  dependent quenching was detected in the absence of DT. In diatoms, both  $\Delta pH$  and DT are required for NPQ. The binding of DT to protonated antenna sites could be obligatory for energy dissipation.

*Key words:* diatom; diadinoxanthin; diatoxanthin; non-photochemical quenching; xanthophyll cycle; *Phaeodactylum tricornutum*

*Abbreviations:* Chl *a*, chlorophyll *a*; CL, continuous light regime (16 h light/8 h dark per day); DCCD, N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; DTT, dithiothreitol; IL, intermittent light regime (5 min light per hour); LHC, light-harvesting complex; NPQ, non-photochemical fluorescence quenching; PS I and II; photosystem I and II;  $\Delta pH$ , transthylakoid proton gradient.

## Introduction

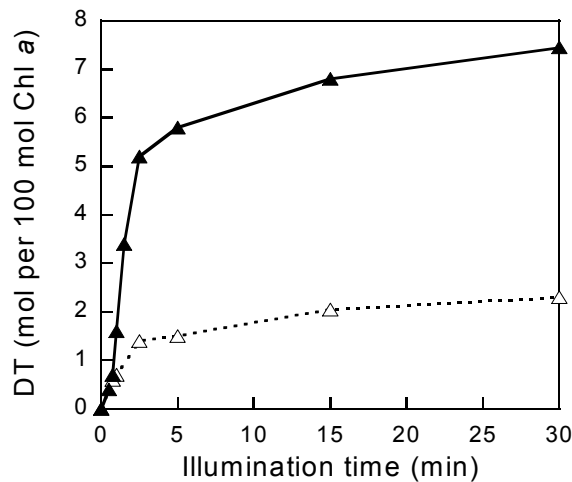
The dissipation of excess excitation energy and the related operation of a xanthophyll cycle are important for the photoprotection of photosystem (PS) II against light-induced damage. It is of particular relevance in diatoms which experience large fluctuations of light intensity in turbulent waters where they are the dominant species [1]. In diatoms, the photosynthetic apparatus organization differs in many respects from that of higher plants. The thylakoids are loosely appressed and organized in extended bands of three without grana stacking and PS I and II are not segregated [2]. The light-harvesting complexes (LHCs), which contain Chl *a*, Chl *c*, fucoxanthin and the xanthophyll cycle pigments [3], are equally distributed among appressed and non-appressed regions [2] and there is no evidence of any state-transitions [4]. The LHC subunits are made of several highly homologous proteins encoded by a multigene family (Fucoxanthin Chlorophyll Proteins, FCPs, [5]). Some of these subunits appear to be PS I specific, although their pigment content is similar to the other LHC subunits [6]. Some of the minor subunits (CP26 and CP 29) specific to PS II in higher plants have not been found in diatoms [7] and no PsbS-like protein has yet been identified. Only two species (instead of three in higher plants) diadinoxanthin (DD) and its de-epoxidized form diatoxanthin (DT) are involved in the xanthophyll cycle. The xanthophyll concentration relative to chlorophyll can be much larger in the LHCs of diatoms than in higher plant LHCs [8]. Upon exposure to high light intensity, DT and non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) are formed rapidly [9].

We have previously shown that the DD pool size could be doubled under intermittent light regime (IL) while the size and pigment composition of the PS II antenna were otherwise unchanged. The relative amount of DD of 9 mol/100 mol Chl *a* in cells grown under a 16/8 h light-dark cycle "CL cells", could be increased to 18 mol/100 mol Chl *a* in IL cells [10]. Upon exposure to high light intensity, the formation of a transthylakoid proton gradient ( $\Delta\text{pH}$ ) and de-epoxidation of DD to DT rapidly caused a NPQ that was fully reversible in the dark. In diatoms with the larger DD pool size, NPQ could reach values up to 12, well above those found in higher plants (at most 4). In cells with different DD pool size, the NPQ expressed by the Stern-Volmer equation was always proportional to the DT concentration [10]. Our previous results did not rule out the possibility of a DT-independent, as observed in higher plants, where a  $\Delta\text{pH}$  dependent quenching has been detected in the absence of de-epoxidized xanthophylls [7,11]. In this report, specific inhibitors were used to alter the amplitude of the  $\Delta\text{pH}$  and/or DD de-epoxidation reaction. Their effects on the relationship between NPQ and

DT were studied. No conditions could be found where part of NPQ was independent of DT formation and only dependent on  $\Delta\text{pH}$ . We propose that, in diatoms, both protonation of the antenna complexes and binding of DT to specific protonated sites are required for NPQ.

## Results and Discussion

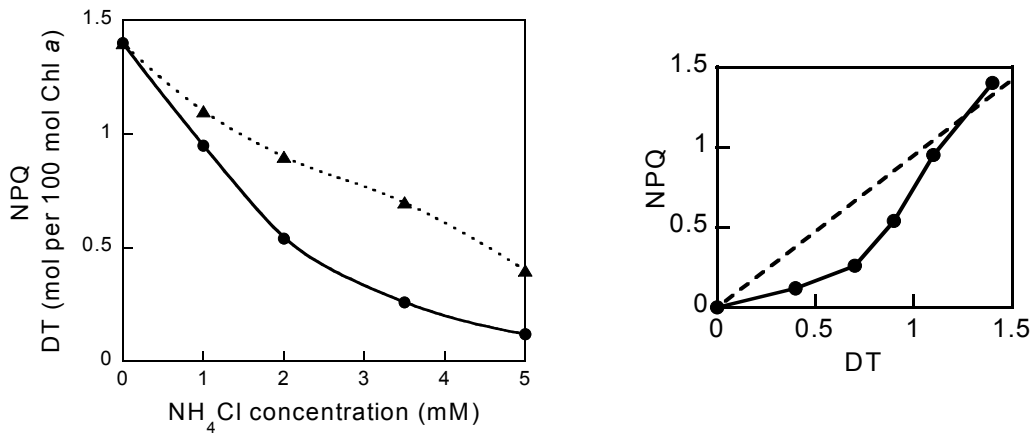
The  $\Delta\text{pH}$  value required for de-epoxidase activation was not reached under low light, and no de-epoxidation can occur during growth (at  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Thus, the cells did not contain any DT before the shift to high light. On exposure to high light ( $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ), the de-epoxidation of DD to DT occurred very rapidly in CL and IL cells with biphasic kinetics (Fig. 1). The fast phase was completed within a few minutes. The de-epoxidation is rather fast in diatoms in contrast to higher plants grown in the same light conditions, either CL or IL [16]. It could be due to the fact that the DD de-epoxidase is activated at lower  $\Delta\text{pH}$  than the violaxanthin de-epoxidase of higher plants [17] and/or that in diatoms, the thylakoids are loosely appressed [2]. In higher plants, de-epoxidation is faster in unstacked than in stacked membranes [16].



**Figure 1.** De-epoxidation kinetics in *P. tricornutum* cells with a low (CL cells, open triangles) or with a large (IL cells, solid triangles) DD pool size during an illumination of  $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

During the high light illumination, NPQ was always proportional to the concentration of DT (dotted line in inset to Fig. 2, [10]). However, this proportionality broke down when cells were dark-incubated with increasing concentrations of  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . This reagent is a well-known uncoupler that decreases the  $\Delta\text{pH}$  formed during illumination. The 5 min illumination at  $350 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  led to lower values of NPQ and DT for increasing concentrations of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  but the decrease in NPQ was larger than that of DT (Fig. 2). As a consequence the linear

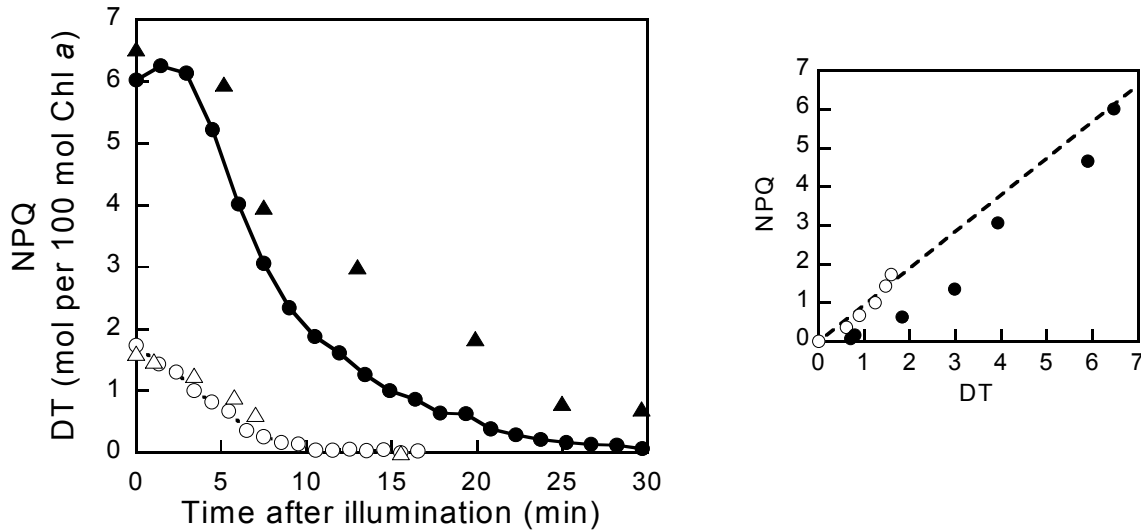
relationship between NPQ and DT was replaced by an S shaped one (solid circles, inset Fig. 2). Since NPQ can be fully suppressed this way while some DT accumulation persists, we must conclude that the  $\Delta pH$  affects not only the de-epoxidation of DD but also the effectiveness of DT in causing NPQ.



**Figure 2.** Effect of increasing concentrations of  $NH_4Cl$  on NPQ (circles) and DT concentration (triangles) in *P. tricornutum* CL cells (low DD pool size). Cells were incubated in the dark for 20 min with different concentrations of  $NH_4Cl$  prior to illumination (5 min at  $350 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ). Inset: corresponding correlation of NPQ and DT concentration. The dotted linear regression ( $NPQ = 0.95 DT$ ) illustrates the correlation between NPQ and DT concentration in the absence of  $NH_4Cl$  [10].

A divergence from a linear relationship between NPQ and DT was also observed during the dark decay of NPQ and epoxidation of DT after a high light illumination. It was best observed with IL cells where a 5 min illumination at  $450 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$  induced an NPQ of 6 much larger than the values attained in CL cells due to the smaller DD pool. NPQ was proportional to the DT concentration during illumination for both types of cells (see dotted line, inset to Fig. 3, [10]). During the dark period following the illumination, epoxidation of DT and relaxation of NPQ occurred (Fig. 3). NPQ decreased faster than the DT content and their relationship became sigmoidal, similar to that observed in the presence of  $NH_4Cl$  (Fig. 3, inset). In cells with a small DD pool, the deviation from linearity also existed but was less pronounced (Fig. 3, inset), possibly because of the faster epoxidation in CL cells. The epoxidation is faster in diatoms in contrast to higher plants grown in the same light conditions, either CL or IL [16]. Darkness following high light was the second situation where some DT remained while NPQ was fully suppressed. The reason might be similar to the situation observed in the presence of an uncoupler: DT cannot cause NPQ after  $\Delta pH$  dissipation. If for NPQ a  $\Delta pH$  is required in addition to the presence of DT, one possible explanation is that protonation of light-harvesting protein(s) is necessary for the binding of

DT. The pK of the protonation could be higher than the pK of DD de-epoxidase so that on illumination protonation precedes de-epoxidation and NPQ is strictly proportional to DT. Epoxidation of DT to DD is pH independent and was apparently slower than deprotonation of the light-harvesting protein(s) after illumination, so that some DT remained while NPQ was completely suppressed.



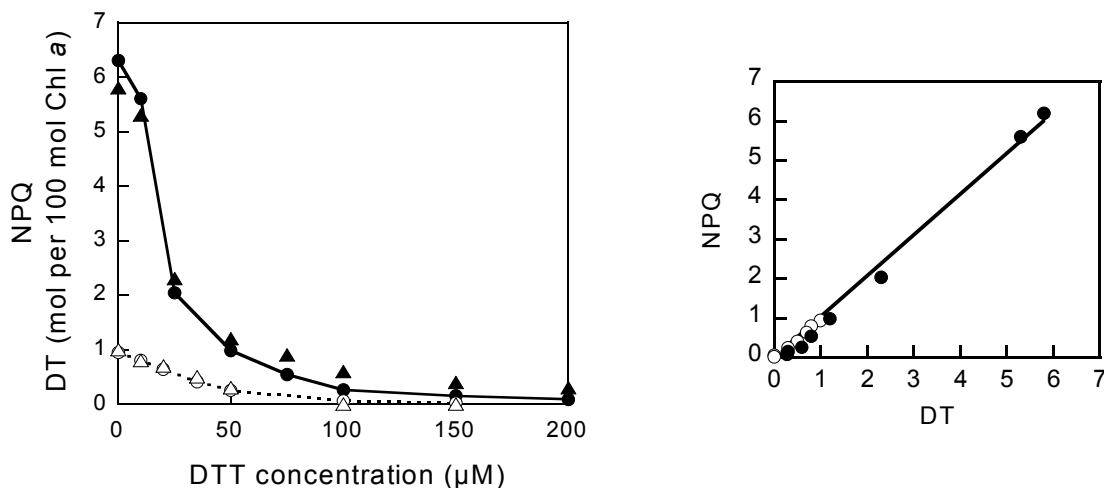
**Figure 3.** Decay of NPQ (circles) and epoxidation of DT (triangles) in darkness following an illumination of 5 min at  $450 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  for *P. tricornutum* cells with a low (open symbols) or with a large (solid symbols) DD pool. Inset: corresponding correlation of NPQ and DT concentration for cells with a low (open circles) or with a large (solid circles) DD pool. The dotted linear regression ( $\text{NPQ} = 0.95 \text{DT}$ ) illustrates the correlation of NPQ and DT concentration during illumination.

On the other hand, a strict proportionality between NPQ and DT was maintained under conditions designed to selectively increase the  $\Delta\text{pH}$  or decrease DT accumulation. At low concentrations, DCCD is an inhibitor of ATP synthase [18]. Its presence should therefore increase the  $\Delta\text{pH}$  formed during illumination. Cells were exposed to a 5 min illumination at  $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . The intensity used for this experiment was chosen low enough not to induce any NPQ or DT in the absence of added DCCD. When dark-adapted cells were pre-incubated with a low concentration of DCCD ( $10 \mu\text{M}$ ), the effects of DCCD on DT and NPQ were dependent on the incubation time. In the presence of DCCD (5 or 10 min incubation in the dark) both DT and NPQ could be detected at the end of the 5 min illumination at  $100 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  as shown in Table 1. The relationship between NPQ and DT remained linear as under higher illumination in the absence of DCCD.

**Table 1.** Effect of dark incubation of the cells with DCCD on NPQ and DT accumulation after a 5 min illumination at  $100 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

DCCD ( $\mu\text{M}$ )	Incubation time (min)	NPQ	DT (mol/100 mol Chl <i>a</i> )
0	0	0.06	0
10	5	1.73	1.7
10	10	1.83	2.3

DTT is a well-known inhibitor of de-epoxidase and has been used to detect zeaxanthin-independent fluorescence quenching in higher plants [11]. DTT acts on the de-epoxidase without affecting lumen acidification [19]. DTT also inhibits the DD de-epoxidase in diatoms [20]. NPQ coupled to DT was formed by a 5 min illumination at  $450 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  in cells with different DD pool sizes (CL and IL cells). Cells were pre-incubated with increasing concentrations of DTT (up to  $150 \mu\text{M}$ ) and the DT content and NPQ were determined at the end of the illumination. As shown in Fig. 4, both DT and NPQ were decreased by increasing DTT concentrations. NPQ remained proportional to DT and their relationship followed the same linear regression curve as in the absence of DTT. If DTT does not affect the  $\Delta\text{pH}$ , the results of Fig. 4 clearly demonstrate the obligatory presence of DT for NPQ to exist in diatoms.



**Figure 4.** Effect of increasing concentration of DTT on NPQ (circles) and DT (triangles) for *P. tricornutum* cells with a low (open symbols) or with a large (solid symbols) DD pool. Cells were incubated in the dark for 20 min with DTT prior to the illumination (5 min at  $350 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ). Inset : corresponding correlation of NPQ and DT concentration. The linear regression was  $\text{NPQ} = 0.93 \text{ DT}$  with  $R^2 = 0.98$  for the cells with a low DD (open circles) and  $\text{NPQ} = 1.04 \text{ DT}$  with  $R^2 = 0.99$  for cells with a large DT (solid circles).

This is different from higher plants where DTT inhibits the accumulation of de-epoxidized xanthophylls without totally suppressing NPQ [11]. An analogue situation was reported for *Chlamydomonas* and *Arabidopsis* mutants with defective xanthophyll cycling that continues to exhibit a small zeaxanthin-independent NPQ under high light [21,22]. DTT has been shown to have many other effects including the inhibition of  $\Delta\text{pH}$ . In the present experiment such effects cannot be completely ruled out, but the concentrations used are well below those required for the suppression of  $\Delta\text{pH}$  [23].

In conclusion, we propose that, in diatoms, upon acidification of the lumen, LHC subunits become protonated, de-epoxidase is rapidly activated and DT is formed. The binding of DT to the LHCs is influenced by protonation. Protonation alone is not sufficient to modify the dissipative function of the antenna complexes in contrast to higher plants [24]. It is the presence of DT bound to the protonated LHCs which induces NPQ. The exact role of DT remains to be elucidated. It is still unclear if it can play a direct role in energy dissipation processes; alternatively, its presence could cause association of other pigments leading to the formation of quenchers (carotenoid, carotenoid-Chl or Chl-carotenoid-Chl, Chl-Chl associations) [25,26].

The large concentrations of DT, the high of values reached by NPQ, the absence of photosystem segregation and of state-transitions have to be taken into account when comparing the LHCs of diatoms and higher plants. The DD de-epoxidase is activated by a low  $\Delta\text{pH}$  value and the xanthophyll cycle kinetics are faster than in higher plants [16,17]. A  $\Delta\text{pH}$  alone is not sufficient to induce NPQ. In diatoms, the molecular mechanisms involved in the  $\Delta\text{pH}$  dependent photoprotective dissipation of excess energy are partly distinct from those occurring in higher plants. Some properties of diatoms and especially the rapidity of the xanthophyll cycle kinetics are important for a rapid switch of the LHCs function from the dissipation of excess energy to the efficient transfer of energy to the reaction centers.

### **Acknowledgements**

J. L. thanks the Ministry of National Education, Research and Technology for his financial support. We thank Drs A. Pascal and J. Houmard for helpful discussions and critical reading of the manuscript.

## Materials and Methods

### Culture.

*Phaeodactylum tricornutum* Böhlén cells were grown photoautotrophically in sterile natural seawater F/2 medium [12]. Cultures of 300 mL were incubated at 18°C in airlifts continuously flushed with sterile air. They were illuminated at a light intensity of 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with white fluorescent tubes (Claude, Blanc Industrie, France). Two light regimes were used: a classical 16 h light/8 h dark photoperiod (CL cells) and an intermittent light regime of 5 min illumination per hour (IL cells). Cells were harvested during the exponential phase of growth, centrifuged at 3000 g for 10 min and resuspended in their culture medium to a final concentration of 10  $\mu\text{g Chl } a\cdot\text{mL}^{-1}$ . This concentrated suspension was slowly stirred at 18°C under low continuous light for CL cells and intermittent light for IL cells until use.

### Xanthophyll contents.

Pigment analyses were performed by HPLC as previously described [9]. Cells collected from the PAM-fluorometer (see below) were frozen in liquid nitrogen. Pigments were extracted with a methanol:acetone (70:30, v/v) solution. Published extinction coefficients were used for chlorophyll (Chl) [6] and for DD and DT [13].

### Chl fluorescence yield and non-photochemical fluorescence quenching (NPQ).

Standard modulated Chl fluorescence measurements were performed with a PAM-101 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) as described previously [10]. After a dark-adaptation of 20 min, cells were subjected to a saturating light pulse and then illuminated with an actinic light of adjustable intensity. The average fluorescence measured during the last 400 ms of the saturating pulse was taken as  $F_m$  or  $F_m'$ . Data were recorded with a microcomputer through a 12 bit analogue-digital interface and the system was driven by home-made software [14]. For each experiment, 2 mL of cell suspension was used. Sodium bicarbonate was added at a concentration of 4 mM from a freshly prepared 0.2 M stock water solution to prevent any limitation of the photosynthetic rate by carbon supply. When appropriate,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (ammonium chloride), DCCD (N, N'-dicyclohexyl-carbodiimide) or DTT (dithiothreitol), were added at the start of dark-incubation. Stock solutions of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Prolabo, 0.1 or 1 M in distilled water), DCCD (Sigma, 1 mM in absolute ethanol) and DTT (Sigma, 20 mM in distilled water) were freshly prepared.

Non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) was calculated as  $F_m/F_m'-1$  [15], where  $F_m'$  is the maximum PS II fluorescence in the light-adapted state and  $F_m$  that in the dark-adapted state. This Stern-Volmer expression of NPQ is proportional to the concentration of the quencher state [10,11].

## References

- |   |   |
|---|---|
| [1] Harris, G.P. (1986) <i>Phytoplankton Ecology: Structure, Function and Fluctuation</i> , Chapman & Hall, London, UK. | [7] Müller, P., Li, X.-P. and Niyogi, K.K. (2001) <i>Plant Physiol.</i> 125, 1558-66.                           |
| [2] Pyszniak, A.M. and Gibbs, S.P. (1992) <i>Protoplasma</i> 166, 208-17.   | [8] Wilhelm, C. (1990) <i>Plant Physiol. Biochem.</i> 28, 293-306.  |
| [3] Brown, J.S. (1988) <i>J. Phycol.</i> 24, 96-102.  | [9] Arsalane, W., Rousseau, B. and Duval, J.-C. (1994) <i>Photochem. Photobiol.</i> 60, 237-43.                 |
| [4] Owens, T.G. and Evarina, R.W. (1986) <i>Plant Physiol.</i> 80, 732-38.  | [10] Lavaud, J., Rousseau, B., van Gorkom, H.J. and Etienne, A.-L. (2002) <i>Plant Physiol.</i> 129, 1398-1406. |
| [5] Bhaya, D. and Grossman, A.R. (1993) <i>Nucleic Acids Res.</i> 21, 4458-66.  | [11] Gilmore, A.M. and Yamamoto, H.Y. (1991) <i>Plant Physiol.</i> 96, 635-43.                                  |
| [6] Berkaloff, C., Caron, L. and Rousseau, B. (1990) <i>Photosynth. Res.</i> 23, 181-193.                               |   |



- [12] Guillard, R.R.R. and Ryther, J.H. (1962) *Gran. Can. J. Microbiol.* 8, 229-38.
- [13] Johansen, J.E., Wa, S., Liaaen-Jensen, S. and Haxo, F.T. (1974) *Phytochem.* 13, 2261-71.
- [14] Arsalane, W., Paresys, G., Duval, J.-C., Wilhelm, C., Conrad, R. and Büchel, C. (1993) *Eur. J. Phycol.* 28, 247-52.
- [15] Krause, G.H. and Weis, E. (1991) *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 42, 313-349.
- [16] Färber, A. and Jahns, P. (1998) *Biochem. Biophys. Acta* 1363, 47-58.
- [17] Jakob, T., Goss, R. and Wilhelm, C. (2001) *J. Plant Physiol.* 158, 383-90.
- [18] McCarty, R.E. and Racker, E. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3435-3439.
- [19] Sokolove, P.M. and Marsho, T.V. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* 430, 321-326.
- [20] Olaizola, M., Laroche, J., Kolber, Z. and Falkowski, P.G. (1994) *Photosynth. Res.* 41, 357-70.
- [21] Niyogi, K.K., Björkman, O. and Grossman, A.R. (1997) *Plant Cell* 9, 1369-1380.
- [22] Niyogi, K.K., Grossman, A.R. and Björkman, O. (1998) *Plant Cell* 10, 1121-1134.
- [23] Pfündel, E.E. and Bilger, W. (1994) *Photosynth. Res.* 42, 89-109.
- [24] Horton, P., Ruban, A.V. and Walters, R.G. (1996) *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 655-84.
- [25] Frank, H.A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D. and Wasielewski, M.R. (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1277, 243-252.
- [26] Frank, H.A., Bautista, J.A., Josue, J.S. and Young, A.J. (2000) *Biochemistry* 39, 2831-2837.

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE III

## 1<sup>ère</sup> PARTIE

*4- Généralisation des résultats concernant  
le cycle des xanthophylles et le NPQ  
à plusieurs diatomées planctoniques*

---

## GENERALISATION DES RESULTATS CONCERNANT LE CYCLE DES XANTHOPHYLLES ET LE NPQ A PLUSIEURS DIATOMEES PLANCTONIQUES

*Phaeodactylum tricornutum*, parce qu'elle est facile à cultiver et parce qu'elle développe de larges valeurs de NPQ sous forte illumination constitue un organisme "modèle" qui nous a permis d'acquérir des données inédites sur la photoprotection chez les diatomées. Il était important de comparer les propriétés de *P. tricornutum* avec celles d'autres diatomées planctoniques afin de valider ce modèle. C'est cette comparaison entre plusieurs diatomées planctoniques qui est présentée dans ce chapitre sous forme d'une publication soumise à **Journal of Phycology**.

### RESUME DES RESULTATS.

#### *Les caractéristiques photosynthétiques des cinq espèces comparées.*

Nous avons utilisé cinq espèces pour cette comparaison : *P. tricornutum*, *Skeletonema costatum*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Thalassiosira weissflogii* et *Ditylum brightwellii*. Elles ont des capacités photosynthétiques potentielles équivalentes, les concentrations de Chl *a* par cellule varient d'une espèce à l'autre avec une valeur très éloignée de la moyenne pour une espèce où les cellules sont remarquablement grandes (*D. brightwellii*). Elles sont toutes dotées des mêmes pigments : Chl *a* et *c*, fucoxanthine,  $\beta$ -carotène, DD, DT dont les proportions varient avec des propriétés communes à toutes les espèces : il y a beaucoup plus de fucoxanthine que de Chl *c* par rapport à la Chl *a* et le taux de fucoxanthine est relativement élevé (Tableau 1).

#### *L'accumulation de la diatoxanthine et le développement du NPQ.*

Le cycle des xanthophylles existe dans toutes les espèces (Fig. 1 et 2). Une partie de la DT n'est pas dé-époxydable et la phase rapide de dé-époxydation peut être assimilée à une exponentielle (Tableau 2). Chez toutes les espèces sauf une, une synthèse *de novo* de DT intervient en cas d'illumination prolongée (Figure 1, Tableau 2). Le taux de dé-époxydation et

la vitesse de synthèse *de novo* de DT sont fonctions de l'intensité lumineuse (Tableau 3). La formation de DT au cours de la forte illumination est accompagnée de l'apparition du NPQ (Fig. 3). La corrélation linéaire entre NPQ et la concentration de DT est vérifiée lors d'une forte illumination, avec une déviation de la linéarité pour une espèce (*T. weissflogii*) quand la concentration de DT dépasse une certaine valeur (Fig. 4). Pour *S. costatum*, la pente de la corrélation linéaire entre NPQ et DT est inférieure à celle des autres espèces, par ailleurs toutes similaires.

***Comparaison des capacités de photoprotection entre deux espèces présentant des NPQ différents.***

Nous avons ensuite comparé la capacité de photoprotection chez *P. tricornutum* où le NPQ peut atteindre des valeurs importantes (jusqu'à 5) alors que chez *S. costatum*, il ne dépasse pas 1,5 (Fig. 5). La photoprotection est meilleure chez *P. tricornutum* où la perte de l'activité PS II est moindre : 30 % contre 50 % chez *S. costatum* (on a vu dans le Chapitre I, § II- 3. 4. 2. a. que l'espèce *S. costatum* est représentée par de nombreux clones dont les capacités de photoprotection sont variables ; les résultats obtenus ici ne sont donc pas nécessairement représentatifs de l'espèce). De plus, alors que chez *P. tricornutum*, la perte d'activité PS II est totalement réversible après 90 min de récupération sous une faible lumière, cette réversibilité est quasiment inexistante chez *S. costatum*. Ceci suggère un endommagement irréversible (dont le temps de récupération est supérieur à 90 min) des centres réactionnels PS II chez cette espèce et une simple inactivation réversible de l'activité PS II chez *P. tricornutum*. Cet endommagement reste à vérifier par une mesure de l'évolution des quantités de la protéine D1 lors de l'illumination et après celle-ci chez les deux espèces.

## **Relationship between diadinoxanthin cycle and non-photochemical fluorescence quenching in planktonic marine diatoms (Bacillariophyceae)**

*Johann Lavaud, Bernard Rousseau and Anne-Lise Etienne*

Laboratoire 'Organismes Photosynthétiques et Environnement', UMR CNRS 8543, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm 75230 PARIS Cedex 05, France

### **Abstract**

Diadinoxanthin (DD) de-epoxidation to diatoxanthin (DT) and the development of non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) were measured after a shift to high light for five species of planktonic marine diatoms (Bacillariophyceae): *Phaeodactylum tricorutum* Böhlin, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, *Cylindrotheca fusiformis* Reimann et Lewin, *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hasle and *Ditylum brightwellii* (West) Grunow. De-epoxidation was rapid and a direct linear relationship was observed between NPQ and DT concentration for all of the species. We also compared photoinhibition for two species with similar pools of DD but different NPQ and showed that the dissipation of excess energy was efficient in photoprotection of PS II reaction centers. The presence of two DD pools with different functionality and a *de novo* synthesis of DT under prolonged high light exposure was confirmed. The specific features of the photoprotection process in diatoms could explain, in part, why they dominate in turbulent waters.

*Key Index Words:* diadinoxanthin-cycle; planktonic diatoms; diatoxanthin; non-photochemical fluorescence quenching; photoprotection

*Abbreviations:* Chl *a*, chlorophyll *a*; DD, diadinoxanthin; DT, diatoxanthin; NPQ, non-photochemical fluorescence quenching; PS II, Photosystem II

## **Introduction**

Diatoms (Bacillariophyceae) play a key role in the marine carbon balance (Field et al. 1998). They account for 40 % of the primary carbon production in the oceans corresponding to *ca* 25 % of the net primary production on the Earth (Tréguer et al. 1995, Field et al. 1998). They flourish in turbulent waters (Harris 1986, Fogg 1991), where the available amount of light is highly variable. Continuous deep vertical mixing exposes them to very large short-term changes in light intensity (Lewis et al. 1984, MacIntyre et al. 2000). Cells acclimated to low light such as those found deep in the euphotic zone can rapidly be transported to the surface where they experience much higher light intensities (Neale 1987, Fogg 1991, Long et al. 1994). Under these conditions, a decline in the photosynthetic quantum efficiency frequently occurs (Neale 1987, Long et al. 1994). This so-called photoinhibition has been studied in diatoms over many years (see Belay and Fogg 1978 and citations therein). This phenomenon is of great significance because, under natural conditions, it can decrease the carbon fixation of the full water column by up to 25 % (Falkowski and Raven 1997).

Phytoplankton species have developed strategies to optimize light harvesting at low intensities while minimizing photodamage due to periodic high intensities. On long time scales (hours), they regulate the quantity and composition of their light-harvesting complexes and of a number of other components of their photosynthetic machinery (reviewed by Falkowski and Laroche 1991, MacIntyre et al. 2000). On shorter time scales (seconds-minutes), 'safety valves' ensure their response to sudden increases in light intensity, including a process of photoprotective non-radiative dissipation of the light energy in excess (Niyogi 2000). This process is referred to as non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) and measured by chlorophyll (Chl) fluorescence emission under high light. In diatoms, NPQ is rapidly formed (Ting and Owens 1993, Arsalane et al. 1994, Olaizola et al. 1994, Olaizola and Yamamoto 1994).

NPQ is induced in response to the formation of a proton gradient across the thylakoid membrane. This  $\Delta$ pH regulates the xanthophyll cycle (DD-cycle), which converts the mono-epoxide carotenoid DD into the de-epoxide form, diatoxanthin (DT), under high light, and DT into DD under low light or darkness (Demers et al. 1991, Arsalane et al. 1994, Olaizola et al. 1994, Olaizola and Yamamoto 1994). The de-epoxidase was shown to be activated by high pH-values, resulting from a rather weak proton gradient (Jakob et al. 2001).

The DD-cycle is involved in the development of NPQ and protection against photodamage triggered by high visible light (Arsalane et al. 1994) and UV radiations (Goss et al. 1999, Zudaire and Roy 2001). The photoprotection efficiency depends on the pool size of

DD (Lavaud et al. 2002). *In situ* measurements of the DD-cycle have been seldom performed (because of the technical difficulties). DD-cycling was observed during a temperate diatom bloom in early Summer (Klein and Sournia 1987) and a subarctic bloom in Spring (Olaizola et al. 1992). It is dependent upon local light intensity and thus varies with seasons, during the course of the day, with depth and water turbidity (Olaizola et al. 1992, Brunet et al. 1993).

The regulation of the xanthophyll cycle and the exact molecular mechanisms involved in NPQ are still mainly unclear for diatoms while they are better known for higher plants and green algae (for comprehensive recent reviews see Eskling et al. 1997, Müller et al. 2001). In diatoms, thylakoids differ in many respects from those of higher plants. They are loosely appressed and organized in extended bands of three (Pyszniak and Gibbs 1992). The photosystems are equally distributed among appressed and non appressed regions (Pyszniak and Gibbs 1992) and there is no evidence of any state-transitions (Owens 1986). The light-harvesting complex subunits are known to be formed of highly homologous proteins, encoded by a multigene family (FCPs, Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins, Bhaya and Grossman 1993). They contain Chl *a*, Chl *c*, fucoxanthin and the xanthophyll cycle pigments diadinoxanthin (DD) and diatoxanthin (DT) (Brown 1988). Their macromolecular organization remains to be elucidated.

Our goal was to bring new insights on general and specific features of the xanthophyll cycle and associated photoprotective mechanisms in diatoms. Five species of planktonic marine diatoms of ecological relevance were studied: *Phaeodactylum tricorutum* Bohlin, *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve, *Cylindrotheca fusiformis* Reimann et Lewin, *Thalassiosira weissflogii* (Grunow) Fryxell et Hasle and *Ditylum brightwellii* (West) Grunow. For all of the species, the relationship between DT accumulation and NPQ development under high light was examined. Differences observed for *T. weissflogii* and *S. costatum* are discussed.

## **Results**

### *Characteristics of the five species of diatoms.*

The pigment content and quantum yield of PSII photochemistry ( $F_v/F_m$ ) of the five species of planktonic marine diatoms examined (*P. tricorutum*, *S. costatum*, *C. fusiformis*, *T. weissflogii* and *D. brightwellii*) are shown in Table 1. Whereas the ratio  $F_v/F_m$  was similar for all of the species, the Chl *a* per cell (which depends on the size of the cell) and relative contents of other pigments vary. Under the growth conditions used ( $40 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 16 h light / 8 h dark), no DT was present when the cells were harvested during the light period.

**Table 1. Characteristics of the five planktonic marine diatoms examined.**

Species	$F_v/F_m^a$ ( $\pm 0.03$ )	Chl <i>a</i> .cell <sup>-1</sup> (pg)	Fucoxanthin	Chl <i>c</i>	DD	DT	$\beta$ -carotene
				(mol.100 mol Chl <i>a</i> <sup>-1</sup> )			
<i>P. tricornutum</i>	0.77	0.38 $\pm$ 0.05	68.0	13.5	10.4	0	7.6
<i>S. costatum</i>	0.77	0.86 $\pm$ 0.11	72.6	14.9	11.0	0	6.9
<i>C. fusiformis</i>	0.79	1.16 $\pm$ 0.15	69.5	16.6	7.1	0	5.3
<i>T. weissflogii</i>	0.79	2.08 $\pm$ 0.19	54.7	10.7	10.0	0	7.2
<i>D. brightwellii</i>	0.82	24 $\pm$ 2.8	80.0	22.4	7.8	0	7.2

(<sup>a</sup>)  $F_v/F_m$  ( $F_v=F_m-F_o$ ) is the quantum yield of PS II. Values are means of three measurements.

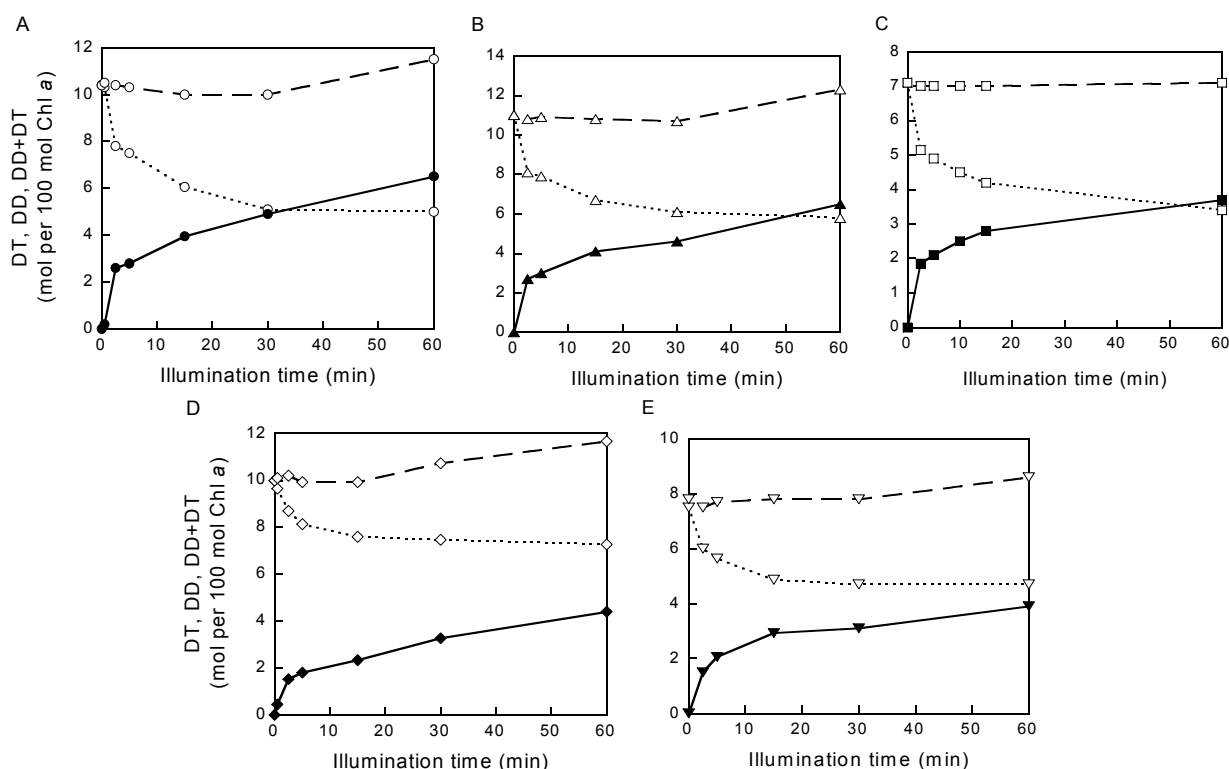
#### *DD de-epoxidation.*

Changes in xanthophyll content were monitored in the six species as a function of illumination duration up to 1 h at a light intensity of 2000  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (full sunlight, Long et al. 1994) (Fig. 1). Under these conditions, the amounts of Chl *a*, Chl *c*, fucoxanthin and  $\beta$ -carotene remained constant (not shown). A rapid de-epoxidation of DD into DT occurred in all species after the shift from dark to light. The amount of DD which underwent de-epoxidation was limited and a minimum level of DD was reached (Fig. 1). The decrease of DD could be fitted with an exponential decay according to equation 1:

$$DD_t = (DD_{\text{initial}} - DD_{\text{min}}) \times e^{-kt} \quad \text{Eq. 1}$$

where  $DD_{\text{initial}}$  is the initial amount,  $DD_{\text{min}}$ , the remaining amount after 1 h illumination (asymptotic level) and  $k$  the rate constant of de-epoxidation. The results of the curve fitting are shown in Table 2. Percentage of convertible DD and  $k$  were species and light-dependent (Table 2 and 3, respectively). In all species except *C. fusiformis*, the DD+DT content increased during the illumination period (Fig. 1), as a result of a slow DT synthesis not involving DD de-epoxidation. The rate of this *de novo* synthesis, estimated from the slope of the curve DD+DT, varied by a factor of two for the four species concerned (Table 2) and was dependent on light intensity (Table 3).





**Figure 1.** DD (open symbols, dotted line), DT (solid symbols) and DD+DT (open symbols, dashed line) as a function illumination duration at  $2000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ : (A) *P. tricornutum* (circles), (B) *S. costatum* (triangles), (C) *C. fusiformis* (squares), (D) *T. weisflogii* (diamonds), (E) *D. brightwellii* (inverted triangles).

**Table 2.** Characteristics of the DD de-epoxidation measured at  $2000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

Species	$k^a$ ( $\text{min}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Convertible DD (%)	Rate of <i>de novo</i> DT synthesis ( $\text{mmol.mol Chl a}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
<i>P. tricornutum</i>	2.8	49	0.50
<i>S. costatum</i>	2.0	46	0.53
<i>C. fusiformis</i>	1.3	52	0.00
<i>T. weisflogii</i>	1.3	27	0.39
<i>D. brightwellii</i>	1.3	40	0.27

(<sup>a</sup>)  $k$  is the rate constant of DD de-epoxidation (see Eq.1)

**Table 3.** Effect of light intensity on the rate of DT synthesis in *P. tricornutum* cells.

Light intensity ( $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	$k^a$ ( $\text{min}^{-1}$ )	Convertible DD (%)	Rate of <i>de novo</i> DT synthesis ( $\text{mmol.mol Chl a}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
450 <sup>b</sup>	1.4	32	0.27
2000	2.8	51	0.50

(<sup>a</sup>)  $k$  is the rate constant of DD de-epoxidation (see Eq.1). (<sup>b</sup>)  $450 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  is just saturating for the oxygen emission (as measured with a Clark electrode) while  $2000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  corresponds to full sunlight.

Fig. 2 shows that for a fixed period of 5 min illumination, DT concentration increased with light intensities whichever the species. The amount of DT formed at a given light intensity depends on the competition between forward and backward reaction of the xanthophyll cycle. Under high light, the equilibrium is shifted towards DT while at low light, no DT could be detected.

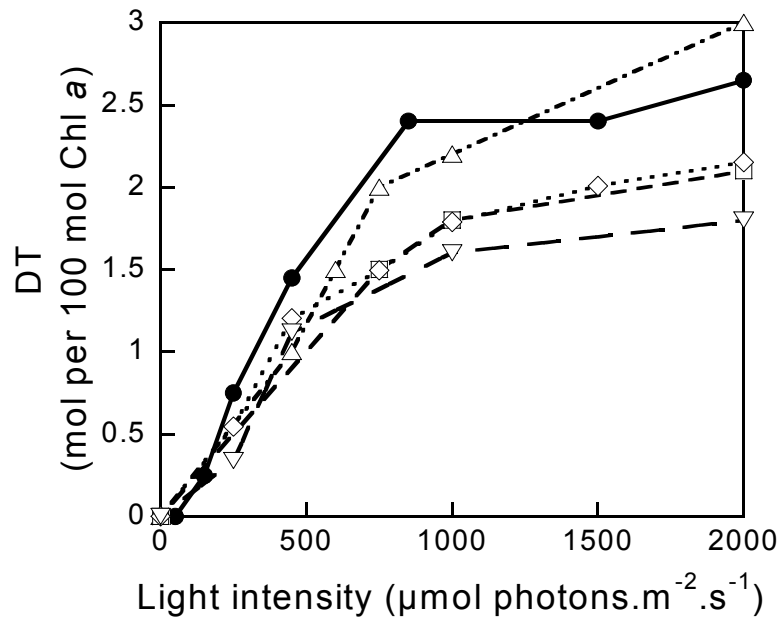


Figure 2. DT accumulation as a function of light intensity for a fixed illumination duration of 5 min in *P. tricornutum* (circles), *S. costatum* (triangles), *C. fusiformis* (squares) and *T. weissflogii* (diamonds) and *D. brightwellii* (inverted triangles).

#### Correlation between DT accumulation and NPQ.

The development of NPQ as a function of light intensity and duration (Fig. 3A and 3B, respectively) was monitored for the different species. The built up NPQ was quite similar in all species except for *S. costatum*, for which the extent of NPQ was less. A direct linear relationship was observed between NPQ and DT concentration (Fig. 4). The regression coefficient was close to one for all of the species except for *S. costatum*, for which it was lower (0.31). For *T. weissflogii*, the linearity was no longer observed above a DT concentration of 3 mol/100mol Chl *a*.

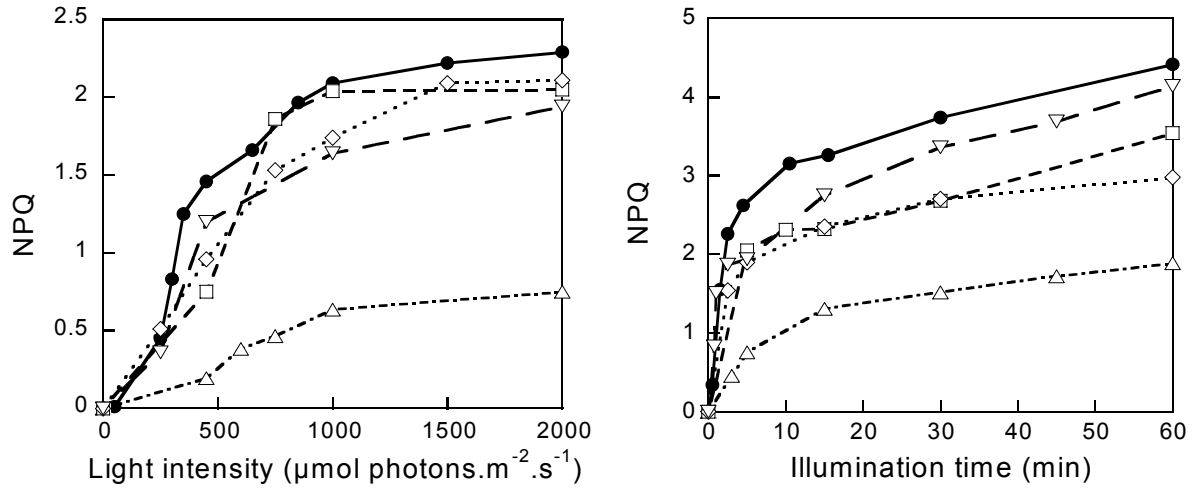


Figure 3. Non-photochemical quenching as a function of light intensity for fixed illumination duration of 5 min (A) and as a function of illumination duration at  $2000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (B). *P. tricornutum* (circles), *S. costatum* (triangles), *C. fusiformis* (squares), *T. weisflogii* (diamonds), *D. brightwellii* (inverted triangles).

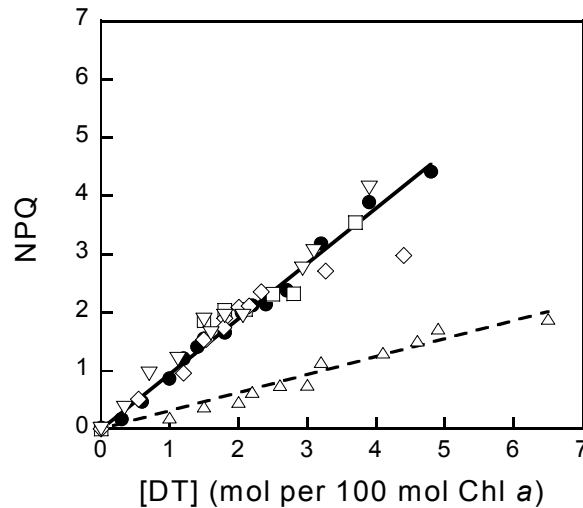
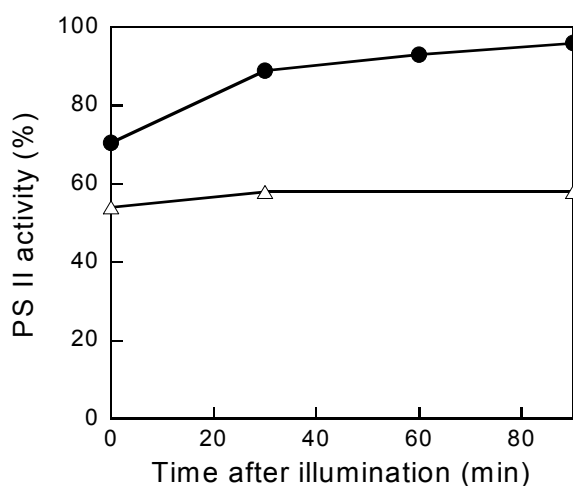


Figure 4. Correlation of NPQ and DT concentration for *P. tricornutum* (circles), *S. costatum* (triangles), *C. fusiformis* (squares), *T. weisflogii* (diamonds) and *D. brightwellii* (inverted triangles). Data are from experiments of Fig. 1, 2 and 4. Linear regressions:  $\text{NPQ}(Pt) = 0.95 [\text{DT}]$ ,  $\text{NPQ}(Sc) = 0.31 [\text{DT}]$ ,  $\text{NPQ}(Cf) = 0.96 [\text{DT}]$ ,  $\text{NPQ}(Tw) = 0.94 [\text{DT}]$ ,  $\text{NPQ}(Db) = 1.01 [\text{DT}]$ , with  $0.95 < R^2 < 0.99$ .

#### Comparison of the photoprotection capacity for *P. tricornutum* and *S. costatum*.

In order to assess if the lower NPQ developed in *S. costatum* accounted for a lower photoprotective energy dissipation, PS II photoinhibition during a high light illumination and subsequent recovery at low light were compared with those observed with *P. tricornutum* (for which more information is available, Arsalane et al. 1994, Lavaud et al. 2002). Cells were submitted to  $2000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  for 15 min and the remaining PS II activity measured.

Thereafter, cells were transferred to the growth light intensity ( $40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) and the recovery of PS II activity recorded for 90 min following the high light illumination (Fig. 5). Both the remaining PS II activity after the light treatment, and the recovery of this activity at low light were lower in *S. costatum*. Indeed, while the recovery was almost complete after 90 min for *P. tricornutum*, there was nearly none for *S. costatum*. For the latter, recovery from photoinhibition requires neosynthesis of PS II reaction center proteins and longer times are then needed.



**Figure 5.** PS II activity after a 15 min  $2000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  illumination and its recovery in low light ( $40 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) in *P. tricornutum* (circles) and *S. costatum* (triangles). The corresponding NPQ values at the offset of light were 3.3 and 1.3 respectively. PS II activity was measured by steady-state  $\text{O}_2$  yield per flash on a rate electrode. It was normalized to the activity (100 %) measured in cells adapted to low light.

## Discussion

### *Presence of two pools of DD.*

For most of the species examined, the amount of DD which undergoes de-epoxidation after a shift from dark to light is limited. The pool involved in the xanthophyll cycle represents about 50 % of the total DD pool. The presence of two distinct pools of DD, engaged in different functions, is in agreement with previous measurements performed with *P. tricornutum* (Arsalane et al. 1994, Olaizola et al. 1994, Lohr and Wilhelm 2001), *Chaetoceros muelleri* (Olaizola and Yamamoto 1994) and *Nitzschia palea* (Willemoës and Monas 1991). Kinetic studies of radio-labeled xanthophylls also suggested the presence of two DD pools for *T. weissflogii* (Goericke and Welshmeyer 1992). Different localizations have been proposed for the two pools. The non-convertible DD would be a constitutive part of the light-harvesting complexes (Lohr and Wilhelm 2001), inaccessible to the de-epoxidase, as it

is the case for violaxanthin in higher plants (Ruban et al. 2001). The convertible population of xanthophyll has to be accessible to the de-epoxidase bound to the lipid matrix (Eskling et al. 1997), so it may be located at the periphery of the pigment-protein complexes (Gilmore 1997, Ruban et al. 2001) and be partly imbedded in the boundary lipid of the light-harvesting complexes.

#### *The DD de-epoxidation characteristics.*

In all diatoms examined, a shift to high light leads to a rapid stoichiometric conversion of DD into DT, as previously reported for *P. tricornutum*, *C. muelleri* and *Thalassiosira pseudonana* (Demers et al. 1991, Olaizola et al. 1994, Olaizola and Yamamoto 1994, Arsalane et al. 1994, Casper-Lindley and Bjorkman 1998). Jakob et al. 2001 reported that even a rather weak proton gradient can lead to activation of the DD de-epoxidase. DD de-epoxidation thus starts rapidly and well below the saturating light intensity. The rate of de-epoxidation is dependent on species and light intensity. The higher the intensity, the faster the de-epoxidation rate is because lumen acidification is faster under high light.

#### *Possibility of two pathways for DT synthesis.*

For *P. tricornutum*, *S. costatum*, *T. weissflogii* and *D. brightwellii*, prolonged exposure beyond the first 15-30 min led to further DT synthesis without appreciable de-epoxidation. Under the light intensity used in this study, the rate of synthesis varies by a factor of two between the four species and is null for *C. fusiformis*. Such DT synthesis has already been reported for *P. tricornutum* (Olaizola et al. 1994) and *C. muelleri* (Olaizola and Yamamoto 1994). It was postulated that this *de novo* synthesis corresponds to a direct transformation of violaxanthin into DT without DD intermediate (Goericke and Welshmeyer 1992, Lohr and Wilhelm 2001), and confirmed by the insensitivity of this DT synthesis to dithiothreitol, an inhibitor of DD de-epoxidation (Olaizola et al. 1994). This pathway would be triggered when maximal DD de-epoxidation is reached. Indeed, for *T. weissflogii*, the lower size of the DD pool susceptible to de-epoxidation is partially compensated by a *de novo* DT synthesis already occurring after only 15 min of light. The rate of DT *de novo* synthesis is increased with light intensity and the *de novo* synthesized DT participates in NPQ in the same way as that coming from the DD-cycle suggesting that this additional DT accumulation accounts for the supplementary photoprotective dissipation of excess energy that is necessary under sustained high light conditions.

*Correlation between the light induced DT and NPQ.*

As DT accumulation occurred, a concomitant formation of NPQ is observed. The extent of NPQ has been correlated with the capacity for the dissipation of excess energy and proposed to account for the efficiency of protection of PS II against photodamage in diatoms (Arsalane et al. 1994, Lavaud et al. 2002). The linear correlation between NPQ and DT concentration is very similar for all but one of the species studied, with a slope of 1. A crucial feature is that linear regressions all start from zero whatever the species. This is in agreement with results obtained by Arsalane et al. 1994 but different from those of Olaizola and co-workers (Olaizola et al. 1994, Olaizola and Yamamoto 1994) who reported that some NPQ develops without any DT accumulation. We believe that this discrepancy is due to the presence of constitutive DT, a consequence of culture conditions (continuous light of relatively high intensity). The presence of such a constitutive DT pool has indeed been reported for high light acclimated diatoms (Willemoës and Monas 1991).

The control of NPQ by the xanthophyll cycling is very variable between organisms (Casper-Lindley and Bjorkman 1998), being important in diatoms but also in *Arabidopsis thaliana* compared to the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Niyogi et al. 1998). In diatoms, the difference with green plants is the rapid de-epoxidation (Jakob et al. 2001). Such a process can confer a high photoprotection during the first minutes of a shift to high light which diatoms have to frequently cope with.

*Particularities of T. weissflogii and S. costatum.*

Two species differ from the others in the correlation between DT accumulation and NPQ. For *T. weissflogii*, part of the additional DT synthesis that originates from the *de novo* pathway does not lead to a subsequent increase in NPQ. The *de novo* synthesized DT might remain 'free' in the lipid matrix instead of being bound to the light-harvesting complex. Such a localization has also been proposed in higher plants for the *de novo* synthesized zeaxanthin (Eskling et al. 1997 and citations within). This would be consistent with a role for de-epoxidized xanthophylls in the protection against lipid peroxidation and penetration of radical oxygen species in the lumen upon high light illumination, resulting from modification of the membrane fluidity (Müller et al. 2001). *T. weissflogii* also show a lower convertible DD pool than the other diatoms. Part of the convertible DD pool is also involved in fucoxanthin synthesis (Lohr and Wilhelm 2001). Since *T. weissflogii* has a lower fucoxanthin content under the growth conditions used, the regulation of DD and fucoxanthin synthesis might differ from other species.

For *S. costatum*, the regression coefficient between DT and NPQ is smaller than that of the other diatoms. This difference implies that *S. costatum* has a lower capacity for excess energy dissipation. As expected, PS II reaction center photoinhibition is more pronounced in *S. costatum* than in *P. tricornutum* after high light illumination. The fast recovery of PS II activity from high light illumination seen with *P. tricornutum* (which indicates that no photodamage has occurred) is absent in *S. costatum*. In green algae, the photoinactivation of PS II precedes its photodamage (Kirilovsky et al. 1990) and the DT analog, zeaxanthin was recently shown to be involved in the photoprotection of the partially damaged PS II core complexes (due to high light exposure) from potentially irreversible photodamage (Jin et al. 2001). For *S. costatum*, irreversible damage of the PS II core complexes could not be avoided because of a lower photoprotection capacity, and thus repair process is longer because it required protein neosynthesis (Aro et al. 1993). It is noteworthy that the polypeptide composition of *S. costatum* light-harvesting complex is very different from that of *P. tricornutum* which could explain differences observed in photoprotective capacity (Caron et al. 1988). Sakshaug et al. 1987 also reported differences in the extent of the photoprotective mechanism in clones of *S. costatum* isolated from different ecosystems.

In aquatic environments, phytoplankton needs to cope with highly fluctuating light both in terms of intensity and duration. The better its adaptability, the higher the probability for an organism to survive and even dominate in turbulent environments (Fogg 1991). Diatoms survive under wide variations in light intensity (Richardson, 1983) and are the least affected by fluctuating light when compared to other phytoplanktonic groups (Litchman, 2000 and citations within). They are capable of long-term survival under darkness (Griffiths, 1973, Fogg 1991) and acclimate to both short (Arsalane et al. 1994, Olaizola and Yamamoto 1994; Lavaud et al. 2002) and long (Willemoës and Monas 1991, Casper-Lindley and Bjorkman 1998, Mouget et al. 1999; Anning et al. 2000, Zudaire and Roy 2001) periods of high visible or UV light. In the present report, we clearly showed that planktonic marine diatoms are photoprotected under high light intensities. The regulation of the light-harvesting exhibits specific features in spite of inter-species variability: (1) a precise regulation of the xanthophyll cycle as a function of light intensity both in the rate of de-epoxidation and in the size of the convertible DD pool; (2) a very fast DD de-epoxidation (within seconds) which immediately drives photoprotective energy dissipation which is very important during the first minutes of a shift in irradiance; (3) a DT *de novo* synthesis which accounts for supplementary photoprotection under sustained high light exposure. It seems likely that these general

properties of planktonic diatoms play an important role in their successful adaptation to the strongly fluctuating light intensities in their natural habitat (Harris 1986, Fogg 1991). In this regard, it is worth citing a comparative study of two diatom species adapted to ecosystems which differ by their vertical mixing rate (Sakshaug et al. 1987). The photoadaptive strategy of the coastal water species (*Thalassiosira pseudonana*) was more flexible than that of the open ocean species (*T. oceanica*), the former having an increased DD pool, higher capacity for DD de-epoxidation and higher NPQ under similar high light exposure.

### **Acknowledgements**

We thank A. Pascal, J. Houmard and P. Lopez for critical reading and improvement of the manuscript. J. L. thanks the French Ministry of National Education, Research and Technology for its financial support.

### **Materials and Methods**

#### *Cultures.*

*Phaeodactylum tricornutum* Böhlin (Laboratoire Arago algal collection, Banyuls-sur-Mer, France), *Skeletonema costatum* UTEX-LB2308 (Greville) Cleve (University of Texas Collection (UTEX), Austin), *Cylindrotheca fusiformis* CCMP343 Reimann et Lewin (Provasoli-Guillard National Center for Culture of marine Phytoplankton (CCMP), West Boothbay Harbor, Maine), *Thalassiosira weissflogii* CCMP1051 (Grunow) Fryxell et Hasle, *Ditylum brightwellii* CCMP359 (West) Grunow cells were grown photoautotrophically in sterile natural seawater F/2 medium (Guillard and Ryther 1962). Cultures of 300 mL were incubated at 18°C in airlifts continuously flushed with sterile air. They were illuminated at a light intensity of 40  $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  with white fluorescent tubes (Claude, Blanc Industrie, France) with a 16 h light/8 h dark photoperiod. Cells were harvested during the exponential phase of growth, centrifuged at 3000 g for 10 min and resuspended in their culture medium to a final concentration of 10  $\mu\text{g Chl } a.\text{mL}^{-1}$ . The concentrated suspension was then continuously stirred at 18°C under low light before use.

#### *Pigment content.*

Pigment analyses were performed by HPLC as previously described (Arsalane et al. 1994). Cells collected from the Clark electrode adapted to the PAM-fluorometer (see below) were frozen in liquid nitrogen. Pigments were extracted with a methanol:acetone (70:30, v/v) solution. Published extinction coefficients for Chl (Berkaloff et al. 1990) and for diadinoxanthin (DD) and diatoxanthin (DT) (Johansen et al. 1974) were used. Cell counts were performed with a Thoma hematocytometer, using the public domain NIH Image program (US National Institute of Health).

#### *Chl fluorescence yield and non-photochemical fluorescence quenching (NPQ).*

Chl fluorescence yield was monitored with a modified PAM-101 fluorometer (Walz, Effeltrich, Germany) as described previously (Ritz et al. 1999). A Clark electrode was adapted to the PAM light guides in order to record simultaneously oxygen and fluorescence. Fluorescence was excited by a very weak (non-actinic) modulated 650 nm light. After 20 min dark-adaptation, continuous actinic light of adjustable intensity was switched on. 600 ms pulses of white light ( $4000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) were admitted by an electronic shutter (Uniblitz, Vincent, USA,



opening time 2 ms) placed in front of a KL-1500 quartz iodine lamp continuously switched on in order to monitor NPQ evolution. The average fluorescence (acquisition time 33  $\mu$ s) measured during the last 400 ms of the pulse was taken as  $F_m$  or  $F_m'$ . Data were recorded with a microcomputer through a 12 bit analogue-digital interface and the system was driven by home-made software (Arsalane et al. 1993). For each experiment, 2 mL of cell suspension were used. Sodium bicarbonate was added at a concentration of 4 mM from a freshly prepared 0.2 M stock solution in distilled water to prevent any limitation of the photosynthetic rate by carbon supply.

Standard fluorescence nomenclature was used (van Kooten and Snel 1990).  $F_o$  and  $F_m$  are defined as the fluorescence yield of dark-adapted cells and the maximum fluorescence reached in such cells during a saturating pulse of white light, respectively. The quantum yield of excitation trapping by PSII is the ratio  $F_v/F_m$  where  $F_v$  is the variable part of the fluorescence emission and is equal to  $F_m - F_o$ . Non-photochemical fluorescence quenching (NPQ) is quantified by the 'Stern-Volmer' expression  $F_m/F_m' - 1$ , where  $F_m'$  is the fluorescence yield in the presence of quenching (Krause and Weis 1991). NPQ quantified by the 'Stern-Volmer' expression is found to be proportional to the concentration of the de-epoxidized xanthophyll zeaxanthin or DT (Gilmore and Yamamoto 1991).

#### *O<sub>2</sub> yield per flash.*

The relative  $O_2$  yield produced per flash during a sequence of single-turnover saturating flashes at a frequency of 2 Hz was measured at 18°C with a rate electrode as described by Lemasson and Etienne 1975. Short (5  $\mu$ s) saturating flashes were produced by a Strobotac (General Radio Co., Concord, MA). For the control sequences, cells were first dark-adapted for 20 min and then deposited on the electrode. Both control and illuminated samples taken from the PAM-fluorometer were allowed to settle on the electrode for 7 min under darkness before measurement. The steady-state  $O_2$  yield per flash ( $Y_{SS}$ ) was attained for the last flashes of a sequence of twenty flashes when the classical four-step oscillations due to the S-states cycle (Kok et al. 1970) were fully damped.  $Y_{SS}$  was used to assess PS II activity since it reflects the relative concentration of  $O_2$  evolving PS II reaction centers.

#### References

- Anning, T., MacIntyre, H. L., Pratt, S. M., Sammes, P. J., Gibb, S. & Geider, R. J. 2000. Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.* 45:1807-17.
- Aro, E. M., Virgin, I. & Andersson, B. 1993. Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143:113-34.
- Arsalane, W., Paresys, G., Duval, J.-C., Wilhelm, C., Conrad, R. & Büchel, C. 1993. A new fluorometric device to measure the *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence yield in microalgae and its use as a herbicide monitor. *Eur. J. Phycol.* 28:247-52.
- Arsalane, W., Rousseau, B. & Duval, J.-C. 1994. Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: Competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* 60:237-43.
- Belay, A. & Fogg, G. E. 1978. Photoinhibition of photosynthesis in *Asterionella formosa* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 14:341-47.
- Berkaloff, C., Caron, L. & Rousseau, B. 1990. Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigments analysis. *Photosynth. res.* 23:181-93.
- Bhaya, D. & Grossman, A. R. 1993. Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Nucleic Acids Res.* 21:4458-66.
- Brown, J. S. 1988. Photosynthetic pigment organization in diatoms (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 24:96-102.
- Brunet, C., Brylinski, J. M. & Lemoine, Y. 1993. *In situ* variations of the xanthophylls diatoxanthin and diadinoxanthin: photoadaptation and relationships with a hydrodynamical system in the eastern English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 102:69-77.
- Caron, L., Remy, R. & Berkaloff, C. 1988. Polypeptide composition of light-harvesting complexes from some brown algae and diatoms. *FEBS Letters* 229:11-15.
- Casper-Lindley, C. & Bjorkman, O. 1998. Fluorescence quenching in four unicellular

- algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth. Res.* 56:277-89.
- Demers, S., Roy, S., Gagnon, R. & Vignault, C. 1991. Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 76:185-93.
- Eskling, M., Arvidsson, P. O. & Akerlund, H. E. 1997. The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plantarum* 100:806-16.
- Falkowski, P. G. & Laroche, J. 1991. Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.* 27:8-14.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. 1997. *Aquatic Photosynthesis*. Blackwell Science, Malden, USA, 375 pp.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. 1998. Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science* 281:237-40.
- Fogg, G. E. 1991. The phytoplanktonic ways of life. *New Phytol.* 118:191-32.
- Gilmore, A. M. 1997. Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plantarum* 99:197-209.
- Gilmore, A. M. & Yamamoto, H. Y. 1991. Zeaxanthin formation and energy-dependent fluorescence quenching in pea chloroplasts under artificially mediated linear and cyclic electron transport. *Plant Physiol.* 96:635-43.
- Goericke, R. & Welshmeyer, N. A. 1992. Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. II. The <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-labelling kinetics of carotenoids. *J. Phycol.* 28:507-17.
- Goss, R., Mewes, H. & Wilhelm, C. 1999. Stimulation of the diadinoxanthin cycle by UV-B radiation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Photosynth. Res.* 59:73-80.
- Guillard, R. R. R. & Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.* 8:229-38.
- Harris, G. P. 1986. *Phytoplankton Ecology: Structure, Function, and Fluctuation*. Chapman & Hall, London, UK.
- Jakob, T., Goss, R. & Wilhelm, C. 2001. Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *J. Plant Physiol.* 158:383-90.
- Jin, E., Polle, J. E. W. & Melis, A. 2001. Involvement of zeaxanthin and of the Cbr protein in the repair of photosystem II from photoinhibition in the green alga *Dunaliella salina*. *Biochim. Biophys. Acta* 1506:244-59.
- Johansen, J. E., Wa, S., Liaaen-Jensen, S. & Haxo, F. T. 1974. Carotenoids of the Dinophyceae. *Phytochem.* 13:2261-71.
- Kirilovsky, D. L., Vernotte, C. & Etienne, A. L. 1990. Protection from photoinhibition by low temperature in *Synechocystis* 6714 and in *Chlamydomonas reinhardtii*: detection of an intermediary state. *Biochemistry* 29:8100-06.
- Klein, B. & Sournia, A. 1987. A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. II. Phytoplankton pigment composition studied by HPLC analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 37:265-75.
- Kok, B., Forbush, B. & Mc Gloin, M. 1970. Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.* 11:457-75.
- Krause, G. H. & Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:313-49.
- Lavaud, J., Rousseau, B., van Gorkom, H. J. & Etienne A.-L. 2002. Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 129:1398-1406.
- Lemasson, C. & Etienne, A.-L. 1975. Photo-inactivation of system II centers by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta* 408:135-42.
- Lewis, M. R., Horne, E. P. W., Cullen, J. J., Oakey, N. S. & Platt, T. 1984. Turbulent motions may control phytoplankton photosynthesis in the upper ocean. *Nature* 311:49-50.
- Lohr, M. & Wilhelm, C. 2001. Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta* 212:382-91.
- Long, S., Humphries, S. & Falkowski, P. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45:633-62.
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M. & Geider, R. J. 2000. The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci.* 5:12-17.
- Mouget, J.-L., Tremblin, G., Morant-Manceau, A., Morançais, M. & Robert, J.-M. 1999. Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis
- Müller, P., Li, X.-P. & Niyogi, K. K. 2001. Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.* 125:1558-66.
- Neale, P. J. 1987. Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. In Kyle, D. J., Osmond, C. B. & Arntzen, C. J. [Ed.] *Photoinhibition*. Elsevier Science

- Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands, pp. 39-62.
- Niyogi, K. K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:455-60.
- Niyogi, K. K., Grossman, A. R. & Bjorkman, O. 1998. *Arabidopsis* mutants define a central role for the xanthophyll cycle in the regulation of photosynthetic energy conversion. *Plant Cell* 10:1121-34.
- Olaizola, M., Bienfang, P. K. & Ziemann, D. A. 1992. Pigment analysis of phytoplankton during a Subarctic spring bloom: xanthophyll cycling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 158:59-74.
- Olaizola, M., Laroche, J., Kolber, Z. & Falkowski, P. G. 1994. Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.* 41:357-70.
- Olaizola, M. & Yamamoto, H. Y. 1994. Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 30:606-12.
- Owens, T. G. 1986. Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol.* 80:739-46.
- Pyszniak, A. M. & Gibbs, S. P. 1992. Immunocytochemical localisation of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophyll *a/c* light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protoplasma* 166:208-17.
- Ritz, M., Neverov, K. V. & Etienne, A.-L. 1999.  $\Delta$ pH-dependent fluorescence quenching and its photoprotective role in the unicellular red alga *Rhodella violacea*. *Photosynthetica* 37:267-80.
- Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B. & Horton, P. 2001. Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J. Biol. Chem.* in press.
- Sakshaug, E., Demers, S. & Yentsch, C. M. 1987. *Thalassiosira oceanica* and *T. pseudonana*: two different photoadaptational responses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 41:275-82.
- Ting, C. S. & Owens, T. G. 1993. Photochemical and non-photochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol.* 101:1323-30.
- Tréguer, P., Nelson, D. M., van Bennekom, A. J., DeMaster, D. J., Leynaert, A. & Quéginer, B. 1995. The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science* 268:375-79.
- van Kooten, O. & Snel, J. F. H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25:147-50.
- Willemoës, M. & Monas, E. 1991. Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiol. Plantarum* 83:449-56.
- Zudaire, L. & Roy, S. 2001. Photoprotection and long-term acclimation to UV in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B.* 62:26-34.

\*\*\*\*\*

# CHAPITRE III

## 2<sup>ème</sup> PARTIE

*5- Les mécanismes photoprotecteurs alternatifs :  
transport cyclique des électrons au sein du PS II  
et chlororespiration*

---

## LES MECANISMES PHOTOPROTECTEURS ALTERNATIFS : TRANSPORT CYCLIQUE DES ELECTRONS AU SEIN DU PS II ET CHLORORESPIRATION

Nous avons vu dans les chapitres précédents que les diatomées possèdent un système efficace de photoprotection qui se traduit par la capacité de l'antenne à dissiper une partie de la lumière absorbée en excès afin d'éviter la surexcitation des centres qui peut conduire à leur endommagement. Néanmoins, sous forte illumination, nous avons observé chez *Phaeodactylum tricornerutum* des cinétiques de disparition de l'activité PS II (Fig. 7, Chapitre III, § 2-). Cette perte d'activité est cependant de nature différente chez *P. tricornerutum* et *Skeletonema costatum* (Fig. 5, Chapitre III, § 4-). Chez la première, l'inactivation est plus faible (30 %) et surtout cette perte d'activité PS II est totalement récupérée après 90 min d'obscurité. Au contraire, chez *S. costatum*, l'inactivation est plus forte (50 %) et elle n'est pas réversible après 90 min de faible lumière. Il semble donc que chez *P. tricornerutum*, on assiste à une "simple" inactivation réversible de l'activité PS II alors que chez *S. costatum*, il s'agit plus de photoinhibition au sens "classique" du terme, c'est-à-dire la perte irréversible de l'activité PS II nécessitant une synthèse *de novo* de protéines, en particulier D1, et un assemblage des PS II qui peut demander un temps supérieur à 90 min. Se posait donc la possibilité chez certaines diatomées d'une inactivation réversible de l'émission d'O<sub>2</sub> qui n'indiquerait pas nécessairement un endommagement des centres réactionnels au niveau protéique. Cette observation était à mettre en relation avec l'absence de dégradation de D1 précédemment observée chez *P. tricornerutum* lors d'un stress lumineux (Olaizola *et al.*, 1994).

Une des façons de mesurer le nombre de centres actifs PS II, c'est-à-dire de centres capables d'émettre de l'O<sub>2</sub> (en effectuant au minimum trois turnovers successifs pour parcourir les états S de S<sub>1</sub> à S<sub>4</sub>) et donc d'oxyder l'eau est de mesurer par ampérométrie le rendement d'O<sub>2</sub> par flash à l'aide d'une électrode de vitesse (ou électrode de Joliot) (voir Chapitre III, § 2-). L'échantillon est incubé à l'obscurité avant la mesure, les états S<sub>2</sub> et S<sub>3</sub> se désactivent vers S<sub>1</sub>, il ne reste que S<sub>1</sub> et S<sub>0</sub> et en début de séquence on observe des oscillations de période quatre avec des maxima aux troisième, septième et onzième flashes. Ces oscillations s'amortissent pour atteindre une valeur stationnaire Y<sub>SS</sub> correspondant à l'équipartition des états S. Y<sub>SS</sub> est le rendement stationnaire moyen de l'émission d'O<sub>2</sub> par

flash. La réalisation précédente de ce type de mesure après un stress lumineux chez les cyanobactéries ou les algues vertes avait abouti à la diminution de  $Y_{SS}$  sans modification du profil de la séquence d' $O_2$  (Kirilovsky *et al.*, 1990). La conclusion logique de cette observation était le passage des centres réactionnels PS II d'un état actif à un état endommagé (photoinhibé). Cependant, dans ce cas précis, les séquences d' $O_2$  étaient mesurées après une longue période d'obscurité suivant le stress lumineux.

C'est en effectuant le même type de mesure chez *P. tricornutum* mais avec un temps minimum (de quelques minutes) entre la fin de l'illumination forte et le début de la séquence d' $O_2$  que nous avons observé une modification de la séquence d' $O_2$  sans diminution de  $Y_{SS}$ , comme si les centres réactionnels avaient une activité modifiée sans être endommagés. Ce type de séquence est caractérisé par un rendement d' $O_2$  par flash en début de séquence très fortement diminué, c'est ce que nous avons nommé par la suite un "déficit d' $O_2$ ". Notre objectif initial était de mesurer l'efficacité de la photoprotection produite par la dissipation de l'énergie absorbée en excès au niveau des antennes (voir Chapitre III, § 2-). En effet la mesure du temps nécessaire pour atteindre le point de compensation entre photosynthèse et respiration telle qu'elle avait été utilisée par Arsalane *et al.* (1994), ne nous semblait pas être une mesure très fiable de la diminution de l'activité PS II (voir Chapitre I-Introduction, § II-3.3.1.). Entre autres raisons, sous la lumière saturante utilisée dans ces expériences la production d' $O_2$  n'est pas limitée par l'activité du PS II, elle est limitée par l'étape la plus lente du transfert d'électrons qui peut être la réoxydation du pool de PQ réduits et/ou la limitation des accepteurs du PS I (en particulier le  $CO_2$ ). Effectivement, nous avons observé que le rendement d' $O_2$  stationnaire  $Y_{SS}$  commence à chuter pour des durées d'éclairement inférieures au temps nécessaire pour atteindre le point de compensation. Les conclusions auxquelles nous sommes arrivés vont dans le même sens mais la mesure de  $Y_{SS}$  est une mesure directe qui reflète fidèlement la perte d'activité des PS II au cours du stress lumineux alors que le temps nécessaire pour atteindre le point de compensation n'en est qu'une conséquence très indirecte.

