

**UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI**

**ÉTUDE DE L'EFFET DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET-B (UVB; 280-320 nm)  
SUR LA PROTÉINE D1 IMPLIQUÉE DANS LE CYCLE DE RÉPARATION DU  
PHOTOSYSTÈME II DE COMMUNAUTÉS PHYTOPLANCTONIQUES  
NATURELLES**

**THÈSE**

**PRÉSENTÉE À**

**L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI**

**Comme exigence partielle du programme de**

**DOCTORAT EN OCÉANOGRAPHIE**

**PAR**

**JOSÉE NINA BOUCHARD**

**M. Sc. Océanographie**

**Novembre 2005**

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI  
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

*Ceux qui prétendent détenir la vérité sont ceux qui ont abandonné la poursuite du chemin vers elle.  
La vérité ne se possède pas, elle se cherche.*

*Albert Jacquard  
(1925- )*

## AVANT-PROPOS

Dans sa quête lumineuse lui permettant de capter l'énergie essentielle au processus de la photosynthèse, le phytoplancton est parfois exposé aux longueurs d'ondes dommageables du rayonnement ultraviolet-B (UVB; 280-320 nm). Au sein de l'appareil photosynthétique, le complexe du photosystème II (PSII) est particulièrement sensible à l'exposition au rayonnement UVB ce qui peut mener à l'inactivation du transport d'électrons et à la dégradation éventuelle de la protéine D1, une protéine essentielle formant le cœur du centre réactionnel (CR) du PSII. Chez les organismes photosynthétiques, certains mécanismes permettent cependant de réparer les dommages causés par le rayonnement UVB. Au sein du PSII, la synthèse *de novo* de la protéine D1 et sa réintégration éventuelle au CR du PSII constitue le cycle de réparation du PSII et assure un maintien efficace de l'activité photochimique.

Ce travail de recherche vise à étudier l'effet du rayonnement UVB sur le cycle de réparation du PSII impliquant la protéine D1 de communautés phytoplanctoniques naturelles. Jusqu'à maintenant, peu d'attention n'avait encore été portée à l'importance de la protéine D1 chez les communautés naturelles de phytoplancton possiblement dû à la diversité de la composition taxonomique, à la difficulté d'étudier des systèmes dynamiques naturels ainsi qu'à la complexité des analyses qui en découlent. Les aspects originaux de ce travail de recherche sont d'ailleurs la combinaison des domaines de la physiologie végétale et de l'océanographie biologique et l'application de techniques de biologie moléculaire à des communautés mixtes de phytoplancton.



Une partie des résultats de ces travaux de recherche ont été présentés sous forme d'affiche lors du 30<sup>th</sup> Annual Meeting of American Society for Photobiology (ASP), Québec (Canada), du 27<sup>e</sup> congrès annuel de l'association des biologistes du Québec (ABQ), Rimouski (Canada), du 20<sup>th</sup> Eastern Regional Photosynthesis Conference (ERPC), Woods Hole (États-Unis), du 13<sup>th</sup> International Congress of Photosynthesis, Montréal (Canada), et sous forme d'une présentation orale à l'American Society of Limnology and Oceanography (ASLO), Santiago de Compostela (Espagne).

Cette thèse est constituée d'une introduction générale rédigée en français, de trois chapitres centraux rédigés en anglais sous forme d'articles scientifiques et d'une conclusion générale rédigée en français. Le deuxième chapitre a été publié dans le *Journal of Phycology* (2005, 41: 273-286), le troisième chapitre été publié dans le journal *Polar Biology* (2005, 28: 607-618) et le quatrième chapitre sera soumis sous peu à une revue scientifique pour publication.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Suzanne Roy, la directrice de ce projet doctoral, pour m'avoir donné l'opportunité de développer ce projet de recherche, pour sa rigueur scientifique, pour la confiance et la liberté qu'elle a su me donner tout au long de ce parcours. Je la remercie également pour le soutien financier et pour m'avoir donné l'opportunité de présenter ces travaux de recherche lors de nombreux congrès scientifiques nationaux et internationaux.

Je remercie le Dr Douglas Campbell, co-directeur de ce projet doctoral, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, me donnant ainsi accès à tout le matériel technique nécessaire aux détectations de protéines par immunochimie, pour ses apports scientifiques judicieux, pour sa disponibilité constante à répondre à mes nombreuses interrogations et pour m'avoir permis de participer à deux congrès portant sur la photosynthèse.

Je remercie également le Dr Gustavo Ferreyra, co-directeur de ce projet doctoral, pour l'excellent travail de terrain effectué en Antarctique et pour les conseils judicieux prodigués tout au long de ces années.

Je remercie également :

- Le Dr Christian Nozais pour avoir accepté de présider le jury de thèse et pour ses commentaires constructifs sur la thèse.
- Le Dr David Lean pour avoir accepté d'agir à titre d'examineur externe lors de la soutenance de cette thèse.
- Le Dr Warwick Vincent, membre du comité de thèse, pour ses commentaires constructifs et stimulants.
- Les membres des équipes techniques de l'Institut des sciences de la mer de Rimouski (ISMER, Rimouski), de l'Université de Sao Paulo (Brésil) et du Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC, Argentine) qui ont assuré la mise en place des mésocosmes à chacun des trois sites visités, de même que l'équipe technique de l'Instituto Antártico Argentino (IAA) et le personnel de l'armée argentine pour le support logistique déployé lors de l'expérience effectuée en Antarctique.
- Maria Lorena Longhi pour son aide indispensable lors des incubations, son support moral et son amitié.
- Ana Catarina Conte Jakovac, Martha Stephan et Oscar Gonzales pour leur aide précieuse aux filtrations.

- Dr Suzana Diaz, Carolina Camilión, Julio Escobar pour la collecte des données de lumière, Leonardo Cantoni, Dr Bert Klein, Dr Gustavo Ferreyra et Dr Suzanne Roy pour le contrôle de qualité des données de lumière.
- Dr Sonia Giancesella et Dr Bruna Mohovic pour les valeurs du  $F_v/F_m$  dans les mésocosmes pour chacun des sites étudiés.
- Martha Ferrario et Silvia Rodríguez pour le décompte cellulaire et l'identification des espèces phytoplanctoniques pour chacun des sites étudiés.
- Scott Schofield et Laura Smith pour leur aide technique lors de la détection de la protéine D1.
- Agrisera AB ([www.agrisera.se](http://www.agrisera.se)) pour avoir fourni l'anticorps global utilisé pour la détection des pools de protéine D1 (PsbA)
- Pour terminer, j'aimerais remercier de façon toute particulière mon amour, Maxence Le Vasseur, pour m'avoir inlassablement supportée et encouragée tout au long de ce parcours.

## RÉSUMÉ

Dans le contexte actuel de la diminution de la couche d'ozone ( $O_3$ ), une meilleure compréhension de l'effet du rayonnement ultraviolet-B (UVB; 280-320 nm) sur les producteurs primaires marins est primordiale. À la base de la chaîne alimentaire, ces organismes photosynthétiques jouent en effet un rôle essentiel quant à l'équilibre des maillons supérieurs de la chaîne trophique et contribuent de surcroît à la fixation du  $CO_2$ , principal gaz responsable du réchauffement climatique. Étant donné leur position stratégique près de la surface dans la colonne d'eau leur permettant de capter l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse, ces organismes peuvent parfois être soumis aux radiations dommageables du rayonnement UVB.

Le rayonnement UVB peut causer des dommages tant au niveau cellulaire qu'au niveau métabolique chez les organismes phytoplanctoniques. Le centre réactionnel (CR) du photosystème II (PSII) est particulièrement vulnérable au rayonnement UVB qui peut l'inactiver, inhiber le transport d'électrons et mener à la dégradation d'une protéine constitutive essentielle, la protéine D1. La synthèse *de novo* de cette protéine et sa réintégration au CR du PSII assure le maintien de la capacité photochimique et constitue le cycle de réparation du PSII. L'effet du rayonnement UVB sur ce cycle de réparation du PSII a été particulièrement étudié chez des espèces spécifiques de cyanobactéries, de phytoplancton, de macroalgues et même chez les plantes. Le récent développement d'anticorps globaux permettant la détection de la protéine D1 chez plusieurs espèces à la fois nous a permis d'étudier l'effet du rayonnement UVB sur la protéine D1 de communautés phytoplanctoniques naturelles. Pour d'atteindre cet objectif, des expériences de terrain ont été effectuées avec des assemblages phytoplanctoniques provenant des eaux côtières d'un milieu tropical (Ubatuba, Brésil), de deux milieux tempérés (Rimouski, Canada et Ushuaia, Sud de l'Argentine) et d'un milieu polaire (Île Observatorio, Antarctique). Les résultats issus de ces travaux de recherche ont permis de mettre en évidence la variabilité latitudinale existant au sein des réponses phytoplanctoniques lors de l'exposition au rayonnement UVB. L'étude à long terme (7 à 10 jours) de chacune de ces communautés phytoplanctoniques a également permis de mettre en lumière la variabilité temporelle existant dans la réponse photosynthétique d'un assemblage phytoplanctonique donné.

Le second chapitre de cette thèse présente les résultats issus d'une première étude visant à étudier l'effet de l'augmentation du rayonnement UVB sur le cycle de réparation du PSII impliquant la protéine D1 de communautés phytoplanctoniques naturelles provenant de deux sites tempérés et d'un site tropical. À chacun des sites visités, des expériences en mésocosmes ont été effectuées pour une période de sept à dix jours. Lors de ces expériences, deux traitements de lumière ont été testés. Certains mésocosmes étaient soumis à la lumière naturelle ambiante alors que d'autres étaient soumis à la lumière naturelle ambiante additionnée d'une forte dose de rayonnement UVB correspondant à une déplétion d' $O_3$  locale de 60%. Afin d'examiner l'effet du rayonnement UVB sur la protéine

D1, des incubations de courte durée ( $\leq 3$  h) ont été effectuées à la surface de certains de ces mésocosmes. Ces incubations ont été effectuées en absence ou en présence de lincomycine, un inhibiteur de synthèse des protéines encodées dans le chloroplaste telle que la protéine D1. Les effets du rayonnement UVB sur le PSII ont été déterminés en utilisant la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle *a* (en observant plus particulièrement la réponse du rendement quantique maximal de la photosynthèse ( $F_v/F_m$ ) dont la diminution est un indice de photoinhibition) alors que la protéine D1 a été détectée par immunochimie. Les résultats de ces incubations ont démontré que lorsque la synthèse de la protéine D1 était bloquée par la lincomycine (absence de réparation du PSII), les pools de protéine D1 ainsi que les valeurs de  $F_v/F_m$  ont chuté de façon similaire sous les deux traitements de lumière étudiés. Par contre, en présence de synthèse active de protéine D1 (présence de réparation du PSII), les pools de protéine D1 ont chuté plus rapidement sous le traitement de lumière additionné d'une forte dose de rayonnement UVB comparativement au traitement de lumière ambiante alors que le  $F_v/F_m$  s'est maintenu sous les deux traitements de lumière étudiés. Ces résultats montrent donc que le rayonnement UVB n'augmente pas directement le dommage à la protéine D1 mais entrave plutôt sa biosynthèse ce qui affecte la réparation du PSII. Le maintien du  $F_v/F_m$  sous le traitement de lumière additionné d'une forte dose de rayonnement UVB malgré les pools réduits de D1 suggère une acclimatation des CRs restants ou une récupération lors de la période d'exposition à l'obscurité imposée avant la mesure du  $F_v/F_m$ . Au niveau latitudinal, la dégradation nette de la protéine D1 était plus rapide au site tropical qu'aux sites tempérés. Cette différence s'explique, entre autres, par les fortes irradiances prévalant à ce site et permettant une dégradation rapide de la protéine D1 et ce, malgré la température élevée de l'eau qui favorise les activités enzymatiques accélérées et donc un processus de réparation accru.

Le troisième chapitre de cette thèse présente les résultats issus d'une seconde étude visant à étudier l'effet du rayonnement UVB local sur le cycle de réparation du PSII mais impliquant cette fois-ci la protéine D1 de communautés phytoplanctoniques naturelles provenant de l'Antarctique. Bien que semblable à la première étude, celle-ci n'a pas été effectuée sur des communautés phytoplanctoniques isolées dans des mésocosmes mais bien sur des communautés phytoplanctoniques échantillonnées à la surface de la colonne d'eau. L'ajout de rayonnement UVB à l'aide de lampes étant techniquement impossible à ce site polaire, les communautés phytoplanctoniques ont plutôt été exposées à la lumière naturelle ambiante et à la lumière naturelle ambiante sans la majorité des longueurs d'ondes comprises dans la gamme du rayonnement UVB. Des incubations de surface de courte durée (60 à 100 min) ont été effectuées lors de journées ensoleillées et d'une journée nuageuse. Comme lors de l'étude précédente, certains échantillons ont été incubés en présence de lincomycine afin de bloquer la synthèse de la protéine D1 alors que d'autres échantillons ont été incubés en absence de lincomycine afin de servir d'échantillons contrôles. Les volumes utilisés lors de ces incubations étant généralement trop petits pour permettre la collecte des quantités importantes d'eau nécessaires à la détection de la protéine D1, celle-ci n'a pu être détectée qu'en une seule occasion à ce site. Les résultats des incubations effectuées à ce site polaire ont montré que lorsque la synthèse de la protéine D1 était bloquée avec la lincomycine des diminutions importantes du  $F_v/F_m$  se sont

produites lors des journées ensoleillées mais non lors de la journée nuageuse. À l'instar de la première étude, ces résultats montrent qu'en absence de synthèse de la protéine D1, la majorité de la photoinhibition se produit suite à l'exposition du phytoplancton à la lumière visible (PAR) et/ou au rayonnement ultraviolet-A (UVA) sans effet significatif du rayonnement UVB. En présence de synthèse active de la protéine D1, cependant, la suppression du rayonnement UVB n'a eu que peu d'effet sur le  $F_v/F_m$  lorsque le phytoplancton provenait d'une colonne d'eau peu stratifiée, sans couche de mélange bien définie, mais a diminué la photoinhibition lorsque le phytoplancton provenait d'une couche de mélange plus profonde (13 m) que la profondeur de pénétration du 1% du UVB (à 305 nm; 10 m). Les résultats de cette seconde étude confirment donc que le UVB a plus d'effet sur le processus de réparation du PSII, et donc sur la synthèse de la protéine D1, que sur la dégradation comme telle de cette protéine, à la différence que pour ce site polaire, la sensibilité du phytoplancton à l'exposition au rayonnement UVB de surface était influencée par son passé lumineux lequel est, en partie du moins, influencé par la structure verticale de la colonne d'eau.

Le quatrième chapitre de cette thèse présente les résultats issus d'une troisième étude visant à étudier l'influence du statut nutritionnel sur la sensibilité du phytoplancton, et particulièrement de la D1, au rayonnement UVB. Cette étude a été effectuée chez les mêmes communautés phytoplanctoniques des sites tempéré (Rimouski, Canada) et tropical (Ubatuba, Brésil) décrites pour la première étude. Des incubations de surface d'une journée ont été effectuées à chacun des sites plusieurs fois pendant la durée des expériences en mésocosmes. Certains sacs d'incubation ont été incubés en présence de  $\text{NO}_3^-$ , de  $\text{PO}_4^{3-}$  et de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  alors que d'autres, servant de contrôles, ont plutôt été incubés suite à l'ajout de  $\text{PO}_4^{3-}$  et de  $\text{Si}(\text{OH})_4$  seulement. En plus de la détermination de plusieurs paramètres photosynthétiques ( $F_v/F_m$ ,  $\Phi_{\text{PSII}}$ ,  $qP$  et  $\text{NPQ}$ ), la protéine D1 de même que la grande sous-unité de l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase-oxygénase (RuBisCO LSU) ont été détectées par immunochimie. Les résultats de ces incubations ont montré qu'à mesure que les concentrations de  $\text{NO}_3^-$  devenaient limitantes à l'intérieur des mésocosmes, le phytoplancton tempéré devenait de plus en plus sensible au rayonnement UVB. Cette sensibilité s'est, entre autres, manifestée par des diminutions du  $F_v/F_m$ , des pools de D1 et de RuBisCO LSU. Lors de cette période de limitation en sels nutritifs, l'ajout de  $\text{NO}_3^-$ , en plus des autres nutriments lors des incubations, n'a pas eu d'effet bénéfique sur les pools de protéine D1 mais a contribué, bien que non significativement, à maintenir des pools plus importants de RuBisCO LSU, à diminuer significativement la pression sur le PSII et à diminuer la photoinhibition. Contrairement au phytoplancton tempéré, l'ajout de rayonnement UVB n'a pas affecté le phytoplancton tropical. À ce site, le phytoplancton était plutôt affecté par la forte lumière ambiante sans effet supplémentaire de l'ajout de rayonnement UVB. Lors des incubations de surface, des diminutions des pools de D1 ont été observées sous les deux traitements de lumière. De plus, la détection d'une bande de poids moléculaire supérieur (~70 kDa) à celui (~54 kDa) normalement détecté pour le RuBisCO LSU et ce, même sous le traitement de lumière ambiante suggère un dommage causé à l'enzyme par le rayonnement UVB naturel (accompagné de la lumière visible) sans effet supplémentaire de l'ajout de rayonnement UVB. Bien que les concentrations de nutriments aient été faibles en tout temps à ce site typiquement oligotrophe, l'ajout de  $\text{NO}_3^-$

à ce site a seulement eu un effet positif lors d'une première incubation mais non lors de l'incubation suivante possiblement parce que les petites cellules qui dominaient l'assemblage vers la fin de l'expérience dépendaient principalement de sources d'azote reminéralisées pour leur croissance ou parce qu'elles n'étaient simplement plus capables d'assimiler efficacement le  $\text{NO}_3^-$  dû à leur condition physiologique déclinante.

Dans l'ensemble, les résultats issus de ces travaux de recherche ont permis de mettre en évidence la variabilité inter-latitudinale existant au sein des réponses phytoplanctoniques à l'exposition au rayonnement UVB. Cette variabilité est, en partie, expliquée par les différences marquantes existant à chacun des sites étudiés quant aux conditions lumineuses, à la température de l'eau, au caractère nutritionnel de l'eau, aux conditions de mélange et à la composition spécifique de l'assemblage phytoplanctonique. L'étude à long terme de chacune de ces communautés phytoplanctoniques par la répétition d'incubations de surface de courte durée a également permis de mettre en lumière la variabilité temporelle de la réponse photosynthétique d'un assemblage phytoplanctonique donné. Plusieurs facteurs peuvent donc affecter la sensibilité d'un assemblage phytoplanctonique au rayonnement UVB dont, entre autres, le statut nutritionnel des espèces qui le composent, les changements de communautés et l'acclimatation des organismes à la lumière.

## TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS .....	iii
REMERCIEMENTS.....	v
RÉSUMÉ .....	vii
TABLES DES MATIÈRES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX .....	xiv
LISTE DES FIGURES .....	xvi

### **CHAPITRE PREMIER**

<b>1. INTRODUCTION GÉNÉRALE .....</b>	<b>1</b>
1.1 La diminution de la couche d’ozone .....	2
1.2 Le rayonnement ultraviolet .....	3
1.3 La pénétration du rayonnement ultraviolet dans la colonne d’eau.....	4
1.4 Les dommages causés par le rayonnement ultraviolet .....	5
1.5 La structure du photosystème II .....	6
1.6 Le transport d’électrons.....	8
1.7 Les mécanismes d’inactivation du photosystème II.....	12
1.8 Le cycle de réparation du photosystème II impliquant la protéine D1 .....	14
1.9 L’étude du cycle de réparation du photosystème II au moyen d’inhibiteurs de synthèse protéique .....	16
1.10 L’étude de la protéine D1 en milieu naturel.....	19
1.11 Les influences environnementales sur le cycle de réparation du photosystème II...20	
1.11.1 La quantité et la qualité spectrale de l’illumination.....	21



1.11.2	La température .....	25
1.11.3	Le statut nutritionnel.....	26
1.11.4	La composition spécifique de l'assemblage, le potentiel d'acclimatation et les conditions de mélange de la colonne d'eau.....	27
1.12	L'étude de communautés phytoplanctoniques naturelles par l'approche en mésocosmes.....	31
1.13	Les sites expérimentaux visités.....	32
1.14	Les objectifs et hypothèses de cette étude.....	33

## **CHAPITRE 2**

<b>2.</b>	<b>EFFECTS OF UVB RADIATION ON THE D1 PROTEIN REPAIR CYCLE OF NATURAL PHYTOPLANKTON COMMUNITIES FROM THREE LATITUDES (CANADA, BRAZIL, ARGENTINA) .....</b>	<b>36</b>
2.1	RÉSUMÉ.....	37
2.2	ABSTRACT.....	39
2.3	INTRODUCTION.....	40
2.4	MATERIALS AND METHODS.....	43
2.5	RESULTS.....	53
2.6	DISCUSSION .....	69

## **CHAPITRE 3**

<b>3.</b>	<b>UVB EFFECTS ON PHOTOSYSTEM II EFFICIENCY OF NATURAL PHYTOPLANKTON COMMUNITIES FROM ANTARCTICA .....</b>	<b>77</b>
3.1	RÉSUMÉ.....	78
3.2	ABSTRACT.....	80
3.3	INTRODUCTION.....	81
3.4	MATERIALS AND METHODS.....	85

3.5 RESULTS.....	92
3.6 DISCUSSION .....	105

#### **CHAPITRE 4**

<b>4. D1, RUBISCO AND PHOTOCHEMICAL RESPONSES TO UVB ENHANCEMENT AND NITRATE SUPPLEMENTATION IN NATURAL PHYTOPLANKTON FROM A TEMPERATE AND A TROPICAL ENVIRONMENT .....</b>	<b>112</b>
4.1 RÉSUMÉ.....	113
4.2 ABSTRACT.....	115
4.3 INTRODUCTION.....	117
4.4 MATERIALS AND METHODS.....	121
4.5 RESULTS.....	129
4.6 DISCUSSION .....	143

#### **CHAPITRE 5**

<b>5. CONCLUSIONS GÉNÉRALES &amp; PERSPECTIVES.....</b>	<b>150</b>
---	------------

#### **CHAPITRE 6**

<b>6. RÉFÉRENCES .....</b>	<b>166</b>
----------------------------	------------

## LISTE DES TABLEAUX

### CHAPITRE 2

Tableau 2.1	Daily maximal noontime ambient irradiance (Max. Amb. Irrad.; min; max) averaged for the 7 or 10 days of the experiments performed in Rimouski, Ubatuba and Ushuaia for UVB (305 nm), UVA (340 nm) and PAR (400-700 nm); average $Q_{UVB}/Q_{total (UVB+UVA+PAR)}$ ratio (min; max); ozone concentration ( $O_3$ ); average daily irradiance below the water surface ( $\bar{I}_0$ ; min; max) for 305 nm under NUVB and HUVB and for 340 nm and PAR; mean depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}$ ) calculated for 305 nm, 340 nm and PAR; surface water temperature (T) and salinity (S) .....	54
Tableau 2.2	Results obtained from the repeated-measures ANOVA for the chl <i>a</i> concentrations and $F_v/F_m$ values measured in the mesocosms in Rimouski and Ushuaia .....	57
Tableau 2.3	D1 protein exponential decay rate ( $k$ , $\text{min}^{-1}$ ) and the correlation coefficients ( $r^2$ ) of the exponential curve fitted to the data for the short-term incubations performed in Ubatuba and Ushuaia for phytoplankton exposed to the NUVB and the HUVB light treatments without lincomycin addition (- Linco) and with lincomycin addition (+ Linco).....	65
Tableau 2.4	Results obtained from the repeated measures ANOVAs for the $F_v/F_m$ measured during the short-term incubations performed in Ushuaia .....	66

### CHAPITRE 3

Tableau 3.1	Irradiance at 305, 320, 340, 380 nm and PAR integrated over the first 60 min of the incubation period for each short-term incubation performed ( $\text{J m}^{-2} \text{ nm}^{-1} \text{ h}^{-1}$ for UV irradiance and $\text{mol photons m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ for PAR). Experiments were performed from 20 to 24 February (except 22 February) and on 4 March 2002	94
Tableau 3.2	Nutrient concentrations ( $\mu\text{M}$ ), total chl <i>a</i> concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and phytoplankton cell concentration ( $\times 10^6 \text{ cells L}^{-1}$ ) from 20 to 24 February and on 4 March 2002.....	97
Tableau 3.3	Summary of two-way ANOVAs performed on the changes in $F_v/F_m$ after 60 min of surface exposure (Fig. 4F-J) .....	102
Tableau 3.4	Summary of Tukey test results for the short-term incubations.....	103

## **CHAPITRE 4**

Tableau 4.1 Incident irradiance and UV increase for the three temperate bioassays (Bioas.1, 2 and 3) and for the two tropical bioassays (Bioas.1 and 2) .....	130
Tableau 4.2 Total cell abundance inside the NUVB and HUVB mesocosm at $T_0$ of the three temperate bioassays (Bioas.1, 2 and 3) and of the two tropical bioassays (Bioas.1 and 2). Major phytoplankton groups are presented as percentages of the total cell abundance .....	131
Tableau 4.3 Summary of results obtained from the repeated-measures ANOVA for Chl $a$ , photosynthetic parameters and photoprotective pigments determined at both sites .....	136

## LISTE DES FIGURES

### CHAPITRE PREMIER

- Figure 1.1 Structure du photosystème II ..... 9
- Figure 1.2 Centre réactionnel du PSII dans son état ouvert ou fermé ..... 11
- Figure 1.3 Cycle de réparation du photosystème II impliquant la protéine D1 ..... 15

### CHAPITRE 2

- Figure 2.1 Temporal variations of chl *a* ( $\mu\text{g}\cdot\text{chl } a \text{ L}^{-1}$ ) concentrations and maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) from day 1 to 10 (18 to 27 June, 2000) in Rimouski; from day 1 to day 7 (10 to 16 February, 2001) in Ubatuba and from day 1 to day 10 (6 to 15 November, 2001) in Ushuaia ..... 56
- Figure 2.2 Example of D1 protein detection by immunochemistry for both light treatments (NUVB and HUVB), on day 9 for Rimouski, on day 3 for Ubatuba and on day 4 for Ushuaia ..... 59
- Figure 2.3 Maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) at initial (11:00) and final time (14:00) for incubations performed in Rimouski on days 5 and 9 ..... 61
- Figure 2.4 Kinetics of maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) from the short-term incubations performed on days 3 and 5 in Ubatuba ..... 63
- Figure 2.5 Kinetics of maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) from the short-term incubations performed on days 4 and 8 in Ushuaia ..... 67

### CHAPITRE 3

- Figure 3.1 Map showing the study area, the location of the Melchior station on the Observatorio Island and the position of the sampling station ..... 86
- Figure 3.2 Temporal variation of incident UVB (305 and 320 nm), UVA (340 and 380 nm) and PAR (400-700 nm) during the experimental period; from 20 to 24 February and on 4 March ..... 93

- Figure 3.3 Depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}$ , m) and vertical attenuation coefficients ( $K_d$ ,  $m^{-1}$ ) for each specific wavelength. Vertical profiles of water density,  $\sigma_t$ , for 20 Feb., 21 Feb., 22 Feb., 23 Feb., 24 Feb., and 4 Mar. A chl *a* vertical profile typical of the February period is also presented (closed circles). .....95
- Figure 3.4 Development of the  $F_v/F_m$  in the surface field samples at 7:00, 13:00 and at variable times in the afternoon on 20 Feb., 21 Feb., 23 Feb., 24 Feb. and 4 Mar. and the development of the  $F_v/F_m$  during the surface short-term incubations performed in late afternoon on 20 Feb., 21 Feb., 23 Feb., 24 Feb. and 4 Mar. Change in  $F_v/F_m$  over 60 min (estimated as the difference between the  $F_v/F_m$  value after 60 min of incubation and the  $F_v/F_m$  value at initial time for each experimental condition tested) on 20 Feb., 21 Feb., 23 Feb., 24 Feb. and 4 Mar. ....98
- Figure 3.5 The relationship between the PAR irradiance integrated over the morning periods (from 7:00 to 13:00) and the percent decrease in  $F_v/F_m$  (estimated as the difference between the  $F_v/F_m$  at 7:00 and the  $F_v/F_m$  at 13:00, normalized to  $F_v/F_m$  at 7:00 \*100) ..... 100

#### **CHAPITRE 4**

- Figure 4.1 Evolution of the  $NO_3^-$  and Chl *a* concentrations determined for the bioassays performed at both sites. Treatments were natural ambient light (NUVB) and natural ambient light with lamp-supplemented UVB (HUVB) with the addition of  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{3-}$  and  $Si(OH)_4$  (NPS-bags) and the addition of  $PO_4^{3-}$  and  $Si(OH)_4$  only (PS-bags) ..... 133
- Figure 4.2 Evolution of the maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ), of the quantum yield of open PSII under illumination ( $\Phi_{PSII}$ ), photochemical quenching ( $q_p$ ) and non-photochemical quenching (NPQ) for the bioassays performed at both sites ..... 135
- Figure 4.3 Evolution of the Chl-specific zeaxanthin (Z) during the bioassays performed at both sites and of Chl-specific pool of diadinoxanthin (Dd) and diatoxanthin (Dt). Retention of Dt ( $Dt/(Dd+Dt)$ ) for the temperate bioassays only ..... 139
- Figure 4.4 Evolution of the relative D1 protein pool size (pixel count  $mm^{-2}$  pg Chl  $a^{-1}$ ) for both sites and of the relative RuBisCO LSU pool size (pixel count  $mm^{-2}$  pg Chl  $a^{-1}$ ) for the temperate site only. The RuBisCO LSU to D1 ratio is also shown for the temperate site. Examples of D1 protein (PsbA) and RuBisCO LSU (RbcL) detection by immunochemistry are shown for the different

incubation bags exposed to HUVB during the second temperate bioassay and to NUVB during the first tropical bioassay .....	141
--	-----

## 1. INTRODUCTION GÉNÉRALE



## 1.1 LA DIMINUTION DE LA COUCHE D'OZONE

Initialement observé au-dessus du continent Antarctique lors du printemps austral, l'appauvrissement de la couche d'ozone ( $O_3$ ) stratosphérique (Farman et al. 1985) (communément appelé «trou d'ozone») constitue un phénomène récurrent. Ce phénomène ne se limite pas seulement à l'hémisphère sud mais s'étend maintenant aux régions arctiques (Blumthaler & Ambach 1990, Hofmann & Deschler 1991, Stolarski et al. 1992, Mühler et al. 1997, Rex et al. 1997, Newman et al. 1997, Lefèvre et al. 1998) et tempérées (Kerr & McElroy 1993). Le principal facteur responsable de la destruction de la couche d' $O_3$  est l'émission anthropique de chlorofluorocarbones (CFCs) (Anderson et al. 1991). N'ayant aucune origine naturelle, les CFCs sont non toxiques et inertes dans la troposphère mais sont photolysés dans la stratosphère, ce qui engendre la libération d'atomes de chlore réactifs qui catalysent la destruction de l' $O_3$ . Malgré les recommandations émises lors du Protocole de Montréal en 1987, prônant un contrôle plus serré ainsi qu'une diminution des émissions de CFCs à l'échelle internationale (Tarasick & Fioletov 1997), la déplétion de la couche d' $O_3$  continue de se produire dû au long temps de résidence des CFCs dans l'atmosphère (entre 8 et 380 ans : Hardy & Gucinski 1989) et aux autres sources de composés destructeurs comme les halons.

Le développement de certaines conditions atmosphériques tel le vortex polaire peut contribuer à l'intensification de l'appauvrissement de la couche d' $O_3$ . Le vortex polaire se forme au sein de la partie inférieure de la stratosphère au-dessus des pôles et se caractérise par la présence d'air stable et froid (McConnell & Chartrand 1997). Le vortex polaire isole l'air froid provenant des pôles de l'air plus chaud provenant des latitudes tempérées

(McConnell & Chartrand 1997) et permet la formation de nuages polaires stratosphériques (PSCs; Polar Stratospheric Clouds) (Rex et al. 1997) à l'intérieur desquels le processus de destruction de l'O<sub>3</sub> est facilité par les réactions entre l'O<sub>3</sub> et les CFCs (Austin & Butchart 1994).

La diminution des concentrations d'O<sub>3</sub> pourrait aussi être accentuée par l'augmentation des concentrations de gaz à effet de serre tel le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) atmosphérique (Austin et al. 1992, Austin & Butchart 1994, Shindell et al. 1998). Une telle augmentation résulte non seulement en un réchauffement de la surface de la terre mais aussi en un refroidissement de la stratosphère. Ce refroidissement pourrait permettre la formation d'un vortex polaire arctique plus stable lequel favorisera la destruction de l'O<sub>3</sub> par la formation accrue de PSCs (Austin & Butchart 1994, Shindell et al. 1998). Bien que Shindell et ses collègues (1998) estiment que 50 à 100 ans seraient nécessaires pour revenir à des concentrations dites normales d'O<sub>3</sub>, l'appauvrissement en cours de la couche d'O<sub>3</sub> continuera de se produire dans un avenir proche et résultera en une augmentation du rayonnement ultraviolet atteignant la surface de la terre.

## **1.2 LE RAYONNEMENT ULTRAVIOLET**

Le rayonnement ultraviolet (UV : 200-400 nm) constitue une portion naturelle du spectre électromagnétique et est divisé en trois sous-groupes: le rayonnement ultraviolet C (UVC : 200-280 nm), le rayonnement ultraviolet B (UVB : 280-320 nm) et le rayonnement ultraviolet A (UVA : 320-400 nm). Les longueurs d'ondes du rayonnement UVC sont absorbées par les gaz contenus dans la haute atmosphère et n'atteignent conséquemment

pas la couche d'O<sub>3</sub> (Karentz et al. 1994), ni la surface de la terre. L'O<sub>3</sub> est le principal composé responsable de l'absorption partielle du rayonnement UVB dans la stratosphère. À mesure que la longueur d'onde augmente vers la portion du rayonnement UVA, l'absorption par l'O<sub>3</sub> diminue jusqu'à ce qu'elle soit indétectable à environ 340 nm. Ainsi, l'O<sub>3</sub> stratosphérique est responsable de l'atténuation du rayonnement UVB, ce qui modifie l'intensité et la qualité spectrale des radiations atteignant la surface de la terre alors que le rayonnement UVA, partiellement absorbé par l'atmosphère, demeure relativement inaltéré par les variations d'O<sub>3</sub> stratosphérique. De même, la lumière visible ou PAR (Photosynthetically Active Radiation, 400-700 nm), n'est absorbée que de façon négligeable par l'O<sub>3</sub> stratosphérique. Ainsi la diminution des concentrations d'O<sub>3</sub> résulte en une augmentation de l'émission irradiante du rayonnement UVB,  $Q_{UVB}$ , alors que celles correspondant au rayonnement UVA,  $Q_{UVA}$ , et au PAR,  $Q_{PAR}$ , demeurent relativement constantes.

### **1.3 LA PÉNÉTRATION DU RAYONNEMENT ULTRAVIOLET DANS LA COLONNE D'EAU**

La diminution des concentrations d'O<sub>3</sub> stratosphérique entraîne conséquemment une pénétration plus importante du rayonnement UVB atteignant la surface de la terre et pénétrant la colonne d'eau. L'intensité et la qualité spectrale de la radiation solaire incidente pénétrant dans l'eau sont modifiées par plusieurs facteurs. Mis à part la concentration d'O<sub>3</sub> stratosphérique, les particularités à l'interface air-eau (irrégularités causées par le vent, vagues, substances polluantes) et l'irradiance incidente qui varie en

fonction de l'angle du zénith solaire, de la latitude, des saisons (Madronich 1993, Frederick & Lubin 1994) et du couvert nuageux (Booth et al. 1997) déterminent la quantité de radiation réfléchiée dans l'espace et absorbée dans la colonne d'eau. La pénétration de la portion de l'énergie lumineuse qui atteint néanmoins la colonne d'eau est reliée directement à la longueur d'onde, les longueurs d'ondes plus longues pénétrant plus profondément que les courtes (Baker & Smith 1982, Kirk 1994). Ainsi le PAR atteint des profondeurs plus grandes alors que le rayonnement UV est absorbé plus rapidement près de la surface. L'atténuation rapide du rayonnement UVB dans la colonne d'eau est principalement causée par la présence de matières organiques dissoutes et de matières particulaires (seston) (Smith & Baker 1979). Néanmoins, des études ont démontré que le rayonnement UV peut atteindre des profondeurs écologiquement significatives dans des écosystèmes marins et d'eau douce (Jerlov 1976, Smith & Baker 1979, Gieskes & Kraay 1990). Dans les eaux claires, le rayonnement UVB et le rayonnement UVA peuvent pénétrer jusqu'à 30 m et 60 m, respectivement (Smith & Baker 1979, Holm-Hansen et al. 1993, Booth et al. 1997).

#### **1.4 LES DOMMAGES CAUSÉS PAR LE RAYONNEMENT ULTRAVIOLET**

La diminution des concentrations d'O<sub>3</sub> stratosphérique, l'augmentation du rayonnement UVB qui en résulte et la mise en évidence de la pénétration du rayonnement UV dans l'eau, ont suscité un intérêt majeur quant à l'impact du rayonnement UVB sur les organismes marins. De nombreuses études se concentrent d'ailleurs sur les premiers maillons du réseau trophique dont, entre autres, le phytoplancton. Ces organismes photosynthétiques sont en effet vulnérables à l'exposition au rayonnement UVB, étant donné leur position stratégique

près de la surface dans la colonne d'eau qui leur permet de capter l'énergie lumineuse nécessaire à la photosynthèse. Une partie du rayonnement UVB est donc absorbée par les organismes photosynthétiques, ce qui peut conséquemment causer des dommages au niveau cellulaire et mener au dysfonctionnement ainsi qu'à l'inactivation de cycles métaboliques tels que la photosynthèse, le transport membranaire, l'assimilation de sels nutritifs, l'allocation du carbone, la respiration, la fixation de l'azote, etc. (Vernet 2000). Les effets subséquents incluent l'inhibition de la croissance, de la reproduction et finalement la mort de la cellule (Vincent & Neale 2000).

Le dommage causé au phytoplancton suite à l'exposition au rayonnement UV peut se produire de façon *directe* par la dégradation photochimique de biomolécules telles que les acides nucléiques, les protéines et les pigments ou de façon *indirecte* par la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS; Reactive Oxygen Species) (Vincent & Neale 2000). Au niveau cellulaire, l'ADN, l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase-oxygénase (RuBisCO) impliquée dans le processus de fixation du carbone, et le centre réactionnel du photosystème II constituent les principales cibles du rayonnement UV (Setlow 1974, Cullen et al. 1992, Cullen & Neale 1993). Les mécanismes d'inactivation du photosystème II étant complexes, une description préalable de la structure du photosystème II et un résumé du transport d'électrons s'avèrent pertinents.

## 1.5 LA STRUCTURE DU PHOTOSYSTÈME II

Au sein de l'appareil photosynthétique, les complexes du photosystème II (PSII) et du photosystème I (PSI) constituent les unités fonctionnelles au sein desquelles se déroulent

les réactions photo-induites de la photosynthèse. Imbriqués au sein de la membrane du thylacoïde, ces complexes comportent tous deux un lit de pigments appelé complexe d'antenne qui collecte la lumière. Au sein de chaque photosystème, le creuset réel du processus photochimique est le complexe protéinique multimérique appelé centre réactionnel (CR) qui contient deux molécules de chlorophylle (Chl) formant une paire spéciale là où converge l'énergie captée par le complexe d'antenne. Le CR d'un photosystème est désigné d'après la longueur d'onde du maximum d'absorption de sa paire spéciale. Le CR du PSI est désigné P700 (P pour pigment et 700 pour le maximum d'absorption de sa paire spéciale); le CR du PSII est appelé P680. Les deux photosystèmes fonctionnent en série et sont en relation par l'intermédiaire de transporteurs d'électrons particuliers.

Le CR du PSII est constitué d'une vingtaine de protéines (Fig. 1), lesquelles sont encodées par des gènes situés à la fois dans le génome du noyau et du chloroplaste. Les protéines les plus importantes du PSII sont les molécules désignées CP47 et CP43 (47 et 43 kDa, respectivement) qui sont liées à la Chl et servent à transférer l'énergie d'excitation de l'antenne collectrice au CR, la protéine stabilisante du manganèse de 33 kDa, ainsi que le dimère de protéines D1 et D2, (32 et 34 kDa, respectivement). Les protéines D1 et D2 sont attachées au P680, à la phéophytine (Phéo), à l'accepteur d'électrons métastable du P680 ainsi qu'aux quinones,  $Q_A$  et  $Q_B$ , accepteurs d'électrons. Le donneur d'électrons intermédiaire du P680 est un résidu tyrosine, Tyr<sub>Z</sub>, de la protéine D1 (Fig. 1). La protéine D1 est encodée par le gène *psbA* situé dans le génome du chloroplaste et possède la séquence d'acides aminés la mieux conservée de toutes les protéines photosynthétiques :

approximativement 85% des acides aminés sont conservés entre les cyanobactéries et les plantes supérieures (Barber 1992), indice de sa grande importance pour le processus de la photosynthèse.

## 1.6 LE TRANSPORT D'ÉLECTRONS

L'absorption d'un photon (quantum d'énergie lumineuse) par une molécule de pigment du complexe d'antenne du PSII constitue l'événement initial des réactions lumineuses de la photosynthèse. L'énergie du photon piégé propulse la molécule de pigment vers un état énergétique plus élevé. L'énergie de cette molécule de pigment excitée passe rapidement à d'autres molécules de pigments incluses dans le complexe d'antenne puis converge vers la paire spéciale (Chl  $a$ ) du CR de P680. Au moment où la paire spéciale reçoit cette énergie, le CR acquiert son état excité, P680\*, qui le transforme en puissant réducteur. La molécule spéciale de Chl  $a$  (P680\*) agit donc comme donneur primaire d'électrons alors que la molécule de quinone,  $Q_A$ , agit comme accepteur primaire d'électrons.

Tout dépendant de l'état physiologique du phytoplancton et de l'état redox de  $Q_A$ , l'énergie du photon absorbé pourra être dissipée de trois façons différentes, soient par la photosynthèse, par la fluorescence ou par la dissipation thermique. L'état du PSII peut être suivi par les changements d'émission de fluorescence *in vivo*, laquelle provient presque exclusivement de la Chl  $a$  associée au complexe d'antenne du PSII. Le rendement en fluorescence est hautement variable et Duysens & Sweers (1963) ont d'ailleurs proposé un modèle reposant sur l'état redox de  $Q_A$  afin d'illustrer cette variabilité (Fig. 2). Lorsqu'un CR est laissé assez longtemps à l'obscurité, le donneur d'électrons (P680) est

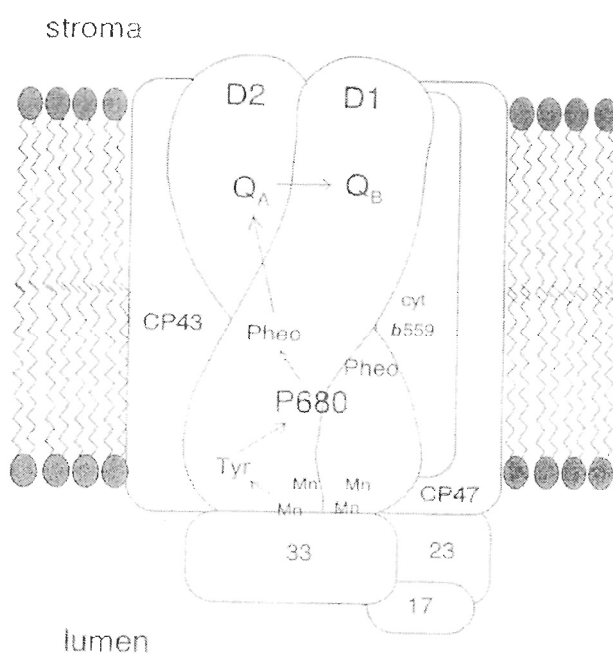


Figure 1.1 Structure du photosystème II (tiré de Plants and UV-B. Responses to environmental change. Lumsden, P. (Ed). 1997).



complètement réduit alors que l'accepteur d'électrons,  $Q_A$ , est complètement oxydé et le CR est dit « ouvert ». Suivant le début de l'exposition à la lumière, des photons sont absorbés par les pigments photosynthétiques et l'énergie d'excitation transférée au CR mène à la séparation des charges. Le CR est alors capable de déplacer un électron à partir du donneur P680 vers la Phéo puis de la Phéo vers l'accepteur primaire,  $Q_A$ , puis vers l'accepteur secondaire,  $Q_B$ .  $Q_B$  est à nouveau réduit par un second cycle du CR puis se dissocie physiquement du complexe protéinique du CR et devient une composante du pool de plastoquinone (PQ), laquelle est impliquée dans d'autres réactions redox au sein du complexe du cytochrome *b/f*. Le site d'attachement laissé vacant est par la suite occupé par une autre PQ, ce qui permet un transfert subséquent d'électrons de  $Q_A$  vers PQ. Dans ces conditions, l'énergie lumineuse est convertie de façon maximale en énergie photochimique et la fluorescence est à son niveau minimal désigné  $F_0$ . Suite à l'absorption d'un photon, l'accepteur  $Q_A$  devient réduit et le donneur devient oxydé temporairement ( $P680^+$ ). Dans ces conditions, le CR est dit « fermé » de façon transitoire. Comme il ne peut utiliser une excitation subséquente pour la séparation photochimique des charges, les photons subséquentement absorbés seront réémis sous forme de fluorescence laquelle atteint son niveau maximal désigné  $F_M$ . C'est seulement suite à la re-réduction de  $P680^+$  et à la réoxydation de  $Q_A^-$  que l'énergie d'un autre photon absorbé pourra être utilisée efficacement afin de promouvoir le prochain transfert d'électrons photochimique. L'émission de fluorescence fournit donc des informations quant aux processus photochimiques se produisant au sein du PSII.

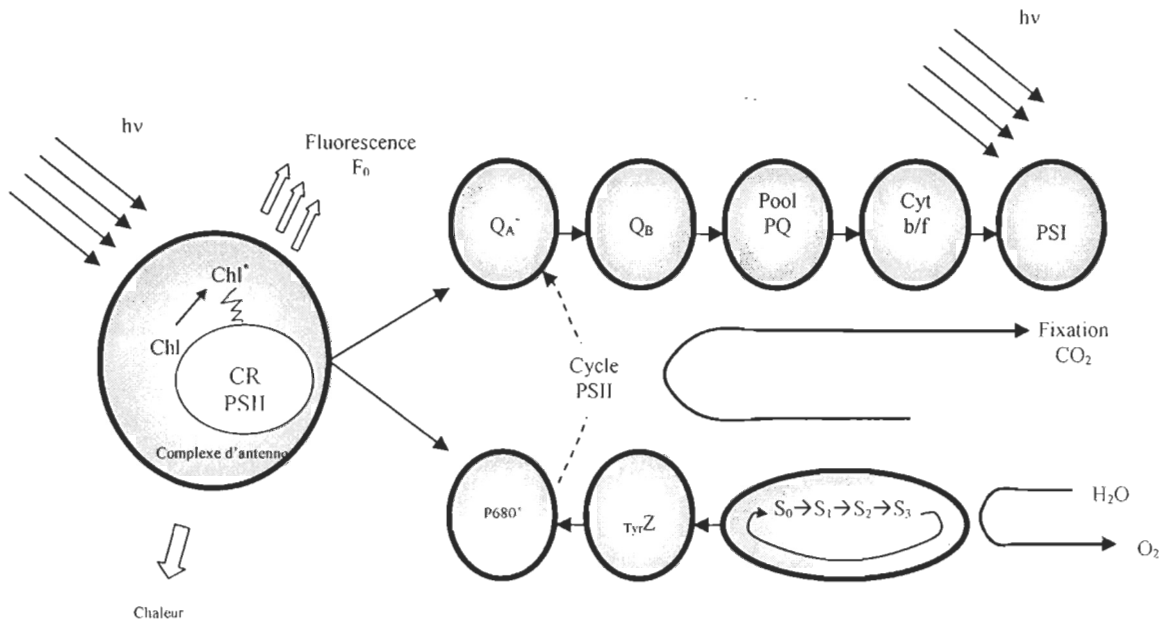
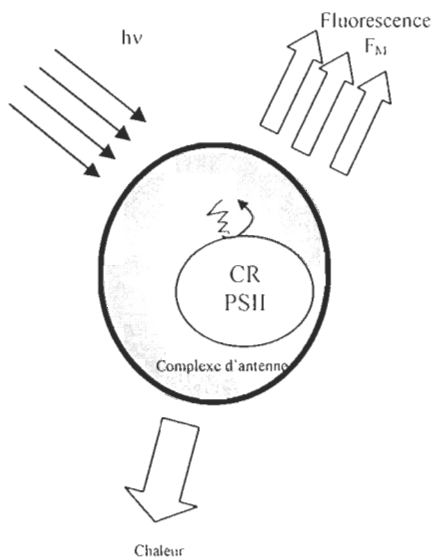
A. Centre réactionnel du PSII *OUVERT*B. Centre réactionnel du PSII *FERMÉ*

Figure 1.2 Centre réactionnel du PSII dans son état ouvert (A) ou fermé (B). (D'après Kolber & Falkowski, 1993).

## 1.7 LES MÉCANISMES D'INACTIVATION DU PHOTOSYSTÈME II

Les mécanismes d'inactivation du PSII ont été plus souvent étudiés sous l'effet de la lumière visible lors d'expériences effectuées *in vitro*. Ces études ont d'ailleurs permis de déterminer que l'inactivation du PSII pouvait s'effectuer selon deux mécanismes principaux : l'un impliquant des dommages induits du côté accepteur du PSII et l'autre impliquant des dommages induits du côté donneur du PSII (Prásil et al. 1992, Mulo et al. 1998). L'inhibition associée au côté accepteur se produit sous de fortes intensités lumineuses alors que le pool de PQ est complètement réduit, créant ainsi une insuffisance de PQ oxydée pouvant s'attacher au site  $Q_B$  sur la protéine D1. Ne pouvant transférer son électron à  $Q_B$ ,  $Q_A^-$  devient doublement réduit ( $Q_A^{2-}$ ) puis protoné pour former  $Q_AH_2$ , lequel est relâché de son site d'attachement sur la protéine D2 (Vass et al. 1992). Avec ce site laissé vacant, l'excitation de P680 résulte en la formation d'une paire de radicaux,  $P680^+Pheo^-$ . La recombinaison de ces radicaux permet la formation d'un triplet de P680 (Vass et al. 1992), lequel réagit avec l'oxygène pour former de l'oxygène à l'état singulet. Sous cette forme, l'oxygène peut endommager les protéines, particulièrement la protéine D1 et initier sa dégradation (Aro et al. 1993a). L'autre mécanisme d'inactivation du PSII se manifeste lorsque le côté donneur du PSII ne peut égaler le taux d'enlèvement des électrons de P680, ce qui permet l'accumulation de radicaux oxydants ( $P680^+$ ,  $Tyr_Z^+$ ) sur le côté donneur du PSII. Ces radicaux peuvent par la suite induire une inactivation rapide du transport d'électrons, sous l'action catalytique des ions de manganèse impliqués dans la photolyse de l'eau (Barbato et al. 1995) et endommager les protéines (Aro et al. 1993a).