L'observation d'une déformation importante de la séquence d' $O_2$  enregistrée dans les minutes qui suivent la fin de l'illumination forte n'était pas prévue. La compréhension de ce phénomène nous paraissait importante. Elle pouvait correspondre à plusieurs types de mécanismes et pouvait aussi jouer un rôle complémentaire de celui du NPQ dans la photoprotection. Son interprétation n'a pas été aisée. Les expériences dépendaient fortement de l'état physiologique des cellules et l'existence du déficit était beaucoup plus labile et

difficile à mesurer et à cerner que la formation du NPQ. La caractérisation du déficit, de sa dépendance vis-à-vis de l'illumination (intensité et durée), du temps nécessaire à sa disparition et de l'origine possible de ce phénomène ont nécessité de nombreux mois de travail expérimental et de réflexion.

Les caractéristiques de ce phénomène et l'interprétation que nous en faisons sont décrits dans ce chapitre présenté sous la forme d'une publication sous presse dans **Photosynthesis Research**, vol. 74 (1), pp 49-57.

## RESUME DES RESULTATS

### *La description du déficit d'O<sub>2</sub>.*

Nous avons d'abord quantifié l'ampleur du déficit qui atteint au maximum trois équivalents réduits par centre réactionnel PS II. (Fig. 1 et Tableau 1). Un déficit de cet ampleur est observé chez une autre espèce de diatomée planctonique déjà étudiée dans un chapitre précédent, *Cyclotella fusiformis*, et chez une diatomée épipélique (à la fois planctonique et benthique), *Cylindrotheca cryptica*. On le retrouve également chez l'algue verte *Chlorella fusca* comme déjà rapporté (Prasil *et al.*, 1986). Par contre, son ampleur est plus faible chez la diatomée benthique *Navicula* sp. (la diatomée *S. costatum* n'a pas été testée car la souche a été perdue par contamination avec *P. tricornutum*).

### *Le déficit d'O<sub>2</sub> apparaît dans les mêmes conditions que le NPQ : une illumination créatrice de ΔpH.*

Nous nous sommes ensuite assurés que ce déficit était bien le résultat de l'effet d'une forte illumination en le comparant au NPQ dans les trois conditions suivantes :

1) Variation des amplitudes comparées de NPQ et du déficit en fonction de la durée de la forte illumination. Le déficit apparaît le premier et continue à croître lorsque le NPQ atteint une valeur maximale (Fig. 2a). Lorsque l'illumination se prolonge et que la concentration des centres PS II actifs diminue, le déficit diminue dans les mêmes proportions montrant ainsi qu'il s'agit bien de réducteurs liés à chacun des centres PS II et non d'un effet global (Tableau 1).

2) Modification des valeurs du NPQ et du déficit atteints au bout d'une illumination de 5 min par variation de l'intensité de l'illumination. Dans ce cas encore, le déficit varie dans le même sens que le NPQ, les deux augmentant avec l'augmentation de l'intensité mais comme

précédemment le déficit apparaît pour des intensités qui n'engendrent pas de NPQ. (Fig. 2b, symboles pleins).

3) Variation de l'ampleur du déficit pour différentes valeurs du gradient de protons transthylakoïdal atteint au bout de 5 min d'une illumination saturante. Le  $\Delta\text{pH}$  est diminué par l'incubation des cellules à l'obscurité avec des concentrations croissantes du découpleur  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Fig. 2b, symboles vides). La relation obtenue entre le déficit et le NPQ est très semblable à celle observée dans les conditions expérimentales 2).

À ce stade, il y a une relation évidente entre la photoprotection évaluée par le NPQ et le déficit d' $\text{O}_2$ . Le développement du NPQ dépend de manière directe/ou indirecte du  $\Delta\text{pH}$  créé lors d'une illumination (voir § précédents). Il en est de même du déficit mais les deux phénomènes sont à l'évidence distincts et leur dépendance ne semble pas de même nature.

***L'apparition du déficit d' $\text{O}_2$  dépend de l'activité de l'ATP synthase qui elle-même dépend de l'ampleur du  $\Delta\text{pH}$ .***

L'utilisation de faibles concentrations de DCCD illustre clairement les effets antagonistes obtenus sur la formation du NPQ et du déficit (Tableau 1). À faible concentration, le DCCD inhibe l'ATP synthase et donc l'utilisation du gradient de protons transthylakoïdal, qui augmente et la production d'ATP qui diminue ; or le DCCD augmente le NPQ et diminue le déficit. Le NPQ augmente car le  $\Delta\text{pH}$  augmente et le déficit diminue car son apparition est liée à la production d'ATP qui est elle inhibée par le DCCD.

***Le déficit d' $\text{O}_2$  persiste à l'obscurité.***

Une autre différence réside dans les cinétiques de disparition du NPQ et du déficit après la fin de l'illumination saturante. La valeur atteinte par le NPQ dépend de la durée de l'illumination mais le NPQ disparaît quelle que soit la durée de l'illumination en 20 min au maximum. La valeur maximale du déficit dépend également de la durée de l'illumination, le déficit persiste beaucoup plus longtemps que le NPQ et son déclin est notablement plus lent quand la durée de l'illumination augmente (Fig. 3a).



***Les cinétiques de disparition du déficit d'O<sub>2</sub> à l'obscurité suivent celles de la consommation d'O<sub>2</sub> par la chlororespiration.***

Le CO<sub>2</sub>, au contraire de l'eau, est un substrat qui peut devenir rapidement limitant ce qui entraîne une surréduction de la chaîne de transporteurs d'électrons. A ce moment là, la chaîne photosynthétique peut se tourner vers des accepteurs d'électrons alternatifs au CO<sub>2</sub>. Bien qu'à ce stade il soit vraisemblable que les diatomées accumulent pendant la forte lumière un pouvoir réducteur, il nous fallait une autre observable qui pouvait dépendre de cette accumulation de réducteurs lors de la forte illumination. Nous avons donc étudié, à cette fin, la consommation d'O<sub>2</sub> qui intervient dès la fin de l'illumination. Nous avons constaté que cette consommation d'O<sub>2</sub> dépend dans son ampleur et sa persistance, de la durée de l'illumination. Les cinétiques de la consommation d'O<sub>2</sub> sont extrêmement proches de celles de la disparition du déficit à l'obscurité (Fig. 3b).

La consommation d'O<sub>2</sub> provient pour une part importante de la chlororespiration connue comme étant importante chez les diatomées. La chlororespiration utilise les équivalents réducteurs accumulés pendant la forte lumière pour réduire l'O<sub>2</sub> via le pool de PQ et une oxydo-réductase. Nous pensons que c'est à partir de la réduction des PQ que le coté donneur du PS II accumule des équivalents réduits qui sont réoxydés pendant les premiers flashes de la séquence de flash. Ceci équivaut à un cycle d'électrons au sein du PS II qui semble exister dès la fin de l'illumination (déficit mesuré 5 s après l'illumination) et sans doute plus rapidement pendant la forte illumination. Cette réduction de donneurs d'électrons réapparaît avec un demi-temps de 2 min à l'obscurité et dure tant que le pool de réducteurs n'a pas été épuisé par la chlororespiration (Fig. 3a). Cette vue est confortée par le ralentissement de la disparition du déficit en conditions semi-anaérobiques qui inhibent partiellement la chlororespiration (Fig. 3a, diamants). Ce cycle participe à la photoprotection des centres réactionnels PS II en inhibant la production d'O<sub>2</sub> et en évitant la surréduction des transporteurs d'électrons situés en aval, alors que la séparation primaire de charges s'effectue normalement. Les candidats potentiels à cette réduction sont le cytochrome *b<sub>559</sub>* déjà évoqué pour jouer un rôle similaire par de nombreux auteurs, la tyrosine de la protéine D2 qui dans son état oxydé est à l'origine du signal II slow détecté en RPE et qui se réoxyde sous illumination si elle a été réduite avant. Dans des conditions d'illumination normale cette tyrosine reste sous sa forme oxydée.

En conclusion, nous avons prouvé l'existence de l'induction par une forte illumination d'un cycle d'électrons au sein du PS II. Avec une vitesse que l'on peut estimer à  $10^2 \text{ s}^{-1}$  sous une illumination saturante, la photoinhibition du PS II due à une surréduction de  $Q_A$  est évitée et les cofacteurs impliqués dans le cycle sont maintenus largement à l'état réduit et sont donc en compétition avec l'eau comme donneur d'électrons à la Chl-centre oxydée P680. Cette réduction provient d'un transfert de  $Y_D$  à  $Y_Z^{\text{ox}}$  qui est en compétition avec la réduction en 2 ms de  $Y_Z^{\text{ox}}S_3$  à  $Y_ZS_0$  par l'eau. Le fait que l'on puisse toujours observer cette compétition (et donc le déficit) à l'obscurité est dû à une "fuite" d'électrons provenant du pool de PQ. La réduction du pool de PQ à l'obscurité est due à la chlororespiration qui utilise comme carburant un composé réduit accumulé sous forte lumière. La taille de ce pool dépend de la durée et de l'intensité de l'illumination et sa synthèse nécessite de l'ATP. La nature de ce composé demeure cependant inconnue. On a vu dans l'introduction l'importance dans la photoprotection de ces voies alternative à la photochimie servant de "puits" à électrons lors d'une forte illumination (Chapitre I, § I- 3. 1. 3. ).

## **Photosystem II electron transfer cycle and chlororespiration in planktonic diatoms**

Johann Lavaud<sup>1</sup>, Hans J. van Gorkom<sup>2</sup> & Anne-Lise Etienne<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire 'Organismes Photosynthétiques et Environnement', UMR CNRS 8543, Ecole Normale Supérieure, 46 Rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France

<sup>2</sup>Department of Biophysics, Leiden University, P.O.Box 9504, 2300 RA Leiden, The Netherlands.

### **Abstract**

The dominance of diatoms in turbulent waters suggests special adaptations to the wide fluctuations in light intensity that phytoplankton must cope with in such an environment. Our recent demonstration of the unusually effective photoprotection by the xanthophyll cycle in diatoms (Lavaud et al. 2002) also revealed that failure of this protection led to inactivation of oxygen evolution, but not to the expected photoinhibition. Photo-oxidative damage might be prevented by an electron transfer cycle around Photosystem II (PS II). The induction of such a cycle at high light intensity was verified by measurements of the flash number dependence of oxygen production in a series of single-turnover flashes. After a few minutes of saturating illumination the oxygen flash yields are temporarily decreased. The deficit in oxygen production amounts to at most 3 electrons per PS II, but continues to reappear with a half time of 2 min in the dark until the total pool of reducing equivalents accumulated during the illumination has been consumed by (chloro)respiration. This is attributed to an electron transfer pathway from the plastoquinone pool or the acceptor side of PS II to the donor side of PS II that is insignificant at limiting light intensity but is accelerated to milliseconds at excess light intensity. Partial filling of the 3-equivalents capacity of the cyclic electron transfer path in PS II may prevent both acceptor-side photoinhibition in oxygen-evolving PS II and donor-side photoinhibition when the oxygen-evolving complex is temporarily inactivated.

*Key words:* diatoms, electron transport cycle, oxygen evolution, *Phaeodactylum tricornerutum*, photoprotection, photosystem II

*Abbreviations:* DCCD – N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide; NPQ – non-photochemical fluorescence quenching; PS I and PS II – Photosystem I and II; Q<sub>A</sub> – primary quinone acceptor of PS II; S<sub>0</sub> to S<sub>3</sub> – oxidation states of the water evolving complex; Y<sub>D</sub> – tyrosine D of the PS II reaction center responsible for EPR signal II slow; Y<sub>SS</sub> – steady-state oxygen yield per flash; Y<sub>Z</sub> – tyrosine Z of the PS II reaction center secondary electron donor

## Introduction

Although marine diatoms contribute substantially to global primary production (van den Hoek et al. 1995), their bioenergetics has received relatively little attention. Diatoms often dominate the phytoplankton in turbulent waters (Harris 1986), where vertical mixing continuously exposes them to large fluctuations in light intensity on time scales of minutes to days (Lewis et al. 1984). They must be able to survive long periods of darkness when carried down by deep mixing as well as short periods of full sunlight when they hit the surface. They have indeed been shown to survive many days of darkness without carbon assimilation (Griffiths 1973) and to cope with a wide variation in light intensity (Richardson et al. 1983). Their main protective mechanism against over-excitation appears to be non-photochemical quenching of the chlorophyll excited state (NPQ) (Ting and Owens 1993) associated with xanthophyll de-epoxidation (Arsalane et al. 1994; Olaizola et al. 1994). By a quantitative study of the quenching by NPQ, both with open ( $Q_A$  oxidized) and with closed ( $Q_A$  reduced) photosystem II (PS II) reaction centers, we recently demonstrated that the xanthophyll cycle provides the planktonic diatom *Phaeodactylum tricornutum* with a unusually effective and adaptable mechanism to down-regulate PS II activity at high light intensity (Lavaud et al. 2002). Illumination for an hour at a light intensity corresponding to full sunlight (50 times the intensity at which the cells were grown) was required to inactivate a large fraction of PS II, as measured by the yield of  $O_2$  production upon illumination by repetitive single-turnover flashes. Surprisingly, the chlorophyll fluorescence yield increase associated with photoreduction of  $Q_A$  was not affected. When the oxygen evolving complex is not functional, charge separations in PS II would be expected to lead to rapid photo-oxidative destruction, either directly by the strong oxidants resulting from charge separation or indirectly by charge recombination to the triplet state, leading to singlet oxygen production (Aro et al. 1993). The only likely way to avoid that would seem to be an electron transfer cycle around PS II.

Cyclic electron flow around PSII, presumably via cytochrome  $b_{559}$  (for review see Whitmarsh and Pakrasi 1996), has been suggested earlier as a photoprotection mechanism that could retard both acceptor and donor side photoinhibition (Nebdal et al. 1992; Barber and De Las Rivas 1993). Such a cycle was shown to occur *in vivo* in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* at high light intensities (Falkowski and Kolber 1986). Prasil et al. (1996) studied its expression in a temporary decrease of  $O_2$  production by saturating flashes during the first tens of seconds after a light to dark transition, and concluded that the cycle occurs as long as the plastoquinone pool is reduced.

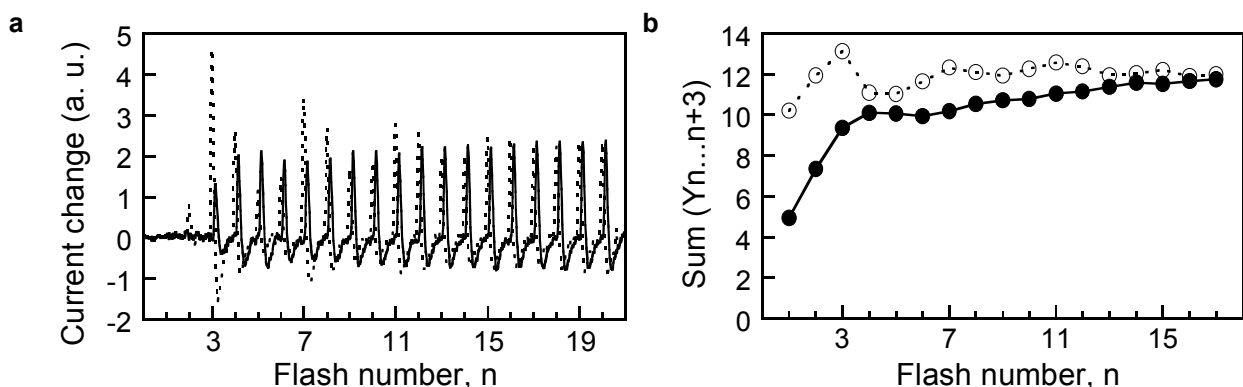
In order to verify the possible induction of an electron transfer cycle in *Phaeodactylum tricornutum* at high light intensity, we have also investigated the flash number dependence of the O<sub>2</sub> yields in a series of single turnover flashes. For dark-adapted cells, these yields initially show a period 4 oscillation with flash number due to the 4-state oxidation cycle of the O<sub>2</sub>-evolving complex (Joliot et al. 1969; Kok et al. 1970). To produce an O<sub>2</sub> molecule, 4 consecutive charge separations in the same PS II reaction center are required, each raising the oxidation state ('S-state') by one equivalent. S<sub>0</sub> and S<sub>1</sub> are stable, but the higher S-states decay to S<sub>1</sub> in a few minutes darkness, resulting in an oscillating O<sub>2</sub> yield with maxima on flash numbers 3, 7, etc. The oscillation is damped in a few cycles to a constant steady state yield, Y<sub>SS</sub>, due to loss of synchrony caused mainly by a non-zero probability of 'misses', usually near 10 %. The oscillation pattern is extremely sensitive to the miss probability and would change significantly already if only a few percent of the electrons would come from a cyclic electron transfer pathway rather than from water oxidation.

After exposure to high light intensity a very high miss probability that disappeared in approximately 15 flashes, quite similar to that reported by Prasil et al. (1996) for *Chlorella*, was indeed observed. In *Phaeodactylum* and other planktonic diatoms, it could still be measured after very long dark times and its properties suggest a somewhat different interpretation, but nevertheless provide evidence for a photoprotective electron transfer cycle around PS II at high light intensity.

## Results

Typical O<sub>2</sub> flash yield measurements are shown in Figure 1A. *Phaeodactylum tricornutum* cells were allowed to settle in darkness on a rate electrode and the polarographic current changes induced by a series of single-turnover flashes were recorded. The dashed line shows the classical period four oscillation of the O<sub>2</sub> yield with flash number due to the 4-step redox cycle of the O<sub>2</sub>-evolving complex (Joliot et al. 1969; Kok et al. 1970). The damping to a constant steady-state yield, Y<sub>SS</sub>, results from a normal probability of about 10 % that a photoreaction fails to contribute to H<sub>2</sub>O oxidation. Early in the sequence this 'miss probability' was much higher in cells that had been exposed to saturating light for 5 min, but it returned to 10 % during the flash series so that Y<sub>SS</sub> was the same (solid line). This phenomenon is better visualized by plotting the sums of 4 consecutive flash yields in order to remove most of the oscillatory pattern (Figure 1B). The solid symbols show that it took about 15 flashes before the normal O<sub>2</sub> yield was fully recovered in the illuminated sample.

We quantify the oxygen deficit as  $20 Y_{SS}$  minus the total oxygen production of the 20 flashes and subtract the  $O_2$  deficit of the non-illuminated sample, which is  $0.8-1.0 Y_{SS}$ . This is expected because the higher S-states are reduced to  $S_1$  in the dark, so the average number of stored oxidizing equivalents is expected to decrease from approximately  $(0+1+2+3)/4 = 1.5$  in the steady state to  $(0+1+1+1)/4 = 0.75$  after dark-adaptation. The difference of 0.75 equivalents should cause a deficit of  $0.83 Y_{SS}$ , taking the 10 % miss probability into account. It will be somewhat larger because the miss probability and hence the steady state S-state concentration is higher for high S-states than for low S-states (de Wijn and van Gorkom 2002). The deficit in the illuminated sample in Figure 1 was higher than that in the non-illuminated sample by  $2.8 Y_{SS}$ , or 2.5 electrons per PS II. The shape of the oscillation pattern does not suggest a phase delay by 3 flashes but rather an increased miss probability that gradually disappears in 15 flashes. From our previous study (Lavaud et al. 2002) we know that the large extra miss probability during the first S-state cycle in these conditions cannot be attributed to a non-saturating flash energy or to the presence of closed PS II centers. It appears, therefore, that the  $O_2$  deficit is due to the presence of reductants that can compete with water as an electron donor to PS II. Decreasing the flash frequency did not change the deficit, however. Similar data were obtained with other planktonic marine diatoms from turbulent coastal waters of the Northern Atlantic (*Cylindrotheca fusiformis* and *Cyclotella cryptica*), but not or much less with a benthic diatom (*Navicula* sp.), a green alga (*Chlorella fusca*) and a cyanobacterium (*Synechococcus* sp.). The duration and intensity of illumination producing the maximum  $O_2$  deficit were rather different for the different species but it was for the planktonic diatoms that the  $O_2$  deficit was the highest.



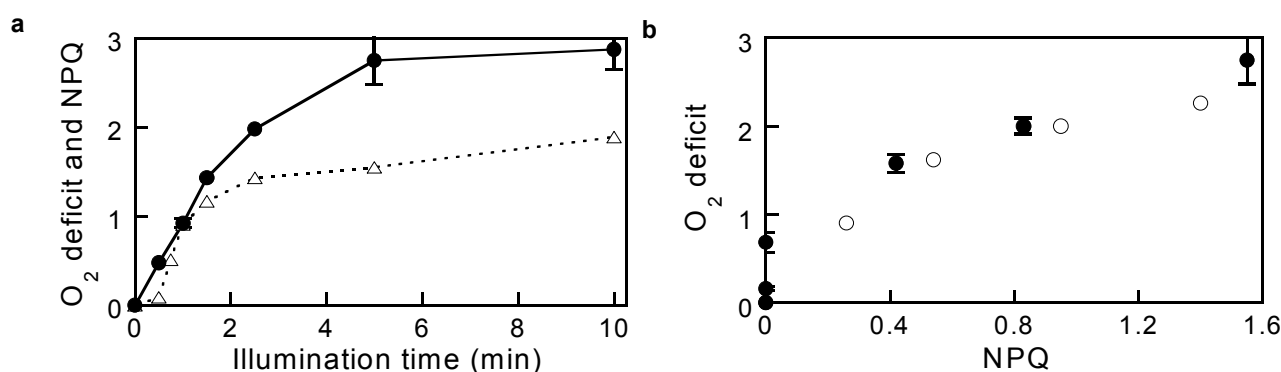
**Figure 1.** (a) Oxygen production in a series of single-turnover flashes by dark-adapted cells (dashed line) or after 5 min saturating illumination ( $450 \mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ ) in the PAM vial (solid line). In panel (b) the sums of 4 successive flash yields are plotted versus flash number to reveal the gradual decrease of the miss probability in the light-treated cells.

**Table 1. Effects of saturating light on NPQ and O<sub>2</sub> flash yield.**

	NPQ	Y <sub>SS</sub>	O <sub>2</sub> deficit
5 min Light	1.6 ± 0.1	0.98 ± 0.2	2.8 ± 0.2
60 min Light	2.5	0.69	1.7
DCCD + 5 min L	2.1	0.95*	1.5

Effects of illumination (in the PAM vial) at 450  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  on 20 min dark-adapted *P. tricornutum*. NPQ: non-photochemical quenching expressed as  $(F_m - F_m')/F_m'$ . Y<sub>SS</sub>: steady state O<sub>2</sub> flash yield measured after 7 min sedimentation on the electrode, normalized to non-illuminated control. DCCD was added at 10  $\mu\text{M}$  at the start of the 20 min dark-adaptation. \*DCCD decreased the dark-adapted Y<sub>SS</sub> substantially. The O<sub>2</sub> deficit is given in units Y<sub>SS</sub> of the non-illuminated control.

The O<sub>2</sub> deficit was induced by conditions similar to those that elicit NPQ, suggesting a connection to photoprotective mechanisms, but there are clear differences in detail. Figure 2A shows that it appeared earlier and continued to rise longer. At much longer times, while NPQ continues to increase slowly (Lavaud et al. 2002), Y<sub>SS</sub> and the O<sub>2</sub> deficit decreased in parallel (Table 1), i.e. the deficit per active PS II remained unchanged. This observation indicates that the electron donors responsible for the O<sub>2</sub> deficit are intrinsic components of PS II and not a common pool accessible to all remaining active PS II centers. Figure 2B shows the relation between O<sub>2</sub> deficit and NPQ when their amplitude was varied using either different light intensities (solid symbols) or different concentrations of an uncoupler (NH<sub>4</sub>Cl) (open symbols). Presumably both conditions affect NPQ primarily via the extent of the steady-state pH gradient maintained during illumination. When the pH gradient is lowered by decreasing the electron transport rate (using a lower light intensity) or by uncoupling (which probably increases the electron transport), a similar decrease of O<sub>2</sub> deficit with decreasing NPQ is seen. Therefore the deficit appears to depend on the pH gradient, but not in the same way as NPQ: a deficit is detectable already at a pH gradient too small to induce NPQ.



**Figure 2. (a) Induction of the O<sub>2</sub> deficit (circles) during saturating illumination in the PAM vial, compared to that of non-photochemical quenching (triangles). Panel (b): relationship between the O<sub>2</sub> deficit and NPQ were lowered by increasing the light intensity used during a 5 min illumination (50, 150, 250, 350, 450  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  from left to right, solid symbols) or by adding to the cells increasing concentrations of NH<sub>4</sub>Cl before the dark incubation (3.5, 2.5, 1, 0 mM, from left to right, open symbols).**

Low concentrations of N,N'-dicyclohexyl-carbodiimide (DCCD) enhanced NPQ but decreased the deficit (Table 1). DCCD can have multiple effects but since its most obvious effect at low concentration is to inhibit the dissipation of the pH gradient by the ATP-synthase (McCarty and Racker 1967; Shoshan and Selman 1980), these results suggest that ATP synthesis is required for induction of the O<sub>2</sub> deficit.

After illumination, the size of the O<sub>2</sub> deficit changed in complicated ways (Fig. 3A). The open symbols in panel A show that recovery from NPQ was largely complete in 5 min, independent of illumination time. Decay of the O<sub>2</sub> deficit (solid symbols) was much slower and depended strongly on illumination time. Two components can be distinguished: a rapid decay starting after a lag time that also depended on illumination time, followed by a much slower component. Addition of DCCD after illumination led to a slower decay of the O<sub>2</sub> deficit and to an increase of NPQ after its initial post-illumination decrease (not shown). The first point of these O<sub>2</sub> data is at 7 min after illumination, the time required for settling of the cells on the electrode. The diamonds represent a light treatment equivalent to that for the circles but which was applied directly on the rate electrode. These data show that the deficit was fully developed immediately after illumination and did not decrease during a half-hour in the semi-anaerobic conditions on the electrode.

Figure 3B shows the O<sub>2</sub> deficit as a function of dark time after a fixed illumination time of 5 min at different light intensities (solid symbols). Here a comparison is made to the rate of O<sub>2</sub> consumption (open symbols, dashed lines), revealing a rather similar pattern. These data were obtained from O<sub>2</sub> concentration measurements by a Clark electrode; a typical trace is shown in the inset. Most or all of the O<sub>2</sub> and hence of the photosynthetic products made during the high intensity illumination are consumed again within tens of minutes after illumination. Apparently the size of the O<sub>2</sub> deficit, when below its maximum of 3 electrons/PS II, reflects the rate of this consumption or the amount of photosynthetic products left. This suggests that the electrons reducing the PS II components responsible for the O<sub>2</sub> deficit in this case originated ultimately from the photosynthetic products generated during the light treatment. That would also account for the suppression of the O<sub>2</sub> deficit by DCCD when added before but not when added after illumination.

Figure 4 shows the kinetics of re-appearance of the O<sub>2</sub> deficit in a second flash series as a function of dark time, on the electrode, after it was removed by a first series of 20 flashes. Depletion of the electron source by (chloro)respiration is slow in the semi-anaerobic conditions on the polarized electrode and should not become limiting on this time scale (see Fig. 3A, diamonds). The deficit increased with a half time 2 min to the same value as in the



first flash series. This is not shorter than the lifetime of the high S-states, which limits the minimum light intensity where PS II can function, and will not decrease the efficiency of photosynthesis in low light. The appearance of the deficit after strong illumination could not be resolved (diamonds in Fig. 3A) and must be much faster than its measurement (a few seconds). This suggests that immediately after, and presumably during, high intensity illumination the time required for reduction of the PS II components responsible for the O<sub>2</sub> deficit must be at least several orders of magnitude shorter than 2 min and might well be short enough to play a photoprotective role.

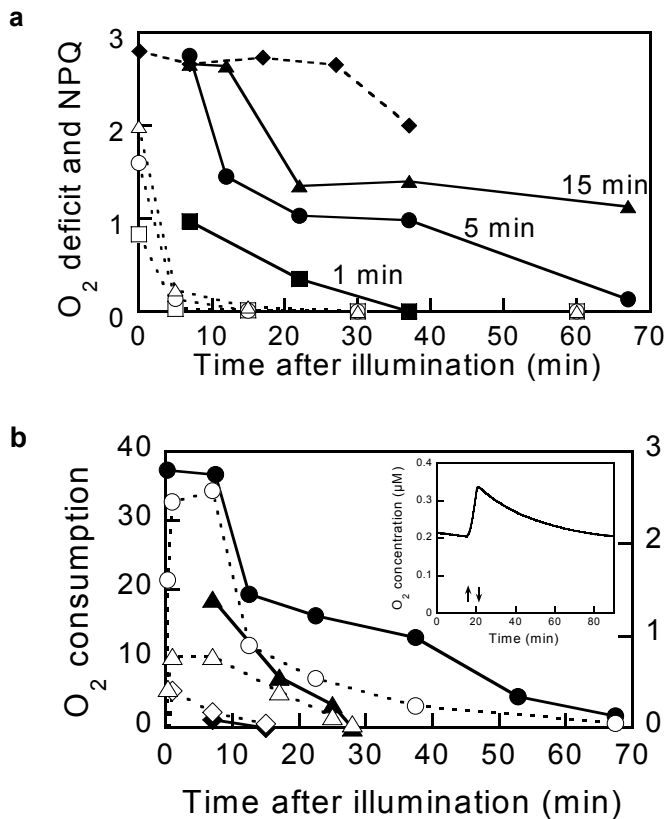


Figure 3. O<sub>2</sub> deficit (solid symbols) as a function of time after illumination. Panel (a): Illuminated for 1, 5, or 15 min (squares, circles, triangles) in the PAM vial at an intensity of 450 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, NPQ measured (open symbols) and samples taken 7 min before O<sub>2</sub> measurement to settle on the O<sub>2</sub> electrode. Diamonds: as circles but illuminated on the electrode. Panel (b): Illuminated for 5 min at 70 (diamonds), 250 (triangles) and 450 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> (circles). Open symbols: O<sub>2</sub> consumption (μmol O<sub>2</sub>.mg Chl a<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) measured with Clark electrode. Inset: typical trace of O<sub>2</sub> concentration measurements by a Clark electrode before, during (between the arrows) and after a 5 min illumination at 450 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>. The zero point is arbitrary (offset subtracted).

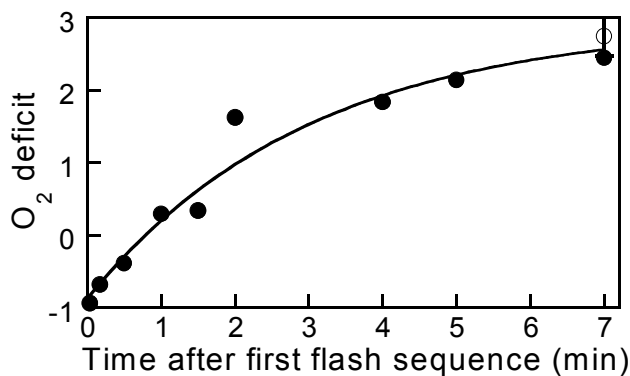


Figure 4. O<sub>2</sub> deficit as a function of dark time on the electrode after its removal by a first flash series (which had the deficit shown by the open circle at 7 min after saturating illumination). It is initially negative due to the lower oxidation state of the O<sub>2</sub> evolving complex in the dark-adapted reference.

## **Discussion**

The large deficit that appears after saturating illumination in the  $O_2$  yields of a series of single turnover flashes could not be attributed to a decreased flash yield of stable charge separation and shows that a substantial fraction of the charge separations did not contribute to water oxidation. Therefore competition by an alternative electron donor had to be assumed. The  $O_2$  deficit of up to 3  $Y_{SS}$  is much larger than can be accounted for by possible changes in steady state S-state distribution or deactivation kinetics induced by high intensity illumination.

### *Cofactors involved.*

The proportional decrease of  $Y_{SS}$  and the deficit by long exposure to high light intensity shows that the alternative electron donors causing the deficit in  $O_2$  production are probably endogenous PS II components that are not exchangeable between different PS II centers. Perhaps reduction of  $S_1$  to  $S_0$  might account for a fraction of the deficit, but it is not possible to attribute the deficit to an over-reduced 'S<sub>-2</sub>' state of the oxygen evolving complex itself, because the oscillation pattern shows a decreased efficiency rather than a delay in  $O_2$  production. The PS II reaction center contains several cofactors known to play a role as alternative electron donors in specific experimental circumstances, especially at cryogenic temperatures:  $\beta$ -carotene,  $Chl_Z$ , and cytochrome  $b_{559}$  (Butler et al. 1973; Visser et al. 1977; Schenk et al. 1982; Thompson and Brudvig 1988). Tyrosine D ( $Y_D$ ) is the only PS II component that normally competes with, but does not completely out-compete, the electron transfer reactions leading to water oxidation. The high S-states can oxidize it in seconds (Babcock 1987), presumably via their redox equilibria with the secondary electron donor  $Y_Z$  and the primary electron donor  $P_{680}$ .  $Y_Z^{ox}$  can oxidize  $Y_D$  in a ms (Boussac and Etienne 1982) and this reaction competes with the 2 ms reduction of  $Y_Z^{ox}S_3$  to  $Y_ZS_0$  by water (van Leeuwen et al. 1993). Normally  $Y_D$  remains in its oxidized tyrosyl radical form during photosynthesis, but we found no literature data to confirm that for diatoms. If high light intensity would enable its rapid reduction, e.g. via Cyt  $b_{559}$  and one other component, a cyclic electron transfer path would result that could explain both the  $O_2$  deficit reported here and the lack of photo-oxidative damage when the oxygen evolving complex is inactivated (Lavaud et al. submitted).

### *Reduction of the alternative electron donors during illumination.*

In the conditions of Figure 4, the reduction rate of the alternative electron donors is approximately 1 equivalent per PS II per minute. With an oxidation rate near 1 equivalent per

S-state cycle and a reasonable light-saturated rate of O<sub>2</sub> evolution of the order of 10 S-state cycles per PS II per second, the alternative electron donors should be in their oxidized state during saturating illumination. The O<sub>2</sub> deficit measured in seconds after illumination, however, shows that the alternative electron donors were largely in the reduced state. At high light intensity their oxidation is unlikely to be slower, so their reduction must be very much faster than in the dark.

Electrons reducing the endogenous PS II components that act as alternative electron donors would be expected to come from Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>, or the plastoquinone pool. The steady state reduction level of the plastoquinone pool remains unusually low on illumination of *P. tricornutum*, in spite of normal antenna sizes and relative amounts of PS I and PS II (Owens 1986; Caron et al. 1987) and the absence of a 'state 1 - state 2 transition' (Owens 1986). This would be consistent with an electron transfer cycle around PS II that, at saturating light intensity, is not slow compared to linear electron flow to PS I. A time constant of the order of 10 ms would be indicated, long enough not to interfere with commonly used methods to determine the extent of photochemical quenching, but short enough to prevent acceptor side photoinhibition (Nebdal et al. 1992) and keep some of the alternative electron donors in the reduced state. Those would decrease the quantum yield of O<sub>2</sub> evolution substantially and would also account the non-linearity between O<sub>2</sub> evolution and photochemical quenching at high light intensity that Geel et al. (1997) attribute to a redox state dependent Mehler-type O<sub>2</sub> reduction.

#### *Reduction in the dark.*

Prasil et al. (1996) studied a similar post-illumination decrease of O<sub>2</sub> flash yields seen in the green alga *Chlorella pyrenoidosa* on a time scale of seconds, which they attributed to a Cyt *b*<sub>559</sub>-switched cyclic electron transport around PS II. The main difference with our data seems to be the absence of period 4 oscillations due to the absence of a dark-adaptation time between illumination and flash series. The recovery to normal values after illumination was attributed to a decreasing number of centers in which the cycle was switched on and was related to the oxidation of the plastoquinone pool. Indeed a faster recovery of the oxygen yield per flash during the flash series was observed with background illumination by far-red light that selectively excited PS I, and a slower recovery was obtained in anaerobic conditions. Measurements at a different flash spacing than 2.5 s were not reported, but would not be expected to show a much different oxidation time of the pool in this case.

The O<sub>2</sub> deficit in *P. tricornutum* did not depend on flash frequency, so the time required to recover Y<sub>SS</sub> yields was proportional to the spacing of the flashes. Apparently it is the flashes that cause the recovery, not the time spent between them. If the deficit in O<sub>2</sub> production is attributed to cyclic electron transport during the flash series, as proposed by Prasil et al. (1996), it implies a temporary shortage also in reduction of the plastoquinone pool by PS II compared to its oxidation by PS I. So the flash series itself might indeed cause some oxidation of the pool if it was in the reduced state. Since the deficit accounts for at most 3 electrons/PS II, however, an unlikely small pool size or PS II/PS I ratio would have to be assumed to explain the recovery of normal Y<sub>SS</sub> yields by PS I-induced oxidation of the total plastoquinone pool. If only an arbitrary fraction of the pool was involved an invariable maximum O<sub>2</sub> deficit of 3 Y<sub>SS</sub> would not be expected. We conclude that cyclic electron transfer during the flash series is unlikely to explain our results.

After a few minutes darkness, the reduction of the alternative electron donors appeared to depend on the total pool of reducing equivalents accumulated by water oxidation during the preceding illumination. After saturating illumination an accelerated O<sub>2</sub> uptake was observed that consumed approximately the same amount of O<sub>2</sub> as had been produced in the light (Figure 3B). The diatoms are evidently unable to use the temporary >10-fold excess of light, compared to the light intensity at which they were grown, for net carbon fixation on this time scale. Instead, they seem to use the accumulated reducing equivalents as fuel for subsequent (chloro)respiratory ATP synthesis in the dark. Such a process could extend the useful dynamic range of photosynthetic electron transport. This could be an important advantage at fluctuating light intensity, e.g. in allowing carotenoid biosynthesis to proceed (Bennoun 2001; Carol and Kuntz 2001). We have shown earlier that the capacity of photoprotection by NPQ in *P. tricornutum* is proportional to the diadinoxanthin content of the cells.

A temporary storage of excess reductant for later use was recently proposed to be the function of the bi-directional hydrogenase in a cyanobacterium (Appel et al. 2000). H<sub>2</sub> seems in fact the most, if not the only, likely reductant to have direct access to the donor side of PS II and cause an O<sub>2</sub> deficit. The electron source involved here cannot be H<sub>2</sub>, however, since it was not washed from the sample on the rate electrode. Instead, the reducing equivalents are presumably accumulated in the form of reduced carbon compounds produced by the Calvin cycle or C<sub>4</sub> metabolism (Reinfelder et al. 2000) and should have no access to the donor side of PS II. The electron transfer pathway reducing the alternative electron donors in PS II is probably very indirect in this case.

When added after illumination, DCCD caused not only to a slower decay of the O<sub>2</sub> deficit but also an increase of NPQ after its initial post-illumination decrease. This indicates that the oxidation of the accumulated photosynthetic products takes place at least in part in the chloroplast via the chlororespiration coupled to ATP synthesis reported earlier (Caron et al. 1987; Ting and Owens 1993; Jakob et al. 1999). Chlororespiration is thought to proceed via the plastoquinone pool (Bennoun 2001), so in principle the same electron transfer pathway from plastoquinol to the PS II donor side could be involved in the dark as well as in the light, only at a 10<sup>4</sup> times slower rate. This rate difference is much too large to be attributed merely to a lower steady state plastoquinol concentration if chlororespiration can build up a sufficiently large pH gradient to induce substantial NPQ in the dark. An effective switching mechanism must exist to ensure that the cycle operates only at high light intensity. Cyt *b*<sub>559</sub> has often been postulated to play a role in such a switching mechanism (Thompson and Brudvig 1988; Nebdal et al. 1992; Allakhverdiev et al. 1997).

#### *Concluding remarks.*

We have presented evidence for the induction of an electron transfer cycle around PS II in planktonic diatoms at high light intensity. With an estimated rate of 10<sup>2</sup> s<sup>-1</sup> at saturating light intensity acceptor-side photoinhibition due to over-reduction of Q<sub>A</sub> is prevented and the cofactors involved in the cycle are kept largely in the reduced state that competes with water as an electron donor. This is tentatively attributed to electron transfer from Y<sub>D</sub> to Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup> that competes with the 2 ms reduction of Y<sub>Z</sub><sup>ox</sup>S<sub>3</sub> to Y<sub>Z</sub>S<sub>0</sub> by water and that will also prevent photo-oxidative damage when the O<sub>2</sub>-evolving complex is inactivated. The fact that we can still see the competition long after the cycle has been shut down is attributed to a very slow, physiologically irrelevant leak of electrons from the chlororespiratory pathway in the dark to the cofactors responsible for the PS II electron transport cycle at high light intensity.

#### **Acknowledgements**

We thank J.-C. Duval for experimental assistance and helpful discussions and B. Rousseau for culture maintenance. JL thanks the French Ministry of National Education, Research and Technology for its financial support. HJvG thanks the Ecole Normale Supérieure for an invited professorship.

## Materials and methods

### Cultures.

*Phaeodactylum tricornutum* Böhlin and other marine diatoms: *Cylindrotheca fusiformis* and *Cylindrotheca cryptica* and *Navicula* sp. were grown photoautotrophically at 18°C in sterile natural seawater F/2 medium (Guillard and Ryther 1962) in 300 mL batches, continuously flushed with sterile air (except for *Navicula* sp. which is a benthic diatom) and illuminated at 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  by white fluorescent tubes in a 16 h light - 8 h dark cycle. The cells were harvested in exponential phase, resuspended in their culture medium at 10  $\mu\text{g Chl } a\cdot\text{mL}^{-1}$ , and kept continuously stirred under low light at 18°C until use. All measurements were done at 18°C. Before measurement 4 mM sodium bicarbonate was added.

### Measurement of oxygen evolution.

O<sub>2</sub> production on illumination by a series of short (5  $\mu\text{s}$ ) saturating flashes (Strobotac, General Radio) fired at 2 Hz was measured polarographically by a rate electrode (Joliot and Joliot 1968) as described (Lemasson and Etienne 1975), after 7 min settling of the cells in the dark. For the experiments shown by the diamonds in Figure 3A, the setup was modified to allow saturating illumination via an optic guide that could be removed within a few seconds before the flash series. Illumination was provided by a 150 W quartz-iodine lamp through a heat filter. The O<sub>2</sub> deficit was quantified as 20 x Y<sub>SS</sub>, the steady-state flash yield, minus the sum of signals in a 20-flash series, expressed in units Y<sub>SS</sub>. The contribution to the deficit resulting from normal S-state deactivation during dark-adaptation was corrected for by subtraction of the deficit in a non-illuminated sample.

### Fluorescence yield measurements.

Chlorophyll fluorescence yield changes were recorded by a modified (Ritz et al. 1999) PAM 101 module (Walz). The cells were dark-adapted for 20 min before actinic illumination of adjustable intensity, as measured by a PAR sensor (Licor), and the development of NPQ was probed by 600 ms pulses of 4  $\text{mE}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  white light from a quartz-iodine lamp admitted by an electronic shutter (Vincent Uniblitz). NPQ was calculated as  $(F_m - F_m')/F_m'$  (Krause and Weis 1991).

## References

- Allakhverdiev SI, Klimov V and Carpentier R (1997) Evidence for the involvement of cyclic electron transport in the protection of photosystem II against photoinhibition: influence of a new phenolic compound. *Biochemistry* 36: 4149-4154
- Appel J, Phunpruch S, Steinmuller K and Schulz R (2000) The bidirectional hydrogenase of *Synechocystis* sp. PCC 6803 works as an electron valve during photosynthesis. *Arch Microbiol* 173: 333-338
- Aro EM, Virgin I and Andersson B (1993) Photoinhibition of Photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim Biophys Acta* 1143: 113-134
- Arsalane W, Rousseau B and Duval J-C (1994) Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: Competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem Photobiol* 60: 237-243
- Babcock GT (1987) The photosynthetic oxygen evolving process. In: Ames J (ed) *Photosynthesis*, pp 125-158. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands
- Barber J and De Las Rivas J (1993) A functional model for the role of cytochrome b559 in the protection against donor and acceptor side photoinhibition. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10942-10946
- Bennoun P (2001) Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1506: 133-142
- Boussac A and Etienne AL (1982) Oxido-reduction kinetics of signal II slow in Tris-washed chloroplasts. *Biochem Biophys Res Comm* 109: 1200-1205
- Butler WL, Visser JWM and Simons HL (1973) The kinetics of light-induced changes of C550,

- Cyt b559 and fluorescence yield in chloroplasts at low temperature. *Biochim Biophys Acta* 292: 140-151
- Carol P and Kuntz M (2001) A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci* 6: 31-36
- Caron L, Berkaloff C, Duval J-C and Jupin H (1987) Chlorophyll fluorescence transients from the diatom *Phaeodactylum tricorutum* : relative rates of cyclic phosphorylation and chlororespiration. *Photosynth Res* 11: 131-139
- de Wijn R and van Gorkom HJ (2002) S-states dependence of the miss probability in Photosystem II. *Photosynth Res*, in press
- Falkowski PG and Kolber Z (1986) Evidence for cyclic electron flow around Photosystem II in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol* 81: 310-312
- Geel C, Versluis W and Snel JFH (1997) Estimation of oxygen evolution by marine phytoplankton from measurement of the efficiency of photosystem II electron flow. *Photosynth Res* 51: 61-70
- Griffiths DJ (1973) Factors affecting the photosynthetic capacity of laboratory cultures of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar Biol* 21: 91-97
- Guillard RRR and Ryther JH (1962) Studies of marine planktonic diatoms. 1. *C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Gran Can J Microbiol* 8: 229-238
- Harris GP (1986) *Phytoplankton Ecology: Structure, Function, and Fluctuation*. Chapman & Hall, London, UK
- Jakob T, Goss R and Wilhelm C (1999) Activation of diadinoxanthin de-epoxidase due to a chlororespiratory proton gradient in the dark in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Biol* 1: 76-82
- Joliot P, Barbieri G and Chabaud R (1969) Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II. *Photochem Photobiol* 10: 309-329
- Joliot P and Joliot A (1968) A polarographic method for detection of oxygen production and reduction of hill reagent by isolated chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 153: 625-634
- Kok B, Forbush B and McGloin M (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem Photobiol* 11: 457-475
- Krause GH and Weis E (1991) Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol* 42: 313-349
- Lavaud J, Rousseau B, van Gorkom HJ and Etienne A-L (2002) Influence of the diadinoxanthin pool size on photoprotection in the marine planktonic diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol* 129:1398-1406
- Lemasson C and Etienne A-L (1975) Photo-inactivation of system II centers by carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone in *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim Biophys Acta* 408: 135-142
- Lewis MR, Horne EPW, Cullen JJ, Oakey NS and Platt T (1984) Turbulent motions may control phytoplankton photosynthesis in the upper ocean. *Nature* 311: 49-50
- McCarty RE and Racker E (1967) The inhibition and stimulation of photophosphorylation by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem* 242: 3435-3439
- Nebdal L, Samson G and Whitmarsh J (1992) Redox state of a one electron component controls the rate of photoinhibition of Photosystem II. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7929-7933
- Olaizola M, Laroche J, Kolber Z and Falkowski PG (1994) Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth Res* 41: 357-370
- Owens TG (1986) Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol* 80: 739-746
- Prasil O, Zbigniew K, Berry JA and Falkowski PG (1996) Cyclic electron flow around Photosystem II *in vivo*. *Photosynth Res* 48: 395-410
- Reinfelder JR, Kraepiel AML and Morel FMM (2000) Unicellular C<sub>4</sub> photosynthesis in a marine diatom. *Nature* 407: 996-999
- Richardson K, Beardall J and Raven JA (1983) Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol* 93: 157-191
- Ritz M, Neverov KV and Etienne A-L (1999) ΔpH-dependent fluorescence quenching and its photoprotective role in the unicellular red alga *Rhodella violacea*. *Photosynthetica* 37: 267-280
- Schenk CC, Diner B, Mathis P and Satoh K (1982) Flash-induced carotenoid radical cation formation in photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 680: 216-227
- Shoshan V and Selman BR (1980) The interaction of N,N'-dicyclohexylcarbodiimide with chloroplast coupling factor 1. *J Biol Chem* 255: 384-389
- Thompson LK and Brudvig GW (1988) Cyt b559 may function to protect photosystem II from photoinhibition. *Biochemistry* 27: 6653-6658
- Ting CS and Owens TG (1993) Photochemical and non-photochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Plant Physiol* 101: 1323-1330
- van den Hoek C, Mann DG and Jahns HM (1995) *Algae: An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, UK

van Leeuwen PJ, Heimann C, Gast P, Dekker JP and van Gorkom HJ (1993) Flash-induced redox changes in oxygen-evolving spinach Photosystem II core particles. *Photosynth Res* 38: 169-176

Visser JWM, Rijgersberg CP and Gast P (1977) Photooxidation of chlorophyll in spinach

chloroplasts between 10 and 180 K. *Biochim Biophys Acta* 460: 36-46

Whitmarsh J and Pakrasi HB (1996) Form and function of cytochrome b-559. In: Ort DR and Yocum CF (eds) *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, pp 249-264. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands

\*\*\*\*\*



# CHAPITRE III

## 3<sup>ème</sup> PARTIE

### *6- Recherches en cours :*

#### *6- 1. La photoacclimatation*

*et*

#### *6- 2. La caractérisation biochimique des LHCF*

---

## **PHOTOACCLIMATATION DE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* : MODIFICATIONS DE L'APPAREIL PHOTOSYNTHETIQUE ET DE LA RELATION ENTRE LA DIATOXANTHINE ET LE NPQ.**

Les diatomées comme tous les autres organismes photosynthétiques sont capables, dans une certaine mesure, d'adapter leur appareil photosynthétique aux caractéristiques de la lumière qu'elles reçoivent pendant leur croissance. En d'autres termes les mécanismes de photoprotection (nous avons étudié ceux qui concernent les centres réactionnels PS II et leur antenne) sont progressivement accompagnés d'une modification de la structure de l'appareil photosynthétique lorsque la forte intensité lumineuse persiste pendant plusieurs générations. Cette modification résulte de la photorégulation de l'expression de nombreux gènes et même si cette régulation se met très rapidement en route (comme le montre les quelques études chez les diatomées, voir Chapitre I, § II- 3. 4. 3. ), ses effets sur les structures n'apparaissent clairement qu'après quelques générations de cellules placées dans les nouvelles conditions de lumière.

Deux stratégies sont utilisées pour cette étude :

- 1) la caractérisation des cellules adaptées en moyenne et en forte lumière en comparaison de celles acclimatées en faible lumière (les cellules CL décrites dans les chapitres précédents),
- 2) l'étude de la cinétique des changements de l'appareil photosynthétique induits par une modification rapide de l'intensité lumineuse utilisée pour la croissance des cellules. Les cellules sont photoacclimatées à faible lumière (cellules LL, "Low Light") puis l'intensité utilisée pour la culture est modifiée et les cellules sont alors soumises à une intensité moyenne (cellules ML "Medium Light") puis à une intensité forte (cellules HL "High Light").

Notre objectif est de comprendre dans quelles proportions l'appareil photosynthétique peut être modifié par une modification brutale et importante du facteur lumière. L'originalité de cette approche consiste en l'étude des capacités de photoprotection des cellules acclimatées à moyenne et forte lumière et à déterminer si le cycle des xanthophylles et sa relation avec le NPQ sont modifiés. Les premiers résultats obtenus et présentés ici sont presque complets et

devraient prochainement donner lieu à la soumission d'une publication ("Kinetics of photoacclimation in response to a shift to high light of the diatom *Phaeodactylum tricoratum* adapted to low irradiance with special reference to the xanthophyll cycle") actuellement en cours de rédaction.

### 1- Cinétique d'acclimation de cellules cultivées en faible lumière, lorsque l'intensité lumineuse est augmentée en un seul palier à une valeur moyenne puis forte.

Dans un premier temps, nous avons suivi la croissance cellulaire et la variations des contenus pigmentaires au cours du temps de façon à déterminer la vitesse d'acclimatation des cellules lors d'un passage de  $40 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (LL) à  $500 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (ML) puis à  $1000 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  (HL). Pour ce faire, les cellules LL en phase exponentielle de croissance sont repiquées à une concentration de  $0,5 \mu\text{g Chl } a.\text{mL}^{-1}$  et mises en culture à une intensité ML. La Figure 1 montre qu'après une phase de latence de 8 h, le contenu cellulaire en Chl *a* commence à diminuer parallèlement à la croissance des cellules. Après 24 h, le contenu cellulaire en Chl *a* atteint un seuil minimal stable. Ce temps est similaire à celui de 20-25 h rapporté par Post *et al.* (1984, 1985) chez *Thalassiosira weissflogii* pour un changement de contenu cellulaire en Chl *a*.

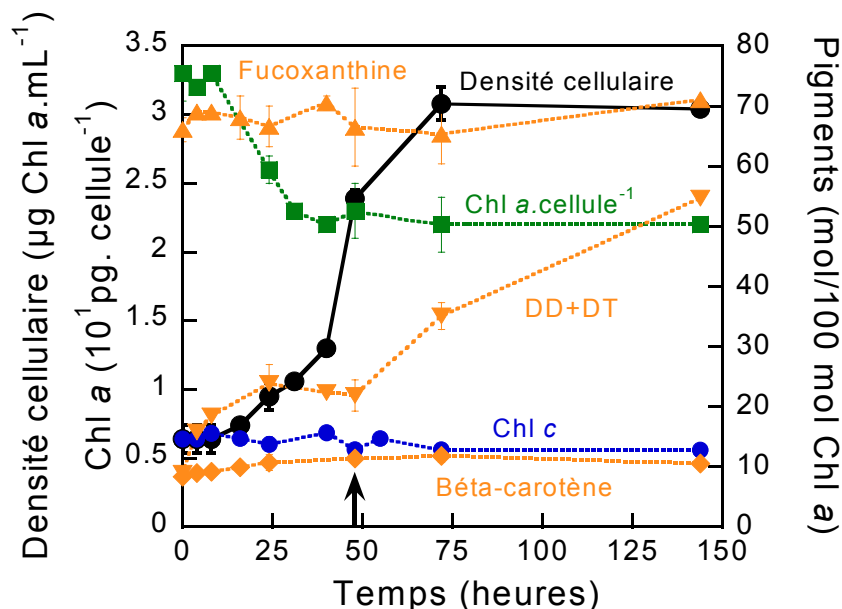


Figure 1. Cinétique de photoacclimatation de cellules de *P. tricoratum* cultivées à faible lumière (LL,  $40 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) et transférées à une intensité moyenne (ML,  $500 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) au temps 0. La flèche indique le type de cellules choisies pour caractériser l'état stable d'acclimatation à l'intensité ML. Toutes les données ( $\pm$  SD) sont la moyenne de 3 à 5 mesures.

Après 72 h, les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance. La proportion des autres pigments par rapport à la Chl *a* varie peu (à l'exception de la DD). La fucoxanthine est variable mais oscille autour d'une valeur moyenne qui est celle des cellules de départ (dans la limite de l'erreur), la Chl *c* montre une légère diminution, le  $\beta$ -carotène une légère augmentation. Le pool qui varie le plus est celui de la DD+DT. Cette variation a lieu en quatre temps : un doublement du pool en 4 h, puis une augmentation moins rapide jusqu'à la 25<sup>ème</sup> heure où le pool est alors le triple du pool initial (24 mol DD+DT/100 mol Chl *a*). Ensuite, la taille du pool stagne puis augmente à nouveau pour atteindre 35 mol DD+DT/100 mol Chl *a* après 72 h soit un pool cinq fois plus important que le pool initial. L'augmentation observée ensuite est due au fait que les cellules atteignent la phase stationnaire de croissance comme observé par Arsalane *et al.* (1994). A partir de ces données nous avons choisi de prélever les cellules après 48 h d'acclimatation. A ce stade, les cellules sont déjà bien acclimatées et elles sont encore en phase exponentielle de croissance.

Ces cellules acclimatées à  $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  sont ensuite repiquées à une concentration de  $0,5 \mu\text{g Chl } a\cdot\text{mL}^{-1}$  et cultivées à  $1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La Figure 2 montre la cinétique obtenue (les données récoltées sont pour l'instant peu nombreuses). Les cellules croissent lentement (environ deux fois moins vite que les cellules LL) et contrairement aux cellules ML n'atteignent pas aussi rapidement la phase stationnaire (elles sont encore en phase exponentielle au 4<sup>ème</sup> jour). Le contenu cellulaire en Chl *a* baisse légèrement. Les proportions en Chl *c*, fucoxanthine et  $\beta$ -carotène par rapport à la Chl *a* sont stables. Par contre, le pool de DD+DT montre un doublement en 24 h pour atteindre une valeur oscillant autour de 35-40 mol/100 mol Chl *a*.

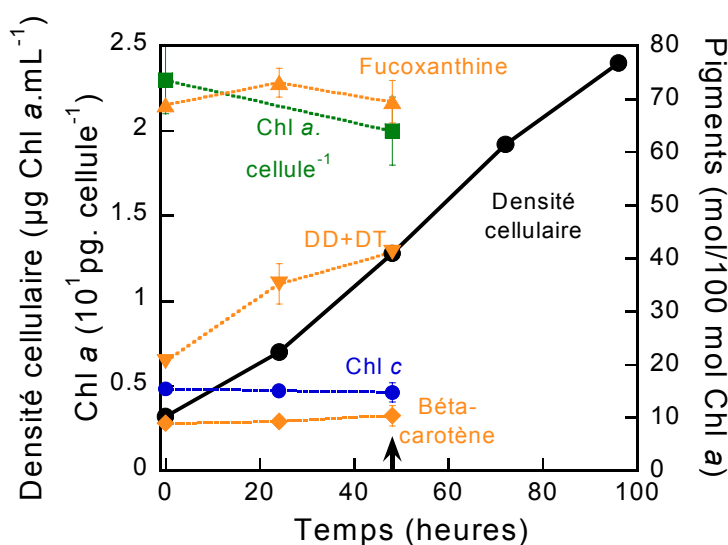


Figure 2. Cinétique de photoacclimatation de cellules de *P. tricornutum* cultivées à moyenne lumière (ML,  $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et transférées à une intensité forte (HL,  $1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) au temps 0. La flèche indique le type de cellules choisies pour caractériser l'état stable d'acclimatation à l'intensité HL. Toutes les données ( $\pm$  SD) sont la moyenne de 2 mesures.

## 2- Les modifications de l'appareil photosynthétique chez les cellules acclimatées à différentes intensités lumineuses.

A partir des cinétiques précédemment établies, nous avons choisi de caractériser les cellules ML et HL récoltées après 48 h d'acclimatation à 500 et 1000  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  respectivement. Cette caractérisation concerne le contenu pigmentaire, la quantité de centres PS II actifs et l'activité photochimique des cellules.

Le contenu pigmentaire est différent chez les cellules LL, ML et HL. Ce contenu peut être obtenu soit par cellule (Tableau 1) soit par rapport à la Chl *a* (Tableau 2).

**Tableau 1. Contenus pigmentaires par cellule (pg. cellule<sup>-1</sup>).**

Pigments	Cellules LL	Cellules ML	Cellules HL
Chl <i>a</i>	0,33 ± 0.02 <sup>a</sup>	0,23 ± 0.02	0,20 ± 0.03
Chl <i>c</i>	0,052	0,030	0,030
Fucoxanthine	0,22	0,15	0,15
DD	<b>0,03</b>	<b>0,05</b>	<b>0,07</b>
DT	<b>0</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0050</b>
β-carotène	0,027	0,027	0,019

(<sup>a</sup>) Toutes les données (± SD) sont la moyenne de 3 à 5 mesures, sauf pour HL, 2 mesures.

**Tableau 2. Contenus pigmentaires par rapport à la Chl *a* (mol/100 mol Chl *a*).**

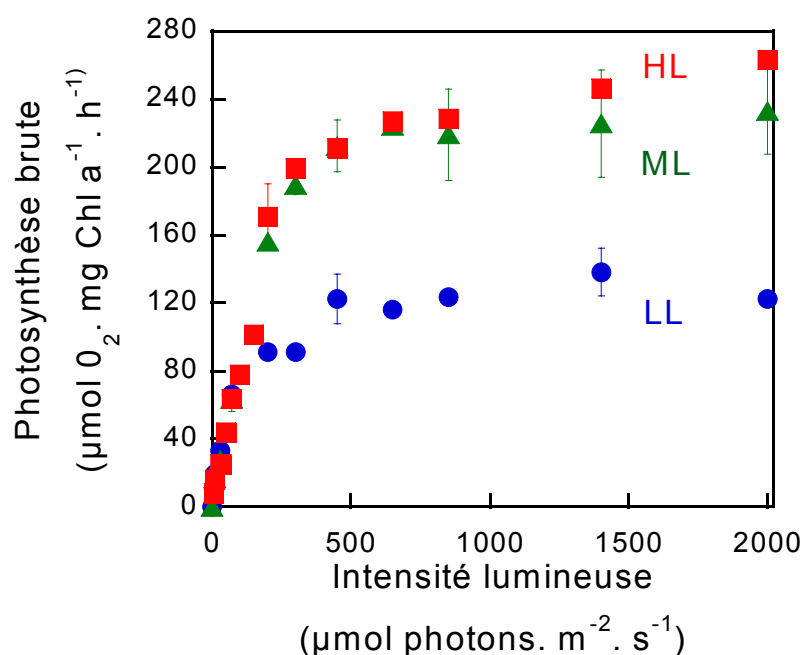
Pigments	Cellules LL	Cellules ML	Cellules HL
Chl <i>c</i>	15,7 ± 1,1 <sup>a</sup>	13 ± 0,8	15.1 ± 1
Fucoxanthine	66,1 ± 2,0	66.5 ± 6,5	73.1 ± 2,7
DD	<b>8,9 ± 1,3</b>	<b>21.9 ± 2,6</b>	<b>34.9 ± 2,8</b>
DT	<b>0 ± 0</b>	<b>0.25 ± 0,1</b>	<b>2,3 ± 2,3</b>
β-carotène	8,3 ± 0,3	11.7 ± 0,7	9,3 ± 1
Chl <i>a</i> /Chl <i>c</i>	6,4	7,7	6,6
Chl <i>a</i> /Fucoxanthine	1,5	1,5	1,4
Chl <i>a</i> /DD+DT	11,2	4,6	2,9

(<sup>a</sup>) Toutes les données (± SD) sont la moyenne de 3 à 5 mesures, sauf pour HL, 2 mesures.

Ces résultats appellent les commentaires suivants. Il est clair que le contenu cellulaire en Chl *a* diminue avec l'augmentation de l'intensité lumineuse. Il semble tout de même que la concentration atteinte à  $500 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (qui est l'intensité de saturation de l'émission d' $\text{O}_2$  des cellules LL, voir Chapitre III, § I-) soit un seuil puisqu'une plus forte intensité ne produit quasiment pas de baisse de la Chl *a* cellulaire. Cette réduction de la Chl *a* correspond à un phénomène connu (voir Chapitre I-Introduction, § II-3.4.2. a.). Elle correspond à une diminution du nombre de thylakoïdes par cellule et donc à une réduction globale de l'ensemble de l'appareil photosynthétique. Ceci sera à vérifier par la réalisation de coupes transversales des cellules ML et HL et leur observation au microscope électronique comme réalisé pour les cellules IL (voir § I-). Cette situation est confirmée par la baisse parallèle des contenus par cellule des autres pigments (Chl *c*, fucoxanthine et  $\beta$ -carotène, Tableau 1). Plus intéressantes sont les variations de ces pigments par rapport à la Chl *a* (Tableau 2). Les modifications des proportions Chl *a*/Chl *c*/fucoxanthine restent faibles. Par contre, le rapport Chl *a*/(DD+DT) varie énormément, diminuant à chaque "palier" de lumière (de 11,2 à 4,6 puis 2,9). Ces variations sont dues à la fois à la diminution de la Chl *a* par cellule et à l'augmentation du pool de DD par cellule (Tableaux 1 et 2). Cette augmentation d'un facteur 4 de la DD par rapport à la Chl *a* concorde tout à fait avec les observations réalisées sur *Haslea ostrearia* et *Skeletonema costatum* (Mouget *et al.*, 1999; Anning *et al.*, 2000). Pour ces deux types de cellules, la DT est présente "constitutivement" durant la culture montrant ainsi l'existence d'un  $\Delta\text{pH}$  suffisant pour activer la dé-époxydase. La quantité de DT est d'autant plus importante que l'intensité lumineuse est forte. Ceci est identique aux observations rapportées chez *Nitzschia palea* et *Thalassiosira weissflogii* (Willemoës et Monas, 1991; Goericke et Welschmeyer, 1992). Ici, les conditions sont donc différentes de celles prévalant dans les cellules cultivées en lumière intermittente pour lesquelles l'augmentation du pool de DD se fait sans modification du contenu cellulaire des autres pigments (voir Chapitre III, § I-).

On a vu que malgré une diminution des principaux pigments accessoires (Chl *c* et fucoxanthine), leur rapport à la Chl *a* est très peu modifié. Cette observation suggère une faible variation de la taille d'antenne du PS II dans ces conditions de photoacclimatation. Cette supposition est confortée par la pente de la relation reliant l'émission d' $\text{O}_2$  à l'intensité lumineuse pour des illuminations faibles (de 10 à  $70 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) quand il n'y a pas de formation du NPQ (Fig. 3). Cette pente  $\alpha$  est plus faible pour les cellules ML et HL bien que les différences soient peu importantes, cependant la tendance existe (Tableau 3). Cette mesure

de taille antenne est à confirmer en mesurant l'émission d'O<sub>2</sub> par flash en fonction de l'intensité des flashes (voir Chapitre III, § 2-). Cette observation corrobore cependant celles réalisées par Falkowski et Owens (1980) et Falkowski *et al.* (1981) sur *Skeletonema costatum*. En effet, chez cette diatomée, lorsque l'intensité varie de quelques  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  à 100-150  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , on observe une diminution de la taille d'antenne du PS II et en parallèle une diminution de la Chl *c* (dans ces études, la fucoxanthine n'a pas été mesurée). Par contre, pour des intensités plus fortes, la taille d'antenne ne varie plus. Il semble donc que chez les diatomées, la flexibilité de la taille d'antenne soit limitée et que les modifications les plus importantes aient lieu à une échelle supérieure, c'est-à-dire au niveau du nombre de thylakoïdes.



**Figure 3.** Courbes P-E (émission d'O<sub>2</sub> en fonction de l'intensité lumineuse) des trois types de cellules de *P. tricornutum* acclimatées à 40 (LL), 500 (ML) et 1000 (HL)  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Toutes les données ( $\pm$  SD) sont la moyenne de 3 mesures.

**Tableau 3.** Paramètres des courbes P-I.

	Cellules LL	Cellules ML	Cellules HL
$R_d$ ( $\mu\text{mol O}_2\cdot\mu\text{g Chl a}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$-1,9 \pm 0,5$ <sup>a</sup>	$-2,8 \pm 2,6$	$-5,4 \pm 2,6$
$P_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol O}_2\cdot\mu\text{g Chl a}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) <sup>c</sup>	$125,2 \pm 2,3$	$225,2 \pm 1,4$	$246,0 \pm 4,3$
$I_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) <sup>d</sup>	$\cong 450$	$\cong 650$	$> 650$
$I_k$ ( $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) <sup>e</sup>	125	245	285
$\alpha$ ( $\mu\text{mol O}_2\cdot\mu\text{mol photons}^{-1}$ ) <sup>f</sup>	0,99	0,93	0,87

(<sup>a</sup>) Toutes les données ( $\pm$  SD) sont la moyenne de 3 mesures. (<sup>b</sup>) Taux de respiration. (<sup>c</sup>) Photosynthèse maximale. (<sup>d</sup>) Intensité lumineuse pour laquelle  $P_{\text{max}}$  est atteinte. (<sup>e</sup>) Intensité lumineuse pour laquelle NPQ apparaît. (<sup>f</sup>) Taille de l'antenne PS II.

La quantité de PS II a été mesurée soit par l'émission d'O<sub>2</sub> par flash (Y<sub>SS</sub>), soit par la fluorescence variable (F<sub>v</sub>) des cellules adaptées à l'obscurité. Les résultats sont clairs (Tableau 4) : le nombre de PS II baisse de 15 % pour les cellules ML et d'environ 50 % pour les cellules HL comparées aux cellules LL. Ceci a été classiquement observé précédemment (voir Chapitre I-Introduction, § II- 3. 4. 2. a. ). Les données sur les quantités de β-carotène (qui est spécifique des photosystèmes) restent difficile à interpréter tant que nous n'avons pas fait la mesure des quantités de PS I. Concernant la variation du nombre de PS I, il n'existe pas de consensus parmi les travaux précédents mais la plupart du temps, le nombre de PS I augmente.

**Tableau 4. Mesures du nombre de centres réactionnels PS II actifs.**

	Cellules LL	Cellules ML	Cellules HL
Y <sub>SS</sub> <sup>b</sup>	362 ± 18,7 <sup>a</sup>	312 ± 7	164 ± 6
F <sub>v</sub> <sup>c</sup>	598 ± 15	498 ± 18	374

(<sup>a</sup>) Toutes les données (± SD) sont la moyenne de 3 mesures. (<sup>b</sup>) Emission moyenne d'O<sub>2</sub> par flash. (<sup>c</sup>) Fluorescence variable.

La capacité photosynthétique des trois types de cellules est illustrée Figure 3 par l'émission d'O<sub>2</sub> en fonction de l'intensité lumineuse. Les différents paramètres issus de ces courbes sont présentés dans le Tableau 3. Les résultats obtenus sont classiques (voir Chapitre I-Introduction, § II- 3. 4. 2. a. ). Les taux de respiration à l'obscurité et de photosynthèse maximale sont plus élevés chez les cellules ML et HL. L'augmentation du taux de photosynthèse maximale est en général due à une augmentation des quantités et activités de certaines enzymes comme l'ATP synthase et la Rubisco (Beardall et Morris, 1976; Smith et Melis, 1988). Ceci permet à la cellule une meilleure utilisation des fortes intensités lumineuses. Ainsi, l'émission d'O<sub>2</sub> des cellules LL est saturée pour une intensité plus basse (450 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>) que les cellules ML et HL (650 μE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> et plus). L'intensité I<sub>k</sub> pour laquelle apparaît le NPQ (Henley, 1993; voir § suivant) est également plus élevée pour les cellules ML et HL (voir également Fig. 5), ce qui pourrait effectivement concorder avec l'augmentation de la quantité et/ou de l'activité de l'ATP synthase, mais ceci reste une hypothèse.

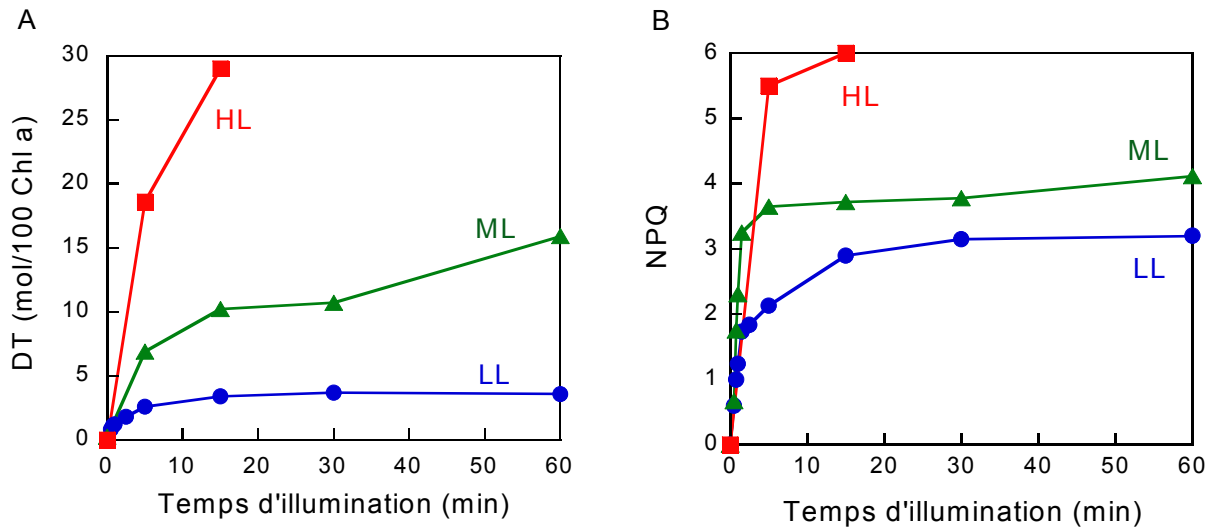


### ***3- Le NPQ et le cycle des xanthophylles chez les cellules photoacclimatées à faible, moyenne et forte intensité lumineuse.***

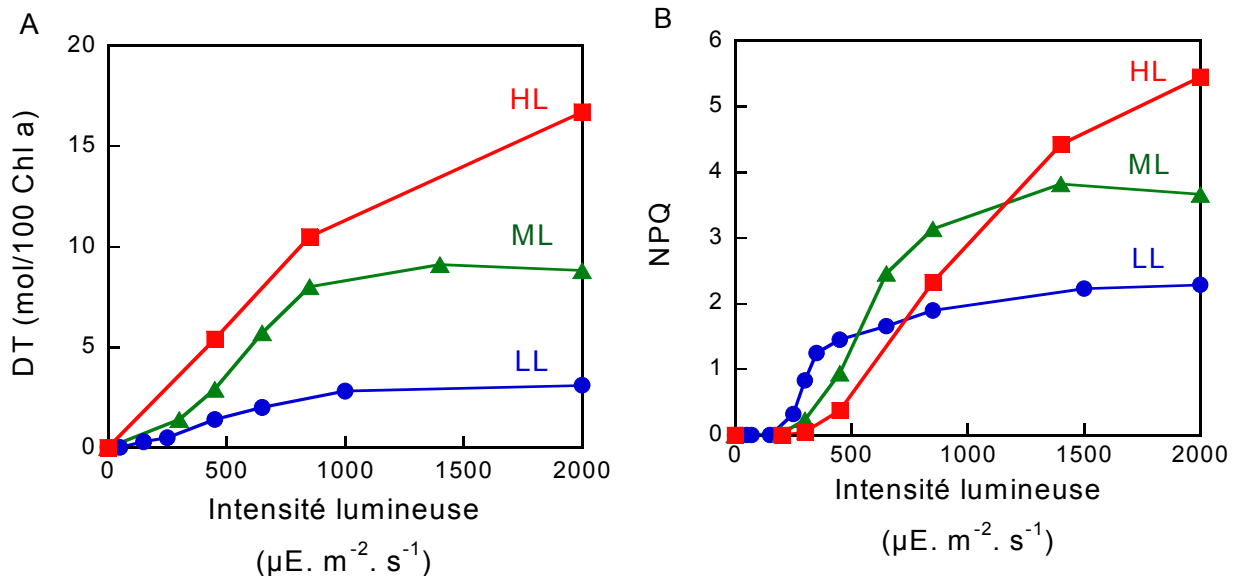
En tenant compte des conclusions de nos précédents articles, l'augmentation importante du pool de DD par rapport à la Chl *a* pose le problème de la localisation des xanthophylles du cycle pour les cellules acclimatées aux lumières moyenne et forte. Tout le pool peut-il encore être lié au complexe antenne ? Y a-t-il substitution d'une partie des molécules de fucoxanthine par des molécules des xanthophylles du cycle, comme c'est le cas chez les cellules cultivées en lumière intermittente ? Les xanthophylles du cycle sont-elles en partie, localisées dans la membrane lipidique comme suggéré par certains auteurs ? Si tel est le cas, la fraction lipidique du pool augmente-t-elle avec l'augmentation de l'intensité lumineuse ? Dans cette optique, qu'elle est alors la relation entre l'accumulation de DT et le NPQ ?

La formation de la DT et du NPQ suivent des cinétiques biphasiques au cours de l'illumination à  $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pour les cellules LL, ML et HL (Fig. 4). L'accumulation de DT et le développement du NPQ sont d'autant plus importants que l'intensité utilisée pour la culture des cellules est forte. Cependant, la différence de NPQ entre les ML et les LL est assez faible. Pour les cellules ML, il existe une synthèse *de novo* de DT entre 30 et 60 min d'illumination (le pool total DD+DT augmente de 18 à plus de 23 mol/100 Chl *a*). Pour les cellules HL, les données ne sont pas encore disponibles. Dans cette expérience, les cellules LL ne présentent pas de synthèse *de novo* de DT (voir Chapitre III, § 1-). Ce taux de synthèse *de novo* chez les cellules ML est élevé en comparaison des valeurs présentées § 1- :  $1.7 \text{ mmol DT}\cdot\text{mol Chl } a^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  contre  $0,3$  à  $0,5 \text{ mmol DT}\cdot\text{mol Chl } a^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$  pour la plupart des espèces de diatomées cultivées en LL.

La formation de la DT et l'apparition du NPQ en fonction de l'intensité lumineuse sont différentes pour les trois cultures (Fig. 5). L'accumulation de la DT est plus importante chez les cellules ML comparées aux LL et chez les HL comparées aux ML quelque soit l'intensité utilisée. Par contre, chez les cellules ML et HL, l'apparition du NPQ est décalée vers les plus fortes intensités : à partir de  $150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pour les cellules LL,  $200\text{-}250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pour les ML et  $300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pour les HL, ce qui confirme les valeurs de  $I_k$  obtenues avec les courbes d'émission d' $\text{O}_2$  (Tableau 3). Ensuite, au-delà d'une certaine intensité lumineuse, le NPQ développé par les cellules LL plafonne et est supplanté par celui des cellules ML. C'est chez les cellules HL que la formation du NPQ démarre le plus lentement mais atteint finalement les plus fortes valeurs.