Bien que ces deux mécanismes d'inactivation du PSII soient différents, ils causent tous deux l'inhibition du transport d'électrons et la dégradation subséquente de la protéine D1.

*In vivo*, l'étude du mécanisme d'inactivation du PSII est plus complexe car la réparation du PSII endommagé peut s'effectuer grâce à la re-synthèse et au remplacement de la protéine D1 endommagée par une nouvelle protéine D1 intacte. L'ensemble de ces étapes constitue le cycle de réparation du PSII qui sera décrit en détail plus loin. L'intensité de la photoinhibition *in vivo* dépend donc de la balance entre les dommages induits au PSII et la réparation de ces PSII endommagés via la synthèse *de novo* de la protéine D1 (Baroli & Melis 1996, Tyystjarvi & Aro 1996, Anderson et al. 1997). Les études effectuées *in vivo* ont tout de même démontré l'occurrence des deux mécanismes d'inactivation du PSII décrits précédemment (Aro et al. 1993a, Melis 1999, Adir et al. 2003).

Bien que ces mécanismes aient été étudiés en présence de lumière visible, des études récentes effectuées en présence de rayonnement UVB ont montré un effet synergique du PAR et du rayonnement UVB sur l'inactivation du PSII (Babu et al. 1999). La sensibilité du PSII au rayonnement UVB s'explique par la présence de chromophores actifs (ex. l'acide aminé tryptophane) dans la gamme du rayonnement UVB. Ces chromophores sont présents à la fois du côté donneur et du côté accepteur du PSII. Les principales cibles du rayonnement UVB sur le côté accepteur incluent les PQs (Greenberg et al. 1989, Melis et al. 1992, Jansen et al. 1994) de même que la protéine D1 elle-même (Giacometti et al. 1996, Campbell et al. 1998a). Du côté donneur, Tyr<sub>Z</sub> (Greenberg et al. 1989, Renger et al. 1989) et le groupement de manganèse impliqué dans l'évolution de l'oxygène (Barbato et al. 1995, Giacometti et al. 1996, Vass et al. 1996, 1999, Larkum et al. 2001) constituent

d'autres cibles possibles du rayonnement UVB. Selon Ohnishi et al. (2005) l'inactivation du PSII s'effectuerait en deux étapes distinctes. Lors de la première étape, le rayonnement UV et la lumière bleue inactiverait le complexe qui produit de l'oxygène, puis lors de la seconde étape, la lumière rouge absorbée par les chlorophylles inactiverait le CR du PSII.

### **1.8 LE CYCLE DE RÉPARATION DU PHOTOSYSTÈME II IMPLIQUANT LA PROTÉINE D1**

Face aux longueurs d'ondes dommageables ainsi qu'aux intensités lumineuses trop élevées, les organismes phytoplanctoniques bénéficient d'une panoplie de mécanismes de protection et d'évitement (Roy 2000). Cependant, lorsque la protection de la cellule par ces mécanismes échoue et que des dommages surviennent tant à l'ADN qu'au PSII, des mécanismes de réparation tentent de contrer ces dommages et d'optimiser le fonctionnement de la cellule.

La photoinactivation du PSII menant à la dégradation subséquente de la protéine D1 (Baker et al. 1997) nécessite la présence d'un mécanisme de réparation efficace afin de favoriser le rétablissement de la fonction photosynthétique. Ce mécanisme de réparation du PSII implique le remplacement rapide de la protéine D1 endommagée par une protéine D1 intacte, nouvellement synthétisée (Sass et al. 1997) ce qui constitue le cycle de réparation du PSII (Fig. 3). La protéine D1 joue donc un rôle crucial au sein du PSII. Lorsqu'elle est endommagée, la protéine D1 doit dans un premier temps être dégradée afin de permettre à la nouvelle copie de la protéine d'être assemblée au sein du PSII. Bien que le mécanisme protéolytique exact responsable de la dégradation de la protéine D1 soit longtemps resté

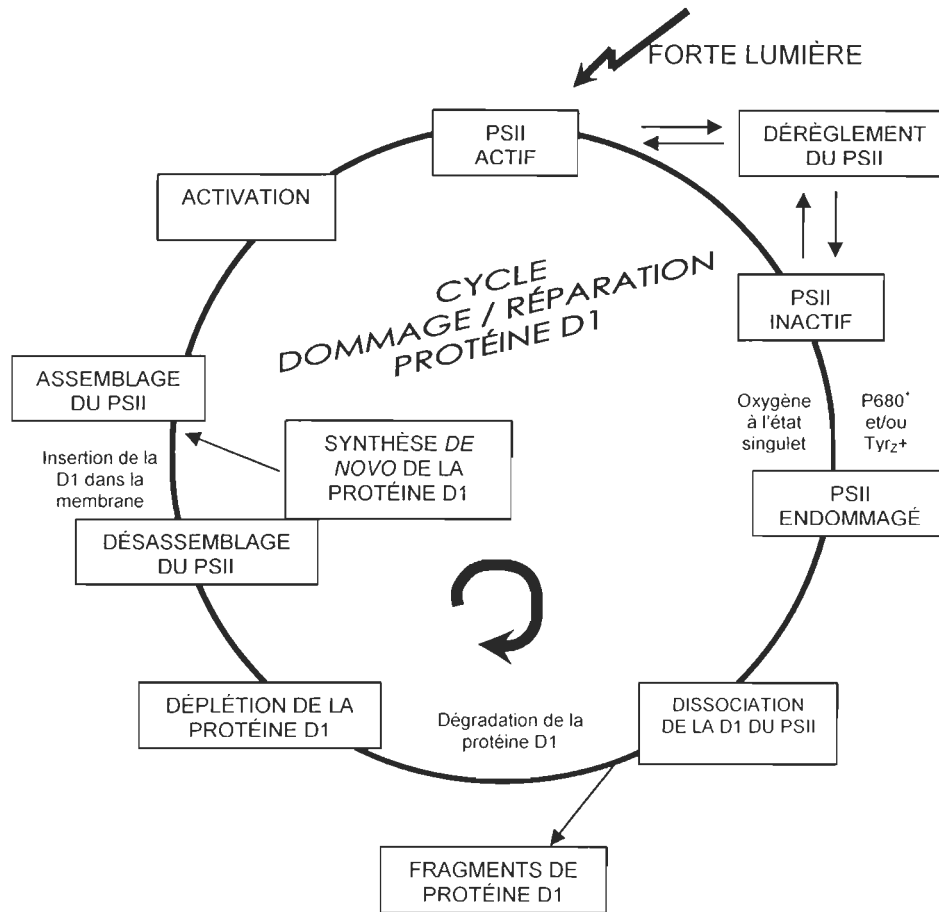


Figure 1.3 Cycle de réparation du photosystème II impliquant la protéine D1 (simplifié d'après Aro et al. 1993a).

obscur, les protéases DegP2 et Ftsh ont récemment été identifiées comme étant les principales responsables de la dégradation de cette protéine (voir références dans Santabarbara et al. 2001). Le taux de remplacement de la protéine D1 est très rapide, de l'ordre d'environ 30 minutes chez les cyanobactéries (Ohad et al. 1984). Le processus de dégradation de la protéine D1 doit en fait être considéré comme la première phase du processus de réparation des CRs endommagés du PSII. En réalité, l'inhibition des activités du PSII ne devient apparente que lorsque le taux de réparation échoue à compenser l'apparition de dommages, i.e., sous des conditions lumineuses extrêmes, en présence d'inhibiteurs de synthèse de protéines du chloroplaste ou alors à des faibles températures (Prasil et al. 1992).

### **1.9 L'ÉTUDE DU CYCLE DE RÉPARATION DU PHOTOSYSTÈME II AU MOYEN D'INHIBITEURS DE SYNTHÈSE PROTÉIQUE**

Comme la protéine D1 est constamment remplacée à un taux considérablement plus rapide que tous les autres composants du PSII (Mattoo et al. 1984) il est parfois difficile, lors d'études portant sur le mécanisme de remplacement de la protéine D1, de différencier les effets reliés directement à la dégradation de la D1 de ceux associés à l'inactivation du transport d'électrons et aux dommages causés par les ROS. L'utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique est donc parfois privilégiée afin de comprendre le cycle de réparation du PSII impliquant la protéine D1. Fréquemment utilisées, ces substances (lincomycine, streptomycine, rifampicine, chloramphénicol, etc.) inhibent la synthèse des protéines du chloroplaste, et donc la synthèse de la protéine D1, ce qui permet de vérifier l'effet d'un

stress, comme le rayonnement UVB, sur la photosynthèse alors que la réparation du PSII n'est pas opérationnelle.

Dans le contexte d'utilisation d'inhibiteurs de synthèse protéique, il est essentiel de bien comprendre leur mode d'action afin de s'assurer que l'inhibiteur utilisé agit exactement à l'endroit voulu et n'interfère pas avec le reste des fonctions métaboliques essentielles des organismes étudiés. La lincomycine (l'inhibiteur utilisé pour ce présent travail) bloque la synthèse des protéines du chloroplaste en agissant au niveau de la sous-unité 50S du ribosome. L'attachement de la lincomycine à la sous-unité 50S bloquerait alors la synthèse des protéines, en inhibant la phase d'élongation de celles-ci et/ou en empêchant la translocation du ribosome (Böttger et al. 2001). Comme le chloroplaste est doté de ribosomes 70S (avec les sous-unités 30S et 50S) et que les ribosomes du cytoplasme des cellules eucaryotes étudiées sont de type 80S (avec sous-unités 40S et 60S), la lincomycine (qui agit exclusivement avec la sous-unité 50S) n'interfère pas avec la synthèse des protéines qui se produit au sein du cytoplasme mais exclusivement avec celle se produisant au sein du chloroplaste. De plus, comme la protéine D1 possède le turnover le plus rapide de toutes les protéines chloroplastiques, lors d'études à court terme l'effet observé sera directement associé à la dégradation de la protéine D1.

Ekelund (1996) a démontré l'inhibition de la photosynthèse et de la motilité chez le flagellé *Euglena gracilis* exposé au rayonnement UVB. Il a ensuite noté un rétablissement partiel de la photosynthèse suite à une exposition de 24 heures au PAR. Le rétablissement de la photosynthèse a cependant été bloqué pendant 16 heures en présence de lincomycine, suggérant un rôle de réparation du PSII par la synthèse de la protéine D1. Pour leur part,



Sass et al. (1997) ont démontré une perte de la production d'oxygène à l'état stable (donc de l'activité photochimique) accompagnée par une perte des protéines D1 et D2 du CR du PSII suite à l'exposition des cyanobactéries *Synechocystis* sp. PCC 6803 au rayonnement UVB. L'exposition subséquente de ces cellules au PAR seulement a cependant permis un rétablissement partiel de la production d'oxygène de même que de la synthèse des protéines alors que l'ajout de la lincomycine juste avant l'exposition au PAR a bloqué le processus de rétablissement. L'ajout de lincomycine juste avant l'exposition au rayonnement UVB aurait cependant accéléré la cinétique de la perte de l'activité. Chez la même espèce de cyanobactérie exposée à une forte lumière visible ( $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), Kanervo et al. (1993) ont également noté une inhibition de l'activité du PSII accompagnée par une légère diminution des concentrations de la protéine D1. En présence de divers inhibiteurs de synthèse de la protéine D1 (D-threo-chloramphénicol, streptomycine et rifampicine) cependant, une dégradation rapide de la D1 s'est produite accompagnée par une accélération de la photoinhibition du PSII. Une étude utilisant l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* a par ailleurs montré qu'une exposition au rayonnement UVB inhibait à la fois la production d'oxygène ainsi que le transport d'électrons du PSII en plus de favoriser la dégradation rapide des protéines D1 et D2 (Chaturvedi & Shyam 2000). L'inactivation de la photosynthèse et l'entrave au rétablissement de la photosynthèse suivant l'ajout de chloramphénicol ont permis de démontrer que la synthèse continue des protéines D1 et D2 est essentielle à la réparation du PSII endommagé. Xiong et al. (1997) ont pour leur part testé la sensibilité de différentes espèces de microalgues à l'exposition au rayonnement UVB. Certaines de ces algues étaient hautement tolérantes au rayonnement

UVB (dû à la présence de quantités substantielles de sporopollenine, un polymère présent dans la membrane cellulaire et qui absorbe le rayonnement UVB et d'acides aminés de type mycosporine (MAA)) alors que d'autres étaient plutôt sensibles au rayonnement UVB (dû à l'absence ou aux faibles quantités de sporopollenine au sein de la membrane cellulaire et de MAA). Les espèces d'algues tolérantes se sont cependant montrées vulnérables au rayonnement UVB suite à l'ajout de streptomycine qui a bloqué la synthèse de la protéine D1, soulignant l'importance de ce mécanisme de photo-protection. Ces études démontrent que l'utilisation d'inhibiteurs de synthèse des protéines du chloroplaste s'avère appropriée afin de bloquer la synthèse de la protéine D1. L'utilisation de ces inhibiteurs de synthèse protéique est cependant encore peu répandue dans l'étude des communautés phytoplanctoniques naturelles (Bergmann et al. 2002).

### **1.10 L'ÉTUDE DE LA PROTÉINE D1 EN MILIEU NATUREL**

Bien que le processus de réparation des dommages causés par le rayonnement UVB relié à la synthèse de la protéine D1 bénéficie d'un intérêt grandissant de la part de la communauté scientifique, la majorité des études se concentrent généralement sur les spécimens *in vitro* de cyanobactéries (Campbell et al. 1998a, Vass et al. 2000) et de phytoplancton (Gerber & Häder 1995). D'autres études *in vivo* se concentrent pour leur part sur des espèces spécifiques de macroalgues et de plantes supérieures (Flanigan & Critchley 1996, Kettunen et al. 1997, Barbato et al. 2000, Chaturvedi & Shyam 2000). L'attention limitée portée à l'importance de la protéine D1 chez les communautés phytoplanctoniques naturelles (Warner et al. 1999) peut sans doute s'expliquer par la diversité de la composition

taxonomique, par la difficulté d'étudier des systèmes dynamiques naturels ainsi que par la complexité des analyses qui en découlent. Cependant, cette avenue relativement récente devrait se développer rapidement grâce, entre autres, au récent développement d'anticorps globaux permettant la détection de la protéine D1 chez les communautés mixtes de phytoplancton (Campbell et al. 2003) et à l'optimisation des techniques de cinétique de fluorescence telle que la fluorescence Pulse-Amplitude Modulated : PAM (Schreiber et al. 1993) permettant l'étude de la fluorescence *in vivo* chez des communautés phytoplanctoniques naturelles de faible biomasse. Cette technique de la fluorescence permet d'obtenir plus d'informations sur les caractéristiques photosynthétiques instantanées des cellules et de relier celles-ci à l'état de la protéine D1.

### **1.11 LES INFLUENCES ENVIRONNEMENTALES SUR LE CYCLE DE RÉPARATION DU PHOTOSYSTÈME II**

L'étude de communautés phytoplanctoniques en milieu naturel nécessite la considération de multiples paramètres pouvant affecter la réponse des organismes étudiés suite à l'exposition au rayonnement UV. L'inhibition causée par l'exposition au rayonnement UV représente le bilan des dommages et de la réparation. L'effet net peut être aggravé soit par l'augmentation du taux de dommage (par exemple via une augmentation de la dose de rayonnement UV ou une diminution des enzymes ou caroténoïdes pouvant protéger la cellule des ROS) ou une diminution du taux de réparation (i.e., inhibition générale de la biosynthèse liée à des températures non optimales ou à une limitation en sels nutritifs).

### *1.11.1 La quantité et la qualité spectrale de l'illumination*

Pour une réaction photochimique, la loi de Bunsen-Roscoe de la réciprocité stipule que si les produits de la durée de l'exposition et de l'irradiance (dose) sont égaux, alors les quantités de matériel subissant des changements seront égales. En d'autres mots, le concept de réciprocité s'applique si une longue exposition à une irradiance de faible intensité cause autant de dommage qu'une courte exposition à une irradiance de forte intensité (réciprocité = les effets du rayonnement UV sont une fonction linéaire de la dose cumulative reçue). Lors de nombreux processus biologiques le concept de réciprocité ne peut s'appliquer car la réparation, la réactivation ou la resynthèse de molécules endommagées se produit lors de l'exposition. Dans une étude testant la réciprocité pour l'inhibition de la photosynthèse par le rayonnement UVB, Cullen & Lesser (1991) ont exposé des diatomées à différentes intensités de rayonnement UVB pour des périodes de temps allant de 15 min à 4 h. Dans cette expérience, le taux de la photosynthèse a chuté en réponse au rayonnement UVB puis, dans l'espace de 30 min, a atteint un taux qui est demeuré constant jusqu'à la fin de l'expérience. Cet état d'équilibre est représenté par une fonction hyperbolique et est en accord avec le modèle de la photoinhibition qui prédit que l'effet net du rayonnement UVB sur la photosynthèse résulte de la balance entre les processus de dommage et de réparation (Lesser et al. 1994), lesquels dépendent de différentes régions du spectre solaire et agissent possiblement sur différentes échelles de temps. Les courtes longueurs d'ondes du rayonnement UVB sont généralement associées aux dommages (Cullen et al. 1992) alors que les longueurs d'ondes plus longues du rayonnement UVA sont à la fois associées aux dommages ainsi qu'aux mécanismes de réparation des cellules phytoplanctoniques (Smith

et al. 1992). L'effet net du rayonnement UVB sur la photosynthèse est donc mieux décrit par des fonctions de normalisation spectrale qui expriment sous forme mathématique l'influence négative du rayonnement UV et permettent de tenir compte des interactions possibles entre les longueurs d'ondes du rayonnement UV causant des dommages et les longueurs d'ondes plus longues importantes pour l'activation de mécanismes de protection (Cullen et al. 1992, Neale et al. 1994, Neale 2000). Il est donc essentiel d'étudier les processus de réparation, comme celui du PSII, puisque les récents modèles mathématiques tiennent maintenant compte à la fois des dommages et des processus de réparation (Neale 2000).

Bien que le mécanisme de réparation du PSII requiert de la lumière pour fonctionner, ce mécanisme sature à de très faibles intensités lumineuses indépendamment de l'irradiance à laquelle un organisme est acclimaté (Anderson et al. 1997, Franklin et al. 2003). Ainsi, lorsque l'absorption de l'énergie d'excitation excède la demande lumineuse pour la photosynthèse, le cycle de réparation du PSII peut alors se montrer inefficace pour contrer les dommages (Baker et al. 1997). Il a d'ailleurs été démontré que les dommages causés au PSII suite à l'exposition de la cyanobactérie *Synechocystis* à une forte lumière visible ( $1500 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) relevaient d'une inhibition du mécanisme de réparation du PSII plutôt que d'une augmentation du dommage directement (Nishiyama et al. 2001).

Selon Sicora et al. (2003), la lumière visible et le rayonnement UVB affectent des cibles différentes au niveau du PSII ce qui implique qu'ils peuvent induire des dommages au PSII indépendamment l'un de l'autre. Lorsque la synthèse de la protéine D1 est bloquée avec un inhibiteur, donc en absence de réparation du PSII, la sensibilité des différentes

cibles du rayonnement UVB dans le PSII n'est pas influencée significativement par la présence de lumière visible et vice versa. Par contre, lorsque le processus de réparation du PSII est opérationnel (i.e., en absence d'inhibiteur de synthèse de protéine), la sensibilité du PSII au rayonnement UVB est influencée par la présence ou non de lumière visible. En fait, la lumière visible peut avoir un effet protecteur contre les dommages induits par le rayonnement UVB (Grzymalski et al. 2001). L'étude de Sicora et al. (2003) a d'ailleurs démontré que l'illumination d'une cyanobactérie ayant un cycle de réparation du PSII fonctionnel, avec à la fois la lumière visible (de faible intensité) et le rayonnement UVB limitait l'inactivation de l'activité du PSII. En fait, sous cette illumination simultanée de lumière visible et de rayonnement UVB, l'inactivation de l'activité du PSII était moindre que celle qui se serait produite suite à l'illumination sélective de l'organisme avec la lumière visible seulement ou le rayonnement UVB seulement. Chez cette cyanobactérie, le processus de réparation du PSII a été initié à la fois par le PAR et le rayonnement UVB lorsqu'appliqués séparément. Cependant, l'illumination avec de faibles intensités de lumière visible ( $130 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), qui à elle seule ne cause pas de perte nette d'activité photochimique, procure un effet protecteur contre le dommage causé par le rayonnement UVB. Cet effet protecteur est attribué à une capacité de réparation accrue. Cependant, à des intensités lumineuses plus élevées de lumière visible ( $1300 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), qui à elles seules induisent l'inactivation de l'activité du PSII, la protection absolue contre le dommage causé par le rayonnement UVB ne se produit plus. En fait, l'illumination combinée avec des fortes intensités de lumière visible et de rayonnement UVB entraîne une perte d'activité du PSII qui, cette fois, est plus importante qu'elle ne

l'aurait été suite à l'illumination par le rayonnement UVB seulement ou la lumière visible seulement. Chez la chlorophycée *Dunaliella tertiolecta* exposée au rayonnement UVB ( $4,1 \text{ W m}^{-2}$ ) ainsi qu'à différentes intensités de PAR, les taux de dommages ont augmenté en fonction de l'intensité croissante du PAR (jusqu'à  $700 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) alors que les taux de réparation ont aussi augmenté en fonction de l'intensité croissante du PAR mais jusqu'à  $300 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  après quoi, ils n'ont montré qu'une faible augmentation avec l'intensité croissante du PAR (Shelly et al. 2003). Lorsque la source de rayonnement UVB a été éteinte, aucune récupération ne s'est produite en absence de PAR, alors qu'en présence de PAR, la récupération a augmenté jusqu'à  $300 \text{ } \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  alors qu'au delà de cette valeur la récupération s'est mise à chuter à cause de la photoinhibition du transport d'électrons du PSII (Shelly et al. 2003). Les auteurs suggèrent que la présence de lumière visible est nécessaire pour permettre la photosynthèse et par conséquent la synthèse d'ATP lequel serait indispensable au processus de réparation du PSII. Allakhverdiev et al. (2005) ont d'ailleurs récemment démontré que le taux de réparation du PSII était réduit suite à l'inhibition de la synthèse d'ATP et que la synthèse de la protéine D1 était stimulée par la synthèse d'ATP.

Ces résultats suggèrent donc que la synthèse d'ATP pourrait jouer un rôle de régulation dans le processus de réparation du PSII. À la lumière des résultats de ces études, il apparaît essentiel de considérer le spectre solaire dans son entier lors d'études visant à déterminer l'effet du rayonnement UVB sur les organismes photosynthétiques.

### *1.11.2 La température*

Le facteur température peut agir comme un stress supplémentaire en modifiant l'efficacité des mécanismes de réparation mais aussi en contribuant aux dommages. Puisque certains des processus du transport d'électrons sont associés à la membrane et que la viscosité de celle-ci augmente à une température critique (la température critique correspond généralement à 10°C sous la température optimale de croissance), le mouvement de certains composés au sein de la membrane peut être entravé par de faibles températures (Falkowski & Raven 1997). Une baisse de température peut également affecter les collisions intermoléculaires, ce qui se traduit au niveau de l'appareil photosynthétique par un ralentissement de la diffusion de transporteurs d'électrons tels que la PQ et la plastocyanine et conséquemment par une augmentation du temps de turnover électrochimique. Ainsi une diminution de température peut se traduire par une surexcitation du PSII à des faibles irradiances (Falkowski & Raven 1997) et par une susceptibilité accrue à la photoinhibition de la photosynthèse (Huner et al. 1993). Davison (1991) soutient d'ailleurs que les effets d'une réduction de température sont comparables à ceux causés par une augmentation de l'intensité lumineuse.

La réparation biosynthétique par la synthèse de la protéine D1 est corrélée positivement avec la température du moins jusqu'à la limite de thermo-tolérance d'un organisme (Greer et al. 1986). Inversement, les faibles températures peuvent réduire l'efficacité des mécanismes de défense qui dépendent d'activités biosynthétiques (Neale et al. 1994, Lesser et al. 1996) car les réactions enzymatiques se produisent plus lentement à des faibles températures (Falkowski & Raven 1997). Dans leur étude testant l'effet de la



température sur les mécanismes de dommage et de réparation du phytoplancton de l'Antarctique, Rae et al. (2000) ont d'ailleurs montré un fonctionnement inefficace du processus de réparation du PSII dû à la basse température de l'eau. D'un autre côté, dans leur étude testant les effets d'une augmentation de température sur les dinoflagellés symbiotiques au corail, Warner et al. (1999) ont montré des diminutions plus importantes du  $F_v/F_m$  et des pools de protéine D1 à 31,5°C plutôt qu'à 25°C.

### *1.11.3 Le statut nutritionnel*

Le statut nutritionnel de communautés phytoplanctoniques influence la réponse des organismes exposés au rayonnement UV. Une limitation au niveau de la disponibilité de sels nutritifs peut augmenter grandement l'effet inhibiteur du rayonnement UV, en limitant à la fois les processus de photoprotection et de réparation qui dépendent de l'assimilation de sels nutritifs permettant aux organismes de synthétiser les molécules essentielles impliquées dans ces processus (Cullen & Lesser 1991, Lesser et al. 1994). Selon Behrenfeld et al. (1994), il existe une interaction compétitive entre le stress imposé par une limitation en sels nutritifs et celui imposé par une exposition au rayonnement UV où l'effet net sur la croissance et la biomasse sera déterminé par le facteur le plus limitant. Plusieurs études ont montré une sensibilité accrue au rayonnement UVB sous des conditions limitantes d'azote (Lesser et al. 1994, Litchman et al. 2002, Shelly et al. 2002). Cette sensibilité accrue au rayonnement UVB est généralement attribuée à un ralentissement des taux de réparation ce qui est consistant avec les résultats de Bergmann et al. (2002) qui suggèrent que, sous des conditions limitantes d'azote, la capacité du phytoplancton naturel

de l'estuaire de Neuse à réparer les dommages était négativement affectée. Les résultats de Shelly et al. (2002), par contre, montrent une stimulation des taux de réparation du PSII chez l'algue *Dunaliella tertiolecta* soumise à des conditions limitantes d'azote. Dans cette étude, cependant, la stimulation de la réparation n'était pas suffisante pour contrer l'augmentation des dommages.