**Figure 4.** (A-) Cinétiques d'accumulation de la DT et (B-) d'apparition du NPQ en fonction du temps sous une illumination de  $2000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  des trois types de cellules de *P. tricornutum* acclimatées à 40 (LL), 500 (ML) et  $1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL) (les cinétiques des cellules HL sont incomplètes). Les cellules sont adaptées à l'obscurité pendant 1 h avant la mesure, la concentration en DT est donc égale à 0.



**Figure 5.** (A-) Cinétiques d'accumulation de la DT et (B-) d'apparition du NPQ en fonction de l'intensité lumineuse pour un temps d'illumination fixe de 5 min des trois types de cellules de *P. tricornutum* acclimatées à 40 (LL), 500 (ML) et  $1000 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL). Les cellules sont adaptées à l'obscurité pendant 1 h avant la mesure, la concentration en DT est donc égale à 0.

La corrélation entre DT et NPQ est présentée Figure 6. Cette représentation est très instructive. Il est clair que la relation entre la concentration en DT et le NPQ formé n'est pas la même pour les trois types de cellules. La corrélation linéaire qui a été précédemment décrite pour les cellules LL (voir Chapitre III, § 2-), existe également pour les ML et les HL mais avec les différences suivantes:

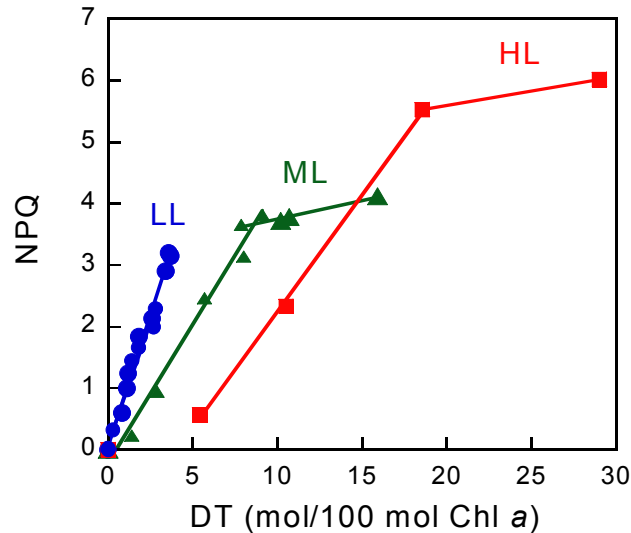


Figure 6. Relation NPQ versus DT pour les trois types de cellules de *P. tricornutum* acclimatées à 40 (LL), 500 (ML) et 1000  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (HL). Les données proviennent des Fig. 4 et 5.

1) Plus les cellules sont acclimatées à une forte lumière, plus la pente est faible : 0,45 et 0,38 pour les cellules ML et HL respectivement contre 0,85 pour les cellules LL. En d'autres termes, il faut plus de DT chez les cellules ML et encore plus chez les IL pour produire la même valeur de NPQ que chez les LL. À titre d'exemple pour un NPQ de 3, il faut 3,5 DT/100 Chl *a* pour les LL, 7 DT/ 100 Chl *a* pour les ML et 12 DT/ 100 Chl *a* pour les HL. La relation DT/NPQ chez les cellules HL pour de faibles valeurs de DT reste à mesurer.

2) Pour une intensité lumineuse de 2000  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et des durées d'illumination de 60 min chez les LL et 5 min chez les ML et HL, la relation linéaire atteint des valeurs de NPQ de 3,2 ; 3,6 et 5,5 respectivement. Alors que l'accumulation de DT atteint son maximum chez les cellules LL, elle continue chez les ML et HL mais l'incidence sur l'augmentation du NPQ est bien moindre comme le montre la brutale rupture de pente chez les ML et HL pour les valeurs élevées de DT. Ainsi, au-delà d'une certaine quantité de DT (de 10 mol/100 mol Chl *a* pour les cellules ML et de 18 mol/100 mol Chl *a* pour les cellules HL), la DT synthétisée en plus (qui correspond en partie à une synthèse *de novo* comme observée chez les ML) n'induit pas de NPQ supplémentaire ce qui suggère une localisation de la DT autre qu'une fixation sur les complexes antennes. Certains auteurs ont montré chez les plantes supérieures une localisation des xanthophylles dé-époxydées dans la membrane thylakoïdale où elles agiraient comme de puissants anti-oxydants permettant de réduire la peroxydation lipidique (Havaux et Niyogi, 1999; Havaux *et al.*, 2000). Il serait intéressant ici de confirmer ou d'infirmer cette possibilité chez *P. tricornutum*. Des mesures par thermoluminescence des produits de la peroxydation

lipidique pourrait par exemple nous permettre de détecter d'éventuelles différences entre les trois types de cellules sous des conditions d'illuminations données.

#### 4- La photoprotection chez les cellules acclimatées à moyenne intensité lumineuse.

Compte tenu des différences de NPQ observées entre les différents types de cellules et des observations réalisées précédemment (voir Chapitre III, 2- et 4- ), les valeurs supérieures de NPQ observées chez les cellules ML et HL devraient correspondre à une dissipation de l'énergie absorbée en excès plus importante et donc conduire à une meilleure photoprotection des centres réactionnels PS II. Comme pour la comparaison des cellules CL et IL, l'émission d'O<sub>2</sub> par flash a été utilisée pour mesurer la diminution d'activité des centres PS II dans deux conditions d'illumination : en fonction de l'intensité lumineuse pour une durée fixe de 5 min (Fig. 7). Les variations d'activité PS II répondent strictement à celles du NPQ : au-delà de 500  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , le NPQ des cellules ML supplante largement celui des cellules LL (Fig. 5) ce qui aboutit à une baisse de l'activité PS II moindre. Il semble donc que les cellules ML ait une meilleure photoprotection en relation directe avec un NPQ et une accumulation de DT plus importants. Il convient maintenant de réaliser ces mesures pour les cellules HL.

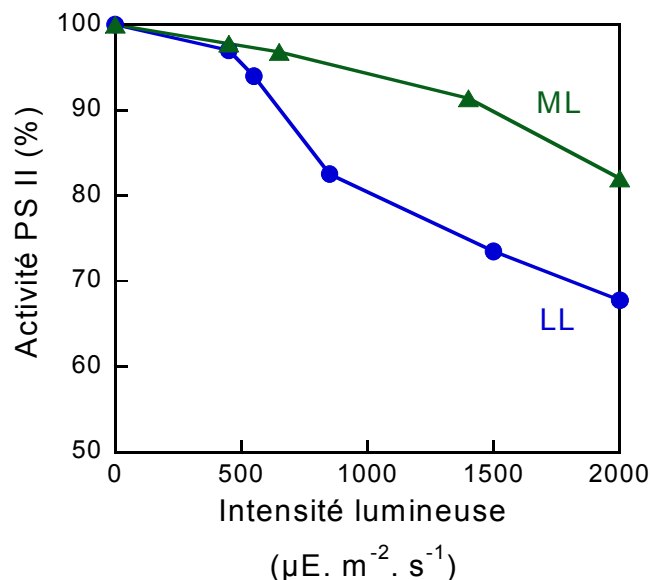


Figure 7. Cinétiques de perte d'activité PS II en fonction de l'intensité lumineuse pour un temps d'illumination fixe de 5 min des deux types de cellules de *P. tricornutum* acclimatées à 40 (LL) et 500  $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  (ML).

## 5- Conclusion.

L'ensemble de ces premiers résultats et ceux des articles précédents conduisent aux conclusions suivantes. La variation de la pente de la relation linéaire entre NPQ et DT est une indication forte que la DT n'est pas le "quencher" direct de la Chl *a* excitée mais que c'est une modification de l'antenne induite par sa présence qui induit le NPQ. Cette hypothèse rejoint donc le modèle développé par Horton et collaborateurs (Horton *et al.*, 1996 ; Müller et Niyogi, 2001). En corollaire bien sûr, cela implique une modification des sous-unités des complexes antennes exprimées en moyenne et forte lumière par rapport à celles exprimées en faible lumière. Ainsi, les propriétés de dissipation de l'énergie lumineuse et la relation DT/NPQ varieraient avec ces modifications structurales. Il est donc nécessaire d'identifier ces changements de synthèse protéique. Les premiers résultats obtenus (voir Chapitre III, § 6- 2. ) vont tout à fait dans ce sens. Il est également indispensable d'étudier la photorégulation de l'expression de la famille des gènes *lhcf*, domaine dans lequel peu de résultats sont pour l'instant disponibles.

Une autre observation importante est que la diminution des capacités d'absorption des cellules à fortes lumières (diminution de la quantité de Chl *a* et dans une moindre mesure de la taille d'antenne PS II) ne conduit pas, comme un raisonnement simple pouvait le prédire, à une atténuation de la photoprotection liée à la dissipation de l'énergie absorbée en excès. Au contraire, plus les cellules sont cultivées en forte lumière plus leur capacité de dissipation photoprotective est importante. Néanmoins, ce sont quand même les cellules cultivées en lumière intermittente qui possèdent les plus grandes capacités de photoprotection ; le NPQ des cellules HL n'atteint que la moitié du maximum 12 atteint chez les cellules IL pour le NPQ. Dans ce cadre, c'est donc le rapport Chl *a*/DD qui connaît les plus fortes modifications au sein de complexes antennes dont la taille mais aussi la composition protéique peut varier. D'après les résultats précédemment publiés, il semble que la variation de taille d'antenne est de 50 % maximum et est confinée à une échelle d'intensités allant de quelques  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  à  $100\text{-}150 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , au-delà la cellule diminue "la voilure" en abaissant le nombre de thylakoïdes par cellule. Par contre, quelque soit la taille d'antenne, la transmission de l'excitation au centre peut elle varier de 100 % à 5-10 % grâce à un ajustement très flexible et rapide du contenu en DD par rapport à la Chl *a* : ce fait est remarquable.

\*\*\*\*\*

## CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DU LHCF DE *PHAEODACTYLUM TRICORNUTUM* SOUmise A DIFFERENTS REGIMES LUMINEUX

A ce stade, il apparaît clairement que l'antenne collectrice de lumière des diatomées a des propriétés spécifiques qu'elle ne partage pas avec celle des antennes contenant de la Chl *a* et *b*, lutéine, néoxanthine et violaxanthine. Après les caractérisations fonctionnelles présentées dans les chapitres précédents, il s'avère nécessaire d'identifier et de caractériser les différentes sous-unités dont l'association forme le macrocomplexe antennaire. Une purification biochimique du LHCF a été entreprise. Les techniques utilisées ont été décrites dans le Chapitre II-Matériels et Méthodes. Notre objectif principal est d'identifier les sous-unités qui composent le complexe antenne des diatomées pour confirmer ou infirmer le fait qu'elles semblent beaucoup plus similaires entre elles que les sous-unités des plantes supérieures où elles sont multiples et très différenciées (voir Chapitre I-Introduction, § I-1. 2. 3. ). La caractérisation que nous entreprenons concerne l'identification des protéines (ainsi que leur nombre) qui correspondent chacune à des sous-unités et l'identification des pigments qu'elles lient, avec une attention particulière pour les xanthophylles du cycle (DD et DT).

Les étapes expérimentales de cette partie de ce travail sont les suivantes :

- 1) obtenir des fractions LHCF purifiées et natives avec une décomposition progressive en éléments aussi nombreux que possible et dont il est souhaitable que l'état natif soit conservé.
- 2) en déterminer les contenus pigmentaires ainsi que leurs spectres d'absorption, d'émission et d'excitation et de fluorescence à basse température.
- 3) identifier, après complète dénaturation, le nombre de protéines participant au complexe antenne et les caractériser en remontant jusqu'à leurs gènes et en comparant les profils d'expression dans les différentes conditions de culture utilisées : régimes lumineux CL ou LL, IL, ML et HL.

Les résultats décrits ci-après sont encore largement incomplets et devront être complétés avant la rédaction définitive d'une publication sur le sujet ("Biochemical characterization of the light-harvesting complexes of a diatom with an increased diadinoxanthin pool size due to different light regimes"). Certains des résultats présentés sont inclus dans la publication présentée Chapitre III- 1- et soumise à **Journal of Phycology**.

**1- 1<sup>ère</sup> étape de purification du LHCF (libre ou associés aux deux photosystèmes) et caractérisation pigmentaire des trois fractions obtenues pour les cellules CL (ou LL) et IL.**

1- a- Identification des trois fractions isolées sur le gradient de densité.

Une première étape consiste en l'obtention d'une solution de membranes thylakoïdales la plus pure possible (voir Chapitre II-Matériels et Méthodes, § III- , Fig. 42). Elle est réalisée dans un premier temps sur les cellules CL (ou LL). Ces membranes sont ensuite soumises à l'action d'un détergent doux (la digitonine). Le produit est déposé sur gradient de densité (saccharose) et une première séparation de trois bandes est obtenue après centrifugation (Fig. 1) :

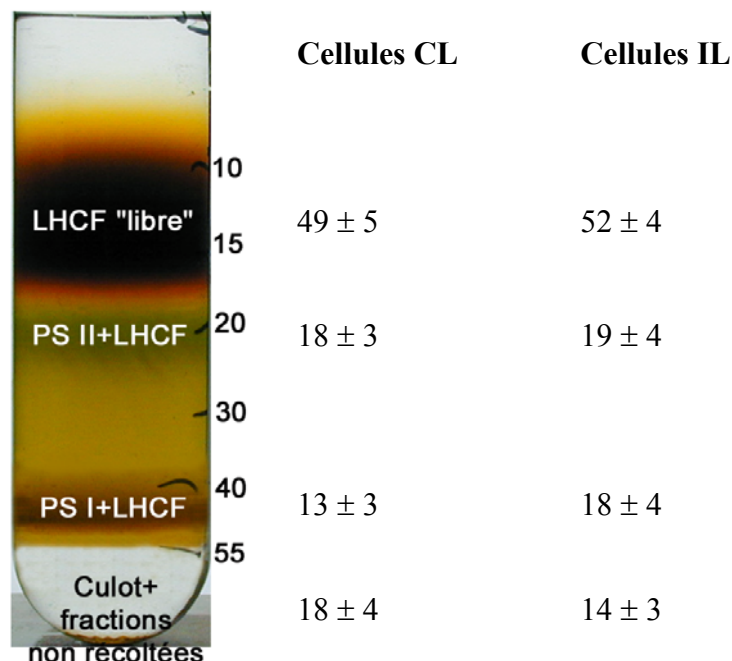
- à 10-15 % de saccharose une bande majoritaire qui constitue le LHCF "libre" et qui contient environ 50 % de la Chl *a* totale déposée sur le gradient.

- à 20 % de saccharose, une bande enrichie en PS II contenant environ 20 % de la Chl *a*.

- à 40 % de saccharose, une bande enrichie en PS I contenant environ 15 % de la Chl *a*.

Le culot ainsi que les fractions non récoltées (car mal dissociées) représentent seulement 15 à 20 % de la Chl *a* totale. L'identification des bandes est basée sur les résultats précédemment publiés au laboratoire et utilisant le même protocole de purification (voir Passaquet *et al.*, 1991 ; De Martino *et al.*, 1997, 2000).

La même opération a été effectuée pour les cellules IL. Le même type de profil est obtenu. La quantité de Chl *a* constituant chacune des bandes est similaire (Fig. 1).



**Fig. 1.** Fractions isolées sur gradient de densité (saccharose) après action de la digitonine sur les membranes thylakoïdales de *Phaeodactylum tricornutum*. Les chiffres à droite indique la concentration en saccharose (en %). A droite, le contenu en Chl *a* (en % du total déposé sur le gradient) de chaque fraction pour les cellules poussées en lumière continue (CL) et en lumière intermittente (IL). Les données sont la moyenne de 3 mesures.

1- b- Composition pigmentaire des trois fractions isolées sur le gradient de densité.

Les Tableaux 1 et 2 montrent les contenus pigmentaires déterminés par HPLC pour les différentes fractions du gradient de saccharose pour les deux types de culture. La fraction LHCF est enrichie en fucoxanthine et Chl *c* et appauvrie en  $\beta$ -carotène. Les fractions PS I+LHCF et PS II+LHCF sont à l'inverse appauvries en Chl *c* et fucoxanthine et enrichies en  $\beta$ -carotène (dans la suite le "+LHCF" disparaît parfois pour simplification). La fraction PS I possède nettement plus de fucoxanthine (15 mol/100 mol Chl *a*), un peu plus de Chl *c* (3 mol/100 mol Chl *a*), et légèrement moins de  $\beta$ -carotène que la fraction PS II. Par contre les contenus en DD sont identiques pour les deux fractions LHCF associées aux photosystèmes.

**Tableau 1. Contenu pigmentaire des trois fractions isolées sur gradient de densité pour des cellules CL adaptées à l'obscurité.**

Pigments (mol/100 mol Chl <i>a</i> )	Cellules de départ	LHCF "libre"	PS II + LHCF	PS I + LHCF
Chl <i>c</i>	15,9 ± 0,3 <sup>a</sup>	24,8 ± 1,0	5,8 ± 1,0	8,7 ± 0,06
Fucoxanthine	68,4 ± 3,0	110,0 ± 5,9	31,0 ± 1,5	47,3 ± 3,2
<b>DD</b>	<b>9,5 ± 1,5</b>	<b>9,6 ± 2,3</b>	<b>10,5 ± 0,7</b>	<b>8,9 ± 0,4</b>
$\beta$ -carotène	8,0 ± 1,1	1,8 ± 0,2	15,1 ± 1,8	12,3 ± 2,7

(<sup>a</sup>) Toutes les données (± SD) sont la moyenne de 3 à 4 mesures.

**Tableau 2. Contenu pigmentaire des trois fractions isolées sur gradient de densité pour des cellules IL adaptées à l'obscurité.**

Pigments (mol/100 mol Chl <i>a</i> )	Cellules de départ	LHCF "libre"	PS II + LHCF	PS I + LHCF
Chl <i>c</i>	13,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	19,7 ± 1,2	5,1 ± 0,4	8,0 ± 2,4
Fucoxanthine	65,5 ± 3,5	95,6 ± 3,3	30,0 ± 3,6	46,0 ± 3,3
<b>DD</b>	<b>21,6 ± 1,8</b>	<b>27,6 ± 3,1</b>	<b>13,2 ± 1,7</b>	<b>13,4 ± 1,2</b>
$\beta$ -carotène	8,4 ± 0,2	2,3 ± 0,7	14,3 ± 2,2	12,0 ± 1,4

(<sup>a</sup>) Toutes les données (± SD) sont la moyenne de 3 à 4 mesures.

C'est le contenu en DD des différentes fractions des deux types de culture qui connaît les plus fortes variations. Pour les cellules CL, toutes les fractions en possèdent la même proportion de DD que les cellules de départ, soit 8 à 10 mol DD/100 mol Chl *a*. Pour les cellules IL dont le pool de DD est au moins le double de celui des CL, la situation est très différente. La fraction LHCF est beaucoup plus enrichie en DD que les fractions PS I et PS II



qui sont elles-mêmes légèrement enrichies par rapport aux fractions correspondantes chez les cellules CL. Enfin, quand on compare les fractions LHCF obtenues chez les deux types de cellules, on constate que leur composition en xanthophylles diffère. En effet, chez les cellules IL, l'enrichissement en DD est accompagné d'un appauvrissement en fucoxanthine par rapport aux cellules CL. Par contre la somme des xanthophylles fucoxanthine+DD est constante au sein du LHCF des deux types de cellules. Ces informations sont discutées dans le Chapitre III- I- correspondant à une publication soumise à Journal of Phycology.

A ce stade, on constate donc qu'une partie importante du LHCF est facilement détachée par action d'un détergent doux et que restent attachées aux deux photosystèmes deux fractions LHCF minoritaires. Ceci pourrait indiquer une hétérogénéité des LHCF entre antenne distale et antenne proximale, la composition pigmentaire des deux antennes distales PS I et PS II étant différente (l'antenne PS I semble plus riche en fucoxanthine et Chl *c*).

De plus, le cycle des xanthophylles est opérationnel dans les trois fractions. En effet, lorsque des cellules IL sont soumises à une forte illumination avant purification, on constate une conversion de la DD en DT dans les LHCF des trois fractions (Tableau 3). La somme des xanthophylles fucoxanthine+DD+DT de chaque fraction est constante par rapport aux cellules IL non illuminées. Alors que le taux de conversion est de 60 % dans les cellules entières, il atteint 67 % dans le LHCF "libre" mais surtout il est plus faible et identique (autour de 40-45 %) pour les pools LHCF qui restent liés aux photosystèmes. Ceci confirme qu'il y a bien une hétérogénéité des LHCF avec un LHCF "libre" deux fois plus riche en DD et dont la conversion est 25 % plus importante. Une telle hétérogénéité dans la distribution des xanthophylles participant au cycle a déjà été observée chez les plantes supérieures pour la VX (pour revue voir Eskling *et al.*, 1997). De même, il existe des différences de dé-époxydation de la VX entre l'antenne distale et proximale du PS II et au sein de l'antenne distale, entre les complexes mineurs (CP24, 26 et 29) et le LHCFII (Färber *et al.*, 1995 ; Ruban *et al.*, 1999). Ces différences de conversion ne sont pas encore bien comprises mais elles pourraient provenir d'une différence d'accessibilité de la VX à la dé-époxydase (Eskling *et al.*, 1997). Ainsi, chez les diatomées, la plus grande dé-époxydation de la DD dans le LHCF "libre" pourrait s'expliquer par le fait que la DD est plus accessible car localisée en périphérie du complexe antenne. Enfin, l'information importante (également rapportée chez les végétaux supérieurs) est que la conversion de la DD en DT a lieu aussi dans le LHCF qui reste lié au PS I. La possibilité d'une dissipation photoprotective de l'énergie identique à ce qui observé pour le PS II est donc envisageable à ce niveau (chez les végétaux supérieurs, on a longtemps cru que le cycle n'existait qu'au sein du complexe antenne PS II). Certaines de ces informations ainsi que la conséquence de cette dé-époxydation sur les propriétés spectrales du LHCF "libre" sont discutées plus longuement Chapitre III- I- .

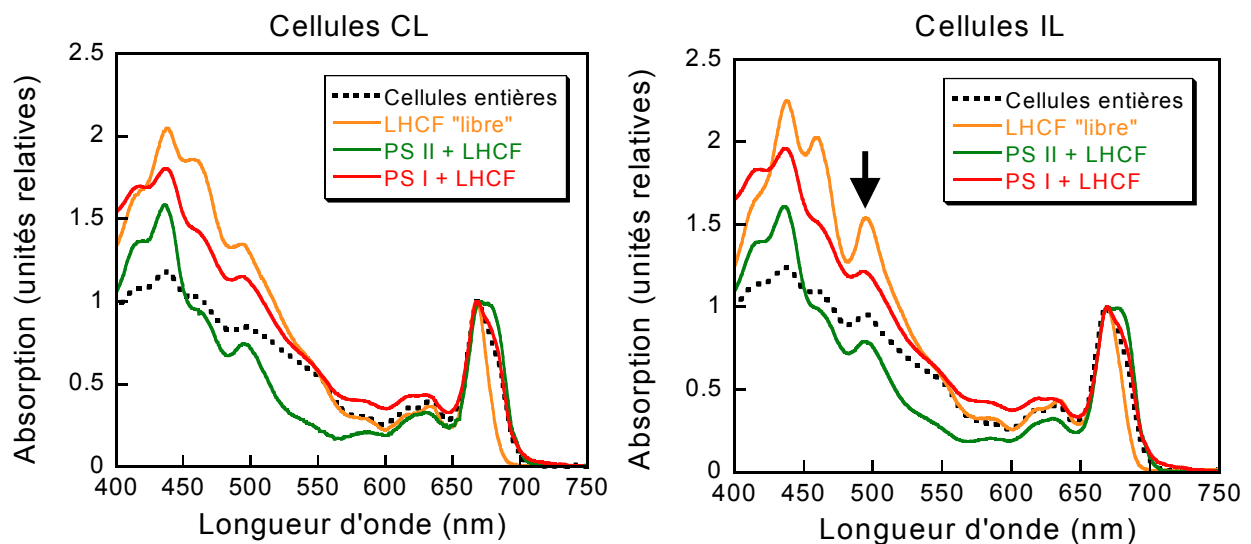
**Tableau 3.** Contenu pigmentaire des trois fractions isolées sur gradient de densité pour des cellules IL illuminées ( $5300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pendant 20 min) (cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois).

Pigments (mol/100 mol Chl <i>a</i> )	Cellules de départ	LHCF "libre"	PS II + LHCF	PS I + LHCF
Chl <i>c</i>	13,2	18,2	4,4	8,9
Fucoxanthine	66,7	93,2	27,2	55,6
<b>DD</b>	<b>9,1</b>	<b>9,3</b>	<b>10</b>	<b>7,7</b>
<b>DT</b>	<b>13,9</b>	<b>19,1</b>	<b>6,3</b>	<b>6</b>
$\beta$ -carotène	8,4	2,1	15,4	10,6
<b>DD+DT</b>	<b>23</b>	<b>28,4</b>	<b>16,3</b>	<b>13,7</b>
<b>CX (%)</b> <sup>a</sup>	<b>60</b>	<b>67</b>	<b>39</b>	<b>44</b>

<sup>(a)</sup> CX = DT/(DD+DT) x 100

### 1- c- Analyses spectrales des trois fractions isolées sur le gradient de densité.

Ce paragraphe reprend des données partiellement disponibles et discutées, dans le Chapitre III- 1- . Les spectres d'absorption à 77°K des différentes fractions pour les deux types de cellules sont présentés Fig. 2.



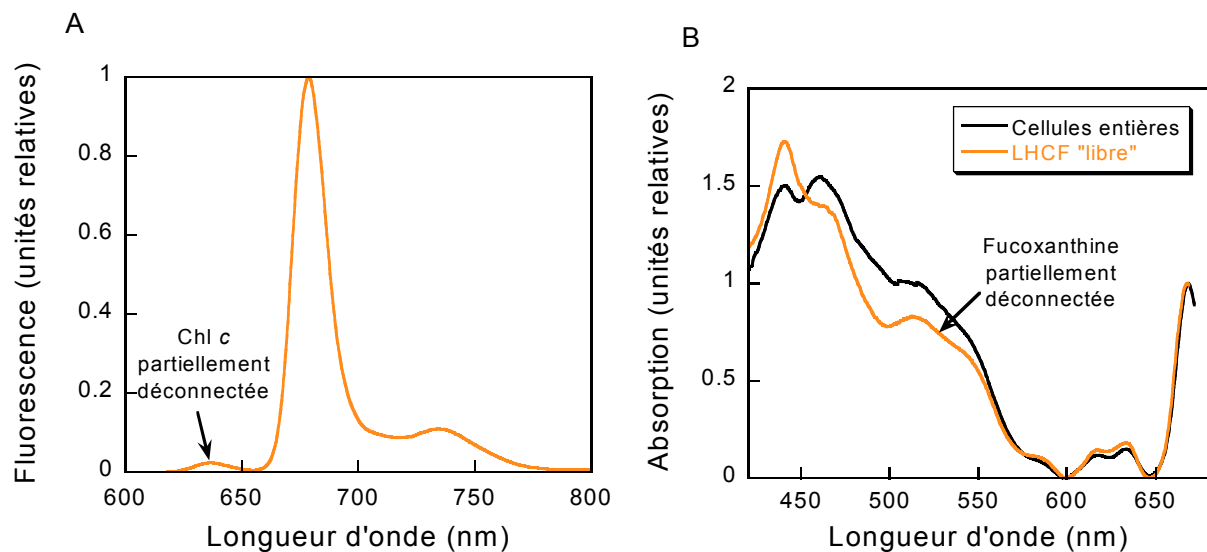
**Fig. 2.** Spectres d'absorption à 77°K des cellules entières et des trois fractions isolées sur le gradient de densité pour les cellules CL et IL. Les spectres sont normalisés à 667 nm (pic d'absorption de la Chl *a* dans le rouge). La flèche indique l'augmentation du pic d'absorption de la DD.

Sont à noter :

- la disparition de l'absorption grande longueur d'onde dans les LHCF qui est clairement visible sous forme d'un épaulement vers 690 nm pour les fractions PS I et PS II.

- la disparition d'une forme chlorophyllienne grande longueur d'onde également dans les fractions PS I comparées au PS II.
- une diminution de l'absorption dans la région 400-525 nm pour les fractions PS I et II, ce qui correspond à l'appauvrissement en Chl *c* et fucoxanthine détectée par les mesures HPLC.
- l'augmentation du pic de DD (495 nm) dans le LHCF IL, ceci corroborant les mesures pigmentaires.

Concernant les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence, seules les fractions LHCF "libres" ont pour le moment été traitées. Les spectres d'émission de fluorescence à 77°K (Fig. 3A) montrent trois pics ou épaulements : un léger épaulement à 635 nm correspondant à une fraction Chl *c* déconnectée, un pic principal à 677 nm et un épaulement à 735 nm. Les spectres d'excitation de fluorescence des deux types de cellules (Fig. 3B) sont similaires aux spectres d'excitation des cellules entières. La bosse observée entre 500-550 nm indique clairement que le transfert d'énergie entre la fucoxanthine et la Chl *a* est partiellement conservé : les fractions LHCF "libre" sont donc relativement natives.



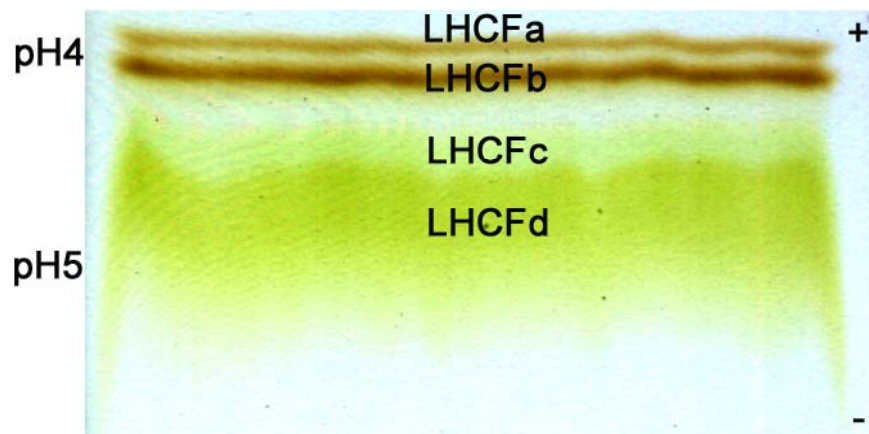
**Fig. 3.** A- Spectres d'émission de fluorescence à 77°K des fractions LHCF des cellules CL (excitation à 440 nm). Les spectres sont normalisés au pic d'émission à 677 nm. B- Spectres d'excitation de fluorescence à 77°K des mêmes fractions (émission à 677 nm). Les spectres sont normalisés au pic à 667 nm. Dans les deux cas, les spectres obtenus pour les fractions LHCF des cellules IL sont extrêmement similaires (comme pour les spectres d'absorption, Fig. 2) voire identiques comme pour le spectre d'émission de fluorescence (voir Chapitre III- 1-).

## 2- Séparation de la fraction LHCF “libre” en sous-fractions par IEF non dénaturante.

### 2- a- Identification des quatre fractions isolées sur le gel IEF.

Pour une meilleure identification de la bande LHCF “libre” isolée sur gradient de densité, une séparation par focalisation isoélectrique (IEF) dans des conditions non dénaturantes est réalisée. Ainsi, les protéines pigmentaires migrent le long d'un gradient de pH 7-3 en fonction de leur point isoélectrique (pI) en préservant en partie les connexions pigmentaires. Comme le montre la Figure 4, cette technique permet de distinguer différentes composantes du LHCF “libre” que ce soit pour les cellules CL ou IL (seul le profil obtenu pour les cellules CL est montré). On observe quatre bandes différenciables par leur pI et leur couleur :

- à pH 5,5-5, une bande brun clair diffuse, le LHCF d qui représente environ 30 % de la Chl *a* totale déposée sur le gel d'IEF.
- à pH 5, une bande verte, le LHCF c qui représente environ 5 % de la Chl *a* totale.
- à pH 4, deux bandes brunes et fines, les LHCF b et a qui représentent respectivement 10-15 % et 5 % de la Chl *a* totale.



Fractions IEF	Cellules CL	Cellules IL
LHCF a	5 ± 2	3
LHCF b	14 ± 2	11
LHCF c	4 ± 1	7 ± 1
LHCF d	27 ± 2	30 ± 5
Non récolté	48 ± 5	50 ± 5

**Fig. 4.** Fractions isolées à partir du LHCF “libre” au cours de la focalisation isoélectrique. En-dessous, le contenu en Chl *a* (en % du total déposé sur le gel IEF) de chaque fraction pour les cellules poussées en lumière continue (CL) et en lumière intermittente (IL). Les données sont la moyenne de 2 à 3 mesures.

## 2- b- Composition pigmentaire des quatre fractions isolées sur le gel IEF.

Les compositions pigmentaires des quatre bandes LHCF isolées sur le gel d'IEF à partir de la fraction LHCF "libre" sont présentées Tableau 4 pour les cellules CL et Tableau 5 pour les cellules IL. Pour les LHCF c et d, les deux jeux de données n'ont pas été moyennés. De même pour les deux types de cultures, sont figurés deux exemples pour lesquels le pool de DD est plus ou moins important. Ces résultats appellent les commentaires suivants.

Les quatre bandes discernées peuvent être rassemblées en deux groupes distincts. Tout d'abord les LHCF a et b. Ces deux sous-fractions brunes sont composées de fucoxanthine et Chl *c* dans des proportions identiques entre les deux bandes et entre les deux types de cellules. Elles ne possèdent pas de DD et pas ou très peu de  $\beta$ -carotène. Le taux de dégradation de la Chl *a* de ces bandes varie entre 5 et 20 %. Elles sont discernables uniquement sur la base de leur pI (un peu plus acide pour le LHCF a). Vue la différence de pI, leur composition protéique est donc certainement très proche : un seul acide aminé modifié pourrait en effet engendrer une différence de pI aussi faible (G. Guglielmi, com. pers.).

Les fractions LHCF c et d ensuite semble être le produit d'une seule sous-fraction (voir les deux jeux de données Tableaux 4 et 5). Le taux de dégradation de la Chl *a* de la bande LHCF c est élevé (entre 60 et 70 %) et celui de la LHCF d est très variable en fonction des essais (de 20 à 70 %). Au cours de la migration, la sous-fraction LHCF c pourrait se détacher de la LHCF d emportant avec elle une bonne partie de la fucoxanthine, de la Chl *c* et du  $\beta$ -carotène (assez souvent la moitié du total) mais par contre quasiment pas de DD. Si l'on regroupe les deux sous-fractions, LHCF c+d contient alors de la fucoxanthine, de la Chl *c*, de la DD et du  $\beta$ -carotène. Elle est moins riche en fucoxanthine et en Chl *c* que les LHCF a et b (- 20-25 % dans les deux cas) mais contient toute la DD et une très grande majorité voire tout le  $\beta$ -carotène. Cependant, vu le taux de dégradation de la Chl *a*, il est vraisemblable que ces deux fractions LHCF c et d soient très endommagées (voir également § 2. c. ). Les contenus pigmentaires de ces fractions sont donc peut-être artefactuels et particulièrement celui de la DD. Chez les plantes supérieures, la VX est plus ou moins libérée de ces sites de fixation en fonction des méthodes de purification, et ces molécules sont capables de se lier au cours d'une migration sur gel à des sites de sous-unités qu'elles n'occupent pas *in vivo* (A. Pascal, com. pers.). Il pourrait en être de même ici avec la DD et le fait que la fraction LHCF d soit dégradée ne nous permet pas de conclure que le LHCF d lie la totalité de la DD présente dans le LHCF "libre".

Nous ne retrouvons donc pas les deux complexes décrits précédemment par Friedman et Alberte (1984) et Owens (1986) qui font état d'un complexe majeur à Chl *a*/Chl *c*/fucoxanthine contenant 75 % de la Chl *a* et d'un complexe mineur à Chl *a*/Chl *c*. Cependant, les conditions dans lesquelles les algues étaient cultivées et le protocole de

purification (et en particulier les détergents utilisés) étaient différents. Nous ne pouvons donc pas aisément comparer nos résultats et les leurs.

**Tableau 4. Contenu pigmentaire des quatre bandes isolées sur le gel IEF à partir de la fraction LHCF “libre” pour des cellules CL adaptées à l’obscurité.**

Pigments (mol/100 mol Chl <i>a</i> )	LHCF “libre”	LHCF a	LHCF b	LHCF c	LHCF d	LHCF c+d
Chl <i>c</i>	25,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	37,3 ± 1,6	33,0 ± 1,9	29,9	26,1	28,0 ± 1,9
Fucoxanthine	113,4 ± 3,1	133	126,3	113,8	112,8	107,0 ± 6,4
				63,1	138,1	
<b>DD</b>	<b>12,9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>20</b>	<b>20,0</b>
	<b>7,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>15,4</b>	<b>16,4</b>
β-carotène	1,8 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,5	2,9	2,8	2,4 ± 0,5
				1,1	2,5	

(<sup>a</sup>) Toutes les données (± SD) sont la moyenne de 2 mesures.

**Tableau 5. Contenu pigmentaire des quatre bandes isolées sur le gel IEF à partir de la fraction LHCF “libre” pour des cellules IL adaptées à l’obscurité.**

Pigments (mol/100 mol Chl <i>a</i> )	LHCF “libre”	LHCF a	LHCF b	LHCF c	LHCF d	LHCF c+d
Chl <i>c</i>	19,5 ± 0,9 <sup>a</sup>	35,4	37,6	46,1	9,2	25,5 ± 2,3
				29,0	17,4	
Fucoxanthine	96,7 ± 3,9	132,6	127,4	73,7	127,1	100,9 ± 0,5
				113,6	89,2	
<b>DD</b>	<b>29,5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4,2</b>	<b>47,8</b>	<b>52,0</b>
	<b>17,8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1,1</b>	<b>26,7</b>	<b>27,8</b>
β-carotène	1,9 ± 0,8	1,5 ± 1,5	1,3 ± 1,3	1,1	2,0	2,3 ± 0,6
				4,1	1,7	

(<sup>a</sup>) Toutes les données (± SD) sont la moyenne de 2 mesures.

De la même façon que pour l'étape de purification précédente, pour des cellules éclairées, la dé-époxydation de la DD en DT est observée dans la bande LHCF c+d (Tableau 6). Le taux de conversion (68 %) est identique à celui trouvé dans le LHCF "libre" de départ. Là encore, il est difficile d'exploiter plus les résultats, sans risques de les surinterpréter, car les fractions LHCF c et d sont trop endommagées.

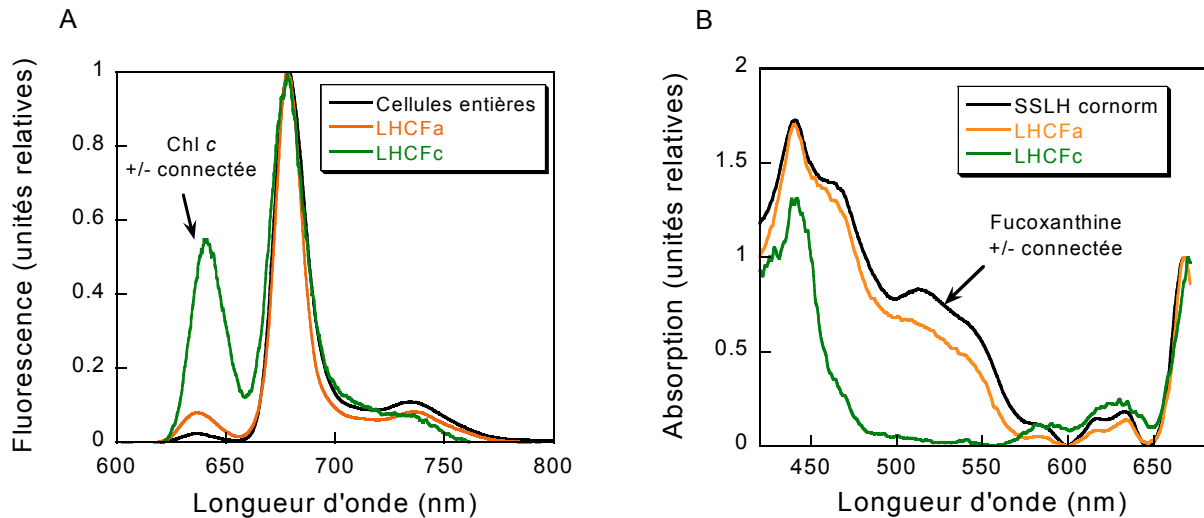
**Tableau 6.** Contenu pigmentaire des trois sous-fractions isolées sur le gel IEF à partir de la fraction LHCF "libre" pour des cellules IL illuminées ( $5300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  pendant 20 min) (cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois).

Pigments (mol/100 mol Chl <i>a</i> )	LHCF "libre"	LHCF a	LHCF b	LHCF c+d
Chl <i>c</i>	18,2	30,3	41,1	29,4
Fucoxanthine	93,2	138,6	140,4	109,8
<b>DD</b>	<b>9,3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>16,4</b>
<b>DT</b>	<b>19,1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>35,0</b>
$\beta$ -carotène	2,1	1,4	1,7	2,1
<b>DD+DT</b>	<b>28,4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>51,4</b>
<b>CX (%)</b> <sup>a</sup>	<b>67</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>68</b>

(<sup>a</sup>) CX = DT/(DD+DT) x 100

### 2- c- Analyses spectrales des trois fractions isolées sur le gradient de densité.

Les spectres d'absorption à 77°K n'apportent pas d'informations supplémentaires par rapport aux analyses HPLC mais confirment tout à fait celles-ci ; ils ne sont pas montrés. A cette étape de la purification, les spectres d'émission et d'excitation de fluorescence renseignent par contre sur l'état des transferts d'énergie entre les complexes pigments-protéines de chaque sous-fraction LHCF (Fig. 5). Ces spectres montrent que ces transferts d'énergie sont partiellement conservés dans les sous-fractions LHCF a et b (Chl *c* et fucoxanthine toujours connectées). Ainsi, ces deux bandes peuvent être considérées comme représentatives d'un état d'organisation existant *in vivo*. Par contre, les transferts d'énergie ont été dégradés au cours de l'IEF pour les sous-fractions LHCF c et d. L'étape suivante va donc consister à varier certaines parties du protocole de purification de façon à isoler des bandes aussi natives que possible afin de distinguer les complexes natifs des artefacts possibles. Plusieurs solutions sont envisageables dont l'amélioration du gradient de pH du gel d'IEF ou le remplacement de cette étape par une autre : par exemple, action directe d'un détergent très doux (comme l' $\alpha$ -ddm) sur la fraction LHCF "libre" suivie d'une séparation sur colonne DEAE échangeuse d'anions ou colonne permettant un fractionnement en fonction de la masse moléculaire.



**Fig. 5.** A- Spectres d'émission de fluorescence à 77°K des fractions LHCF "libre", LHCFa et LHCFc des cellules CL (excitation à 440 nm). Les spectres sont normalisés à 77°K. B- Spectres d'excitation de fluorescence à 77°K des trois mêmes fractions (émission à 677 nm). Les spectres sont normalisés à 667 nm. Les spectres de la fractions LHCF b sont similaires à la fraction LHCFa et ceux de la fraction LHCFd sont intermédiaires entre les situations observées chez les LHCFa et c. Les données obtenues pour les cellules IL sont identiques.

### 3- Détermination des sous-unités protéiques des différentes fractions LHCF et photosystèmes.

Les profils protéiques obtenus après dénaturation des protéines, pour les fractions LHCF "libre", PS I et II sont présentées Figure 6A pour les cellules CL. Le profil obtenu pour la fraction LHCF "libre" est similaire à ceux précédemment publiés (Fawley et Grosman, 1986 ; Owens et Wold, 1986 ; Caron et Brown, 1987). Le LHCF "libre" présente une bande majoritaire aux alentours de 18-19 kDa. Selon les différents auteurs, celle-ci est parfois dissociable en deux, voire trois bandes de poids moléculaire (PM) très proche. Des formes minoritaires de PM plus élevé sont également identifiables aux alentours de 30, 40 et 60 kDa. Selon Caron et Brown (1987), certaines de ces bandes seraient issues de contaminants provenant des fractions photosystèmes. Effectivement, si l'on compare le profil du LHCF "libre" et ceux des fractions photosystèmes, ces formes protéiques à haut PM sont retrouvées (Fig. 6A).

Les profils obtenus pour les quatre fractions LHCFa, b, c et d des cellules CL sont présentés Figure 6B. Pour chacune de ces fractions, on retrouve la bande majoritaire autour de 18-19 kDa mais celle-ci est plus ou moins "lourde" en fonction des fractions. Il semble donc que les sous-unités protéiques constituant chacune des fractions LHCF isolées sur par IEF non dénaturante soit, au moins en partie, différentes.

Cependant, la technique SDS-Page ne nous permet pas, comme prévu compte tenu de la littérature existant sur le sujet, de réellement distinguer ces sous-unités. En effet, si l'on

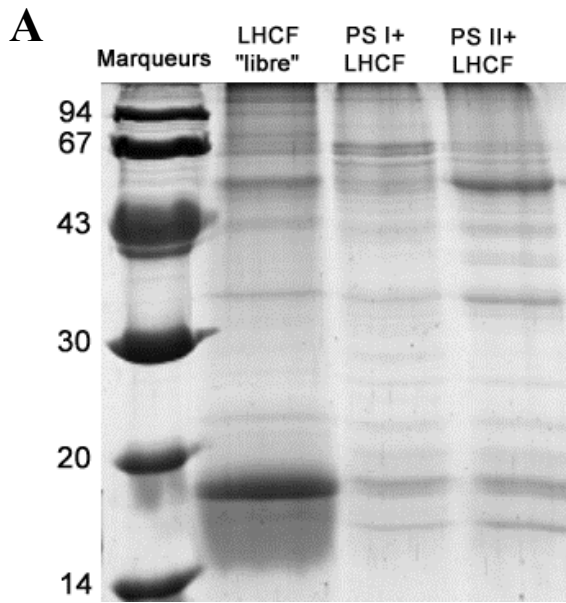


considère les six gène *lhcf* décrits par Bhaya et Grosman (1993) chez *P. tricornutum*, on constate que leur PM est extrêmement proche (Tableau 7). Par contre les pI de ces polypeptides sont, en tous cas pour certains d'entre eux, relativement différents et peuvent théoriquement être différenciés par focalisation isoélectrique dénaturante (voir le Chapitre II-Matériels et Méthodes, § III- ). Cette technique a précédemment été utilisée avec succès au laboratoire chez les algues brunes *Pelvetia canaliculata* et *Laminaria saccharina* (De Martino *et al.*, 1997, 2000).

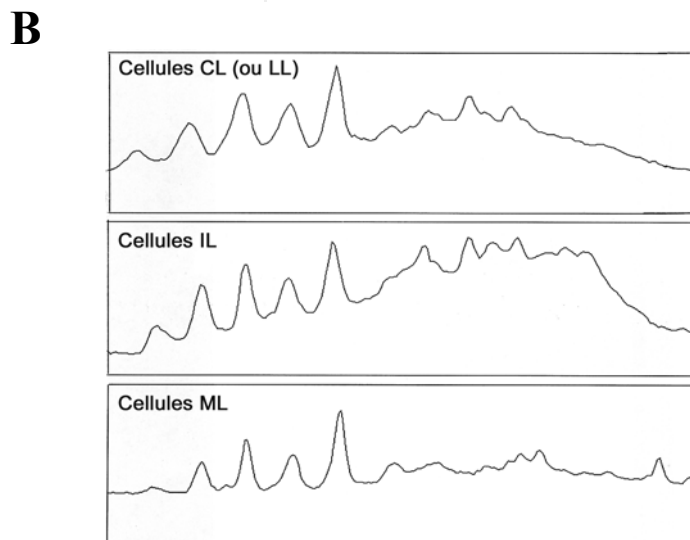
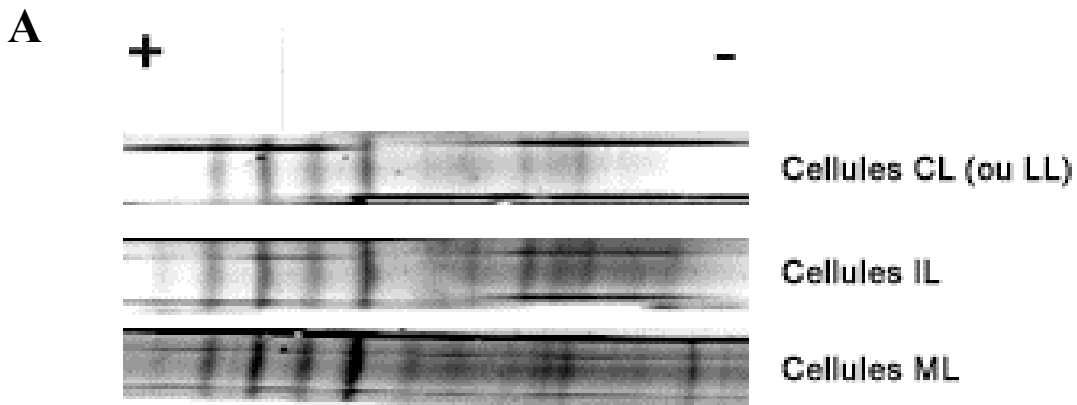
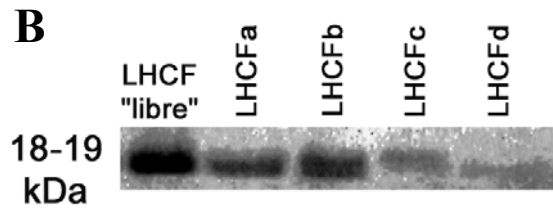
**Tableau 7. Poids moléculaire et point isoélectrique des six polypeptides LHCF décrits par Bhaya et Grosman (1993) chez *P. tricornutum*. Les PM et pI ont été recalculés à partir des séquences des gènes *lhcf a, b, c, d, e* et *f* incomplets, c'est-à-dire sans le peptide d'adressage au plaste.**

Protéines	Poids moléculaire (kDa)	Point isoélectrique (ou pI)
<i>Lhcf a</i>	18 034	4,60
<i>Lhcf b</i>	18 095	4,64
<i>Lhcf c</i>	18 092	4,37
<i>Lhcf d</i>	18 197	4,47
<i>Lhcf e</i>	18 092	4,37
<i>Lhcf f</i>	18 095	4,47

Nous avons appliqué la focalisation isoélectrique dénaturante sur les fractions LHCF “libre” des cellules LL, IL et ML (Fig. 7A). Chaque fraction présente une dizaine de polypeptides, ce qui est plus que les six précédemment décrits (Bhaya et Grosman, 1993) et similaire à ce qui a été récemment rapporté (Scala *et al.*, 2002). D'après les profils de densitométrie (Fig. 7B), il est possible de distinguer cinq composants majeurs (sur la gauche du profil) dont les quantités relatives sont variables en fonction des conditions d'illumination. Les autres composants sont mineurs (sur la droite du profil) et leur quantité relative ainsi que leur présence ou absence varient avec les conditions de lumière. Il semble donc clair que les sous-unités protéiques constituant les différentes fractions du complexe antenne sont exprimées différemment en fonction non seulement de l'intensité lumineuse incidente mais aussi du régime lumineux pour une intensité donnée. Cette technique de séparation est à optimiser mais les premiers résultats obtenus sont encourageants et les différentes fractions LHCF séparées par focalisation isoélectrique seront traitées sous peu. Il reste également à mesurer de manière précise le pI de chaque polypeptide.



*Fig. 6. A- Profils protéiques (technique SDS-Page) des trois fractions isolées sur gradient de densité pour les cellules CL (ou LL) : LHCf "libre", PS I+LHCf et PS II+LHCf. Les chiffres à droites indiquent le poids moléculaire (en kDa) des marqueurs. B- Elargissement de la zone 18-19 kDa obtenue par technique SDS-Page pour les fractions LHCf "libre", et les quatre fractions LHCf a, b, c et d isolées par focalisation isoélectrique pour les cellules CL (ou LL).*



*Fig. 7. A- Profils protéiques des fractions LHCf "libre" des cellules CL (ou LL), IL et ML obtenus par focalisation électrique dénaturante. B- Profils densitométriques enregistrés pour chacun des trois profils protéiques.*

#### **4- Conclusion.**

Cette étude préliminaire est très prometteuse et montre que les complexes antennes sont constitués de diverses sous-unités protéiques de masse moléculaire voisine mais dont les propriétés diffèrent par leur point isoélectrique, leur contenu pigmentaire et leur stabilité au cours des différentes étapes de purification. La localisation de ces sous-unités par rapport aux centres PS I et PS II est également différente puisqu'une petite proportion des complexes est co-purifiée avec les centres réactionnels. Ceci indique l'existence d'une antenne proximale et d'une antenne périphérique bien qu'elles soient moins différentes que leurs homologues des complexes antennes des plantes supérieures. Pour la suite, il est indispensable d'étudier les LHCF restant lié aux centres réactionnels. Des travaux préliminaires montrent en effet, que les sous-unités protéiques des fractions PS I+LHCF et PS II+LHCF sont diversement exprimées chez les cellules LL et ML. Concernant la localisation de la DD, comme nous l'avons vu, la fraction LHCF "libre" est plus riche que les fractions LHCF qui restent liées aux photosystèmes. Il sera important pour la suite de réussir à isoler des sous-fractions natives contenant de la DD, ce qui permettra d'en étudier les propriétés : la possible liaison de la DD avec des protéines spécifiques, les sites de fixation de la DD, sa configuration au sein des sous-unités, etc... autant d'informations qui peuvent aider à comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le NPQ. Le matériel dont nous disposons, cellules LL, IL, ML et HL, et qui est déjà largement caractérisé au niveau physiologique, va nous permettre d'étudier de façon à la fois globale et précise les effets des variations d'intensité et du régime lumineux sur la composition, l'organisation et les propriétés spectrales des complexes antennes.

\*\*\*\*\*

## **CHAPITRE IV**

# **CONCLUSIONS**

**ET**

# **PERSPECTIVES**

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Round *et al.* (1990) et plus récemment Falciatore et Bowler (2002) se sont penchés sur les “secrets biologiques” qui pourraient expliquer les formidables capacités adaptatives des diatomées à leur environnement très variable. D’après ces auteurs, certaines caractéristiques seraient propres aux diatomées; le degré de spécificité de l’écologie des diatomées en tant que groupe phytoplanctonique à part entière ayant jusqu’alors été largement ignoré en comparaison des autres groupes. Round *et al.* (1990) avancent l’idée que l’écologie des diatomées est régie par deux facteurs essentiels : la disponibilité en silice, composant de leur frustule, et la turbulence des eaux; ce dernier paramètre jouant lui-même sur la disponibilité en certains nutriments, les fluctuations lumineuses, etc... Dans ce cadre, ces auteurs déplorent le fait que le facteur “silice” et le rôle de la frustule (au niveau de la flottaison, de la protection contre le broutage des organismes zooplanctoniques qui est également un paramètre important) aient reçu autant d’attention aux dépens des autres paramètres environnementaux.

Notre but au début de ce travail était d’étudier de la façon la plus complète et la plus cohérente possible la manière dont les diatomées réagissent face aux variations du paramètre lumière avec une question centrale cruciale : certaines des stratégies adoptées par les diatomées pourraient-elles expliquer leur dominance sur les autres groupes phytoplanctoniques dans les eaux turbulentes où les fluctuations de la lumière sont très importantes ? La réponse que nous apportons à cette question est bien sûr loin d’être complète mais le noyau de connaissances que nous avons acquis au cours de ces dernières années auquel s’ajoute les nombreux travaux complémentaires sur le sujet nous permettent aujourd’hui de construire un schéma, certes partiel, mais relativement fiable de l’écophysiologie des diatomées face à leur environnement lumineux. Le champ d’investigations ainsi élargi est d’autant plus vaste que ce groupe d’organismes joue un rôle écologique incontournable au sein de l’écosystème Terre (en particulier dans les cycles biogéochimiques du carbone et de la silice) et se situe au carrefour d’un nombre croissant de disciplines. La dernière en date est l’explosion des techniques de biologie moléculaire appliquées aux diatomées (pour revue voir Falciatore et Bowler, 2002) qui vont permettre

d'élucider de nombreuses questions concernant l'écologie, la physiologie, la biologie, la phylogénie, etc... de ces organismes; sans parler des applications technologiques, elles aussi de plus en plus florissantes (pour un exemple récent voir Zaslavskaja *et al.*, 2001).

***1- L'écophysiologie des diatomées planctoniques : un schéma de l'absorption et de la dissipation photoprotective de l'énergie lumineuse.***

L'ensemble des résultats de ce travail a été obtenu en laboratoire. Ils peuvent néanmoins être utilisés pour cerner certaines des propriétés spécifiques aux diatomées phytoplanctoniques marines qui leur permettent d'être le groupe dominant dans les eaux turbulentes. Ces organismes se sont adaptés pour consacrer un minimum de leur énergie à la modification de leur métabolisme et de leur appareil photosynthétique au gré des fluctuations de la lumière. L'importance de leur chlororespiration et leur faculté à modifier très rapidement la fonction de leur antenne collectrice de lumière leur permet de continuer à avoir une croissance optimale en faible lumière et lorsque la lumière devient trop forte, à avoir une dépense d'énergie minimale pour se photoprotéger. Le contenu des complexes antennes en xanthophylles peut varier du simple au double, il reste toujours bien supérieur à celui des antennes des plantes supérieures. La diadinoxanthine (DD) qui est présente à faible intensité lumineuse, participe à la collecte de la lumière et transfère l'énergie qu'elle absorbe à la chlorophylle (sauf peut-être dans les cellules acclimatées à de fortes intensités lumineuses). La DD participe donc à l'utilisation par la photosynthèse de la majeure partie des photons absorbés par les pigments présents. Dès que l'intensité lumineuse devient suffisante pour que les protons (dont la translocation est couplée au transfert photosynthétique d'électrons) s'accumulent dans le lumen, car leur consommation par l'ATP synthase devient insuffisante, la DD dé-époxydase est activée et la DD transformée en quelques minutes en diatoxanthine (DT). Ceci a lieu très tôt (en temps d'illumination et en intensité) chez les diatomées dont la DD dé-époxydase est activée par un faible gradient de protons trans-thylakoïdal. La DT ainsi synthétisée, en se fixant aux complexes antennes protonés, leur confère la propriété de ne transférer au centre que l'énergie nécessaire à la photosynthèse, le surplus de l'énergie absorbée étant dissipé. Dès que l'intensité baisse, il y a déprotonation des complexes antennes, l'époxydation de DT en DD a lieu en parallèle mais plus lentement et le transfert de l'énergie absorbée au centre redevient efficace.

Les centres, déjà photoprotégés par la dissipation de l'énergie en excès au niveau de l'antenne, sont eux-mêmes dotés de propriétés qui leur permettent, semble-t-il, d'éviter la photodestruction de leur protéine-centre D1. Les diatomées possèdent un transport cyclique d'électrons au sein du PS II qui semble plus efficace que celui décrit dans les plantes supérieures et les algues vertes. Ce cycle est couplé au stockage d'un pool de réducteur durant les fortes illuminations quand les accepteurs du PS I deviennent limitants ce qui sert également de voie alternative photoprotective d'utilisation des électrons en excès. Ce pool sert ensuite à une chlororespiration importante qui se met en place dès la fin de l'illumination intense. Nous avons pu découvrir qu'une infime partie du pool de réducteur est utilisé pour faire tourner à l'obscurité un cycle ralenti au sein du PS II : ceci engendre un déficit d'émission d'O<sub>2</sub> mis en évidence dès la fin de l'illumination. Le déficit disparaît lorsque le pool de réducteur a été entièrement consommé et c'est à partir de ce déficit qu'on imagine que le cycle existe pendant la forte lumière. Celui-ci inhibe en partie la surréduction de certains accepteurs du PS II ainsi que l'émission d'O<sub>2</sub> et donc le risque de destruction des protéines et lipides par formation d'espèces radicalaires de l'O<sub>2</sub>. La photoinhibition qui peut néanmoins avoir lieu lors d'une forte illumination pour une partie des centres PS II semble être réversible rapidement (de l'ordre de l'heure) à l'obscurité sans qu'il y ait besoin de synthèse protéique : il s'agirait donc plus d'une photoinactivation. Si ce fait est confirmé, alors les centres réactionnels des diatomées ont des propriétés qui les distingueraient de ceux des plantes supérieures qui sont détruits par les intensités lumineuses trop fortes. Une synthèse protéique qui n'est pas un phénomène rapide et qui requiert un minimum de lumière a, chez les plantes supérieures, un coup énergétique certain qui diminue le rendement des cultures.

Après une exposition à une forte lumière, les diatomées seraient donc capables de réactiver rapidement à plus faible lumière ou à l'obscurité leurs centres réactionnels seulement inactivés et non endommagés parallèlement au retour des complexes antennes à leur fonction de collecte de la lumière. Si cette hypothèse se vérifiait, on voit bien comment les diatomées planctoniques seraient capables d'utiliser de façon optimale les fluctuations de la lumière ce qui expliquerait, en partie, pourquoi leur croissance dans ces conditions est supérieure à celle des autres groupes phytoplanctoniques comme déjà rapporté par plusieurs auteurs.

Les processus étudiés dans cette thèse sont donc d'importance pour comprendre l'écophysiologie des diatomées planctoniques. Bien sûr, lors des expérimentations en laboratoire, seul le facteur lumière a été modifié. Dans leur milieu naturel, les diatomées vont

également subir d'autres stress environnementaux tels que la limitation en certains nutriments, les variations de température, etc... Les effets de ces stress s'additionnent et là encore il serait judicieux d'étudier les effets de limitation en silice et en Fer (ces deux nutriments étant connus pour être d'importance dans la croissance des diatomées) et de celui des faibles températures (de grosses populations de diatomées étant rencontrées au niveau des hautes latitudes des océans) sur les capacités de régulations des flux lumineux des diatomées.

## ***2- Les voies de recherche pour le futur.***

### 2- a- Le cycle des xanthophylles chez les diatomées planctoniques.

La DD et la DT jouent un rôle majeur dans la dissipation de l'énergie lumineuse en excès et leurs sites de fixation sont pourtant encore inconnus. Nous avons réussi à démontrer que des antennes de taille similaire mais de composition différente étaient capables de fixer une quantité de DD qui pouvait aller du simple au double. L'incidence de ce doublement est primordial dans les propriétés dissipatrices d'énergie conférées à l'antenne par sa protonation et par la présence de DT. L'hypothèse de Franck (voir Chapitre I-Introduction, § I- 3. 1. 2. c. ) qui envisageait une relation directe entre les chlorophylles et les xanthophylles dé-époxydées était séduisante par sa simplicité mais aux dires même de son auteur trop simpliste. La présence de ces molécules dé-époxydées confère donc aux complexes antennes de nouvelles propriétés de fluorescence qui les rendent inaptés au transfert efficace vers la Chl-centre. Grâce à leur capacité à moduler le contenu de leur antenne en DT, les diatomées peuvent dissiper la quasi-totalité de l'énergie absorbée. En plus, fait remarquable, c'est quand cette énergie est la moins utilisable par la photosynthèse (c'est-à-dire dans le cas des centres fermés, quand la fluorescence est élevée) que la dissipation est la plus poussée. Quand les centres sont ouverts la dissipation est moindre et cette fois-ci elle est différente pour les complexes à forte ou faible teneur en DT. Remarquable finesse que cette régulation du rôle de l'antenne. Sans doute à cause de ces propriétés et avec comme résultat une meilleure adaptabilité aux lumières fluctuantes, les diatomées se photoacclimatent certes, mais la taille de l'antenne ne diminue pas sensiblement. Par contre, l'antenne contient toujours des xanthophylles du cycle et conserve de ce fait la dualité de sa fonction, la photoprotection restant efficace quelle que soit la taille de l'antenne.



Lorsque les diatomées sont acclimatées à de fortes lumières, nous pensons avoir mis en évidence l'autre rôle possible de la DD dont une partie ne semble plus influencer sur le NPQ. Il est possible que cette partie se localise dans la membrane lipidique où son rôle photoprotecteur est différent de celui qu'elle exerce au sein des antennes. Cette piste est à étudier sérieusement de façon à infirmer ou confirmer cette hypothèse.

Dans ce cadre, il serait également intéressant d'aller plus avant dans la caractérisation de la voie de biosynthèse des xanthophylles et de la régulation du cycle des xanthophylles. Les données récentes rapportées par l'équipe de C. Wilhelm montrent que là encore les diatomées présentent des spécificités importantes permettant de mieux comprendre leur écophysiologie.

#### 2- b- Les processus photoprotecteurs alternatifs.

Pour la première fois, nous avons mis en évidence l'existence d'un transport cyclique des électrons au sein du PS II chez les diatomées planctoniques. Ce phénomène impliqué dans la photoprotection des côtés donneur et accepteur d'électrons du PS II avait déjà été observé chez les algues vertes planctoniques. Il est intéressant de noter ici que son amplitude est plus importante chez les diatomées planctoniques et plus faible chez les espèces benthiques. Ce phénomène pourrait donc être également d'importance pour comprendre la régulation des flux d'énergie chez les diatomées planctoniques. Il conviendrait de mieux le caractériser afin d'en comprendre le mécanisme exact, sa distribution parmi les organismes planctoniques, son importance relative par rapport au mécanisme de dissipation non-radiative au sein des complexes antennes et enfin les conditions environnementales dans lesquelles il devient important.

La chlororespiration était déjà connue chez les diatomées planctoniques par son amplitude inhabituelle et sa capacité à engendrer à l'obscurité un gradient de pH transthylakoïdal suffisant pour induire une dé-époxydation de DD en DT conférant ainsi une mise en route rapide de la photoprotection dans un environnement caractérisé par des fluctuations d'intensité lumineuse. Nous avons pu mettre en évidence l'accumulation sous forte illumination d'un substrat réduit qui est ensuite utilisé à l'obscurité comme "carburant" par la chlororespiration. Il serait intéressant de déterminer la nature exacte de ce composé et nous avançons ici la possibilité qu'il soit un intermédiaire (le malate?) du métabolisme carboné spécial que possède les diatomées ou bien de l'ascorbate utilisé ensuite par

l'ascorbate peroxydase consommatrice d'O<sub>2</sub> à l'obscurité (il est également intéressant de rappeler que l'ascorbate est un cofacteur essentiel de la dé-époxydation de DD en DT). De plus, concernant la chlororespiration, deux voies sont à explorer :

- est-ce ce phénomène qui permet aux diatomées de survivre à de longues périodes d'obscurité sans baisse de leur activité métabolique ?
- comme chez les plantes supérieures, la chlororespiration est-elle liée à la voie de biosynthèse des caroténoïdes ?

Il est nécessaire de répondre à ces questions afin de mieux comprendre ce processus qui pourrait s'avérer être un point central de fonctionnement et de régulation de diverses voies métaboliques essentielles à la réponse des diatomées planctoniques aux fluctuations de la lumière. L'implication écologique de ce processus a été en partie soulevée récemment (Dijkman et Kroon, 2002). La participation à ces recherches du groupe de C. Wilhelm de l'Université de Leipzig, déjà habitué de ces aspects est primordiale.

#### 2- c- Les complexes antennes des diatomées planctoniques.

La structure de l'antenne des diatomées est également un sujet passionnant à plusieurs égards. Tous nos résultats et ceux des groupes avec qui nous collaborons indiquent des différences majeures entre l'organisation de l'antenne des diatomées et celle beaucoup mieux connue des plantes supérieures. Si nous avons pu montrer l'existence d'une dizaine au moins de sous-unités protéiques, elles sont assez proches, de masses moléculaires et pI voisins. Des différences existent bien sûr et seront sans doute importantes à identifier pour comprendre les propriétés des macrocomplexes antennaires. La caractérisation biochimique des sous-unités de ce macrocomplexe que nous n'avons eu que le temps d'ébaucher pendant ce travail de thèse mérite d'être poursuivie. Elle se fera dans les diverses directions indiquées dans le chapitre concernant les résultats déjà obtenus (Chapitre III-Résultat et Discussion, § 6- 2. ). Elle ne sera complète que couplée aux caractérisations fines des propriétés spectrales des différentes sous-unités isolées dans une configuration native. Un point crucial concerne évidemment la localisation de la DD et de la DT, leur configuration au sein des sous-unités ainsi que leur propriétés, bref autant d'aspects qui permettront d'éclairer les mécanismes moléculaires fins du NPQ. Ces caractérisations sont en cours dans le groupe de B. Robert au CEA Saclay et celui de von Grondelle à Amsterdam. Ce dernier est également très intéressé par l'organisation macromoléculaire des complexes antennes de diatomées et l'obtention

d'images aussi belles et détaillées que celles obtenues sur les macrocomplexes des antennes des plantes supérieures feraient grandement avancer le domaine.

#### 2- d- Singularités du centre réactionnel PS II des diatomées planctoniques.

Les spécialistes du centre réactionnel du PS II et de la photoinhibition par les espèces radicalaires d'O<sub>2</sub> pourront se pencher sur les raisons exactes qui confèrent à *P. tricornutum* ce que nous avons observé, à savoir cette capacité à éviter l'endommagement rapide de la protéine D1, et qui reste à confirmer et à mieux caractériser. Très peu d'études ont été faites sur les polypeptides impliqués dans le dégagement d'O<sub>2</sub> chez les diatomées : deux des trois protéines extrinsèques semblant absentes, ce qui les rapprocherait plus des cyanobactéries que des plantes supérieures ! Il est possible que l'acidification du lumen entraîne une inactivation réversible du complexe émetteur d'O<sub>2</sub> plus rapide chez les diatomées que chez les plantes supérieures et pour des valeurs plus basses du gradient transthylakoïdal de protons.

#### 2- e- Et enfin le génome !

En cette ère génomique et post génomique, il est certain que les ESTs du génome de *P. tricornutum* publiées récemment (Scala *et al.*, 2002) et qui ouvrent de nombreux champs d'investigations, seront remplacées à brève échéance par la connaissance du génome complet. Les techniques de transformation permettront l'obtention de mutants qui faciliteront l'exploration des complexes antennes des diatomées et l'identification de toutes les sous-unités qui les composent. Les comparaisons interspécifiques seront alors grandement facilitées.

Une considération d'actualité concerne la présence ou non de la sous-unité PsbS ou d'un homologue chez les diatomées. La réponse à cette question, qu'elle quelle soit, est d'importance car elle permettrait soit d'élaborer un schéma général du NPQ commun aux diatomées et aux plantes supérieures où psbS aurait un rôle prépondérant, soit au contraire, si PsbS est absent chez les diatomées, de différencier le mécanisme à l'origine du NPQ chez ces organismes par rapport aux plantes supérieures sans pour autant remettre en cause le rôle de PsbS chez ces dernières. Les approches biochimiques que nous avons entrepris n'ont pour le moment pas porté leur fruit à cause de divers problèmes auxquels s'est également heurtée l'équipe de K. Niyogi de l'Université de Berkeley. Cependant ce dernier, fort de sa découverte du possible rôle de PsbS par la réalisation de mutants fonctionnels chez

*Arabidopsis* s'est lancé dans une approche génomique chez les diatomées qui aboutira certainement d'ici peu.

\*\*\*\*\*

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- Admiraal, W. & Peletier, H. (1979). Influence of organic compounds and light limitation on the growth rate of estuarine benthic diatoms. *Br. Phycol. J.*, 14, 197-206.
- Alberte, R. S., Friedman, A. L., Gustafson, D. L., Rudnick, M. S. & Lyman, H. (1981). Light-harvesting systems of brown algae and diatoms. Isolation and characterization of chlorophyll *a/c* and chlorophyll *a*/fucoxanthin pigment-protein complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 635, 304-316.
- Alivisatos, A. P. (1996). Perspectives on the physical chemistry of semiconductor nanocrystals. *J. Phys. Chem.*, 100, 13226-13239.
- Anderson, J. M. & Barrett, J. (1977). Chlorophyll-protein complexes of brown algae: P700 reaction center and light-harvesting complexes. *Ciba Foundation Symposium*, 61, 81-104.
- Anderson, J. M. & Barrett, J. (1985). Light-harvesting pigment-protein complexes of algae. In *Photosynthetic membranes*, Ed. Staehelin, L. A. & Arntzen, C. J., pp 1-14, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Anderson, J. M. (1995). The grand design of photosynthesis: acclimation of the photosynthetic apparatus to environmental cues. *Photosynth. Res.*, 46, 129-139.
- Anderson, L. W. J. & Sweeney, B. M. (1978). Role of inorganic ions in controlling sedimentation rate of a marine centric diatom *Ditylum brightwelli*. *J. Phycol.*, 14, 204-214.
- Andersson, J., Walters, R. G., Horton, P. & Jansson, S. (2001). Antisense inhibition of the photosynthetic antenna proteins CP29 and CP26: implications for the mechanisms of photoprotective energy dissipation. *Plant Cell*, 13, 1193-1204.
- Anning, T., MacIntyre, H. L., Pratt, S. M., Sammes, P. J., Gibb, S. & Geider, R. J. (2000). Photoacclimation in the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Limnol. Oceanogr.*, 45, 1807-1817.
- Apt, K. E., Bhaya, D. & Grossman, A. R. (1994). Characterization of genes encoding the light-harvesting proteins in diatoms: biogenesis of the fucoxanthin chlorophyll *a/c* protein complex. *J. Appl. Phycol.*, 6, 225-230.
- Apt, K. E., Clendennen, S. K., Powers, D. A. & Grossman, A. R. (1995). The gene family encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins from the brown alga *Macrocystis pyrifera*. *Mol. Gen. Genet.*, 246, 445-464.
- Aro, E. M., Virgin, I. & Andersson, B. (1993). Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta*, 1143, 113-134.
- Arsalane, W., Rousseau, B. & Duval, J.-C. (1994). Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.*, 60, 237-43.

- Arsalane, W., Paresys, G., Duval, J.-C., Wilhelm, C., Conrad, R. & Büchel, C. (1993). A new fluorometric device to measure the *in vivo* chlorophyll *a* fluorescence yield in microalgae and its use as a herbicide monitor. *Eur. J. Phycol.*, 28, 247-52.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 601-639.
- Baier, M. & Dietz, K. J. (1999). Alkyl hydroperoxide reductases: the way out of the oxidative breakdown. *Trends Plant Sci.*, 4, 166-168.
- Baldauf, S. L., Roger, A. J., Wenk-Siefert, I. & Doolittle, W. F. (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science*, 290, 972-977.
- Barber, J. & Andersson, B. (1992). Too much of a good thing: light can be and for photosynthesis. *Trends Plant Sci.*, 17, 61-66.
- Barber, J. & Kühlbrandt, V. (1999). Photosystem II. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 9, 469-475.
- Barrett, J. & Anderson, J. M. (1980). The P700-chlorophyll alpha protein complex and two major light-harvesting complexes from *Acrocarpia paniculata* and other brown seaweeds. *Biochim. Biophys. Acta*, 590, 309-323.
- Bassi, R. & Caffarri, S. (2000). Lhc proteins and the regulation of photosynthetic light-harvesting function by xanthophylls. *Photosynth. Res.*, 64, 243-256.
- Bassi, R., Pineau, B., Dainese, P. & Marquardt, J. (1993). Carotenoid-binding protein of the photosystem II. *Eur. J. Biochem.*, 163, 221-230.
- Batschauer, A. (1998). Photoreceptors in higher plants. *Planta*, 206, 479-492.
- Battacharya, D. & Medlin, L. K. (1995). The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.*
- Beardall, J. & Morris, I. (1976). The concept of light intensity adaptation in marine phytoplankton: some experiments with *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Biol.*, 37, 377-387.
- Beardall, J., Burger-Wiersma, T. & Rijkeboer, M. (1994). Studies on enhanced post-illumination respiration in microalgae. *J. Plankton Res.*, 16, 1401-1410.
- Behrenfeld, M. J., Hardy, J. T. & Lee II, H. (1992). Chronic effects of ultraviolet-B radiation on growth and cell volume of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 28, 757-760.
- Bennoun, P. (2001). Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1506, 133-142.
- Berkaloff, C., Caron, L. & Rousseau, B. (1990). Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigments analysis. *Photosynth. res.*, 23, 181-193.
- Berkaloff, C., Duval, J.-C., Hauswirth, N. & Rousseau, B. (1983). Freeze fracture study of thylakoids of *Fucus serratus*. *J. Phycol.*, 19, 96-100.
- Bhaya, D. & Grossman, A. R. (1991). Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol. Gen. Genet.*, 229, 400-404.