#### *1.11.4 La composition spécifique de l'assemblage, le potentiel d'acclimatation et les conditions de mélange de la colonne d'eau*

D'autres facteurs tels que la composition spécifique de l'assemblage, le potentiel d'acclimatation et le degré de mélange de la colonne d'eau influencent également la réponse d'un assemblage phytoplanctonique à une exposition au rayonnement UV. Les réponses du phytoplancton à l'exposition au rayonnement UVB sont spécifiques aux différentes espèces (Calkins & Thordardottir 1980, Jokiel & York 1984). De façon générale, la sensibilité des espèces phytoplanctoniques (déterminée par l'étude de divers processus cellulaires tels que la prise d'azote, le taux de croissance spécifique, l'abondance cellulaire, etc.) dépend de la taille des cellules; les cellules de petite taille étant généralement plus sensibles que celles de grande taille (Karentz et al. 1991). Bien qu'il existe des études présentant des résultats contradictoires, les diatomées sont généralement considérées comme étant plus résistantes au rayonnement UVB que les prymnésiofycées, lesquelles seraient à leur tour plus résistantes que les petits flagellés (Vernet 2000). Les cyanobactéries et les algues vertes seraient de leur côté aussi résistantes que les diatomées (Vernet 2000). Selon Karentz et al. (1991), l'augmentation du rayonnement UVB résultant

de la déplétion de la couche d'O<sub>3</sub> pourrait mener à un changement de la composition des espèces phytoplanctoniques avec les espèces les plus résistantes au rayonnement UV dominant les espèces les plus sensibles à l'exposition au rayonnement UV. Le degré de sensibilité dépend non seulement de l'espèce de phytoplancton mais aussi de son potentiel d'acclimatation à l'exposition aux longueurs d'onde dommageables. La rapidité avec laquelle un organisme donné est capable de s'acclimater à une dose de rayonnement UV est en partie dictée par le caractère génétique des cellules ayant évolué sous des pressions sélectives d'exposition au rayonnement UV. En vertu de leur évolution sous de fortes doses de rayonnement UV, les espèces phytoplanctoniques tropicales et subtropicales pourraient être capables de s'acclimater plus rapidement à l'augmentation du rayonnement UVB que les espèces phytoplanctoniques des milieux tempérés et polaires (Hazzard et al. 1997). En fait, l'induction des mécanismes de défense dépend de la balance entre le PAR et la demande énergétique pour le métabolisme du phytoplancton. Si l'intensité lumineuse moyenne est faible, alors le phytoplancton accumulera des pigments capteurs de lumière afin d'augmenter son efficacité photochimique. Ce type de phytoplancton n'aura alors qu'une faible capacité à se défendre sous une forte irradiance (PAR et UV) comme celle prévalant près de la surface de la colonne d'eau. D'un autre côté, si le phytoplancton est exposé à une intensité lumineuse élevée relativement à sa demande énergétique, ce dernier mettra l'accent sur le déploiement de mécanismes de protection et de défense plutôt que sur l'optimisation de l'efficacité photochimique. Dans ce cas, la synthèse de pigments protecteurs tels que les xanthophylles ou d'autres composés faisant écran au rayonnement UV, de même que le maintien de mécanismes efficaces de réparation des dommages, seront

favorisés. Ainsi les assemblages phytoplanctoniques provenant d'environnements ayant des couches de mélange moins profondes seraient généralement plus résistants à l'exposition au rayonnement UV parce qu'acclimatés à des plus fortes irradiances près de la surface. Inversement, les assemblages phytoplanctoniques provenant de couches de mélange plus profondes et donc plutôt acclimatés à des faibles irradiances, seraient plus sensibles à l'exposition au rayonnement UV (Neale et al. 1998b).

Le mélange vertical qui détermine le temps de résidence des organismes phytoplanctoniques près de la surface de la colonne d'eau et la profondeur de la couche de mélange, laquelle influence l'irradiance moyenne à laquelle ces organismes sont exposés, sont d'autres facteurs importants à considérer dans les études portant sur l'effet du rayonnement UV sur la photosynthèse (Neale et al. 1998a, 2003). Plusieurs études ont démontré que le mélange vertical pouvait protéger contre le rayonnement UVB en réduisant l'irradiance à laquelle les organismes sont exposés (Neale et al. 2003). Dans certains cas, le transport du phytoplancton sous la couche euphotique et en particulier sous le 0,1% du rayonnement UV incident permet la réparation (par les longues longueurs d'ondes du rayonnement UVA et/ou du PAR) des dommages causés lors de l'exposition aux fortes irradiances de surface. Bien qu'une couche de mélange profonde puisse être considérée comme étant bénéfique pour diminuer les dommages causés par le rayonnement UV, c'est plutôt le ratio entre les processus de dommages et les processus de réparation qui est déterminant. Lors d'une étude effectuée en Antarctique, le rayonnement UV a été manipulé (par un ingénieux système de filtres rotatifs positionnés autour de tubes d'incubation) afin de simuler le transport des organismes phytoplanctoniques dans la couche de mélange

(Helbling et al. 1994). Cette étude a permis de démontrer que, comparativement aux tubes statiques, le mélange vertical simulé pouvait augmenter l'inhibition de la photosynthèse lorsque l'effet du rayonnement UV était considéré sur toute la profondeur de la colonne d'eau (production intégrée verticalement) (Helbling et al. 1994). Sous ces conditions de mélange simulé, la photoinhibition s'est produite très rapidement et la réparation était absente ou faible, suggérant l'application du concept de réciprocité (i.e. le dommage est une fonction linéaire de la dose cumulative reçue) pour de courtes périodes de temps. Or, l'inhibition de la photosynthèse à la surface était tellement forte que les réponses sont devenues non linéaires (le concept de réciprocité ne pouvant plus s'appliquer) pour les expositions dépassant 30 minutes (Helbling et al. 1994) et le phytoplancton échoua à maintenir des taux de photosynthèse élevés lors de brèves expositions près de la surface. Sous ces conditions mélangées, les cellules endommagées près de la surface ont été remplacées par de nouvelles cellules provenant de zones plus profondes et qui ont été endommagées à leur tour. Puisque la réparation était faible sous ces conditions, les cellules endommagées transportées loin de la couche de surface n'étaient pas réparées et les effets du rayonnement UV se sont accumulés donnant une inhibition de la photosynthèse intégrée verticalement plus importante sous des conditions mélangées que sous des conditions stratifiées. Sous les conditions statiques, l'inhibition par le rayonnement UV était sévère mais les effets se limitaient seulement à la partie de la colonne d'eau située près de la surface. La photosynthèse a diminué en fonction du temps en suivant une courbe exponentielle (le concept de réciprocité ne s'appliquant pas) avec un effet net du rayonnement UV plus marqué au début de l'exposition que vers la fin (Neale et al. 2003).

Le degré d'exposition au rayonnement UV du phytoplancton dépend donc de plusieurs facteurs environnementaux comme par exemple la formation de thermoclines temporaires près de la surface de l'eau qui prolongent le temps de résidence du phytoplancton près de la surface. Comme ces périodes de stratification coïncident généralement avec des périodes de forts éclairagements solaires, le phytoplancton est alors soumis à de fortes doses de rayonnement UVB. De la même manière, le phytoplancton soumis à des conditions de mélange peu profond ou alors formant un bloom près de la surface de la colonne d'eau sera exposé à de fortes irradiances de rayonnement UVB (Neale et al. 1998b).

### **1.12 L'ÉTUDE DE COMMUNAUTÉS PHYTOPLANCTONIQUES NATURELLES PAR L'APPROCHE EN MÉSOCOSMES**

Bien qu'elles soient indispensables à la compréhension des réponses physiologiques du phytoplancton à l'exposition au rayonnement UVB, les études *in vitro* sur des cultures monospécifiques ne sont pas représentatives des conditions environnementales naturelles. Il est notamment impossible de reproduire les conditions lumineuses naturelles, incluant leur variabilité liée à différents facteurs dont le mélange vertical affectant la position des algues. Conséquemment, les résultats issus de travaux effectués en laboratoire peuvent difficilement être extrapolés à l'environnement naturel (Vincent & Roy 1993, Cullen & Neale 1994). Dans cette optique, les expériences en mésocosmes prennent tout leur intérêt, puisque de telles unités expérimentales permettent entre autres d'utiliser un éclairage solaire naturel, de reproduire des conditions de mélange (Belzile et al. 1998) mais aussi d'étudier les modifications de la structure de la communauté phytoplanctonique (Mostajir

et al. 1999, Wängberg et al. 1999) et dans certains cas, les différents niveaux trophiques (bactéries; Chatila et al. 1999, mésozooplancton; Mostajir et al. 1999). De plus, elles permettent de contrôler, jusqu'à un certain point, les conditions expérimentales.

### **1.13 LES SITES EXPÉRIMENTAUX VISITÉS**

Dans le cadre d'une étude plus vaste effectuée à l'échelle continentale des Amériques et visant à examiner la réponse des écosystèmes marins, d'eau douces et côtiers à l'augmentation du rayonnement UV, des sites expérimentaux situés à des latitudes différentes ont été considérés. Pour le présent travail, un site tropical (Ubatuba, Brésil), deux sites tempérés (Rimouski, Canada et Ushuaia, Sud de l'Argentine) et un site polaire (Île Observatorio, Antarctique) ont été visités. Ces sites présentent des caractéristiques physico-chimiques qui leur sont propres ce qui confère un caractère unique aux assemblages phytoplanctoniques qui s'y trouvent. Par exemple, l'intensité lumineuse est beaucoup plus intense aux tropiques qu'aux hautes latitudes alors que le rayonnement UVB peut périodiquement s'intensifier à Ushuaia et en Antarctique lors des épisodes de déplétion de la couche d'O<sub>3</sub>. L'eau des milieux tempérés et du site polaire étudié est caractérisée par sa température plus faible et son caractère méso-eutrophe alors que celle du milieu tropical (Ubatuba) est beaucoup plus chaude et plus oligotrophe. La colonne d'eau du milieu tropical est caractérisée par la présence d'une stratification qui confine les organismes photosynthétiques près de la surface sous de fortes intensités lumineuses alors que celle des milieux tempérés et du milieu polaire est plus fréquemment soumise à des

processus de mélange, lequel modifie la durée de l'exposition aux intensités lumineuses de surface et influence l'irradiance moyenne à laquelle ces organismes sont exposés.

Afin d'étudier la réponse du phytoplancton à l'augmentation du rayonnement UVB, des expériences en mésocosmes ont été effectuées aux deux sites tempérés et au site tropical. À chacun de ces sites, deux traitements de lumière ont été testés, soient : la lumière naturelle ambiante et la lumière naturelle ambiante additionnée d'une forte dose de rayonnement UVB. Afin d'étudier l'importance de la synthèse de la protéine D1 pour le maintien de l'efficacité photochimique, des incubations de courte durée combinées à l'utilisation de lincomycine ont été effectuées à l'intérieur même de certains mésocosmes. D'autres incubations de courte durée, combinées dans ce cas-ci à l'ajout de nutriments, ont également été effectuées avec les communautés phytoplanctoniques provenant du site méso-eutrophe de Rimouski et du site oligotrophe d'Ubatuba afin de comparer l'influence du statut nutritionnel sur la sensibilité du phytoplancton au rayonnement UVB. Au site polaire, des incubations de courte durée ont également été effectuées en présence de lincomycine mais les unités expérimentales, à ce site, ont été incubées directement sous la surface de l'eau plutôt qu'à l'intérieur de mésocosmes. Les traitements lumineux testés en Antarctique étaient la lumière naturelle ambiante et la lumière naturelle ambiante sans les longueurs d'onde comprises dans la gamme du rayonnement UVB.

#### **1.14 LES OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES DE CETTE ÉTUDE**

L'objectif général du présent projet doctoral vise à vérifier l'effet du rayonnement UVB sur la réponse photosynthétique de communautés phytoplanctoniques naturelles et d'évaluer



plus spécifiquement l'effet du rayonnement UVB sur la protéine D1 qui joue un rôle crucial au sein du processus de réparation du PSII.

Le premier objectif spécifique de cette étude consiste à examiner l'influence de l'augmentation du rayonnement UVB sur le cycle de réparation du PSII impliquant la protéine D1 de communautés phytoplanctoniques naturelles provenant de deux sites tempérés et d'un site tropical. L'hypothèse de travail stipule que *l'exposition de communautés phytoplanctoniques naturelles à de fortes intensités de rayonnement UVB (mais aussi de PAR et de rayonnement UVA) devrait augmenter le dommage net à la protéine D1.*

Le second objectif spécifique de cette étude consiste à étudier l'influence du rayonnement UVB local en Antarctique sur l'activité photochimique des communautés phytoplanctoniques en supprimant les longueurs d'ondes comprises dans la gamme du rayonnement UVB. L'hypothèse de travail stipule que *la suppression du rayonnement UVB devrait limiter le dommage net à la protéine D1, permettre le maintien du processus de réparation du PSII et permettre un maintien plus efficace de l'activité photosynthétique.*

Le troisième objectif spécifique de cette étude consiste à étudier l'influence du statut nutritionnel sur la sensibilité au rayonnement UVB en comparant les réponses du phytoplancton tempéré de Rimouski au phytoplancton tropical d'Ubatuba. Comme la limitation en azote peut affecter la synthèse de protéines essentielles telles que la protéine D1, la sensibilité au rayonnement UVB, au niveau de l'activité photosynthétique, devrait varier en fonction du statut nutritionnel du phytoplancton. L'hypothèse de travail stipule que *l'ajout de nitrate à des communautés limitées en azote devrait permettre une*

*augmentation des pools de protéine D1, aider au maintien de l'activité photosynthétique et diminuer la sensibilité au rayonnement UVB.*

Le quatrième et dernier objectif spécifique de cette étude consiste à effectuer une comparaison inter-latitudinale quant à l'importance du cycle de réparation du PSII pour le maintien de l'activité photosynthétique. L'hypothèse de travail stipule que *le cycle de réparation du PSII impliquant la protéine D1 n'a pas la même importance pour les communautés phytoplanctoniques naturelles des quatre sites expérimentaux étudiés : la dégradation et la re-synthèse (turnover) de la protéine D1 devraient être plus lents pour les communautés phytoplanctoniques des milieux tempérés et polaire et plus rapides pour les communautés phytoplanctoniques du milieu tropical en vertu de l'intensité lumineuse plus forte et de la température de l'eau plus élevée à ce site.*

**2. EFFECTS OF UVB RADIATION ON THE D1 PROTEIN REPAIR CYCLE OF  
NATURAL PHYTOPLANKTON COMMUNITIES FROM THREE  
LATITUDES (CANADA, BRAZIL, ARGENTINA)**

*Bouchard JN, Campbell DA & Roy S*

*Journal of Phycology* 2005, 41 : 273-286.

## 2.1 RÉSUMÉ

L'objectif spécifique de cette première étude était d'examiner l'effet de l'augmentation du rayonnement UVB sur le cycle de réparation du PSII, impliquant la protéine D1, chez des communautés phytoplanctoniques naturelles provenant de Rimouski (Canada), Ubatuba (Brésil) et Ushuaia (Argentine). À chacun des trois sites, six mésocosmes d'environ 2000 L chacun ont été remplis d'eau de mer locale et immergés dans la colonne d'eau le long d'un quai. L'eau contenue à l'intérieur des mésocosmes était mélangée à l'aide de pompes (taux de mélange  $\sim 1$  h). Trois des six mésocosmes étaient exposés à la lumière naturelle ambiante (NUVB) alors que les trois autres mésocosmes étaient soumis à la lumière naturelle ambiante additionnée d'une forte dose de rayonnement UVB correspondant à une déplétion d'ozone locale de 60% (HUVB). L'évolution des communautés phytoplanctoniques confinées à l'intérieur des mésocosmes a été suivie sur une période de 7 à 10 jours. À chacun des trois sites visités, l'ajout de rayonnement UVB n'a eu aucun effet significatif comparativement au traitement de lumière ambiante ni sur la biomasse algale (chlorophylle *a*) ni sur le rendement quantique de la photosynthèse ( $F_v/F_m$  après 45 min d'obscurité) ce qui suggère la présence de mécanismes actifs de protection ou de réparation contre le rayonnement ultraviolet (UV). Afin d'examiner le rôle du turnover de la protéine D1, lequel est essentiel à la réparation du photosystème II (PSII), des incubations de surface de courte durée ( $\leq 3$  h) ont été effectuées à chacun des sites visités. Ces incubations ont été effectuées en absence ou en présence de lincomycine, un inhibiteur de synthèse des protéines encodées dans le chloroplaste telles que la protéine D1. Les effets

du rayonnement UVB sur le PSII ont été déterminés en utilisant la fluorescence *in vivo* de la chlorophylle *a* (chl *a*) alors que la protéine D1 a été détectée par immunochimie. Lorsque la synthèse de la protéine D1 a été bloquée par la lincomycine (absence de réparation du PSII), les pools de protéine D1 ainsi que les valeurs de  $F_v/F_m$  ont chuté de façon similaire sous les deux traitements de lumière. En absence de lincomycine (présence de réparation du PSII), les pools de D1 ont diminué plus rapidement sous le traitement de lumière HUUVB comparativement au traitement de lumière NUUVB alors que le  $F_v/F_m$  s'est maintenu sous les deux traitements de lumière étudiés. Ces résultats suggèrent que l'exposition de populations phytoplanctoniques naturelles au traitement de lumière HUUVB a un effet plus marqué sur la synthèse de la protéine D1 et la réparation du PSII plutôt qu'au niveau du dommage causé à la D1. Malgré la diminution des pools de protéines D1 sous HUUVB, les centres réactionnels ont été capables de maintenir leur efficacité photochimique soit par une acclimatation au HUUVB ou alors par une récupération lors de la période d'obscurité imposée avant la mesure du  $F_v/F_m$ . Au niveau latitudinal, le dommage net (dommage – réparation) à la protéine D1 était plus rapide au site tropical où la forte irradiances a endommagé rapidement la D1 malgré la température élevée de l'eau qui permet des activités enzymatiques de réparation accélérées. Cette étude démontre le rôle crucial des changements dynamiques de la protéine D1 dans la photobiologie des communautés phytoplanctoniques naturelles de trois latitudes.

## 2.2 ABSTRACT

UV effects were examined in natural phytoplankton communities from Rimouski (Canada), Ubatuba (Brazil) and Ushuaia (Argentina). Outdoor pump-mixed mesocosms were submitted to ambient solar radiation ( $N_{\text{atural}}$  UVB), and ambient with additional UVB from lamps ( $H_{\text{igh}}$  UVB), corresponding to a local 60% ozone depletion scenario. At all sites, neither algal biomass nor dark-adapted  $F_v/F_m$  were significantly affected by additional UVB, suggesting the presence of active UV-protection or repair mechanisms. To examine the role of D1 protein turnover, essential for PSII repair, short-term surface incubations were performed in the presence or absence of lincomycin, a chloroplast protein synthesis inhibitor. Effects on PSII were determined using chlorophyll *a* *in vivo* fluorescence while the D1 protein was detected immunochemically. In the absence of D1 repair, D1 pools and  $F_v/F_m$  decreased to a similar extent under both light treatments. In the presence of D1 repair, D1 pools suffered faster net degradation under HUVB compared to NUVB while  $F_v/F_m$  was maintained for both light treatments suggesting that HUVB exposure in field populations had more effect on D1 synthesis and PSII repair than on D1 degradation. The fewer undamaged reaction centers remaining in phytoplankton under HUVB were able to maintain  $F_v/F_m$  or actually recovered during the dark acclimation prior to  $F_v/F_m$  measurements. D1 pools suffered faster net degradation at the tropical site where high irradiance drove faster D1 degradation despite the high water temperature which enabled fast enzymatic activities. This study shows the crucial role of dynamic changes in D1 turnover in the photobiology of natural planktonic communities across a range of latitudes.

## 2.3 INTRODUCTION

Concomitant with the capture of long wavelength radiation to drive photosynthesis, near surface aquatic photosynthetic organisms are also exposed to ultraviolet radiation (UV). Due to episodic stratospheric ozone (O<sub>3</sub>) reductions occurring over Antarctica (Farman et al. 1985) and other latitudes (Stolarski et al. 1992) these organisms are exposed to an episodically variable flux of ultraviolet B radiation (UVB: 280-320 nm) (Kerr and McElroy 1993), relative to photosynthetically active radiation (PAR). Although UVB is attenuated in the water column (Smith & Baker 1979) it can penetrate to ecologically significant depths (Jerlov 1950, Fleischmann 1989) and affect phytoplankton (Smith et al. 1992). UVB can cause damage directly via the photochemical degradation of biomolecules such as nucleic acids and proteins or indirectly via the production of reactive oxygen species (ROS) which cause oxidative damage to the cell (reviewed in Vincent & Neale 2000). This damage subsequently affects essential physiological processes in phytoplankton (Vincent & Roy 1993, Davidson 1998) and can result in photoinhibition of photosynthesis (Long et al. 1994).

At the cellular level, one of the main targets of photoinhibition is the photosystem II (PSII) complex (Melis et al. 1992, Adir et al. 2003). There are several possible sites of damage in the PSII reaction center (RC) complex (Vass et al. 1992, Bumann & Oesterhelt 1995, Anderson et al. 1997), and many of them are associated with the D1 protein, an essential component of PSII which binds the primary donors and acceptors active in PSII electron transport. The D1 protein has an unusually rapid, light-dependent turnover (Mattoo

et al. 1984, Prásil et al. 1992) because it is central to the PSII repair cycle (Aro et al. 1993a). In the light, PSII suffers photoinactivation of electron transport with concomitant damage to the D1 protein, followed by proteolytic release of the damaged D1 protein from a partly disassembled PSII complex, *de novo* synthesis of the protein and the incorporation of the new D1 into a reassembled PSII complex (Aro et al. 1993a). In this cycle, photoinactivation of the PSII electron transport precedes the degradation of the D1 protein (Prásil et al. 1992, Aro et al. 1993a, Baker et al. 1997). The extent of photoinhibition in this model reflects a balance between damage of the D1 protein and recovery of PSII function through replacement of the damaged D1 protein with a newly synthesized D1 (Prásil et al. 1992, Aro et al. 1993a).

Photoinactivation of PSII is typically investigated using rapid and non-invasive chlorophyll *a* (chl *a*) fluorescence analyses. Improvements to fluorescence instrumentation now allow investigation of natural phytoplankton communities with low biomasses (Schreiber et al. 1993). A decrease in the maximum quantum yield of PSII, measured as dark-adapted  $F_v/F_m$ , is an indicator of photoinhibition or down-regulation of PSII (Critchley 2000). Studies of natural phytoplankton communities using the fluorescence technique provided insights on the effects of UV on PSII photoinhibition (Vassiliev et al. 1994, Lesser et al. 1996, Bracher & Wiencke 2000, Bergmann et al. 2002). There are, however, no complementary analyses of the D1 protein pools of natural phytoplankton communities, in part because the diversity of phytoplankton assemblages complicates the application of molecular detection tools. Several studies have examined the D1 repair cycle under UVB exposure in culture and/or on specific species of cyanobacteria (e.g. Campbell et al. 1998a),



micro- and macroalgae (e.g. Xiong 2001, van de Poll et al. 2003) and plants (e.g. Wilson & Greenberg 1993, Barbato et al. 2000). These studies, however, have limited relevance to mixed natural communities of phytoplankton because they are limited to single species and fail to reproduce the natural variability of underwater light penetration.

UV sensitivity of phytoplankton is affected by the light history of the cells (Ivanov et al. 2000, MacDonald et al. 2003) which in turn is influenced by the mixing regime prevailing in the water column. Therefore, a mesocosm approach is useful for investigation of UV effects on natural phytoplankton communities since it allows some control of the experimental conditions, while retaining the whole phytoplankton community and simulating mixing (Belzile et al. 1998). In order to examine the UVB response at three latitudes (one tropical and two temperate environments), mesocosm experiments were performed using local seawater. The impact of natural and enhanced UVB on natural phytoplankton communities was examined over a period of 7 to 10 days. The recent development of global antibodies for the detection of protein pools from mixed communities (Campbell et al. 2003) allowed us to examine the D1 protein pools of these different phytoplankton communities. As part of these larger mesocosm experiments, short-term incubations were performed inside selected mesocosms. The goal of these short-term incubations was to examine the relationship between photoinhibition and the D1 turnover-mediated repair cycle, the response of the D1 turnover to enhanced UVB and latitudinal variability in this response.

## 2.4 MATERIALS AND METHODS

*Experimental sites.* The first 10-day mesocosm experiment was conducted at the marina of Rimouski (Quebec, Canada, 48°.30' N, 68°.29' W) in the lower St. Lawrence Estuary from 18 to 27 June 2000. The second 7-day mesocosm experiment was conducted at the marina (Saco da Ribeira) of Ubatuba (Brazil, 23°.45' S, 45°.06' W) from 10 to 16 February 2001. The third 10-day mesocosm experiment was performed in a Beagle Channel bay near the town of Ushuaia (Tierra del Fuego, Argentina, 54°.47' S, 68°.20' W) from 6 to 15 November 2001.

*Experimental set-up.* At all three experimental sites six cylindrical mesocosms (in Rimouski: 2000 L; 2.30 m x 1.16 m [filled volume; overall depth x diameter]; in Ubatuba: 1800 L; 1.90 m x 1.16 m; in Ushuaia: 1900 L; 2.40 m x 1.16 m) were attached to a wharf and immersed in the water column. These mesocosms were made of clear polyethylene that transmitted 85 to 93% of light in the 280 to 750 nm range. At all sites, mesocosms were filled one day prior to the beginning of the experiment. In Rimouski, water was collected at 5 m from the surface in the St. Lawrence Estuary, off the coast of Rimouski, using a pump (model 13D-19, Gorman-Rupp of Canada Ltd., St. Thomas, Ontario, Canada). Water was then transported on board the *Alcide C. Horth* to the experimental site in pre-washed, open plastic bins and a portable outdoor pool. In Ubatuba, coastal seawater was collected at 8 m from the surface using the same pump used for the Rimouski experiment. Water was transferred in pre-washed outdoor pools located on the deck of a schooner and transported

to the experimental site. In Ushuaia, seawater was collected at 2 m from the surface beside the wharf using a submersible electropump (model Best 3M, Ebara Italia S.P.A., Cles, TN, Italia). In Rimouski and Ubatuba, water was transferred by gravity from the bins and the pools to a 200 L barrel while in Ushuaia the water was pumped directly into this barrel, which was fitted with six plastic tubes at the bottom which drained by gravity into the mesocosms, ensuring simultaneous filling of all mesocosms. This system was intended to provide homogeneity between the mesocosms and to minimize the disturbance to the organisms in the sample. To exclude large grazers, the seawater was screened through a 500  $\mu\text{m}$  Nitex™ mesh that was installed over the 200 L barrel. In Ushuaia, nutrient enrichment was done while filling (since nutrient concentrations determined prior to the experiment indicated that levels were too low to sustain a 10-day experiment). A 2-L solution containing 2.0  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$  and 3.3  $\mu\text{M}$   $\text{Si}(\text{OH})_4$  was injected into the distributing barrel. Subsequent nutrient determination revealed that nutrients were equally distributed among mesocosms (4.3  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , 3.8  $\mu\text{M}$   $\text{Si}(\text{OH})_4$ ). For all three mesocosm experiments, continuous mixing within the mesocosms was induced by water pumping (turnover rate of 1 h) using Little Giant® pumps (model 2-MD-HC, Oklahoma City, OK, USA). Water intake was located between 25 and 55 cm below the mesocosm surface and the outflow was located at the bottom of the mesocosms for all three experiments.

*Light treatments.* At all sites, two different light treatments (three replicates per treatment) were tested: natural ambient irradiance (NUVB) and, natural irradiance plus increased UVB (HUVB) equivalent to a 60% ozone depletion at the respective sites (Díaz et al. 2003).

UVB enhancement was provided by four UVB fluorescent light tubes (TL40 W/12RS, Philips, Markham, Ontario, Canada). These fluorescent light tubes were suspended at 30-40 cm above the water surface and were preburned for >100 h prior to the experiments. Wavelengths shorter than 290 nm (UVC radiation) were screened out by cellulose diacetate film replaced daily. To ensure equal shading effects, 4 wooden dummy lamps were suspended over the NUVB mesocosms. In Rimouski, lamps were turned on from 10:00 to 15:00 starting on day 1, while in Ushuaia, they were on from 11:00 to 16:00 starting on day 3. In Ubatuba, UVB radiation emitted by the fluorescent light tubes was adjusted using dimming ballasts (FDB4843-120-2, Lutron Electronics, Inc., Coopersburg, PA, USA) controlled by computer using an electronic unit linked to UVB detectors (model SUD240/SPS300/T/W, International Light, Inc., Newburyport, MA, USA). One mesocosm per treatment was equipped with a UVB detector. These detectors were cross-calibrated before the experiment. The electronic unit continuously compared HUVB with NUVB readings and provided a constant proportional enhancement of UVB, following the natural variations of ambient UVB throughout the day. At all sites, surface water temperature was continuously measured using thermocouples (type "J") connected to a data logger (21X, Campbell Scientific, Inc., Edmonton, Alberta, Canada). Surface salinity was determined daily using an AutoSal salinometer (model #8400, Guildline Instruments, Inc., Lake Mary, FL, USA) in Rimouski, a Beckman salinometer (model #R10, Beckman Instruments, Inc., Richmond, CA, USA) in Ubatuba and a CTD (Micro-CTD 3, Falmouth Scientific, Inc., Cataumet, MA, USA) in Ushuaia.

*Light measurements.* Incident PAR, UVA and UVB were recorded every minute using an IL1700 radiometer (International Light, Inc.) equipped with PAR (SUD033/PAR/W), UVA (SUD033/UVA/W) and UVB (SUD240/SPS300/T/W) sensors. Incident solar radiation was also recorded for wavelengths 305, 313, 320, 340, 380 nm and PAR every 10 min using a GUV510 surface radiometer (Biospherical Instruments, Inc., San Diego, CA, USA). Irradiance throughout the water column was measured every day in the center of the mesocosms with a PUV profiling radiometer (Biospherical Instruments, Inc., model 542T in Rimouski and Ubatuba and model 500 in Ushuaia) at 10:00, 12:30 and 14:30 in Rimouski, at 10:00, 13:00 and 16:00 in Ubatuba, and at 11:00, 13:15 and 15:30 in Ushuaia. Simultaneous incident irradiance was given by the surface radiometer (GUV541 in Rimouski and Ubatuba). In Ushuaia, incident solar radiation was estimated using a multivariate model from the SUV-100 (Biospherical Instruments, Inc.) installed on the roof of CADIC (Centro Austral de Investigaciones Científicas, Argentina) which is located five km from the experimental site (Díaz et al. 2003). Before the experiments, the IL1700, the GUV541 and the PUV-542T were calibrated at their respective factories. The IL PAR and the GUV PAR were always cross calibrated before each experiment. The SUV at Ushuaia, which belongs to the same network as the spectroradiometer at Biospherical Instruments, Inc. was calibrated with the same standard lamp as the SUV in San Diego and used for calibration of the GUV producing a cross-calibration of the GUVs with the SUV at Ushuaia. For each site, the mean  $Q_{UVB}/Q_{Total (UVB+UVA+PAR)}$  ratio around noon was calculated by integrating the irradiance between 280 and 320 nm ( $Q_{UVB}$ ) and dividing it by the integrated irradiance between 280 and 700 nm ( $Q_{Total (UVB+UVA+PAR)}$ ). At each experimental

site, the average daily irradiance below the water surface ( $\bar{I}_0$ ,  $\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}$  for UV and  $\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}$  for PAR) was calculated as described in Belzile et al. (1998). The vertical attenuation coefficient ( $K_d$ ,  $\text{m}^{-1}$ ) and mean depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}$ , m) were also determined for UVB (305 nm), UVA (340 nm) and PAR (400-700 nm).

*Mesocosm core sampling.* Mesocosms were sampled daily between 7:00 and 7:30 (local time) at each experimental site using the circulating pump. For Ubatuba, only two of three mesocosms submitted to the HUVB light treatments were considered as a phytoplankton bloom developed in the third HUVB mesocosm, while none developed in the remaining five.

*Photopigment analyses.* Samples were filtered on 25 mm GF/F filters (Whatman, Maidstone, UK), which were then frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at  $-80^\circ\text{C}$ . For the Ubatuba and Ushuaia experiments, samples were sent from the experimental site to Rimouski by dry-shipper. Methanol extraction of pigments present on GF/F filters was followed by HPLC according to Wright et al. (1991) as modified by Roy et al. (1996) for Rimouski samples, and using the method of Zapata et al. (2000) for Ubatuba and Ushuaia samples.

*Fluorescence measurements.* Chl *a* fluorescence induction was measured daily using a Xenon-Pulse Amplitude Modulated Fluorometer (Xe-PAM, Walz, Effeltrich, Germany). Prior to the analysis, phytoplankton samples were kept at *in situ* temperature and were dark

adapted for at least 45 min to allow for relaxation of non-photochemical quenching. Minimal fluorescence ( $F_0$ , measured after a dark adaptation period) was first determined on phytoplankton samples and then a 600 ms pulse of saturating white light ( $\sim 4000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) was administered (saturation flash lamp, Schott Inc., Mainz, Germany) in order to measure maximum fluorescence ( $F_m$ ). These values were then used (van Kooten & Snell 1990) to estimate the quantum yield of PSII photochemistry,  $F_v/F_m$ , as:

$$F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$$

*Inhibition of repair by lincomycin treatment - Short-term incubations.* At all three experimental sites, short-term incubations were performed in one NUVB mesocosm and one HUVB mesocosm. Small (2-2.5 L) plastic bags were statically incubated near the surface of the respective mesocosms for short periods of time (up to 3 h). The plastic bags used were UV transparent Ziploc-type bags that transmit 86 to 94% of light at 280-750 nm. Short-term incubations were performed in the presence of lincomycin ( $400 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  final concentration; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, Ontario, Canada), an inhibitor of RNA translation in prokaryotes (Pestka & Brot 1971) that blocks the synthesis of chloroplast-encoded proteins. Consequently there was no *de novo* synthesis of the D1 protein (encoded by the *psbA* gene) to replace the D1 protein damaged and then removed during the PSII repair cycle (Aro et al. 1993b). Short-term incubations were performed repeatedly at each site in order to determine whether the phytoplankton response to UV exposure varied with their changing light history and nutritional status. In Rimouski, short-term incubations were performed on days 5, 7 and 9 for 3 h from 11:00 to 14:00. For each

incubation, 2 L-UV transparent bags were filled with water originating from each of the two pre-described mesocosms. Three bags were treated with lincomycin while three acted as controls. All six bags were removed after 3 h. In Ubatuba, similar short-term incubations were performed on days 3 and 5 for 20 min from 14:00 to 14:20. However, here two bags (one control and one treated with lincomycin) were removed from each of the two mesocosms after 5, 10 and 20 min of incubation. In Ushuaia, short-term incubations were performed on days 4, 6 and 8 and generally lasted 1.5 h from 13:00 to 14:30. In this location, twelve 2.5 L-UV transparent bags were used per mesocosm. Six of these bags were treated with lincomycin with the remaining six bags as controls. After 45 and 90 min of incubation, three control bags and three lincomycin-treated bags were withdrawn from each of the two mesocosms. Every time a bag was withdrawn from the mesocosm, a 10-mL water subsample was dark-adapted and used for determination of  $F_v/F_m$  while the remaining water was filtered on a 47 mm GF/F filter (Whatman) which was then frozen in liquid nitrogen and subsequently stored at  $-80^\circ\text{C}$  for determination of the D1 protein. Whenever possible, sampling was performed simultaneously in the mesocosms as well as in the short-term incubation bags in order to compare results.

*D1 protein detection by immunoblotting.* Total cellular proteins present on frozen GF/F filters were solubilised in 750  $\mu\text{l}$  of extraction buffer (100 mM Tris-base pH 8.3, 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.5% dithiothreitol). Cells were disrupted by 30 s of continuous sonication (model XL2010, Heat Systems, Farmingdale, NY, USA). Samples were kept on ice while sonicating to avoid excess



heating. To denature and solubilise proteins, samples were frozen in liquid nitrogen then heated at 80° C for 5 min in a water bath. This freeze and thaw cycle was repeated three times. Insoluble material was removed by centrifugation at 14 000 g for 6 min. Supernatants containing the solubilised proteins were removed and stored at -80° C until electrophoresis. Serial re-extraction of the remaining filter showed we attained an average yield of D1 protein of 27% ± 11, 60% ± 8 and 71% ± 14 for Rimouski, Ubatuba and Ushuaia, respectively, using this procedure. The proteins were separated on linear 10% SDS-polyacrylamide ReadyGels (BioRad Laboratories (Canada) Ltd., Mississauga, Ontario, Canada) using a Mini-Protean II (BioRad) cell. Comparable chl contents were loaded in each well. The gels were electrophoresed at 100V for 100 min in 25 mM Tris-base, 192 mM glycine and 0.1% SDS. Proteins were then electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (BioRad) in 49 mM Tris-base, 39 mM glycine, 0.04% SDS and 20% methanol in a Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) at 13 V for 25 min. The PVDF membrane was then washed in Tris-buffered saline (TBS-T: 20 mM Tris-base, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20; pH 7.5) and soaked for 1 h at 25° C in a blocking buffer made of 5% low-fat powdered milk in TBS-T. The D1 protein was immunodetected by incubating the membrane with a primary anti-PsbA Global antibody ([www.agrisera.se](http://www.agrisera.se)) diluted 1:4000 in 10 ml of blocking buffer, for 40 min at 25° C. The membrane was further rinsed with TBS-T and incubated with a secondary rabbit anti-chicken IgG antibody conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich Canada Ltd.) diluted 1:4000 in 10 ml blocking buffer, for 40 min at 25° C. The membrane was then rinsed with TBS-T and incubated with ECL Plus (Amersham Biosciences, Inc., Baie d'Urfé, Québec,

Canada) for 5 min at 25° C. The blots were imaged using a Fluor-S-Max™ MultiImager (BioRad) and quantification performed with the Quantity One® software (BioRad). D1 protein concentrations determined by densitometry were used to estimate the half-life ( $t_{1/2}$ ) of the D1 protein when kinetic samplings were performed (at Ubatuba and Ushuaia). Exponential curves were fitted to the D1 data and the exponential decay rate ( $k$ ) was determined from the slope of a straight line in a plot of  $\ln$  (D1 protein value) against incubation time.  $t_{1/2}$  and  $k$  are related by  $t_{1/2} = \ln 2/k$ .

*Statistical analyses.* For the mesocosm experiments, the differences between the two light treatments were tested using repeated measures ANOVAs (SYSTAT, V. 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) with days as the repeated factor. When significant differences were found ( $p < 0.05$ ), Student's  $t$ -tests for independent samples were performed to compare the two light treatments on each separate day. Prior to the ANOVA, normality was checked using a one-sample Kolmogorov-Smirnov test while the sphericity assumption that concerns variance homogeneity was checked using the Huynh-Feldt epsilon (Scheiner & Gurevitch 2001). For Ubatuba, no statistical tests were performed because of lack of variance under the HUVB light treatment (only two mesocosms available). For the short-term incubations performed in Rimouski, two-way ANOVAs were performed for each incubation day with the light and lincomycin treatments acting as factors. When significant differences were detected a Tukey test was performed. For Ushuaia's lincomycin experiments, repeated measures two-way ANOVAs were performed with light and lincomycin treatments acting as factors and incubation time acting as the repeated factor.

When significant differences were present, a two-way ANOVA was performed for each specific incubation time with light and lincomycin treatments acting as factors.

## 2.5 RESULTS

*Ambient and underwater light conditions at experimental sites.* During the experiment in Rimouski, skies were generally sunny or intermittently cloudy except on days 4, 8 and 10 when skies were overcast with short periods of rain in the afternoons. The average noontime maximal incident UVB (305 nm) irradiance was  $\sim 4 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}$ ,  $\sim 50 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}$  for UVA (340 nm) and  $\sim 1750 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  for PAR (Table 1).

In Ubatuba, skies were mostly sunny with clouds on days 2, 5, 6 and 7 and mostly overcast on days 1, 3 and 4 with intermittent rain and heavy showers in the afternoons on days 1 and 3. Average maximal incident irradiance around noon was  $\sim 7 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}$  for UVB,  $\sim 58 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}$  for UVA and  $\sim 1960 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  for PAR (Table 1).

In Ushuaia, skies were overcast for the first three days with snow occurring on day 1. While days 6 and 7 were mostly sunny, clouds and intermittent rain prevailed on days 2, 3, 5 and 9. The average maximal incident UVB and UVA irradiance were respectively  $\sim 3$  and  $\sim 55 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{nm}^{-1}$  and PAR was  $\sim 2000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Table 1).

For all sites, the PAR and the UVA (340 nm) daily irradiance below the water surface ( $\bar{I}_0$ ) were similar for both light treatments but UVB (305 nm)  $\bar{I}_0$ s were greater under HUVB (Table 1). In Rimouski and Ushuaia, UVB  $\bar{I}_0$  was  $\sim 14$  times greater under HUVB than under NUVB while in Ubatuba UVB  $\bar{I}_0$  was  $\sim 4$  times greater under HUVB than under NUVB (Table 1). For all sites, the vertical attenuation coefficients ( $K_d$ ) were generally similar for both light treatments and for all irradiances (not shown). The mean depths of 1%

Table 2.1 Daily maximal noontime ambient irradiance (Max. Amb. Irrad.; min; max) averaged for the 7 or 10 days of the experiments performed in Rimouski, Ubatuba and Ushuaia for UVB (305 nm), UVA (340 nm) and PAR (400-700 nm); average  $Q_{UVB}/Q_{total}$  (UVB+UVA+PAR) ratio (min; max); ozone concentration ( $O_3$ ); average daily irradiance below the water surface ( $\bar{I}_0$ ; min; max) for 305 nm under NUVB and HUVB and for 340 nm and PAR; mean depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}$ ) calculated for 305 nm, 340 nm and PAR; surface water temperature (T) and salinity (S).

	RIMOUSKI	UBATUBA	USHUAIA
<b>Max Amb. Irrad. (min, max)</b>			
305 nm ( $\mu W \cdot cm^{-2} \cdot nm^{-1}$ )	4 (1; 6)	7 (4; 9)	3 (2.5; 3)
340 nm ( $\mu W \cdot cm^{-2} \cdot nm^{-1}$ )	50 (19; 63)	57 (37; 72)	55 (52; 58)
PAR ( $\mu mol \text{ photons} \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ )	1750 (610; 2200)	1960 (1200; 2500)	2000 (1800; 2200)
$Q_{UVB}/Q_{total}$ (UVB+UVA+PAR)	0.008 (0.005; 0.009)	0.007 (0.006; 0.007)	0.005 (0.004; 0.006)
<b><math>O_3</math> (DU)</b>	303-365	274-285	320-373
<b>Daily <math>\bar{I}_0</math></b>			
305 nm ( $kJ \cdot m^{-2} \cdot nm^{-1}$ )			
NUVB	0.37 (0.15; 0.51)	0.61 (0.32; 0.83)	0.22 (0.15; 0.26)
HUVB	5.03 (2.05; 7.01)	2.36 (1.26; 3.24)	3.10 (2.18; 3.62)
340 nm ( $kJ \cdot m^{-2} \cdot nm^{-1}$ )	7.62 (4.01; 9.36)	6.00 (3.21; 8.32)	6.14 (4.91; 6.91)
PAR ( $mol \text{ photons} \cdot m^{-2}$ )	24.40 (12.61; 30.50)	16.57 (7.76; 24.96)	15.93 (11.85; 18.27)
<b><math>Z_{1\%}</math> (m)</b>			
305 nm	$0.72 \pm 0.04$	$1.88 \pm 0.09$	$2.55 \pm 0.23$
340 nm	$1.31 \pm 0.09$	$2.62 \pm 0.26$	$4.00 \pm 0.32$
PAR	$6.76 \pm 0.66$	$6.73 \pm 1.57$	$14.55 \pm 1.69$
<b>T (<math>^{\circ}C</math>)</b>	9.0-12.8	30.0	6.2-8.6
<b>S (PSU)</b>	~26	~34	~32

light penetration ( $Z_{1\%}$ : calculated as  $4.6/K_d$ ) for all incubation days show that PAR irradiance reached the bottom of the mesocosms in Rimouski while UVA and UVB reached only the upper half and third respectively (Table 1). In contrast, in Ubatuba and Ushuaia, the mean depth of 1% light penetration for PAR, UVA and UVB irradiances reached the bottom of the mesocosms (Table 1).

*Effects of UVB enhancement on mixed phytoplankton communities.* For samples taken from the mixed mesocosms, there was no significant difference ( $p > 0.05$ ) (except for one specific day) in chl biomass and  $F_v/F_m$  measurements between the NUVB and the HUVB light treatments (Table 2, Fig. 1). These results are therefore described without distinction between the two light treatments.

In Rimouski a bloom (Fig. 1A) developed in the mesocosms as nutrients were consumed;  $\text{NO}_3^-$  levels decreased from  $\sim 15 \mu\text{M}$  to undetectable levels on day 7. The bloom was dominated by diatoms (mostly *Chaetoceros* spp. and *Thalassiosira* spp.). Small phytoflagellates ( $< 5\mu\text{m}$ ) and green microalgae were also present and their concentrations increased as the diatom bloom declined. The quantum yield of photochemistry decreased from 0.13 on day 1 to 0.05 on day 3, suggesting photoinhibition. On day 4, however,  $F_v/F_m$  values increased to 0.40, in parallel with a chl increase on that day, and then remained between 0.45 and 0.50 until the end of the experiment (Fig. 1B).

In tropical Ubatuba, no distinct phytoplankton bloom developed in the mesocosms considered (Fig. 1C) because of low nutrient concentrations;  $\text{NO}_3^-$  remained less than  $1.8 \mu\text{M}$ . Phytoplankton were dominated by small phytoflagellates ( $< 5\mu\text{m}$ ) during the whole

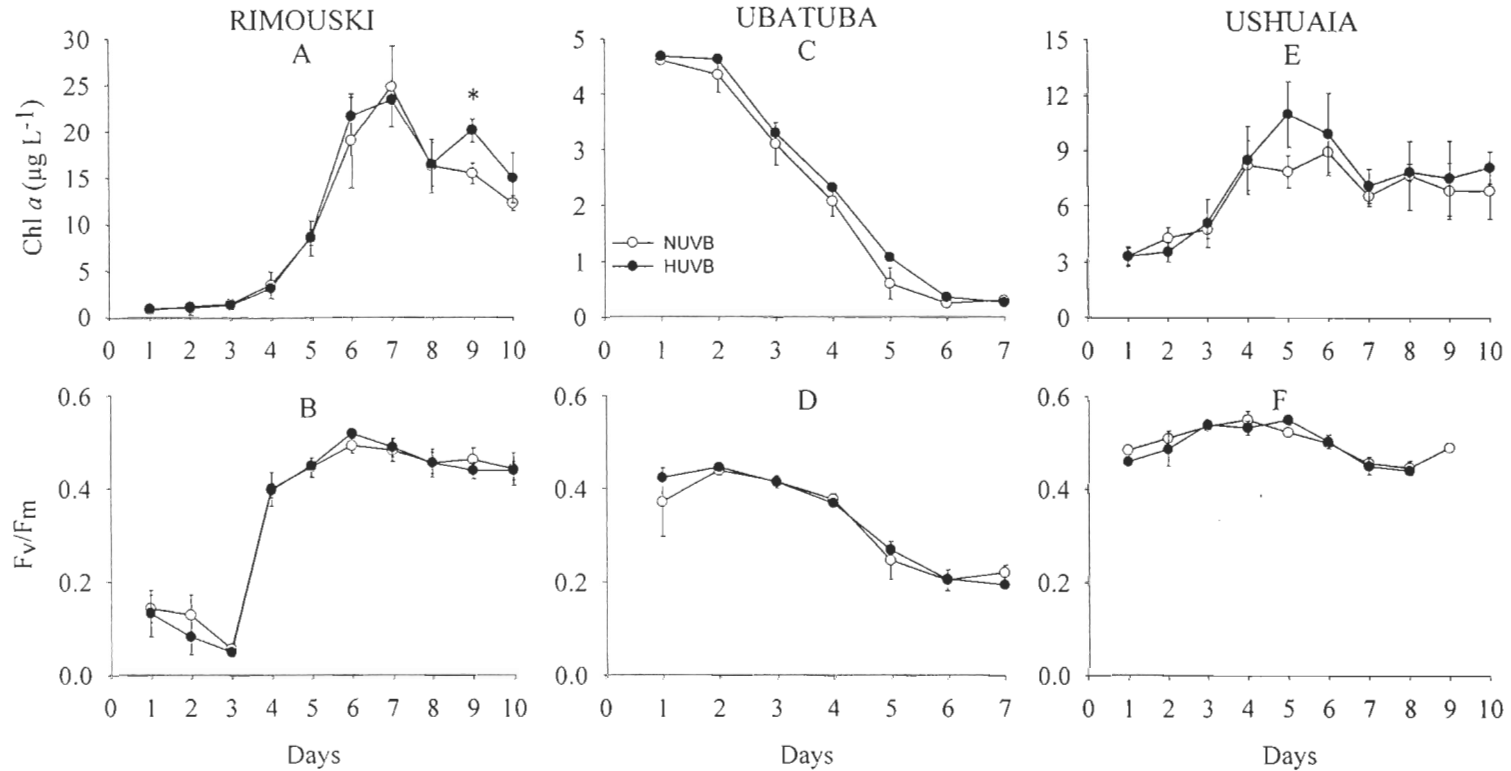


Figure 2.1 Temporal variations of chl *a* ( $\mu\text{g}\cdot\text{chl } a \text{ L}^{-1}$ ) concentrations and maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) from day 1 to 10 (18 to 27 June, 2000) in Rimouski (A, B respectively); from day 1 to day 7 (10 to 16 February, 2001) in Ubatuba (C, D respectively) and from day 1 to day 10 (6 to 15 November, 2001) in Ushuaia (E, F respectively). Treatments were natural UVB (NUVB) and enhanced UVB (HUVB). Values are the means  $\pm$  SD of three replicate mesocosms except for the HUVB light treatment in Ubatuba where values are the means of two replicates. \* indicates a significant difference between the light treatments at  $p \leq 0.05$ .

Table 2.2 Results obtained from the repeated-measures ANOVA for the chl *a* concentrations and  $F_v/F_m$  values measured in the mesocosms in Rimouski and Ushuaia. The source of variation is partitioned into individual effects of the light treatment (UV) and the repeated measure (Time) and its interaction with the light treatment (Time\*UV). \* indicates significance at  $0.01 < p \leq 0.05$ , \*\* at  $0.001 < p \leq 0.01$  and \*\*\* at  $p \leq 0.001$ , ns: not significant.