- Bhaya, D. & Grossman, A. R. (1993). Characterization of gene clusters encoding the fucoxanthin chlorophyll proteins of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Nucleic Acids Res.*, 21, 4458-4466.
- Bibby, T. S., Nield, J. & Barber, J. (2001a). Iron deficiency induces the formation of an antenna ring around trimeric photosystem I in cyanobacteria. *Nature*, 412, 743-745.
- Bibby, T. S., Nield, J., Partensky, F. & Barber, J. (2001b). Oxyphotobacteria: antenna ring around photosystem I. *Nature*, 413, 590.
- Bienfang, P. K. (1980). Phytoplankton rates in oligotrophic waters off Hawaii, USA. *Mar. Biol.*, 61, 69-77.
- Boczar, B. A. & Prézelin, B. B. (1987). Chlorophyll-protein complexes from the red-tide dinoflagellate, *Gonyaulax polyedra*. Isolation, characterization and the effect of growth irradiance on chlorophyll distribution. *Plant Physiol.*, 83, 805-812.
- Boczar, B. A. & Prézelin, B. B. (1989). Organization and comparison of chlorophyll-protein complexes from two fucoxanthin-containing algae: *Nitzschia closterium* (Bacillariophyceae) and *Isochrysis galbana* (Prymnesiophyceae). *Plant Cell Physiol.*, 30, 1047-1056.
- Boczar, B. A. & Palmisano, A. C. (1990). Photosynthetic pigments and pigment-proteins in natural populations of Antarctic sea-ice diatoms. *Phycologia*, 29, 470-477.
- Boekema, E. J., van Roon, H., van Breemen, J. F. L. & Dekker, J. P. (1999). Supramolecular organization of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Eur. J. Biochem.*, 266, 444-452.
- Boekema, E. J., van Roon, H., Calkoen, F., Bassi, R. & Dekker, J. P. (2000a). Multiple types of association of photosystem II and its light-harvesting antenna in partially solubilized photosystem II membranes. *Biochemistry*, 38, 2233-2239.
- Boekema, E. J., van Breemen, J. F. L., van Roon, H. & Dekker, J. P. (2000b). Arrangement of photosystem II supercomplexes in crystalline macrodomains within the thylakoid membrane of green plant chloroplasts. *J. Mol. Biol.*, 301, 1123-1133.
- Boekema, E. J., Hifney, A., Yakushevskaya, A. E., Piotrowski, M., Keegstra, W., Berry, S., Michel, K. P., Pistorius, E. K. & Kruip, J. (2001). A giant chlorophyll-protein complex induced by iron deficiency in cyanobacteria. *Nature*, 412, 745-748.
- Briantais, J. M., Vernotte, C., Krause, G. H. & Weiss, E. (1986). Chlorophyll *a* fluorescence of higher plants: chloroplasts and leaves. In *Light Emission by Plants and Cyanobacteria*, Ed. Govindjee, R., Amez, J. & Fork, D. C., pp 539-583, Academic Press Inc.
- Britton, G. (1993). Biosynthesis of carotenoids. In *Carotenoids in Photosynthesis*, Ed. Young, A. & Britton, G., pp 96-127, Chapman and Hall, London, UK.
- Brott, L. L., Nait, R. R., Pikas, D. J., Kirkpatrick, S. M. & Tomlin, D. W. (2001). Ultrafast holographic nanopatterning of biocatalytically formed silica. *Nature*, 413, 89-93.
- Brown, J. S. (1989). Photosynthetic pigment organization in diatoms (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 24, 96-102.



- Brunet, C., Brylinski, J. M. & Lemoine, Y. (1993). *In situ* variations of the xanthophylls diatoxanthin and diadinoxanthin: photoadaptation and relationships with a hydrodynamical system in the eastern English Channel. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 102, 69-77.
- Büchel, C. & Wilhelm, C. (1993). *In vivo* analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: progress, problems and perspectives. *Photochem. Photobiol.*, 58, 137-148.
- Caffarri, S., Croce, R., Breton, J. & Bassi, R. (2001). The major antenna complex of photosystem II has a xanthophyll binding site not involved in light harvesting. *J. Biol. Chem.*, 276, 35924-35933.
- Canaani, O. & Havaux, M. (1990). Evidence for a biological role in photosynthesis for cytochrome *b*-559-A component of photosystem II reaction center. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 9295-9299.
- Carol, P. & Kuntz, M. (2001). A plastid terminal oxidase comes to light: implications for carotenoid biosynthesis and chlororespiration. *Trends Plant Sci.*, 6, 31-36.
- Caron, L., Jupin, H. & Berkaloff, C. (1983). Effects of light quality on chlorophyll-forms Ca 684, Ca 690 and Ca 699 of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photosynth. Res.*, 4, 21-33.
- Caron, L., Dubacq, J.-P., Berkaloff, C. & Jupin, H. (1985). Subchloroplast fractions from the brown alga *Fucus serratus*: phosphatidylglycerol contents. *Plant Cell Physiol.*, 26, 131-139.
- Caron, L. & Brown, J. S. (1987). Chlorophyll-carotenoid protein complexes from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*: spectrophotometric, pigment and polypeptide analyses. *Plant Cell Physiol.*, 28, 775-785.
- Caron, L., Remy, R. & Berkaloff, C. (1988). Polypeptide composition of light-harvesting complexes from some algae and diatoms. *FEBS Letters*, 11-15.
- Caron, L., Mortain-Bertrand, A. & Jupin, H. (1988). Effect of photoperiod on photosynthetic characteristics of two maine diatoms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 123, 211-226.
- Caron, L., Douady, D., Quinet-Szely, M., De Goër, S. & Berkaloff, C. (1996). Gene structure of a chlorophyll *a/c* binding protein from a brown alga: presence of an intron and phylogenetic implications. *J. Mol. Evol.*, 43, 270-280.
- Casper-Lindley, C. & Bjorkman, O. (1998). Fluorescence quenching in four unicellular algae with different light-harvesting and xanthophyll-cycle pigments. *Photosynth. Res.*, 56, 277-89.
- Coale, K. H., Johnson, K. S., Fitzwater, S. E., Gordon, R. M. & Tanner, S. (1996). A massive phytoplankton bloom induced by an ecosystem-scale iron fertilization experiment in equatorial Pacific Ocean. *Nature*, 383, 495-501.
- Cogdell, R. J. & Frank, H. A. (1987). How carotenoids function in photosynthetic bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, 895, 63-79.
- Cosper, E. (1982). Effects of variations in light intensity on the efficiency of growth of *Skeletonema costatum* (Bacillariophyceae) in a cyclostat. *J. Phycol.*, 18, 360-368.
- Dau, H. (1994). Molecular mechanisms and quantitative models of variable photosystem II fluorescence. *Photochem. Photobiol.*, 60, 1-23.

- De Martino, A., Douady, D., Rousseau, B., Duval, J.-C. & Caron, L. (1997). Characterization of two light-harvesting subunits isolated from the brown alga *Pelvetia canaliculata*: heterogeneity of xanthophyll distribution. *Photochem. Photobiol.*, 66, 190-197.
- De Martino, A., Douady, D., Quinet-Szely, M., Rousseau, B., Crépineau, F., Apt, K. E. & Caron, L. (2000). The light-harvesting antenna of brown algae. Highly homologous proteins encoded by a multigene family. *Eur. J. Biochem.*, 267, 5540-5549.
- de Vrind-de Jong, E. W. & de Vrind, J. P. M. (1997). Algal deposition of carbonates and silicates. *Rev. Mineralogy*, 35, 267-307.
- Debus, R. J. (1992). The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution. *Biochim. Biophys. Acta*, 1102, 269-352.
- Dehning, I. & Tlzer, M. M. (1989). Survival of *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae) in darkness. *J. Phycol.*, 25, 509-515.
- Delieu, T. & Walker, A. (1972). An improved cathode for the measurement of photosynthetic oxygen evolution by isolated chloroplasts. *New Phytol.*, 71, 201-225.
- Delwiche, C. F. & Palmer, J. D. (1997). The origins of plastids and their spread via secondary symbiosis. In *Origins of Algae and Their Plastids*, Ed. Battacharya, D., pp 53-86, Springer Verlag, Vienna-New York, Austria-USA.
- Demers, S., Roy, S., Gagnon, R. & Vignault, C. (1991). Rapid light-induced changes in cell fluorescence and in xanthophyll-cycle pigments of *Alexandrium excavatum* (Dinophyceae) and *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae): a photo-protection mechanism. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 76, 185-93.
- Demmig-Adams, B. & Adams, W. W. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.*, 1, 21-26.
- Denman, K. L. & Gargett, A. E. (1983). Time and space scales of vertical mixing and advection of phytoplankton in the upper ocean. *Limnol. Oceanogr.*, 28, 801-815.
- Dijkman, N. A. & Kroon, B. M. A. (2002). Indications for chlororespiration in relation to light regime in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 66, 179-187.
- Dixit, S. S., Smol, J. P., Kingston, J. C. & Charles, D. F. (1992). Diatoms: powerful indicators of environmental change. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 22-33.
- Döhler, G. & Hagmeier, E. (1997). UV effects on pigments and assimilation of <sup>15</sup>N-ammonium and <sup>15</sup>N-nitrate by natural marine phytoplankton of the north sea. *Bot. Acta*, 110, 481-488.
- Dolganov, N. A., Bhaya, D. & Grossman, A. R. (1995). Cyanobacterial protein with similarity to the chlorophyll *a/b* cinding proteins of higher plants: evolution and regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 636-640.
- Douady, D., Rousseau, B. & Caron, L. (1994). Fucoxanthin-chlorophyll *a/c* light-harvesting complexes of *Laminaria saccharina*: partial amino acid sequences and arrangement in thylakoid membranes. *Biochemistry*, 33, 3165-3170.

- Douglas, S. E. (1998). Plastid evolution: origins and diversity. *Trends Curr. Opin. Genet. Develop.*, 8, 655-661.
- Douglas, S., Zauner, S., Fraunholz, M., Beaton, M. & Penny, S. (2001). The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature*, 410, 1091-1096.
- Dubinsky, Z., Falkowski, P. G. & Wyman, K. (1986). Light harvesting and utilization by phytoplankton. *Plant Cell Physiol.*, 27, 1335-1349.
- Durnford, D. G. & Green, B. R. (1994). Characterization of the light harvesting proteins of the chromophytic alga, *Olithodiscus luteus* (*Heterosigma carterae*). *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 118-123.
- Durnford, D. G. & Green, B. R. (1995). Characterization of a gene encoding a fucoxanthin-chlorophyll protein from the chromophyt alga, *Heterosigma carterae*. *Plant Physiol.*, 1, 963-966.
- Dunford, D. G., Deane, G. A., Tan, S., Mc Fadden, G. I., Gantt, E. & Green, B. R. (1999). A phylogenetic assessment the eukariotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *J. Mol. Evol.*, 48, 59-68.
- Duval, J.-C., Jupin, H. & Berkaloff, C. (1983). Photosynthetic properties of plastids isolated from macrophytic brown algae. *Physiol. Veg.*, 21, 1145-1157.
- Dwarte, D. M. & Vesk, M. (1982). Freeze-fracture thylakoid ultrastructure of representative members of "chlorophyll c" algae. *Micron.*, 13, 325-326.
- Dwarte, D. M. (1983). A freeze fracture study of cryptomonas thylakoids. *Protoplasma*, 117, 130-141.
- Eppard, M. & Rhiel, E. (1998). The genes encoding light-harvesting subunits of *Cyclotella cryptica* (Bacillariophyceae) constitute a complex and heterogenous family. *Mol. Gen. Genet.*, 260, 335-345.
- Eskling, M., Arvidsson, P. O. & Akerlund, H. E. (1997). The xanthophyll cycle, its regulation and components. *Physiol. Plantarum*, 100, 806-16.
- Falciatore, A. & Bowler, C. (2002). Revealing the molecular secrets of marine diatoms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 109-130.
- Falciatore, A., Ribera d'Alcala, M., Croot, P. & Bowler, C. (2000). Perception of environmental signals by a marine diatom. *Science*, 288, 2363-2366.
- Falkowski, P. G. & Owens, T. G. (1978). Effects fo light intensity on photosynthesis and dark in six species of marine phytoplankton. *Mar Biol*, 45, 289-295.
- Falkowski, P. G. & Owens, T. G. (1980). Light-shade adaptation. Two strategies in marine phytoplankton. *Plant Physiol.*, 66, 592-595.
- Falkowski, P. G. & Wirick, C. D. (1981). A simulation model of the vertical mixing on primary productivity. *Mar. Biol.*, 65, 69-75.
- Falkowski, P. G., Owens, T. G., Ley, A. C. & Mauzerall, D. C. (1981). Effects of growth irradiance levels on the ratio of reaction centers in two species of marine phytoplankton. *Plant Physiol.*, 68, 969-973.

- Falkowski, P. G. & Laroche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.*, 27, 8-14.
- Falkowski, P. G. (1994). The role of phytoplankton photosynthesis in global biogeochemical cycles. *Photosynth. Res.*, 39, 235-258.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. (1997). *Aquatic Photosynthesis*, pp 375, Blackwell Science, Malden, USA.
- Falkowski, P. G., Barber, R. T. & Smetacek, V. A. (1998). Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science*, 280, 200-206.
- Färber, A., Young, A. J., Ruban, A. V., Horton, P. & Jahns, P. (1997). Dynamics of xanthophyll-cycle activity in different antenna subcomplexes in the photosynthetic membranes of higher plants. *Plant Physiol.*, 115, 1609-1618.
- Fawley, M. W. & Grossman, A. R. (1986). Polypeptides of light-harvesting complex of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* are synthesized in the cytoplasm of the cell as precursors. *Plant Physiol.*, 81, 149-155.
- Fawley, M. W. (1987). Evidence for a common evolutionary origin of light-harvesting fucoxanthin chlorophyll *a/c*-protein complexes of *Pavlova gyrams* (Prymnesiophyceae) and *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 23, 377-381.
- Field, C. B., Behrenfeld, M. J., Randerson, J. T. & Falkowski, P. (1998). Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. *Science*, 281, 237-40.
- Finazzi, G., Ehrenheim, A. M. & Forti, G. (1993). Influence of different uncouplers on photosystem II photochemistry and fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta*, 1142, 123-128.
- Fischer, A. E. & Harrison, P. J. (1996). Does carbohydrate content affect the sinking rate of diatoms? *J. Phycol.*, 32, 360-365.
- Fogg, G. E. & Thake, B. (1987). *Algal cultures and Phytoplankton Ecology*, The University of Wisconsin Press, Madison, Wisconsin, USA.
- Fogg, G. E. (1991). The phytoplanktonic ways of life. *New Phytol.*, 118, 191-32.
- Fork, D. C., Herbert, S. K. & Malkin, S. (1991). Light energy distribution in the brown alga *Macrocystis pyrifera* (giant kelp). *Plant Physiol.*, 95, 731-739.
- Foyer, C. H. & Noctor, G. (2000). Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytol.*, 146, 359-388.
- Frank, H. A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D. & Wasielewski, M. R. (1994). Photophysics of the carotenoids associated with the xanthophyll cycle in photosynthesis. *Photosynth. Res.*, 41, 389-395.
- Frank, H. A., Cua, A., Chynwat, V., Young, A., Gosztola, D. & Wasielewski, M. R. (1996). The lifetimes and energies of the first excited singlet states of diadinoxanthin and diatoxanthin: the role of these molecules in excess energy dissipation in algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 1277, 243-252.

- Frank, H. A. & Cogdell, R. J. (1996). Carotenoids in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, 63, 257-264.
- Frank, H. A., Bautista, J. A., Josue, J. S. & Young, A. J. (2000). Mechanism of non-photochemical quenching in green plants: energies of the lowest excited singlet states of violaxanthin and zeaxanthin. *Biochemistry*, 39, 2831-2837.
- Friedman, A. L. & Alberte, R. S. (1984). A diatom light-harvesting pigment-protein complex. Purification and characterization. *Plant Physiol.*, 76, 483-489.
- Friedman, A. L. & Alberte, R. S. (1986). Biogenesis and light regulation of the major light harvesting chlorophyll-protein of diatoms. *Plant Physiol.*, 80, 43-51.
- Friedman, A. L. & Alberte, R. S. (1987). Phylogenetic distribution of the major diatom light-harvesting pigment-protein determined by immunological methods. *J. Phycol.*, 23, 427-433.
- Fritz, L., Quilliam, M. A., Wright, J. L. C., Beale, A. M. & Work, T. M. (1992). An outbreak of domoic acid. Poisoning attributed to the pennate diatom *Pseudonitzschia australis*. *J. Phycol.*, 28, 439-442.
- Fryxell, G. A. & Villac, M. C. (2001). Toxic and harmful marine diatoms. In *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*, Ed. Stoermer, F. & Smol, J. P., pp 469, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Funk, C., Schroder, W. P., Napiwotzki, A., Tjus, S. E., Renger, G. & Anderson, B. (1995a). The PSII-S protein of higher plants: a new type of pigment-binding protein. *Biochemistry*, 34, 11133-11141.
- Funk, C., Adamska, I., Green, B. R., Anderson, B. & Renger, G. (1995b). The nuclear-encoded chlorophyll-binding photosystem II-S protein is stable in the absence of pigments. *J. Biol. Chem.*, 270, 30141-30147.
- Funk, C. & Vermass, W. (1999). A cyanobacterial gene family coding for single-helix proteins resembling part of the light-harvesting proteins from higher plants. *Biochemistry*, 38, 9397-9404.
- Furukawa, T., Watanabe, M. & Shihira-Ishikawa, I. (1998). Green- and blue-light-mediated chloroplast migration in the centric diatom *Pleurosira laevis*. *Protoplasma*, 203, 214-220.
- Gallagher, J. C., Wood, A. M. & Alberte, R. S. (1984). Ecotypic differentiation in the marine diatom *Skeletonema costatum*: influence of light intensity on the photosynthetic apparatus. *Mar. Biol.*, 82, 121-134.
- Garavito, R. M. & Ferguson-Miller, S. (2001). Detergents as tools in membrane biochemistry. *J Biol. Chem.*, 276, 32403-32406.
- Geider, R. J., Osborne, B. A. & Raven, J. A. (1985). Light dependence of growth and photosynthesis in *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 21, 609-619.
- Gibbs, S. P. (1970). The comparative ultrastructure of the lagal chloroplast. *Ann. New York Acad. Sci.*, 175, 433-444.
- Gibbs, S. P. (1979). The route of entry of of cytoplasmatically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. *J. Cell Sci.*, 35, 253-266.

- Gibbs, S. P. (1981). The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukariotic algae. *Ann. New York Acad. Sci.*, 361, 193-208.
- Gilmore, A. M. (1997). Mechanistic aspects of xanthophyll cycle-dependent photoprotection in higher plant chloroplasts and leaves. *Physiol. Plantarum*, 99, 197-209.
- Glazer, A. N. (1989). Light guides. Directional energy transfer in a photosynthetic antenna. *J. Biol. Chem.*, 264, 1-4.
- Goedheer, J. C. (1970). On the pigment system of brown algae. *Photosynthetica*, 4, 97-106.
- Goericke, R. & Welschmeyer, N. A. (1992). Pigment turnover in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. II. The <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-labeling kinetics of carotenoids. *J. Phycol.*, 25, 507-517.
- Gordon, R. & Drum, R. W. (1994). The chemical basis of diatoms morphogenesis. *Int. Rev. Cytology*, 150, 243-372.
- Goss, R., Hewes, H. & Wilhelm, C. (1999). Stimulation of the diadinoxanthin cycle by UV-B radiation in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Photosynth. Res.*, 59, 73-80.
- Grabowski, B., Cunningham Jr., F. X. & Gantt, E. (2001). Chlorophyll and carotenoid binding in a simple red algal light-harvesting complex crosses phylogenetic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 2911-2916.
- Gray, M. W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytology*, 72, 49-99.
- Green, B. R. & Pichersky, E. (1994). Hypothesis for the evolution of three-helix Chl *a/b* and Chl *a/c* light-harvesting antenna proteins from the two-helix and four-helix ancestor. *Photosynth. Res.*, 39, 149-162.
- Green, B. R. & Kuhlbrandt, W. (1995). Sequence conservation of light-harvesting and stress-response proteins in relation to the three-dimensional molecular structure of LHCII. *Photosynth. Res.*, 44, 139-148.
- Green, B. R. & Durnford, D. G. (1996). The chlorophyll-carotenoid proteins of oxygenic photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 685-714.
- Griffiths, D. J. (1973). Factors affecting the photosynthetic capacity of laboratory cultures of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mar. Biol.*, 21, 91-97.
- Grossman, A. R., Manodori, A. & Snyder, D. (1990). Light-harvesting proteins of diatoms: their relationship to the chlorophyll *a/b* binding proteins of the higher plants and their mode of transport into plastids. *Mol. Gen. Genet.*, 224, 91-100.
- Grossman, A. R., Bhaya, D., Apt, K. E. & Kehoe, D. M. (1995). Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control and evolution. *Ann. Rev. Genet.*, 29, 231-288.
- Gugliemelli, L. A., Dutton, H. J., Jursinic, P. A. & Siegelman, H. W. (1981). Energy transfer in a light-harvesting carotenoid-chlorophyll *c*-chlorophyll *a*-protein of *Phaeodactylum tricorutum*. *Photochem. Photobiol.*, 33, 903-907.
- Gugliemelli, L. A. (1984). Isolation and characterization of pigment-protein particles from the light-harvesting complex of *Phaeodactylum tricorutum*. *Biochim. Biophys. Acta*, 766, 45-50.

- Guillard, R. R. R. & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. 1. *C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.*, 8, 229-38.
- Guillou, L., Chretiennot-Dinet, M. J., Medlin, L. K., H., C. & Loiseaux-de Goer, S. (1999). *Bolidomonas*: a new genus with two species belonging to a new algal class, the Bolidophyceae (Heterokontophyta). *J. Phycol.*, 35, 368-381.
- Hager, A. & Stransky, H. (1970). Das carotinoidmuster und die verbreitung des lichtinduzierten xanthophyllcyclus in verschieden algenklassen. V. Einzelne vertreter der Cryptophyceae, Euglenophyceae, Bacillariophyceae, Chrysophyceae und Phaeophyceae. *Arch. Mikrobiol.*, 73, 77-89.
- Haldrup, A., Jensen, P. E., Lunde, C. & Scheller, H. V. (2001). Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.*, 6, 301-305.
- Hankamer, B., Barber, J. & Boekema, E. J. (1997). Structure and membrane organization of photosystem II in green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 641-671.
- Hansen, J. L. S. & Josefson, A. B. (2001). Pools of chlorophyll and live planktonic diatoms in aphotic marine sediments. *Mar. Biol.*, 139, 289-299.
- Harris, G. P. (1986). *Phytoplankton Ecology: Structure, Function, and Fluctuation*, Chapman & Hall, London, UK.
- Harrison, K. G. (2000). Role of increased marine silica input on paleo-pCO<sub>2</sub> levels. *Paleoceanography*, 15, 292-298.
- Hatch, M. D. (1987). C<sub>4</sub> photosynthesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochim. Biophys. Acta*, 895, 81-106.
- Hauber, M. M., Muller, S. B., Speth, V. & Maier, U.-G. (1994). How to evolve a complex plastid? A hypothesis. *Bot. Acta*, 107, 383-386.
- Havaux, M. (1998). Carotenoids as membrane stabilizers in chloroplasts. *Trends Plant Sci.*, 3, 147-151.
- Havaux, M. & Niyogi, K. K. (1999). The violaxanthin cycle protects plants from photooxidative damage by more than one mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8762-8767.
- Havaux, M., Bonfils, J. P., Lutz, C. & Niyogi, K. K. (2000). Photodamage of the photosynthetic apparatus and its dependence on the leaf developmental stage in the npq1 *Arabidopsis* mutant deficient in the xanthophyll cycle enzyme violaxanthin de-epoxidase. *Plant Physiol.*, 124, 273-284.
- Henley, W. J. (1993). Measurement and interpretation of photosynthetic light-response curves in the context of photoinhibition and diel changes. *J. Phycol.*, 29, 729-739.
- Hildebrand, M., Dahlin, K. & Volcani, B. E. (1998). Characterization of a silicone transporter gene family in *Cylindrotheca fusiformis*: sequences, analysis, and identification of homologs in other diatoms. *Mol. Gen. Genet.*, 260, 480-486.

- Hiller, R. G., Bardin, A.-M. & Nabdryk, E. (1987). The secondary structure content of pigment-protein complexes from the thylakoids of two Chromophyte algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 894, 365-369.
- Hiller, R. G. & Breton, J. (1992). A linear dichroism study of photosynthetic pigment organisation in two fucoxanthin-containing algae. *Biochim. Biophys. Acta*, 1102, 365-370.
- Hiller, R. G., Crossley, L. G., Wrench, P. M., Santucci, N. & Hofmann, E. (2001). The 15-kDa forms of the apo-peridinin-chlorophyll a protein (PCP) in dinoflagellates show high identity with the apo-32 kDa PCP forms, and have similar N-terminal leaders and gene arrangements. *Mol. Genet. Gen.*, 266, 254-259.
- Hobson, L. A., Morris, W. J. & Guest, K. P. (1985). Varying photoperiod, Ribulose1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase and CO<sub>2</sub> uptake in *Thalassiosira fluviatis* (Bacillariophyceae). *Plant Physiol.*, 79, 833-837.
- Hoffman, E., Wrench, P. M., Sharples, F. P., Hiller, R. G., Welte, W. & Diederichs, K. (1996). Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*. *Science*, 272, 1788-1791.
- Holdsworth, E. S. (1985). Effect of growth factors and light quality on the growth, pigmentation and photosynthesis of two diatoms, *Thalassiosira gravida* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Mar. Biol.*, 86, 253-262.
- Horton, P., Ruban, A. V. & Walters, R. G. (1996). Regulation of light harvesting in green plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 655-684.
- Horton, P., Ruban, A. V. & Wentworth, M. (2000). Allosteric regulation of the light-harvesting system of photosystem II. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 355, 1361-1370.
- Hsu, B.-D. & Lee, J.-Y. (1987). Orientation of pigments and pigment-protein complexes in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*. A linear-dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta*, 893, 572-577.
- Huszar, V. M. d. M. & Caraco, N. F. (1998). The relationship between phytoplankton composition and physical-chemical variables: a comparison of taxonomic and morphological-functional descriptors in six temperate lakes. *Freshwater Biol.*, 40, 679-696.
- Hutchinson, G. E. (1967). *A Treatise in Limnology. Vol. 2. Introduction to Lake Biology and Limnoplankton*, Wiley, J., New York, USA.
- Imberger, J. (1985). Thermal characteristics of standing waters: an illustration of dynamic processes. *Hydrobiologia*, 125, 7-29.
- Jahns, P. (1995). The xanthophyll cycle in intermittent light-grown pea plants - Possible functions of chlorophyll a/b binding proteins. *Plant Physiol.*, 108, 149-156.
- Jakob, T. & Wilhelm, C. (2001). Unusual pH-dependence of diadinoxanthin de-epoxidase activation causes chlororespiratory induced accumulation of diatoxanthin in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *J. Plant Physiol.*, 158, 383-390.



- Jakob, T., Goss, R. & Wilhelm, C. (1999). Activation of diadinoxanthin de-epoxidase due to a chlororespiratory proton gradient in the dark in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Biol.*, 1, 76-82.
- Janssen, M., Bathke, L., Marquardt, J., Krumbein, W. E. & Rhiel, E. (2001). Changes in the photosynthetic apparatus of diatoms in response to low and high light intensities. *Int. Microbiol.*, 4, 27-33.
- Jansson, S. (1994). The light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, 1184, 1-19.
- Jansson, S. (1999). A guide to the *Lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci.*, 4, 236-240.
- Jeffrey, S. W. & Humphrey, G. F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, *c*<sub>1</sub> and *c*<sub>2</sub> in higher plants and algae. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 167, 191-194.
- Jeffrey, S. W. & Vesik, M. (1977). Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast ultrastructure in the marine diatom *Stephanopyxis turris*. *J. Phycol.*, 13, 271-279.
- Jeffrey, S. W. & Vesik, M. (1978). Chloroplast structural changes induced by white light in the marine diatom *Stephanopyxis turris*. *J. Phycol.*, 14, 238-240.
- Johnston, A. M., Raven, J. A., Beardall, J. & Leegood, R. C. (2001). Photosynthesis in a marine diatom. *Nature*, 412, 40-41.
- Joliot, P., Barbieri, G. & Chabaud, R. (1969). Un nouveau modèle des centres photochimiques du système II. *Photochem. Photobiol.*, 10, 309-329.
- Jupin, H. & Giraud, G. (1971). Modification du spectre d'absorption dans le rouge lointain d'une diatomée cultivée en lumière rouge. *Biochim. Biophys. Acta*, 226, 98-102.
- Jupin, H. (1973). Modification de l'importance relative des deux systèmes photochimiques chez la diatomée *Detonula* sp. cultivée en lumière rouge. *Physiol. Veg.*, 11, 507-517.
- Jupin, H. & Lamant, A. (1997). *La Photosynthèse*, Masson, Paris, France.
- Katoh, T., Mimuro, M. & Takaichi, S. (1989). Light-harvesting particles isolated from a brown alga, *Dyctiota dichotoma*. A supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 976, 233-240.
- Katoh, T. & Ehara, T. (1990). Supramolecular assembly of fucoxanthin-chlorophyll-protein complexes isolated from a brown alga, *Petanelia fasciata*. Electron microscopic studies. *Plant Cell Physiol.*, 31, 439-447.
- Keegstra, A. & Cline, K. (1999). Protein import and routing systems of chloroplasts. *Plant Cell*, 11, 557-570.
- Kirilovsky, D., Ducruet, J. M. & Etienne, A.-L. (1990). Primary events occurring in photoinhibition in *Synechocystis* 6714 wild-type and atrazine-resistant mutant. *Biochim. Biophys. Acta*, 1020, 87-93.
- Kirk, J. T. O. (1977). Thermal dissociation of fucoxanthin protein binding in pigment complexes from chloroplasts of *Hormosira* (Phaeophyta). *Plant Sc. Lett.*, 9, 373-380.

- Klein, B. & Sournia, A. (1987). A daily study of the diatom spring bloom at Roscoff (France) in 1985. II. Phytoplankton pigment composition studied by HPLC analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 37, 265-75.
- Kok, B., Forbush, B. & McGloin, M. (1970). Cooperation of charges in photosynthetic O<sub>2</sub> evolution-I. A linear four step mechanism. *Photochem. Photobiol.*, 11, 457-475.
- Kooistra, W. H. C. F. & Medlin, L. K. (1996). Evolution of the diatoms (Bacillariophyta). IV. A reconstruction of their age from small subunit rRNA coding regions and the fossil record. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 6, 391-407.
- Kowallik, K. V. (1992). *Origin and Evolution of Plastids from Chlorophyll-a+c-Containing Algae: Suggested Ancestral relationship to Red and Green Algal Plastids*, Chapman and Hall, New York/London, USA/UK.
- Kowallik, K. V., Stobe, B., Schaffran, I., Kroth-Pancic, P. & Freier, U. (1995). The chloroplast genome of a chlorophyll *a+c*-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 13, 336-342.
- Kraay, G. W., Zapata, M. & Veldhuis, M. J. W. (1992). Separation of chlorophyll *c*<sub>1</sub>, *c*<sub>2</sub> and *c*<sub>3</sub> of marine phytoplankton by reversed-phase-C<sub>18</sub>-high-performance liquid chromatography. *J. Phycol.*, 28, 708-712.
- Kramer, D. M., Sacksteder, C. A. & Cruz, J. A. (1999). How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.*, 60, 151-163.
- Krämer, P., Wilhelm, C., Wild, A., Mörschel, E. & Rhiel, E. (1988). Ultrastructure and freeze-fracture studies of the thylakoids of *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae). *Protoplasma*, 147, 170-177.
- Krause, G. H. & Weiss, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313-349.
- Krauss, N., Schibert, W. D., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H. T. & Saenger, W. (1996). Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna. *Nature Structural Biology*, 3, 965-973.
- Kröger, N. & Sumper, M. (1998). Diatom cell wall proteins and the cell biology of silica biomineralization. *Protist*, 149, 213-219.
- Kröger, N., Deutzmann, R. & Sumper, M. (1999). Polycationic peptides from diatoms biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 286, 1129-1132.
- Kröger, N., Deutzmann, R., Bergsdorf, C. & Sumper, M. (2000). Species-specific polyamines from diatoms control silica morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 14133-14138.
- Kroth, P. & Strotmann, H. (1999). Diatom plastids: secondary endocytobiosis, plastid genome and protein import. *Physiol. Plantarum*, 107, 136-141.
- Kroth-Pancic, P. G. (1995). Nucleotide sequence of two cDNAs encoding fucoxanthin chlorophyll *a/c* proteins in the diatom *Odontella sinensis*. *Plant Mol. Biol.*, 27, 825-828.

- Kühlbrandt, W. & Wang, D. N. (1991). Three-dimensional structure of plant light-harvesting complex determined by electron crystallography. *Nature*, 350, 130-134.
- Kühlbrandt, W., Wang, D. N. & Fujiyoshi, Y. (1994). Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 367, 614-621.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lambers, J. W. J., Terpstra, W. & Levine, Y. K. (1986). Studies on chlorophyllase. I. Release of the enzyme from photosynthetic membranes of *Phaeodactylum tricoratum*. *Photochem. Photobiophys.*, 11, 237-248.
- Larkum, T. & Howe, C. J. (1997). Molecular aspects of light-harvesting processes in algae. *Adv. Bot. Res.*, 27, 257-330.
- Laroche, J., Henry, D., Wyman, K., Sukenik, A. & Falkowski, P. (1994). Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding a major fucoxanthin-chlorophyll *a/c*-containing protein from the chrysophyte *Isochrysis galbana*: implications for evolution of the cab gene family. *Plant Mol. Biol.*, 25.
- Lavorel, J. (1976). Matrix analysis of the oxygen evolving system of photosynthesis. *J. Theor. Biol.*, 57, 171-185.
- Lazar, D. (1999). Chlorophyll *a* fluorescence induction. *Biochim. Biophys. Acta*, 1412, 1-28.
- Leblanc, C., Falciatore, A., Watanabe, M. & Bowler, C. (1999). Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. *Plant Mol. Biol.*, 40, 1031-1044.
- Lee, R. E. (1999). *Phycology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Lemasson, C. & Etienne, A.-L. (1975). Photo-inactivation of system II centers by carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone in *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, 408, 135-142.
- Levy, H., Tal, A., Shaish, A. & Zamir, A. (1993). Cbr, an algal homolog of early light-induced proteins is a putative zeaxanthin binding protein. *J. Biol. Chem.*, 268, 20892-20896.
- Lewin, J. C., Lewin, R. A. & Philpott, D. E. (1958). Observations on *Phaeodactylum tricoratum*. *J. Gen. Microbiol.*, 18, 418-426.
- Li, X. P., Bjorkman, O., Shih, C., Grossman, A. R., Rosenquist, M., Jansson, S. & Niyogi, K. K. (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature*, 403, 391-395.
- Lichtlé, C., Duval, J.-C., Hauswirth, N. & Spilar, A. (1986). Freeze fracture study of thylakoid organization of *Cryptomonas rufescens* (Cryptophyceae) according to illumination conditions. *Photochem. Photobiophys.*, 11, 159-171.
- Lichtlé, C., Spilar, A. & Duval, J.-C. (1992). Immunogold localization of light-harvesting and photosystem I complexes in the thylakoids of *Fucus serratus* (Phaeophyceae). *Protoplasma*, 166, 99-106.

- Lichtlé, C., Arsalane, W., Duval, J. C. & Passaquet, C. (1995). Characterization of the light-harvesting complex of *Gyraudyopsis stellifer* (Chrysophyceae) and effect of light stress. *J. Phycol.*, 31, 380-387.
- Litchman, E. (1998). Population and community responses of phytoplankton to fluctuating light. *Oecologia*, 117, 247-257.
- Litchman, E. (2000). Growth rates of phytoplankton under fluctuating light. *Freshwater Biol.*, 44, 223-235.
- Lohr, M. & Wilhelm, C. (1998). Pigment synthesis and xanthophyll cycle in diatoms under high light stress and during low light recovery. In *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Ed. Garab, G., pp 2313-2316, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Lohr, M. & Wilhelm, C. (1999). Algae displaying the diadinoxanthin cycle also possess the violaxanthin cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 8784-8789.
- Lohr, M. & Wilhelm, C. (2001). Xanthophyll synthesis in diatoms: quantification of putative intermediates and comparison of pigment conversion kinetics with rate constants derived from a model. *Planta*, 212, 382-391.
- Long, S. P., Humphries, S. & Falkowski, P. G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 633-662.
- Lund, J. W. G. (1965). The ecology of freshwater phytoplankton. *Biol. Rev.*, 40, 231-291.
- MacIntyre, H. L. & Kana, T. M. (2002). Photoacclimation of photosynthesis irradiance response curves and photosynthetic pigments in microalgae and cyanobacteria. *J. Phycol.*, 38, 17-38.
- MacIntyre, H. L., Kana, T. M. & Geider, R. J. (2000). The effect of water motion on short-term rates of photosynthesis by marine phytoplankton. *Trends Plant Sci.*, 5, 12-17.
- Mallick, N. & Mohn, F. H. (2000). Reactive oxygen species: response of algal cells. *J. Plant Physiol.*, 157, 183-193.
- Malone, T. C., Falkowski, P. G., Hopkins, T. S., Rowe, G. T. & Whitledge, T. E. (1983). Mesoscale response of diatom populations to a wind event in the plume of the Hudson River. *Deep-Sea Res.*, 30, 149-170.
- Mann, D. G. (1993). Patterns of sexual reproduction in diatoms. *Hydrobiologia*, 269/270, 11-20.
- Mann, D. G. (1999). The species concept in diatoms. *Phycologia*, 38, 437-495.
- Mann, S. & Ozin, G. A. (1996). Synthesis of organic materials with complex form. *Nature*, 382, 313-318.
- Manodori, A. & Grossman, A. R. (1990). Sequence homology between light harvesting polypeptides of plants and the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. In *Current Research in Photosynthesis*, Ed. Baltscheffsky, M., pp 541-544, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Marra, J. (1978). Effect of short-term variations in light intensity on photosynthesis of a marine phytoplankton: a laboratory simulation study. *Mar. Biol.*, 46, 191-202.

- Martin, J. H., Coale, K. H., Johnson, K. S., Fitzwater, S. E. & Gordon, R. M. (1994). Testing iron hypothesis in ecosystems of the equatorial Pacific Ocean. *Nature*, 371, 123-129.
- Martin, W., Stobe, B., Goremykin, V., Hansmann, S., Hasegawa, M. & Kowallik, K. V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*, 393, 162-165.
- Martin-Jézéquel, V., Hildebrand, M. & Brzezinski, A. (2000). Silicon metabolism in diatoms: implications for growth. *J. Phycol.*, 36, 791-820.
- Martinson, T. A., Ikeuchi, M. & Plumley, F. G. (1998). Oxygen-evolving diatom thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1409, 72-86.
- Maxwell, K. & Johnson, G. N. (2000). Chlorophyll fluorescence-A practical guide. *J. Exp. Bot.*, 51, 659-668.
- McCarty, R. E. & Racker, E. (1967). The inhibition and stimulation of photophosphorylation by N,N'-dicyclohexylcarbodiimide. *J Biol Chem*, 242, 3435-3439.
- Medlin, L. K., Kooistra, W. H. C. F. & Schmid, A.-M. M. (2000). A review of the evolution of the diatoms-A total approach using molecules, morphology and geology. In *The Origin and early Evolution of the Diatoms: Fossil, molecular and Biogeographical Approaches*, Ed. Witkowski, A. & Sieminska, J., pp 13-35, W. Szafer Inst. Bot., Pol. Acad. Sci., Cracow, Poland.
- Medlin, L. K., Kooistra, W. H. C. F., Gersonde, R., Sims, P. A. & Wellbrock, U. (1997). Is the origin of the diatoms related to the end-Permian mass extinction? *Nova Hedwigia*, 65, 1-11.
- Melis, A. (1991). Dynamics of photosynthetic membrane composition and function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1058, 87-106.
- Melis, A. (1999). Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo* ? *Trends Plant Sci.*, 4, 130-135.
- Meyen, S. V. (1987). *Fundamentals of Paleobotany*, Chapman and Hall, London.
- Mimuro, M. & Katoh, T. (1991). Carotenoids in photosynthesis: absorption transfer and dissipation of light energy. *Pure Appl. Chem.*, 63, 123-130.
- Mimuro, M., Katoh, T. & Kawai, H. (1990). Spatial arrangement of pigments and their interaction in the fucoxanthin-chlorophyll *a/c* protein assembly (FCPA) isolated from the brown alga *Dictyota dichotoma*. Analysis by means of polarized spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1015, 450-456.
- Montane, M. H. & Kloppstech, K. (2000). The family of light-harvesting-related proteins (LHCs, ELIPs, HLIPs): was the harvesting of light their primary function? *Gene*, 258, 1-8.
- Morden, C. W. & Sherwood, A. R. (2002). Continued evolutionary surprises among dinoflagellates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 11558-11560.
- Morse, D. E. (1999). Silicon biotechnology: harnessing biological silica production to construct new materials. *Trends Biotechnol.*, 17, 230-232.
- Mortain-Bertrand, A., Descolas-Gros, C. & Jupin, H. (1987). Short-term <sup>14</sup>C incorporation in *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve (Bacillariophyceae) as a function of light regime. *Phycologia*, 26, 262-269.

- Mortain-Bertrand, A., Descolas-Gros, C. & Jupin, H. (1988). Pathway of dark inorganic carbon fixation in two species of diatoms: influence of light regime and regulator factors on diel variations. *J. Plankton res.*, 10, 199-217.
- Mortain-Bertrand, A. & Falkowski, P. G. (1989). Evidence for a relation between fluorescence and carotenoids: a way to improve models of primary productivity. *CR Acad. Sci. Paris*, 309, 13-18.
- Mouget, J.-L., Tremblin, G., Morant-Manceau, A., Morançais, M. & Robert, J.-M. (1999). Long-term photoacclimation of *Haslea ostrearia* (Bacillariophyta): effect of irradiance on growth rates, pigment content and photosynthesis. *Eur. J. Phycol.*, 34, 109-115.
- Müller, P. Li, X.-P. & Niyogi, K. K. (2001). Non-photochemical quenching. A response to excess light energy. *Plant Physiol.*, 125, 1558-1566.
- Müller-Moulé, P., Conklin, P. L. & Niyogi, K. K. (2001). Ascorbate deficiency can limit violaxanthin de-epoxidase activity *in vivo*. *Plant Physiol.*, 128, 970-977.
- Mullineaux, P. & Karpinski, S. (2002). Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 43-48.
- Munekage, Y., Takeda, S., Endo, T., Jahns, P., Hashimoto, T. & Shikanai, T. (2001). Cytochrome *b(6)f* mutation specifically affects thermal dissipation of absorbed light energy in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 28, 351-359.
- Nayak, L., Raval, M. K., Biswal, B. & Biswal, U. C. (2001). Photoprotection of green leaves by zeaxanthin, a two-channel process. *Curr. Sci.*, 81, 1165-1166.
- Neale, P. J. (1987). Algal photoinhibition and photosynthesis in the aquatic environment. In *Photoinhibition*, Ed. Kyle, D. J., Osmond, C. B. & Arntzen, C. J., pp 39-62, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands.
- Nelson, D. M., Tréguer, P., Brzezinski, A., Leynaert, A. & Quéginer, B. (1995). Production and dissolution of biogenic silica in the ocean: revised global estimates, comparison with regional data and relationship to biogenic sedimentation. *Global Biogeochem. Cy.*, 9, 359-372.
- Nichols, H. W. & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. *J. Phycol.*, 1, 34-38.
- Nicklisch, A. (1998). Growth and light absorption of some planktonic cyanobacteria, diatoms and Chlorophyceae under simulated natural light fluctuations. *J. Plankton Res.*, 20, 105-119.
- Nield, J., Funk, C. & Barber, J. (2000a). Supermolecular structure of photosystem II and location of the PsbS protein. *Phil. Trans. Roy. Soc. London B*, 355, 1337-1343.
- Nield, J., Orlova, E. V., Morris E. P., Gowen B., van Heel, M. & Barber J. (2000b). 3D map of the plant photosystem II supercomplex obtained by cryoelectron microscopy and single particle analysis. *Nat. Struct. Biol.*, 7, 44-57.
- Niyogi, K. K. (1999). Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 50, 333-359.
- Niyogi, K. K. (2000). Safety valves for photosynthesis. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 3, 455-460.

- Niyogi, K. K., Shih, C., Chow, W. S., Pogson, B. J., DellaPenna, D. & Bjorkman, O. (2001). Photoprotection in a zeaxanthin- and lutein-deficient double mutant of *Arabidopsis*. *Photosynth. Res.*, 67, 139-145.
- Norton, T. A., Melkonian, M. & Anderson, R. A. (1996). Algal biodiversity. *Phycologia*, 35, 308-326.
- Nothgamel, E. A. (1987). Quantum counter for correcting fluorescence excitation spectra at 320 to 800 nm wavelengths. *Anal. Biochem.*, 163, 224-237.
- Olaizola, M., Bienfang, P. K. & Ziemann, D. A. (1992). Pigment analysis of phytoplankton during a Subarctic spring bloom: xanthophyll cycling. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 158, 59-74.
- Olaizola, M., Laroche, J., Kolber, Z. & Falkowski, P. G. (1994). Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.*, 41, 357-70.
- Olaizola, M. & Yamamoto, H. Y. (1994). Short-term response of the diadinoxanthin cycle and fluorescence yield to high irradiance in *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 30, 606-12.
- Oliver, R. L. & Ganf, G. G. (2000). Freshwater blooms. In *The Ecology of Cyanobacteria*, Ed. Whitton, B. A. & Potts, M., pp 149-194, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Ort, D. R. (2001). When there is too much light. *Plant Physiol.*, 125, 29-32.
- Ort, D. R. & Baker, N. R. (2002). A photoprotective role of O<sub>2</sub> as an alternative electron sink in photosynthesis? *Curr. Opin. Plant Biol.*, 5, 193-198.
- Owens, T. G. & Wold, E. R. (1986). Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. I. Isolation and characterization of pigment-protein complexes. *Plant Physiol.*, 80, 732-738.
- Owens, T. G. (1986). Light-harvesting function in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. II. Distribution of excitation energy between the photosystems. *Plant Physiol.*, 80, 739-746.
- Parkinson, J. & Gordon, R. (1999). Beyond micromachining: the potential of diatoms. *Trends Biotechnol.*, 17, 190-196.
- Pascal, A. A., Caron, L., Rousseau, B., Lapouge, K., Duval, J. C. & Robert, B. (1998). Resonance Raman spectroscopy of a light-harvesting protein from the brown alga *Laminaria saccharina*. *Biochemistry*, 37, 2450-2457.
- Passaquet, C., Thomas, J. C., Caron, L., Hauswirth, N., Puel, F. & Berkaloff, C. (1991). Light-harvesting complexes of brown algae-Biochemical characterization and immunological relationships. *FEBS Letters*, 280, 21-26.
- Passaquet, C. & Lichtlé, C. (1995). Molecular study of a light-harvesting apoprotein of *Gyraudyopsis stellifer* (Chrysophyceae). *Plant Mol. Biol.*, 29, 135-148.
- Paterson, D. M. & Hagerthey, S. E. (2001). Microphytobenthos in contrasting coastal ecosystems: biology and dynamics. In *Ecological Comparisons of Sedimentary Shores*, Ed. Reise, K., pp 105-125.

- Paulsen, H. (1995). Chlorophyll *a/b*-binding proteins. *Photochem. Photobiol.*, 62, 367-382.
- Pearcy, R. W. (1990). Sunflecks and photosynthesis in plant canopies. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 41, 421-453.
- Perry, M. J., Talbot, M. C. & Alberte, R. S. (1981). Photoadaptation in marine phytoplankton: responses of the photosynthetic unit. *Mar. Biol.*, 62, 91-101.
- Peterson, R. B. & Havir, E. A. (2001). Photosynthetic properties of an *Arabidopsis thaliana* mutant possessing a defective PsbS gene. *Planta*, 214, 142-152.
- Peyrière, M., Caron, L. & Jupin, H. (1984). Pigment complexes and energy transfers in brown algae. *Photosynthetica*, 18, 184-191.
- Pfannschmidt, T., Allen, J. F. & Oelmüller, R. (2001). Principles of redox control in photosynthesis gene expression. *Physiol. Plantarum*, 112, 1-9.
- Pfündel, E. & Bilger, W. (1994). Regulation and possible function of the violaxanthin cycle. *Photosynth. Res.*, 42, 89-109.
- Pickett-Heaps, J., Schmid, A.-M. M. & Edgar, L. A. (1990). The cell biology of diatom valve formation. In *Progress in Phycological Research*, Ed. Round, F. E. & Chapman, D. J., Biopress Ltd, Bristol, UK.
- Piechulla, B. (1999). Circadian expression of the light-harvesting complex protein genes in plants. *Chronobiol. Int.*, 16, 115-128.
- Polvika, T., Herek, J. L., Zigmantas, D., Akerlund, H. E. & Sundstrom, V. (1999). Direct observation of the (forbidden) S<sub>1</sub> state in carotenoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 4914-4917.
- Post, A. F., Dubinsky, Z., Wyman, K. & Falkowski, P. G. (1984). Kinetics of light-intensity adaptation in a marine planktonic diatom. *Mar. Biol.*, 83, 231-238.
- Post, A. F., Dubinsky, Z., Wyman, K. & Falkowski, P. G. (1985). Physiological responses of a marine planktonic diatom to transitions in growth irradiance. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 25, 141-149.
- Prasil, O., Kolber, Z., Berry, J. A. & Falkowski, P. G. (1996). Cyclic electron flow around photosystem II *in vivo*. *Photosynth. Res.*, 48, 395-410.
- Prézelin, B. B. & Haxo, F. T. (1976). Purification and characterization of peridinin-chlorophyll *a*-proteins from the marine dinoflagellate *Glenodinium* sp. and *Gonyaulax polyedra*. *Planta*, 128, 133-141.
- Prézelin, B. B. & Bozcar, B. A. (1986). Molecular bases of cell absorption and fluorescence in phytoplankton: potential applications to studies in optical oceanography. In *Progress in Phycological research*, Ed. Round, F. E. & Chapman, D. J., Biopress Ltd., Bristol, UK.
- Pyszniac, A. M. & Gibbs, S. P. (1992). Immunocytochemical localization of photosystem I and the fucoxanthin-chlorophyll *a/c* light-harvesting complex in the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Protoplasma*, 166, 208-217.
- Reinfelder, J. R., Kraepiel, A. M. L. & Morel, F. M. M. (2000). Unicellular C<sub>4</sub> photosynthesis in a marine diatom. *Nature*, 407, 996-999.



- Reinfelder, J. R. (2001). Photosynthesis in a marine diatom-Reply. *Nature*, 412, 41.
- Reith, M. (1995). Molecular biology of rhodophyte and chromophyte plastids. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 46, 549-575.
- Reynolds, C. S. (2002). *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rhee, K. H. (2001). Photosystem II: the solid structural era. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 30, 307-328.
- Rhee, K. H., Morris, E. P., Barber, J. & Kuhlbrandt, W. (1998). Three-dimensional structure of photosystem II reaction center at 8 Å resolution. *Nature*, 396, 283-286.
- Ricard, M. (1987). *Atlas du Phytoplancton marin, Vol.2-Diatomophycées*, Ed. A., Sournia, CNRS, Paris, France.
- Richardson, K., Beardall, J. & Raven, J. A. (1983). Adaptation of unicellular algae to irradiance: an analysis of strategies. *New Phytol.*, 93, 157-191.
- Riebesell, U. (2000). Photosynthesis - Carbon fix for a diatom. *Nature*, 407, 959-960.
- Rijstenbil, J. W. (2001). Effect of periodic, low UVA radiation on cell characteristics and oxidative stress in the marine planktonic diatom *Ditylum brightwellii*. *Eur. J. Phycol.*, 36, 1-8.
- Ritz, T., Damjanovic, A., Schulten, K., Zhang, J.-P. & Koyama, Y. (2000). Efficient light harvesting through carotenoids. *Photosynth. Res.*, 66, 125-144.
- Rmiki, N.-E., Brunet, C., Cabioch, J. & Lemoine, Y. (1996). Xanthophyll-cycle and photosynthetic adaptation to environment in macro- and microalgae. *Hydrobiologia*, 326/327, 407-413.
- Rochow, E. G. (1987). *Silicon and Silicones*, Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Rögl, H. & Külbrandt, W. (1999). Mutant trimers of light-harvesting complex II exhibit altered pigment content and spectroscopic features, which have not been obtained in crystal structure, are now assigned for most of the chlorophylls. *Biochemistry*, 267, 19254-19259.
- Rosen, B. H. & Lowe, R. L. (1984). Physiological and ultrastructural responses of *Cyclotella meneghiniana* (Bacillariophyta) to light intensity and nutrient limitation. *J. Phycol.*, 20, 173-183.
- Round, F. E. (1981). *The Ecology of Algae*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Round, F. E. & Crawford, R. M. (1990). Phylum Bacillariophyta. In *Handbook of Prototista*, Ed. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M. & Chapman, D. J., pp 574-596, Johns & Barlett, Boston, USA.
- Round, F. E., Crawford, R. M. & Mann, D. G. (1990). *The Diatoms. Biology and Morphology of the Genera*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Rozak, P. R., Seiser, R. M., Wacholtz, W. F. & Wise, R. R. (2002). Rapid, reversible alterations in spinach thylakoid appression upon changes in light intensity. *Plant Cell Environ.*, 25, 421-429.
- Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B. & Horton, P. (2002). Activation of zeaxanthin is an obligatory event in the regulation of photosynthetic light harvesting. *J. Biol. Chem.*, 277, 7785-7789.

- Ruban, A. V., Pascal, A. A., Robert, B. & Horton, P. (2001). configuration and dynamics of xanthophylls in light-harvesting antennae of higher plants. *J. Biol. Chem.*, 276, 24862-24878.
- Ruban, A. V., Lee, P. J., Wentworth, M., Young, A. J. & Horton, P. (1999). Determination of the stoichiometry and strength of binding of xanthophylls to the photosystem II light harvesting complexes. *J. Biol. Chem.*, 274, 10458-10465.
- Ruban, A. V., Young, A. J., Pascal, A. A. & Horton, P. (1994). The effects of illumination on the xanthophyll composition of the photosystem II light-harvesting complexes of spinach thylakoid membranes. *Plant Physiol.*, 104, 227-234.
- Sakshaug, E., Demers, S. & Yentsch, C. M. (1987). *Thalassiosira oceanica* and *T. pseudonana*: two different photoadaptational responses. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 41, 275-282.
- Scala, S., Carels, N., Falciatore, A., Chiusano, M. L. & Bowler, C. (2002). Genome properties of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.*, 129, 993-1002.
- Schmitt, A., Herold, A., Welte, C., Wild, A. & Wilhelm, C. (1993). The light-harvesting system of a unicellular alga *Mantoniella squamata* (Prasinophyceae): evidence for the lack of a photosystem-I specific antenna complex. *Photochem. Photobiol.*, 57, 132-138.
- Scholín, C. A., Gulland, F., Doucette, G. J., Benson, S. & Busman, M. (2000). Mortality of sea lions along the central California coast linked to a toxic diatom bloom. *Nature*, 403, 80-84.
- Schonfeld, M. & Schickler, H. (1988). Modes of action of uncouplers in thylakoids. I. Proton conduction characteristics. *FEBS Letters*, 229, 298-302.
- Schreiber, U., Schlimm, U. & Bilger, W. (1986). Continuous recording of photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. *Photosynth. Res.*, 10, 51-62.
- Schubert, W. D., Klukas, O., Krauss, N., Saenger, W., Fromme, P. & Witt, H. T. (1997). Photosystem I of *Synechococcus elongatus* at 4 Å resolution: comprehensive structure analysis. *J. Mol. Biol.*, 272, 741-769.
- Schubert, W. D., Klukas, O., Saenger, W., Witt, H. T., Fromme, P. & Krauss, N. (1998). A common ancestor for oxygenic and anoxygenic photosynthetic systems. A comparison based on the structural model of photosystem I. *J. Mol. Biol.*, 280, 297-314.
- Sitte, P. (1993). Symbiotic evolution of complex cells and complex plastids. *Eur. J. Protistol.*, 29, 131-143.
- Smayda, T. J. & Boleyn, B. J. (1965). Experimental observations on the flotation of marine diatoms. *Limnol. Oceanogr.*, 10, 499-506.
- Smetacek, V. A. (1985). Role of sinking in diatom life history: ecological, evolutionary and geological significance. *Mar. Biol.*, 84, 239-251.
- Smetacek, V. A. (1999). Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist*, 150, 25-32.
- Smetacek, V. A. (2001). A watery arms race. *Nature*, 411, 745.

- Smith, B. M. & Melis, A. (1987). Photosystem stoichiometry and excitation distribution in chloroplasts from the surface and minus 20 meters blades of *Macrocystis pyrifera*, the giant kelp. *Plant Physiol.*, 84, 1325-1330.
- Smith, B. M. & Melis, A. (1988). Photochemical apparatus organization in the diatom *Cylindrotheca fusiformis*: photosystem stoichiometry and excitation distribution in cells grown under high and low irradiance. *Plant Cell Physiol.*, 29, 761-769.
- Sournia, A. (1982a). Form and function in the marine phytoplankton. *Biol. Rev.*, 57, 347-394.
- Sournia, A. (1982b). Is there a shade flora in the marine plankton? *J. Plankton res.*, 4, 391-399.
- Stauber, J. L. & Jeffrey, S. W. (1988). Photosynthetic pigments in fifty-one species of marine diatoms. *J. Phycol.*, 24, 158-172.
- Stewart, D. H. & Brudvig, G. W. (1998). Cytochrome b559 of photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1367, 63-87.
- Stoermer, E. F. & Smol, J. P. (1999). *The Diatoms: Applications for the Environmental and Earth Sciences*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Strasser, R. J., Srivasta, A. & Govindjee, R. (1995). Polyphasic chlorophyll *a* fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochem. Photobiol.*, 61, 32-42.
- Sweeney, B. M. (1981). Freeze-fractured chloroplast membranes of *Gonyaulax polyedra* (Pyrrophyta). *J. Phycol.*, 17, 95-101.
- Tappan, H. (1980). *The Paleobiology of Plant Protists*, Freeman, San Francisco, USA.
- Tardy, F. & Havaux, M. (1997). Thylakoid membrane fluidity and thermostability during the operation of the xanthophyll cycle in higher-plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1330, 179-193.
- ten Lohuis, M. R. & Miller, D. J. (1998). Light-regulated transcription of genes encoding peridinin chlorophyll *a* proteins and the major intrinsic light-harvesting complex proteins in the dinoflagellate *Amphidinium cartarum* Hulbert (Dinophyceae). *Plant Physiol.*, 117, 189-196.
- Terpstra, W. (1980). Influence of lecithin liposomes on chlorophyllase-catalysed chlorophyll hydrolysis. Comparison of intramembraneous and solubilized *Phaeodactylum* chlorophyllase. *Biochim. Biophys. Acta*, 600, 36-47.
- Thildom, E., Lindstrom, V., Tissier, C., Robinson, C., Schroder, W. P. & Funk, C. (2002). Novel approach reveals localisation and assembly pathway of the PsbS and PsbW proteins into the photosystem II dimer. *FEBS Letters*, 513, 217-222.
- Thomas, W. H., Dodson, A. N. & Reid, F. M. H. (1978). Diatom productivity compared to other algae in natural marine phytoplankton assemblages. *J. Phycol.*, 14, 250-253.
- Ting, C. S. & Owens, T. G. (1993). Photochemical and non-photochemical fluorescence quenching processes in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol.*, 101, 1323-1330.

- Trautman, J. K., Shreve, A. P., Owens, T. G. & Albrecht, A. C. (1990). Femtosecond dynamics of carotenoid to chlorophyll energy transfer in thylakoid membrane preparation. *Chem. Phys. Lett.*, 98, 369-376.
- Tréguer, P., Nelson, D. M., van Bennekom, A. J., DeMaster, D. J., Leynaert, A. & Quéguiner, B. (1995). The silica balance in the world ocean: a reestimate. *Science*, 268, 375-79.
- Tréguer, P. & Pondaven, P. (2000). Silica control of carbon dioxide. *Nature*, 406, 358-359.
- Trémolières, A., Dubacq, J.-P., Ambard-Breteville, F. & Rémy, R. (1981). Lipid composition of chlorophyll protein-complexes from tobacco thylakoids membranes: specific enrichment in phosphatidylglycerol containing trans-hexadecenoic acid of oligomeric form of LHCP. *FEBS Lett.*, 130, 27-31.
- Underwood, G. J. C. & Kromkamp, J. (1999). Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. *Adv. Ecol. Res.*, 29, 93-153.
- van den Hoek, C., Mann, D. G. & Jahns, H. M. (1995). *Algae: An Introduction to Phycology*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- van Kooten, O. & Snel, J. F. H. (1990). The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.*, 25, 147-50.
- Vesk, M. & Jeffrey, S. W. (1977). Effect of blue-green light on photosynthetic pigments and chloroplast ultrastructure in unicellular marine algae from six classes. *J. Phycol.*, 13, 280-288.
- Villareal, T. A. & Lipschultz, F. (1995). Internal nitrate concentrations in single cells of large plankton from the Sargasso Sea. *J. Phycol.*, 31, 689-696.
- Villareal, T. A., Pilska, C., Brzezinski, A., Lipschultz, F., Dennett, M. & Gardner, G. B. (1999). Upward transport of oceanic nitrate by migrating diatom mats. *Nature*, 397, 423-425.
- Walsby, A. E. & Reynolds, C. S. (1980). Sinking and floating. In *The Physiological Ecology of Phytoplankton*, Ed. Morris, I., pp 371-412, Blackwells, Oxford, UK.
- Walsby, A. E. (1988). Buoyancy in relation to the ecology of the freshwater phytoplankton. In *Algae and the Aquatic Environment*, Ed. Round, R. E., pp 125-137, Biopress Ltd., Bristol, UK.
- Walters, R. G., Rogers, J. J. M., Shephard, F. & Horton, P. (1999). Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the role of photoreceptors. *Planta*, 209, 517-527.
- Werner, D. (1977). *The Diatoms*, University of California Press, Berkeley, USA.
- Whatley, J. M., John, P. & Whatley, F. R. (1979). From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. London B.*, 204, 165-187.
- Wiedemann, I., Wilhelm, C. & Wild, A. (1983). Isolation of chlorophyll-protein complexes and quantification of electron transport components in *Synura petersenii* and *Tribonema equale*. *Photosynth. Res.*, 4, 317-329.
- Wilhelm, C. (1990). The biochemistry and physiology of light-harvesting processes in chlorophyll *b*- and chlorophyll *c*-containing algae. *Plant Physiol. Biochem.*, 28, 293-306.

- Wilhelm, C., Büchel, C. & Rousseau, B. (1988). The molecular organization of chlorophyll-protein complexes in the Xanthophyceean alga *Pleurochloris moerengiensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 934, 220-228.
- Willemoës, M. & Monas, E. (1991). Relationship between growth irradiance and the xanthophyll cycle pool in the diatom *Nitzschia palea*. *Physiol. Plantarum*, 83, 449-56.
- Winkler, U. & Stabenau, H. (1995). Isolation and characterization of peroxisomes from diatoms. *Planta*, 195, 403-407.
- Wittpoth, C., Kroth, P., Weyrauch, K., Kowallik, K. V. & Strotmann, H. (1998). Functional characterization of isolated plastids from two marine diatoms. *Planta*, 206, 79-85.
- Yakushevskaya, A. E., Jensen, P. E., Keegstra, A., van Roon, H., Scheller, H. V., Boekema, E. J. & Dekker, J. P. (2001). Supermolecular organization of photosystem II and its associated light-harvesting antenna in *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.*, 268, 6020-6028.
- Yamamoto, H. Y. & Bassi, R. (1996). Carotenoides: localization and function. In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, Ed. Ort, D. R. & Yocum, C. F., pp 539-563, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Yentsch, C. S. (1962). Marine Phytoplankton. In *Physiology and Biochemistry of Algae*, Ed. Lewin, R. A., pp 771-797, Academic Press, New York, USA.
- Yin, Z.-H. & Johnson, G. N. (2000). Photosynthesis acclimation of higher plants to growth in fluctuating light environments. *Photosynth. Res.*, 63, 97-107.
- Young, A. J. (1993) Factors that affect the carotenoid composition of higher plants and algae. In *Carotenoids in Photosynthesis*, Ed. Young, A. J., Britton, G., pp 161-206, Chapman & Hall, London, UK.
- Zaslavskaya, L. A., Lippmeier, J. C., Shih, C., Ehrhardt, D., Grossmann, A. R. (2001). Trophic conversion of an obligate photoautotrophic organism through metabolic engineering. *Science*, 292, 2073-2075.
- Zudaire, L. & Roy, S. (2001). Photoprotection and long-term acclimation to UV radiation in the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 62, 26-34.
- Zurzolo, C. & Bowler, C. (2001). Exploring bioinorganic pattern formation in diatoms. A story of polarized trafficking. *Plant Physiol.*, 127, 1339-1345.

\*\*\*\*\*

# ANNEXE

*Conception d'un fluorimètre  
pour le suivi de la dynamique des  
populations phytoplanctoniques*

---

# SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
MATERIELS ET METHODES.....	26
RESULTATS ET DISCUSSION.....	49
CONCLUSION.....	80
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	82
Article 6.....	93

\*\*\*\*\*

# *Introduction*





# INTRODUCTION

## I- LE PHYTOPLANCTON, L'EAU ET L'HOMME.

L'augmentation des phénomènes d'eutrophisation dans les lacs naturels, les réservoirs artificiels et les rivières est une source d'inquiétude croissante dans le domaine du traitement de l'eau utilisée pour la production d'eau de consommation. L'enrichissement des ressources aquatiques en éléments nutritifs provenant d'activités anthropiques (agricoles, industrielles et citadines; voir Anonyme, 1993a) est à l'origine de la prolifération d'algues phytoplanctoniques qui engendrent des problèmes de qualité de l'eau utilisée comme étendue de loisirs ou pour la production d'eau de consommation. Les inquiétudes liées à la présence importante d'algues et de cyanobactéries phytoplanctoniques sont liées au fait que les cellules, et les métabolites qu'elles sécrètent peuvent traverser partiellement la chaîne de traitement et se retrouver dans l'eau de boisson. Ces inquiétudes sont principalement de deux ordres : la biomasse cellulaire elle-même et les métabolites synthétisés principalement par les cyanobactéries.

### I- 1. La biomasse cellulaire.

Elle pose un problème quant à l'élimination efficace du phytoplancton au cours du traitement de l'eau. En effet, une biomasse trop abondante peut aboutir à divers inconvénients : une surconsommation des réactifs utilisés lors du traitement, une augmentation gênante du dépôt organique dans les unités de décantation, une accélération du colmatage des filtres, etc. Ces problèmes sont connus depuis les années 50 (Mouchet, 1997) et le phytoplancton concerné se répartit principalement entre les diatomées (*Melosira* sp., *Asterionella* sp., *Fragilaria* sp., *Cyclotella* sp., *Navicula* sp.), les algues vertes (*Pediastrum* sp., *Chlorella* sp., *Closterium* sp.) et quelques cyanobactéries (*Anabaena* sp.). Ces algues, par sécrétion de substances mucilagineuses de nature polysaccharidique, sont capables de former des tapis denses sur la surface des filtres et empêchent ainsi l'eau de passer convenablement (Mouchet, 1997). De plus, les algues résiduelles dans l'eau en cours de traitement peuvent être la source d'un large éventail de complications incluant la production de trihalométhanes au cours du traitement par réaction avec des produits chlorés (Hoehn *et al.*, 1980; El-Dib et Ali, 1994), la production de composés phénoliques qui

réagissent également avec les produits chlorés engendrant des goûts (Mouchet et Bonnelye, 1998), et la production de matière organique qui aide au développement des bio-films (Peterson *et al.*, 1995) ou des micro-invertébrés susceptibles de coloniser le système de distribution (Mouchet et Pourriot, 1992). C'est pour ces raisons que, en l'absence de réglementation précise, le plus haut degré d'élimination des algues doit être envisagé (Mouchet et Bonnelye, 1998).

## **I- 2. L'excrétion dans l'eau de métabolites indésirables.**

Des molécules indésirables peuvent être libérées dans l'eau du milieu naturel, au cours du traitement ou de la distribution. Trois principaux groupes de substances particulièrement gênantes voire nuisibles qui dérivent majoritairement de l'activité métabolique des cyanobactéries peuvent être distingués : les métabolites qui gênent le traitement de l'eau, ceux qui engendrent des goûts et des odeurs dans l'eau de boisson (peuvent être également inclus dans cette catégorie les métabolites qui produisent une turbidité et une couleur de l'eau) et les toxines.

### I- 2. 1. Les molécules qui gênent le traitement de l'eau.

Ces molécules sont de natures diverses et leurs conséquences sur le traitement de l'eau sont plus ou moins importantes (Mouchet, 1997). Les substances mucilagineuses décrites précédemment peuvent également protéger les cellules contre l'action d'oxydants (chlore, ozone) lors du traitement. Il existe également des substances qui complexent les coagulants utilisés pour faire précipiter la biomasse cellulaire et qui vont inhiber cette étape du traitement. Le métabolisme photosynthétique des cellules est à l'origine de l'émission d'oxygène. Des sursaturations peuvent se produire qui accélèrent le colmatage des filtres, provoquent la remontée de boues et la corrosion des surfaces métalliques dans le système. La consommation importante de CO<sub>2</sub> et de ses dérivés complexés aqueux (bicarbonates, etc) sont également à l'origine de variations de pH importantes; ce paramètre devant être parfaitement maîtrisé tout le long de la chaîne de traitement.

### I- 2. 2. Les molécules qui produisent des goûts et des odeurs.

Voir les nombreux travaux de Persson et de Jüttner sur le sujet et particulièrement ceux dans le numéro spécial de *Water Science and Technology*, vol.15, n°6/7 (Persson, 1995; Jüttner, 1995). Les deux molécules les plus fréquemment rencontrées sont la géosmine qui

produit une odeur de terre et le 2-MIB (2-méthyl-isobornéol) qui produit une odeur de moisi. Les cyanobactéries connues pour produire ces substances sont listées Tableau 1. La production de ces composés semble être dépendante de l'espèce et des conditions environnementales (Persson, 1996). Les algues vertes, les diatomées et les dinoflagellés sont également impliqués dans la production de ces substances mais elles restent minoritaires comparées aux cyanobactéries.

**Tableau 1 : Principaux genres de cyanobactéries connus pour produire de la géosmine et du 2-MIB (2-méthyl-isobornéol) (modifié d'après Persson, 1996; Paerl et Millie, 1996).**

Genres	Géosmine	2-MIB
<i>Anabaena</i> spp.	6 <sup>a</sup>	/
<i>Aphanizonemon</i> spp.	2	/
<i>Oscillatoria</i> spp.	15	10
<i>Phormidium</i> spp.	2	3
<i>Pseudoanabaena</i> spp.	/	1
<i>Synechococcus</i> spp.	/	1

<sup>a</sup>Les chiffres indiquent le nombre d'espèces.

### I- 2. 3. Les toxines de cyanobactéries.

Les cyanotoxines sont devenues une source d'inquiétude croissante depuis quelques années (pour une revue récente voir Dow et Swoboda, 2000; voir les nombreux travaux de Codd et Carmichael sur le sujet et notamment Carmichael, 1997; Codd *et al.*, 1997; Codd *et al.*, 1999; voir également les travaux de Falconer dans le numéro spécial de *Phycologia*, vol.35, n°6). La qualité des réservoirs d'eau douce utilisés soit pour la production d'eau de consommation soit comme étendue de loisirs (Chorus *et al.*, 2000) est remise en cause depuis la découverte de leur impact potentiel (Falconer et Humpage, 1996) et avéré sur la santé humaine (Hunter, 1988; Duy *et al.*, 2000) spécialement en Australie (Falconer, 1996; Pilotto *et al.*, 1997; Steffensen *et al.*, 1997).

Les cyanotoxines peuvent être subdivisées en trois groupes majeurs en fonction de leur mode d'action (Carmichael, 1994; Sivonen, 1996; Dow et Swoboda, 2000) : les *hépatotoxines* dont les plus communes sont les microcystines (*Microcystis* sp.), les nodularines (*Nodularia* sp.) et les cylindrospermines (*Cylindrospermopsis* sp.); les *neurotoxines* comme les PSPs (ou Paralytic Shellfish Poisons) dont les saxitoxines et les anatoxines

(*Anabaena* sp.); et les *cytotoxines* dont les endotoxines qui sont des constituants des membranes cellulaires et que l'on retrouve donc chez la plupart des cyanobactéries.

Les deux premiers types peuvent être hautement toxiques; les principaux genres de cyanobactéries producteurs de ces deux types de toxines sont listés Tableau 2.

**Tableau 2 : Principaux genres de cyanobactéries connus pour produire des toxines (modifié d'après Dow et Swoboda, 2000).**

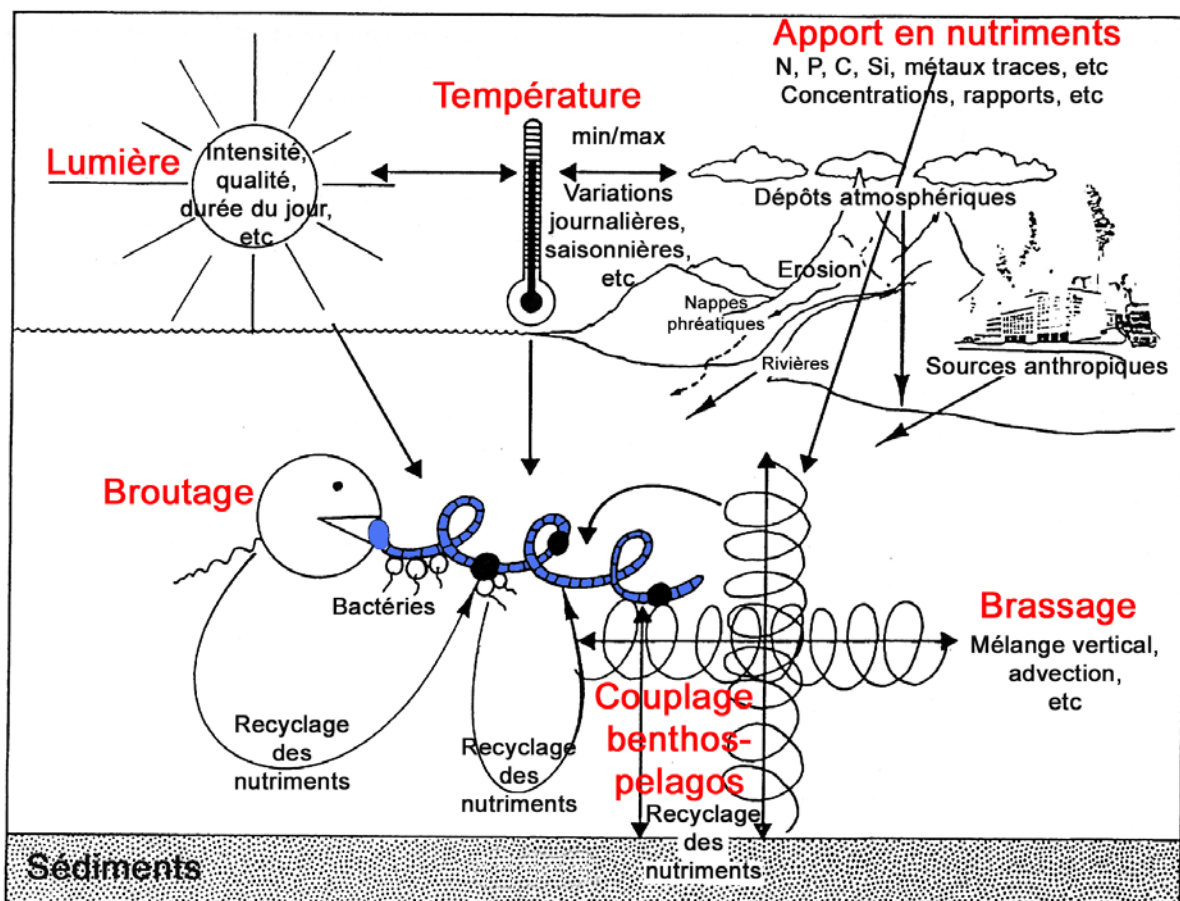
Cyanobactéries	Hépatotoxines	Neurotoxines
<i>Anabaena</i> spp.	+	+
<i>Aphanizonemon</i> spp.	-	+
<i>Oscillatoria</i> spp.	+	+
<i>Microcystis</i> spp.	+	+
<i>Lyngbya</i> spp.	-	+

Vingt-cinq genres de cyanobactéries sont connus à ce jour pour produire ces toxines (Codd *et al.*, 1999). Les hépatotoxines peuvent causer des lésions à court terme du foie, du tractus gastro-intestinal et des reins. Ce potentiel a été tristement illustré dans un centre de dialyse à Caruaru, au Brésil en 1996 (Jochimsen *et al.*, 1998; Pouria *et al.*, 1998). Suite à un traitement inadéquat de l'eau au niveau de l'usine municipale et du centre de dialyse, 126 cas de lésions profondes du foie furent recensées. Soixante personnes en sont mortes. Jochimsen et collaborateurs mirent clairement en évidence la responsabilité de la microcystine (Jochimsen *et al.*, 1998). Ces toxines sont également soupçonnées d'être à l'origine de divers cancers dont celui du tractus gastro-intestinal et du foie (Falconer et Humpage, 1996). Une étude épidémiologique récente en Chine a mis en évidence le lien entre la consommation d'eau contaminée fréquemment par *Oscillatoria* sp. et l'augmentation des cancers du foie dans certaines régions (Yu, 1995). Les neurotoxines sont des poisons neuromusculaires dont les effets aigus et à court terme peuvent aller jusqu'à la paralysie du système cardiaque et/ou respiratoire. Leur toxicité est comparable au curare ou encore à l'amatoxine du champignon *Amanita* sp., ou la toxine sécrétée par certains cobras (*Naja naja*). Aucun cas d'intoxication grave via l'eau de boisson n'a été rapporté; par contre ce type de toxines est fréquemment impliqué dans des intoxications par mise en contact avec l'eau contaminée d'aires récréatives (Falconer, 1996). Les cytotoxines sont moins toxiques et leurs effets résultent seulement en de légers troubles gastro-intestinaux, des irritations de la peau, etc. Alors que les hépatotoxines

sont très toxiques même à faible concentration, les neurotoxines nécessitent une forte densité cellulaire et ne deviennent donc un sujet d'inquiétude qu'en cas de prolifération cyanobactérienne.