		UV	Time	Time*UV
RIMOUSKI	Chl <i>a</i>	*	***	ns
	$F_v/F_m$	ns	***	ns
USHUAIA	Chl <i>a</i>	ns	***	ns
	$F_v/F_m$	ns	***	ns



experiment. With time, cyanobacteria (mostly *Johannesbaptista pellucida* (Dickie) Taylor & Drouet) and dinoflagellate concentrations increased while diatom abundance (mostly *Cerataulina* aff. *pelagica*) decreased. Initial  $F_v/F_m$  values near 0.40 increased slightly to near 0.45 from day 1 to day 2. Subsequently,  $F_v/F_m$  values decreased to approx. 0.20 on day 7 (Fig. 1D).

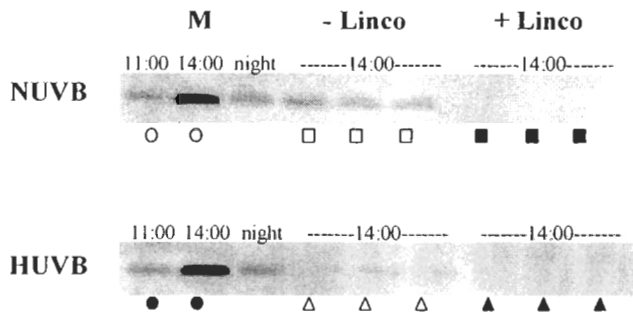
In Ushuaia, the nutrient addition allowed development of a phytoplankton bloom (Fig. 1E). At this site, phytoplankton were dominated by the pennate diatom *Pseudonitzschia* spp., but small phytoflagellates, euglenophytes and cryptophytes were also present. Initial  $F_v/F_m$  values ranged between 0.46 and 0.48, then increased to 0.52-0.55 on day 5 and finally decreased to 0.44 on day 8 (Fig. 1F).

*Inhibition of the in vivo PSII repair cycle by lincomycin – short-term incubations.*

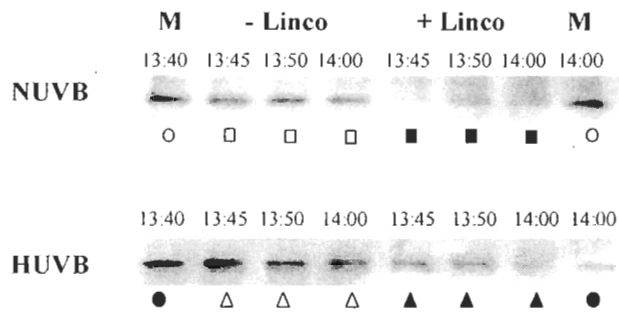
Immunoblots performed on samples from all three experimental sites confirmed net declines in D1 protein pools with time in the presence of lincomycin (Fig. 2). By inhibiting the synthesis of the D1 protein with lincomycin *in vivo*, the repair cycle was blocked, while photoinactivation and subsequent degradation of D1 continued. This was accompanied by consistent decreases in  $F_v/F_m$  at all sites indicating net PSII inactivation.

*Rimouski lincomycin incubations.* Statistical tests showed significant lincomycin effects on  $F_v/F_m$ , no significant light treatment effects and no significant interaction between factors, for each incubation. On day 5 in the NUVB treatment (Fig. 3A), the initial noon time  $F_v/F_m$  value of 0.24 increased during subsequent bag incubations to ~ 0.47 in the presence of

## A) RIMOUSKI



## B) UBATUBA



## C) USHUAIA

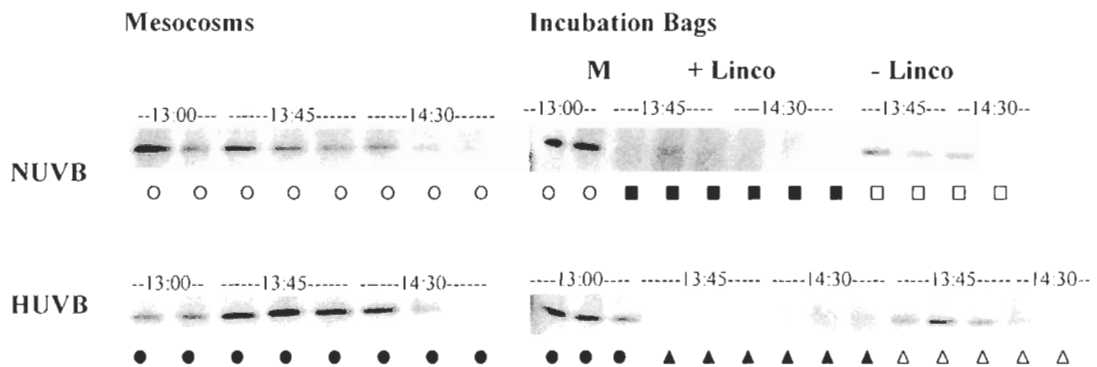


Figure 2.2 Example of D1 protein detection by immunochemistry for both light treatments (NUVB and HUVB), on day 9 for Rimouski (A), on day 3 for Ubatuba (B) and on day 4 for Ushuaia (C). The D1 protein was detected at the times indicated above the bands either inside the mixed mesocosms (M) or inside the surface incubation bags in the absence of lincomycin (- Linco) or in the presence of lincomycin (+ Linco). In Rimouski, the third band (night) was detected at 19:00 but is not illustrated on Fig. 3B, D. Circles represent mesocosm data (open circles: NUVB mesocosms; closed circles: HUVB mesocosms), squares represent incubation bags incubated under the NUVB light treatment (open squares: - Linco; closed squares: + Linco), triangles represent incubation bags incubated under the HUVB light treatment (open triangles: - Linco; closed triangles: + Linco).

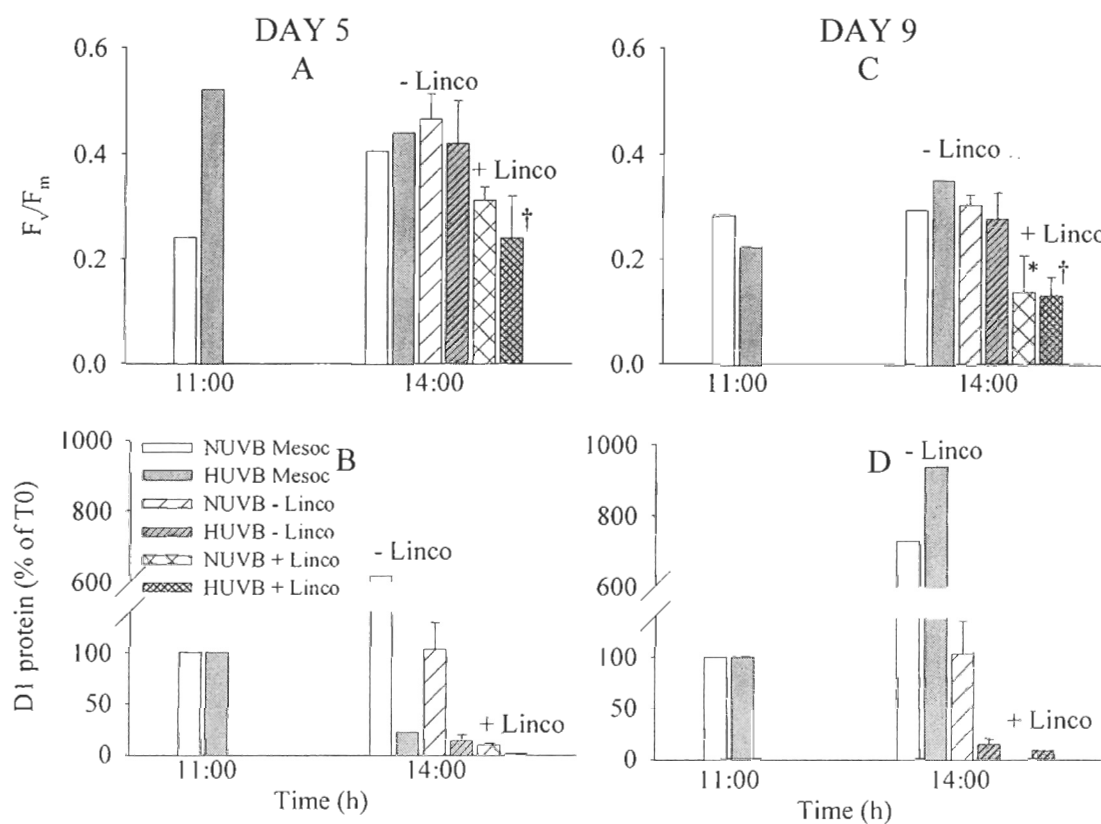


Figure 2.3 Maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) at initial (11:00) and final time (14:00) for incubations performed in Rimouski on days 5 (A) and 9 (C). Treatments were natural UVB (NUVB) and enhanced UVB (HUVB) without lincomycin addition (- Linco) and with lincomycin addition (+ Linco). Values are also shown for the phytoplankton submitted to mixing inside the mesocosms (Mesoc) exposed to both the NUVB and the HUVB light treatments. Values are the means  $\pm$  SD of three replicates except at 11:00 and for the mesocosms (Mesoc). \* denotes a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) between lincomycin treatments under the NUVB light treatment whereas † indicates a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) between lincomycin treatments under the HUVB light treatment. Relative D1 protein amount (relative to initial value) at initial (11:00) and final time (14:00) of each incubation performed in Rimouski on days 5 (B), and 9 (D). Treatments are as described above. No replicate sampling was performed in the mesocosms. For the small incubation bags, however, values are the means  $\pm$  SE of two bags for day 5 and the means  $\pm$  SD of three bags for day 9.

repair (- Linco) and to  $\sim 0.31$  in the absence of repair (+ Linco) ( $p > 0.05$  for the difference in final  $F_v/F_m$ ). The initial HUUVB  $F_v/F_m$  value of 0.52 decreased somewhat during subsequent bag incubations to  $\sim 0.42$  in the presence of repair but decreased even further to  $\sim 0.24$  in the absence of repair ( $p < 0.05$  for the difference in final  $F_v/F_m$ ) (Fig. 3A). In the presence of repair on days 7 (not shown) and 9 (Fig. 3C), initial noon time  $F_v/F_m$  values of  $\sim 0.28$  (NUVB) and  $\sim 0.22$  (HUUVB) slightly increased during subsequent bag incubations but decreased to  $\sim 0.13$  in the absence of repair ( $p = 0.054$  (day 7, NUVB) and  $p < 0.05$  (day 7, HUUVB; day 9, NUVB and HUUVB) for the difference in final  $F_v/F_m$ ). In the presence of repair, detected D1 pools remained near initial levels for 3 h under NUVB but decreased to low levels, even when repair was taking place, under HUUVB. In the absence of repair, D1 decreased to low levels under both light treatments (Fig. 3B, D). Inside the mixed mesocosms, D1 pools increased over the 3 h period under NUVB (Fig. 3B, D). Under HUUVB, it decreased over the 3 h period on days 5 (Fig. 3B) and 7 (not shown) but increased on day 9 (Fig. 3D).

*Ubatuba lincomycin incubations.* Bag incubations conducted in Ubatuba were of short duration because of fast D1 degradation rates at this tropical site. On day 3 near mid-day, the initial  $F_v/F_m$  value of 0.31 (NUVB) and 0.36 (HUUVB) increased during subsequent bag incubations to 0.41 in the presence of repair but swiftly decreased to  $\sim 0.14$  after 20 min in the absence of repair (Fig. 4A). In the presence of repair on day 5, the initial NUVB  $F_v/F_m$  value of 0.17 decreased to 0.14 during subsequent bag incubations while the initial HUUVB  $F_v/F_m$  value of 0.28 remained constant during the 20-min incubation period (Fig. 4C). In the

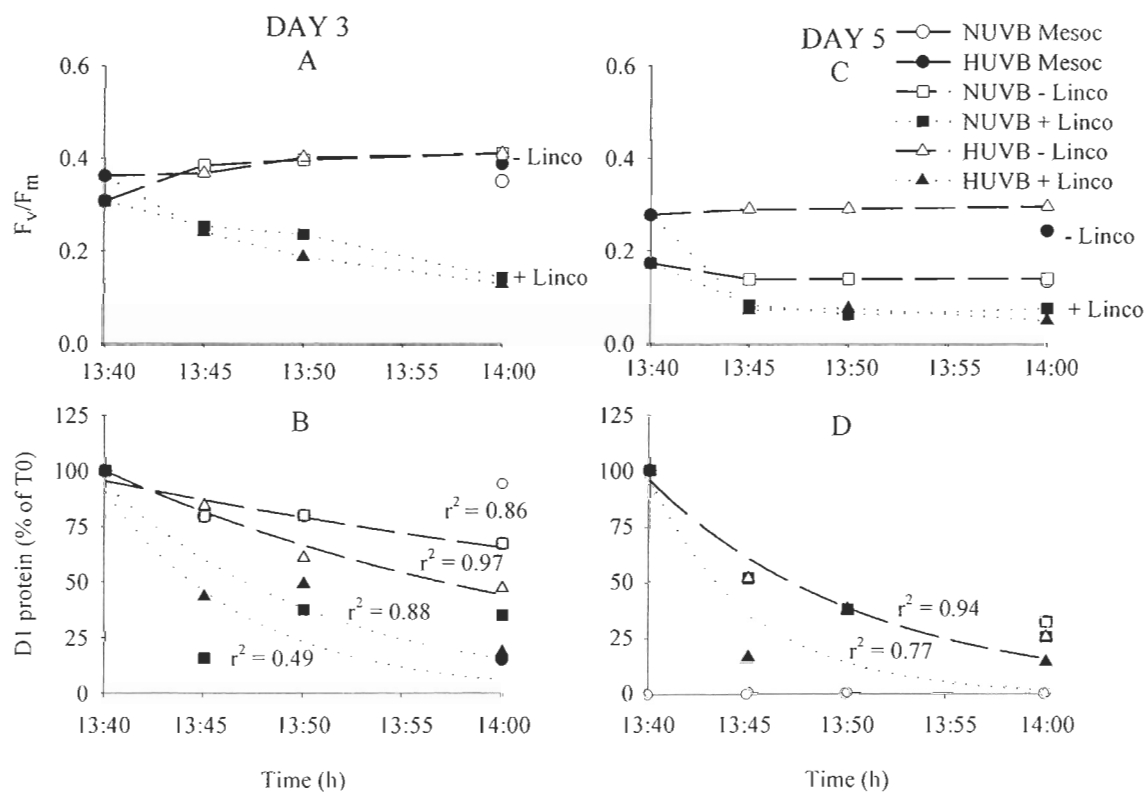


Figure 2.4 Kinetics of maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) from the short-term incubations performed on days 3 (A) and 5 (C) in Ubatuba. Treatments are as described in Fig. 3. Final  $F_v/F_m$  values are also shown for the phytoplankton that were submitted to mixing inside the mesocosms (Mesoc) exposed to both the NUVB and the HUVB light treatments. Kinetics of D1 protein amount (relative to the initial value) from the short-term incubations performed on day 3 (B) and on day 5 (D) in Ubatuba.

absence of repair, initial NUVB and HUVB  $F_v/F_m$  values decreased to  $\sim 0.07$  within only 5 min (Fig. 4C). In the presence of repair on day 3, D1 was degraded faster ( $t_{1/2} \sim 17$  min) under HUVB compared to NUVB ( $t_{1/2} \sim 35$  min), while in the absence of repair, D1 degradation was very fast ( $t_{1/2} \sim 5$  to 7.7 min) for both light treatments (see Table 3 for degradation rates). In fact, in the presence of lincomycin, the second point (at 13:45) showed in most cases the lowest D1 level (Fig. 4B, D) suggesting that D1 was rapidly degraded within only 5 min with some subsequent repair re-occurring with time. In these cases, the degradation rates calculated with exponential curves may slightly underestimate the actual rates of D1 degradation.

*Ushuaia lincomycin incubations.* Repeated measures ANOVAs (Table 4) showed a significant light treatment effect on  $F_v/F_m$  on days 4 and 6, a significant lincomycin effect on all days with significant interaction between these two factors on days 4 and 8. During the all three incubations (day 6 not shown) performed at this site, initial NUVB and HUVB  $F_v/F_m$  values ranging from 0.45 to 0.50 varied only slightly with time in the presence of repair (- Linco and in the mesocosms) but decreased significantly to  $\sim 0.24$  within 45 to 90 min in the absence of repair (Fig. 5A, C). In Ushuaia, D1 degradation was slower than in Ubatuba both in the presence or in the absence of repair (Table 3). Similar to the tropical site however, the D1 was degraded faster ( $t_{1/2} \sim 35$  min) under HUVB compared to NUVB ( $t_{1/2} \sim 70$  min) in the presence of repair, while in the absence of repair D1 degradation was very fast ( $t_{1/2} \sim 8$  to 23 min) for both light treatments on days 4 and 6. On these days under

Table 2.3 D1 protein exponential decay rate ( $k$ ,  $\text{min}^{-1}$ ) and the correlation coefficients ( $r^2$ ) of the exponential curve fitted to the data for the short-term incubations performed in Ubatuba and Ushuaia for phytoplankton exposed to the NUVB and the HUVB light treatments without lincomycin addition (- Linco) and with lincomycin addition (+ Linco). Data are also shown for the phytoplankton in the mixed mesocosms (Mesoc) for Ushuaia. - : missing data.

	day	$k$ ( $\text{min}^{-1}$ )		$r^2$		
		NUVB	HUVB	NUVB	HUVB	
UBATUBA	- Linco (+ repair)	3	0.02	0.04	0.86	0.97
		5	-	0.09	-	0.94
	+ Linco (- repair)	3	0.14	0.09	0.49	0.88
		5	-	0.20	-	0.77
	Mixed Mesocosms (+ repair)	4	0.01	-	0.91	-
		6	-	0.01	-	1.00
8		0.01	0.01	0.97	0.99	
USHUAIA	- Linco (+ repair)	4	0.01	0.02	0.95	0.92
		6	0.01	0.02	0.95	0.97
		8	-	-	-	-
	+ Linco (- repair)	4	0.06	0.09	1.00	1.00
		6	0.04	0.03	0.97	1.00
		8	0.01	0.02	0.97	0.96



Table 2.4 Results obtained from the repeated measures ANOVAs for the  $F_v/F_m$  measured during the short-term incubations performed in Ushuaia. The source of variation is partitioned into individual effects of light (UV) and lincomycin (Linco) treatments and their interaction (UV\*Linco) and the repeated measure (Time) and its interaction with the light treatment (Time\*UV), the lincomycin treatment (Time\*Linco) and both light and lincomycin treatments (Time\*UV\*Linco). \* indicates significance at  $0.01 < p \leq 0.05$ , \*\* at  $0.001 < p \leq 0.01$  and \*\*\* at  $p \leq 0.001$ , ns: not significant.

	UV	Linco	UV*Linco	Time	Time*UV	Time*Linco	Time*UV*Linco
Day 4	***	***	*	***	***	***	**
Day 6	*	***	ns	***	ns	***	**
Day 8	ns	***	***	***	*	***	**

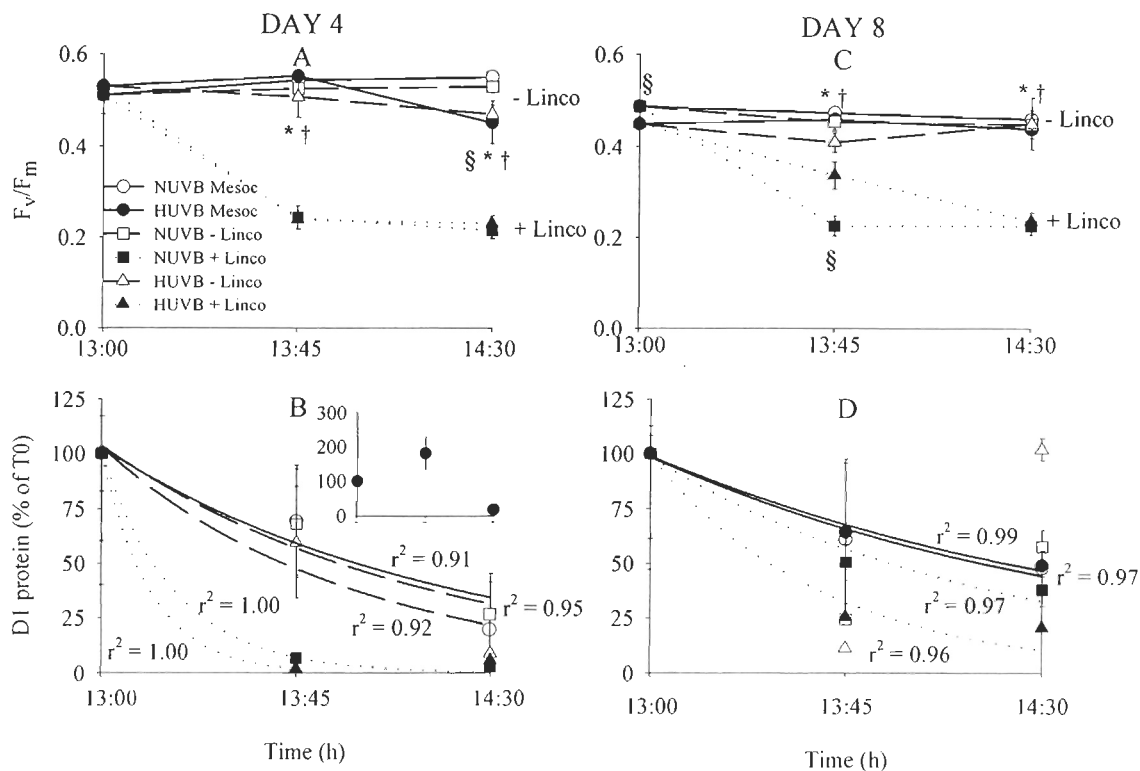


Figure 2.5 Kinetics of maximal quantum yield of photochemistry ( $F_v/F_m$ ) from the short-term incubations performed on days 4 (A) and 8 (C) in Ushuaia. Treatments are as described in Fig. 3. Values are also shown for the phytoplankton that were submitted to mixing inside the mesocosms (Mesoc) exposed to both the NUVB and the HUVB light treatments. Values are the means  $\pm$  SD of three replicates. \* denotes a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) between lincomycin treatments under the NUVB light treatment whereas † indicates a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) between lincomycin treatments under the HUVB light treatment. § denotes a significant difference ( $p \leq 0.05$ ) between light treatments under similar lincomycin conditions. Kinetics of D1 protein amount (relative to the initial value) from the short-term incubations performed on days 4 (B) and 8 (D) in Ushuaia

HUVB, D1 pools recovered after 45 min of incubation in the presence of lincomycin (Fig. 5 B, D) suggesting that lincomycin was no longer effective and repair was re-occurring. For these two specific cases, D1  $t_{1/2}$ s in the absence of repair were estimated over the initial decline period (the first 45 min).

Overall, blocking the PSII repair cycle using lincomycin resulted in significantly increased photoinhibition and D1 pool declines at all sites. In the absence of repair, PSII function and D1 pools declined rapidly and at similar rates for both NUVB and HUVB (except on day 8 at Ushuaia). In the presence of repair,  $F_v/F_m$  was generally maintained, reaching similar final values for both light treatments (except on day 5 at Ubatuba) and D1 pools suffered faster net degradation under HUVB compared to NUVB conditions.

## 2.6 DISCUSSION

*Effects of UVB enhancement on mixed phytoplankton communities.* Long-term mesocosm experiments performed at different latitudes revealed that UVB enhancement had no additional effect on chl *a* concentrations and  $F_v/F_m$  compared to the ambient light treatment in phytoplankton communities subjected to mixing (Fig. 1 and Table 2). The sampling strategy might partly explain the absence of HUVB effects on phytoplankton photosynthetic performance. In nature,  $F_v/F_m$  varies diurnally, i.e. it decreases during periods of high irradiance (mid-day) and usually rapidly recovers in late afternoon as irradiance decreases (Kroon 1994, Long et al. 1994, Vassiliev et al. 1994). By systematically sampling the mesocosms early in the morning (~7:00, local time) phytoplankton benefited from the night to repair the damage caused during the preceding day and hence recovered some, if not all, of their photochemical performance (Vassiliev et al. 1994). At Ubatuba, low  $F_v/F_m$  values (0.45-0.50) measured from the start of the experiment kept decreasing after day 2 (Fig. 1D). This indicates that the physiological state of the cells was not optimal and that cells were not recuperating overnight as their physiological condition kept worsening with time. However, because this decline of physiological state occurred with the same extent under both light treatments, it was likely related to the ambient light conditions prevailing at the site or to factors such as predation, nutrient depletion, or cell death but not specifically to UVB enhancement. Several studies using outdoor mesocosms have shown the absence of UVB enhancement effect on chl *a* and  $F_v/F_m$  when mixing occurred (Wängberg et al. 1999, Forster & Schubert 2001,

Fouilland et al. 2003). Depending on the extent of phytoplankton exposure to high surface irradiance, vertical mixing can limit or enhance photoinhibition (Neale et al. 1998b, 2003). The exposure depends on the depth of the mixed layer, the rate of vertical mixing and the water transparency (Neale et al. 2003), with phytoplankton cells alternately exposed to limiting and saturating light conditions. Phytoplankton thus have strategies for coping with these rapid and variable changes in spectral irradiance, including strategies to minimise the consequences of UV-induced damage (Roy 2000, Banaszak 2003). Photoprotection mechanisms can act simultaneously with one another (Xiong et al. 1997), and it is the balance between the cumulative action of protective mechanisms, the cost of photoprotection or resistance processes and the extent of damage that will determine the final response to UV stress. While mixing limited phytoplankton exposure to PAR and UV in the mesocosms, other protection/mitigation strategies may have limited the extent of UV-induced damages. In particular the PSII repair cycle was an active, but variable, mechanism in the phytoplankton communities studied.

*Effects of UVB enhancement on the PSII repair cycle.* The inhibition of chloroplastic protein synthesis at all three sites increased photoinhibition for the phytoplankton communities relative to the phytoplankton incubated without lincomycin addition, where D1 protein synthesis continued. These results are consistent with those of others (Lesser et al. 1994, Ekelund 1996, Bergmann et al. 2002, Shelly et al. 2002) and show that the net loss of the D1 protein was correlated with increased inhibition of PSII activity. At all three sites, photoinhibition and D1 pool declines proceeded at similar rates under both NUVB and

HUVB. The slower rates of net PSII inactivation observed in the absence of lincomycin represent the balance between PAR and UV induced photoinactivation and ongoing PSII repair through turnover of the D1 protein. In the presence of D1 repair,  $F_v/F_m$  was generally maintained for both light treatments while D1 pools suffered faster net degradation under HUVB. Under HUVB conditions, the repair of photodamaged D1 proteins through the PSII repair cycle was likely inhibited (Prášil et al. 1992, Behrenfeld et al. 1998). The fewer undamaged RCs still operating under HUVB were likely able to maintain photochemical performance or transiently inhibited PSII actually recovered during the dark exposure prior to  $F_v/F_m$  measurements.

In Rimouski (day 5 and 9) and Ushuaia (day 6; not shown) an accumulation of D1 protein was observed for the phytoplankton communities exposed to ambient light inside the mixed mesocosms (D1 accumulated under HUVB only on day 9 in Rimouski). These results suggest that D1 was actively synthesised but only slowly degraded under ambient light and in the presence of mixing and that D1 replacement was slower under HUVB thereby pre-empting D1 accumulation (Behrenfeld et al. 1998). In phytoplankton transiently drawn down during mixing events, enhanced light harvesting capacity at low light can be achieved by an increase in the number of PSII reaction centers (D1 proteins) with relatively low absorption cross-sections (Behrenfeld et al. 1998). This acclimation strategy allows for a constant rate of photosynthesis over the maximum duration of the photoperiod and prevents losses of photosynthesis under photoinhibitory irradiances (Behrenfeld et al. 1998). These results could alternatively be explained by an accumulation of inactive D1 protein as observed during plants photoinhibition at low temperature

(Ottander et al. 1993). Mixing inside the mesocosms may have pre-empted D1 degradation by limiting UV-exposure when phytoplankton reached the bottom of the mesocosms.

*The PSII repair cycle varies latitudinally.* Environmental factors such as irradiance and water temperature influence the turnover rate of the D1 protein. D1 protein is photoinactivated faster under high PAR or UV irradiance (Roos & Vincent 1998, Rae et al. 2000). Biosynthetic repair through D1 protein synthesis is positively correlated with temperature, at least over the thermotolerance range of the organism (Greer et al. 1986). As light conditions and water temperatures were different among the tropical and temperate environments sampled (Table 1), D1 protein turnover was expected to vary latitudinally. In tropical phytoplankton, the D1 protein was inactivated and degraded with a  $t_{1/2}$  of 3.5 to 7.7 min for both light treatments. The slower rates of D1 degradation determined in temperate Ushuaia (and Rimouski) reflect both the lower irradiance, and thus slower photoinactivation even if the cold water temperature results in slower repair biosynthesis at these sites. Depending on the light conditions and on the organism, the  $t_{1/2}$  of the D1 protein can range from minutes to hours (Kanervo et al. 1993, Kim et al. 1993, Sundby et al. 1993, Baroli & Melis 1996). While the  $t_{1/2}$ s of the D1 protein from the temperate sites are comparable to those previously found for cyanobacteria and green algae, the  $t_{1/2}$ s from tropical Ubatuba are at the short end of published D1  $t_{1/2}$ s, probably because of the high PAR and UV irradiance and warm water temperature.

*The PSII repair cycle varies locally with time.* Temporal variation of the PSII repair cycle in natural phytoplankton communities from each site can be attributed to factors including phytoplankton acclimation to light, nutrient availability, changes in phytoplankton species and the induction of other photoprotective mechanisms.

In Rimouski, phytoplankton subjected to mixing inside the mesocosms were only intermittently exposed to UV as only PAR irradiance reached the bottom of the mesocosms (Table 1). At this site, phytoplankton exposure to surface irradiance for 3 h resulted in photoinhibition on day 7 for NUVB and HUVB and on day 9 for HUVB (comparing bags with mesocosms), suggesting that cells from this site were somewhat light (notably UV)-sensitive upon suppression of mixing. UV- inhibition of photosynthesis was also observed by others upon short exposures ( $\leq 30$  min) of natural phytoplankton assemblages to surface radiation (Marwood et al. 2000). The most important change for D1 observed with time at this site was the accumulation of D1 protein for the mixed phytoplankton exposed to HUVB during the post-bloom period (day 9) while on other days, net D1 pools declined. This may reflect either a physiological acclimation to mixing and HUVB or a change in phytoplankton species (Sommaruga 2003) with a dominance of UV-tolerant organisms accumulating inactive D1 proteins. A change in the dominant diatom was observed in this experiment, from *Chaetoceros* spp. in the NUVB mesocosm to a progressively greater abundance of *Thalassiosira* spp. in the HUVB mesocosm. Some species of the genus *Thalassiosira* are known to be relatively UV-tolerant (Helbling et al. 1996). Small phytoflagellates were dominant on day 9 under both light treatments, notably green



microalgae which were twice as abundant in the HUVB mesocosm compared to the NUVB mesocosm (M. Ferrario, Universidad Nacional de La Plata, unpubl.).

In Ubatuba, photoinhibition was not exacerbated in the surface incubations compared to the pump-mixed mesocosms likely because phytoplankton inside the mesocosms were always exposed to UV and PAR irradiances even when mixed to the bottom of the mesocosms (Table 1) and because surface exposure was of short duration. From day 3 to day 5, the increase in D1 degradation rate observed under HUVB was likely related to the higher ambient irradiance prevailing on day 5 compared to day 3. Consistently,  $F_v/F_m$  values under HUVB were lower on day 5 than on day 3. On day 5 however,  $F_v/F_m$  values remained higher under HUVB compared to NUVB. This may be due to a community change toward UV-tolerant species - indeed the dominance of cyanobacteria and dinoflagellates was noted under this light treatment (M. Ferrario, Universidad Nacional de La Plata, unpubl.). Although net D1 declines occurred under HUVB, these organisms may have used alternate sources of N (as  $\text{NO}_3^-$  were almost completely depleted inside the mesocosms) to help counteract photoinhibition through the replacement of a constitutive D1 protein form by an alternate form (Campbell et al. 1998a, Tichy et al. 2003) or through the synthesis of protective MAAs (Carreto et al. 1990).

In Ushuaia, photoinhibition did not occur upon phytoplankton exposure to surface irradiance for 1.5 h, suggesting that, at the community level, light enhancement and suppression of mixing for a short-period of time could be tolerated. This may be related to the fact that both UV and PAR irradiances reached the bottom of the mesocosms at this site and because phytoplankton from Ushuaia are periodically exposed to high UVB doses

when an ozone hole occurs. In Ushuaia, D1 degradation rates gradually slowed down with time under both light treatments (Table 3). Since the taxonomic composition was similar under both light treatments from the beginning of the experiment up to day 8, the gradually slower D1 degradation may be partly related to the increase with time in other photoprotection mechanisms, such as the xanthophyll cycle photoprotective pigments (diadinoxanthin and diatoxanthin; data not shown). The induction of photoprotective pigments was similar for both light treatments and occurred as cells were gradually becoming nutrient depleted (Geider et al. 1993). By diminishing the light energy reaching the PSII, these photoprotective pigments may have conferred protection to the PSII and thereby slowed down the photoinactivation of the D1 protein (Sandmann et al. 1993, Olaizola et al. 1994, Lavaud et al. 2002). On day 8, the faster rate of D1 degradation under HUVB could result from a stress amplification by combined UVB enhancement and nutrient depletion.

*Conclusion.* This study demonstrated the presence of an active PSII repair cycle in natural phytoplankton communities from three latitudes. D1 pools suffered faster net degradation at the tropical site compared to the temperate sites. These differences are likely a consequence of different adaptation to light and water temperature, enabling fast enzymatic activities in tropical Ubatuba. The complete blockage of the repair process with lincomycin confirmed that maintenance of PSII activity in the phytoplankton community depends on continual synthesis of the D1 protein under illumination. UVB effects at the community level appeared mainly through inhibition of the D1 replacement process, rather than

through increased primary photoinactivation under UVB. In the presence of D1 repair,  $F_v/F_m$  generally varied similarly for both light treatments while D1 pools suffered faster net degradation under HUUVB. The remaining RCs under HUUVB were apparently generally able to maintain photosynthetic performance. In addition, changes in phytoplankton species composition favouring better UV-acclimated organisms and the induction of other slower protective strategies such as photoprotective pigments and/or MAAs, likely contributed to the maintenance of photosynthetic performance under HUUVB conditions. Further research is needed to determine the combined actions and community level costs of these photoprotective mechanisms.

**3. UVB EFFECTS ON PHOTOSYSTEM II EFFICIENCY OF NATURAL  
PHYTOPLANKTON COMMUNITIES FROM ANTARCTICA**

*Bouchard JN, Roy S, Ferreyra G, Campbell DA & Curtosi A*

*Polar Biology* 2005, 28 : 607-618.

### 3.1 RÉSUMÉ

L'impact du rayonnement UVB sur le cycle de réparation du PSII, au sein duquel le remplacement de la protéine D1 endommagée par une protéine D1 nouvellement synthétisée joue un rôle crucial, a été étudié chez le phytoplancton de l'Antarctique lors de l'été austral 2002. Des incubations de surface de courte durée (60 à 100 min) ont été effectuées lors de journées ensoleillées et d'une journée nuageuse. Lors de ces incubations, le phytoplancton échantillonné à 1 m de profondeur a été exposé à la lumière naturelle ambiante (+UVB) ainsi qu'à la lumière naturelle ambiante sans la majorité des longueurs d'ondes comprises dans la gamme du rayonnement UVB (-UVB). Ces longueurs d'ondes ont été filtrées à l'aide d'un filtre Mylar. La moitié des échantillons ont été traités avec la lincomycine afin de bloquer la synthèse de la protéine D1 alors que l'autre moitié des échantillons, incubée en absence de lincomycine, servait de contrôle. L'inhibition de la synthèse de la protéine D1 a causé des diminutions importantes du  $F_v/F_m$  lors des incubations effectuées les jours ensoleillés mais n'a eu aucun effet lors de l'incubation effectuée la journée nuageuse. La majorité de la diminution du  $F_v/F_m$  a été causée par l'exposition des cellules à la lumière visible (PAR) et/ou au rayonnement UVA puisque le rayonnement UVB n'a pas augmenté de façon significative la diminution du  $F_v/F_m$ . En présence de synthèse active de la protéine D1, et donc de réparation du PSII, la suppression du rayonnement UVB n'a eu que peu d'effet sur le  $F_v/F_m$  lorsque le phytoplancton provenait d'une colonne d'eau peu stratifiée, sans couche de mélange bien définie mais a diminué la photoinhibition lorsque le phytoplancton provenait d'une couche de mélange

plus profonde (13 m) que la profondeur de pénétration du 1% du rayonnement UVB (à 305 nm; 10 m). Ces résultats suggèrent que le rayonnement UVB a plus d'effet sur le processus de réparation du PSII et donc sur la synthèse de la protéine D1 plutôt que sur la dégradation de la D1, mais que la sensibilité du phytoplancton à l'exposition au rayonnement UVB de surface est influencée par son passé lumineux lequel est, en partie, influencé par la structure verticale de la colonne d'eau.

### 3.2 ABSTRACT

The impact of UVB on the Antarctic phytoplankton photosystem II repair cycle, involving the rapidly cycled D1 protein, was studied during summer 2002. On sunny and overcast days, phytoplankton (from 1 m depth) were exposed to natural light (+UVB) and Mylar-screened (-UVB) conditions. Half of the samples from each treatment were inoculated with lincomycin, an inhibitor of synthesis of chloroplast-encoded proteins including the D1 protein. Blocking D1 repair caused significant  $F_v/F_m$  depressions on sunny days but had no effect on the overcast day. Most of the  $F_v/F_m$  depression was caused by PAR and UVA with a non significant contribution from UVB. In the presence of D1 repair, suppressing UVB had no effect on  $F_v/F_m$  when the samples originated from a weakly stratified water column with no defined upper mixed layer (UML) while it alleviated  $F_v/F_m$  depression when the phytoplankton samples originated from within an UML deeper than the depth of UVB penetration. These results suggest that UVB had more effect on the D1 repair process than on the damage process itself but that phytoplankton sensitivity to surface UVB exposure was influenced by their previous light history, partly determined by the vertical structure of the water column.

### 3.3 INTRODUCTION

The seasonal loss of ozone over Antarctica (Madronich et al. 1998) has raised serious concerns regarding the impact of episodic increased ultraviolet-B radiation (UVB; 280-320 nm) on the Antarctic marine ecosystem and more specifically on its primary producers (Smith et al. 1992). Although phytoplankton possess an array of physiological and biochemical mechanisms to mitigate, protect themselves from or repair ultraviolet- (UV; 280-400 nm) induced damage (Roy 2000, Banaszak 2003), UVB can adversely affect phytoplankton at the level of the photosynthetic apparatus. Much attention has been given to the reaction centre of photosystem II (PSII) (Strid et al. 1990) because the D1 protein located at its core has a rapid, light-dependent turnover (Mattoo et al. 1984) referred to as the PSII repair cycle (Aro et al. 1993a). Under all light intensities, the PSII repair mechanism operates continuously (Prášil et al. 1992) but under photoinhibitory stress, the D1 protein must be rapidly degraded and synthesized *de novo* via the PSII repair cycle to prevent the accumulation of damaged PSII and maintain the pool of active PSII (Aro et al. 1993a, Sass et al. 1997).

Photoinhibition, commonly defined as a lowering of the maximal quantum yield of photochemistry (dark-acclimated  $F_v/F_m$ ), occurring upon phytoplankton exposure to photoinhibitory stress (Bracher & Wiencke 2000) can either be a dynamic or chronic phenomenon. Dynamic photoinhibition, also referred to as PSII downregulation, involves the dissipation of excess energy as heat through the xanthophyll cycle (Hanelt 1996) and is defined as a protective mechanism. Chronic photoinhibition involves the net photodamage



of the PSII reaction centre D1 protein and thus a drop in the content of functional PSII centres (Osmond 1994). Recovery from chronic photoinhibition involves the synthesis of new copies of D1 protein and their re-insertion in the thylakoid membrane while recovery from dynamic photoinhibition does not require protein synthesis. Although UVB (supplemented with lamps) was shown to increase the net loss of D1 pools in temperate and tropical natural phytoplankton assemblages (Bouchard et al. 2005a), no studies prior to this one has addressed the effects of UVB on the PSII repair cycle of polar phytoplankton communities.

Assessing Antarctic phytoplankton sensitivity to UVB is complex due to the great heterogeneity existing in the Southern Ocean in terms of phytoplankton composition and productivity. For instance, Southern Ocean environments range from the oligotrophic regions of the southern Drake Passage to the productive marginal ice zone (MIZ) of the Antarctic Peninsula (Holm-Hansen et al. 1997). Depending on the water column stability (Mitchell & Holm-Hansen 1991) diverse species of phytoplankton will dominate (Rodriguez et al. 2002a) with diatoms and microplankton dominating under turbulent conditions and flagellates (*Cryptomonas* and *Phaeocystis*) dominating under more stratified conditions (Rodriguez et al. 2002b). Because of their evolutionary light history with low radiation levels, polar phytoplankton are generally thought to be more vulnerable to UVB than phytoplankton from low latitudes (Villafañe et al. 2003). However, studies performed in Antarctica revealed that phytoplankton sensitivity to UV is species specific, with flagellates being the most sensitive and diatoms the least sensitive (Helbling et al. 1994, Villafañe et al. 1995). Some diatoms, such as *Chaetoceros* sp., however, were also shown

to be vulnerable to UV which induced the formation of resting spores (Helbling et al. 1992).

Phytoplankton UV-sensitivity is also influenced by the physical characteristics of the upper water column (Helbling et al. 1992, 1994) and thus by the phytoplankton light exposure history (Barbieri et al. 2002, MacDonald et al. 2003). Because many protection/repair mechanisms are inducible, phytoplankton cells gradually exposed to high photosynthetically active radiation (PAR; 400-700 nm) and/or UVB can become more UVB-tolerant (Villafañe et al. 1995, MacDonald et al. 2003). To maximize their protective mechanisms against UVB, however, phytoplankton need to spend significant periods of time (hour to days) under high-light conditions. Both the depth of the upper mixed layer (UML) and rate of vertical transport within this layer are critical factors in establishing the extent of phytoplankton exposure to high light (Neale et al. 2003). Phytoplankton sensitivity to UV is expected to increase with the depth of mixing (Neale et al. 2003). Thus, in deeply mixed environments, phytoplankton circulating within the UML will likely be more UV-sensitive and shade-acclimated than phytoplankton confined within a shallow UML (Helbling et al. 1992, Neale et al. 1998b). The relationship between UV inhibition and mixing can, however, be more complex (reviewed by Neale et al. 2003) as mixing was reported to enhance inhibition under some circumstances (Helbling et al. 1994).

To determine the importance of the PSII repair cycle in UVB-tolerance of Antarctic phytoplankton communities, dark-acclimated  $F_v/F_m$ , (a measure of photochemical efficiency), was monitored under contrasting (sunny versus overcast) outdoor irradiances. *In vivo* repair capacities were assessed with short-term incubations performed repeatedly in

the presence and in the absence of UVB radiation. Some of the samples were treated with lincomycin, an inhibitor of synthesis of chloroplast-encoded proteins, and particularly the rapidly cycled D1 protein, while others acted as controls with ongoing chloroplast protein synthesis. Results from these short-term incubations are discussed in terms of the inferred phytoplankton light exposure histories.

### 3.4 MATERIALS AND METHODS

*Study site and field sampling.* This study was conducted in Antarctica from February 20<sup>th</sup> to March 4<sup>th</sup> 2002. The sampling station is located near the Observatorio Island (Gamma Island) in the vicinity of the Argentinean summer station Melchior (64° 20'S, 62° 59'W) (Fig. 1). In the afternoons of February 20<sup>th</sup>, 21<sup>st</sup>, 23<sup>rd</sup>, 24<sup>th</sup> and March 4<sup>th</sup>, short-term (60 to 100 min) UV experiments were performed using surface water (1m) from the sampling station. To understand and describe the marine environment where these experiments were conducted, routine analyses were performed daily at that station. Nutrient concentrations, chlorophyll *a* (chl *a*) biomass and the taxonomic composition of the phytoplankton assemblage were determined once daily (7:00) using surface waters while the maximal efficiency of PSII (dark-acclimated  $F_v/F_m$ ) was determined twice daily (7:00 and 13:00) also using surface waters.

*Light measurements.* Daily incident UVB, ultraviolet-A radiation (UVA; 320-400 nm) and PAR at the study site were recorded every minute (every 10 min for the 22 Feb.) during the day using a PUV-500 radiometer (Biospherical Instruments, Inc., San Diego, CA, USA) immersed outdoors in a seawater tank to keep temperature constant. The sensors of the instrument were placed 1 cm below the water surface in order to record light penetration immediately below the surface. The same instrument was used for irradiance profiling throughout the water column three times per day (7:00, 13:00 and 19:00). These data were

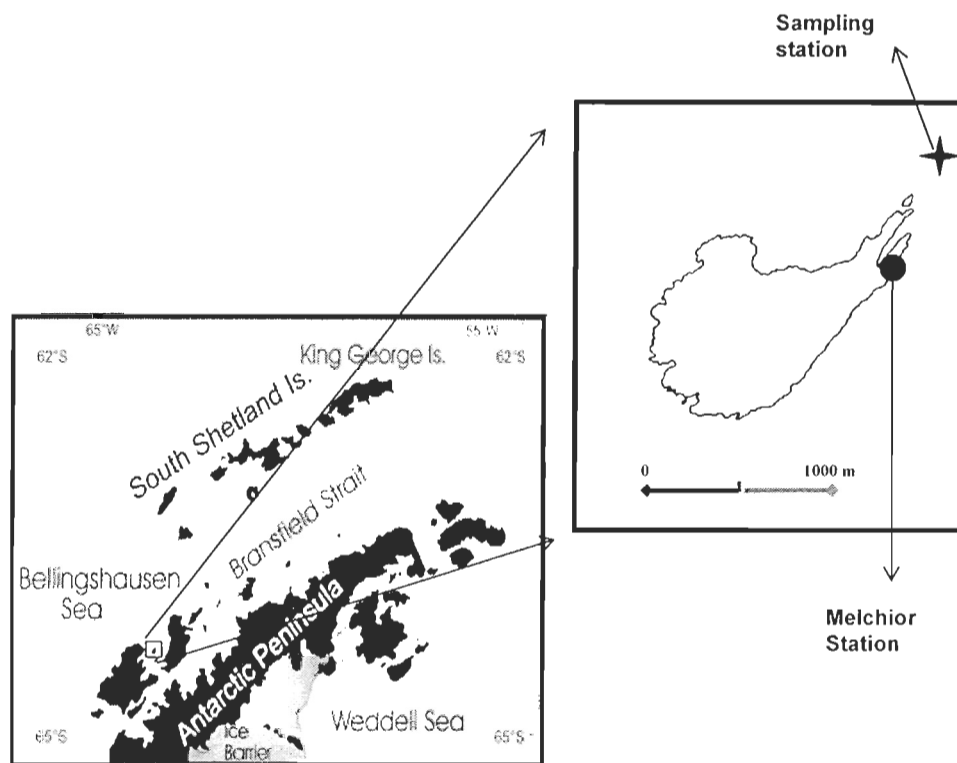


Figure 3.1 Map showing the study area, the location of the Melchior station on the Observatorio Island and the position of the sampling station.

used to calculate the vertical attenuation coefficient ( $K_d$ ) and the mean depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}$ , m) at 305, 320, 340, 380 nm and for PAR. Temperature and salinity were determined with a conductivity, temperature and depth probe (Micro-CTD 3, Falmouth Scientific, Inc., Cataumet, MA, USA). Visual observation of these data was performed to estimate the depth of the upper mixed layer ( $Z_{UML}$ )

*Biological and chemical analyses of field samples.* For nutrient analyses (nitrate + nitrite, phosphate and silicate) duplicate 30 mL aliquots were filtered onto 25 mm GF/F filters (Whatman®, Maidstone, UK) and filtrates, collected after passage of at least ten ml of sample water, were frozen for later analysis using a Technicon TAI autoanalyser (Bran+Luebbe, Inc., Buffalo Grove, IL, USA) as described in Parsons et al. (1984). Chl *a* was determined according to the fluorometric method of Yentsch & Menzel (1963) as described in Parsons et al. (1984). Briefly, 200 mL samples were filtered onto 25 mm GF/F filters (Whatman®) and photopigments extracted in 90% acetone at 4°C for 24 h. Readings were made using a digital fluorometer (model 450, Sequoia-Turner Corporation, Mountain View, CA USA) correcting for phaeopigments. Calibration of the fluorometer was made with commercially purified chl *a* (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Measurements of chl fluorescence *in vivo* were performed using the same fluorometer following the conventional DCMU methodology (Samuelson & Öquist 1977) as described in Parkhill et al. (2001). The samples were dark-acclimated for 1 h and kept at *in situ* temperature. The PSII maximal quantum efficiency (dark-acclimated  $F_v/F_m$ ) was calculated as described in Parkhill et al. (2001) where the variable fluorescence  $F_v = (F_m - F_0)$ ,  $F_0$  is the

fluorescence in the dark-acclimated samples and  $F_m$  is the fluorescence after the addition of  $15 \times 10^{-6}$  M 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU). Fluorescence measurements were performed in three replicates for each sample. Phytoplankton microscopic examination was done using 200 mL samples fixed with the acidic Lugol's solution (Thorndsen 1978) and counts were done under an inverted microscope (Utermöhl 1958).

*Experimental protocols for short-term incubations.* To determine the physiological state of natural phytoplankton communities in the field under the full solar spectrum and upon exclusion of UVB, water samples from the sampling station were placed in twelve 50-mL quartz tubes on 20, 21, 23 and 24 Feb. and incubated at the surface of the water column under contrasting light conditions (sunny versus overcast days). For each of these experiments, half of the tubes were inoculated with lincomycin (final concentration of  $0.4 \text{ g L}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich Canada Ltd., Oakville, ON, Canada), an inhibitor of the synthesis of chloroplast-encoded proteins including the D1 protein while the remaining tubes acted as controls. These tubes were disposed randomly into two racks and arranged linearly in order to avoid shadow effects. This array was submerged at 0.5 m depth with a buoy mooring near the coast and exposed to two different light treatments. Half of the lincomycin-treated and lincomycin-free tubes were exposed to the full solar spectrum (+UVB) while the other half were covered with a 0.13 mm Mylar® D sheet (DuPont, Hopewell, VA, USA) and were thus exposed to the solar spectrum with much reduced UVB (-UVB). The Mylar® sheet transmitted 85% in the visible region of the spectrum and the cut-off wavelength was at  $\sim 325 \text{ nm}$ . The incubations were performed late in the afternoon in order to study the

impact of UVB on communities that were recovering from the mid-day inhibition rather than on cells that were maximally stressed at noon time. The incubation tubes were incubated near the surface of the water column for a total duration of 60 min on 20 and 23 Feb and 90 min on 21 and 24 Feb. Ten mL samples were taken with syringes at different time intervals (at 30 and 60 min on 20 and 23 Feb.; at 60 and 90 min on 21 and 24 Feb.) for fluorescence measurements. On the last three short-term incubations, one additional lincomycin-free tube and one additional lincomycin-treated tube were incubated in the dark and, as expected, no significant changes were observed with time among these two tubes (not shown). On 4 Mar., an experiment similar to the one described above was performed except that 1L-UV-transparent bags were used to allow the detection of the D1 protein which requires the filtration of large water volumes. Twelve bags were treated with lincomycin to a final concentration of  $0.4 \text{ g L}^{-1}$  and the other twelve bags acted as controls. The bags were sampled after 60 and 100 min of incubation. At the end of each sampling interval, ten mL sub-samples were taken for fluorescence readings while the rest of the volume was filtered onto 25 mm GF/F filters (Whatman®) and immediately frozen for further D1 protein detection.