## II- LES PROLIFERATIONS PHYTOPLANCTONIQUES EN EAU DOUCE.

Le développement des algues et des cyanobactéries dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce est soumis à des interactions complexes entre divers facteurs environnementaux physiques (lumière, température, brassage des eaux, etc), chimiques (apports en nutriments de sources naturelles et anthropiques, etc) et biotiques (broutage par le zooplancton, interaction avec les bactéries, etc). La Figure 1 présente de façon schématique ces différents couplages (voir également Reynolds, 1994 et Anonyme, 1993a).

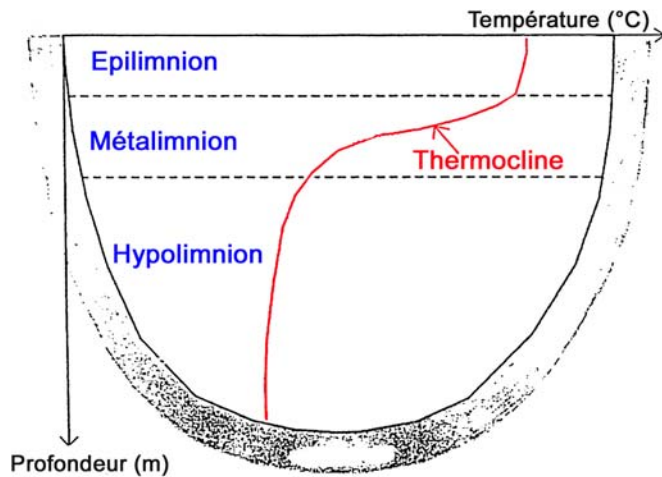


*Fig. 1 : Représentation schématique des différents facteurs environnementaux physiques, chimiques et biotiques pouvant potentiellement influencer le développement des algues et des cyanobactéries en milieu dulçaquicole (modifié d'après Paerl et Millie, 1996).*

## **II- 1. Les régions tempérées.**

Dans les régions tempérées, les proliférations phytoplanctoniques, historiquement appelées “blooms” (Reynolds et Walsby, 1975), sont approximativement saisonnières. La plupart des lacs des régions tempérées ont un régime de mélange “mono- ou bi-mixé”, c’est-à-dire une période de mélange des eaux qui dans le premier cas s’étend de l’automne au début du printemps ou dans le deuxième cas est répartie en deux périodes de mélanges, une en automne, une au début du printemps.

Pour ce type de lac, les facteurs climatiques influent fortement sur la succession des groupes phytoplanctoniques avec une progression allant des diatomées au début du printemps alors que la stratification thermique de la colonne d’eau n’a pas encore eu lieu, suivies par les algues vertes avec le début de la stratification thermique, puis par les cyanobactéries et parfois les dinoflagellés en été lors d’une stratification thermique solidement établie. Les deux facteurs environnementaux majeurs qui stimulent la succession des groupes phytoplanctoniques sont l’intensité et la stabilité de la stratification thermique de la colonne d’eau et la disponibilité en éléments nutritifs (Reynolds, 1984). Au cours de la saison chaude, l’intensité de la stratification thermique augmente progressivement jusqu’à un maximum l’été parallèlement à une diminution de la force de mélange des eaux qui devient progressivement insuffisante pour aider au maintien en suspension des espèces plus lourdes, comme la plupart des diatomées. La stratification aboutit à la séparation de la colonne d’eau en deux zones : une zone de surface plus chaude, l’épilimnion, où la disponibilité en lumière permet la croissance du phytoplancton et une zone profonde plus froide, l’hypolimnion, où l’intensité lumineuse est faible. Entre les deux, se trouve le gradient de température, appelé thermocline ou métalimnion (Fig. 2). Cette séparation engendre une limitation de l’épilimnion en nutriments (très souvent en nutriments azotés) due à la prolifération du phytoplancton en surface et au contraire un enrichissement de l’hypolimnion dû à la sédimentation des organismes morts. La croissance des algues devient limitée par les nutriments et les cyanobactéries font alors leur apparition. C’est donc en été et en automne, dans des conditions météorologiques calmes associées à une concentration minimale en nutriments au niveau de l’épilimnion, que les blooms de cyanobactéries se développent fréquemment en surface. Un second pic de diatomées peut être associé avec le début de la période de mélange des eaux en automne qui entraîne une disparition de la stratification thermique et une remise en suspension des nutriments accumulés dans l’hypolimnion tout au long de l’été.



**Fig. 2 :**  
**Représentation schématique de la stratification thermique d'un écosystème dulçaquicole.**

Cette vue simplifiée de la dynamique du phytoplancton dans les lacs tempérés profonds peut être fortement modifiée et les progressions saisonnières altérées par les conditions locales chimiques et/ou physiques (Reynolds, 1994). Par exemple, dans les lacs eutrophes (plus riches en nutriments), la séquence peut aller des diatomées, aux algues vertes (Volvocales, *Volvox* sp.) aux cyanobactéries possédant des vacuoles à gaz (Nostocales, *Anabaena* sp. ou Chroococcales, *Mycrocystis* sp.) ou dinoflagellés alors que dans les lacs mésotrophes (moyennement riches en nutriments), la succession va des diatomées aux chrysophytes et algues vertes (Chlorococcales, *Sphaerocystis* sp.) aux dinoflagellés (Reynolds, 1990). Dans les lacs eutrophiques peu profonds des zones tempérées de l'hémisphère nord, le genre de cyanobactéries qui domine en été est *Oscillatoria* sp. et dans ces lacs typiquement très turbides, la persistance des cyanobactéries peut s'étaler sur tout l'hiver si celui-ci n'est pas trop froid (Scheffer *et al.*, 1997).

## II- 2. Les régions tropicales.

Dans les régions tropicales et sub-tropicales, de part la stabilité des facteurs climatiques (ensoleillement et température), la stratification thermique est quasiment permanente (Mouchet, 1997) et les blooms peuvent se produire pratiquement toute l'année (Oliver et Ganf, 2000) et sont ainsi souvent difficiles à prédire. Cependant, malgré cette constance, il existe des changements hydrographiques et météorologiques majeurs qui altèrent la structure de la communauté phytoplanctonique. Des similarités marquantes existent entre les grands lacs tropicaux comme le lac Victoria dans l'est africain (Talling, 1987) et le lac Lanao aux Philippines (Lewis, 1978). Les proliférations de diatomées coïncident avec des dépressions de la thermocline provoquées par des événements météorologiques (tempêtes lors

des forts orages, etc), tandis que les algues vertes et les cyanobactéries déclinent durant ces périodes de croissance des diatomées. A l'inverse, lorsque la thermocline se rétablit, le phytoplancton suit une progression proche de celle observée dans les régions tempérées mais sur des échelles de temps plus courtes. Les algues vertes dominent d'abord quand la limitation en nutriments n'est pas sévère suivie par les cyanobactéries pendant les périodes de forte limitation. Le comportement et la composition du phytoplancton dans les lacs tropicaux peu profonds est totalement différente comme c'est le cas pour le lac Georges, pourtant proche du lac Victoria (Viner et Smith, 1973). Ici, le lac est stratifié suivant un cycle journalier de stratification-destratification thermique qui apparaît être une condition idéale pour la prolifération permanente de cyanobactéries type *Mycrocystis* sp., *Aphanizonemon* sp, *Lyngbya* sp. et *Anabaena* sp.

Dans ces systèmes tropicaux, il semble qu'il existe trois changements environnementaux cycliques majeurs, chacun faisant intervenir de nombreuses variables, qui structurent la communauté phytoplanctonique (Oliver et Ganf, 2000) : un cycle journalier prépondérant comme cela semble être le cas pour les lacs peu profonds, un cycle annuel prépondérant pour les lacs profonds et une influence marquée de la variation du volume de l'eau. De façon générale, ces milieux présentent des populations de diatomées et de cyanobactéries qui occupent des positions complémentaires influencées par la disponibilité en nutriments, le brassage vertical et l'hydrographie de la réserve (Oliver et Ganf, 2000). Le Tableau 3 illustre des exemples de diversités phytoplanctoniques rencontrées dans des réservoirs tropicaux et sub-tropicaux avec les principaux genres observés pour les algues vertes, les diatomées et les cyanobactéries.

Location of reservoir	Africa		Asia		South America		
	Downstream from High Dam (Nile water at Cairo)	Lake Mcllwaine (Harare, Zimbabwe)	Singapore		Laguna de Bay (Manila, Philippines)	Poza Honda (Ecuador)	
			Pandan	Kranji			
Total algae count (per ml)	45,000	8,300	18,000	30,000	114,500	55,000	
Cyanophyta	Microcystis	Presence	2,400	150	2,500	95,000	6,500
	Anabaena	8,500	2,600	950	600	3,500	—
	Anabaenopsis		—	—	—	1,500	43,000
	Oscillatoria	—	—	150	1,500	11,500	—
	Lyngbya	Presence	—	—	100	1,000	—
Other	200		—	300	1,000	500	
Chlorophyta	Chlorella	500	100	4,500	8,500	Presence	1,000
	Scenedesmus		150	2,650	3,500		
	Other		150	1,500	3,250		
Diatoms	Cyclotella	28,000	500	2,850	3,500	500	—
	Synedra	1,200	300	1,250	2,500	—	—
	Navicula	800	200	250	1,000	500	—
	Melosira	1,500	1,500			—	—
	Other	500	200			—	—

**Tableau 3 : Exemple de communautés phytoplanctoniques d'eau douce dans des écosystèmes tropicaux et sub-tropicaux (modifié d'après Mouchet, 1997).**



## II- 3. Le cas particulier des cyanobactéries.

### II- 3. 1. Pourquoi les cyanobactéries forment-elles un groupe écologique à part ?

La présence de cyanobactéries est un caractère commun à une grande majorité d'écosystèmes aquatiques tempérés et tropicaux et les blooms de cyanobactéries en milieu dulçaquicole semblent augmenter en distribution, fréquence et durée dans toutes les régions du globe (Tableau 4) (Codd *et al.*, 1999). De nombreuses études ont concerné la prédominance des cyanobactéries et les raisons pour lesquelles ces organismes sont capables de s'adapter avec autant de succès à un large spectre de conditions environnementales (voir la revue de Oliver et Ganf, 2000 sur le sujet).

**Tableau 4 : Distribution géographique de l'observation de blooms cyanobactériens (modifié d'après Codd *et al.*, 1999).**

Europe	Allemagne, Belgique, Danemark, Espagne, Estonie, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Italie, Pays-bas, Norvège, Pologne, Portugal, République Tchèque, Royaume-Uni, Russie, Suède, Slovaquie, Slovénie, Suisse, Ukraine
Amériques	Argentine, Bermudes, Brésil, Canada, Chili, Etats-Unis (au moins 27 états), Mexique, Vénézuéla
Moyen-orient et Asie	Arabie Saoudite, Bangladesh, Corée du Sud, <b>Chine</b> , Inde, Israël, Japon, <b>Malaisie</b> , Sri Lanka, Thaïlande
Océanie	Australie (5 états), Nouvelle-Calédonie, Nouvelle-Zélande
Afrique	Afrique du Sud, Egypte, Ethiopie, Maroc, Zimbabwe

Les explications avancées pour expliquer la dominance des cyanobactéries sont leur capacités à tirer avantage des températures plus chaudes, à utiliser des intensités lumineuses faibles, à utiliser les faibles concentrations en nutriments (faible rapport azote/phosphore), à stocker le phosphore, et à accéder aux faibles concentrations en CO<sub>2</sub> dissout (Blomqvist *et al.*, 1994; Shapiro, 1997; Steinberg et Hartmann, 1988). Une autre caractéristique suggérée comme étant avantageuse est la réduction du broutage zooplanctonique grâce à la sécrétion de toxines (Christoffersen, 1996). Enfin, un avantage certain est leur capacité à réguler leur position dans la colonne d'eau grâce à des vacuoles gazeuses. Ainsi, les genres principaux de cyanobactéries responsables de blooms possèdent tous des vacuoles gazeuses (Tableau 5) et

quasiment tous la capacité de fixer l'azote atmosphérique (N<sub>2</sub>) ce qui les avantage en cas de limitation en nutriments azotés (faible rapport azote/phosphore) (Paerl, 1996) ce qui est très souvent le cas en fin d'été. Ces genres de cyanobactéries peuvent ainsi réguler leur flottaison en fonction des changements de conditions environnementales (Walsby, 1994). Les avantages principaux liés à cette caractéristique morphologique particulière sont une réduction de la sédimentation (Reynolds, 1984), la possibilité d'accéder aux couches de surface pour une meilleure utilisation de la lumière, et du CO<sub>2</sub> et N<sub>2</sub> atmosphériques tout en profitant des concentrations en nutriments plus importantes de l'hypolimnion (Ganf et Oliver, 1982; Paerl et Ustach, 1982; Humphries et Lyne, 1988; Walsby *et al.*, 1997). Cette capacité de régulation de la flottaison est donc très avantageuse dans des eaux présentant une stratification thermique.

**Tableau 5 : Principaux genres de cyanobactéries connus pour produire des blooms et quelques une de leurs caractéristiques morphologiques et physiologiques (modifié d'après Oliver et Ganf, 2000).**

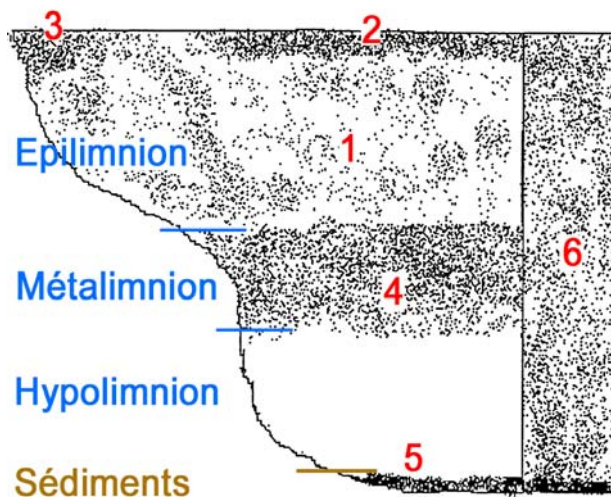
Cyanobactéries	Vacuoles gazeuses	Filaments	Fixation du N <sub>2</sub>
<i>Anabaena</i> sp.	+	+	+
<i>Aphanizonemon</i> sp.	+	+	+
<i>Nodularia</i> sp.	+	+	+
<i>Cylindrospermopsis</i> sp.	+	+	+
<i>Oscillatoria</i> sp.	+	+	?
<i>Spirulina</i> sp.	+	+	-
<i>Microcystis</i> sp.	+	-	-
<i>Gomphosphaeria</i> sp.	+	-	-
<i>Coelosphaerium</i> sp.	+	-	-

### II- 3. 2. Les proliférations cyanobactériennes.

Les conditions requises pour l'apparition d'un bloom de cyanobactéries sont relativement bien connues (Paerl, 1996; Steffensen *et al.*, 1997; Oliver et Ganf, 2000). Elles correspondent à une convergence de plusieurs facteurs environnementaux : des conditions de vent calme, température de l'eau élevée (entre 15 et 30°C), stratification thermique de la colonne d'eau (qui est une conséquence du prolongement des deux premières conditions), un pH entre 6 et 9 et une capacité d'absorption des nutriments plus importante par rapport aux organismes eucaryotes. L'abondance de nutriments (phosphates et aussi souvent nitrates) due

à des activités anthropiques favorise également la prolifération des cyanobactéries (mais aussi des autres groupes du phytoplancton). Dans ces conditions, typiques de la période estivale et du début de l'automne en zone tempérée mais que l'on peut trouver toute l'année dans les régions tropicales, les cyanobactéries supplantent les algues. Paerl (1996) cite également la taille et le volume de l'écosystème, la rétention d'eau (apports par des rivières), le brassage vertical et l'atténuation de la lumière dans la colonne d'eau comme des facteurs importants.

La persistance de biomasses cyanobactériennes en surface serait liée à une disparition de la faculté de régulation de la flottaison suite à des dommages physiologiques (Walsby, 1994) dus à la photoinhibition, la déshydratation (Zohary et Pais-Madeira, 1990), la limitation en carbone organique (Klemer *et al.*, 1996), etc. Dans les lacs dont l'eau est très claire et où la lumière peut pénétrer au-delà de l'épilimnion, il existe également des populations de cyanobactéries inféodées à une zone bien précise de la colonne d'eau : la thermocline. Ces cyanobactéries à vacuoles gazeuses comme *Oscillatoria agardhii* et *Aphanizonemon flos-aquae* peuvent former des biomasses denses dans cette zone (à 3-4 m de profondeur par exemple, Konopka, 1989) (Fig. 3), et lorsque les conditions deviennent défavorables, ces cellules filamenteuses s'agrègent et remontent à la surface pour former des blooms (Walsby *et al.*, 1983). Ainsi, un bloom peut apparaître très rapidement, souvent en quelques heures et sans suivi continu, il peut se produire sans aucun indice qui pourrait prévenir cet événement (Oliver et Ganf, 2000). A 20°C, le taux de croissance de la plupart des cyanobactéries s'étale entre 0.4 et 2 j<sup>-1</sup>. En fait, ces apparitions soudaines sont le plus souvent le résultat de la migration en masse en surface (possible lorsque la turbulence est réduite) et du rassemblement de populations pré-existantes mais dispersées au niveau de l'épilimnion (Fig. 3) (Reynolds, 1994).



**Fig. 3 :** Représentation schématique des localisations possibles des cyanobactéries dans la colonne d'eau d'un écosystème dulçaquicole. 1- Epilimnion, accumulés (blooms) 2- en surface et/ou 3- le long des bords les jours calmes, 4- Métalimnion (thermocline) pour certains genres (*Oscillatoria* sp., *Aphanizonemon* sp.), 5- sur les sédiments, 6- tout le long de la colonne d'eau en période de brassage. Modifié d'après Mouchet, 1997.

### II- 3. 3. La synthèse des toxines et des substances responsables de goûts et odeurs.

La synthèse des métabolites nuisibles cités précédemment et particulièrement les toxines est également liée de façon plus ou moins complexe à divers facteurs physiques, chimiques et biotiques. La sécrétion de toxines servirait de défense chimique qui réduirait le broutage par le zooplancton et la croissance des algues phytoplanctoniques (Christoffersen, 1996; Paerl, 1996b). Une autre explication est avancée par Paerl et Millie (1996). La synthèse de ces métabolites secondaires pourrait être également liée à un mécanisme de “trop plein” permettant de dissiper l’excès d’énergie et/ou de carbone durant les changements d’état physiologique et particulièrement dans les conditions de stress physiologique. Ceci a été mis en évidence pour les toxines (Sivonen, 1996) mais aussi pour les métabolites entraînant des goûts et odeurs (Jüttner, 1995; van der Ploeg *et al.*, 1995). Ces changements peuvent être induits par des variations de régime lumineux (Naes *et al.*, 1985). En effet, de nombreuses recherches ont fait le lien entre la production de toxines et substances responsables de goûts et odeurs et des facteurs environnementaux et/ou endogènes régulant la biosynthèse des pigments. Par exemple, la production de ces métabolites secondaires chez *Microcystis aeruginosa* et *Anabaena cylindrica* est strictement fonction de l’intensité lumineuse (Jüttner *et al.*, 1983; Utliken et Gjolme, 1992). De plus, la localisation intracellulaire de la synthèse de ces métabolites a été identifiée comme étant les lamelles thylakoïdales (Bafford *et al.*, 1993) et cette synthèse a été associée avec la régulation des pigments lipophiles (Bowmer *et al.*, 1992). Par exemple, la géosmine et le 2-MIB sont dérivés des précurseurs des monoterpènes et des sesquiterpènes au sein de la voie de synthèse des isoprénoïdes (voie de synthèse dans laquelle les caroténoïdes et la chaîne phytol de la chlorophylle *a* (Chl *a*) sont synthétisés) (Bentley et Meganathan, 1981). Ils sont produits lorsque la demande en précurseurs de pigments est faible (Naes *et al.*, 1989), ce qui suggère effectivement l’implication dans un mécanisme de “trop plein” lié à l’état physiologique des cellules (Naes *et al.*, 1985). Des détails sur les facteurs influant la production de toxines et les voies de biosynthèse sont également apportés par Sivonen (1996). La production intracellulaire maximale de toxines est plus ou moins liée aux conditions environnementales favorisant le développement optimal des cyanobactéries (durant l’été dans les régions tempérées) (Jungmann et Benndorf, 1994).

Les toxines sont en général libérées dans le milieu lors du déclin d’un bloom (Berg *et al.*, 1987), plus rarement lorsqu’elles se trouvent dans leur phase active de croissance (Sivonen *et al.*, 1990). Il en est de même pour les substances produisant des goûts et odeurs

(Persson, 1996). Une fois libérées dans le milieu aquatique, les toxines peuvent persister pendant plusieurs jours sans diminution de la toxicité. Ainsi, les travaux de Jones (Jones et Orr, 1994; Jones et Negri, 1997) ont montré que les hépatotoxines et les neurotoxines libérées par *Mycrocystis aeruginosa* et *Anabaena circilanis* peuvent persister dans l'eau de trois jours à trois mois. Les hépatotoxines ont une "durée de vie" maximale de trois semaines mais les neurotoxines (spécialement les PSPs) sont particulièrement persistantes. Cette variabilité est due aux conditions environnementales locales et à la nature de la population bactérienne endémique (Jones et Orr, 1994). Par exemple *Sphingomonas* sp. possède les enzymes nécessaires à la dégradation des mycrocystines (Bourne *et al.*, 1996). Dans le cas d'*Anabaena circilanis*, il a même été montré que les toxines PSPs libérées voient leur toxicité accentuée cinq à six fois durant les trois premières semaines (Jones et Negri, 1997).

Enfin, une bonne partie des blooms de cyanobactéries semblent être toxiques. En effet, les genres de cyanobactéries communément connus pour avoir une potentialité à réaliser des blooms sont aussi ceux qui produisent des métabolites secondaires, toxines et responsables de goûts et odeurs : *Anabaena* sp., *Aphanizonemon* sp., *Oscillatoria* sp., *Mycrocystis* sp., etc (Tableaux 1, 2 et 5). Ainsi, la plupart des études menées dans les années 80 et 90 en Europe ont montré que le plus souvent 50 à 90 % des sites présentent des taux de toxicité non négligeables (Tableau 6).

**Tableau 6 : Données sur la surveillance nationale de la toxicité des blooms de cyanobactéries testée par injection intrapéritonéale sur souris (modifié d'après Codd *et al.*, 1999).**

Pays	Période	Nombre de sites testés	% de sites positifs
Royaume-Uni	1981-1989	91	68
Pays scandinaves		51	89
Hongrie	1989-1991	35	83
Norvège		36	88
Australie	1990-1991	130	42
Pays-bas	1992	29	48
Belgique	1992-1993	17	59
Royaume-Uni	1989-1993	48	51
France	1991-1993	12	58
Danemark	1994	42	90
Slovénie	1994-1995	9	89

Considérant ces informations et le fait que la toxicité d'une espèce, d'une souche ou même de clones d'un même isolat varie fortement sans que l'on sache nécessairement pourquoi, ceci fait dire à Codd *et al.* (1999) que toute biomasse cyanobactérienne devrait être considérée comme potentiellement toxique et ce principe de précaution devrait être particulièrement appliqué dans le domaine du traitement de l'eau.

### **III- NECESSITE D'UN SUIVI DU PHYTOPLANCTON POUR L'ADAPTATION DU TRAITEMENT DE L'EAU EN CAS DE BLOOM.**

Comprendre le statut écologique d'un réservoir c'est savoir dresser son "bulletin de santé", information indispensable au gestionnaire de la ressource. Ceci passe nécessairement par la connaissance du compartiment essentiel de l'écosystème, à la base du réseau trophique : le phytoplancton. Il est donc indispensable pour les industriels de l'eau de connaître à tout instant la composition et la distribution du phytoplancton au sein d'un réservoir. En effet, au vu des premiers chapitres, la surveillance de la dynamique des populations phytoplanctoniques est extrêmement importante en termes de préservation de la ressource, de santé publique et d'économies pour les producteurs d'eau de boisson.

#### **III- 1. La chaîne de traitement "classique" de l'eau.**

De nombreuses techniques ont été mises au point afin d'éliminer les organismes phytoplanctoniques soit dans leur milieu naturel, soit au cours du traitement de l'eau. De même, il existe des traitements appropriés pour se débarrasser des substances causant goûts et odeurs et des toxines. Ces différents types de traitements sont décrits par (Bonnelye *et al.*, 1995; Mouchet et Bonnelye, 1998). Une chaîne de traitement "classique" peut être résumée comme suit : après pompage, l'eau subit une étape d'oxydation soit par des produits chlorés, soit par ozone (cette solution est de plus en plus utilisée, Bonnelye *et al.*, 1995) nommée pré-chloration ou pré-ozonation. Cette étape permet, entre autres, de favoriser l'agrégation des organismes entre eux par mise en contact avec un coagulant type polymère. Le phytoplancton agrégé est ensuite éliminé par décantation ou flottaison selon le cas. Afin, d'affiner le traitement, l'eau est ensuite traitée par post-ozonation et filtrée sur un lit de matériau granulaire type charbon actif lorsque cela est nécessaire. Comme précisé dans la revue de Mouchet et Bonnelye, 1998), la connaissance de la biomasse phytoplanctonique et de sa composition est d'importance afin d'ajuster le traitement de l'eau pour quatre raisons

principales : maintenir la qualité de la ressource, économiser le temps et les produits de traitement, optimiser au maximum la chaîne de traitement et tenir compte de la présence des cyanobactéries et des métabolites qu'elles sécrètent. Ceci est essentiel avant que les nuisances engendrées par le phytoplancton ne deviennent de véritables problèmes sous la forme de plaintes des consommateurs et/ou de non respect des critères européens et mondiaux de la qualité de l'eau de boisson.

### III- 2. Adaptation du traitement en cas de bloom et prévention.

L'intervention majeure du gestionnaire de la ressource envers le phytoplancton concerne le contrôle de sa croissance. Celle-ci est le plus souvent basée sur l'épandage d'"algicide"<sup>1</sup>, le plus souvent le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) mais aussi le permanganate de potassium, la chaux et le chlore. Il existe également d'autres procédés chimiques et des procédés physiques de contrôle mais ceux-ci ne seront pas décrits ici (voir Steffensen *et al.*, 1997). De même les diverses interventions permettant de gérer le bassin versant, particulièrement en limitant l'apport de nutriments des points sources anthropiques, ne seront pas abordées ici (voir Anonyme, 1993b). Le CuSO<sub>4</sub> est préféré aux autres produits car il est considéré comme n'ayant aucune implication significative sur la santé humaine (Steffensen *et al.*, 1997) et sa précipitation sur site ne le conduit généralement à la station de traitement que sous formes de traces. Le point le plus débattu quant à son utilisation est l'accumulation du cuivre dans les sédiments, sa libération progressive en conditions réductrices importantes et sa concentration le long de la chaîne alimentaire (Steffensen *et al.*, 1997).

Les cyanobactéries sont plus sensibles que les algues à ce produit. Ce qui pourrait *a priori* apparaître comme un avantage s'est avéré un inconvénient majeur à l'utilisation du CuSO<sub>4</sub>. En effet, la lyse des cyanobactéries conduit à la libération dans le milieu naturel des toxines ( Kenefick *et al.*, 1993; Jones et Orr, 1994; Peterson *et al.*, 1995) et des métabolites responsables des goûts et odeurs (Peterson *et al.*, 1995) ce qui entraîne des problèmes sanitaires et une dégradation de la perception esthétique de l'eau de boisson. Pour ces raisons, l'utilisation d'"algicides" est préconisée en préventif, c'est-à-dire assez tôt au début de la croissance du phytoplancton, et non en curatif. Ce type d'utilisation a deux avantages : il permet d'anticiper un éventuel bloom et d'éviter l'épandage massif de produits chimiques dans le milieu naturel. Le premier point est d'importance car les procédés utilisés en routine

---

<sup>1</sup> Algicide étant un terme anglo-saxon, il sera mis entre guillemets. Il a été préféré au terme herbicide moins adapté au contexte.

deviennent souvent partiellement ou même totalement inefficaces en présence d'une biomasse phytoplanctonique trop importante. L'opérateur doit avoir à l'esprit que certains genres de cyanobactéries responsables de blooms et de sécrétions toxiques (*Oscillatoria* sp. par exemple) sont difficilement éliminées par filtration et ont tendance à persister le long de la chaîne de traitement (Bonnelye *et al.*, 1995). Ceci est bien sûr d'autant plus vrai en période de blooms. Le deuxième point a évidemment une implication environnementale concernant l'accumulation du cuivre dans l'environnement. Enfin, les deux points présentent également un volet économique pour le producteur d'eau : éviter les situations extrêmes c'est éviter de modifier profondément le traitement ce qui aboutit le plus souvent à une perte de temps et une dépense accrue en réactifs, filtres, etc. Dans de nombreux cas, la première indication d'une prolifération phytoplanctonique est le colmatage des filtres (Anonyme, 1998a). Une mesure en continu de la qualité de l'eau pompée permet ainsi d'augmenter la durée de vie des filtres.

Dans le cas des cyanobactéries, l'utilisation d'"algicide" est à éviter (Lam *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 1995). Une "récupération" des cellules entières par coagulation-décantation/flottaison utilisant des oxydants qui ne provoquent pas la lyse des cellules (le sulfate d'aluminium par exemple) est fortement conseillée (Lam *et al.*, 1995; Peterson *et al.*, 1995; Chow *et al.*, 1999). Là encore, le traitement doit être ajusté à la présence de cyanobactéries mais aussi d'algues vertes. En effet, pour les cyanobactéries, une dose trop faible de sulfate d'aluminium permet certes d'éliminer 100 % des algues vertes et des diatomées mais seulement 50 % des cyanobactéries (Mouchet, 1997). De même, l'étape d'oxydation précédant et favorisant la coagulation doit être adaptée à la présence d'algues vertes sous peine de faibles taux d'élimination (Mouchet, 1997).

Un autre aspect important de l'utilisation d'"algicides" en préventif concerne la localisation de la biomasse phytoplanctonique. En effet, celle-ci se concentre sur une épaisseur de plusieurs dizaines de centimètres à plusieurs mètres de profondeur dans des conditions où la colonne d'eau est stratifiée, comme dans le cas de certains genres de cyanobactéries (Fig. 3, § II- 3. 2. ). Un traitement par "algicide" en surface est alors totalement inefficace. Il est donc important de connaître la profondeur exacte de la biomasse phytoplanctonique. Ceci permet soit de modifier la profondeur de pompage de l'eau par un système de siphons adapté, soit d'utiliser un équipement permettant d'injecter l'"algicide" à la profondeur voulue (en général 1 m au-dessus de la zone de croissance active du phytoplancton) (Anonyme, 1998a). Ce genre d'équipement est relativement peu cher comparé au gaspillage de quantités d'"algicides" mal utilisées (Anonyme, 1998a).



### **III- 3. Adaptation du traitement en présence de toxines et/ou substances responsables des goûts et odeurs.**

Divers processus modernes de traitement de l'eau existent en présence potentielle ou réelle de métabolites responsables des goûts et odeurs et de toxines. Ces techniques sont en partie détaillées dans les revues de Mouchet, 1997; Steffensen *et al.*, 1997.

Pour le premier type de molécules, l'efficacité de la dernière étape du traitement, c'est-à-dire l'étape d'affinage, a été largement prouvée (voir la revue de Mc Guire et Gaston, 1988). Ainsi, une post-ozonation et/ou une filtration sur charbon actif sont suffisantes. Pour une description des techniques plus récentes voir Mouchet (1997).

Pour les toxines, cet aspect des choses est également développé dans la récente revue de Hitzfeld *et al.* (2000). Un programme franco-australien a été développé sur le sujet ces dernières années (Bernazeau *et al.*, 1995). Là aussi, l'étape d'affinage ozone couplée à une filtration sur charbon actif est indispensable (Mouchet, 1997) car les processus conventionnels de coagulation/filtration sont totalement inefficaces (Steffensen *et al.*, 1997). L'élimination des hépatotoxines et en particulier de la microcystine est relativement bien maîtrisée (Donati *et al.*, 1994; Nicholson *et al.*, 1994) par contre celle des neurotoxines et spécialement les PSPs reste à optimiser selon Jones et Negri (1997) car les réactifs chlorés utilisés pour détruire les microcystines et cylindrospermines avec efficacité sont impuissants contre les PSPs (Steffensen *et al.*, 1997).

Bien sûr, l'approche qui reste la plus rationnelle est la prévention de la formation de blooms. Ainsi, pour limiter le problème de la mauvaise élimination des organismes phytoplanctoniques, les blooms doivent être anticipés au niveau de la station et parallèlement les taux de coagulants, d'ozone et de chlore doivent être ajustés (Bonnelye *et al.*, 1995). De plus, une attention toute particulière doit être portée à la présence de cyanobactéries toxiques, même à des densités cellulaires relativement basses, spécialement pour la protection de la santé des enfants qui sont plus sensibles que les adultes aux toxines (Duy *et al.*, 2000). L'opérateur doit donc être capable d'anticiper les blooms afin de choisir les "remèdes" et d'adapter les techniques qui sont à sa disposition pour éviter tout dysfonctionnement de la station de traitement.

Pour ces raisons et à cause de la rapidité de division cellulaire des microorganismes constituant le phytoplancton, un système capable de suivre en continu la croissance du

phytoplancton doit être utilisé au niveau de la ressource. La biomasse phytoplanctonique habituellement exprimée en  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ , peut varier très rapidement d'une valeur inférieure à  $1 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  jusqu'à plus de  $2000 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  (plus de 20 millions cellules. $L^{-1}$ ) au plus fort d'un bloom (Oliver et Ganf, 2000). Dans ces conditions, une procédure suffisamment sensible est nécessaire pour détecter un bloom dans ses premiers stades de développement.

#### **IV- LES METHODES DE SUIVI DU PHYTOPLANCTON.**

Plusieurs types de méthodes qui sont majoritairement basées sur le contenu pigmentaire des organismes phytoplanctoniques ont été développées pour évaluer la biomasse ainsi que la composition du phytoplancton.

##### **IV- 1. L'évaluation de la biomasse phytoplanctonique.**

###### IV- 1. 1. La Chl *a* indice de la biomasse phytoplanctonique.

La concentration en Chl *a* de l'eau est depuis longtemps considérée comme un paramètre représentatif de la biomasse phytoplanctonique. D'après Platt et Conover (1971), "la Chl *a* est le seul indice de la présence du phytoplancton disponible à tout moment et qui peut être mesuré *in situ* en continu". Historiquement, la Chl *a* fût d'abord mesurée par des techniques spectrophotométriques après filtration des échantillons et extraction dans l'acétone (Anonyme, 1998b), puis par des techniques fluorimétriques (Yentsch et Menzel, 1963). Les avantages de la détermination de la Chl *a* par fluorimétrie par rapport à la spectrophotométrie sont nombreux (voir la revue Anonyme, 1998b). Un comparatif a été réalisé par l'"U. S. Environmental Protection Agency" et a abouti, entre autres, à la conclusion que la fluorimétrie est plus sensible (au moins d'un facteur 1000) donc nécessite des échantillons de plus faibles volumes (mL au lieu de L).

###### IV- 1. 2. La mesure de la Chl *a in vivo*.

L'idée de mesurer la Chl *a in vivo* par détection de l'émission de fluorescence (IVF ou fluorimétrie *in vivo*) n'est apparue qu'ensuite (Lorenzen, 1966). Les premiers appareils ne permettaient pas une mesure absolue directe de la Chl *a* mais simplement une mesure relative

(comme les fluorimètres type Turner et Datalink; ce point est détaillé ultérieurement dans la section Matériels et Méthodes). Cependant, ils ont été utilisés avec succès dans la gestion de ressources aux Etats-Unis pour détecter le début de la phase de croissance du phytoplancton et ainsi prévenir jusqu'à trois semaines à l'avance l'apparition de blooms (Anonyme, 1998a). Des techniques très sensibles qui mesurent l'émission de fluorescence "active", c'est-à-dire stimulée par une lumière artificielle, ont alors été progressivement développées (voir la première partie de ce manuscrit) : les méthodes "Pulse Amplified modulated" (ou PAM) qui utilise un faisceau modulé pour détecter la fluorescence stimulée par une lumière continue ou des flashes (Schreiber *et al.*, 1993), "pump-and-probe" qui utilise des flashes de faible intensité pour détecter la fluorescence stimulée par des flashes (Kolber et Falkowski, 1993) et "Fast Repetition" Rate (ou FRR) qui est dérivée de la technique "pump-and-probe" avec une plus grande flexibilité des flashes stimulant la fluorescence (Kolber *et al.*, 1998). La méthode "pump-and-probe" a d'ailleurs été adaptée pour le fluorimètre LIDAR qui permet le suivi aérien sur de grandes échelles de la biomasse et des paramètres photosynthétiques du phytoplancton (Chekalyuk *et al.*, 2000). Dès lors, la fluorescence chlorophyllienne est devenue un outil très important pour la détermination de la biomasse et des paramètres de base de l'activité photosynthétique du phytoplancton *in situ*. Elle a été utilisée pour des études sur le phytoplancton de diverses natures (dont une liste non exhaustive est donnée dans la revue Anonyme, 1998a) et reste le seul moyen de déterminer rapidement la distribution verticale et horizontale du phytoplancton. De plus, les mesures de fluorescence permettent d'accéder de façon plus fiable que les mesures de dégagement d'oxygène photosynthétique ou d'incorporation du carbone à la production primaire (Kolber et Falkowski, 1993; Falkowski et Raven, 1997).

Les techniques décrites plus haut (PAM, FRR et "pump-and probe") ont ainsi été utilisées avec succès en océanographie, même dans des zones oligotrophes, pour le suivi du phytoplancton (Falkowski et Kolber, 1995) mais elles étaient jusqu'à récemment limitées par le fait qu'elles ne pouvaient pas distinguer entre les principaux groupes d'organismes phytoplanctoniques (principalement les algues vertes, les diatomées et les cyanobactéries).

#### **IV- 2. L'évaluation de la composition du phytoplancton.**

Les méthodes d'identification des grands groupes phytoplanctoniques basées sur l'observation microscopique et sur l'analyse par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) seront d'abord détaillées car utilisées dans cette étude. Les autres

techniques seront ensuite rapidement évoquées. Enfin, l'accent sera mis sur l'identification reposant sur l'émission de la fluorescence chlorophyllienne, intérêt central de ce travail.

#### IV- 2. 1. L'identification par microscopie optique.

La composition phytoplanctonique d'un échantillon peut être déterminée par comptage et identification au microscope. Il existe différentes techniques dont celle de Utermöhl (1958) (citée dans Wilhelm *et al.*, 1991). Cette technique couramment utilisée comprend une étape de sédimentation des cellules dans une chambre de sédimentation suivie d'une étape de comptage et d'identification des cellules à l'aide d'un microscope inversé (voir la revue de Lund *et al.*, 1958).

Les différentes techniques de comptage microscopique présentent de nombreux désavantages en particulier lorsqu'elles doivent être utilisées pour un suivi en continu : l'identification des organismes demande énormément de temps et nécessite un personnel très qualifié. De plus, il existe plusieurs sources d'imprécision (Tillett, 1993; Rashash et Gallagher, 1995). Dans les échantillons présentant une faible densité cellulaire, l'erreur de comptage est très importante (Lund *et al.*, 1958). L'erreur est également importante (de 50 à 70 %; Wilhelm *et al.*, 1991) pour le dénombrement et l'identification du nanoplancton (2-20  $\mu\text{m}$ ), et le picoplancton (0,2-2  $\mu\text{m}$ ) ne peut être détecté. Ceci est problématique lorsque le phytoplancton, qu'il soit marin ou d'eau douce, est dominé par de tels organismes (Weisse, 1993). Il existe également des imprécisions concernant l'estimation de la biomasse qui, si une mesure de la concentration en Chl *a* ne peut être obtenue, est alors déterminée en estimant la taille des cellules et en exprimant la biomasse en terme de biovolume. Le biovolume est un moins bon paramètre, d'un point de vue physiologique, que la Chl *a*. En effet, le biovolume ne permet pas de distinguer entre les cellules physiologiquement actives et les cellules mortes (Wilhelm *et al.*, 1991; Wilhelm *et al.*, 1995). La conversion du biovolume en quantité de Chl *a* n'est pas fiable car le rapport des deux paramètres peut varier d'un facteur 7 (Wilhelm *et al.*, 1995). Ainsi, la relation biovolume/Chl *a* est extrêmement différente entre des cellules d'algues vertes ou de cyanobactéries qui sont petites et riches en Chl *a* et des cellules de diatomées ou de dinoflagellés, grosses et moins pigmentées (Reynolds, 1994). Néanmoins, cette technique reste indispensable quand une identification au stade de l'espèce comme dans le cas d'un problème de prolifération lié à une espèce donnée (par exemple la cyanobactérie toxique *Microcystis* sp.) s'avère nécessaire.

#### IV- 2. 2. L'identification par HPLC.

Les pigments photosynthétiques et spécialement les caroténoïdes sont utilisés comme biomarqueurs des principaux groupes taxonomiques; par exemple la lutéine pour les algues vertes, la fucoxanthine pour les diatomées et la zéaxanthine pour les cyanobactéries. Ils sont identifiés par HPLC et plusieurs groupes peuvent être ainsi distingués et quantifiés : les algues vertes, les diatomées, les cyanobactéries mais aussi les dinoflagellés, les cryptophycées et les euglénophycées (cette méthode est plus amplement détaillée dans la section Matériels et Méthodes, voir également la revue de Millie *et al.*, 1993). L'analyse par HPLC a d'abord été utilisée en milieu marin (Gieskes et Kraay, 1983; 1986) puis ensuite en milieu dulçaquicole où elle a été confrontée avec succès avec le comptage microscopique (Wilhelm *et al.*, 1991). Plus récemment, l'HPLC a été appliquée dans des expérimentations sur le terrain avec divers degrés de succès dans des eaux oligotrophes à fortement eutrophes (Schmid *et al.*, 1998; Havens *et al.*, 1999; Breton *et al.*, 2000; Desoy *et al.*, 2000 et les références citées dans ce dernier article). Une nouvelle méthode de détermination de l'abondance des différents groupes phytoplanctoniques basée sur l'HPLC (CHEMTAX) a même été développée récemment avec des résultats très prometteurs qui permettent en partie d'éviter les écueils cités ci-dessous (Mackey *et al.*, 1996, 1998; Desoy *et al.*, 2000).

Les avantages de l'HPLC peuvent être résumés comme suit : la possibilité d'automatisation et l'analyse relativement rapide (30 min), l'identification indépendante de la taille et de la densité des cellules, et la quantification des groupes en fonction de la biomasse exprimée cette fois-ci en Chl *a*. Les difficultés rencontrées par cette méthode sont liées à la distribution non spécifique de certains caroténoïdes (comme la zéaxanthine qui est retrouvée sous forme de traces chez les algues vertes, les prochlorophycées et les prasinophycées) et la variation des quantités de caroténoïdes due à une acclimatation aux facteurs environnementaux pour un organisme donné : principalement la lumière (Falkowski et Laroche, 1991; Goericke et Montoya, 1998; Desoy *et al.*, 2000; et la première partie de ce manuscrit) et la limitation en nutriments (Madaragia et Joint, 1992; Goericke et Montoya, 1998). Le métabolisme général, c'est-à-dire le stade de croissance des cellules (phase de croissance exponentielle ou stationnaire; Wilhelm et Manns, 1991), influe également sur la composition pigmentaire; ceci a été très étudié chez les diatomées (Roy, 1988; Brunet *et al.*, 1996). Les avantages et inconvénients de l'HPLC sont discutés plus en détail dans les travaux de Wilhelm (Wilhelm *et al.*, 1991, 1995; Wilhelm et Lohmann, 1997).

#### IV- 2. 3. Les autres méthodes d'identification.

Des méthodes optiques basées sur les différences de morphologie des groupes phytoplanctoniques et/ou d'absorption et de fluorescence ont également été développées (pour revues sur les méthodes de détection optique pour le suivi des blooms phytoplanctoniques voir Cullen *et al.*, 1997; Schofield *et al.*, 1999).

Une approche basée sur **l'analyse de photographies** de cellules traitées par ordinateur a été testée avec un succès relatif particulièrement pour les cellules de petite taille inférieures à 5 µm (Arp, 1991 cité dans Wilhelm et Lohmann, 1997).

Les méthodes de **spectrophotométrie et spectrofluorimétrie** utilisant la signature des spectres d'absorption, d'émission et d'excitation de fluorescence des organismes ont été utilisées pour la première fois par Yentsch et Yentsch pour distinguer différents groupes phytoplanctoniques (Yentsch et Yentsch, 1979). Elles ont été développées progressivement par la suite (Oldham *et al.*, 1985; Yentsch et Phinney, 1985; Hoepffner et Sathyendranath, 1993; Johnsen *et al.*, 1994) jusqu'à récemment (Yacobi *et al.*, 1998; Lohrenz *et al.*, 1999; Schofield *et al.*, 1999; Millie *et al.*, 2001) avec quelques applications couronnées de succès *in situ* (Pryvkina *et al.*, 1994; Seppala et Balode, 1997). Ces techniques sont particulièrement employées pour déterminer l'abondance relative de certaines espèces de dinoflagellés responsables de blooms en milieu marin (Johnsen *et al.*, 1997; Millie *et al.*, 1997). Cependant, les données obtenues par ce type d'approche ne quantifie pas toujours correctement les groupes identifiés en relation avec la biomasse totale et la discrimination n'est pas facile (Schofield *et al.*, 1999). Ces difficultés sont dues en partie à la présence de matières organiques colorées dissoutes ou particulières qui interfèrent avec les signatures pigmentaires des organismes phytoplanctoniques (Schofield *et al.*, 1999). Ainsi, seulement une infime partie de la variabilité totale des spectres peut être attribuée aux pigments accessoires (Garver *et al.*, 1994) et cette méthode n'est pas suffisamment sensible pour distinguer de faibles quantités de différents groupes en mélange et pour détecter le début d'un bloom (Schofield *et al.*, 1999). De plus, d'énormes variations des coefficients d'absorption pour un organisme donné résultant de la photoacclimatation et de l'état physiologique des cellules apportent une difficulté supplémentaire (Sathyendranath *et al.*, 1987; Mitchell et Kiefer, 1988; Johnsen *et al.*, 1994). C'est pour ces raisons qu'une technique de microspectrophotométrie a été développée (Iturriaga *et al.*, 1988) qui s'affranchit partiellement de ces complications en permettant des mesures sur des cellules isolées (Stephens, 1995). La comparaison de cette

amélioration technique récente avec la méthode spectrophotométrique “classique” est plutôt encourageante (Lohrenz *et al.*, 1999).

La **cytométrie de flux** mesure la diffusion de la lumière (qui varie avec la taille et la morphologie des cellules) et l'émission de fluorescence (qui varie avec le contenu pigmentaire des cellules) de cellules isolées (pour une revue récente voir Collier, 2000). Cette méthode est particulièrement utilisée par les océanographes pour déterminer la distribution et la dynamique du picoplancton marin (Vaultot *et al.*, 1995; Partensky *et al.*, 1996) mais elle reste limitée concernant les études en milieu dulçaquicole (Collier, 2000). Elle a prouvé son efficacité dans la distinction et la quantification de plusieurs groupes d'intérêt (Olson *et al.*, 1989). Ainsi, elle a été utilisée pour un système de comptage et d'identification automatique des cellules (Schafer, 1995 cité dans Wilhelm et Lohmann, 1997). Mais là encore des restrictions existent (Dubelaar *et al.*, 1994; Cullen *et al.*, 1997, Collier, 2000). La distinction entre les grands groupes se résume à *Synechococcus* sp., *Prochlorococcus* sp., et aux cellules eucaryotes de petite et grande taille; l'interprétation des données n'est pas toujours évidente. La distinction des amas organiques de grande taille (colonies et cellules filamenteuses) est également limitée. Enfin, la quantification absolue de la biomasse phytoplanctonique est relativement difficile (Collier, 2000).

De nombreux systèmes de détection de l'émission de **fluorescence “passive”** (c'est-à-dire stimulée par la lumière solaire) ont également été mis au point pour le suivi à long terme du phytoplancton océanique côtier sur de grandes échelles (Cullen *et al.*, 1997; Schofield *et al.*, 1999).

Enfin, les méthodes utilisant les **sondes ARNr taxon spécifiques ou les anticorps monoclonaux** couplées avec le marquage par des fluorochromes et la détection par épifluorescence microscopique ou par cytométrie de flux n'en sont qu'à leurs débuts (Groben *et al.*, 2001). Néanmoins, les résultats les plus récents sont encourageants particulièrement en ce qui concerne la détection des espèces toxiques (Collier, 2000).

#### IV- 2. 4. L'identification par fluorimétrie.

Des techniques basées sur la mesure de l'émission de la fluorescence chlorophyllienne par stimulation multi-longueurs d'onde ont également été développées ces dernières années afin de discriminer entre les principaux groupes taxonomiques du phytoplancton. Avec le progrès de l'optique des diodes électroluminescentes (ou LEDs), Schreiber et collaborateurs

ont démontré la faisabilité d'un tel système (Schreiber *et al.*, 1993; Schreiber, 1994) en modifiant la méthode PAM (Kolbowski et Schreiber, 1995; Schreiber, 1998). La méthode "pump-and-probe" a aussi été modifiée dans un but similaire (Beutler *et al.*, 1998) et même pour le suivi à grande échelle (Wright, 1996; Barbini *et al.*, 1998). Un fluorimètre équipé d'une fibre optique a récemment été mis au point, afin de réaliser des mesures de fluorescence à une échelle microscopique pour permettre la distinction entre différents groupes dans les communautés microbiennes constituant des biofilms (Thar *et al.*, 2001).

Ces systèmes sont tous basés sur la discrimination des "groupes spectraux" du phytoplancton. Ces groupes d'organismes possèdent tous des pigments accessoires différents en plus de l'ubiquiste Chl *a*. Ces pigments sont capables d'absorber efficacement la lumière et de transférer l'énergie d'excitation à la Chl *a*, l'accepteur terminal du complexe collecteur d'énergie lumineuse qui émet de la fluorescence. Par exemple, les diatomées ont de la fucoxanthine et les cyanobactéries des phycobilines (contenant soit de la phycocyanine seule, soit associée avec la phycoérythrine). Ces pigments absorbent dans différentes régions du spectre de la lumière visible; vert pour la fucoxanthine et la phycoérythrine, rouge-orange pour la phycocyanine. En utilisant plusieurs longueurs d'onde d'excitation induites par des LEDs de différentes couleurs, une évaluation de la composition systématique d'une population phytoplanctonique donnée peut être obtenue.

Ce principe théorique a pour la première fois été mis en pratique avec un fluorimètre par Schreiber *et al.* (1993). En excitant un mélange d'algues vertes et de cyanobactéries avec une longueur donnée, ils ont pu collecter un signal dix fois plus important pour les cyanobactéries et ainsi réussi à distinguer les deux groupes d'organismes. Le système finalisé par Schreiber *et al.* (1998), appelé "PHYTO-PAM Phytoplankton Analyser" et commercialisé par Watz, Allemagne, comprend quatre longueurs d'onde d'excitation (470, 535, 620 et 650 nm). Il peut ainsi distinguer un groupe spectral bleu (les cyanobactéries sans phycoérythrine), vert (les algues vertes) et brun (les diatomées et les dinoflagellés) avec une sensibilité de  $1 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ . De plus, étant calqué sur la technologie "PAM" de nombreux paramètres photosynthétiques illustrant la physiologie du phytoplancton peuvent être mesurés. Le système mis au point par Beutler *et al.* (1998), appelé "BBE FluoroProbe" et commercialisé par BBE, Allemagne, utilise cinq longueurs d'onde (450, 525, 570, 590 et 610 nm) qui permettent de distinguer les cyanobactéries à phycocyanine, les algues vertes, les diatomées/dinoflagellés et les cryptophycées avec une sensibilité de  $1 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ . L'évaluation de la physiologie de phytoplancton n'est pas possible. Le principal avantage de



cet appareil réside dans son concept calqué sur le technique “pump-and-probe” (Kolber et Falkowski, 1993) qui permet l’acquisition de profils en fonction de la profondeur et en temps réel. De plus, des sondes optionnelles peuvent mesurer la température, la lumière incidente ainsi que la pression. Ces instruments coûteux sont surtout utilisés en recherche fondamentale et ne peuvent être manipulés que par un utilisateur expérimenté. De plus, les deux groupes spectraux de cyanobactéries (avec ou sans phycoérythrine) ne sont pas séparément identifiables, la distinction diatomées/dinoflagellés nécessite une observation microscopique et le second appareil est d’un intérêt limité quant à la détection des formes coloniales *in situ*.

Nous avons développé une telle approche mais avec des buts différents de ceux affichés par les instruments déjà existant. Le prototype (appelé “fluorimètre ENS”) que nous avons mis au point est un système partiellement automatisé, bon marché, facilement utilisable par un technicien peu qualifié, spécialement destiné à être un système alerte pour enregistrer en temps réel la prolifération du phytoplancton d’eau douce et pour déterminer le groupe taxonomique responsable de ce bloom. L’appareil est basé sur l’excitation de la fluorescence chlorophyllienne à seulement trois longueurs d’onde distinctes. Des excitations bleue (430 nm), verte (540 nm) et orangée (625 nm) sont utilisées pour différencier les quatre principaux groupes du phytoplancton d’eau douce : les algues vertes, les diatomées et deux groupes spectraux de cyanobactéries (avec et sans phycoérythrine). Les cryptophycées et les dinoflagellés étant des groupes le plus souvent marginaux en milieu dulçaquicole, ils ne sont pas considérés. Un intérêt spécial a été porté à l’évaluation des cyanobactéries et à l’état physiologique du phytoplancton, c’est-à-dire sa potentialité à pouvoir réaliser un bloom. Le système a été testé *in situ* sur des réservoirs tropicaux naturels ou artificiels utilisés pour la production d’eau de consommation en Malaisie (Masai) et en Chine (Macao) en collaboration avec des laboratoires de recherche dans le domaine de la qualité de l’eau :

- le “Sungay Layang Water Treatment Plant Laboratory, Masai, Johor, Malaisie.
- le “Laboratory and Research Center”, Macao Water Supply Co., Chine.

\*\*\*\*\*

# *Matériels et Méthodes*



## MATERIELS ET METHODES

### I- ALGUES ET CYANOBACTERIES UTILISEES COMME SOUCHES DE REFERENCES ET CONDITIONS DE CULTURE.

#### I- 1. Description des genres et/ou espèces.

Huit genres et/ou espèces d'algues et de cyanobactéries planctoniques ont été utilisés comme représentatifs des :

- **Chlorophycées ou algues vertes (Chlorophytes)** : *Chlorella* sp. Beijerinck (Chlorococcales, Chlorococcacées), *Scenedesmus* sp. Meyen (Chlorococcales, Scenedesmacées), *Monoraphidium* sp. (Chlorococcales) et *Ankistrodesmus* sp. Corda (Chlorococcales).

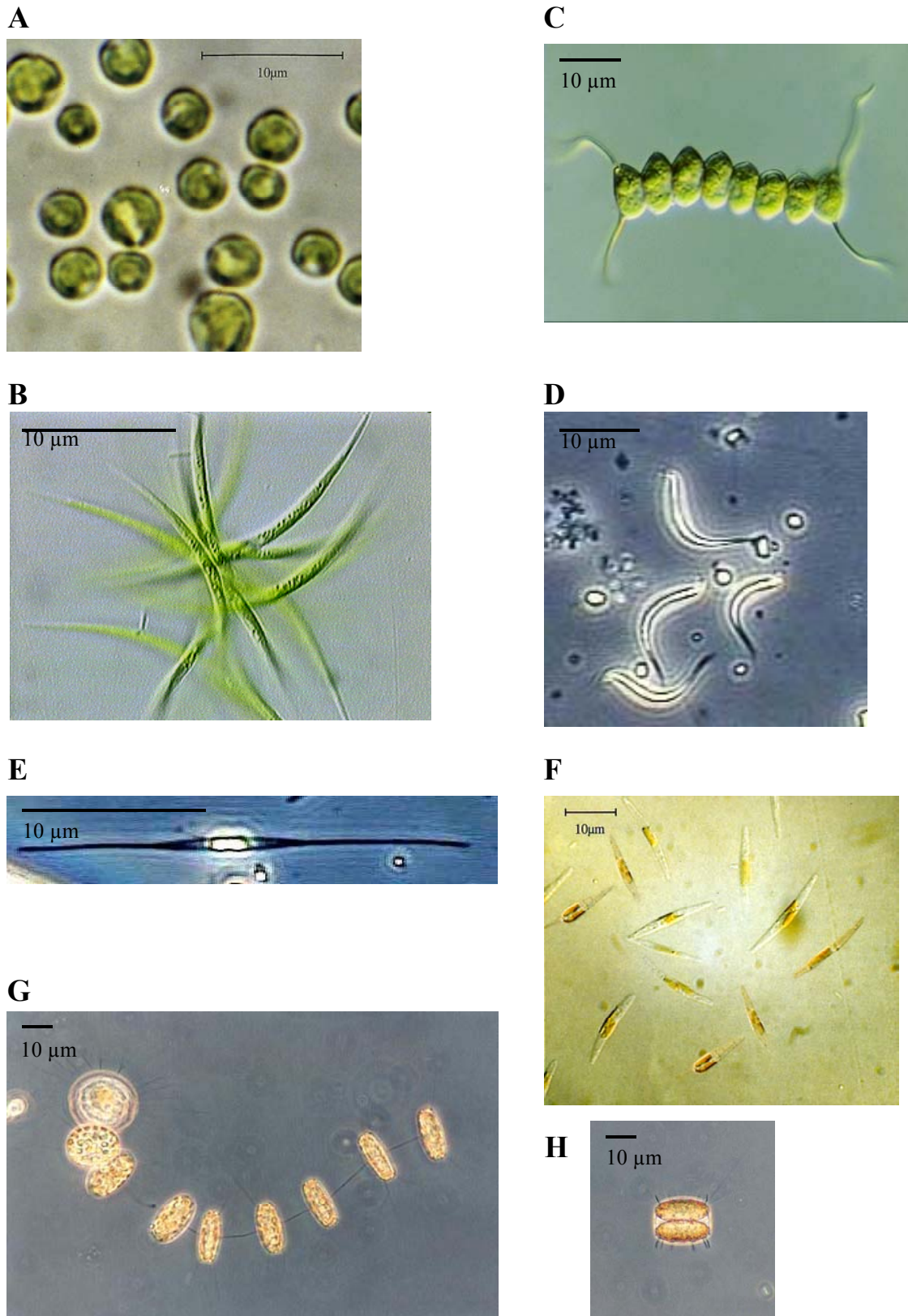
- **Bacillariophycées (Diatomophycées) ou diatomées (Hétérokontophytes)** : *Phaeodactylum tricornutum* Böhlin (Pennales, Phaeodactylacées), *Cylindrotheca fusiformis* Reimann et Lewin (Pennales, Bacillariacées) et *Thalassiosira weissflogii* Fryxell et Hasle (Centrales, Thalassiosiracées).

- **Cyanobactéries (Cyanophytes)** : *Anabena* sp. Bory (Nostocales, Nostocacées), *Pseudoanabena* sp. (Oscillatoriales, Oscillatoriacées) et *Synechococcus* sp. Nägeli (Chroococcales, Chroococcacées).

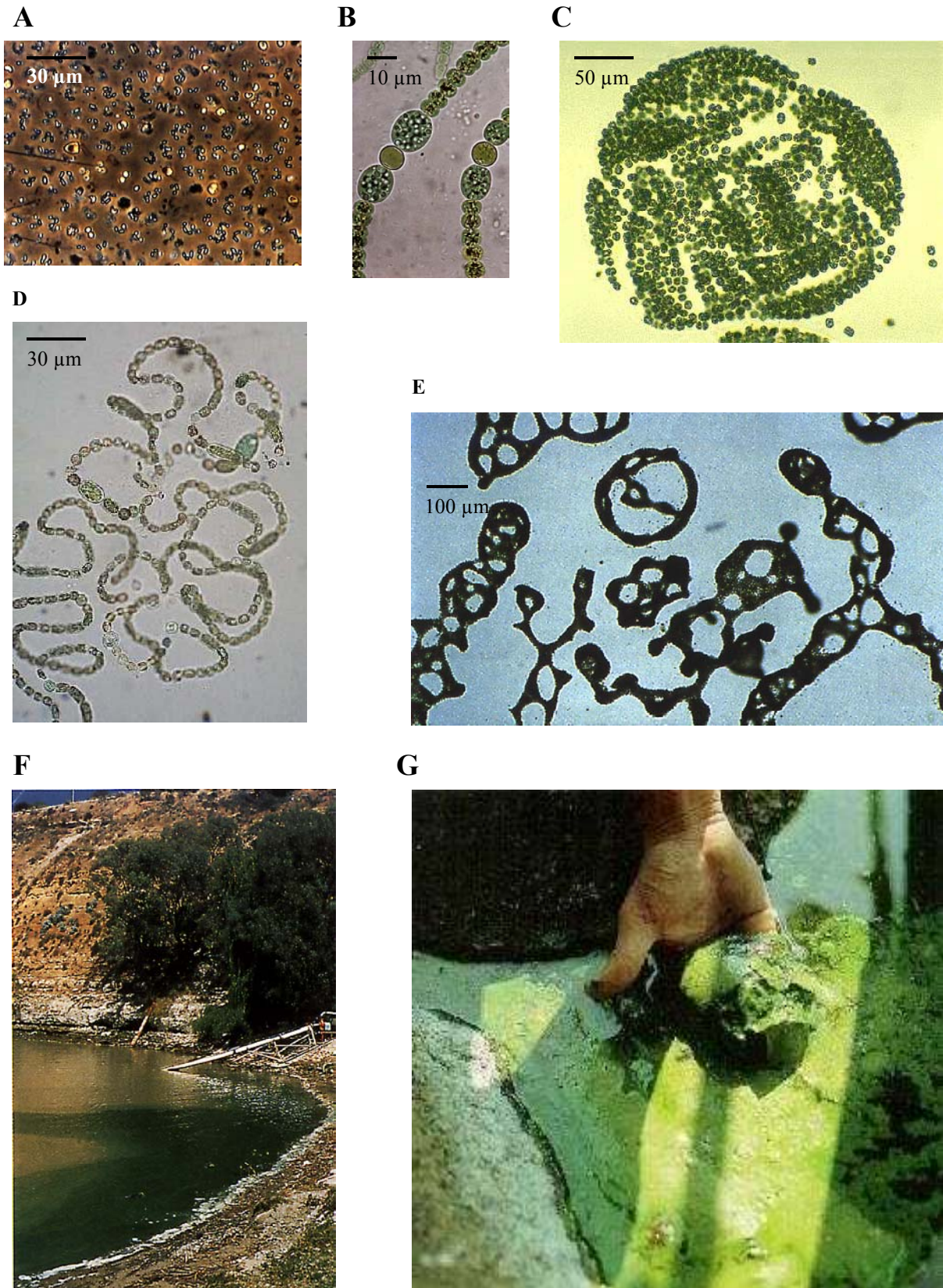
Ces différents genres sont représentés Fig. 4 et Fig. 5.

#### I- 1. 1. Les algues vertes.

Les quatre genres d'algues vertes planctoniques sont fréquemment rencontrés en eau douce dans les zones tropicales et sub-tropicales parmi ceux dominant la biomasse des algues vertes (Mouchet, 1997). *Chlorella* sp. et *Monoraphidium* sp. sont connus pour produire des substances mucilagineuses susceptibles d'accélérer le colmatage des filtres lors du traitement de l'eau (Mouchet, 1997).



**Fig. 4** : Morphologies des espèces d'algues phytoplanctoniques de référence. De A à D : Chlorophycées, de E à H : Bacillariophycées. (A) *Chlorella* sp.; (B) *Ankistrodesmus* sp.; (C) *Scenedesmus* sp.; (D) *Monoraphidium* sp.; (E) *Cylindrotheca fusiformis*; (F) *Phaeodactylum tricornutum*.; (G) *Thalassiosira* sp.; (H) *Thalassiosira* sp.



**Fig. 5 :** Morphologies des cyanobacteries de référence. (A) *Synechococcus* sp.; (B) *Anabaena* sp. détail; (C) *Mycosystis* sp.; (D) *Anabaena* sp.; (E) *Mycosystis* sp.; (F) bloom en eau douce, *Anabaena* sp., Australie; (G) accumulation de biomasse cyanobactérienne lors d'un bloom.

### I- 1. 2. Les diatomées.

Ces espèces ont été décrites dans la première partie de ce manuscrit.

### I- 1. 3. Les cyanobactéries.

*Anabaena* sp. et *Pseudoanabaena* sp. sont fréquemment identifiées dans les réservoirs d'eau douce dans les régions tropicales et sub-tropicales. *Anabaena* sp est un genre connu pour produire des proliférations (Oliver et Ganf, 2000) (Fig. 5, photographie F), accélérer le colmatage des filtres (Mouchet, 1997) par accumulation de biomasse (Fig. 5, photographie G), produire de la géosmine qui génère un goût de terre dans l'eau de boisson (Persson, 1996) et produire des toxines du type hépatotoxine et neurotoxine (Dow et Swoboda, 2000). C'est donc un genre très bien connu des industriels de l'eau. *Pseudoanabaena* sp. et *Synechococcus* sp. sont des genres plus anecdotiques même s'ils sont également rencontrés en milieu naturel et également producteurs de toxines (Dow et Swoboda, 2000) et de 2-méthyl-isobornéol (*Pseudoanabaena* sp., Paerl et Millie, 1996) qui donne un goût de moisi à l'eau de boisson. *Synechococcus* sp. est considéré comme un organisme "modèle" dont la culture est aisée.

## **I- 2. Origine des souches et conditions de culture.**

### I- 2. 1. Les algues vertes.

Les algues vertes sont cultivées dans 25 L de milieu de culture Bold Basal (Nichols et Bold, 1965) continuellement agité par bullage et maintenu à 25 °C, sous une intensité lumineuse de  $25 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  produite par des tubes fluorescents blancs (Cool daylight, Philips, France) avec une photopériode 12 h lumière / 12 h obscurité. Les cultures ont été réalisées au laboratoire du "Sungay Layang Water Treatment Plant Laboratory" de Masai (Malaisie); les espèces n'ont pu être déterminées. Les souches proviennent de la collection de l'Université de Technologie de Malaisie (UTM) exceptée *Ankistrodesmus* sp. qui a été isolée à partir d'un réservoir de Masai.

### I- 2. 2. Les diatomées.

Les trois genres de diatomées planctoniques cultivés ne sont pas tous dulçaquicoles. En effet, le laboratoire de l'ENS ne possédant qu'une seule souche d'eau douce (*Phaeodactylum tricornutum*), trois espèces marines ont été utilisées en comparaison :

*Phaeodactylum tricornutum* - souche marine, *Cylindrotheca fusiformis* et *Thalassiosira weissflogii*. Pour la souche dulçaquicole, les cellules sont cultivées dans 300 mL de milieu de culture Bristol modifié enrichi en éléments mineurs (2 mL) et en extraits de terre (Bold, 1949). Le milieu est constamment agité par bullage d'air stérile et maintenue à 18 °C. Les algues sont illuminées à une intensité de  $40 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  produite par des tubes fluorescents blancs (36 W/133-D26 Claude, Blanc Industrie, Allemagne) sous une photopériode 16 h lumière / 8 h obscurité. Les trois souches marines sont cultivées dans des conditions similaires, dans un milieu de culture F/2 à base d'eau de mer naturelle stérile (Guillard et Ryther, 1962). La souche dulçaquicole provient de l'Université du Texas (UTEX) et les souches marines du "Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton" (CCMP), USA.

### I- 2. 3. Les cyanobactéries.

Les cellules de *Synechococcus* sp. ont été cultivées à l'ENS dans 1 L de milieu de culture GN (Stanier *et al.*, 1971) continuellement agité par bullage d'air stérile à 30 °C. Elles sont illuminées en lumière continue à  $50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  par des tubes fluorescents blancs (TLD 36W/33, Philips, France). Elles proviennent de la collection Pasteur, France, souche PCC 7942. *Anabaena* sp. et *Pseudoanabaena* sp. ont été cultivées au laboratoire du "Sg Layang Water Treatment Plant Laboratory" de Masai (Malaisie) dans les mêmes conditions que les algues vertes; les espèces n'ont pu être déterminées. Ces deux souches proviennent de la collection de l'UTM.

Pour toutes les souches, les cellules ont été récoltées soit en phase exponentielle de croissance soit pendant la phase stationnaire comme précisé ultérieurement.

## **II- METHODES CLASSIQUES UTILISEES POUR LA DETERMINATION DE LA BIOMASSE ET L'IDENTIFICATION DES ORGANISMES PHYTOPLANCTONIQUES.**

### **II- 1. Méthodes permettant la seule mesure de la biomasse phytoplanktonique.**

La biomasse phytoplanktonique peut être exprimée de deux façons : en nombre de particules ou de cellules par unité de volume d'eau ou en quantité de Chl *a* par unité de volume d'eau.

### II- 1. 1. Comptage des particules.

Le comptage de particules a été réalisé avec un compteur de particules 2200-PCX, Hach, USA. Les réglages utilisés sont les suivants : résolution, 1  $\mu\text{m}$ ; taille maximale, 500  $\mu\text{m}$  et comptage maximal, 17 000 particules. $\text{mL}^{-1}$ . Chaque comptage a été effectué sur un volume d'eau de 500 mL à une vitesse de pompage de 100  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Le principe de l'appareil est le suivant : l'eau est dirigée au travers d'une cellule optique de taille 750 x 750  $\mu\text{m}$  placée perpendiculairement à un faisceau laser émis par une diode laser. Chaque particule qui traverse le laser génère un signal correspondant à sa taille. L'appareil a été au préalable calibré avec des sphères de différentes tailles permettant de faire correspondre taille et signal. L'information est triée parmi trente-deux gammes de taille allant de 2 à 500  $\mu\text{m}$ . Elle est ensuite normalisée en nombre de particules. $\text{mL}^{-1}$  pour une, plusieurs ou toutes les catégories de taille. Ici, la taille des cellules phytoplanctoniques étant inconnue, le comptage de particules a été réalisé de façon globale en tenant compte du fait que l'appareil est susceptible de détecter des particules organiques non phytoplanctoniques (petites cellules du zooplancton) et des particules non organiques (argiles, etc).

### II- 1. 2. Détermination de la concentration en Chl *a* *in vivo* par fluorescence.

Les mesures de la concentration en Chl *a* ont été réalisées avec deux types de fluorimètres :

- **le fluorimètre Turner** (Field fluorometer 10-AU Digital, Turner, USA) avec le kit optique 10-096 composé d'une lampe bleue (réf. 10-089), d'un filtre "excitation" passe-bande 340-500 nm (réf. 10-050), d'un filtre "émission" passe-haut 665 nm (réf. 10-113) et d'un filtre référence neutre 400-700 nm (réf. 10-032). L'appareil est calibré avec des solutions standards de différentes concentrations de Chl *a* dans l'acétone 90 %. Ce calibrage d'"usine" est stable durant plusieurs mois. Il est utilisé uniquement pour les mesures de concentration en Chl *a* après extraction dans l'acétone 90 %. Pour l'évaluation de la Chl *a* *in vivo*, une mesure de la Chl *a* par extraction dans l'acétone 90 % selon la méthode EPA 445 est réalisée sur quelques échantillons. Ceci permet d'étalonner l'appareil pour la détermination de la Chl *a* sur des échantillons d'eau naturels. Ce calibrage supplémentaire est indispensable afin de s'affranchir des interférences provenant de diverses substances en suspension comme les acides humiques. Ces substances peuvent en effet engendrer une mauvaise estimation de la concentration en Chl *a*. Le "facteur de calibrage" ainsi obtenu est utilisé pour convertir les mesures de



fluorescence *in vivo* sur des échantillons naturels en concentration de Chl *a* (en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). La méthode EPA 445 (Arar et Collins, 1992) d'extraction de la Chl *a* dans l'acétone 90 % est celle recommandée par l'"U. S. Environmental Protection Agency" (également disponible sur le site web <http://www.turnerdesigns.com>). Cette méthode peut être résumée comme suit. Les algues phytoplanctoniques contenues dans 1 L ou plus d'eau sont concentrées par filtration sous un vide modéré afin de ne pas endommager les cellules algales. La Chl *a* est ensuite extraite dans l'acétone 90 % dans un mortier. La solution obtenue est laissée à macérer pendant 2 h afin d'achever l'extraction. La solution est ensuite clarifiée par centrifugation à 1000 g pendant 5 min. La fluorescence est mesurée sur le surnageant. Le "facteur de calibrage" obtenue lors de la calibration d'"usine" permet de convertir la valeur de fluorescence en concentration de Chl *a* (en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ). Toutes les manipulations sont réalisées à la semi-obscurité.

- **le fluorimètre Datalink** (FL-100, Datalink, France). L'utilisation de l'appareil est très semblable à celle du fluorimètre Turner. La lampe utilisée ici est une lampe Xenon. L'appareil fonctionne en flux continu sur des échantillons de 200 mL avec un écoulement de  $0,5 \text{ L.min}^{-1}$ . Un système optique permet de compenser la dérive des mesures lorsque la turbidité de l'échantillon est trop élevée.

La sensibilité du fluorimètre Turner va de 0,5 à  $250 \mu\text{g.L}^{-1}$ , celle du Datalink, de 0,5 à  $300 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Tous les détails sur les caractéristiques des deux fluorimètres et les méthodes de mesure utilisées sont disponibles sur les sites web (<http://www.turnerdesigns.com> et <http://www.datalink-instruments.com>).

Le principe de ces appareils peut être rapidement décrit comme suit : la Chl *a* est excitée par une illumination bleue plus ou moins sélective avec un pic d'émission autour de 440 nm de courte durée et de forte intensité. La fluorescence émise à température ambiante aux alentours de 670 nm est détectée par un tube photomultiplicateur associé à un filtre interférentiel ou passe-haut qui sélectionne une fenêtre de détection dans cette région du spectre de la lumière visible. Un étalonnage à partir de solutions de différentes concentrations de Chl *a* dans l'acétone 90 % permet ensuite de convertir la mesure de fluorescence en concentration de Chl *a* (en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) dans l'échantillon d'eau analysé.

## II- 2. Méthodes permettant la mesure simultanée de la biomasse phytoplanktonique et l'identification des algues et cyanobactéries.

### II- 2. 1. Analyse pigmentaire par HPLC.

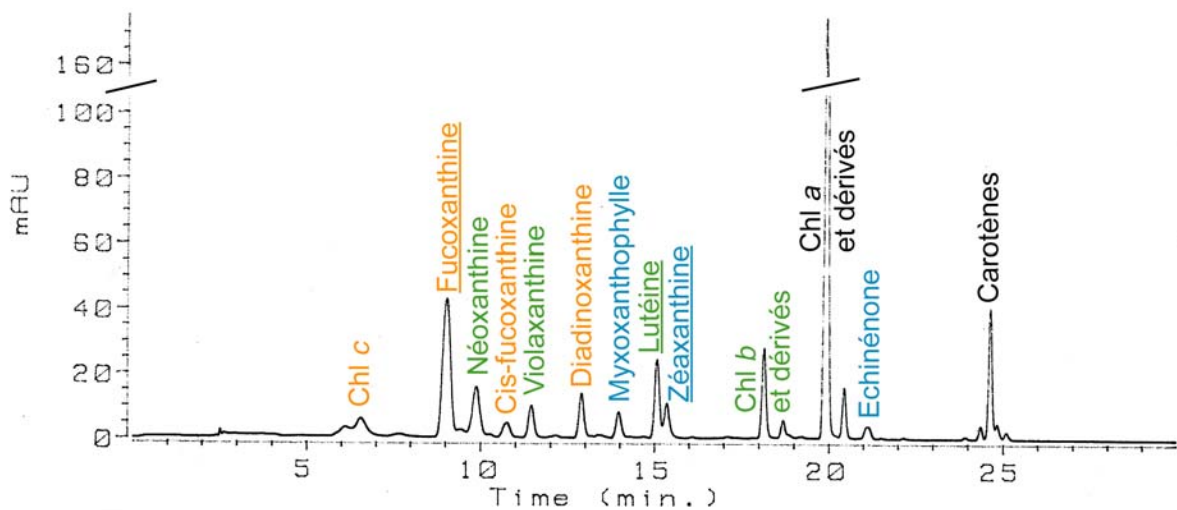
Les analyses pigmentaires ont été réalisées par HPLC selon la méthode utilisée par Arsalane *et al.* (1994). Cette technique est décrite dans la première partie de ce manuscrit (voir Chapitre II-Matériels et Méthodes § IV- 3. ). Les cellules sont déposées sur un filtre millipore (AP 20, Whatman, Grande-Bretagne) qui est ensuite plongé dans l'azote liquide. Les pigments sont extraits dans une solution 70 % méthanol / 30 % acétone (vol / vol) avant analyse. Les coefficients d'extinction utilisés pour la détermination de la Chl *a* sont ceux utilisés par Berkaloff *et al.* (1990).

Les proportions d'algues vertes, de diatomées et de cyanobactéries ont été déterminées en appliquant la matrice précédemment décrite par Wilhelm *et al.* (1991) et régulièrement améliorée (Wilhelm *et al.*, 1995; Wilhelm et Lohmann, 1997). Comme déjà précisé dans l'introduction, cette méthode est basée sur le fait que chaque groupe taxonomique possède, en plus de la Chl *a*, une xanthophylle qui lui est spécifique ou qui n'est retrouvé que sous forme de traces dans d'autres groupes (Tableau 7). La présence de telle ou telle xanthophylle constitue donc la signature d'un groupe et ces pigments sont utilisés comme des biomarqueurs. Wilhelm et collaborateurs ont ainsi choisi la lutéine pour les algues vertes, la fucoxanthine pour les diatomées et la zéaxanthine pour les cyanobactéries (on peut également citer la péridinine pour les dinoflagellés et l'alloxanthine pour les cryptophycées). Le choix de ces pigments biomarqueurs est discuté dans Breton *et al.* (2000). La détection de ces pigments par HPLC permet d'identifier et de quantifier les différents groupes taxonomiques. Les xanthophylles et les chlorophylles sont des pigments hydrophobes qui peuvent être extraits par des solvants organiques et séparés sur des chromatogrammes en fonction de leur temps d'éluion par HPLC (Fig. 6). La quantification de ces pigments est basée sur la conversion de la surface des pics d'éluion en pmol à partir de courbes d'étalonnage réalisées sur des solutions de pigment pur. La quantité de chaque xanthophylle est ensuite rapportée à la quantité de Chl *a*. Ce rapport molaire des xanthophylles à la Chl *a* (coefficient Xan/Chl *a*) a préalablement été déterminé (Everitt *et al.*, 1990; Wilhelm et Manns, 1991; Kraay *et al.*, 1992; Letelier *et al.*, 1993) sur des cultures monospécifiques représentatives de chaque groupe taxonomique. Dans des conditions de culture fixées, la valeur de ce coefficient est stable et

**Tableau 7 : Les xanthophylles majeures des différents groupes d'algues et de cyanobactéries (modifié d'après Wilhelm *et al.*, 1995).**

	Algues vertes	Diatomées	Cyanobactéries
Lutéine	+	-	-
Zéaxanthine	(+) <sup>b</sup>	-	+
Néoxanthine	+	-	-
Violaxanthine	+	-	-
Fucoxanthine	-	+	-
Diadinoxanthine	-	+	-
Myxoxanthophylle	-	-	+

<sup>b</sup> (+), xanthophylle présente sous forme de traces.



**Fig. 6 :** Chromatogramme d'un mélange d'algues vertes (*Chlorella* sp.), de diatomées (*Phaeodactylum* sp.) et de cyanobactéries (*Synechococcus* sp.) en proportions 75/12,5/12,5. Les pics identifiés en vert correspondent aux pigments spécifiques des algues vertes, en brun aux diatomées et en bleu aux cyanobactéries (Rq : la zéaxanthine et l'échinone sont trouvée sous forme de traces chez les algues vertes). La Chl a et les carotènes sont en noir car ils sont ubiquistes. Les pigments soulignés correspondent aux xanthophylles utilisés dans la matrice de Wilhelm (1991).

**Tableau 8 : Rapports molaires des xanthophylles spécifiques à la Chl a (Xan/Chl a) des différents groupes d'algues et de cyanobactéries (modifié d'après Wilhelm *et al.*, 1991).**

Groupe taxonomiques	Xanthophylles	Xan (pmol)/Chl a (nmol)
Algues vertes	Lutéine	149 ± 19
Diatomées	Fucoxanthine	850 ± 71
Cyanobactéries	Zéaxanthine	117 ± 13

spécifique à chaque groupe (Tableau 8). La quantité relative (en %) des groupes taxonomiques est alors obtenue par le rapport du coefficient Xan/Chl *a* de l'échantillon sur le coefficient Xan/Chl *a* des cultures monospécifiques multiplié par 100.

### II- 2. 2. Identification et comptage par microscopie optique.

Les algues et les cyanobactéries ont été comptées et identifiées par microscopie optique avec une cellule de Malassez suivant les recommandations données par l'AWWA ("American Water Works Association") (APHA, 1995). L'identification a été basée sur des clés d'identification du phytoplancton d'eau douce (Prescott, 1978; Anonyme, 1990; Bellinger, 1992).

## **III- DESCRIPTION DU PROTOTYPE DU FLUORIMETRE ENS ET DE L'ACQUISITION DES DONNEES.**

### **III- 1. Le prototype du fluorimètre ENS.**

Le prototype lui-même est très compact puisqu'il est intégré dans une valise (Datavault, Grande-Bretagne) de dimension 38 cm L x 27 cm l x 17 cm H spécialement conçue pour un transport sécurisé et facile particulièrement en avion. Le système a été conçu par Claude Rigart, Gérard Parésys et Jean-Claude Duval. Il présente trois parties (Fig. 7) :

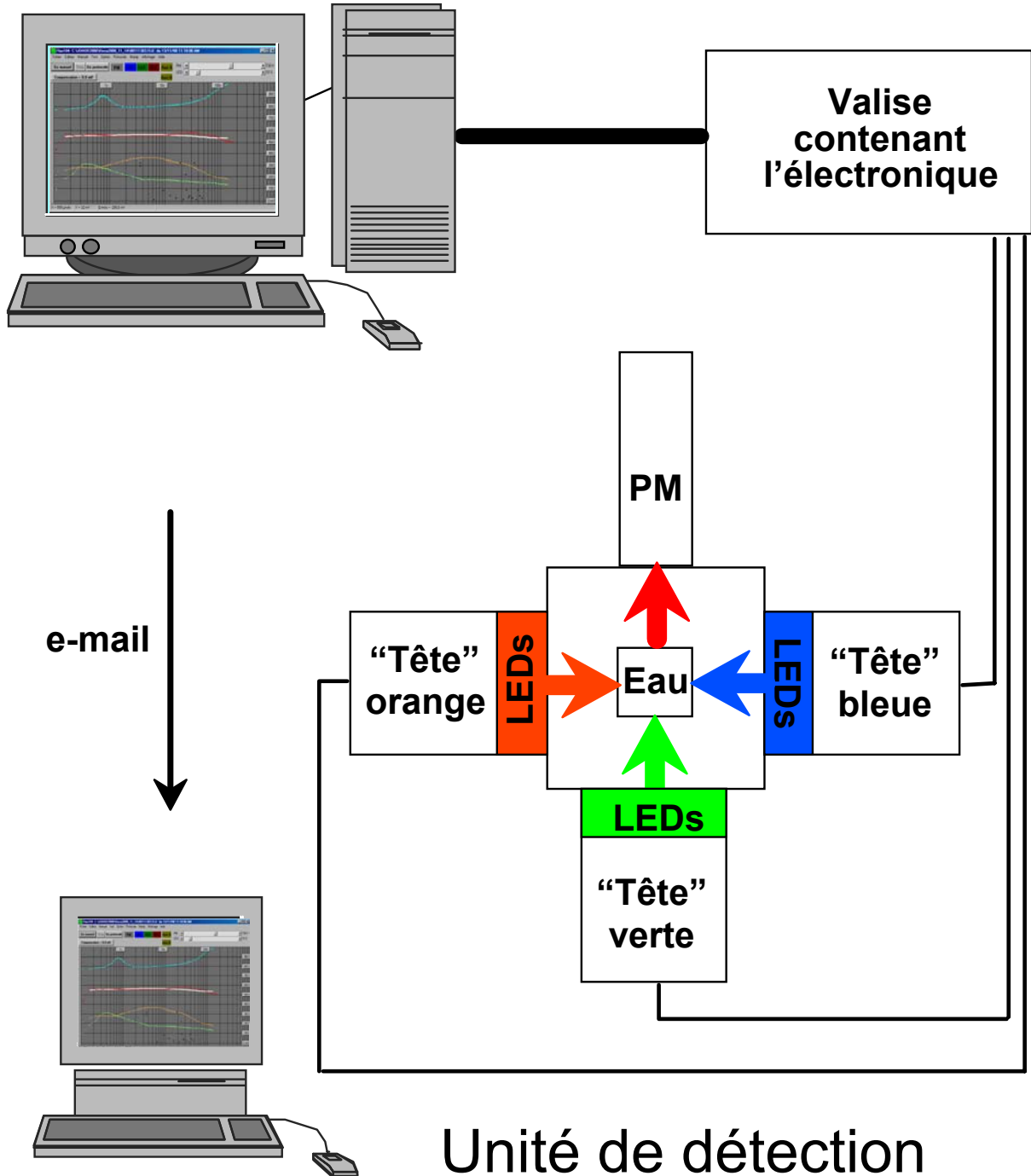
1) **une carte d'acquisition de données** (PCL 818, Advantech, Canada) insérée dans un ordinateur. La fréquence maximale d'acquisition de cette carte est 100 kHz.

2) **l'électronique.**

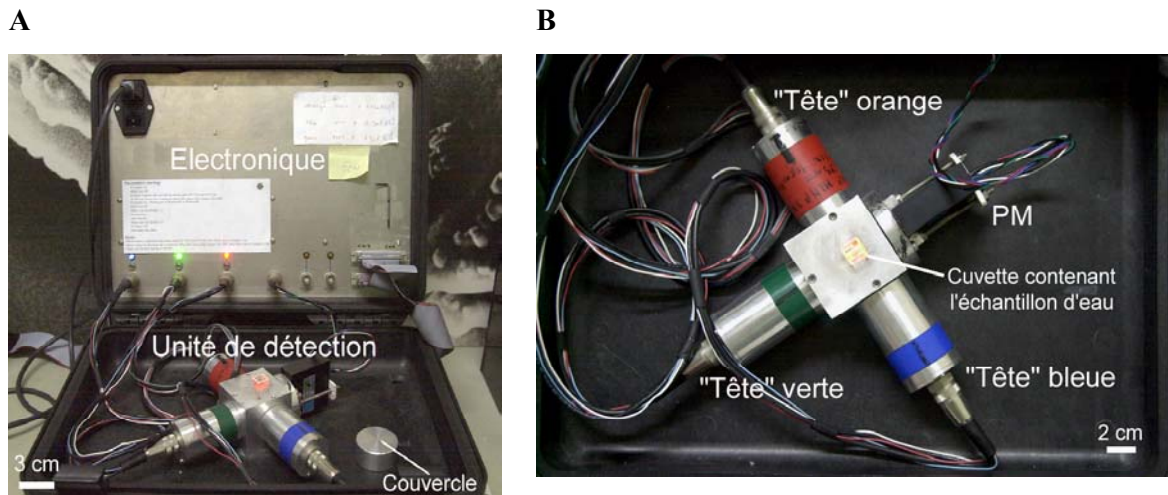
3) **une unité de détection** (Fig. 8). Cette unité comprend une partie cubique centrale avec un emplacement qui contient l'échantillon d'eau de composition phytoplanctonique inconnue (Fig. 9). Cet emplacement peut être illuminé sur trois de ses côtés par des "têtes" émettrices de lumières bleue, verte et orange (Fig. 9). Ces "têtes" sont orientées perpendiculairement par rapport au compartiment échantillon qui lui-même est isolé de la lumière ambiante par un couvercle hermétique (Fig. 8).

Sur le quatrième côté du compartiment échantillon, la fluorescence chlorophyllienne émise par le phytoplancton est détectée par un module composé d'un tube photomultiplicateur (PM) miniature (H 5701-50, Hamamatsu, Japon), d'un amplificateur et d'une alimentation

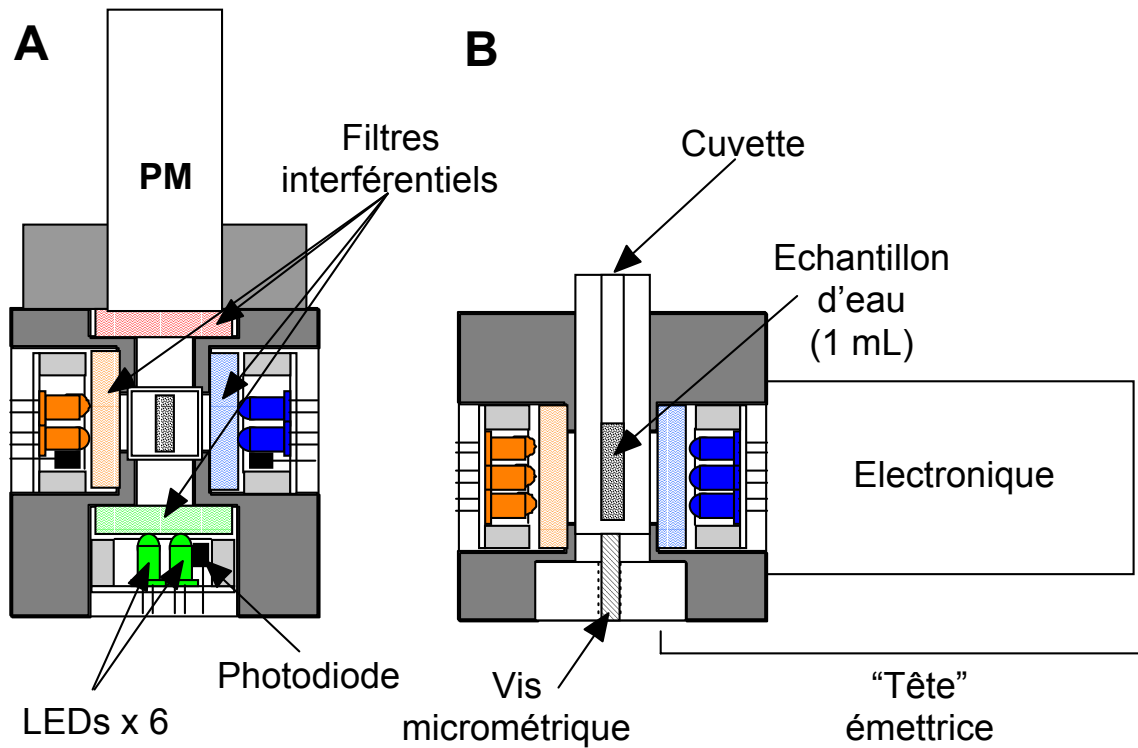
**Ordinateur  
avec  
la carte d'acquisition PCL 818  
et le logiciel "Fluo"**



*Fig. 7 : Schéma du dispositif du fluorimètre ENS avec l'ordinateur comprenant la carte d'acquisition et le logiciel "Fluo", l'électronique et l'unité de détection. LEDs, diodes électroluminescentes ; PM, tube photomultiplicateur.*



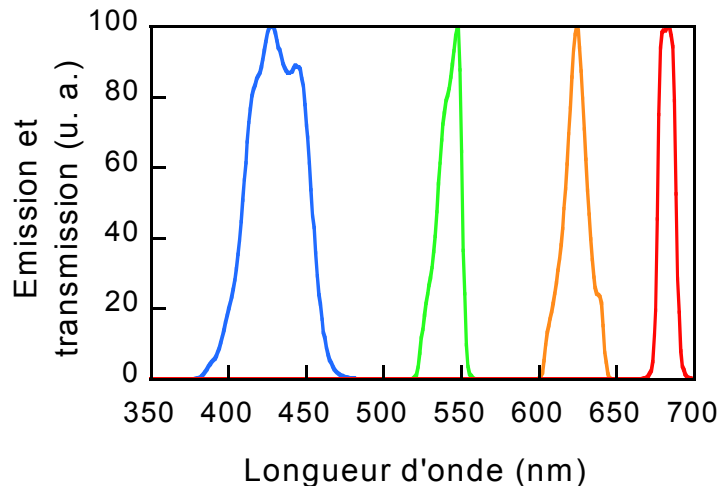
**Fig. 8 :** Photographies de (A) la valise contenant l'électronique et l'unité de détection, (B) l'unité de détection vue de haut. PM, tube photomultiplicateur.



**Fig. 9 :** Schéma de l'unité de détection (A) vue de haut, (B) vue de côté. Echelle 1. LEDs, Diodes électroluminescentes ; PM, tube photomultiplicateur.

haute tension. Le PM est protégé par un filtre interférentiel (S 10-680 F, Corion, USA) afin de sélectionner une fenêtre de détection à  $680 \pm 10$  nm. La sensibilité du PM est ajustée par l'intermédiaire de la haute tension entre 200 et 1100 V qui est elle-même contrôlée par le logiciel "Fluo" décrit dans le § suivant.

Chaque "tête" émettrice est constituée d'un ensemble de six diodes émettrices (LEDs) chacune associée à un filtre ou une combinaison de filtres interférentiels afin d'affiner la longueur d'onde émise par chaque groupe de LEDs. Ainsi, pour la lumière bleue sont utilisées des LEDs (383 UBC, Everlight, Taïwan) ayant un pic d'émission à  $430 \pm 60$  nm accompagnées d'un filtre passe-bande à  $430 \pm 30$  nm obtenu avec une combinaison de filtres interférentiels (SPX-R 500, Maier, Allemagne + 450-FL 07, Andover, USA + 600-FL 07, Andover) (Fig. 10). L'intensité lumineuse maximale émise par cette "tête" et mesurée dans le compartiment échantillon est de  $15 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pour la lumière verte, les LEDs (Ultrabright "pure green", Marl, Grande-Bretagne) ont un pic d'émission à  $552 \pm 50$  nm affiné à  $540 \pm 15$  nm à l'aide d'un filtre interférentiel (XM-540, Corion) (Fig. 10). L'intensité maximale émise et mesurée dans les mêmes conditions est de  $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Pour la lumière rouge-orange, les LEDs (HLMP-DH 08, Hewlett Packard, USA) ont un maximum d'émission à  $621 \pm 30$  nm affiné à  $625 \pm 20$  nm par un filtre interférentiel (XM-625, Corion) (Fig. 10). L'intensité maximale émise par cette "tête" est de  $250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .



**Fig. 10 :** Spectres d'émission des LEDs bleues (Everlight 383 UBC), vertes (Marl Ultrabright "pure green") et rouges-oranges (Hewlett Packard HLMP-DH 08) corrigés par des filtres interférentiels : combinaison de filtres Maier SPX-R 500 + Andover 450-FL 07 + Andover 600-FL 07 pour les LEDs bleues, un filtre Corion XM-540 pour les LEDs vertes et un filtre Corion XM-625 pour les LEDs rouges-oranges. Le spectre de transmission du filtre interférentiel (Corion S 10-680 F) placé devant le PM afin de détecter la fluorescence à  $680 \pm 10$  nm est figuré en rouge. LEDs, diodes électroluminescentes; PM, tube photomultiplicateur; u. a., unités arbitraires.

L'intensité lumineuse émise par chacune des "têtes" (en pourcentage du maximum) et la durée de l'illumination sont fixées par le logiciel "Fluo" comme décrit dans le § suivant. Les caractéristiques des faisceaux lumineux utilisés pour mesurer l'émission de fluorescence chlorophyllienne et permettant d'obtenir les meilleures conditions expérimentales (compromis entre l'intensité et la durée des illuminations pour obtenir un rapport signal/bruit correct) sont décrites dans le Tableau 9.

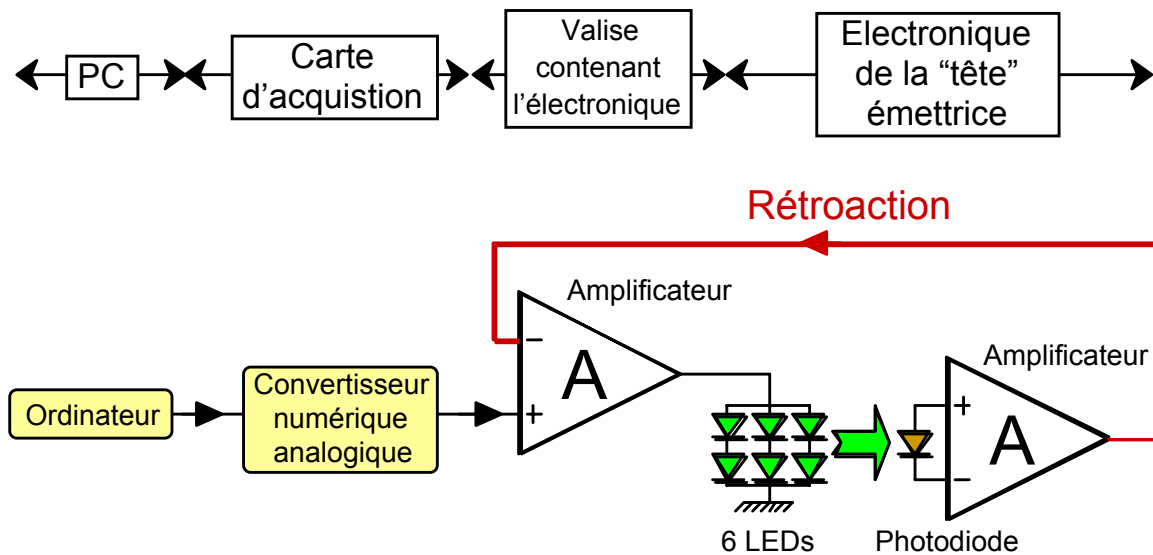
**Tableau 9 : Caractéristiques des trois faisceaux lumineux utilisés pour mesurer l'émission de fluorescence chlorophyllienne<sup>a</sup>**

Lumière excitatrice	Longueur d'onde (nm)	Intensité ( $\mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ )	Durée (s)
Bleue	$430 \pm 30$	1	0,2
Verte	$540 \pm 15$	7	0,5
Rouge-orange	$625 \pm 20$	13	0,2
Rouge-orange	$625 \pm 20$	215	0,2

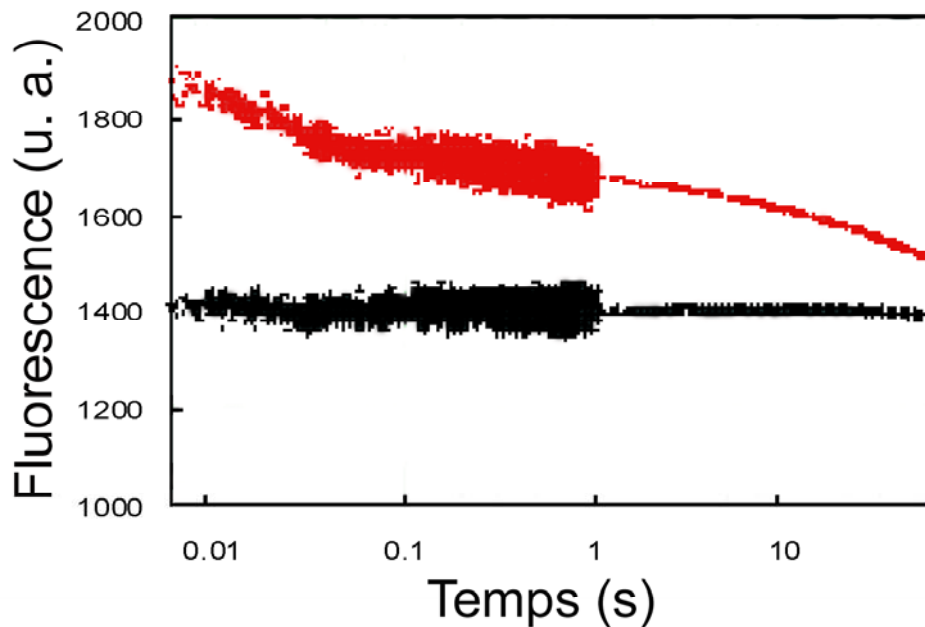
<sup>a</sup> Les trois illuminations de faible intensité sont utilisées pour mesurer le niveau minimal de l'émission de fluorescence. L'illumination rouge-orange de forte intensité est utilisée pour mesurer le niveau maximal de fluorescence (voir la section Résultats et Discussion).

La lumière émise par une LED dépend du courant qui la traverse. Cette lumière est instable, en particulier elle varie en fonction de la température. Or, la température des LEDs augmente dès leur allumage, ce qui engendre une diminution de la lumière émise indépendamment du courant. Une photodiode (BPW 34, Siemens, USA) placée contre l'une des six LEDs mesure la lumière qu'elle émet. Le signal électrique ainsi généré est réinjecté à l'entrée du circuit par une boucle électronique de rétroaction qui compense les variations de lumière par des variations de courant dans les six LEDs (Fig. 11). Ainsi, l'intensité lumineuse est maintenue constante au cours d'une illumination donnée. Pour les "têtes" émettrices bleue et verte, l'instabilité de l'émission de la lumière est la même pour les six LEDs ce qui permet de limiter la mesure de compensation à une seule LED. Les caractéristiques des LEDs oranges étant très variables, la photodiode est disposée afin de mesurer l'intensité moyenne des six LEDs. Cette boucle de rétroaction est indispensable car à courant constant, l'intensité lumineuse peut diminuer jusqu'à 10 % durant les premières 100 ms de l'illumination et jusqu'à 20 % durant la première seconde (Fig. 12). Ce système tout à fait original a été mis au point par Gérard Parésys.





**Fig. 11 :** Schéma de principe de la boucle électronique de rétroaction permettant la régulation de l'intensité de la lumière émise par les LEDs (diodes électroluminescentes).



**Fig. 12 :** Evolution de l'émission de fluorescence durant une illumination bleue de 100 s mesurée avec (symboles noirs) et sans (symboles rouges) le système de boucle électronique de rétroaction. La diminution de l'émission de fluorescence dans le deuxième cas est liée à une augmentation de la température des LEDs (diodes électroluminescentes).

L'échantillon d'eau est contenu dans une cuvette spectrophotométrique en plastique à usage unique (réf. 613101, Greiner, Allemagne) qui s'ajuste parfaitement à l'emplacement échantillon. Cet emplacement est conçu de façon à ce que la cuvette soit la plus proche possible du PM (1 cm, Fig. 9) afin d'optimiser au maximum la détection de la lumière de fluorescence. En dépit de la qualité des filtres interférentiels et de la fluorescence négligeable des cuvettes, un faible signal de fond est toujours détecté avec de l'eau distillée. Ce bruit de fond est considéré et soustrait pour affiner le signal dû au phytoplancton. La proximité entre le compartiment échantillon et le PM permet de s'affranchir des variations du signal attribuables soit à l'atténuation soit à la diffusion des lumières d'excitation et/ou de la lumière de fluorescence. Ces modifications dans l'intensité et la direction des faisceaux lumineux peuvent être dues :

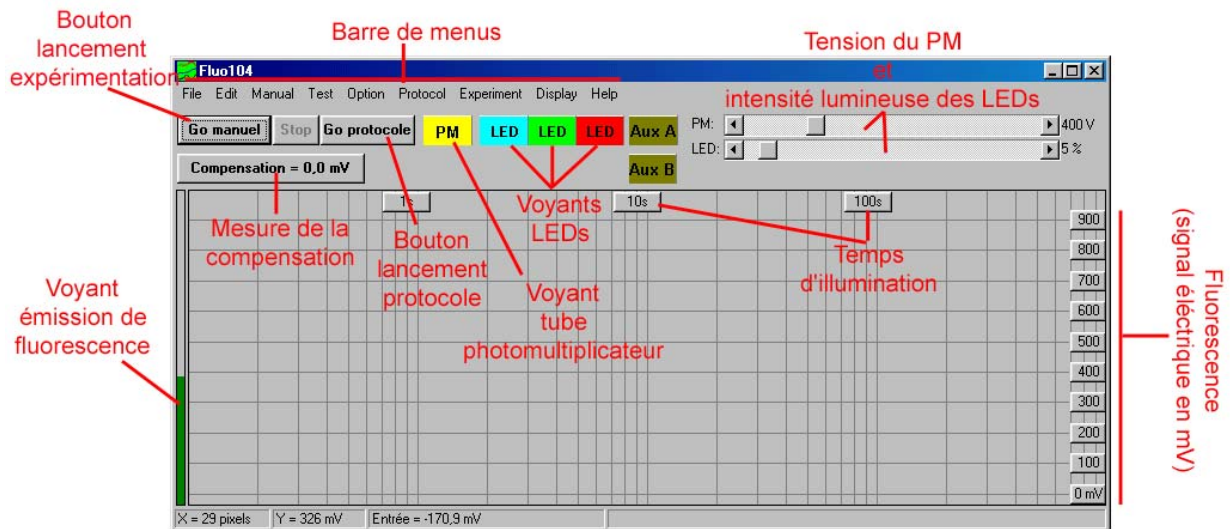
- **aux éléments inorganiques** (matières en suspension d'origines diverses comme les particules d'argile) qui augmentent la turbidité de l'eau. Ainsi, la sensibilité de la détection a été mesurée comme valable jusqu'à une turbidité aussi importante que 150 NTU avec une solution de bentonite (Sigma). Cette turbidité est rarement rencontrée en milieu naturel. Pour comparaison, la turbidité maximale mesurée sur les sites chinois et malais n'était jamais supérieure à 20 NTU.

- **aux éléments organiques**, c'est-à-dire les algues elles-mêmes. Les organismes choisis comme référence et également rencontrés lors des essais sur site (*Mycrocystis* sp.) présentent des tailles et des morphologies très différentes allant de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre pour *Chlorella* sp. et *Synechococcus* sp. jusqu'à 25-30  $\mu\text{m}$  de long pour *Cylindrotheca fusiformis* pour les formes de vie unicellulaires. Mais, les formes de vie coloniales sont capables comme *Ankistrodesmus* sp. ou *Mycrocystis* sp de former des agrégats de plusieurs dizaines voire plusieurs centaines de  $\mu\text{m}$  respectivement. Enfin, les cyanobactéries *Anabaena* sp. et *Pseudoanabaena* sp. forment des filaments de plusieurs dizaines de  $\mu\text{m}$  de long. Ces filaments ont été testés comme n'ayant aucune incidence sur la sensibilité de la détection.

### III- 2. Le logiciel "Fluo" permettant l'acquisition et le traitement des données.

Le logiciel totalement original a été écrit par Gérard Parésys avec le langage Delphi version 5 (Borland, USA). Il présente quatre parties :

1) **l'écran principal** (Fig. 13). Il est constitué de deux parties. La partie haute comprend une barre de menus classique permettant différents réglages avec un menu "Aide"



**Fig. 13 :** Copie de l'écran principal du logiciel "Fluo". Les différents composants sont décrits en caractères rouges.

qui renvoie directement à un mode d'emploi de l'appareil et du logiciel écrit par Gérard Parésys. De gauche à droite : un bouton de lancement de l'expérimentation en mode manuel "Go manuel", un bouton "Stop" pour stopper à tout moment l'expérimentation, un bouton de lancement du protocole de l'expérimentation (voir § suivant) "Go protocole", un bouton "Compensation" qui permet de mesurer le signal de fond sur un blanc d'eau distillée (§ III-3.), un voyant "PM" indiquant la mise sous-tension du tube photomultiplicateur, trois voyants "LEDs" indiquant l'allumage des trois "têtes" émettrices, deux boutons "Aux" prévus pour la mise sous-tension de sorties auxiliaires, deux curseurs pour régler l'alimentation du PM (de 0 à 1000 V) et des LEDs (de 0 à 100 %). La partie basse comprend à gauche un vu-mètre de l'émission de fluorescence et une plage graphique prévue pour enregistrer l'émission de fluorescence en fonction du temps d'illumination (cette partie sera plus amplement détaillée dans la section Résultats et Discussion, § VI- ). Cette plage graphique est constituée d'un axe des abscisses correspondant au temps d'illumination avec une graduation logarithmique ou linéaire réglable en cliquant sur les boutons indicatifs du temps (le bouton "100 s" par exemple). L'axe des ordonnées correspond à l'émission de fluorescence détectée par le PM. Elle est exprimée sous forme d'un signal électrique (de 0 à 1000 mV). La graduation est également réglable à partir des boutons indicatifs du signal (le bouton "100" par exemple). A l'aide de la souris, il est donc possible de régler la tension du PM, l'alimentation des trois "têtes" émettrices, l'allumage du PM et des "têtes", de mesurer le signal de fond sur un blanc

(en appuyant sur le bouton “Compensation”). Le vu-mètre ainsi que la plage graphique permettent de visualiser l’émission de fluorescence en temps réel. Ce mode de fonctionnement appelé “Mode manuel” (enclenché par le bouton “Go manuel”) est utilisé pour des pré-réglages ou pour vérifier le bon fonctionnement du système. Tous ces réglages avec la séquence complète de mesure peuvent être pré-définis dans un “protocole d’expérimentation” (voir § suivant) qui est lancé en appuyant sur le bouton “Go protocole”.

2) le **protocole de l’expérimentation** défini à partir d’une suite de macro-instructions (Fig. 14).

Temps ms	Action	Valeur	Commentaire
	Accumul clear PMT	all On	
3000	PMT Voltage LED Measure every LED blue Accumul LED blue	1000 5 500 On 5 Off	(V) (%) (ms) Fo Bleu dans acc 5
20000	Measure every LED PMT Voltage LED green Accumul LED green	500 10 730 On 2 Off	(ms) (%) obscurité 20s Fo Vert dans acc 2
3000 20000	PMT Voltage LED Measure every Compensation LED orange On	544 50 50 Accumul 14	(V) (%) (ms)
1000 3000 14000 22000 130000	Measure Measure every Measure every Measure every Measure every LED orange	On On 300 1000 3000 10000 Off Off	Accumul 14
	Evaluation Save in Mail to End	C:\CONTINU\MANIPI jcd1@free.fr	

*Annotations de la figure 14 :*

- Allumage du PM
- Réglage de la haute-tension du PM
- Allumage des LEDs
- Prise de mesure
- Temps d'attente de 20 s d'obscurité entre les deux illuminations
- Temps d'attente de 3 s après réglage du PM et des LEDs
- Temps d'attente de 20 s d'obscurité avant l'illumination
- Calcul de l'évaluation de la biomasse et de la composition du phytoplancton
- Fin du protocole
- Réglage de l'intensité des LEDs
- Durée de l'illumination bleue
- MESURE EN FAIBLE LUMIERE BLEUE DE COURTE DUREE
- Extinction LEDs
- MESURE EN FAIBLE LUMIERE BLEUE DE COURTE DUREE
- Début des mesures
- Pendant 3 s une mesure toutes les 300 ms
- MESURE EN LUMIERE ORANGE CONTINUE AVEC DIFFERENTS TEMPS D'ECHANTILLONNAGE
- Fin des mesures
- Sauvegarde dans un répertoire défini
- Envoi des données par e-mail

**Fig. 14** : Exemple simplifié de protocole d’expérimentation d’une succession d’illuminations bleue et verte de faible intensité et de courte durée (flashes) et d’une illumination orange continue permettant l’acquisition de l’émission de fluorescence en fonction de la durée de l’illumination.

Pour chaque illumination, la couleur, l’intensité lumineuse, la durée de l’illumination, la sensibilité (haute-tension) du PM et les périodes d’obscurité entre les illuminations sont pré-ajustées (voir § III- 3. pour la description des séquences d’illumination). Les données sont enregistrées dans un fichier texte qui définit le déroulement de l’expérimentation. Il est automatiquement sauvé avec le protocole correspondant à la fin de la mesure dans un

répertoire également pré-défini de façon à pouvoir associer facilement une expérimentation et son protocole. Les fichiers de données sont automatiquement envoyés par courrier électronique avec le protocole, la date et l'heure locale de mesure de l'échantillon et les commentaires précisant l'heure locale d'échantillonnage et les différentes conditions (profondeur, T°, météo, etc...). Le cas échéant, il est donc possible d'adapter le logiciel aux caractéristiques du site.

3) la "table d'évaluation" de la concentration en Chl *a* et des proportions relatives d'algues vertes, de diatomées et de cyanobactéries (Fig. 15).

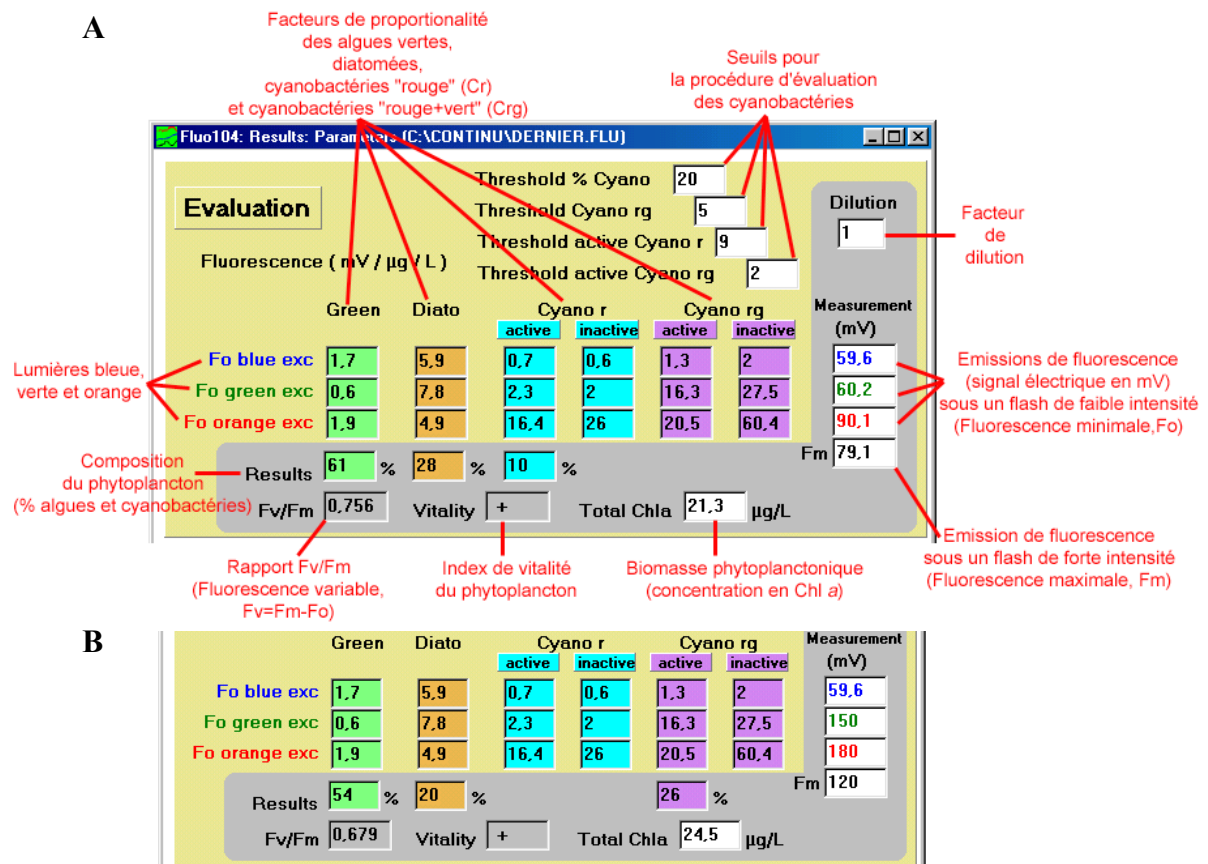


Fig. 15 : (A) Table d'évaluation de la biomasse et de la composition du phytoplancton et table de calcul de l'index de vitalité du phytoplancton. L'échantillon est un mélange 60/25/15 d'algues vertes, de diatomées et cyanobactéries "rouge" en phase exponentielle de croissance à une concentration de 20 µg Chl *a*.L<sup>-1</sup>. Les différents composants sont décrits en caractères rouges. (B) L'échantillon est ici un mélange 50/25/25 avec des cyanobactéries "rouge+vert" à une concentration de 25 µg Chl *a*.L<sup>-1</sup>.

Ces données sont calculées par une matrice à partir des signaux de fluorescence émis sous des lumières d'excitation bleue, verte et orange de faible intensité lumineuse. Cette modélisation est basée sur des facteurs de proportionnalité (FPs) entre l'émission de

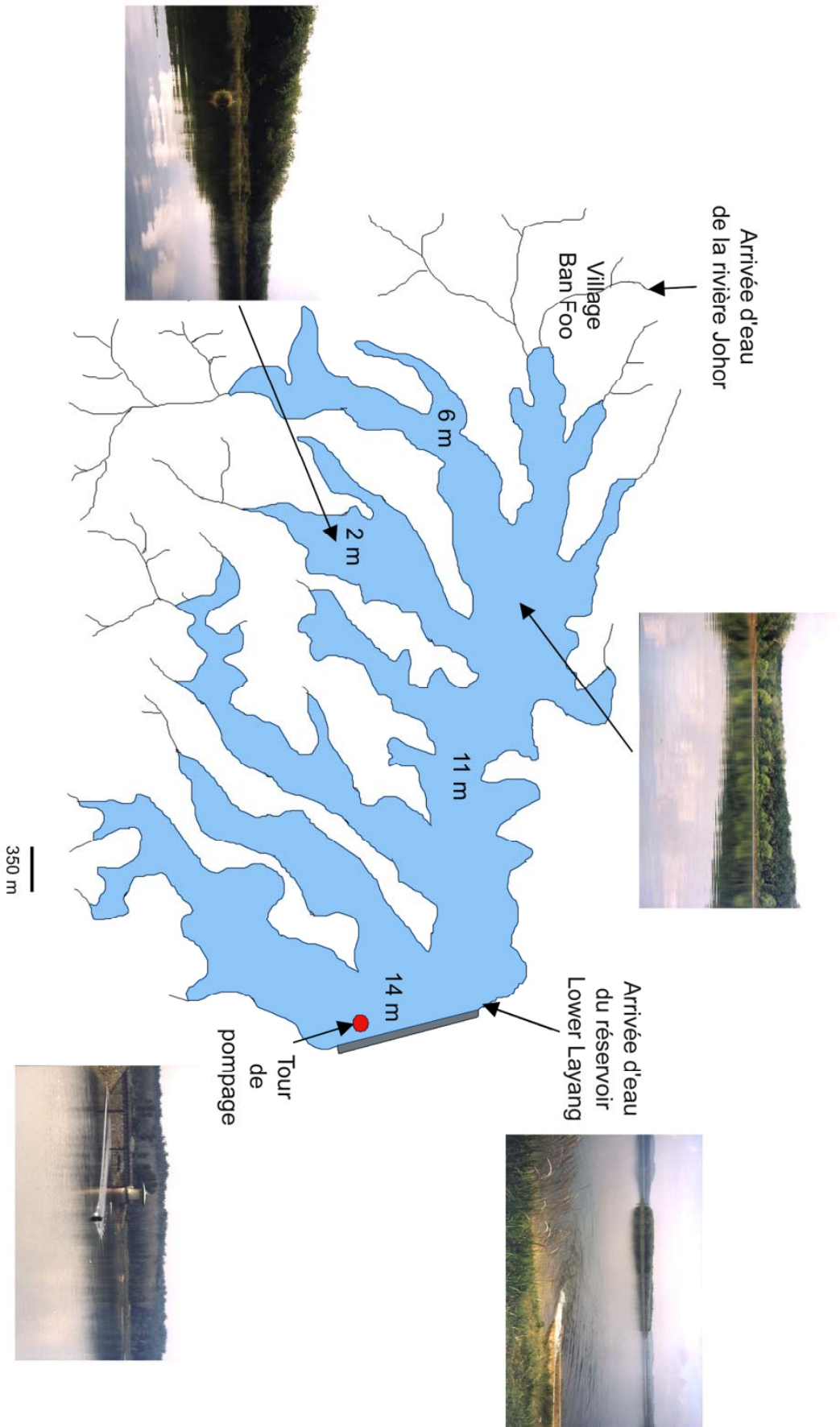
fluorescence et la concentration en Chl *a* pré-enregistrés dans le protocole correspondant. Ces FPs sont déterminés sur les souches de références présentées plus tôt (section Résultats et Discussion, § I-). Cette partie sera détaillée plus amplement dans la section Résultats et Discussion. L'évolution de la biomasse phytoplanctonique (en  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ) et des proportions d'algues vertes, de diatomées et de cyanobactéries peuvent être visualisées de deux façons : dans un tableau ou graphiquement en fonction du temps pour chaque réservoir.

4) **la table de calcul de l'index de vitalité du phytoplancton** (Fig. 15) incluse dans la "table d'évaluation". L'index de vitalité du phytoplancton est basé sur la mesure de l'émission de fluorescence sous une forte illumination (fluorescence maximale,  $F_m$ ) et sur le calcul du rapport  $F_v/F_m$  où  $F_v$  est la fluorescence variable (la différence entre l'émission de fluorescence maximale et minimale). Cette partie sera également développée dans la section Résultats et Discussion (§ IV-).

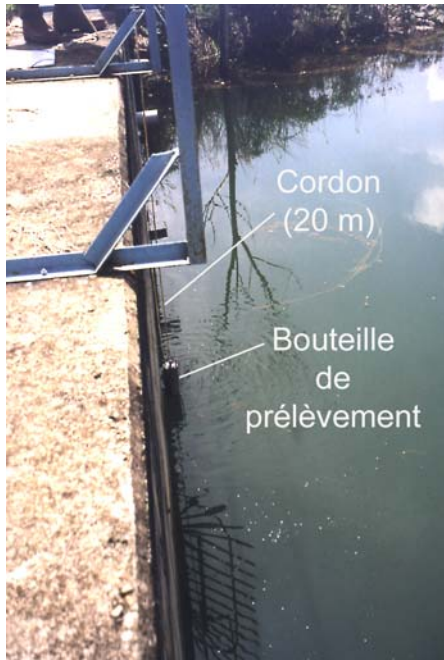
### **III- 3. Protocole expérimental utilisé pour l'acquisition des données.**

Les expérimentations sur sites à partir d'échantillons d'eau naturels ont été conduites en collaboration avec la société Suez-ONDEO Services qui gère des réservoirs d'eau douce naturels et artificiels à Macao (Chine) et à Masai (Malaisie) destinés à la production d'eau de consommation. Un exemple de réservoir naturel (Upper Layang, Masai) est décrit Figure 16. Les expérimentations ont été réalisées en collaboration avec le "Sg Layang Water Treatment Plant Laboratory" de Masai et le "Laboratory and Research Center, Macao Water Supply Co. LTD".

Les échantillons d'eau sont prélevés dans des bouteilles opaques d'1 L à une profondeur de 0,5 m (ou plus si précisé) le matin (9 h) et en fin d'après-midi (17 h) à l'aide de bouteille de prélèvement (Fig. 17). Les mesures de concentration en Chl *a* avec les fluorimètres Turner et Datalink, le comptage de particules ainsi que le comptage des cellules et leur identification par microscopie optique ont été réalisés sur site en parallèle des mesures avec le fluorimètre ENS. Pour les échantillons naturels et de laboratoire, chaque mesure est réalisée en triplicat. Les échantillons sont adaptés à l'obscurité pendant 30 min dans les cuvettes avant le début de la mesure. Les cuvettes sont ensuite agitées de façon à resuspendre les cellules qui auraient pu sédimenter.



**Fig. 16 :** Carte du réservoir "Upper Layang", Masai, Malaisie. Les chiffres en mètres indiquent la profondeur. L'eau utilisée pour la production d'eau de consommation est prélevée au niveau de la tour de pompage à une profondeur de 0,5 m à 1,5 m.



**Fig. 17:** Bouteille de prélèvement utilisée pour l'échantillonnage de l'eau. La bouteille est reliée à deux cordons. Le premier permet d'amener la bouteille à la profondeur désirée, le second permet de refermer le clapet qui enferme l'eau dans la bouteille.

La durée d'une mesure est typiquement de 2 min. Chaque échantillon est soumis à trois séquences de flashes successives de lumières bleue, verte et orange à faible intensité lumineuse suivies par un flash de forte intensité (qui sert à mesurer l'index de vitalité, voir la section Résultats et Discussion). Les caractéristiques de ces illuminations sont détaillées dans le Tableau 9 (p 39). Cette séquence de flashes est d'abord réalisée sur un blanc d'eau distillée afin de mesurer le signal de fond qui sera déduit de la mesure réalisée ensuite sur l'échantillon de phytoplancton. A la fin de la mesure, les valeurs obtenues lors des différentes séquences sont moyennées. La séquence de flashes est donnée une seule fois pour les protocoles désignés pour les échantillons présentant des concentrations en Chl *a* intermédiaires à fortes (voir § suivant). Dans ce cas, la durée d'une mesure est réduite à 40 s. Pour les deux types d'illuminations, de faible et forte intensité, des temps courts ont été adoptés afin d'éviter les variations de l'émission de fluorescence induites par les processus de quenching photochimique et non-photochimique (voir la première partie de ce manuscrit). L'influence d'un flash sur le suivant est minimisée en introduisant des périodes d'obscurité entre les flashes afin de laisser le temps nécessaire aux différents composants de l'appareil photosynthétique de se réoxyder. Ainsi, des périodes de quelques secondes, de 5 s entre deux flashes de faible intensité à 20 s après le flash de forte intensité, ont été testées comme suffisantes (Fig. 14).

Afin de maintenir une bonne sensibilité tout en évitant la saturation du PM et de l'électronique, trois protocoles, avec trois réglages différents des instruments sont utilisés



pour des échantillons présentant une faible ( $1-10 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ), intermédiaire ( $10-50 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ) et forte ( $50-500 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ) concentration en Chl *a*. Ceci est important spécialement lorsque les cyanobactéries représentent une part importante du phytoplancton car comme précisé par la suite, les cyanobactéries sont caractérisées par un faible FP sous excitation bleue et un très fort FP sous excitation orange (voir section Résultats et Discussion, § II- 2. ). Donc, quand le signal est trop fort, les réglages sont changés pour une sensibilité plus faible par passage automatique à un autre protocole. Dans les cas où la biomasse phytoplanctonique est telle que la concentration en Chl *a* est supérieure à  $500 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  (dans le cas d'un fort bloom), l'appareillage est saturé et les échantillons doivent alors être dilués.

Le dispositif du fluorimètre ENS sur le terrain est montré Figure 18.



**Fig. 18 : Dispositif sur site de la première génération du prototype du fluorimètre ENS. L'unité de détection est reliée à une unité de contrôle (cette unité n'existe plus dans la version suivante du prototype présentée ici) , elle même reliée à un ordinateur portable via une carte d'acquisition. Les algues sont adaptées à l'obscurité dans des cuvettes spectrophotométriques placées sous un chiffon noir. L'eau distillée est indispensable afin de réaliser les mesures de référence.**

\*\*\*\*\*

# *Résultats et Discussion*

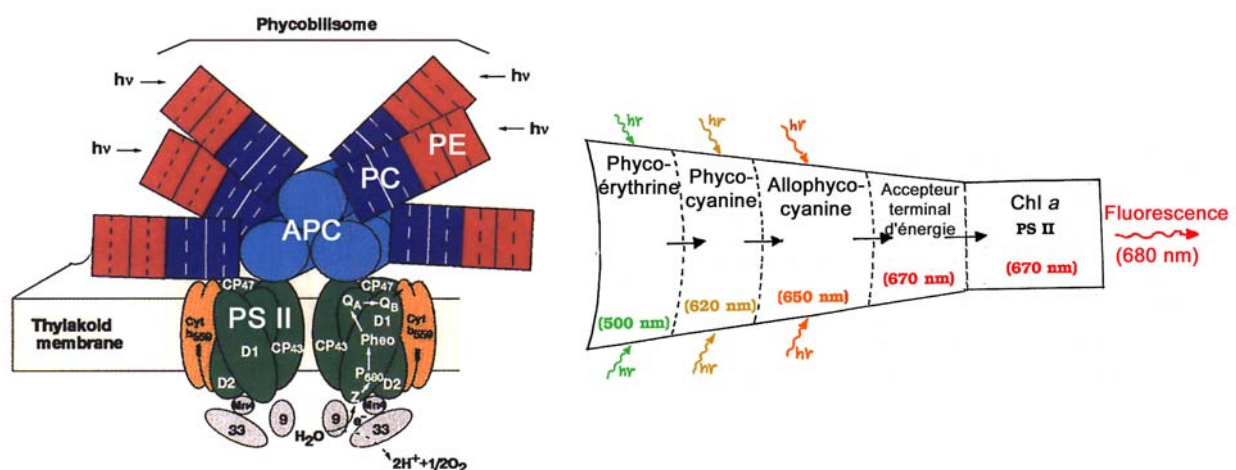


## RESULTATS ET DISCUSSION

### I- PRINCIPES ET DESCRIPTION DE LA MODELISATION UTILISEE POUR L'EVALUATION DE LA BIOMASSE PHYTOPLANCTONIQUE ET POUR L'IDENTIFICATION DES ALGUES ET DES CYANOBACTERIES.

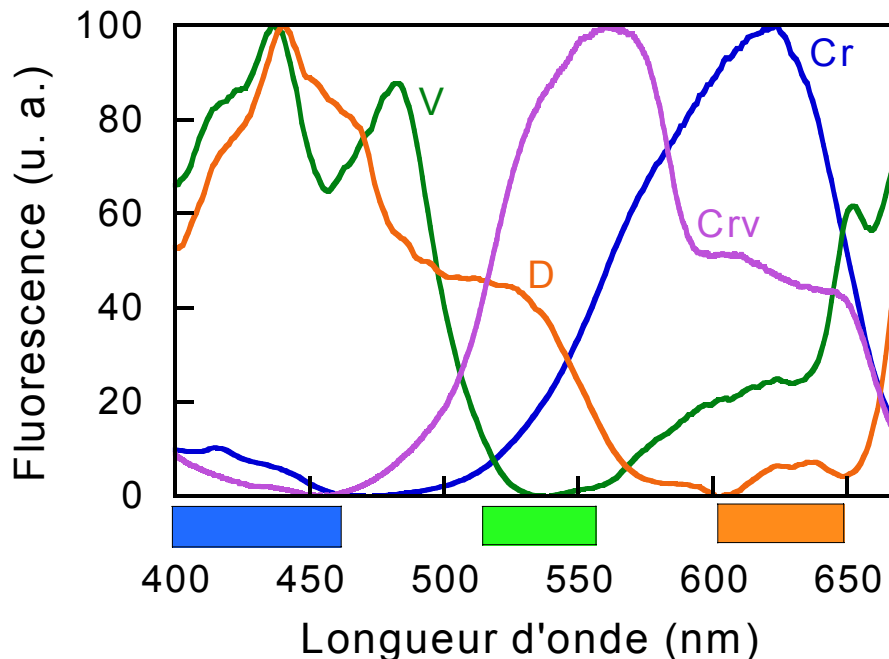
#### I- 1. Principes de l'émission de fluorescence chlorophyllienne.

Le modèle mathématique développé pour évaluer la biomasse phytoplanctonique et pour discriminer entre les algues vertes, les diatomées et les cyanobactéries est basé sur la mesure et l'interprétation de l'émission de fluorescence chlorophyllienne par une population phytoplanctonique de composition inconnue excitée par des illuminations de longueurs d'onde et d'intensités différentes. Les organismes phytoplanctoniques peuvent être classés en groupes spectraux suivant leur composition en pigments photosynthétiques. Alors que les algues vertes sont riches en chlorophylles (*a* et *b*), les diatomées et les cyanobactéries possèdent des pigments accessoires qui leur sont spécifiques et qui contribuent à l'excitation de la Chl *a*. La fucoxanthine chez les diatomées absorbe dans la région verte du spectre de la lumière visible. Les cyanobactéries ont des phycobilines de deux types (Fig. 18) : la phycocyanine présente dans toutes les espèces absorbe dans la région rouge-orange et la phycoérythrine qui, lorsqu'elle est présente, absorbe dans le vert.



**Fig. 18 :** (A) Schéma de la structure du phycobilisome des cyanobactéries (modifié d'après Bryant, 1994). (B) Schéma du transfert de l'énergie d'excitation au sein du phycobilisome. Les longueurs d'onde préférentiellement absorbées par les pigments sont indiquées (modifié d'après Sidler, 1994). PE, Phycoérythrine; PC, Phycocyanine; APC, Allophycocyanine; hv, énergie lumineuse; PS II, Photosystème II.

Deux types de cyanobactéries peuvent être ainsi définis : le premier baptisé cyanobactéries “rouge” (ou Cr), le second nommé cyanobactéries “rouge+vert” (ou Crv). Les spectres d’excitation de la fluorescence (voir la première partie de ce manuscrit) des quatre types d’organismes illustrent bien le fait que la contribution des différents groupes spectraux à l’émission de fluorescence chlorophyllienne est longueur d’onde dépendante (Fig. 19).



**Fig. 19 :** Spectres d’excitation de fluorescence à 680 nm et à température ambiante d’une algue verte (V) (*Chlorella* sp.), une diatomée (D) (*Phaeodactylum* sp.), une cyanobactérie “rouge” (Cr) (*Synechococcus* sp.) qui absorbe préférentiellement dans la région rouge du spectre de la lumière visible (absence du pigment phycoerythrine), et une cyanobactérie “rouge+verte” (Crv) (*Pseudoanabaena* sp.) qui absorbe également dans la région verte (présence du pigment phycoerythrine). Les longueurs d’onde des excitations bleue, verte et orange utilisées par le fluorimètre ENS sont symbolisées par des rectangles sous les spectres. u. a., unités arbitraires.

L’intensité de l’émission de fluorescence dépend principalement de la concentration en Chl *a* (c’est la relation sur laquelle est basée le principe des instruments commerciaux du types fluorimètres Datalink et Turner). L’émission de fluorescence étant complémentaire de l’activité photochimique, elle dépend aussi de l’intensité de la lumière excitatrice incidente (voir la première partie de ce manuscrit, Chapitre I-Introduction, § I- 2. ). Sous une lumière incidente de faible intensité, et pour des cellules adaptées à l’obscurité, un faible niveau de base de fluorescence ( $F_0$ ) est enregistré. Sous une forte lumière, la fluorescence varie de  $F_0$  à un niveau maximal ( $F_m$ ). Cependant, l’état physiologique des cellules qui varie avec les stress environnementaux influence également les niveaux d’émission de fluorescence.

Le niveau  $F_0$  est moins sensible aux variations dues aux stress environnementaux que  $F_m$  et constitue donc la base la plus fiable pour l'évaluation de la concentration en Chl  $a$ . Ainsi,  $F_0$  a été choisi comme base du modèle mathématique. Ce niveau doit être mesuré avec précision aux trois longueurs d'onde utilisées. Les meilleures conditions (compromis entre l'intensité et la durée des illuminations pour obtenir un rapport signal/bruit correct) sont détaillées dans la section Matériels et Méthodes (Tableau 9, p 39). Ces réglages ont été utilisés pour toutes les expérimentations.

## I- 2. Description de la modélisation.

L'intensité  $F_0$  a été mesurée pour les quatre organismes de référence choisis (*Chlorella* sp pour les algues vertes, *Phaeodactylum* sp. pour les diatomées, *Synechococcus* sp. et *Pseudoanabaena* sp. pour les cyanobactéries) sous chacune des trois longueurs d'onde d'excitation : bleue ( $430 \pm 30$  nm), verte ( $540 \pm 15$  nm) et orange ( $625 \pm 20$  nm). Ces intensités ont été mesurées en fonction de la concentration en Chl  $a$  avec des cultures d'algues en phase exponentielle de croissance. En représentant l'intensité de  $F_0$  en fonction de la concentration en Chl  $a$ , une relation linéaire correspondant au facteur de proportion (FP) entre l'émission de fluorescence et la concentration en Chl  $a$  sous une faible intensité lumineuse donnée est obtenue pour chaque organisme à chaque lumière d'excitation (Fig. 20). Ces FP sont listés Tableau 10.

Ainsi, pour une culture pure d'algues vertes et pour la lumière bleue d'excitation, la relation suivante est obtenue :

$$F_b = (FP_bV \times V) \quad (\text{Equation 1})$$

où  $F_b$  est l'intensité de  $F_0$  sous excitation bleue,  $FP_bV$  est le FP entre l'émission de fluorescence et la concentration en Chl  $a$  et  $V$ , la concentration d'algues vertes exprimée en  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ .

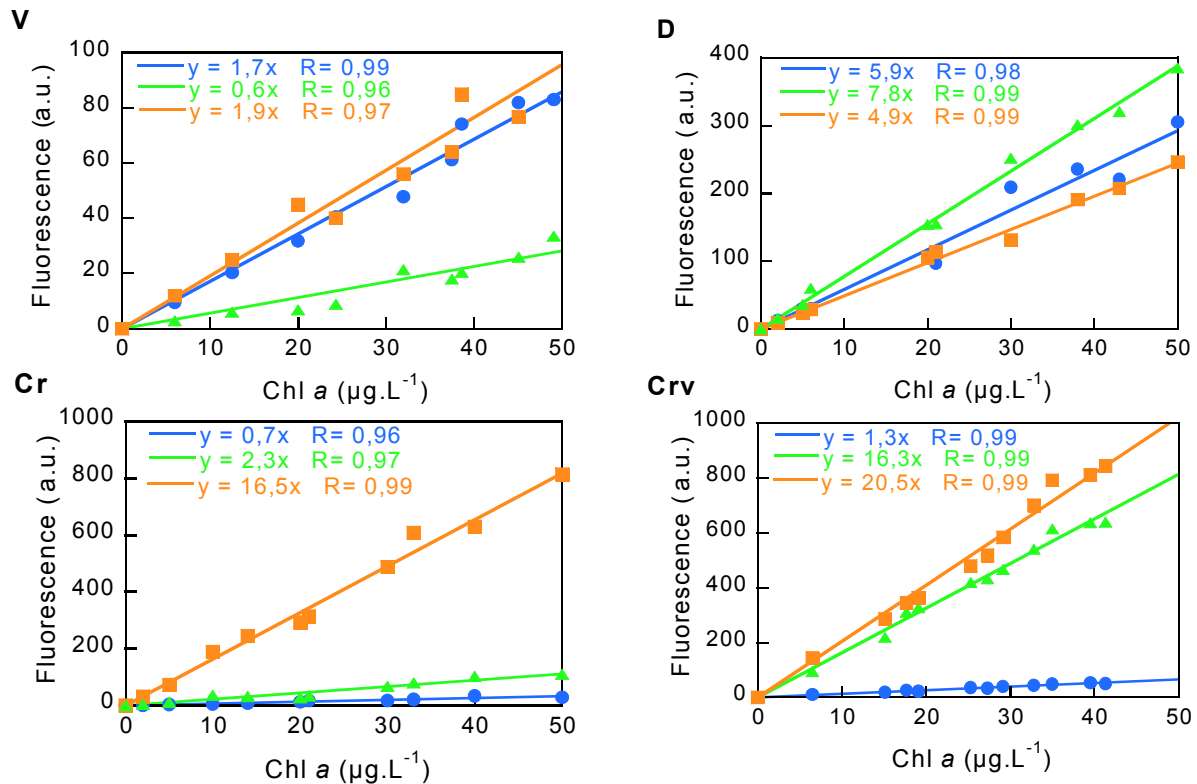
La matrice à partir de laquelle l'évaluation de la biomasse et l'identification des différents groupes d'organismes d'une population phytoplanctonique de composition inconnue est réalisée est composée de trois équations :

$$F_b = (FP_bV \times V) + (FP_bD \times D) + (FP_bC \times C) \quad (\text{Equation 2})$$

$$F_v = (FP_vV \times V) + (FP_vD \times D) + (FP_vC \times C)$$

$$F_r = (FP_rV \times V) + (FP_rD \times D) + (FP_rC \times C)$$

où FPbV, etc... sont les FP du Tableau 10 pré-ajustés par le protocole. Les trois valeurs G, D et C sont les quantités respectives d'algues vertes, de diatomées et de cyanobactéries ("rouge" et "rouge + vert") exprimées en  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  et déduites des mesures des intensités de fluorescence Fb, Fv et Fr sous excitation bleue, verte et orange respectivement (Rq : r symbolise la lumière orange qui est en réalité rouge-orange). La somme V + D + C donne la concentration totale en Chl a soit la biomasse phytoplanctonique.



**Fig. 20 :** Intensité de l'émission de fluorescence (en unités arbitraires) sous une excitation de faible intensité en fonction de la concentration en Chl a (en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) des quatre organismes de référence : l'algue verte (V) (*Chlorella* sp.), la diatomée (D) (*Phaeodactylum* sp.), la cyanobactérie "rouge" (Cr) (*Synechococcus* sp.), et la cyanobactérie "rouge+vert" (Crv) (*Pseudoanabaena* sp.). Les pentes des relations linéaires correspondent aux facteurs de proportionnalité (FP) sous une excitation bleue, verte et orange listés Tableau 10.

**Tableau 10 :** Facteurs de proportionnalité entre l'émission de fluorescence sous une excitation de faible intensité et la concentration en Chl a des quatre organismes de référence <sup>a</sup>.

	FPb	FPv	FPr
Algue verte (V)	1,7	0,6	1,9
Diatomée (D)	5,9	7,8	4,9
Cyanobactérie "rouge" (Cr)	0,7	2,3	16,4
Cyanobactérie "rouge+vert" (Crv)	1,3	16,3	20,5

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : FP pour facteur de proportionnalité; b, v et r pour excitations bleue, verte et orange respectivement.

## II- VALIDITE DES ORGANISMES DE REFERENCE POUR LA DETERMINATION DES FACTEURS DE PROPORTIONALITE.

### II- 1. Algues vertes et diatomées.

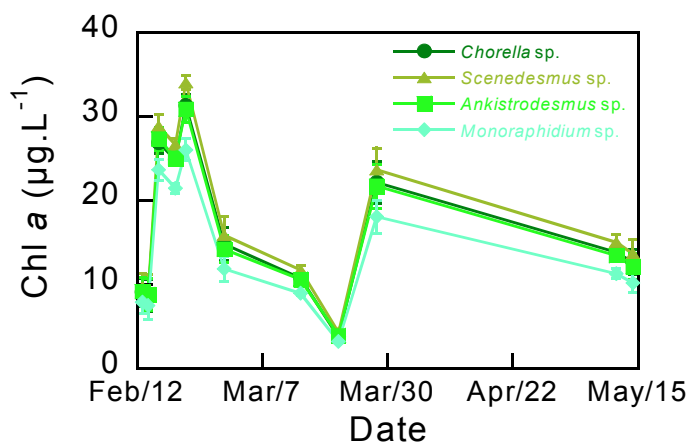
Les valeurs de FP obtenues pour *Chlorella* sp. ont été comparées avec celles de trois autres genres d'algues vertes cultivés en laboratoire et fréquemment rencontrés dans les réservoirs d'eau douce : *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. et *Ankistrodesmus* sp. (Tableau 11). Les FP des quatre algues vertes sont similaires.

**Tableau 11 : Facteurs de proportionnalité entre l'émission de fluorescence sous une excitation de faible intensité et la concentration en Chl *a* pour quatre genres d'algues vertes <sup>a</sup>**

	FPbV	FPgV	FPrV
<i>Chlorella</i> sp.	1,7	0,6	1,9
<i>Scenedesmus</i> sp.	1,6	0,6	1,5
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	1,7	0,5	1,8
<i>Monoraphidium</i> sp.	1,9	0,5	1,9

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : FP pour facteur de proportionnalité; b, v et r pour excitations bleue, verte and orange respectivement et V pour algue verte.

L'influence de ces variations a été testée de façon à déterminer si elles sont négligeables pour les processus d'évaluation et d'identification. Un site présentant une population phytoplanctonique dominé par les algues vertes (entre 90 et 95 % du total) a été choisi et les différents FP appliqués aux mesures de fluorescence réalisées sur ce site sur une période de trois mois (Fig. 21). Les différences observées entre les FP des quatre algues vertes n'ont que peu d'impact sur l'évaluation de la concentration en Chl *a*. De la même façon, le processus d'identification n'est pas perturbé.



**Fig. 21 : Evaluation de la concentration en Chl *a* d'après les facteurs de proportionnalité de quatre genres d'algues vertes. Réservoir "Upper Layang", Masai, Malaisie.**

Ainsi, une seule combinaison de FP peut être envisagé pour représenter les algues vertes. L'erreur engendrée dans l'évaluation est de 15 % au maximum. Les FP de *Chlorella* sp. ont été choisis comme représentatifs des algues vertes. Ce choix a été confirmé comme correct en l'appliquant à des données de terrain concernant un site où les algues vertes dominant le phytoplancton mais pour lequel le genre prépondérant change constamment au cours de la période suivie entre *Pediastrum* sp., *Dictyosphaerium* sp., *Closterium* sp., *Staurastrum* sp., *Ankistrodesmus* sp. et *Monoraphidium* sp. Malgré le changement de genre dominant l'utilisation des FP de *Chlorella* sp. n'a aucun impact néfaste sur la qualité de l'évaluation et de l'identification.

La même comparaison a été effectuée avec trois genres de diatomées. Le laboratoire ne possédant qu'une seule souche de diatomée d'eau douce (*Phaeodactylum tricornutum*), celle-ci a été comparée avec la souche marine de la même espèce et avec deux autres espèces de diatomées marines (Tableau 12). Là encore, les FP des différents genres sont très similaires et une seule combinaison (celle de la souche dulçaquicole) a été choisie comme représentative du groupe diatomées.

**Tableau 12 : Facteurs de proportionnalité entre l'émission de fluorescence sous une excitation de faible intensité et la concentration en Chl *a* pour trois genres de diatomées <sup>a</sup>**

	FPbD	FPvD	FPrD
<i>Phaeodactylum</i> sp. souche dulçaquicole	5,9	7,8	4,9
<i>Phaeodactylum</i> sp. souche marine	6,2	7,4	4,7
<i>Cylindrotheca</i> sp.	5,6	7,0	4,8
<i>Thalassiosira</i> sp.	5,6	7,4	4,9

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : FP pour facteur de proportionnalité; b, v et r pour excitations bleue, verte and orange respectivement et D pour diatomée.

## II- 2. Cyanobactéries.

Au contraire des algues vertes et des diatomées, une seule combinaison de FP ne peut être considérée comme représentative de l'ensemble des cyanobactéries. Comme déjà mentionné (§ I- 1.), deux groupes spectraux de cyanobactéries peuvent être distingués : le groupe "rouge" (Cr) et le groupe "rouge+vert" (Crv). Cette distinction est essentielle pour la fiabilité de la procédure d'identification. En effet, lorsque les Crv sont présentes dans un échantillon en quantité non négligeable, elles peuvent être confondues par la matrice avec des diatomées (Tableau 13). Cette confusion est simplement due au fait que les Crv absorbent



préférentiellement la lumière verte comme les diatomées (Fig. 19). Les Crv vont donc contribuer fortement à l'émission de fluorescence sous excitation verte contrairement aux Cr : le rapport FPvCrv/FPvCr est ainsi égal à 7 (Tableau 14).

**Tableau 13 : Evaluation de la concentration en Chl *a* par le fluorimètre Datalink et le fluorimètre ENS et de la proportion de diatomées et de cyanobactéries d'une culture pure de cyanobactéries "rouge+vert" (*Pseudoanabaena* sp.) en phase exponentielle de croissance <sup>a</sup>**

	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )	D (%)	Crv (%)	Fb	Fv	Fr
Fluorimètre Datalink	41 $\pm$ 0,5	/	/	/	/	/
Fluorimètre ENS, <b>FPCr</b> <sup>b</sup>	151 $\pm$ 1,0	60 $\pm$ 1	40 $\pm$ 1	52 $\pm$ 1	646 $\pm$ 2	845 $\pm$ 2
Fluorimètre ENS, <b>FPCrv</b>	41 $\pm$ 0,7	2 $\pm$ 2	98 $\pm$ 2	52 $\pm$ 1	646 $\pm$ 2	845 $\pm$ 2

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : D et Crv pour diatomées et cyanobactéries "rouge+vert"; F pour fluorescence; b, v et r pour excitations bleue, verte et orange respectivement.

<sup>b</sup> Pour l'évaluation par le fluorimètre ENS sont utilisés consécutivement les facteurs de proportionnalité des cyanobactéries "rouge" (FPCr) et ceux des cyanobactéries "rouge+vert" (FPCrv).

**Tableau 14 : Facteurs de proportionnalité entre l'émission de fluorescence sous une excitation de faible intensité et la concentration en Chl *a* de deux genres de cyanobactéries "rouge" et d'une cyanobactérie "rouge+verte" <sup>a</sup>**

	FPbCr ou FPbCrv	FPvCr ou FPvCrv	FPrCr ou FPrCrg	<b>Fr/Fv</b> <sup>b</sup>
Cyanobactérie "rouge" ( <i>Synechococcus</i> sp.)	0,7	2,3	16,4	<b>7,1</b>
Cyanobactérie "rouge" ( <i>Anabaena</i> sp.)	1,4	4,2	23,7	<b>5,6</b>
Cyanobactérie "rouge+verte" ( <i>Pseudoanabaena</i> sp.)	1,3	16,3	20,5	<b>1,3</b>

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : FP pour facteur de proportionnalité; b, v et r pour excitation bleue, verte et orange respectivement; Cr pour cyanobactérie "rouge"; et Crv pour cyanobactérie "rouge+vert".

<sup>b</sup> Les valeurs du rapport Fr/Fv utilisées dans la procédure d'identification des cyanobactéries sont indiquées.

Afin de distinguer entre ces deux groupes, une optimisation de la procédure d'identification a été choisie et peut être décrite comme suit (la procédure comporte trois étapes, la dernière sera exposée ultérieurement) (Fig. 22) :

1) **Etape 1** : la présence des cyanobactéries est toujours corrélée à une forte émission de fluorescence sous une excitation orange d'où les forts FPrC obtenus (Tableau 14). Les cyanobactéries peuvent donc être indubitablement détectées même à de faibles concentrations.

Si les cyanobactéries ne sont pas le groupe dominant du phytoplancton, quels que soient les FP utilisés (FPCr ou FPCrv), la matrice donne des résultats équivalents. Le seuil pour distinguer entre les deux groupes de cyanobactéries, et donc enclencher cette procédure d'identification spéciale qui vient se greffer sur la procédure générale a été testé et fixé à 20 % C dans une population mixte.

2) **Etape 2** : la distinction entre les deux groupes est basée sur la valeur du rapport Fr/Fv (Tableau 14). Le fit de la matrice est corrigé avec les FPCrv lorsque  $Fr/Fv < 5$  (Fig. 22). Le rapport Fr/Fv a été choisi parce que Fr ne varie pratiquement pas entre les deux groupes alors que Fv est multiplié par 7 pour Crv. Fb a été écarté car il est trop faible pour être réellement fiable. Le seuil 5 a été choisi en référence à un autre genre de Cr, *Anabaena* sp., qui présente un Fr/Fv de 5,6 (Tableau 14).

### **III- PRECISION DE L'ÉVALUATION DE LA BIOMASSE PHYTOPLANCTONIQUE ET DE L'IDENTIFICATION DES ALGUES ET DES CYANOBACTERIES.**

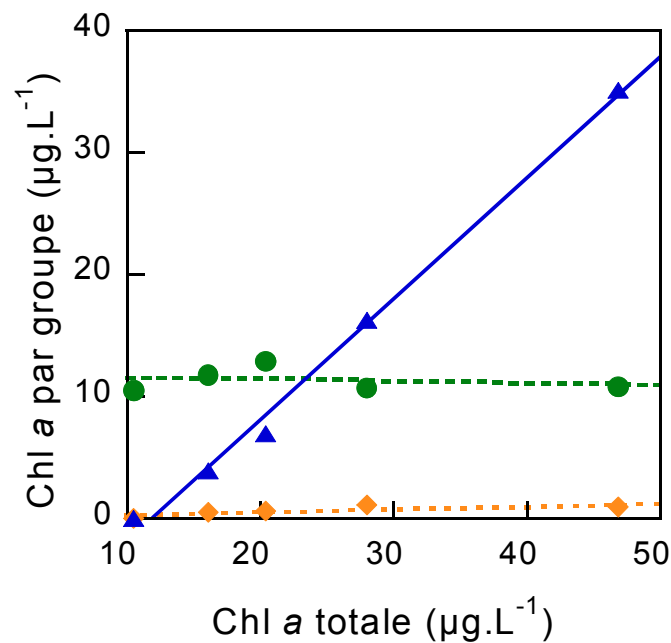
#### **III- 1. Mesure statique.**

Pour appréhender la fiabilité des procédures d'évaluation et d'identification, la matrice a été testée sur des mélanges d'organismes de composition et de concentration en Chl *a* connues. Les algues et cyanobactéries proviennent de cultures de laboratoire en phase exponentielle de croissance. La mesure réalisée avec le fluorimètre ENS est comparée avec la méthode HPLC basée sur l'analyse pigmentaire. Les résultats présentés Tableau 15 montrent que l'appareil est capable de détecter une petite fraction (10-15 %) de deux des trois groupes en présence d'une proportion majoritaire (75 %) de l'un des autres groupes. L'évaluation de la biomasse via la concentration en Chl *a* est également satisfaisante. La précision du fluorimètre ENS et la fiabilité de la matrice sont donc aussi bonnes que celles de la détermination par HPLC mais l'acquisition des données est bien plus facile et l'exploitation des données plus rapide : 2 à 3 min pour le fluorimètre ENS contre 30 min pour l'analyse HPLC (Wilhelm *et al.*, 1995).

***Fig. 22 : Procédure d'identification des cyanobactéries. Les paramètres sont définis comme suit : FP, facteur de proportionnalité; V, D et C, algues vertes, diatomées et cyanobactéries respectivement; Cr, cyanobactéries "rouge"; Crv, cyanobactéries "rouge+vert".***

### III- 2. Mesure dynamique.

Le suivi d'un bloom de cyanobactéries a été simulé en ajoutant de petites quantités de cyanobactéries "rouge" (*Synechococcus* sp.) à une solution pure d'algues vertes (*Chlorella* sp.) de concentration  $10 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  (Fig. 23). L'augmentation de la proportion de cyanobactéries est parfaitement détectée tandis que le signal attribué aux algues vertes reste constant comme attendu. Quelques diatomées (pas plus de 3 % de la population totale) sont détectées de façon erronée.



**Fig. 23 :** Détection d'un bloom de cyanobactéries par le fluorimètre ENS. De petites quantités de cyanobactéries "rouge" (▲) (*Synechococcus* sp.) sont ajoutées à un échantillon contenant des algues vertes (●) (*Chlorella* sp.) à une concentration constante de  $10 \mu\text{g.L}^{-1}$  en Chl *a*. Quelques diatomées (◆) sont détectées par erreur.

### IV- EVALUATION DE L'“INDEX DE VITALITE” GLOBAL DU PHYTOPLANCTON.

Lorsque les organismes phytoplanctoniques atteignent leur phase stationnaire de croissance (après une période métabolique active durant la phase exponentielle),  $F_m$  diminue à cause de la baisse de l'activité photochimique. La différence entre  $F_m$  et  $F_o$  qui est la partie variable de l'émission de fluorescence,  $F_v$ , (voir la première partie de ce manuscrit, Chapitre I-Introduction, § I- 2. ) est amoindrie (Lippemeier *et al.*, 2001 et les citations dans cet article).

**Tableau 15 : Détermination par le fluorimètre ENS et l'analyse HPLC de la concentration en Chl *a* et de la composition de mélanges comprenant des algues vertes, des diatomées et des cyanobactéries "rouge" en proportions différentes <sup>a</sup>**

	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )	G (%)	D (%)	Cr (%)
Valeurs attendues	<b>20</b>	<b>33</b>	<b>33</b>	<b>33</b>
Fluorimètre ENS <sup>b</sup>	20,4 $\pm$ 1,0	34 $\pm$ 2	34 $\pm$ 1	32 $\pm$ 2
Analyse HPLC	18,5	31	41	28
Valeurs attendues	<b>19</b>	<b>50</b>	<b>25</b>	<b>25</b>
Fluorimètre ENS	17,4 $\pm$ 0,3	57 $\pm$ 2	27 $\pm$ 2	26 $\pm$ 3
Analyse HPLC	18,0	57	21	22
Valeurs attendues	<b>19,0</b>	<b>75</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>
Fluorimètre ENS	15,7 $\pm$ 0,2	65 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
Analyse HPLC	17,2	75	11	14
Valeurs attendues	<b>21</b>	<b>25</b>	<b>50</b>	<b>25</b>
Fluorimètre ENS	19,0 $\pm$ 1,0	32 $\pm$ 5	45 $\pm$ 2	23 $\pm$ 3
Analyse HPLC	18,0	32	45	23
Valeurs attendues	<b>20,3</b>	<b>12,5</b>	<b>75</b>	<b>12,5</b>
Fluorimètre ENS	17,6 $\pm$ 0,9	23 $\pm$ 1	70 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1
Analyse HPLC	19,8	13	77	10
Valeurs attendues	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>50</b>
Fluorimètre ENS	18,9 $\pm$ 0,9	23 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2	53 $\pm$ 4
Analyse HPLC	18,7	31	27	42
Valeurs attendues	<b>18,1</b>	<b>12,5</b>	<b>12,5</b>	<b>75</b>
Fluorimètre ENS	19,3 $\pm$ 0,3	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	81 $\pm$ 4
Analyse HPLC	20,2	17	14	69

<sup>a</sup> Les algues vertes, V (*Chlorella* sp.), les diatomées, D (*Phaeodactylum* sp.) et les cyanobactéries "rouge", Cr (*Synechococcus* sp.) proviennent de cultures en phase exponentielle de croissance.

<sup>b</sup> Les données du fluorimètre ENS sont la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD.

Depuis plusieurs années, le rapport  $F_v/F_m$  est considéré comme un indicateur de l'état physiologique des organismes photosynthétiques ou de leur "vitalité" (Krause et Weiss, 1991). Pour les algues vertes et les diatomées, des valeurs de  $0,70 \pm 0,05$  ont été trouvées pour des cellules en phase exponentielle de croissance, comme précédemment rapporté par Falkowski et Kolber (1995), tandis que des valeurs de  $0,50 \pm 0,05$  sont des valeurs obtenues en phase stationnaire. En se basant sur ces observations, le rapport  $F_v/F_m$  a été systématiquement mesuré et défini comme l'index de vitalité de la population phytoplanctonique. Concrètement,  $F_m$  est mesuré sous un flash de lumière orange de forte intensité (voir la section Matériels et Méthodes, § III- 2. 3.) et  $F_v = F_m - F_o$ . Pour les algues vertes et les diatomées, l'index de vitalité est défini comme suit : quand  $F_v/F_m \geq 0,65$ , les algues sont dans une phase active de croissance (index de vitalité : +) tandis que  $F_v/F_m \leq 0,5$  (index de vitalité : -) est indicatif de la phase stationnaire; et entre ces deux valeurs, l'index de vitalité est (+/-).

Pour les cyanobactéries, la valeur de  $F_v/F_m$  varie entre 0,75 et 0,5 pour des cellules en phase exponentielle de croissance comme déjà montré par Campbell *et al.* (1998). Donc, quand les cyanobactéries ne sont pas négligeables (au-dessus de 20 % de la population totale), des seuils différents doivent être utilisés pour maintenir la fiabilité de la détermination de l'index de vitalité. Dans ce cas, les bornes de l'index sont redéfinies comme suit : (+) quand  $F_v/F_m \geq 0,5$  et (-) quand  $F_v/F_m < 0,5$  sans situation intermédiaire.

Il sera montré plus loin pour les expérimentations sur site que l'index de vitalité du phytoplancton combiné avec la procédure d'évaluation peut être utilisé comme un indice de prévision de bloom.

#### **V- LES VARIATIONS DE L'EMISSION DE FLUORESCENCE LIEES AUX STRESS ENVIRONNEMENTAUX.**

Les FP ont été déterminés sur des algues et cyanobactéries en phase exponentielle de croissance présentant une activité photochimique maximale et une structure intacte des composants de l'appareil photosynthétique. Dans le milieu naturel, l'activité photochimique et la structure de l'appareil photosynthétique dont dépend l'émission de fluorescence peuvent être altérées par des stress environnementaux d'origine diverse.

### V- 1. Le stress lumineux.

Dans le milieu aquatique, pendant et/ou après un stress lumineux, les niveaux de fluorescence sont diminués par le développement d'un quenching non-photochimique dû aux mécanismes de photoinhibition et de photoprotection (Long *et al.*, 1994; Falkowski et Raven, 1997; voir également la première partie de ce manuscrit). A cause de ces phénomènes, l'échantillonnage de l'eau aux environs de midi a été exclu. En effet, c'est la période du jour où l'altération de l'activité photochimique, suite aux longues périodes d'exposition à de fortes intensités lumineuses, est la plus importante (Demmig-Adams et Adams III, 2000) particulièrement dans les régions tropicales. De plus, une pré-incubation des échantillons à l'obscurité pendant 30 min avant le début de la mesure réduit la majeure partie du quenching de fluorescence qui aurait pu se développer aux heures choisies pour les prélèvements (9 h et 17 h).

### V- 2. La limitation en nutriments.

La concentration en nutriments, si elle est faible, peut également modifier l'émission de fluorescence des cellules. Ceci est particulièrement vrai pour les cyanobactéries pour lesquelles l'efficacité de transfert de l'énergie d'excitation à la Chl *a* varie avec l'état physiologique. Chez les cellules limitées en nutriments (dites "inactives"), à cause de la déconnexion partielle du phycobilisome une plus grande partie de la lumière absorbée est dissipée via la fluorescence (Campbell *et al.*, 1998). Ceci a pour conséquence d'augmenter fortement les FP Fr et/ou Fv (Tableau 16). Cet aspect a donc été considéré afin d'optimiser comme suit la procédure d'identification des cyanobactéries (Fig. 22) après l'étape 2 (§ II- 2. de cette section) :

3) **Etape 3** : la distinction entre les cellules "actives" (non limitées en nutriments) et "inactives" (limitées) est évaluée par le rapport Fr/Fv. Pour les Cr, quand  $Fr/Fv > 9$ , elles sont considérées comme "inactives" et les nouveaux FP (Tableau 16) sont utilisés pour corriger l'identification. Les Crg sont "inactives" quand  $Fr/Fv > 2$ . Bien que le rapport Fr/Fv ne présentent pas les variations les plus fortes entre les cellules "actives" et "inactives" (par rapport à Fr/Fb), il a été choisi comme la base de l'évaluation physiologique des cyanobactéries car pour les expérimentations sur site, il s'est avéré plus fiable que le rapport Fr/Fb.

**Tableau 16 : Facteurs de proportionnalité entre l'émission de fluorescence sous une excitation de faible intensité et la concentration en Chl *a* d'une cyanobactérie "rouge" et d'une cyanobactérie "rouge+verte" "active" ou "inactive" <sup>a</sup>**

	FPbCr ou FPbCrv	FPvCr ou FPvCrv	FPrCr ou FPrCrg	Fr/Fv <sup>b</sup>
Cyanobactérie "rouge" "active"	0,7	2,3	16,4	<b>7,1</b>
Cyanobactérie "rouge" " <b>inactive</b> "	0,6	2,0	26,0	<b>13,0</b>
Cyanobactérie "rouge+verte" "active"	1,3	16,3	20,5	<b>1,3</b>
Cyanobactérie "rouge+vert" " <b>inactive</b> "	2,0	27,5	60,4	<b>2,2</b>

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : FP pour facteur de proportionnalité; b, v et r pour excitation bleue, verte et orange respectivement; Cr pour cyanobactérie "rouge" (*Synechococcus* sp.); et Crv pour cyanobactérie "rouge+vert" (*Pseudoanabaena* sp.).

<sup>b</sup> Les valeurs du rapport Fr/Fv utilisées dans la procédure d'identification des cyanobactéries sont indiquées.

La distinction entre cellules "actives" et "inactives" est également importante pour les diatomées car les diatomées "inactives" sont confondues avec des algues vertes à cause de la baisse de FPvD. Cette diminution de l'émission de fluorescence sous excitation verte peut être attribuée à des modifications du pool de pigments accessoires des cellules "inactives" : soit une déconnexion de la fucoxanthine (J.-C. Duval, comm. pers.), soit une augmentation du pool de diadinoxanthine (Arsalane *et al.*, 1994), pigment photoprotecteur (voir la première partie de ce manuscrit) qui peut efficacement absorber la lumière (préférentiellement la lumière bleue-verte) sans transmettre l'énergie d'excitation à la Chl *a* (Lutz *et al.*, 1998). Cette incertitude concernant l'évaluation des diatomées n'a pas été complètement résolue car pour toutes les expérimentations menées sur le terrain, les diatomées étaient toujours le groupe le moins abondant.

Pour les algues vertes, la limitation en nutriments ne semble pas avoir un impact véritablement important sur les rapports entre FP dans nos conditions de mesure. Ceci est sans doute dû à une désorganisation moins profonde de l'appareil photosynthétique. Cependant, cette mesure n'ayant été effectuée que sur *Chlorella* sp., il convient de ne pas généraliser.

## VI- EXPERIMENTATIONS SUR SITE.

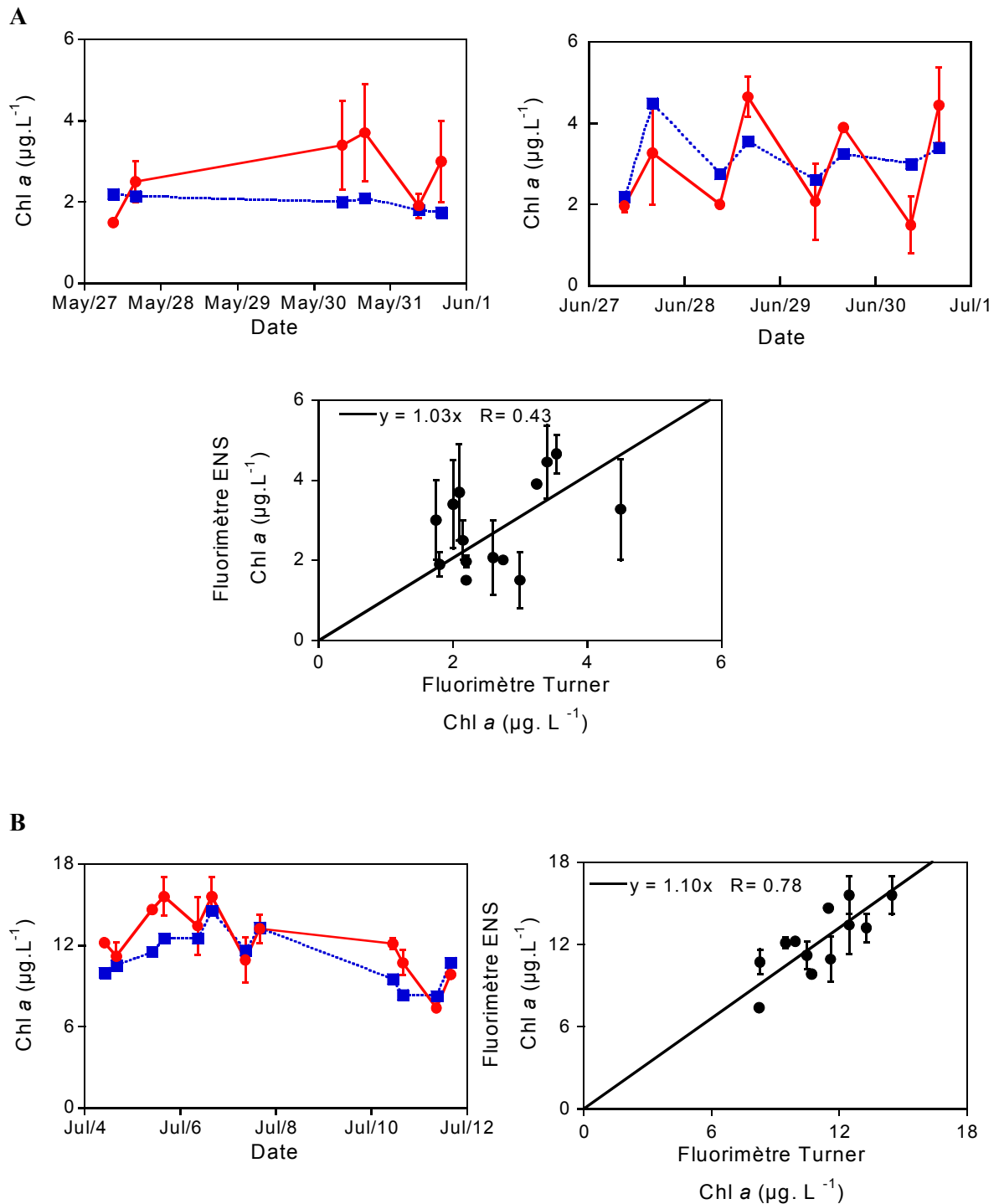
Les performances du fluorimètre ENS et de la matrice ont été testées sur plusieurs réservoirs naturels et artificiels à Macao (Chine) et à Masai (Malaisie) à différents niveaux.



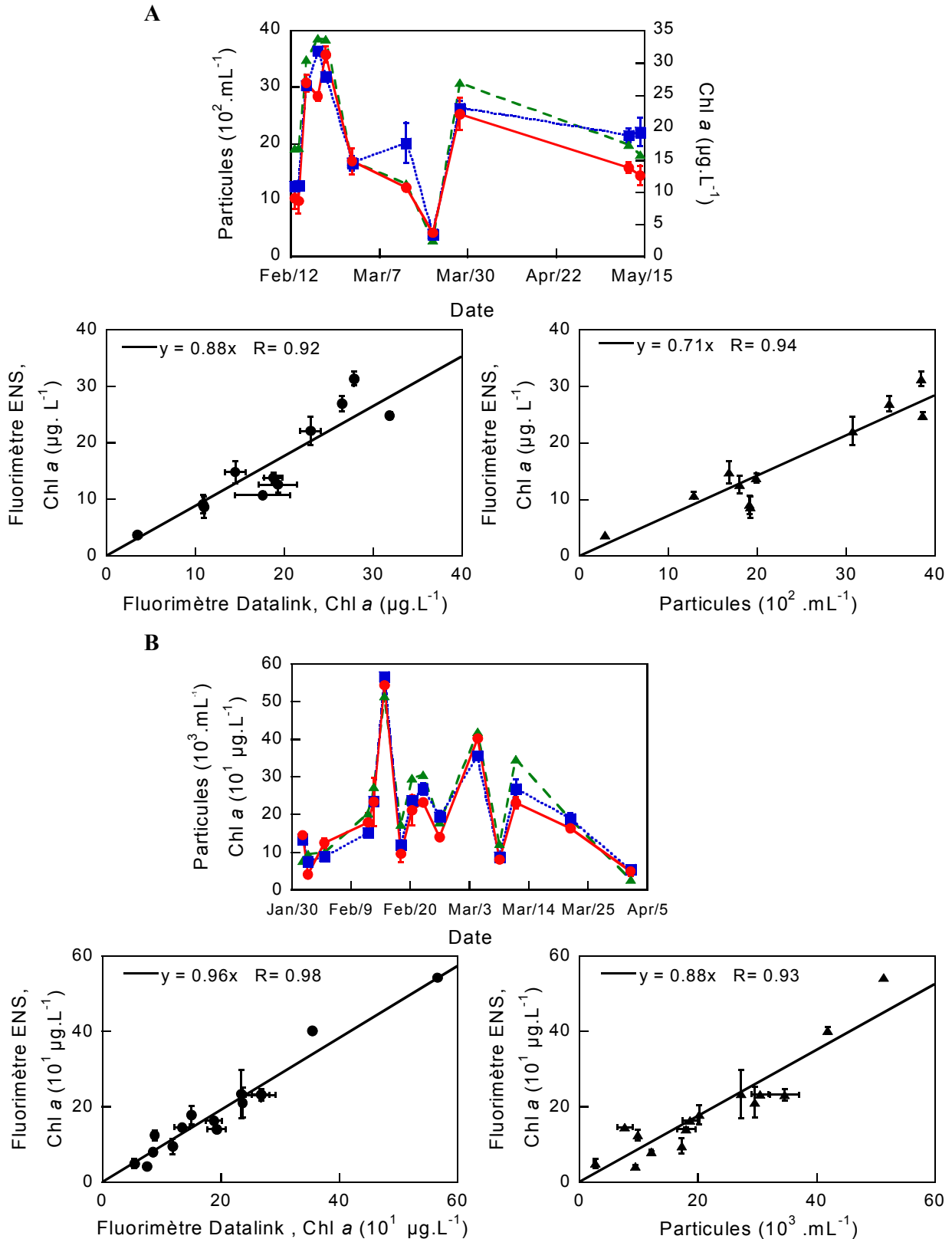
## VI- 1. Evaluation de la biomasse phytoplanctonique.

La fiabilité de l'évaluation de la biomasse phytoplanctonique entre 2 et 60  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  a été vérifiée sur deux sites de Macao ("Main Reservoir" et "Sai Pai Wan") et deux de Masai ("Administrative Pond" et "Upper Layang") présentant des biomasses phytoplanctoniques soit stables, soit variables. Ces sites ont également été choisis car ils présentent tous une composition phytoplanctonique semblable avec une majorité d'algues vertes (plus de 90 % de la population totale). Le fluorimètre ENS a été utilisé en parallèle avec les fluorimètres Turner (10-AU Digital) et Datalink (FL-100) qui sont largement employés pour la mesure de la concentration en Chl *a* en eau douce. Les mesures du fluorimètre ENS ont également été comparées avec le comptage de particules effectué avec un compteur Hach (2200-PCX). Les résultats sont présentés sous forme d'un suivi de la concentration en Chl *a* par les différents appareils et du nombre de particules au cours du temps. Ce suivi est accompagné de la relation correspondante entre la mesure fluorimètre ENS et soit la mesure fluorimètre Turner, soit Datalink, et également la relation entre la mesure de la concentration en Chl *a* par le fluorimètre ENS et le comptage de particules.

Pour les deux réservoirs chinois (Fig. 24), la concentration en Chl *a* évolue peu au cours du temps sur la période d'échantillonnage. Le panneau A correspondant au réservoir "Main Reservoir" montre que le fluorimètre ENS est capable de détecter une biomasse phytoplanctonique de l'ordre de 2  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ . Cependant, dans cette gamme de concentrations ( $< 5 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ), l'erreur dans l'évaluation de la concentration en Chl *a* peut être importante (jusqu'à 50 %). Pour le panneau B qui correspond au réservoir "Sai Pa Wan", la gamme de concentration est de 10-15  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ . La relation linéaire entre les mesures du fluorimètre ENS et celles du fluorimètre Datalink sont bien meilleures ( $r = 0,78$ , pente proche de 1). Pour les deux réservoirs malais (Fig. 25), la concentration en Chl *a* présente de fortes variations (jusqu'à un facteur 6) au cours de la période d'échantillonnage. Dans les deux cas, le fluorimètre ENS est capable de suivre correctement ces variations. Les relations linéaires entre les mesures du fluorimètre ENS et celles du fluorimètre Datalink sont bonnes voire très bonnes ( $r \approx 0,95$  avec une pente proche de 1). Les relations linéaires avec le comptage de particules sont également bonnes même si la pente de la relation montre une tendance à s'éloigner de la valeur 1. Ainsi, les données du compteur de particules sont constamment surestimées par rapport à celles du fluorimètre ENS. Cette situation est sans doute due au fait que le comptage de particules présente le désavantage de compter de façon non sélective toutes les particules présentes dans l'échantillon d'eau présentant une taille comprise entre 1



**Fig. 24** : Evolution de la concentration en Chl *a* (en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) mesurée par le fluorimètre ENS (●) et le fluorimètre Turner (Field 10-AU) (■) avec la relation linéaire entre les mesures effectuées par les deux appareils. (A) du 27/05/2001 au 31/05/2001 dans le réservoir “Main Reservoir” (Macao, Chine) (B) du 04/07/2001 au 11/07/2001 dans le réservoir “Sai Pai Wan” (Macao, Chine). Les données du fluorimètre ENS sont la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD.



**Fig. 25 :** Evolution du nombre de particules ( $\text{mL}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ) et de la concentration en Chl a (en  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) mesurée par le fluorimètre ENS ( $\bullet$ ) et le fluorimètre Datalink (FL-100) ( $\blacksquare$ ) avec les relations linéaires entre les mesures effectuées par les trois appareils. (A) du 13/02/2001 au 14/05/2001 dans le réservoir “Upper Layang” (Masai, Malaisie). (B) du 01/02/2001 au 02/04/2001 dans le réservoir “Administrative pond” (Masai, Malaisie). Les données des fluorimètres sont la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD.

et 500  $\mu\text{m}$ . Ainsi, le compteur ne détecte certainement pas que les cellules phytoplanctoniques mais aussi les plus petits organismes du zooplancton et également des particules non organiques (argiles, etc).

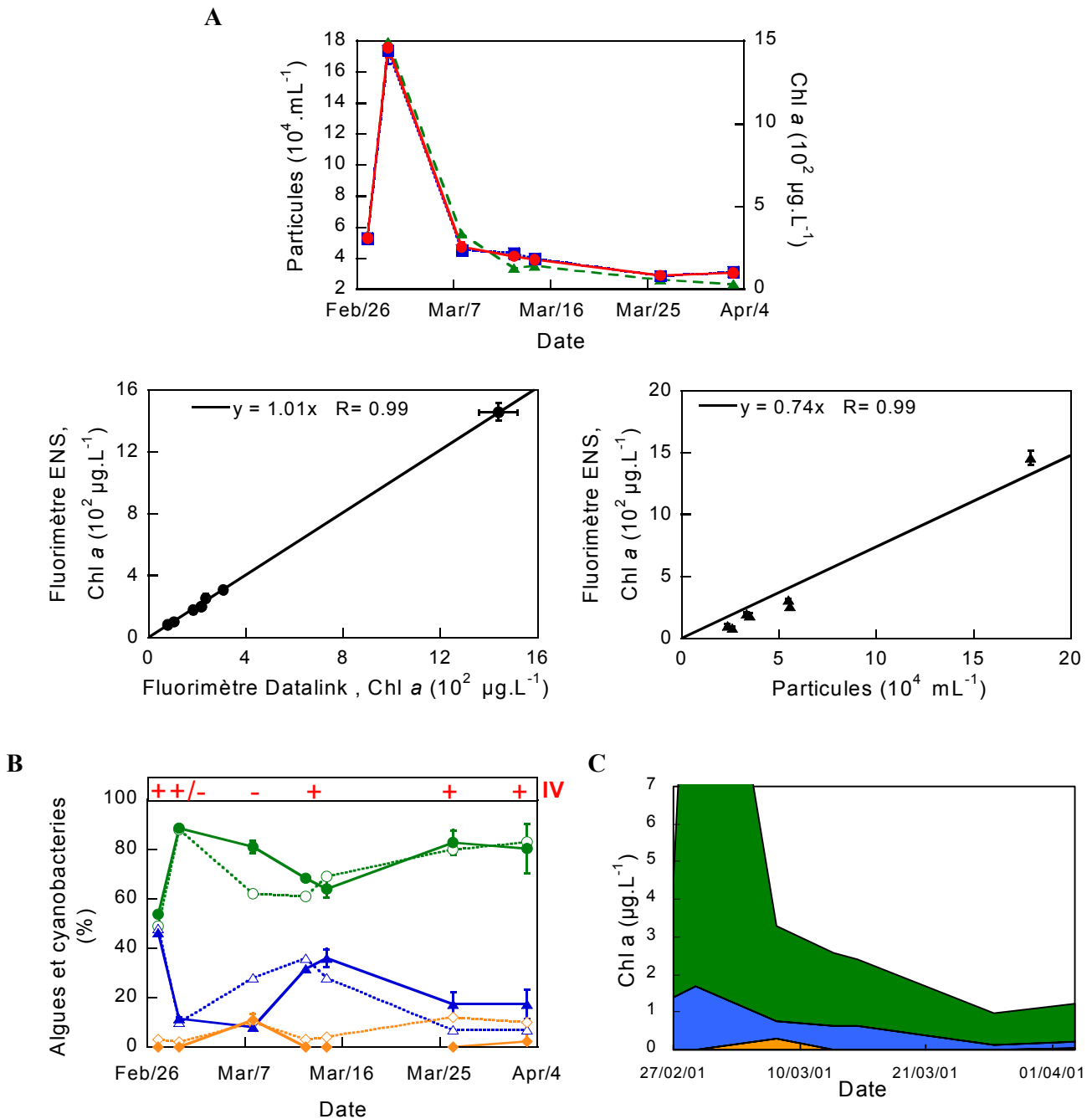
## **VI- 2. Suivi d'un bloom.**

Un bloom avec des changements dans les proportions d'algues vertes et de cyanobactéries a pu être suivi sur un réservoir Malais ("Cahaya Bahru") sur une période d'un mois (Fig. 26). La mesure de la biomasse phytoplanctonique par le fluorimètre ENS a été comparée avec celle obtenue avec le fluorimètre Datalink et avec le compteur de particules. Les résultats de l'identification des groupes phytoplanctoniques ont été eux confrontés avec le comptage et l'identification microscopique.

Les relations linéaires entre les différents appareils pour la mesure de la biomasse phytoplanctonique sont très bonnes dans cette gamme de concentrations ( $> 100 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ) (panneau A). Là encore, la pente de la relation entre les mesures au fluorimètre ENS et le comptage de particules est éloignée de 1 (0,71) sans doute pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment.

Malgré une faible fréquence d'échantillonnage avant et après le bloom, ces résultats montrent la validité de la procédure d'identification et tout particulièrement celle des cyanobactéries (panneau B). Il existe cependant une tendance à sous-estimer le groupe très minoritaire ( $< 10 \%$ ), ici les diatomées. Le type de cyanobactéries identifié par le fluorimètre ENS est le type "rouge+vert". De plus les cellules de cyanobactéries sont détectées comme étant "inactives" ce qui est tout à fait compatible avec une population en déclin constant comme le montre le panneau C.

Le Tableau 17 et la Figure 27 illustrent en détail les trois étapes successives de la procédure d'identification des cyanobactéries (§ II- 2. et V- 2. ). L'illustration de l'étape 1 de la procédure (utilisation arbitraire des FP Cr lorsque les cyanobactéries sont négligeables, c'est-à-dire inférieures à 20 % du total) est présentée Tableau 17. L'échantillon du 03/04/2001 du réservoir "Cahaya Bahru" a été choisi car il ne présente, selon l'identification et le comptage microscopique, que 7 % de cyanobactéries. L'exploitation des données de fluorescence en utilisant successivement les quatre combinaisons possibles de FP C (Cr et Crv "actives" ou pas) montre bien que quelque soit la combinaison utilisée, l'évaluation de la biomasse et de la composition du phytoplancton n'est que peu modifiée.



**Fig. 26 :** (A) Evolution du nombre de particules ( $\text{mL}^{-1}$ ) ( $\blacktriangle$ ) et de la concentration en Chl *a* (en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) mesurée par le fluorimètre ENS ( $\bullet$ ) et le fluorimètre Datalink (FL 100) ( $\blacksquare$ ) avec les relations linéaires entre les mesures effectuées par les trois appareils. (B) Evolution des proportions relatives d'algues vertes, de cyanobactéries et de diatomées évaluées par le fluorimètre ENS (symboles fermés) et l'identification microscopique (symboles ouverts); IV: index de vitalité du phytoplancton. (C) Evolution des quantités absolues (en  $\mu\text{g Chl } a\cdot\text{L}^{-1}$ ) d'algues vertes, de cyanobactéries et de diatomées évaluées par le fluorimètre ENS. Période d'échantillonnage : du 27/02/2001 au 03/04/2001, site : réservoir "Cahaya Bahru" (Masai, Malaisie). Les données des fluorimètres sont la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD.

**Tableau 17 : Illustration de l'étape 1 de la procédure d'identification des cyanobactéries sur un des échantillons (03/04/2001) du réservoir "Cahaya Bahru" (voir Fig. 27) <sup>a</sup>**

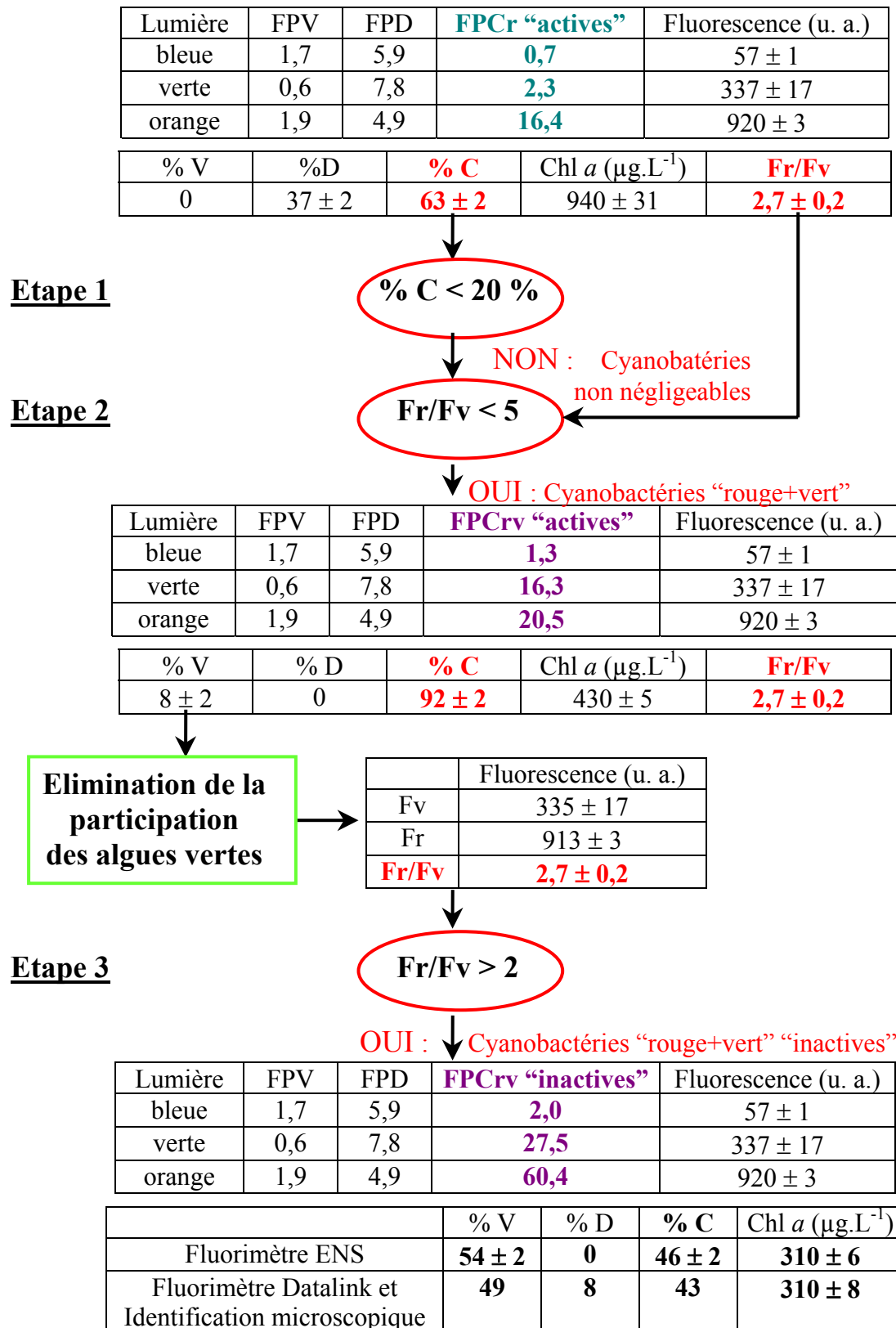
	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )	V (%)	C (%)	D (%)
Fluorimètre Datalink et identification microscopique	106 $\pm$ 3.5	83	7	10
Fluorimètre ENS, <b>FPCr</b> cellules " <b>actives</b> " <sup>b</sup>	100 $\pm$ 14	80 $\pm$ 10	17 $\pm$ 6	3 $\pm$ 3
Fluorimètre ENS, <b>FPCrv</b> cellules " <b>actives</b> "	98 $\pm$ 10	88 $\pm$ 3	12 $\pm$ 3	0
Fluorimètre ENS, <b>FPCr</b> cellules " <b>inactives</b> "	93 $\pm$ 18	83 $\pm$ 12	12 $\pm$ 5	5 $\pm$ 7
Fluorimètre ENS, <b>FPCrv</b> cellules " <b>inactives</b> "	94 $\pm$ 14	91 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3	0

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : V, D et C pour algues vertes, diatomées et cyanobactéries respectivement.

<sup>b</sup> Pour l'évaluation par le fluorimètre ENS sont utilisés consécutivement les facteurs de proportionnalité des cyanobactéries "rouge" (FPCr) et ceux des cyanobactéries "rouge+vert" (FPCrv) "actives" ou "inactives".

La procédure d'identification des cyanobactéries est donc inutile à ce stade et les FP Cr peuvent être utilisés arbitrairement sans que l'évaluation soit faussée. Les détails des deux autres étapes (étape 2 : distinction entre les deux groupes spectraux de cyanobactéries, Cr et Crv; étape 3 : distinction entre les cellules "actives" et "inactives") sont donnés Fig. 27. L'échantillon choisi est celui du 27/02/2001 qui présente la composition phytoplanctonique suivante : 49 % V, 43 % C et 8 % D. Cet exemple montre indubitablement l'importance de ces deux types de distinctions permettant d'optimiser l'identification et la quantification des cyanobactéries.

L'index de vitalité montre clairement une évolution de l'état physiologique du phytoplancton et peut ainsi être utilisé comme un indice du risque de bloom. Le suivi a commencé avec une population phytoplanctonique mixte d'algues vertes et de cyanobactéries avec un fort indice de vitalité (+). Les algues vertes ont alors proliféré. Il semble que le second point d'échantillonnage corresponde au début de la phase de déclin des algues vertes et non au "sommet" du bloom car l'index de vitalité est (+/-). Ce déclin peut être attribué à une limitation en nutriments due à la forte consommation consécutive au bloom et/ou au broutage par le zooplancton (Oliver et Ganf, 2000).



**Fig. 27 :** Illustration de la procédure d'identification des cyanobactéries sur un des échantillons (27/02/2001) du réservoir "Cahaya Bahru" (voir Fig. 26). Les paramètres ont définis comme suit : FP, facteur de proportionnalité; V, D et C, algues vertes, diatomées et cyanobactéries respectivement; Cr, cyanobactéries "rouge"; Crv, cyanobactéries "rouge+vert"; u. a., unités arbitraires. Les données du fluorimètre ENS sont la moyenne de trois valeurs ± SD.

L'index de vitalité décroît ensuite jusqu'à (-). Ce déclin est suivi d'une nouvelle augmentation rapide d'abord, puis progressive ensuite de l'index de vitalité jusqu'à une valeur (+) durant les quinze derniers jours. La fin de la période de suivi correspond probablement au démarrage d'un nouveau bloom d'algues vertes si l'on se réfère à l'augmentation correspondante de la concentration en Chl *a* juste à la fin des quinze jours (panneau C).

La dynamique des trois paramètres (biomasse phytoplanctonique, composition de la population et vitalité) est bien suivie par le fluorimètre ENS et la matrice utilisée. L'identification microscopique a également révélé que les cyanobactéries étaient dominées par le genre *Microcystis* sp. (Chroococcales, Chroococacées) qui est fréquemment rencontré en eau douce dans les zones tropicales et sub-tropicales parmi ceux dominant la biomasse des cyanobactéries (section Introduction, Tableau 3), qui est bien connu pour être responsable de blooms en eau douce (Oliver et Ganf, 2000), pour être un producteur de toxines du type hépatotoxines et neurotoxines et particulièrement la microcystine (Dow et Swoboda, 2000) et pour former des colonies (section Matériels et Méthodes, Fig. 5). Le type de cyanobactéries identifié par le fluorimètre ENS est le type "rouge+vert" ce qui est tout à fait compatible avec le genre *Microcystis* sp. dont nombre d'espèces possèdent de la phycoérythrine (Otuska *et al.*, 1998). De plus les cellules de cyanobactéries sont évaluées comme étant "inactives" ce qui correspond bien avec le déclin de la population cyanobactérienne enregistré (Fig. 26 C).

### **VI- 3. Suivi de la qualité du traitement de l'eau destinée à la production d'eau de consommation.**

Une évaluation de la biomasse, de la composition et de la vitalité du phytoplancton a été réalisée à différentes étapes du traitement de l'eau provenant du réservoir "Upper Layang" (Masai, Malaisie). Les trois étapes principales peuvent être décrites comme suit (voir les revues de Bonnelye *et al.* (1995); Mouchet et Bonnelye (1998) sur le sujet :

- **1, pompage de l'eau, eau "brute"** : l'eau est prélevée à partir de la tour de pompage du réservoir à une profondeur oscillant entre 0,5 et 1,5 m (section Matériels et Méthodes, Fig. 19).

- **2, pré-chloration/décantation ou flottaison, eau "pré-traitée"** : cette eau correspond à l'eau brute chlorée et mise en contact avec un coagulant (un sel inorganique comme le sulfate d'aluminium qui ne dégrade pas les cellules et particulièrement les cyanobactéries (Lam *et al.*,



1995) auquel on ajoute parfois un polymère cationique). Ce coagulant entraîne la formation d'amas de matière organique (dont les algues) formant des flocons qui sont ensuite précipités et éliminés par filtration sur décanteur à lit de boues. La pré-oxydation par le chlore utilisée avant la décantation ou flottaison permet l'immobilisation des cellules mobiles, la modification de la surface des cellules qui favorise la coagulation, et la dégradation partielle de la membrane cellulaire. Depuis une dizaine d'années, la pré-chloration est remplacée par une pré-ozonation pour limiter la production de sous-produits d'oxydation qui persistent dans l'eau. A ce stade, la grande majorité des algues (> 95 %) est donc éliminée et celles qui subsistent présentent une activité physiologique réduite par les différents traitements.

- **3, affinage par post-ozonation et filtration, eau "traitée"** : à ce stade, l'eau est traitée à l'ozone et filtrée sur un lit de matériaux granulaires (le plus souvent du sable avant la post-ozonation et du charbon actif en grains après), désinfectée avec du chlore et le pH ajusté. A ce stade, toutes les algues (> 99 %) ainsi que les produits d'excrétion sont éliminés; l'eau est prête à la consommation.

Les résultats de ces tests ont été comparés avec la mesure de la biomasse du fluorimètre Datalink . Ils sont résumés Tableau 18. Dans ce cas précis, la deuxième étape du traitement a été inefficace malgré une biomasse phytoplanctonique relativement faible ( $10 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ). Les algues vertes ne semblent avoir subi aucune détérioration physiologique car l'index de vitalité est toujours (+) après la deuxième étape du traitement. La troisième étape est clairement très efficace : aucun organisme n'est détecté par le fluorimètre ENS et très peu ou pas par le fluorimètre Datalink.

**Tableau 18 : Evaluation de la concentration en Chl *a* par le fluorimètre Datalink et le fluorimètre ENS, de l'index de vitalité et de la proportion d'algues et de cyanobactéries de l'eau provenant du réservoir "Cahaya Bahru" à différents stades du traitement <sup>a</sup>**

	Type d'eau	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	IV	V (%)	C (%)
Fluorimètre Datalink	Eau "brute"	$10 \pm 2$	/	/	/
Fluorimètre ENS		$11 \pm 4$	(+)	100	0
Fluorimètre Datalink	Eau "pré-traitée"	$10 \pm 2$	/	/	/
Fluorimètre ENS		$11 \pm 1$	(+)	$98 \pm 2$	$2 \pm 2$
Fluorimètre Datalink	Eau "traitée"	$0,5 \pm 0,5$	/	/	/
Fluorimètre ENS		0	/	0	0

<sup>a</sup> Les paramètres sont définis comme suit : IV, Index de vitalité; V et C, algues vertes et cyanobactéries respectivement.

Le fluorimètre ENS et la méthode d'évaluation pourrait donc être également utilisés pour suivre l'efficacité des différentes étapes du traitement de l'eau. Ainsi, tout au long du processus il permettrait d'indiquer la biomasse phytoplanctonique encore présente, le type d'organisme qui aurait pu résister à tel ou tel type de traitement et enfin, l'état physiologique du phytoplancton, afin de répondre à la question suivante : les organismes encore présents sont-ils toujours vivants et intacts ? Une question qui peut s'avérer importante dans le cas de la présence de cyanobactéries toxiques susceptibles de libérer leur toxines dans le réseau de traitement par lyse des cellules.

## **VII- PERSPECTIVES : MESURE DE L'EMISSION DYNAMIQUE DE FLUORESCENCE.**

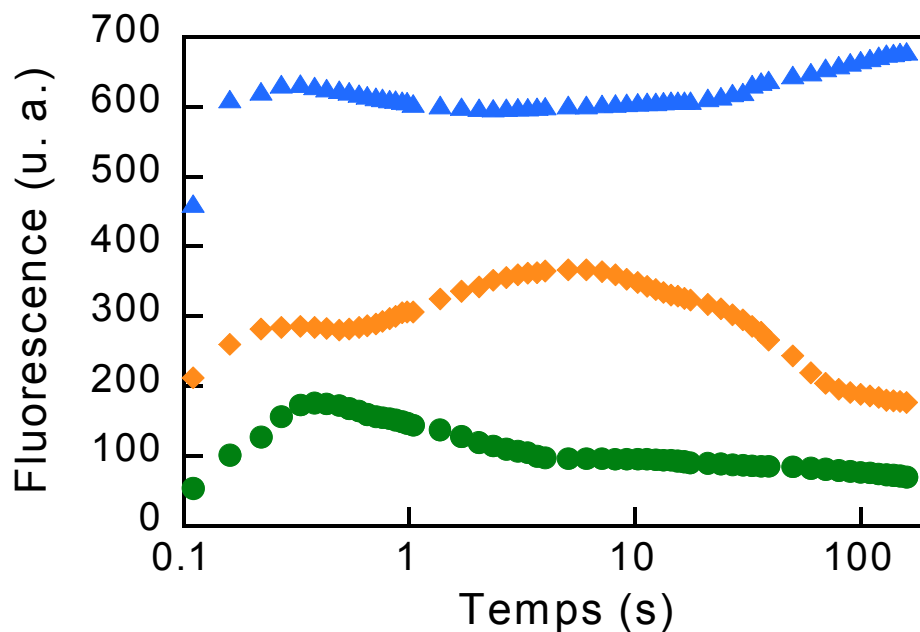
### **VII- 1. Principe et méthode.**

Les données présentées jusqu'ici concernent la mesure et l'interprétation de l'émission statique de fluorescence minimale ( $F_0$ ) sous des excitations de longueur d'onde différente. Un autre type d'émission de fluorescence, l'émission dynamique, peut également apporter des informations précieuses sur les organismes phytoplanctoniques. L'émission de fluorescence dynamique correspond à la fluorescence émise sous une illumination continue d'intensité fixe. La courbe obtenue représente l'intensité de la fluorescence en fonction du temps appelée "courbe d'induction de fluorescence". La forme de l'induction de fluorescence est dépendante de l'état d'oxydo-réduction des transporteurs d'électrons entre le PS II et le PS I et donc illustre l'activité photosynthétique du ou des organisme(s) (voir la première partie de ce manuscrit pour de plus amples détails). Il a également été montré que la forme de l'induction de fluorescence est dépendante de l'espèce de même que l'intensité dépend de la concentration en Chl *a* (pour revue voir Krause et Weis, 1991). L'émission de fluorescence dynamique pourrait donc être très utile pour confirmer, de façon indépendante de la mesure statique, l'évaluation de la biomasse et de la composition du phytoplancton.

L'induction de fluorescence de la population phytoplanctonique est enregistrée après la série de flashes décrite dans la section Matériels et Méthodes (§ III- 3.) qui permet l'acquisition des niveaux  $F_0$  et  $F_m$ . Une illumination orange continue et d'intensité  $125 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  est appliquée à l'échantillon en fin de mesure après 20 s d'attente à l'obscurité afin de laisser le temps nécessaire aux différents composants de l'appareil photosynthétique de se réoxyder. La lumière orange a été choisie après plusieurs essais qui ont montré que l'intensité lumineuse délivrée par la "tête" émettrice bleue est trop faible (au maximum  $15 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) et

que l'émission de fluorescence des algues vertes et des cyanobactéries "rouge" est trop faible sous une excitation verte. Au contraire, tous les organismes présentent une émission de fluorescence d'intensité suffisante sous une excitation orange pour mesurer une induction de fluorescence correcte. L'intensité lumineuse de  $125 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  n'est ni trop faible afin de pouvoir enregistrer les différentes phases de l'induction (voir la première partie de ce manuscrit), ni trop forte afin de minimiser le phénomène de quenching non-photochimique qui uniformiserait les inductions. L'induction est suivie sur l'échelle logarithmique de l'écran principal (section Matériels et Méthodes, § III- 2. ) et enregistrée durant 170 s avec différents temps moyens d'acquisition (successivement 50 ms, 300 ms, 1 s, 3 s et 10 s) afin de limiter la taille du fichier. Les temps d'acquisition sont pré-définis dans le protocole et automatiquement ajustés par le logiciel "Fluo" en cours d'expérimentation. Lorsque l'induction de fluorescence est enregistrée, le temps total de la mesure est alors de 4 à 5 min.

Les caractéristiques de l'induction de fluorescence ont été enregistrées pour chaque groupe sur des cultures monospécifiques à  $50 \mu\text{g Chl } a\cdot\text{L}^{-1}$  des trois organismes de référence : *Chlorella* sp., *Phaeodactylum* sp. et *Synechococcus* sp. (Fig. 28).



**Fig. 28 :** Inductions de fluorescence de référence des algues vertes (*Chlorella* sp.) (●), des diatomées (*Phaeodactylum* sp.) (◆) et des cyanobactéries (*Synechococcus* sp.) (▲) sous une excitation orange de  $125 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La concentration en Chl *a* des trois cultures monospécifiques est de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

La distinction entre les deux types de cyanobactéries a été testée comme inutile de part la similarité des inductions. Les profils des inductions de ces trois organismes sont relativement différents avec un niveau maximal atteint dès 500 ms d'éclairement pour *Chlorella* sp., aux alentours de 10 s pour *Phaeodactylum* sp. et après 100 s pour *Synechococcus* sp. Ces inductions de référence sont incluses dans le protocole et à la fin de la mesure, l'induction obtenue sur l'échantillon naturel est comparée avec les profils des trois groupes d'organismes. Les inductions de référence sont utilisées comme des composants élémentaires dont la somme doit s'ajuster au mieux avec le profil expérimental. La déconvolution s'arrête lorsque la meilleure combinaison des trois courbes de références (testée via l'écart quadratique réduit) est trouvée. La différence entre la courbe expérimentale et la courbe théorique (qui est la somme des proportions des trois profils de référence mesurés à une concentration de  $50 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ) est alors minimale. Ainsi, la concentration en Chl *a* et les proportions d'algues vertes, de diatomées et de cyanobactéries sont obtenues par une méthode totalement indépendante de la mesure de l'émission statique de fluorescence. La Figure 29 présente une induction de fluorescence mesurée sur un mélange des trois groupes d'organismes en proportions 75/12,5/12,5 avec une concentration de  $19 \mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  et le "Fit" théorique de cette induction. La fenêtre "évaluation" qui figure les résultats est également montrée. Le Tableau 19 compare l'évaluation du même échantillon basée sur la mesure de l'émission statique ("Evaluation  $F_0$ ") et dynamique ("Evaluation Fit") de la fluorescence. L'évaluation de la concentration en Chl *a* et des proportions des trois groupes d'organismes est équivalente à l'évaluation basée sur le  $F_0$ . L'erreur sur l'évaluation de la concentration en Chl *a* est cependant plus importante.

## VII- 2. Premiers résultats obtenus sur des expérimentations sur site.

Après avoir testé positivement cette méthode sur des mélanges d'organismes provenant de cultures de laboratoire en phase exponentielle, la seconde étape a consisté à la tester sur des échantillons naturels. Le suivi du bloom observé sur le réservoir malais "Cahaya Bahru" (§ VI- 2., Fig. 26) a été complété chaque jour d'échantillonnage par l'acquisition des inductions de fluorescence de la population phytoplanctonique.

Les inductions obtenues sont présentées Figure 30. Le profil des ces inductions (panneau B) montrent clairement une dominance des algues vertes avec un maximum de fluorescence autour de 500 ms d'illumination; ce qui est très similaire à l'induction de fluorescence des algues vertes (Fig. 28).

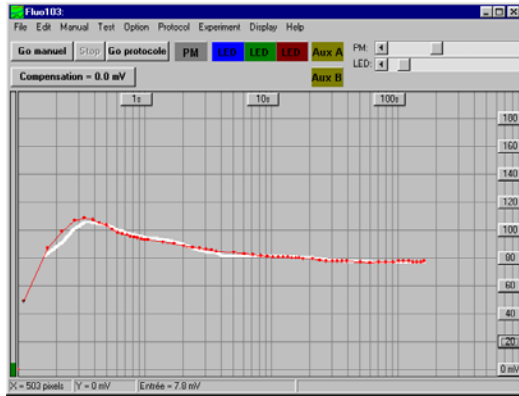


Fig.29 : (A) Copie de l'écran principal du logiciel "Fluo" avec l'induction de fluorescence expérimentale (en rouge) et le "Fit" théorique (en blanc) d'un mélange d'algues vertes (*Chlorella* sp.), de diatomées (*Phaeodactylum* sp.) et de cyanobactéries "rouge" (*Synechococcus* sp.) en proportions 75/12,5/12,5 à une concentration de 19  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ .

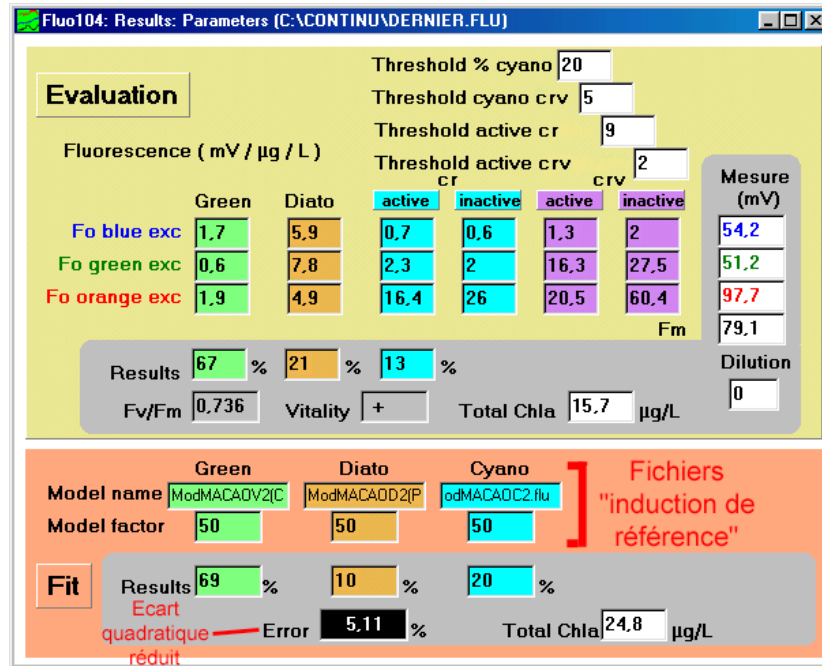
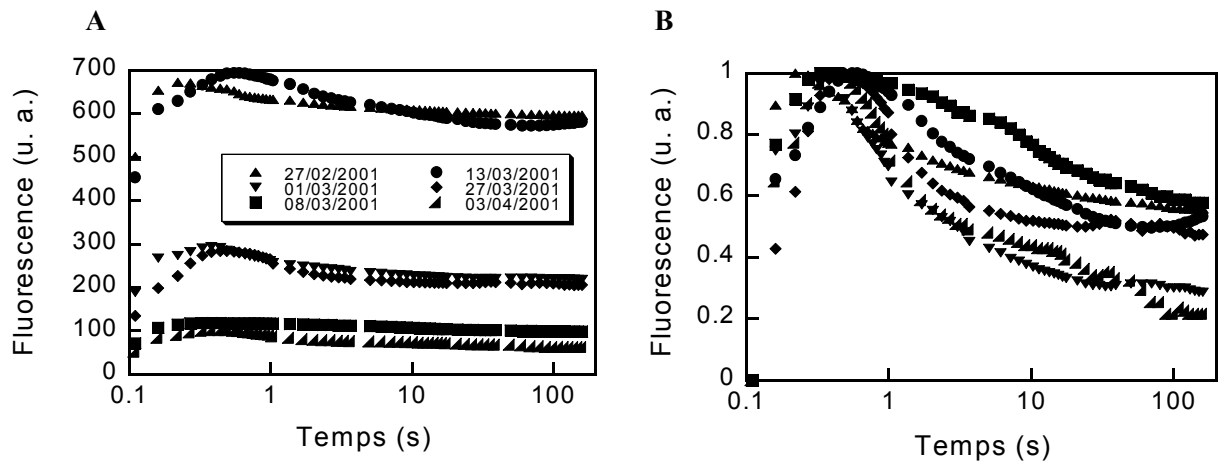


Fig.29 : (B) Copie de la table d'évaluation avec en haut l'"évaluation  $F_0$ " qui correspond à l'évaluation basée sur les mesures de l'émission statique de fluorescence sous trois excitations de longueurs d'onde différentes (mesure du  $F_0$ ) et en bas l'"évaluation Fit" qui correspond à l'évaluation basée sur la mesure de l'émission dynamique de fluorescence sous excitation orange (mesure de l'induction de fluorescence). Sont indiqués en rouge les fichiers sous lesquels sont enregistrés les inductions de référence et qui servent de base au "Fit" théorique et l'écart quadratique réduit qui sert à tester le meilleur "Fit" théorique.

Tableau 19 : Détermination par le fluorimètre ENS de la concentration en Chl *a* et de la composition d'un mélange comprenant des algues vertes, des diatomées et des cyanobactéries "rouge" en proportions 75/12,5/12,5<sup>a</sup>

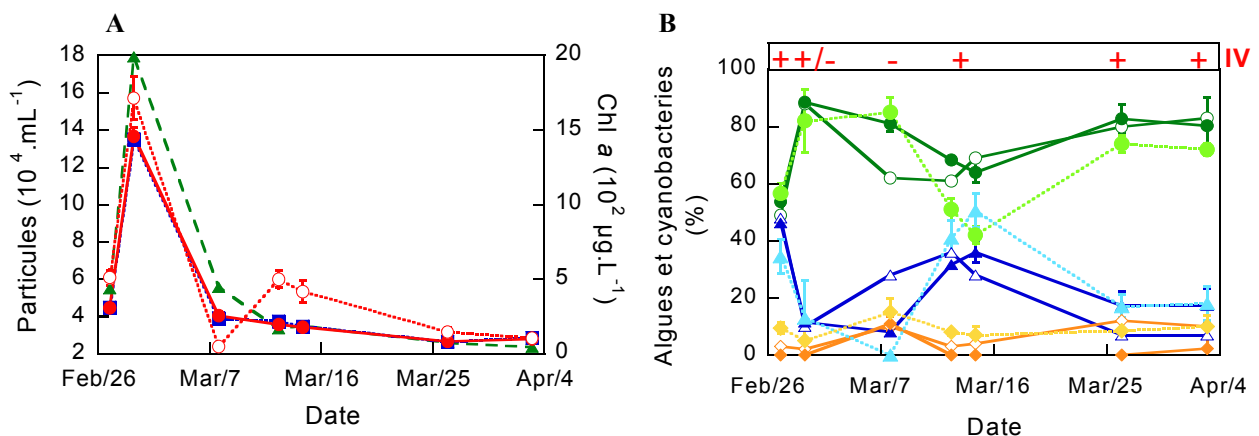
	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g}.L^{-1}$ )	V (%)	D (%)	Cr (%)
Valeurs attendues	19,0	75	12,5	12,5
Evaluation $F_0$	15,7 $\pm$ 0,2	65 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
Evaluation Fit	25,5 $\pm$ 0,9	65 $\pm$ 5	14 $\pm$ 4	21 $\pm$ 1

<sup>a</sup> Les algues vertes, V (*Chlorella* sp.), les diatomées, D (*Phaeodactylum* sp.) et les cyanobactéries "rouge", Cr (*Synechococcus* sp.) proviennent de cultures en phase exponentielle de croissance. Les données du fluorimètre sont la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD.



**Fig. 30 :** (A) Evolution du profil des inductions de fluorescence du phytoplancton du 27/02/2001 au 03/04/2001 sur le réservoir “Cahaya Bahru” (Masai, Malaisie). (B) Inductions normalisées au niveau  $F_0$ .

Les variations de niveau de l'induction (panneau A) sont elles représentatives d'une variation de la concentration en Chl *a* et/ou d'une variation de la proportion de cyanobactéries (qui absorbent préférentiellement la lumière orange). Les résultats de l'exploitation de ces inductions à partir de l'“évaluation Fit” sont montrés Figure 31. L'évaluation de la concentration en Chl *a* par cette méthode (panneau A) n'est que partiellement fiable. La tendance générale est relativement bien décrite (excepté entre les points du 8 et du 13 mars) mais les valeurs absolues sont sujettes à des erreurs importantes (jusqu'à 60 %).



**Fig. 31 :** (A) Evolution du nombre de particules ( $mL^{-1}$ ) (▲) et de la concentration en Chl *a* (en  $\mu g \cdot L^{-1}$ ) mesurée par le fluorimètre Datalink (FL 100) (■) par le fluorimètre ENS à partir de l'“évaluation  $F_0$ ” (●) ou de l'“évaluation Fit” (○). (B) Evolution des proportions relatives d'algues vertes (●), de cyanobactéries (▲) et de diatomées (◆) évaluées par le fluorimètre ENS (symboles fermés) à partir de l'“évaluation  $F_0$ ” (—) ou de l'“évaluation Fit” (---) et l'identification microscopique (symboles ouverts); IV: index de vitalité du phytoplancton. Période d'échantillonnage: du 27/02/2001 au 03/04/2001, site: réservoir “Cahaya Bahru” (Masai, Malaisie). Les données des fluorimètres sont la moyenne de trois valeurs  $\pm$  SD.

A l'inverse, les proportions d'algues et de cyanobactéries obtenues par cette méthode (Fig. 31 B) sont proches de celles obtenues par l'«évaluation  $F_0$ » sauf pour le 15 mars. L'écart entre les deux méthodes est faible (15 % au maximum). Deux indications précieuses sont données par ces résultats :

1- l'«évaluation Fit» permet réellement de confirmer de façon indépendante l'«évaluation  $F_0$ ». C'est par exemple le cas pour le point du 27 février pour lequel les deux types d'évaluation donnent des résultats proches tandis que le comptage microscopique avance des valeurs sensiblement différentes.

2- l'«évaluation Fit» estime mieux que l'«évaluation  $F_0$ » le groupe très minoritaire (autour de 10 %). Dans cet exemple, la proportion des diatomées a tendance à être sous estimée par l'«évaluation  $F_0$ », ce qui n'est pas le cas de l'«évaluation Fit».

### **VII- 3. Conclusion.**

L'«évaluation Fit» basée sur l'acquisition et l'interprétation des courbes d'induction de fluorescence pourrait s'avérer très utile pour confirmer et affiner de façon complètement indépendante l'évaluation de la biomasse et de la composition de la population phytoplanctonique par l'«évaluation  $F_0$ » qui est basée sur les mesures de l'émission statique de fluorescence. Cependant, l'évaluation de la concentration en Chl *a* par cette méthode n'est pas complètement fiable et il semble plus prudent de l'utiliser uniquement comme indicateur de tendances dans l'évolution de la biomasse du phytoplancton au cours du temps plutôt que des valeurs absolues pour lesquelles l'«évaluation  $F_0$ » est incontestablement plus fiable. Pour l'évaluation des proportions d'algues et de cyanobactéries, cette technique donne des résultats satisfaisants qui peuvent venir confirmer et même affiner l'«évaluation  $F_0$ ».

Cet affinage pourrait aller jusqu'à discerner entre quelques genres ou même jusqu'à déterminer le genre de l'organisme du groupe dominant. La Figure 32 présente les inductions de fluorescence de quatre genres d'algues vertes mesurées dans les mêmes conditions d'illumination. Malgré un profil général similaire, avec une augmentation rapide de l'émission jusqu'à un maximum atteint après environ 500 ms d'illumination puis une diminution de l'émission, les subtilités des différents profils pourraient en théorie être utilisées pour distinguer le genre et cibler l'identification sur un ou deux genres pour le groupe d'organismes dominant. Dans le même ordre d'idée, il est également envisageable d'enregistrer une bibliothèque d'inductions de fluorescence adaptées aux genres d'algues et

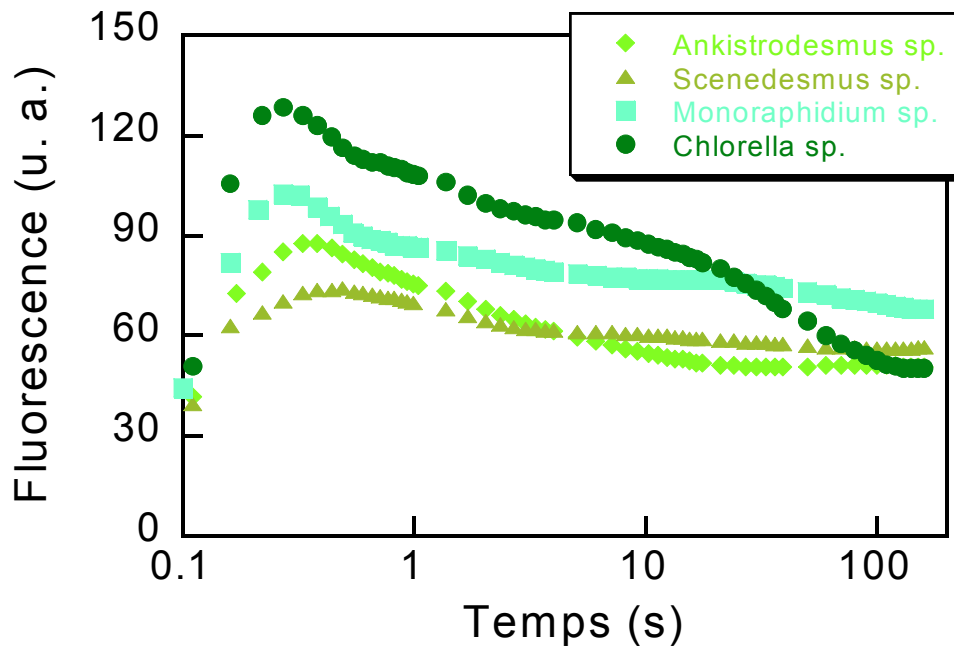


Fig. 32 : Inductions de fluorescence des algues vertes *Chlorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. et *Ankistrodesmus* sp. sous une excitation orange de  $125 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . La concentration en Chl *a* des trois cultures monospécifiques est de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

de cyanobactéries susceptibles d'être rencontrés dans un site donné. Ceci permettrait d'optimiser la méthode et d'affiner l'identification jusqu'au genre. Cette possibilité pourrait être d'importance dans le cas des organismes producteurs de métabolites gênant pour le traitement de l'eau (Mouchet, 1997) ou entraînant des goûts et des odeurs dans l'eau de boisson (Persson, 1996). Cette éventualité est également très intéressante dans le cas des cyanobactéries dont seuls certains genres comme *Anabaena* spp. et *Microcystis* spp. sont bien connus pour produire des toxines (Dow et Swoboda, 2000). Cependant, même si cela semble réalisable pour les algues vertes encore faut-il que les diatomées et les cyanobactéries présentent également un profil général similaire entre les différents genres. L'«évaluation Fit» pourrait donc être limitée par ce biais. Enfin, il convient de manipuler les inductions de fluorescence avec une grande prudence. En effet, leur profil est beaucoup plus sensible à l'état physiologique des algues que ne l'est l'émission statique de fluorescence. Par exemple, le maximum de fluorescence des cyanobactéries enregistré au-delà de 100 s d'illumination correspond au phénomène de transition d'état. Ce phénomène physiologique est très labile et n'est pas toujours vu lors de l'acquisition. Dans ce cas l'«évaluation Fit» est totalement faussée et les cyanobactéries sous-estimées. De même, lorsque les cellules sont dans un état physiologique médiocre, leur induction de fluorescence est aplatie et leur profil uniformisé. Les inductions du phytoplancton sont alors inexploitables; c'est pour cette raison que cette



méthode n'est sans doute réellement fiable que lorsque l'“index de vitalité” est (+) ou (+/-). Il est donc envisagé que l'acquisition de l'induction soit annulée automatiquement par le logiciel lorsque l'“index de vitalité” est (-). Des essais restent donc à effectuer afin d'optimiser cette méthode.

\*\*\*\*\*

# *Conclusion*



## CONCLUSION

Deux types de données ont été présentés. Le premier concerne les expérimentations en laboratoire pour lesquelles la biomasse et la composition du phytoplancton de l'échantillon ainsi que l'état physiologique des organismes étaient déterminés à l'avance. Les résultats obtenus ont été utilisés pour tester et optimiser la méthode basée sur l'émission de fluorescence du phytoplancton : l'intensité et la durée des lumières d'excitation, l'ajustement de la sensibilité des instruments pour l'évaluation de la concentration en Chl *a*, les paramètres utilisés dans la matrice, l'optimisation de la procédure d'identification des cyanobactéries. Le second type de données correspond aux expérimentations sur site en Chine et en Malaisie où la biomasse, la composition et l'état physiologique des échantillons phytoplanctoniques étaient inconnus. Le suivi d'un bloom durant un mois a également été possible.

La robustesse de l'appareil a été prouvée. Il a été transporté par avion et voiture sans aucune conséquence sur les instruments et particulièrement l'optique de l'appareil et sur la sensibilité de détection du PM et la reproductibilité des mesures.

Le fluorimètre ENS est un système sensible possédant une grande dynamique de mesure. Bien que moins cher que les appareillages déjà sur le marché, il peut évaluer correctement une biomasse phytoplanctonique jusqu'à un seuil de  $2 \mu\text{g Chl } a \cdot \text{L}^{-1}$ . Il est capable de discriminer entre les cyanobactéries, les algues vertes et les diatomées même lorsqu'un des groupes est dominant. C'est aussi un outil puissant pour détecter un changement de biomasse d'un des groupes phytoplanctoniques ne représentant qu'une fraction mineure de la population totale. Sa supériorité provient de sa capacité à distinguer entre deux groupes spectraux de cyanobactéries, de considérer leur état physiologique afin d'optimiser leur identification et enfin de détecter les formes coloniales de cyanobactéries. Ces propriétés sont essentielles pour un suivi fiable des cyanobactéries d'eau douce et particulièrement celles qui produisent des toxines.

Le suivi du bloom a été correct et la combinaison des informations sur la composition du phytoplancton et sur sa vitalité permet d'envisager cet instrument comme un système

d'alerte pour la prédiction et la prévention des blooms. Bien sûr, plusieurs suivis de blooms de différents types seront nécessaires à la validation de ce pouvoir de prédiction.

Enfin, cet appareil pourrait également être utilisé pour suivre en continu l'efficacité des différentes étapes du traitement de l'eau.

Ce travail a donné lieu à une publication soumise à **Applied and Environmental Microbiology** (voir ci-après, p. 93).

\*\*\*\*\*

# *Références bibliographiques*

---

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anonyme (1990). *The enumeration of algae, estimation of cell volume, and use in bioassays*, HMSO, London.
- Anonyme (1993a). Causes of algal blooms-Chap. 2. In *Water Resources-Toxic Algae*, Commonwealth of Australia.
- Anonyme (1993b). Implications and management of algal blooms-Chap. 3. In *Water Resources-Toxic Algae*, Commonwealth of Australia.
- Anonyme (1998a) Algae management in reservoirs and lakes in *Application notes, bulletin 105*, <http://www.turnerdesigns.com>.
- Anonyme (1998b) Chlorophyll and pheophytin in *Application notes, bulletin 101*, <http://www.turnerdesigns.com>.
- APHA, AWWA & WEF (1995). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, AWWA Books.
- Arar, E. J. & Collins, G. B. (1992). Method 445.0, *in vitro* determination of chlorophyll *a* and pheophytin *a* in marine and freshwater phytoplankton by fluorescence. In *Methods for the determination of chemicals substances in marine and estuarine environmental samples*, Environmental Monitoring Systems Laboratory, Office of research and Development, U.S. Environment Protection Agency, Cincinnati, Ohio.
- Arsalane, W., Rousseau, B. & Duval, J.-C. (1994). Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.*, 60, 237-243.
- Bafford, R. A., Seagull, R. A., Chung, S.-Y. & Millie, D. F. (1993). Intracellular localization of the taste/odour metabolite, 2-methylisoborneol, in *Oscillatoria limosa* (Cyanophyta). *J. Phycol.*, 29, 91-95.
- Barbini, R., Colao, F., Fantoni, R., Micheli, C., Palucci, A. & Ribezzo, S. (1998). Design and application of a LIDAR fluorosensor system for remote monitoring of phytoplankton. *ICES J. of Mar. Sci.*, 55, 793-802.
- Bellinger, E. G. (1992). *A key to common algae*, The Institution of Water and Environmental Management, London, UK.
- Bentley, R. & Meganathan, R. (1981). Geosmin and methylisoborneol biosynthesis in Streptomyces: evidence for an isoprenoid pathway and its absence in non-differentiating isolates. *FEBS Letters*, 125, 220-222.

- Berg, K., Skulberg, O. M. & Skulberg, R. (1987). Effects of decaying toxic blue-green algae on water quality-a laboratory study. *Arch. für Hydrobiologie*, 108, 549-563.
- Berkaloff, C., Caron, L. & Rousseau, B. (1990). Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigments analysis. *Photosynth. Res.*, 23, 181-193.
- Bernazeau, F., Baudin, I. & Pieronne, P. (1995). Traitement des problèmes des toxines générées par les algues. *TSM\_L'eau*, 90, 747-748.
- Beutler, M., Wiltshire, K. H., Meyer, B., Moldaenke, C. & Dau, H. (1998). Rapid depth-profiling of the distribution of "spectral groups" of microalgae in lakes, rivers and in the sea. In G., Garab (Ed.), *Photosynthesis: mechanisms and effects*, pp 4301-4304. Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis, Budapest, Hungary. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Blomqvist, P., Pettersson, A. & Hyenstrand, P. (1994). Ammonium-nitrogen: a key regulatory factor causing dominance of non-nitrogen-fixing cyanobacteria in aquatic systems. *Arch. Hydrobiol.*, 132, 141-164.
- Bold, H. C. (1949). *Bull. Torrey Bot. Club*, 76, 101-108.
- Bonnelye, V., Baudin, I., Bernazeau, F., Gislette, P. & Mouchet, P. (1995). Elimination des algues planctoniques: efficacité des filières modernes de traitement. *TSM\_L'eau*, 10, 721-727.
- Bourne, D. G., Jones, G. J., Blakeley, R. L., Jones, A., Negri, A. P. & Riddles, P. (1996). Enzymatic pathway for the bacterial degradation of the cyanobacterial cyclic peptide toxin microcystin LR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 4086-4094.
- Bowmer, K. H., Padovan, A., Oliver, R. L., Korth, W. & Ganf, G. G. (1992). Physiology of geosmin production by *Anabaena circinalis* isolated from the Murrumbidgee River, Australia. *Wat. Sci. Technol.*, 25, 259-267.
- Breton, E., Brunet, C., Sautour, B. & Brylinski, J.-M. (2000). Annual variations of phytoplankton biomass in the Eastern English Channel: Comparison by pigment signatures and microscopic counts. *J Plankton Res*, 22, 1423-1440.
- Brunet, C., Davoult, D. & Casotti, R. (1996). Physiological reactions to a change in light regime in cultured *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta): implications for estimation of phytoplankton biomass. *Hydrobiologia*, 333, 87-94.
- Bryant, D. A. (1994). *The Molecular Biology of cyanobacteria*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Campbell, D., Hurry, V., Clarke, A. K., Gustafsson, P. & Oquist, G. (1998). Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Bio. R.*, 62, 667-683.
- Carmichael, W. W. (1994). The toxins of cyanobacteria. *Sci. Am.*, 270, 64-72.
- Carmichael, W. W. (1997). The cyanotoxins. *Adv. Bot. Res.*, 27, 211-256.

- Chekalyuk, A. M., Hoge, F. E., Wright, C. W., Swift, R. N. & Yungel, J. K. (2000). Airbone test of laser pump-and-probe technique for assessment of phytoplankton photochemical characteristics. *Photosynt. Res.*, 66, 45-56.
- Chorus, I., Falconer, I. R., Salas, H. J. & Bartram, J. (2000). Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, 3, 323-347.
- Chow, C. W. K., Drickas, M., House, J., Burch, M. D. & Velzeboer, R. M. A. (1999). The impact of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium *Mycrocystis aeruginosa*. *Wat. Res.*, 33, 3253-3262.
- Christoffersen, K. (1996). Ecological implications of cyanobacterial toxins in aquatic food webs. *Phycologia*, 35, 42-50.
- Codd, G. A., Ward, C. J. & Bell., S. G. (1997). Cyanobacterial toxins: occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. *Arch. Toxicol. Suppl.*, 19, 399-410.
- Codd, G. A., Ward, C. J., Beattie, K. A. & Bell., S. G. (1999). Widening perceptions and significance of cyanobacterial toxins. In *9th International Symposia on Phototrophic Prokariotes*, pp. 623-632., Kluwer Academic/Plenum publishers, New York.
- Collier, J. L. (2000). Flow cytometry and the single cell in phycology. *J. Phycol.*, 36, 628-644.
- Cullen, J. J., Ciotti, A. M., Davis, R. F. & Lewis, M. R. (1997). Optical-detection and assessment of algal blooms. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1223-1239.
- Demmig-Adams, B. & Adams III, W. W. (2000). Harvesting sunlight safely. *Nature*, 403, 371-374.
- Desoy, J.-P., Higgins, H. W., Mackey, D. J., Hurley, J. P. & Frost, T. M. (2000). Pigment ratios and phytoplankton assessment in northern Wisconsin lakes. *J. Phycol.*, 36, 274-286.
- Donati, C., Drikas, M., Hayes, R. & Newcombe, G. (1994). Microcystin-LR adsorption by powered activated carbon. *Wat. Res.*, 28, 1735-1742.
- Dow, C. S. & Swoboda, U. K. (2000). Cyanotoxins. In *The Ecology of Cyanobacteria*, Whitton, B. A. & Potts, M. (Ed.), pp 613-632, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dubelaar, G. B., Jonker, R. R., Meulemans, J. T. M. & van Veen, J. J. F. (1994). Phytoplankton analysis by (EurOPA) flow-cytometry: current and future applications in environmental control. In *Oceans 94 OSATES*, pp. 693-689.
- Duy, T. N., Lam, P. K., Shaw, G. R. & Connell., D. W. (2000). Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 163, 113-185.
- El-Dib, M. A. & Ali, R. K. (1994). Mixed algal population and *Scenedesmus* sp. as trihalomethane precursors. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 52, 712-717.
- Everitt, D. A., Wright, S. W., Volkman, J. K., Thomas, D. P. & Lindstrom, E. (1990). Phytoplankton community composition in the western equatorial Pacific determined from chlorophyll and carotenoid pigment distribution. *Deep-Sea Res.*, 37, 975-997.
- Falconer, I. A. (1996). Potential impact on human health of toxic cyanobacteria. *Phycologia*, 35, 6-11.



- Falconer, I. A. & Humpage, A. R. (1996). Tumour promotion by cyanobacterial toxins. *Phycologia*, 35, 74-79.
- Falkowski, P. G. & Laroche, J. (1991). Acclimation to spectral irradiance in algae. *J. Phycol.*, 27, 8-14.
- Falkowski, P. G. & Kolber, Z. S. (1995). Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 22, 341-355.
- Falkowski, P. G. & Raven, J. A. (1997). *Aquatic Photosynthesis*, pp 375, Blackwell Science, Malden, USA.
- Ganf, G. G. & Oliver, R. L. (1982). Vertical separation of light and available nutrients as a factor causing replacement of green algae by blue-green algae in the plankton of a stratified lake. *J. Ecol.*, 70, 829-844.
- Garver, S. A., Siegel, D. A. & Mitchell, B. G. (1994). Variability in near-surface particulate absorption spectra: what can a satellite ocean color imager see? *Limnol. Oceanogr.*, 39, 1349-1367.
- Gieskes, W. W. C. & Kraay, G. W. (1983). Dominance of Cryptophyceae during the phytoplankton spring bloom in the central North Sea detected by HPLC analysis of pigments. *Mar. Biol.*, 75, 179-185.
- Gieskes, W. W. C. & Kraay, G. W. (1986). Floristic and physiological differences between shallow and deep nanophytoplankton community in the euphotic zone of the open tropical Atlantic revealed by HPLC-analysis of pigments. *Mar. Biol.*, 91, 567-576.
- Goericke, R. & Montoya, J. P. (1998). Estimating the contribution of microalgal taxa to chlorophyll *a* in the field-variations of pigments ratios under nutrient- and light-limited growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 169, 97-112.
- Groben, R., Lange, M. & Medlin, L. K. (2001). rRNA probes for identification and characterization of marine phytoplankton: their potential application for DNA microchips. *J. Phycol.*, 37, 20-21.
- Guillard, R. R. R. & Ryther, J. H. (1962). Studies of marine planktonic diatoms. 1. *C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.*, 8, 229-238.
- Havens, K. E., Steinman, A. D., Carrick, H. J., Louda, J. W., Winfree, N. M. & Baker, E. W. (1999). Comparative analysis of lake periphyton communities using high performance liquid chromatography (HPLC) and light microscope counts. *Aquat. Sci.*, 61, 307-322.
- Hitzfeld, B. C., Hoger, S. J. & Dietrich, D. R. (2000). Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.*, 108, 113-122.
- Hoehn, R. C., Barnes, D. B. & Thompson, B. C. (1980). Algae as source of trihalomethane precursors. *JAWWA*, 72, 344-350.
- Hoepffner, N. & Sathyendranath, S. (1993). Determination of major groups of phytoplankton pigments from the absorption spectra of total particulate matter. *J. Geophys. Res.*, 98, 789-803.
- Humphries, S. E. & Lyne, V. D. (1988). Cyanophyte blooms: the role of cell buoyancy. *Limnol. Oceanogr.*, 33, 79-91.

- Hunter, P. R. (1998). Cyanobacterial toxins and human health. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 27, 35S-40S.
- Iturriaga, R., Mitchell, B. G. & Kiefer, D. A. (1988). Microphotometric analysis of individual particle absorption spectra. *Limnol. Oceanogr.*, 33, 128-134.
- Jochimsen, E. M., Carmichael, W. W., An, J. S., Cardo, D. M., Cookson, S. T., Holmes, C. E., Antunes, M. B., de Melo Filho, D. A., Lyra, T. M., Barreto, V. S., Azevedo, S. M. & Jarvis, W. R. (1998). Liver failure and death after exposure to microcystins at a hemodialysis center in Brazil. *N. Engl. J. Med.*, 338, 873-878.
- Johnsen, G., Samset, O., Granskog, L. & Sakshaug, E. (1994). *In vivo* absorption characteristics in 10 classes of bloom-forming phytoplankton: taxonomic characteristics and responses to photoadaptation by means of discriminant and HPLC analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 105, 149-157.
- Johnsen, G., Prézelin, B. B. & Jovine, R. V. M. (1997). Fluorescence excitation spectra and light utilization in two red tide dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1166-1177.
- Jones, G. J. & Orr, P. T. (1994). Release and degradation of microcystin following algicide treatment of a *Microcystis aeruginosa* bloom in a recreational lake, as determined by HPLC and protein phosphatase inhibition assay. *Wat. Res.*, 28, 871-876.
- Jones, G. J. & Negri, A. P. (1997). Persistence and degradation of cyanobacterial paralytic shellfish poisons (PSPs) in freshwaters. *Wat Res*, 3, 525-533.
- Jungmann, D. & Benndorf, J. (1994). Toxicity to *Daphnia* of a compound extracted from laboratory and natural *Microcystis* spp. and the role of microcystins. *Freshwater Biol.*, 32, 13-20.
- Jüttner, F., Leonhardt, J. & Mohren, S. (1983). Environmental factors affecting the formation of mesityloxyde, dimethylallylic alcohol and other volatile compounds excreted by *Anabaena cylindrica*. *J. General Microbiol.*, 129, 407-412.
- Jüttner, F. (1995). Physiology and biochemistry of odorous compounds from freshwater cyanobacteria and algae. *Wat. Sci. Technol.*, 31, 69-78.
- Kenefick, S. L., Hruday, S. E., Prepas, E. E., Motkosky, N. & Peterson, H. G. (1993). Toxin release from *Microcystis aeruginosa* after chemical treatment. *Wat. Sci. Technol.*, 27, 433-440.
- Klemer, A. R., Cullen, J. J., Mageau, M. T., Hanson, K. M. & Sundell, R. A. (1996). Cyanobacterial buoyancy regulation: the paradoxical roles of carbon. *J. Phycol.*, 32, 47-53.
- Kölber, Z. S. & Falkowski, P. G. (1993). Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. *Limnol. Oceanogr.*, 38, 1646-1665.
- Kölber, Z. S., Prasil, O. & Falkowski, P. G. (1998). Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochim. Biophys. Acta*, 1367, 88-106.
- Kolbowski, J. & Schreiber, U. (1995). Computer-controlled phytoplankton analyser based on a 4-wavelengths PAM chlorophyll fluorometer. In P., Mathis (Ed.), *Photosynthesis: from Light to*

- Biosphere*, pp 825-828. Proceedings of the Xth International Photosynthesis Congress, Montpellier, France. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Konopka, A. (1989). Metalimnetic cyanobacteria in hard-water lakes: buoyancy regulation and physiological state. *Limnol. Oceanogr.*, 34, 1174-1184.
- Kraay, G. W., Zapata, M. & Veldhuis, M. J. W. (1992). Separation of chlorophylls  $c_1$ ,  $c_2$  and  $c_3$  of marine phytoplankton by reversed-phase- $C_{18}$ -high-performance liquid chromatography. *J. Phycol.*, 28, 708-712.
- Krause, G. H. & Weiss, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 313-349.
- Lam, A. K. Y., Prepas, E. E., Spink, D. & Hrudey, S. E. (1995). Chemical control of hepatotoxic phytoplankton blooms: implications for human health. *Wat. Res.*, 29, 1845-1854.
- Letelier, R. M., Bidigare, R. R., Hebel, D. V., Ondrisek, M., Winn, C. D. & Karl, D. M. (1993). Temporal variability of phytoplankton community structure based on pigment analysis. *Limnol. Oceanogr.*, 38, 1420-1437.
- Lewis, W. M. (1978). Dynamics and succession of the phytoplankton in a tropical lake: Lake Lanao, Philippines. *J. Ecol.*, 66, 849-880.
- Lippemeier, S., Hintze, R., Vanselow, K. H., Hartig, P. & Colijn, F. (2001). In-line recording of PAM fluorescence of phytoplankton cultures as a new tool for studying effects of fluctuating nutrient supply on photosynthesis. *Eur. J. Phycol.*, 36, 89-100.
- Lohrenz, S. E., Fahnenstiel, G. L., Kirkpatrick, G. J., Carroll, C. L. & Kelly, K. A. (1999). Microphotometric assessment of spectral absorption and its potential application for characterization of harmful algal species. *J. Phycol.*, 35, 1438-1446.
- Long, S. P., Humphries, S. & Falkowski, P. G. (1994). Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 45, 633-662.
- Lorenzen, C. J. (1966). A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.*, 13, 223-227.
- Lund, J. W. G., Kipling, G. & Le Cren, E. D. (1958). The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimations by counting. *Hydrobiologia*, 11, 143-170.
- Lutz, V. A., Sathyendranath, S., Head, E. J. & Li, W. K. W. (1998). Differences between *in vivo* absorption and fluorescence excitation spectra in natural samples of phytoplankton. *J. Phycol.*, 34, 214-227.
- Mackey, M. D., Mackey, D. J., Higgins, H. W. & Wright, S. W. (1996). CHEMTAX-a program for estimating class abundance from chemical markers: application to HPLC measurements of phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 144, 265-283.
- Mackey, D. J., Higgins, H. W., Mackey, M. D. & Holdsworth, D. (1998). Algal class abundances in the western equatorial Pacific: estimation from HPLC measurements of phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, 45, 1441-1468.

- Madaragia, I. & Joint, I. (1992). A comparative study of phytoplankton physiological indicators. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 158, 149-165.
- Mc Guire, M. J. & Gaston, J. M. (1988). Overview of technology for controlling off-flavours in drinking water. *Wat. Sci. Technol.*, 15, 221-228.
- Millie, D. F., Paerl, H. W. & Hurley, J. P. (1993). Microalgal pigment assessment using high-performance liquid chromatography: a synopsis of organismal and ecological applications. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50, 2513-2527.
- Millie, D. F., Schofield, O. M. E., Kirkpatrick, G. J., Johnsen, G., Tester, P. A. & Vinyard, B. T. (1997). Phytoplankton pigments and absorption spectra as potential 'Biomarkers' for harmful algal blooms: a case study of the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 1240-1251.
- Millie, D. F., Kirkpatrick, G. J., Schofield, O. M. E., Johnsen, G. & Evens, T. J. (2001). Using absorbance and fluorescence spectra to discriminate microalgal phylogenetic groups and taxa. *J. Phycol.*, 37, 35-35.
- Mitchell, B. G. & Kiefer, D. A. (1988). Chlorophyll a specific absorption and fluorescence excitation spectra for light-limited phytoplankton. *Deep-Sea Res.*, 35, 639-663.
- Mouchet, P. & Pourriot, R. (1992). Evolution de la qualité de l'eau dans les réseaux de distribution. 6: pénétration et développement de microinvertébrés dans les réseaux de distribution d'eau potable. *TSM\_L'eau*, 87, 353-368.
- Mouchet, P. (1997) Problem algae and algae problems. Advanced training course for laboratory specialists in Malaysia in *An introduction to freshwater algae and the related problems: algal removal, tastes and odours, toxins*, Suez-Lyonnaise des Eaux, France.
- Mouchet, P. & Bonnelye, V. (1998). Solving algae problems: french expertise and world-wide applications. *J. Water SRT\_Aqua*, 47, 125-141.
- Naes, H., Aarnes, H., Utliken, H., Nilsen, S. & Skulberg, O. M. (1985). Effect of photon fluence rate and specific growth rate on geosmin production of the cyanobacterium *Oscillatoria brevis* (Kuntz) Gom. *Appl. Environ. Microbiol.*, 20, 125-131.
- Naes, H., Utkilen, H. C. & Post, A. F. (1989). Geosmin production in the cyanobacterium *Oscillatoria brevis*. *Arch. Microbiol.*, 151, 407-410.
- Nichols, H. W. & Bold, H. C. (1965). *Trichosarcina polymorpha* gen. et sp. nov. *J. Phycol.*, 1, 34-38.
- Nicholson, B. C., Rositano, J. & Burch, M. D. (1994). Destruction of cyanobacterial peptide hepatotoxins by chlorine and chloramines. *Wat. Res.*, 28, 1297-1303.
- Oldham, P. B., Zlioux, E. J. & Warner, I. M. (1985). Spectral finger-printing of phytoplankton populations by two dimensional fluorescence and Fourier-transform-based pattern recognition. *J. Mar Res*, 43, 893-906.
- Oliver, R. L. & Ganf, G. G. (2000). Freshwater blooms. In *The Ecology of Cyanobacteria*, Whitton, B. A. & Potts, M. (Ed.), pp 149-194, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Olson, R. J., Zettler, E. R. & Anderson, O. K. (1989). Discrimination of eukaryotic phytoplankton cell types from light scatter and autofluorescence properties measured by flow cytometry. *Cytometry*, 10, 636-643.
- Otuska, S., Suda, S., Li, R., Watanabe, M., Oyaizu, H., Matsumoto, S. & Watanabe, M. M. (1998). 16S rDNA sequences and phylogenetic analyses of *Microcystis* strains with and without phycoerythrin. *FEMS Microbiol. Lett.*, 164, 119-124.
- Paerl, H. W. & Ustach, J. F. (1982). Blue-green algal scums: an explanation for their occurrence during freshwater blooms. *Limnol. Oceanogr.*, 27, 212-217.
- Paerl, H. W. (1996). A comparison of cyanobacterial bloom dynamics in freshwater, estuarine and marine environments. *Phycologia*, 35, 25-35.
- Paerl, H. W. & Millie, D. F. (1996). Physiological ecology of toxic aquatic cyanobacteria. *Phycologia*, 35, 160-167.
- Partensky, F., Blanchot, J., Lantoiné, F., Neveux, J. & Marie, D. (1996). Vertical structure of picoplankton at different trophic sites of the tropical northeastern Atlantic Ocean. *Deep-Sea Res.*, 43, 1191-1213.
- Persson, P.-E. (1995). 19th century and early 20th century studies on aquatic off-flavours-A historical review. *Wat. Sci. Technol.*, 31, 9-13.
- Persson, P.-E. (1996). Cyanobacteria and off-flavours. *Phycologia*, 35, 168-171.
- Peterson, H. G., Hruđey, S. E., Cantin, I. A., Perley, T. R. & Kenefick, S. L. (1995). Physiological toxicity, cell membrane damage and the release of dissolved organic carbon and geosmin by *Aphanizomenon flos-aquae* after exposure to water treatment chemicals. *Wat. Res.*, 29, 1515-1523.
- Pilotto, L. S., Douglas, R. M., Burch, M. D., Cameron, S., Beers, M., Rouch, G. J., Robinson, P., Kirk, M., Cowie, C. T., Hardiman, S., Moore, C. & Attewell, R. G. (1997). Health effects of exposure to cyanobacteria (blue-green algae) during recreational water-related activities. *Aust. N. Z. J. Public Health*, 21, 562-566.
- Platt, T. & Conover, R. J. (1971). Variability and its effect on the 24 hour chlorophyll budget of a small marine basin. *Mar. Biol.*, 10, 52-65.
- Pouria, S., De Andrade, A., Barbosa, J., Cavalcanti, R. L., Barreto, V. S. T., Ward, C. J., Preiser, W., Poon, G. K., Neild, G. H. & Codd, G. A. (1998). Fatal microcystin intoxication in haemodialysis unit in Caruaru, Brazil. *Lancet*, 352, 21-26.
- Prescott, G. W. (1978). *How to know the freshwater algae?*, 3 Ed., Wm. C. Brown Company.
- Pryvkina, L., Babichenko, S., Kaital, S., Kuose, H. & Shalapjonok (1994). Spectral fluorescence signatures in the characterisation of phytoplankton community composition. *J. Plankton Res.*, 16, 1315-1327.
- Rashash, D. M. C. & Gallagher, D. L. (1995). An evaluation of algae enumeration. *J. AWWA*, 87, 127-132.
- Reynolds, C. S. & Walsby, A. E. (1975). Water-blooms. *Biol. Rev.*, 50, 437-481.

- Reynolds, C. S. (1984). Phytoplankton periodicity: the interactions of form, function and environmental variability. *Freshwater Biol.*, 14, 111-142.
- Reynolds, C. S. (1990). Temporal scales of variability in pelagic environments and the response of phytoplankton. *Freshwater Biol.*, 23, 25-53.
- Reynolds, C. S. (1994). *The Ecology of Freshwater Phytoplankton*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Roy, S. (1988). Effects of changes in physiological conditions on HPLC-defined chloropigment composition of *Phaeodactylum tricoratum* (Bohlin) in batch and turbidostat cultures. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 118, 137-149.
- Sathyendranath, S., Lazzara, L. & Prieur, L. (1987). Variations in the spectral values of specific absorption of phytoplankton. *Limnol. Oceanogr.*, 32, 403-415.
- Scheffer, M., Rinaldi, S., Gragnani, A., Mur, L. R. & van Nes, E. H. (1997). On the dominance of filamentous cyanobacteria in shallow, turbid lakes. *Ecology*, 78, 272-282.
- Schmid, H., Bauer, F. & Stich, H. (1998). determination of algal biomass with HPLC pigment analysis from lakes of different trophic states in comparison to microscopically measured biomass. *J. Plankton Res.*, 20, 1651-1661.
- Schofield, O. M. E., Grzymiski, J., Bissett, P. W., Kirkpatrick, G. J., Millie, D. F., Moline, M. & Roesler, C. S. (1999). Optical monitoring and forecasting systems for harmful algal blooms: possibility or pipe dream? *J. Phycol.*, 35, 1477-1496.
- Schreiber, U., Neubauer, C. & Schliwa, U. (1993). PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: a highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research. *Photosynt. Res.*, 36, 65-72.
- Schreiber, U. (1994). New emitter-detector-cuvette assembly for measuring modulated chlorophyll fluorescence of highly diluted suspensions in conjunction with the standard PAM fluorometer. *Z Naturforsch*, 49, 646-656.
- Schreiber, U. (1998). Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications. In G., Garab (Ed.), *Photosynthesis: mechanisms and effects*, pp 4253-4258. Proceedings of the XIth International Photosynthesis Congress, Budapest, Hungary, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Seppala, J. & Balode, M. (1997). The use of spectral fluorescence methods to detect changes in the phytoplankton community. *J. Appl. Phycol.*, 363, 207-217.
- Shapiro, J. (1997). The role of carbon dioxide in the initiation and maintenance of blue-green dominance in lakes. *Freshwater Biol.*, 37, 307-323.
- Sidler, W. A. (1994). Phycobilisome and phycobiliprotein structures. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria*, D. A. Bryant (Ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Sivonen, K., Niemela, S. I., Niemi, R. M., Lepisto, L., Luoma, T. H. & Rasanen, L. A. (1990). Toxic cyanobacteria (blue-green algae) in Finnish fresh and coastal waters. *Hydrobiologia*, 190, 267-275.

- Sivonen, K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35, 12-24.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M. & Cohen-Bazire., G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.*, 35, 171-205.
- Steffensen, D. A., Nicholson, B. C., Burch, M. D., Drickas, M. & Baker, P. D. (1997 Sept./Oct.). Blue-green algae and drinking water quality. *Wat. Qual. Res.*, 19-24.
- Steinberg, C. E. W. & Hartmann, H. M. (1988). Planktonic bloom-forming cyanobacteria and the eutrophication of lakes and rivers. *Freshwater Biol.*, 20, 279-287.
- Stephens, F. C. (1995). Variability of spectral absorption efficiency within living cells of *Pyrocystis lunula* (Dinophyta). *Mar. Biol.*, 122, 325-331.
- Talling, J. F. (1987). The phytoplankton of Lake Victoria (East Africa). *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, 25, 229-256.
- Thar, R., Kuhl, M. & Gerhard, H. (2001). Fiber-optic fluorometer for microscale mapping of photosynthetic pigments in microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67, 2823-2828.
- Tillett, H. E. (1993). Potential inaccuracy of microbiological counts from routine water samples. *Wat. Sci. Technol.*, 27, 15-18.
- Utliken, H. & Gjølme, N. (1992). Toxin production by *Mycrocystis aeruginosa* as a function of light in continuous cultures and its ecological significance. *Appl. Environ. Microbiol.*
- van der Ploeg, M., Dennis, M. E. & de Regt, M. Q. (1995). Ecophysiology of *Oscillatoria cf. chalybea*, a 2-methylisoborneol producing blue-green alga of Mississippi catfish ponds. *Wat. Sci. Technol.*, 31, 173-180.
- Vaulot, D., Marie, D., Olson, R. J. & Chisolm, S. W. (1995). Growth of *Prochlorococcus* sp., a photosynthetic prokaryote, in the equatorial Pacific Ocean. *Science*, 268, 1480-1482.
- Viner, A. B. & Smith, I. R. (1973). Geographical, historical and physical aspects of Lake George. *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 184, 235-270.
- Walsby, A. E., Utkilen, H. C. & Johnsen, I. J. (1983). Buoyancy changes of a red coloured *Oscillatoria agardhii* in Lake Gjersjoen, Norway. *Arch. Hydrobiol.*, 90, 1-25.
- Walsby, A. E. (1994). Gas vesicles. *Microbiol. Rev.*, 58, 94-144.
- Walsby, A. E., Hayes, P. K., Boje, R. & Stal, L. J. (1997). The selective advantage of buoyancy provided by gas vesicles for planktonic cyanobacteria in the Baltic Sea. *New Phytol.*, 136, 407-417.
- Weisse, T. (1993). Dynamics of autotrophic picoplankton in marine and freshwater ecosystems. *Adv. Microbiol. Ecol.*, 13, 327-370.
- Wilhelm, C. & Manns, L. (1991). Changes in pigmentation phytoplankton species during growth and stationary phase-consequences for reliability of pigment-based methods of biomass determination. *J. Appl. Phycol.*, 3, 305-310.
- Wilhelm, C., Rudolph, I. & Renner, W. (1991). A quantitative method based on HPLC-aided pigment analysis to monitor structure and dynamics of the phytoplankton assemblage-A study from Meerfelder Maar (Eifel, Germany). *Arch. Hydrobiol.*, 123, 21-35.

- Wilhelm, C., Volkmar, P., Lohmann, C., Becker, A. & Meyer, M. (1995). The HPLC-aided pigment analysis of phytoplankton cells as a powerful tool in water quality control. *J. Water SRT\_Aqua*, 44, 132-141.
- Wilhelm, C. & Lohmann, C. (1997). Recent progress in the identification and determination of freshwater phytoplankton in the natural environment. *Micro. Qual.*, 81-91.
- Wright, C. W. (1996). NASA's airborne oceanographic lidar: a two excitation frequency laser fluorosensor. <http://aol11.wff.nasa.gov/fl95/siar96/siar-fl.htm>.
- Yacobi, Y. Z., Gerhardt, V., Gonen Zurgil, Y. & Sukenik, A. (1998). Delayed fluorescence excitation spectroscopy: A rapid method for qualitative and quantitative assessment of natural population of phytoplankton. *Wat. Res.*, 32, 2577-2582.
- Yentsch, C. M. & Menzel, D. W. (1963). A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence. *Deep-Sea Res.*, 10, 221-231.
- Yentsch, C. S. & Yentsch, C. M. (1979). Fluorescence spectra signatures: the characterisation of phytoplankton populations by the use of excitation and emission spectra. *J. Mar. Res.*, 37, 471-483.
- Yentsch, C. S. & Phinney, D. A. (1985). Spectral fluorescence: an ataxonomic tool for studying the structure of phytoplankton populations. *J. Plankton Res.*, 7, 617-632.
- Yu, S. Z. (1995). Primary prevention of hepatocellular carcinoma. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 10, 674-682.
- Zohary, T. & Pais-Madeira, A. M. (1990). Structural, physical and chemical characteristics of *Microcystis aeruginosa* hyperscums from a hypertrophic lake. *Freshwater Biol.*, 23, 339-352.

\*\*\*\*\*



# *Article 6*



## **Quantitative and qualitative evaluation of phytoplanktonic populations by trichromatic fluorescence excitation with special focus on cyanobacteria.**

J. Lavaud,<sup>1</sup> G. Parésys,<sup>1</sup> C. Rigart,<sup>1</sup> B. Rousseau,<sup>1</sup> A. W. M. Wong,<sup>2</sup> F. Fan,<sup>3</sup> J.-P. Barbier<sup>4</sup> and A.-L. Etienne<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratoire 'Organismes Photosynthétiques et Environnement', UMR CNRS/ENS 8543, Ecole Normale Supérieure, 46 rue d'Ulm, 75230 Paris Cedex 05, France.

<sup>2</sup>Sg Layang Water Treatment Plant Laboratory, PO Box 20, 81760 Masai, Johor, Malaysia.

<sup>3</sup>Laboratory and Research Center, Macao Water Supply Co. LTD, 82 Avenida do Conselheiro Borja, PO Box 115, Macao, China.

<sup>4</sup>ONDEO Services, Direction Technique Recherche, 18 Square Edouard VII, 75316 Paris Cedex 09, France.

### **Abstract**

The occurrence of phytoplankton proliferations (blooms) is a major concern for water treatment. In sub-tropical and tropical latitudes, blooms are unpredictable and can occur all year round. A continuous monitoring system is necessary. The results presented in this paper were obtained with a newly developed sensor (ENS sensor) based on trichromatic excitation of chlorophyll fluorescence to detect, in freshwater reservoirs, the growth of phytoplankton biomass and to identify the group responsible of the bloom (among cyanobacteria, green algae and diatoms). Two sets of data are presented. One concerning laboratory experiments on known samples. The results were used for testing and refining the method. The other set of data corresponds to water reservoirs in South East Asia where the composition of the phytoplankton, its biomass and physiological status are all unknown. A method to assess the physiology of the phytoplankton was established and a "vitality index" defined. The ENS sensor is a sensitive device with large dynamics able to detect low chlorophyll concentrations down to 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  and to discriminate between different groups even in conditions where one is dominant. Its superiority comes from its capacity to distinguish between two types of cyanobacteria, to consider their physiological status in order to improve their evaluation and to detect colonies. Such properties are essential in the monitoring of toxic cyanobacteria. By combining the information about the mixed population and respective "vitality index", a predictive power of bloom was shown to be possible. Its usefulness in monitoring changing populations of phytoplankton has been proven.

## Introduction

The eutrophication in natural lakes, man-made reservoirs, and even in rivers, is a source of major concern for the water treatment in terms of water-quality. These worries fall into two categories. First, the algal biomass itself which give rise to a number of water treatment problems as accelerated clogging of filters or production of organic matter for biofilms or microinvertebrates which colonise the distribution system. Then, the routine processes become often ineffective and special technologies have to be used (24). Second, undesirable metabolites can be released into the water among which three groups of substances derived from the activity of cyanobacteria that can product tastes, odours (26) and toxins (8). Cyanotoxins have become a source of increasing awareness in the recent years for drinking-water reservoirs and recreational waters quality since they can be a source of human health hazards (For recent reviews see (7, 12). In the presence of toxic cyanobacteria, the processes for water treatment have also to be adapted (16, 24).

Generally, phytoplankton proliferations, also called “blooms”, are prevented by addition of algicides ( $\text{CuSO}_4$ ). For total efficiency and also to avoid massive spreading of chemicals, the increase of the phytoplankton has to be detected early enough. Moreover, treatments for toxins removal may not be sufficient during bloom situations (16). In temperate areas, blooms are approximately seasonal: diatoms in early spring, followed by green algae, cyanobacteria in summer and sometimes diatoms at new in late summer-early autumn depending on environmental conditions (25). In sub-tropical and tropical latitudes, blooms can occur all year around and are often unpredictable (25). Therefore, because of rapid cell division, a network of continuous monitoring-system has to be used. As the biomass of phytoplankton, usually expressed as chlorophyll *a* (Chl *a*) concentration, can vary from less than  $1 \mu\text{g Chl } a \cdot \text{L}^{-1}$  to more than  $2 \text{ mg Chl } a \cdot \text{L}^{-1}$  during a bloom, a sensitive procedure is needed to detect a bloom in an early stage.

Several methods were developed to evaluate the phytoplanktonic biomass. Chl *a* is a representative parameter of the phytoplanktonic biomass and has been often measured *in vivo* via fluorescence emission since the early work of Lorenzen (22). Chl *a* fluorescence became an increasingly important tool for the assessment of biomass and basic parameters of photosynthetic activity of the phytoplankton *in situ* (14). Very sensitive techniques which measure “actively stimulated” fluorescence were developed: Pulse Amplified Modulated (PAM) (31), fast repetition rate (18), and pump-and-probe methods (17).

These instruments have been successfully used in oceanography, even in oligotrophic areas, for the monitoring of the phytoplankton (13) but their use is limited by the fact that they

cannot discriminate between the groups of phytoplanktonic organisms (mainly green algae, diatoms and cyanobacteria). This distinction can be made by cell counting and identification based on microscopic method but with potential inaccuracies in cell enumeration (27, 34). Photosynthetic pigments are also used as markers of the main taxonomic groups. High performance liquid chromatography (HPLC) has been applied in field studies with varying degrees of success ((11) and citations within). Optical methods were also developed based on the differences in morphologies and/or pigment contents of phytoplanktonic groups (see (9) and (28) for reviews on optical detection and assessment of algal blooms).

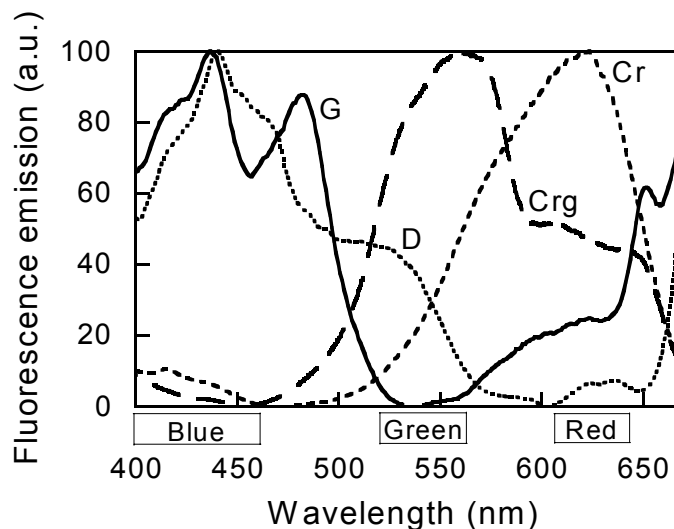
Fluorescence techniques have been developed more recently to allow discrimination between phytoplanktonic taxonomic groups. With the progress in Light Emitting Diodes (LEDs) optics, Schreiber and co-workers demonstrated the feasibility of such system by modifying the PAM method (29, 30). The pump-and-probe method was also modified with the same goal (5). Microscale fluorescence measurements with a fiber-optic fluorometer was also performed allowing discrimination between different groups in biofilms microbial communities (33). These systems are based on the discrimination of “spectral groups” of the phytoplankton. Groups of organisms have different accessory pigments which absorb light efficiently in different spectral regions of the visible light spectrum. They transfer the excitation energy to Chl *a*, the terminal acceptor of the light harvesting system, which emits fluorescence (For reviews on chlorophyll fluorescence emission see (19, 23)). By use of different excitation wavelengths induced by LEDs of different colours, an evaluation of the systematic composition of the population can be obtained.

We have developed the same approach aiming at different goals. The results presented in this paper were obtained with a new automated apparatus (called the ENS sensor) to be used especially in freshwater areas as a monitoring system to detect in real time the growth of phytoplankton biomass and to identify the group responsible for this bloom. The system is based on trichromatic excitation of chlorophyll fluorescence. Only three blue, green and red light excitations are used to differentiate four main groups including green algae, diatoms and two spectral groups of cyanobacteria. Special interest was focus on cyanobacteria evaluation and physiological status of phytoplankton, that is potentiality for a bloom. The system has been tested in tropical reservoirs in Masai (Malaysia) and in Macao (China) in collaboration with local research laboratories in the water quality field.

## Results and discussion

*Description of the modelling used for the phytoplanktonic biomass evaluation and for the identification of algae and cyanobacteria.*

The work presented in this report is based on the measurement and interpretation of chlorophyll fluorescence emission by a phytoplanktonic population of unknown composition excited with lights of different wavelengths and intensities. As already said in the introduction, phytoplanktonic organisms can be classified in spectral groups due to their different composition in photosynthetic pigments. While green algae are rich in chlorophylls (*a* and *b*), diatoms and cyanobacteria have specific accessory pigments which contribute to the excitation of Chl *a*. Fucoxanthin in diatoms absorbs in the green range. Cyanobacteria have phycobilins of two types: phycocyanin present in all strains absorbs in the red range, phycoerythrin when present absorbs in the green range. We defined two types of cyanobacteria: the first type will be called cyanobacteria “red” (or Cr), and the second cyanobacteria “red+green” (or Crg). The fluorescence excitation spectra of the four types of organisms shown in Fig. 1 clearly illustrate the fact that the contribution of the different groups to fluorescence emission is wavelength dependant.



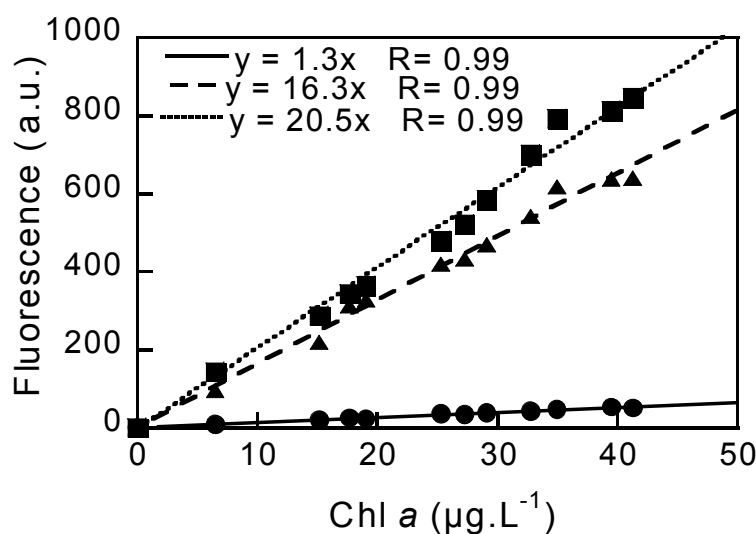
**Fig. 1.** Room temperature 680 nm fluorescence excitation spectra of a green alga (G) (*Chlorella* sp.), a diatom (D) (*Phaeodactylum* sp.), a cyanobacterium “red” (Cr) (*Synechococcus* sp.) and a cyanobacterium “red+green” (Crg) (*Pseudoanabaena* sp.). The ranges of blue, green and red excitation light used in the ENS sensor are shown as rectangles below the spectra.

Fluorescence emission intensity mainly depends on Chl *a* concentration (this is the assumption used by commercial instruments such as Datalink and Turner fluorometers). As it is complementary to the photochemical activity, the fluorescence emission is also dependent

on the incident light intensity (19). Under weak light and for dark-adapted organisms, there is a basic low fluorescence level ( $F_0$ ); under strong light, fluorescence varies from  $F_0$  to a maximum ( $F_m$ ). However, the physiological status of the cells which varies with environmental stresses also influences the fluorescence emission levels (19).

$F_0$  is less susceptible than  $F_m$  to variations due to environmental stresses and is therefore the most reliable base for the evaluation of Chl *a* concentration. Hence, it was chosen as the basis of our mathematical model. It was measured with accuracy at the three different wavelengths utilised during our experiments. The best conditions (compromise between the intensity and duration of illumination, and reliable signal-to-noise ratio) for the ENS sensor are detailed in the Methods section. They have been used in all experiments.

The  $F_0$  intensity was measured under three excitation wavelengths of blue ( $430 \pm 30$  nm), green ( $540 \pm 15$  nm) and “red” ( $625 \pm 20$  nm) for the four reference organisms chosen (*Synechococcus* sp. and *Pseudoanabaena* sp. for cyanobacteria, *Chlorella* sp. for green algae, *Phaeodactylum* sp. for diatoms) and for each excitation light. These intensities were measured as a function of the Chl *a* concentration (measured by HPLC) with pure cultures of algae in the exponential phase of growth. Results obtained with a cyanobacterium are presented as an example in Fig. 2 where the  $F_0$  intensity was plotted versus the Chl *a* concentration. The slope of the linear relationship between these two parameters was the proportionality factor between fluorescence emission and Chl *a* concentration at a given low light irradiance. They were determined for each alga under each light excitation as shown in Table 1.



**Fig. 2.** Fluorescence emission intensity (in arbitrary units) under low light excitation as a function of the Chl *a* concentration (in  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for a cyanobacterium “red+green” (*Pseudoanabaena* sp.). The slopes of the linear fits correspond to the proportionality factors under blue (●), green (▲) and red light (■) listed in Table 1.

**Table 1. Proportionality factors between fluorescence emission under low light excitation and Chl *a* concentration of the four reference organisms <sup>a</sup>**

	Fb	Fg	Fr
Green alga (G)	1.7	0.6	1.9
Diatom (D)	5.9	7.8	4.9
Cyanobacterium “Red” (Cr) <sup>b</sup>	0.7	2.3	16.5
Cyanobacterium “Red+Green” (Crg)	1.3	16.3	20.5

<sup>a</sup>The parameters are labelled as F for proportionality factor ; b, g or r for blue, green and red lights respectively ; and G, D, C for green alga (*Chlorella* sp.), diatom (*Phaeodactylum* sp.) and cyanobacteria.

<sup>b</sup>For cyanobacteria, two types were distinguished : Cyanobacterium “red”, Cr (*Synechococcus* sp.) which absorbs preferentially in the red range (absence of the phycoerythrin pigment) and Cyanobacterium “red+green”, Crg (*Pseudoanabaena* sp.) which additionally absorbs in the green range (presence of the phycoerythrin pigment).

The mathematical model on which the evaluation was based was a set of three equations :

$$Fb = (FbG \times G) + (FbD \times D) + (FbC \times C) \quad (\text{Equation 1})$$

$$Fg = (FgG \times G) + (FgD \times D) + (FgC \times C)$$

$$Fr = (FrG \times G) + (FrD \times D) + (FrC \times C)$$

FbG,etc are the proportionality factors of Table 1. The three values G, D and C are the concentrations (in  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$ ) of green algae, diatoms and cyanobacteria (“red” or “red+green” type) deduced from the measurement of the fluorescence levels Fb, Fg and Fr with blue, green and red low light excitations respectively. The sum  $G + D + C$  was the total Chl *a* concentration.

#### *Validity of a reference organism for the determination of the proportionality factors for green algae and diatoms.*

The validity of a reference organism for the determination of the proportionality factors was tested for green algae and diatoms. The values obtained for *Chlorella* sp. were compared to that of three other laboratory grown green algae genus frequently identified in freshwater reservoirs: *Scenedesmus* sp., *Ankistrodesmus* sp. and *Monoraphidium* sp. (Table 2). The proportionality factors of the four green algae are very similar. This was also tested in fields experiments on several reservoirs where the phytoplanktonic population was dominated by a constantly changing genus over the monitored period without any impact on the evaluation procedure. The same comparison was done with four genus of diatoms. As we only have a freshwater strain (*Phaeodactylum tricornutum*), we compared it with the seawater

strain of the same species and with two other marine diatoms (Table 3). Again proportionality factors of the different genus are very similar. Hence, it validates the use of proportionality factors of one reference organism for the model concerning green algae and diatoms.

**Table 2. Proportionality factors between fluorescence emission under low light excitation and Chl *a* concentration of four genus of green algae<sup>a</sup>**

	FbG	FgG	FrG
<i>Chlorella</i> sp.	1.7	0.6	1.9
<i>Scenedesmus</i> sp.	1.6	0.6	1.5
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	1.7	0.5	1.8
<i>Monoraphidium</i> sp.	1.9	0.5	1.9

<sup>a</sup>The parameters are labelled as F for proportionality factor ; b, v and r for blue, green and red lights respectively and G for green alga.

**Table 3. Proportionality factors between fluorescence emission under low light excitation and Chl *a* concentration of three genus of diatoms<sup>a</sup>**

	FbD	FgD	FrD
<i>Phaeodactylum</i> sp. freshwater strain	5.9	7.8	4.9
<i>Phaeodactylum</i> sp. seawater strain	6.2	7.4	4.7
<i>Cylindrotheca</i> sp.	5.6	7	4.8
<i>Thalassiosira</i> sp.	5.6	7.4	4.9

<sup>a</sup>The parameters are labelled as F for proportionality factor ; b, v and r for blue, green and red lights respectively and D for diatoms.

#### *Discrimination between two spectral groups of cyanobacteria.*

Unlike for green algae and diatoms, one set of fluorescence yields cannot be considered as representative of all cyanobacteria. As already said we distinguished between two spectral groups of cyanobacteria so called “red” and “red+green” cyanobacteria. It is of importance since when cyanobacteria “red+green” were present in the water sample, they were mistaken as diatoms (which also contribute to the fluorescence emission in the green range) because of their high fluorescence emission under green light excitation (Fig. 1, Table 1).

After several trials, an optimisation of the identification procedure was chosen and described as follow:



Step 1- As the presence of cyanobacteria was always correlated with a high fluorescence emission under red light excitation (Table 1), cyanobacteria could be unequivocally detected even at low concentrations. If cyanobacteria were not the dominant group, whatever the proportionality factors used (FCr or FCrg), the model gave equivalent results. The threshold for having to discriminate between the two groups was arbitrarily fixed at 20 % C in a mixed population.

Step 2- The distinction between the two types of cyanobacteria was based on the Fr/Fg ratio (Table 4, “actives” cyanobacteria lines). The fit was refined with cyanobacteria “red+green” factors when Fr/Fg was below 5.

The Fr/Fg ratio was chosen because Fr did not vary and Fg was multiplied by up to 7 in “red+green” type. Fb was discarded because of its low level. The threshold was fixed at 5 by reference to a strain of cyanobacteria “red” (*Anabaena* sp.) which Fr/Fg ratio was 5.5.

**Table 4. Proportionality factors between fluorescence emission under low light excitation and Chl *a* concentration of cyanobacteria “red” and “red+green”, “active” or “inactive”<sup>a</sup>**

	FbCr	FgCr	FrCr	Fr/Fg <sup>b</sup>
	or	or	or	
	FbCrg	FgCrg	FrCrg	
Cyanobacterium “red” “active”	0.7	2.3	16.4	7.1
Cyanobacterium “red” “inactive”	0.6	2.0	26.0	13.0
Cyanobacterium “red+green” “active”	1.3	16.3	20.5	1.3
Cyanobacterium “red+green” “inactive”	2.0	27.5	60.4	2.2

<sup>a</sup> The parameters are labelled as F for proportionality factor ; b, v and r for blue, green and red light respectively and Cr for cyanobacterium “red”, Crg for cyanobacterium “red+green”.

<sup>b</sup> The ratio Fr/Fg values used during the cyanobacteria evaluation procedure are indicated.

#### *Accuracy of the phytoplanktonic biomass evaluation and of the identification of algae and cyanobacteria.*

In order to test the sensitivity of the apparatus and of the model, the identification of spectral groups was determined on mixtures of known composition and Chl *a* concentration from laboratory cultures in exponential phase of growth. Results were compared to HPLC analyses. The data listed in Table 5 show that the ENS sensor was able to detect a small fraction of each of the three groups against a major proportion of one of the other groups. The biomass evaluation through the Chl *a* concentration was satisfactory. Hence, accuracy of the

results obtained with the ENS sensor were as good as HPLC determination but the data acquisition easier and faster.

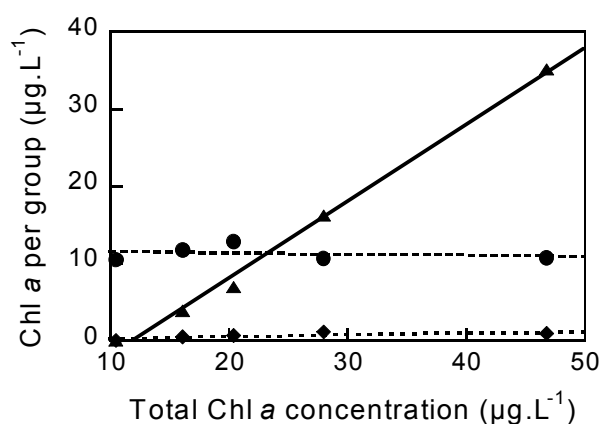
**Table 5. Chl *a* concentration and % of green algae, diatoms and cyanobacteria “red” of mixed suspensions with different proportions<sup>a</sup>**

	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g. L}^{-1}$ )	% G	% D	% Cr
Expected values	19.0	75	12.5	12.5
ENS sensor <sup>b</sup>	15.7 $\pm$ 0.2	65 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	16 $\pm$ 1
HPLC analysis	17.2	75	11	14
Expected values	20.3	12.5	75	12.5
ENS sensor	17.6 $\pm$ 0.9	23 $\pm$ 1	70 $\pm$ 2	7 $\pm$ 1
HPLC analysis	19.8	13	77	10
Expected values	18.1	12.5	12.5	75
ENS sensor	19.3 $\pm$ 0.3	9 $\pm$ 2	10 $\pm$ 2	81 $\pm$ 4
HPLC analysis	20.2	17	14	69

<sup>a</sup> The green algae, G (*Chlorella* sp.), the diatoms, D (*Phaeodactylum* sp.) and the cyanobacteria “red”, Cr (*Synechococcus* sp.) come from laboratory cultures in exponential phase of growth.

<sup>b</sup> ENS sensor data are mean of three values  $\pm$  SD.

It was also possible to monitor a simulated cyanobacterial bloom (Fig. 3). It was simulated by adding small amounts of cyanobacteria “red” to a sample containing green algae at a Chl *a* concentration of 10  $\mu\text{g. L}^{-1}$ . The increase in cyanobacteria proportion was perfectly detected whereas the signal due to green algae remained almost constant. Few diatoms (no more than 3 % of the total population) were detected erroneously.



**Fig. 3. Simulation of cyanobacterial bloom as detected by the ENS sensor. Small amounts of cyanobacteria “red” (▲) (*Synechococcus* sp.) were added to a sample containing green algae (●) (*Chlorella* sp.) at a constant Chl *a* concentration of 10  $\mu\text{g. L}^{-1}$ . Few diatoms (◆) were detected erroneously.**

*Evaluation of the global “vitality index” of the phytoplanktonic population.*

When organisms reach their stationary phase of growth (after an active growth during their exponential phase),  $F_m$  is usually lowered due to a decreased photochemical activity. Then, the difference between  $F_m$  and  $F_o$ , that is variable part of the fluorescence emission ( $F_v$ ), is lowered (see (20) and citations within). For some years, the ratio  $F_v/F_m$  has been taken as an indicator of the physiological status or cell “vitality” (19). For green algae and diatoms, values of  $0.70 \pm 0.05$  were found in the exponential phase of growth as already found (13), while  $0.50 \pm 0.05$  were values obtained in the stationary phase. Based on these observations,  $F_v/F_m$  was measured and defined as the “vitality index” for a given phytoplanktonic population. For green algae and diatoms, we considered that a  $F_v/F_m \geq 0.65$  is indicative of an active phase of growth (vitality index: +) while  $F_v/F_m \leq 0.5$  (vitality index: -), is indicative of a stationary phase of growth, and between these two values, the “vitality index” is +/- . For cyanobacteria “active” cells,  $F_v/F_m$  varied from 0.75 to 0.5 as previously described (6). Then, when cyanobacteria were not a negligible part of the population (over 20 %) different thresholds have to be used for reliability of the “vitality index” determination. In this case, it was defined as follows: (+)when  $F_v/F_m \geq 0.5$  and (-) when  $F_v/F_m < 0.5$ . It will be shown in field experiments presented later in the text that this “vitality index” combined with the evaluation of the phytoplanktonic population can be tentatively used as a predictive factor of a bloom.

*Fluorescence emission variations linked to the physiological status of the organisms.*

The fluorescence yields were determined on laboratory cultures in the exponential phase of growth with a maximal photochemical activity. During or after a light stress in the aquatic environment, the fluorescence levels are lowered because of non-photochemical quenching due to photoinhibition or photoprotection mechanisms (14, 21). Because of these phenomena sampling of water around noon was avoided. Indeed, this is the period of the day where the alteration of the photochemical activity due to long periods of high light illumination is the most important (10) especially in tropical regions. Additionally, a preliminary dark incubation of 30 min before the experiment reduced most of the fluorescence quenching that could have been developed in spite of hour sampling precautions.

Nutrient limitation can also modify the physiological status of cells. This is particularly true for cyanobacteria in which the efficiency of energy transfer to Chl *a* varies with the physiological status. In “inactive” cells, because of partial disconnection of

phycobilins, a larger part of the absorbed light is dissipated through fluorescence (6). As a consequence, the proportionality factors  $F_r$  and/or  $F_g$  increased (Table 4). This has to be considered to correct the identification procedure which was optimised as follows after the step 2 described before:

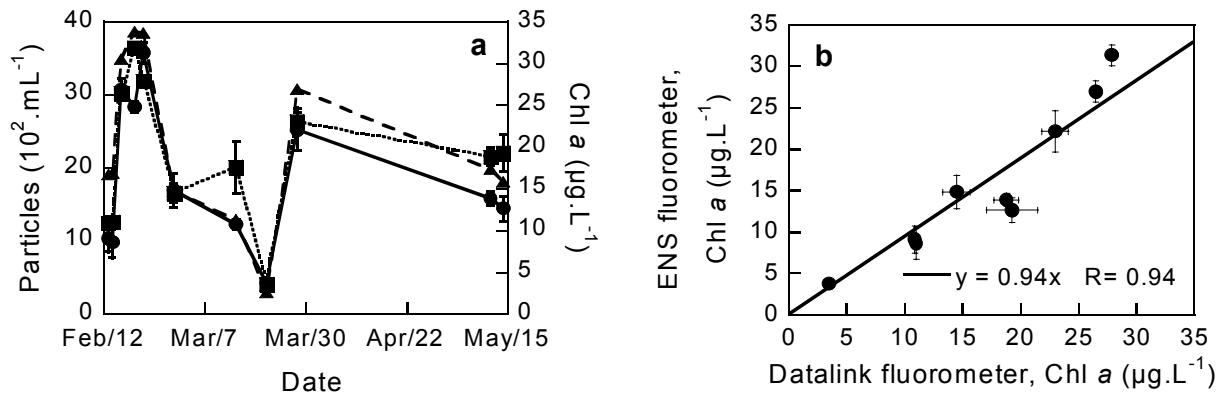
Step 3- The distinction between the “active” and “inactive” physiological status was evaluated by the  $F_r/F_g$  ratio. For cyanobacteria “red”, when  $F_r/F_g$  was over 9, they were “inactive” and new proportionality factors (Table 4) were used to refine the identification procedure. Cyanobacteria “red+green” were “inactive” when  $F_r/F_g$  was over 2. Although, the  $F_r/F_b$  ratios presented larger variations in laboratory grown cultures, we chose to base the evaluation of the physiological status of cyanobacteria on the ratio  $F_r/F_g$  because it proved to be more reliable than the  $F_r/F_b$  ratio in field experiments.

The distinction between “active” and “inactive” cells was also important for diatoms since “inactive” diatoms could be mistaken as green algae because of the decrease of the  $F_g/D$ . This is presumably due to modifications of their accessory pigments pool in “inactive” cells (2). This uncertainty was not fully solved as, in the field experiments we have done, diatoms were always the less abundant part of the population.

For green algae, we observed that the physiological status did not seem to influence proportionality factors in our measurement conditions.

#### *Field experiments.*

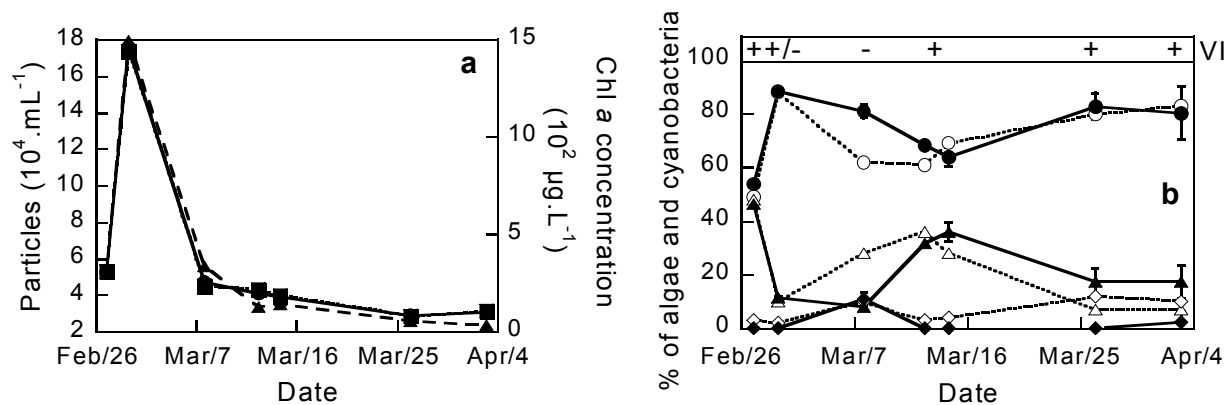
The performances of the ENS sensor and of the model were tested at different levels. The reliability of the evaluation of Chl *a* concentration in freshwater samples of three locations in China and Malaysia was tested in the 2 to 40  $\mu\text{g Chl } a.L^{-1}$  range. These locations were chosen as they showed similar composition in phytoplanktonic community with mostly green algae (more than 90 %). ENS sensor was used in parallel to Turner (10-AU Digital) and Datalink (FL 100) fluorometers which are widely used to determinate Chl *a* concentrations in oligotrophic waters. ENS sensor measurements were also compared to particle counting (PCX, Hach). An example of results obtained is shown in Fig. 4a. Panel b deals with the linear relationship between the Chl *a* concentration measured with the ENS sensor or the Datalink fluorometer. The agreement between the different apparatus was good. The ENS sensor is able to monitor accurately Chl *a* concentration down to 2  $\mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Fig. 4.** (a) Evolution of the particle number (per mL) ( $\blacktriangle$ ) and of the Chl *a* concentration (in  $\mu\text{g.L}^{-1}$ ) as measured by the ENS sensor ( $\bullet$ ) and the Datalink fluorometer ( $\blacksquare$ ) from 13/02/2001 to 14/05/2001 in the Upper Layang reservoir (Masai, Malaysia). (b) Relationship between the Chl *a* concentration measured with the ENS sensor and the Chl *a* concentration measured with the Datalink (FL 100) fluorometer.

A bloom with changes in the proportions of green algae and cyanobacteria was monitored on the Cahaya Bahru reservoir (Malaysia) over a month period (Fig. 5). Chl *a* concentration measurements by the ENS sensor were compared with Datalink measurements and particle counting. The ENS sensor identification of the phytoplanktonic groups was confronted to microscopic counting. Despite a low sampling frequency before and after the bloom period, these data show that the procedure for the identification of phytoplanktonic groups and especially cyanobacteria is valid. The “vitality index” clearly showed an evolution of the physiological status of the phytoplankton and was used as a crude indicator of a risk for a bloom. The monitoring began with a mixture of green algae and cyanobacteria with a strong “vitality index” (+). Then, green algae produced a bloom. It seems that the second point of sampling corresponds to the beginning of the decline of the green algae as the vitality index was (+/-). This decline is tentatively attributed to a nutrient shortage because of the large consumption of nutrients during the bloom and/or to zooplankton grazing (25). The “vitality index” further decreased to (-). This decreased was followed by a new increase for two weeks until a vitality index (+) was reached presumably because the end of the monitoring period corresponded to the starting of a new green algae bloom (see the corresponding increased in the Chl *a* concentration).

The dynamics of the three parameters (phytoplanktonic biomass, composition of the phytoplanktonic population and vitality) were well monitored by the ENS sensor. The identification procedure revealed that the cyanobacteria group was largely dominated by the genus *Microcystis* sp. well known to be responsible for freshwater blooms, to be a potential producer of toxins and to form colonies (8, 25).



**Fig. 5.** (a) Evolution of the particle number (per mL) ( $\blacktriangle$ ) and of the Chl *a* concentration (in  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) as measured by the ENS sensor ( $\bullet$ ) and the Datalink (FL 100) fluorometer ( $\blacksquare$ ) from 27/02/2001 to 03/04/2001 in the Cahaya Bahru reservoir (Masai, Malaysia). (b) % of green algae ( $\bullet$ ), cyanobacteria ( $\blacktriangle$ ) and diatoms ( $\blacklozenge$ ) as evaluated by the ENS sensor (close symbols) and the unit counting and identification (open symbols). VI : vitality index of phytoplankton.

## Conclusion

We have presented two sets of data. One concerns laboratory experiments where the phytoplanktonic composition of the water sample and the physiological status of algae and cyanobacteria were pre-determined. The results obtained have been used for testing and refining the fluorescence method: intensity and duration of the light beams, parameters to be used in the modelling, adjustment of the sensitivity to the total Chl *a* concentration, discrimination between two spectral groups of cyanobacteria and between two physiological status. The other set of data corresponds to water samples from freshwater reservoirs in China and Malaysia where the biomass of the phytoplankton, its taxonomic composition and physiological status were all unknown. A monitoring of a reservoir before during and after a bloom was also done over a month.

The sturdiness of the prototype was proven. It was shipped by plane and car between South East Asia and Paris with no consequences on the optical settings, sensitivity of the detector and reproducibility of the measurements.

The ENS sensor is a sensitive device with large dynamics. Although less costly than the commercially available devices, it is as good for an accurate determination of low phytoplanktonic biomass down to  $2 \mu\text{g Chl } a \cdot \text{L}^{-1}$ . It is able to discriminate between cyanobacteria, green algae and diatoms even in conditions when one group is dominant. It is also powerful to detect a change in biomass of one group which represents a small fraction of the total biomass. Its superiority comes from its capacity to discriminate between two spectral groups of cyanobacteria, to consider their physiological status in the identification procedure

and to detect colonial forms. Such properties are essential for reliability of the monitoring of cyanobacteria especially toxic genus.

The monitoring of the bloom was good and by combining the information about the phytoplanktonic population composition and the respective “vitality index”, a predictive power was shown to be possible. Further monitoring of different types of blooms will be necessary before validation of the predictive power.

### Acknowledgements

This work was supported by the Suez-ONDEO Services society.

We thank Pr J.-C. Duval for experimental assistance, helpful discussions and help for the writing of the manuscript, Dr Hans J. van Gorkom for useful comments on the manuscript, and all the technical staff in Malaysia and China laboratories which provided valuable technical assistance.

### Materials and methods

*Culture of algae and cyanobacteria reference species.*

*Phaeodactylum tricornutum* freshwater strain was grown photoautotrophically at 18°C in a modified Bristol medium with 2 mL of minor elements solution and soil extracts in batches of 300 mL, continuously flushed with sterile air and illuminated at 40  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  by white fluorescence tubes (36 W/133-D26 Claude, Blanc Industrie, Germany) in a 16 h light/8 h dark cycle. *Phaeodactylum tricornutum* seawater strain, *Cylindrotheca fusiformis* and *Thalassiosira weissflogii* cells were grown in a sterile natural seawater F/2 medium (15) in the same conditions. All diatoms strains came from the Provasoli-Guillard Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP), USA. *Chorella* sp., *Scenedesmus* sp., *Monoraphidium* sp. and *Ankistrodesmus* sp. cells were grown photoautotrophically at 27°C in a freshwater Bold Basal medium in 25 L tanks continuously flushed with air and illuminated at 25  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  with white fluorescence tubes (Cool daylight, Philips, France) with a 12 h light/12 h dark cycle. All green algae strains came from the University Technology Malaysia (UTM) collection, except *Ankistrodesmus* sp. which was isolated from a Masai reservoir. *Anabaena* sp. and *Pseudoanabaena* sp. cells were grown in the same conditions as green algae. The two strains come from the UTM collection. *Synechococcus* PCC 7942 cells were grown photoautotrophically at 30°C in a freshwater GN medium (32) in 1 L batches continuously flushed with sterile air and illuminated at 50  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  by white fluorescence tubes (TLD 36W/33, Philips, France) in continuous light. The strain comes from the Pasteur collection, France.

Cells were harvested either during the exponential phase or during the stationary phase of growth as precised in the text.

*Classical methods for phytoplanktonic organisms counting, Chl a concentration measurement and identification of algae and cyanobacteria.*

1) *Particle counting*: particle counting was performed with a factory calibrated Particle Counter (PCX Hach). Resolution was 1  $\mu\text{m}$ , maximum size, 500  $\mu\text{m}$  and maximum count, 17 000 count/mL. Each count was done on 500 mL at 100 mL.  $\text{min}^{-1}$ .

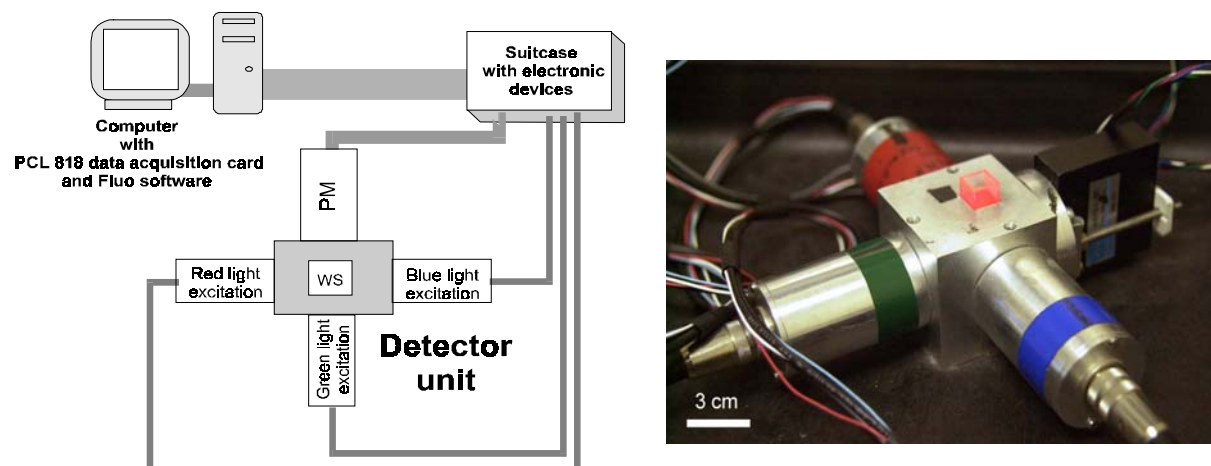
2) *Determination of Chl a concentration with Turner and Data Link fluorometers*: Chl *a* concentration measurements were done with a Turner fluorometer (Field fluorometer 10-AU Digital, Turner, USA) following the EPA method 445. All details about the Turner instrument and the method used are available at the Turner web-site (<http://www.turnerdesigns.com>). The Datalink fluorometer (FL 100, Datalink, France), was factory calibrated and calibration verified by spectrophotometer Chl *a* concentration measurement method. 200 mL of homogenised sample were used for each measurement. Details at the Datalink web-site <http://www.datalink-instruments.com>.

3) *Pigment analysis and algae identification by HPLC*: pigment analyses were performed by HPLC as previously described (2). Cells were frozen in liquid nitrogen and pigments were extracted with a 70 % methanol/30 % acetone (vol/vol) solution. The extinction coefficients used for Chl *a* were the same as in (4). The proportions of green algae, diatoms and cyanobacteria were determined following the matrix previously described (35).

4) *Identification and counting of algae and cyanobacteria*: algae and cyanobacteria were counted as units with a Malassez hemocytometer counting chamber as described (1). Identification was done using freshwater algae identification keys (1, 3).

#### *Description of the ENS sensor set-up and of the data processing.*

1) *ENS sensor prototype*: The system is made of three parts (Fig. 1a). **i)** a data acquisition card (PCL 818, Advantech) inserted in the computer. The maximum frequency of data acquisition is 100 kHz. **ii)** the electronic devices. **iii)** a detector unit (Fig. 1b), including a central sample compartment containing the water sample of unknown phytoplanktonic composition which can be illuminated on three of its sides by blue, red and green light emitting heads perpendicular to the sample compartment. The sample compartment is isolated from ambient light by a cap. On the fourth side of the compartment, fluorescence is detected by a miniature photomultiplier (PM) module (Hamamatsu H5701-50, together with high-voltage supply and amplifier) protected by an interference filter (Corion, S10 680 F) to select a window around  $680 \pm 10$  nm; the high voltage was adjusted by software from 200 V to 1100V.



**Fig. 6.** (a) Schematic representation of the ENS sensor set-up viewed from the top for the detector unit. PM: photomultiplier, WS: water sample. (b) Photography of the detector unit with the spectrophotometric microcuvette containing the water sample illuminated with red light.



Each light emitting head consists of an array of six light emitting diodes (LED) and a specific interference filter. The light energy was fixed by the software (in percentage of the maximum). The light was measured inside the head by a photodiode (BPW 34, Siemens) and was kept constant by an electronic loop. This was necessary since at constant current a decrease of up to 20 % of light energy was recorded during the first second. For blue light excitation, LED (Everlight 383 UBC) were used with a band pass of  $430 \pm 30$  nm obtained with a combination of interference filters (Maier SPX R 500 + Andover 450 FL07 + Andover 600 FL07); the maximum of light energy was  $15 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  in the sample compartment. For green light excitation, LED (Marl Ultrabright “pure green”) were used with a  $540 \pm 15$  nm interference filter (Corion, XM 540); the maximum of light energy was  $65 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . For “red” light excitation, LED (Hewlett Packard HLMP-DH08) were used with a  $625 \pm 20$  nm interference filter (Corion, XM 625); the maximum light energy was  $250 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . The water sample was contained in spectrophotometric semi-microcuvettes (Greiner, ref. 613101) placed as close as possible to the PM to improve the fluorescence detection. Despite the quality of the interference filters and negligible fluorescence of microcuvettes, a small background signal was still detected with sterile distilled water. This was subtracted from the measurements. The proximity between the sample compartment and the PM allowed to free the signal from variations due to turbidity and morphology of the organisms. The sensitivity of the measurement was still good with a turbidity as higher than 150 NTU. We tested cyanobacteria, green algae and diatoms with very different shapes and sizes without incidence on the sensitivity of the measurement.

The prototype itself is very compact since the electronic devices and the detector unit were stored in a suitcase (40 x 30 x 16 cm) designed for easy and save transportation.

2) *Software (“Fluo”) for the monitoring of the experimental procedure, data acquisition and data treatment*: the software was developed by G. Parésys with the Delphi 5 language (Borland, USA) and consists of two parts. **i)** the “protocol” of the experiment was arranged through a set of specific macro-instructions. For each illumination sequence, the colour of the excitation, the light intensity, the time of illumination and the high voltage of the PM were pre-adjusted to a correct setting. Data were recorded in a text file automatically saved at the end of the experiment, together with the corresponding protocol. Data files were automatically sent by e-mail together with the protocol, the date of sampling, the local time and comments. The software allowed the adaptation of the experimental conditions to the characteristics of a station. **ii)** the “evaluation table” of the Chl *a* concentration and of the relative proportions of green algae, diatoms and cyanobacteria were calculated by a mathematical model from the fluorescence signals obtained under blue, green and red low intensity excitations. The model was based on pre-recorded proportionality factors between fluorescence emission and Chl *a* concentration measured on reference cultures. It is described in the following section. Results were visualised graphically as a function of sampling time. **iii)** the “calculation table” of the “vitality index” of the phytoplankton is also described in the following section.

3) *Experimental protocol used to record the fluorescence data*: experiments on natural water samples were conducted in collaboration with the Suez society in natural and man-made freshwater reservoirs that are used to produce drinking water in Macao (China) and Masai (Malaysia). Water was sampled in 1 L bottles at 0.5 m depth in the morning (9 AM) and in the evening (5 PM). Chl *a* concentration measurements with the Turner or Datalink fluorometers, particle counting and unit counting were done in parallel to the ENS sensor measurements. For both laboratory and field experiments, measurements were done on three replicates of each water sample. They were dark-adapted for 30 min in the microcuvettes

before the start of the experiment. Microcuvettes were then shaken to resuspend cells that had settled. A typical experiment lasted around 2 min. Three successive sequences of flashes of blue, green and red light at low energy followed by a flash of high light intensity were fired. They had the following characteristics : 0.2 s blue,  $1 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 0.5 s green,  $7 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 0.2 s red,  $13 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 0.2 s red + blue,  $200 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . This illumination sequence was first done on a blank of distilled water and thereafter on the water sample. At the end of the sequences, values were averaged. The flash sequence was done only one time for experimental settings designed for high Chl *a* concentrations. For both low and high light illuminations, short times were used to prevent variations in the fluorescence emission induced by the photochemical and non-photochemical quenching processes respectively (19). The influence of one flash on the next was minimised by inserting dark periods between flashes. Periods of few seconds (from 5 s between low light flashes to 20 s after the high light flash) were tested as sufficient.

To have a good sensibility while avoiding saturation of the electronic devices, three different settings of the instruments were used for samples with low (1-10  $\mu\text{g Chl } a\cdot\text{L}^{-1}$ ), medium (10-50  $\mu\text{g Chl } a\cdot\text{L}^{-1}$ ) and high (50-500  $\mu\text{g Chl } a\cdot\text{L}^{-1}$ ) Chl *a* concentrations. This was important especially when cyanobacteria were dominant because, as shown in Table 1, they are characterised by a very low proportionality factor under blue light excitation and a very high one under red light. If the signal is too large, the setting was automatically switched to a weaker sensitivity. When the Chl *a* concentration was over 500  $\mu\text{g Chl } a\cdot\text{L}^{-1}$  (as in the case of a large bloom), the set-up remained saturated and samples were diluted.

## References

1. **APHA, AWWA, and WEF** (eds.) 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. AWWA Books.
2. **Arsalane, W., B. Rousseau, and J.-C. Duval.** 1994. Influence of the pool size of the xanthophyll cycle on the effects of light stress in a diatom: competition between photoprotection and photoinhibition. *Photochem. Photobiol.* **60**:237-243.
3. **Bellinger, E. G.** 1992. A key to common algae, 4th ed. The Institution of Water and Environmental Management, London.
4. **Berkaloff, C., L. Caron, and B. Rousseau.** 1990. Subunit organization of PSI particles from brown algae and diatoms: polypeptide and pigments analysis. *Photosynth. Res.* **23**:181-193.
5. **Beutler, M., K. H. Wiltshire, B. Meyer, C. Moldaenke, and H. Dau.** 1998. Rapid depth-profiling of the distribution of "spectral groups" of microalgae in lakes, rivers and in the sea, p. 4301-4304. *In* G. Garab (ed.), *Photosynthesis: mechanisms and effects*. Proceedings of the 11th International Congress on Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers.
6. **Campbell, D., V. Hurry, A. K. Clarke, P. Gustafsson, and G. Oquist.** 1998. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Mol. Bio. R.* **62**:667-683.
7. **Chorus, I., I. R. Falconer, H. J. Salas, and J. Bartram.** 2000. Health risks caused by freshwater cyanobacteria in recreational waters. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.* **3**:323-347.
8. **Codd, G. A., C. J. Ward, and S. G. Bell.** 1997. Cyanobacterial toxins: occurrence, modes of action, health effects and exposure routes. *Arch. Toxicol. Suppl.* **19**:399-410.
9. **Cullen, J. J., A. M. Ciotti, R. F. Davis, and M. R. Lewis.** 1997. Optical-detection and assessment of algal blooms. *Limnol. Oceanogr.* **42**:1223-1239.
10. **Demmig-Adams, B., and W. W. Adams III.** 2000. Harvesting sunlight safely. *Nature.* **403**:371-374.
11. **Desoy, J.-P., H. W. Higgins, D. J. Mackey, J. P. Hurley, and T. M. Frost.** 2000. Pigment ratios and phytoplankton assessment in northern wisconsin lakes. *J. Phycol.* **36**:274-286.
12. **Duy, T. N., P. K. Lam, G. R. Shaw, and D. W. Connell.** 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green algal) toxins in water. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* **163**:113-185.
13. **Falkowski, P. G., and Z. S. Kolber.** 1995. Variations in chlorophyll fluorescence yields in phytoplankton in the world oceans. *Aust. J. Plant. Physiol.* **22**:341-355.
14. **Falkowski, P. G., and J. A. Raven.** 1997. *Aquatic photosynthesis*, 1st ed. Blackwell Science.
15. **Guillard, R. R. R., and J. H. Ryther.** 1962. Studies of marine planktonic diatoms. 1. *C. nana* (Hustedt) and *D. confervacea* (Cleve). *Can. J. Microbiol.* **8**:229-238.

16. **Hitzfeld, B. C., S. J. Hoger, and D. R. Dietrich.** 2000. Cyanobacterial toxins: removal during drinking water treatment, and human risk assessment. *Environ. Health Perspect.* **108**:113-122.
17. **Kolber, Z. S., and P. G. Falkowski.** 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. *Limnol. Oceanogr.* **38**:1646-1665.
18. **Kolber, Z. S., O. Prasil, and P. G. Falkowski.** 1998. Measurements of variable chlorophyll fluorescence using fast repetition rate techniques: defining methodology and experimental protocols. *Biochim. Biophys. Acta.* **1367**:88-106.
19. **Krause, G. H., and E. Weis.** 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*
20. **Lippemeier, S., R. Hintze, K. H. Vanselow, P. Hartig, and F. Colijn.** 2001. In-line recording of PAM fluorescence of phytoplankton cultures as a new tool for studying effects of fluctuating nutrient supply on photosynthesis. *Eur. J. Phycol.* **36**:89-100.
21. **Long, S. P., S. Humphries, and P. G. Falkowski.** 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**:633-662.
22. **Lorenzen, C. J.** 1966. A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res.* **13**:223-227.
23. **Maxwell, K., and G. N. Johnson.** 2000. Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J. Exp. Bot.* **51**:659-668.
24. **Mouchet, P., and V. Bonnelye.** 1998. Solving algae problems: french expertise and word-wide applications. *J. Water SRT\_Aqua.* **47**:125-141.
25. **Oliver, R. L., and G. Gant.** 2000. Freshwater blooms, p. 149-194. *In* B. A. Whitton, and M. Potts (eds), *The ecology of cyanobacteria*, 1st ed. Kluwer Academic Publishers.
26. **Persson, P.-E.** 1996. Cyanobacteria and off-flavours. *Phycologia.* **35**:168-171.
27. **Rashash, D. M. C., and D. L. Gallagher.** 1995. An evaluation of algae enumeration. *J. AWWA.* **87**:127-132.
28. **Schofield, O. M. E., J. Grzymiski, P. W. Bissett, G. J. Kirkpatrick, D. F. Millie, M. Moline, and C. S. Roesler.** 1999. Optical monitoring and forecasting systems for harmful algal blooms: possibility or pipe dream?. *J. Phycol.* **35**:1477-1496.
29. **Schreiber, U.** 1998. Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications, p. 4253-4258. *In* G. Garab (ed.), *Photosynthesis: mechanisms and effects*. Proceedings of the 11th International Congress on Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers.
30. **Schreiber, U.** 1995. Computer-controlled phytoplankton analyser based on a 4-wavelengths PAM chlorophyll fluorometer, p. 825-828. *In* P. Mathis (ed.), *Photosynthesis: from light to biosphere*. Proceedings of the 10th International Congress on Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers.
31. **Schreiber, U., C. Neubauer, and U. Schliwa.** 1993. PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: a highly sensitive new tool in basic and applied photosynthesis research. *Photosynt. res.* **36**:65-72.
32. **Stanier, R. Y., R. Kunisawa, M. Mandel, and G. Cohen-Bazire.** 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriol. Rev.* **35**:171-205.
33. **Thar, R., M. Kuhl, and H. Gerhard.** 2001. Fiber-optic fluorometer for microscale mapping of photosynthetic pigments in microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2823-2828.
34. **Tillett, H. E.** 1993. Potential inaccuracy of microbiological counts from routine water samples. *Water Sci. Technol.* **27**:15-18.
35. **Wilhelm, C., P. Volkmar, C. Lohmann, A. Becker, and M. Meyer.** 1995. The HPLC-aided pigment analysis of phytoplankton cells as a powerful tool in water quality control. *J. Water SRT\_Aqua.* **44**:132-141.

\*\*\*\*\*