*D1 protein detection.* D1 protein was detected immunochemically only for the bag experiment according to the method described in Bouchard et al. (2005a). Briefly, total cellular proteins from cells present on frozen GF/F filters were extracted and solubilised in 375  $\mu\text{l}$  of 100 mM tris-base, pH 8.3, 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1% sodium dodecyl sulfate and 0.5% dithiothreitol. Cells were disrupted by continuous sonication then a freeze



(liquid nitrogen) and thaw (water bath at 80°C) cycle was applied three times to the samples which were then centrifuged to remove insoluble material. The supernatants containing the solubilised proteins were collected and stored at -80°C until use. The proteins were separated on linear 10% SDS-polyacrylamide ReadyGels (BioRad Laboratories (Canada) Ltd., Mississauga, ON, Canada) using a Mini-Protean II (BioRad) cell. The gels were electrophoresed at 100V for 100 min in 25 mM tris-base, 192 mM glycine and 0.1% SDS. Proteins were then electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (BioRad) in 49 mM tris-base, 39 mM glycine, 0.04% SDS and 20% methanol in a Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) at 13 V for 25 min. The PVDF membrane was then washed in tris-buffered saline (TBS-T: 20 mM Tris-base, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20; pH 7.5) and soaked for 1 h at 25°C in 5% low-fat powdered milk in TBS-T. The membrane was incubated with a primary anti-PsbA global antibody ([www.agrisera.se](http://www.agrisera.se)) diluted (1:4000) in 10 ml of blocking buffer for 40 min, at 25°C and then rinsed with TBS-T and incubated with a secondary rabbit anti-chicken IgG antibody conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich) diluted 1:4000 in 10 ml blocking buffer, for 40 min at 25°C. Finally, the membrane was rinsed with TBS-T and incubated with ECL Plus (Amersham Biosciences, Inc., Baie d'Urfé, QC, Canada) for 5 min at 25°C. The blots were imaged with a Fluor-S-MAX™ MultiImager (BioRad) and quantification performed with the Quantity One® software (BioRad).

*Data analyses.* Although the short-term incubations differed in total duration (60 min on 20 and 23 Feb.; 90 min on 21 and 24 Feb.; 100 min on 4 Mar.), the incubation bags were consistently sampled after 60 min of surface exposure. Hence, to allow comparisons among the different short-term incubations conducted, statistical analyses were performed on the variations of the photochemical efficiencies that occurred in 60 min. These variations were calculated as the difference between the  $F_v/F_m$  values after 60 min of incubation and the  $F_v/F_m$  values at initial time ( $F_v/F_m^{60 \text{ min}} - F_v/F_m^{0 \text{ min}}$ ). Prior to the statistical analysis of the data, the normality of distribution was checked with a test of Kolmogorov-Smirnov and the variance homogeneity was checked using a test of Hartley (Zar 1984). Statistical tests of the effects of UVB and lincomycin treatments on photochemical efficiency used a two-way analysis of variance (ANOVA, Statistica v.5.1. StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). When significant differences were present, a Tukey HSD test was used as post hoc test.

### 3.5 RESULTS

Ozone concentrations during the experimental period remained high (351-471 DU, TOMS data). Incident solar radiation (Fig. 2; missing values due to measurement interruptions) at the sampling site was more intense on 20 Feb., 22 Feb., 23 Feb. and 4 Mar. and moderate on 21 Feb. and 24 Feb. (Fig. 2). On the sunny days, the maximal noon incident irradiance was  $\sim 0.48\text{-}0.56 \mu\text{Wcm}^{-2} \text{nm}^{-1}$  for UVB (305 nm),  $\sim 15\text{-}17 \mu\text{Wcm}^{-2} \text{nm}^{-1}$  for UVA (340 nm) and  $\sim 700\text{-}1000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for PAR. On the two remaining days (21 and 24 Feb.), the maximal incident irradiance was  $\sim 0.22\text{-}0.40 \mu\text{Wcm}^{-2} \text{nm}^{-1}$  for UVB (305 nm),  $\sim 7\text{-}10 \mu\text{Wcm}^{-2} \text{nm}^{-1}$  for UVA (340 nm) and  $\sim 260\text{-}360 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  for PAR. Doses of UVR and PAR (integrated over the first 60 min of incubation periods to facilitate comparisons among incubation days) to which phytoplankton were exposed during surface incubations were greatest on 20 Feb., 23 Feb. and 4 Mar., moderate on 21 Feb. and low on 24 Feb. (Table 1). Vertical attenuation coefficients ( $K_{ds}$ ), which remained largely invariant among days (Fig. 3A), show that clear water conditions prevailed during the whole duration of the experimental period. The depth of the euphotic zone ( $Z_{Eu}$ ; defined as the 1% incident PAR penetration) was nearly 50 m and 1% of UVB at 305 nm ( $Z_{1\% 305 \text{ nm}}$ ) penetrated to approximately 20% of the  $Z_{Eu}$  (10 m). The vertical structure of the water column remained generally similar for the experiments performed in February (Fig. 3B). Vertical profiles of water density ( $\sigma_t$ ) for the February period, show that there was no well defined UML but instead a continuous increase in water density with depth (Fig 3B). On these days, the maximum chl *a* concentrations were found near the surface ( $< 10$  m; Fig. 3B) and slowly

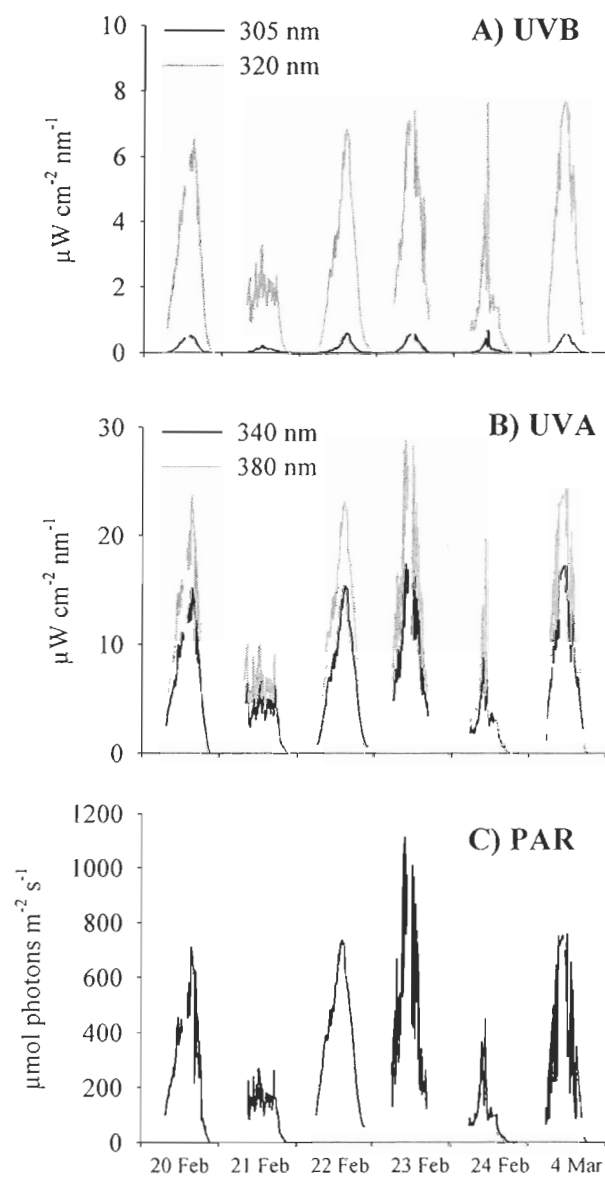


Figure 3.2 Temporal variation of incident UVB (305 and 320 nm; A), UVA (340 and 380 nm; B) and PAR (400-700 nm; C) during the experimental period; from 20 to 24 February and on 4 March.

Table 3.1 Irradiance at 305, 320, 340, 380 nm and PAR integrated over the first 60 min of the incubation period for each short-term incubation performed ( $\text{J m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{h}^{-1}$  for UV irradiance and  $\text{mol photons m}^{-2} \text{h}^{-1}$  for PAR). Experiments were performed from 20 to 24 February (except 22 February) and on 4 March 2002. Initial incubation times are in parentheses below the incubation date.

	<b>305 nm</b> ( $\text{J m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	<b>320 nm</b> ( $\text{J m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	<b>340 nm</b> ( $\text{J m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	<b>380 nm</b> ( $\text{J m}^{-2} \text{nm}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	<b>PAR</b> ( $\text{mol photons m}^{-2} \text{h}^{-1}$ )
<b>20 Feb.</b> (16:45)	4.96	131.75	345.34	534.11	1.67
<b>21 Feb.</b> (16:30)	1.85	64.44	163.46	236.30	0.65
<b>23 Feb.</b> (15:45)	8.99	166.59	404.98	619.96	2.16
<b>24 Feb.</b> (17:15)	0.52	16.83	39.52	51.85	0.12
<b>4 Mar.</b> (15:45)	7.13	163.18	396.79	553.03	1.66

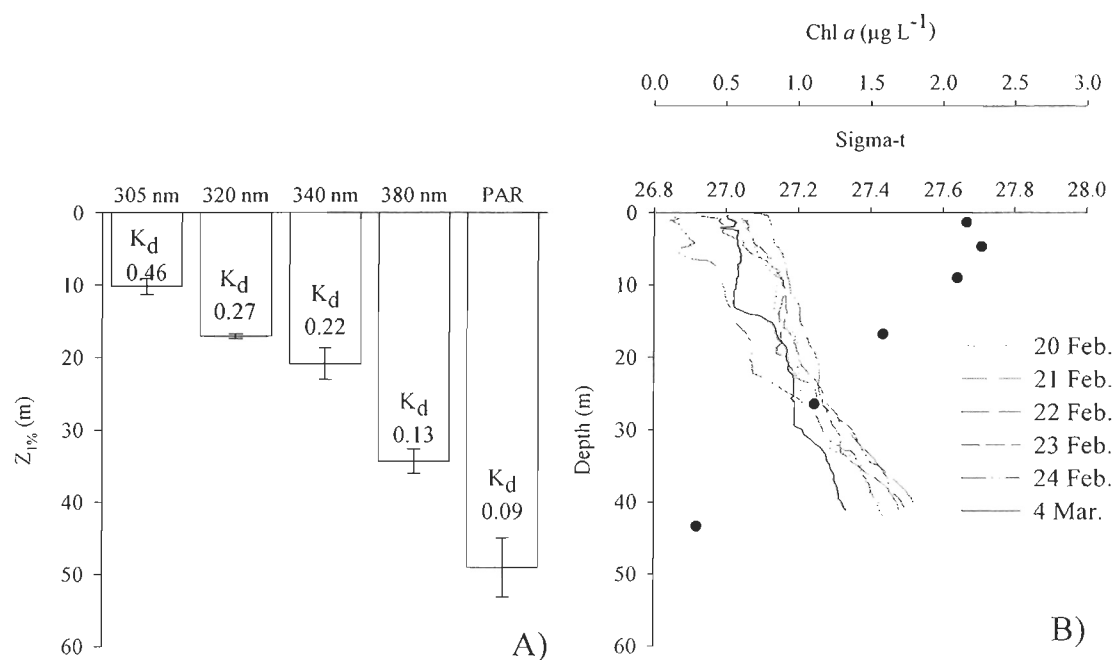


Figure 3.3 Depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}$ , m) and vertical attenuation coefficients ( $K_d$ ,  $m^{-1}$ ) for each specific wavelength ( $K_d$  values presented on the bars). Values of  $Z_{1\%}$  are the mean of all incubation days  $\pm$  SD (A). Vertical profiles of water density, sigma-t, for 20 Feb., 21 Feb., 22 Feb., 23 Feb., 24 Feb., and 4 Mar. (B). A chl *a* vertical profile typical of the February period is also presented (closed circles).

decreased with depth. On 4 Mar., however, the  $Z_{UML}$  (13 m) was slightly deeper than the  $Z_{1\% UVB}$  (305 nm). Phytoplankton within the UML were thus likely acclimated to the low mean dose of UVB compared to the February cells growing near the surface and constantly exposed to UVB.

Nutrient concentrations at the sampling site remained relatively high during the whole experimental period while chl *a* biomass remained between 0.75 and 3.02  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Table 2). At all times, the phytoplankton community was dominated (~ 99 % of the total community) by small flagellates (Table 2) but various diatom species (unidentified pennate and centric diatoms, *Pseudo-nitzschia* sp., *Corethron* sp., *Licmophora* sp.) were also observed. Fig. 4A-E shows the development of the dark-acclimated  $F_v/F_m$  in the field samples (open squares) from morning (7:00) to noon (13:00) and at variable times (between 15:45 and 17:15) in the afternoon.  $F_v/F_m$  values were greatest (0.51-0.72) in the morning (7:00) and lowest (0.35-0.54) around noon time (13:00) (Fig. 4A, C, E). This typical mid-day depression of  $F_v/F_m$  was also observed on 22 Feb. with a  $F_v/F_m$  morning value of 0.57 decreasing to 0.54 at noon (not shown) but was not significant on 21 Feb. (Fig. 4B) and did not occur on 24 Feb. (Fig. 4D). As expected, there was a positive and strong relationship ( $r^2 = 0.99$ ) between the % decrease in  $F_v/F_m$  and the PAR irradiance integrated over the morning period (Fig. 5).

Fig. 4F-J shows the development of the  $F_v/F_m$  during the surface incubations performed in the presence of lincomycin. Inhibition of D1 protein synthesis with lincomycin blocked the PSII repair cycle while photoinactivation and subsequent degradation of the D1 protein continued. Thus, decreases in  $F_v/F_m$  obtained in the presence

Table 3.2 Nutrient concentrations ( $\mu\text{M}$ ), total chl *a* concentration ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and phytoplankton cell concentration ( $\times 10^6$  cells  $\text{L}^{-1}$ ) from 20 to 24 February and on 4 March 2002. -: missing.

	Nitrate+Nitrite ( $\mu\text{M}$ )	Phosphate ( $\mu\text{M}$ )	Silicate ( $\mu\text{M}$ )	Chl <i>a</i> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Flagellates ( $\times 10^6$ cells $\text{L}^{-1}$ )	
					<i>Cryptomonas</i> sp.	Cocoid phytoflagellates
<b>20 Feb.</b>	20.16	1.56	73.04	3.02	1.8	3.4
<b>21 Feb.</b>	22.02	1.65	75.64	2.53	3.0	4.8
<b>22 Feb.</b>	14.04	1.13	75.41	1.59	-	-
<b>23 Feb.</b>	8.94	1.17	73.59	0.75	1.9	4.8
<b>24 Feb.</b>	17.84	1.42	77.40	0.88	1.1	2.5
<b>4 Mar.</b>	19.06	2.30	42.90	1.04	1.1	2.1



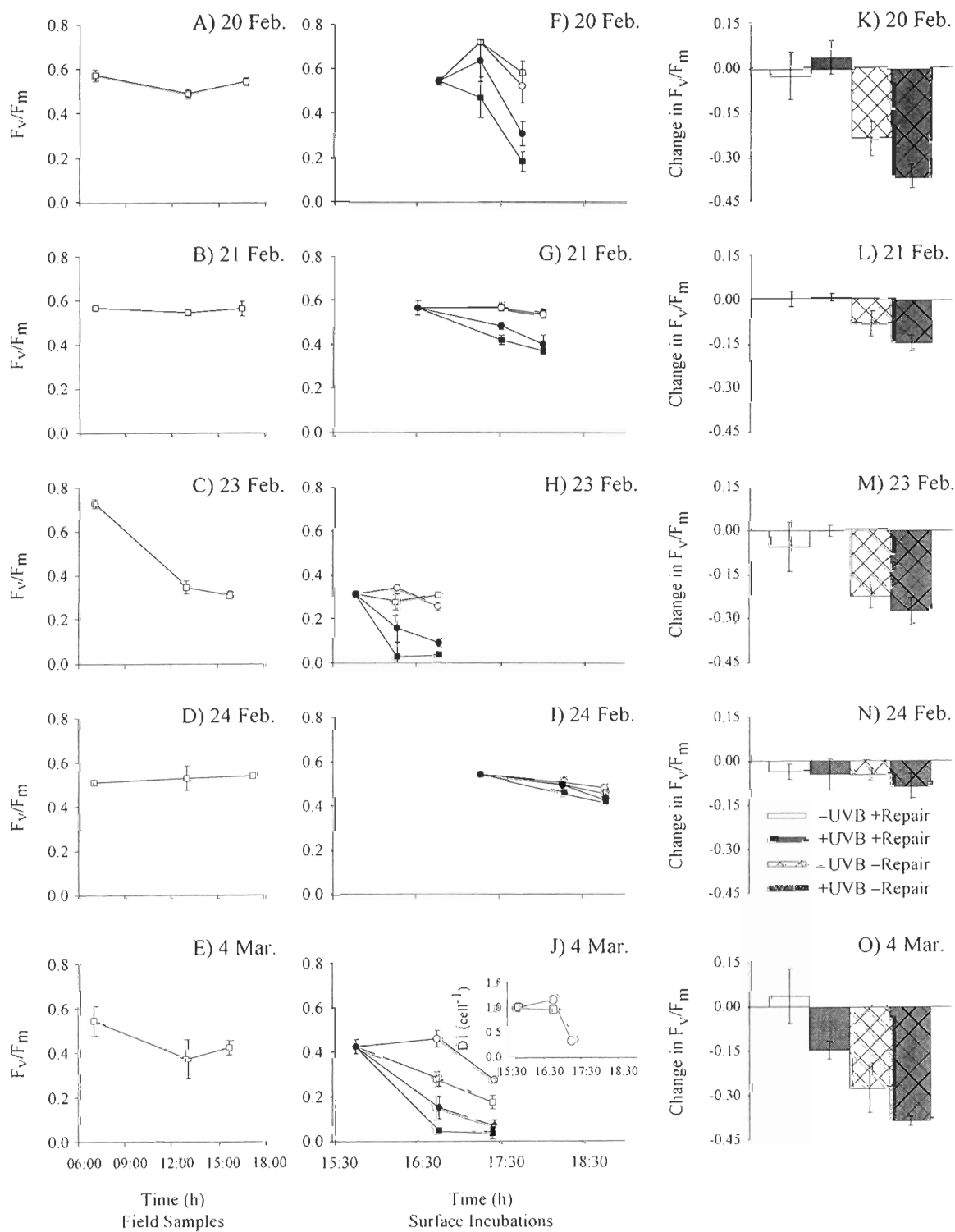


Figure 3.4 Development of the  $F_v/F_m$  in the surface field samples at 7:00, 13:00 and at variable times in the afternoon on 20 Feb. (A), 21 Feb. (B), 23 Feb. (C), 24 Feb. (D) and 4 Mar. (E) and the development of the  $F_v/F_m$  during the surface short-term incubations performed in late afternoon on 20 Feb. (F), 21 Feb. (G), 23 Feb. (H), 24 Feb. (I) and 4 Mar. (J). Note that  $F_v/F_m$  values determined at variable times in the afternoon on Fig. 4A-E correspond to the initial data point taken for the short-term incubations presented on Fig. 4F-J. Treatments were natural ambient light with UVB (+UVB; square) and natural ambient light without UVB (-UVB; circle) in the absence of lincomycin (+Repair; open symbol) and in the presence of lincomycin (-Repair; closed symbol). Fig. 4J Inset; The evolution of the relative D1 amount ( $\text{cell}^{-1}$ ) during the incubation performed on 4 Mar. for the natural ambient light with UVB (+UVB) and natural ambient light without UVB (-UVB) in the absence of lincomycin (+Repair) only. Change in  $F_v/F_m$  over 60 min (estimated as the difference between the  $F_v/F_m$  value after 60 min of incubation and the  $F_v/F_m$  value at initial time for each experimental condition tested) on 20 Feb. (K), 21 Feb. (L), 23 Feb. (M), 24 Feb. (N) and 4 Mar. (O). Treatments are natural ambient light with UVB (+UVB; black bar) and natural ambient light without UVB (-UVB; white bar) in the absence of lincomycin (+Repair; open bars) and in the presence of lincomycin (-Repair; hatched bars). Results from the two-way ANOVAS are presented in Table 3 and results from the Tukey test in Table 4.

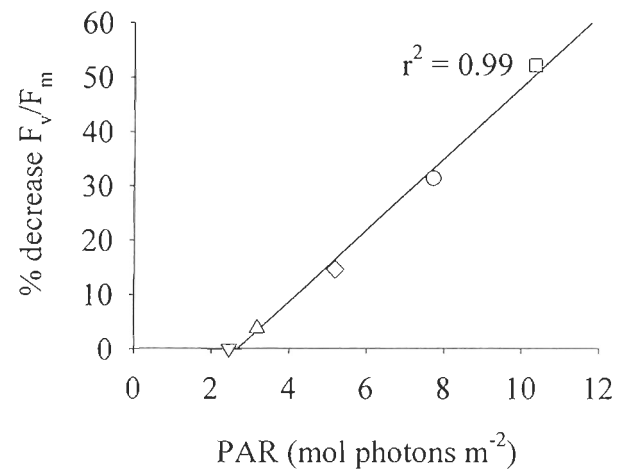


Figure 3.5 The relationship between the PAR irradiance integrated over the morning periods (from 7:00 to 13:00) and the percent decrease in  $F_v/F_m$  (estimated as the difference between the  $F_v/F_m$  at 7:00 and the  $F_v/F_m$  at 13:00, normalized to  $F_v/F_m$  at 7:00 \*100). Symbols for the different incubation days are: 20 Feb. (◇), 21 Feb. (Δ), 23 Feb. (□), 24 Feb. (▽), 4 Mar. (○).

of lincomycin represent the rate of PSII inactivation in the absence of repair. Statistical analyses performed on the changes in  $F_v/F_m$  observed after 60 min of surface incubation (Fig. 4K-O) revealed a significant lincomycin effect on all days except on 24 Feb. (Fig. 4N; Table 3) when irradiance was low (Table 1). The absence of lincomycin effect on that day, implies that D1 turnover was slow enough that inhibiting D1 protein synthesis had no short-term effect on the net PSII function. On other days (20, 21, 23 Feb. and 4 Mar.), lincomycin had a large effect on net PSII function within 60 min (Fig. 4K, L, M, O; Table 3), implying rapid D1 turnover.

To confirm that PSII repair (D1 synthesis) was truly blocked in the presence of lincomycin, the D1 protein was detected by immunochemistry on 4 Mar. (Fig. 4J, inset) only. In the presence of repair, the amount of D1 protein in the absence of UVB varied similarly to and was highly correlated with the PSII efficiency determined during this surface incubation ( $r^2 = 1$ ). Under natural light conditions (+UVB), D1 remained largely constant during 60 min but was then undetectable. In the absence of repair, no D1 was detected after 60 min of incubation for both light treatments.

Screening off most of the UVB radiation in the presence of D1 repair, had no significant effect on  $F_v/F_m$  for the incubations performed in February (Fig. 4K-N; Tables 3, 4) as the initial  $F_v/F_m$  ( $\sim 0.55$  on 20, 21 and 24 Feb. and  $0.31$  on 23 Feb.) remained largely unchanged upon phytoplankton exposure to surface irradiance for 60 min both in the absence and in the presence of UVB. On 4 Mar., however, screening off most of the UVB had a significant positive effect on  $F_v/F_m$  (Fig. 4O; Tables 3, 4) as photoinhibition was

Table 3.3 Summary of two-way ANOVAs performed on the changes in  $F_v/F_m$  after 60 min of surface exposure (Fig. 4F-J). \* denotes a significant effect at  $p \leq 0.05$  and \*\*\* at  $p \leq 0.001$ .

	UVB	Linco	UVB*Linco
20 Feb.		***	*
21 Feb.	..	***	
23 Feb.		***	
24 Feb.			
4 Mar.	***	***	

Table 3.4 Summary of Tukey test results for the short-term incubations. \* denotes a significant effect at  $p \leq 0.05$  and \*\* at  $p \leq 0.01$ .

	-UVB Control & +UVB Control	-UVB Control & -UVB Linco	-UVB Control & +UVB Linco	+UVB Control & -UVB Linco	+UVB Control & +UVB Linco	-UVB Linco & +UVB Linco
20 Feb.		**	**	**	**	
21 Feb.		*	**	*	**	
23 Feb.		*	**	**	**	
24 Feb.						
4 Mar.	*	**	**		**	

completely relieved when UVB was suppressed. In the absence of D1 repair, UVB suppression had no significant effect on  $F_v/F_m$  for all of the incubations performed in February and March (Fig. 4K-O; Table 4), indicating that PSII was mostly damaged by PAR and UVA, and that UVB only slightly increased this effect.

Overall, results showed that D1 damage was mostly caused by UVA and PAR with a slight tendency for UVB to increase this effect. In contrast, the D1 repair process generally remained unaffected by the UVB treatments when phytoplankton originated from a water column with no defined UML (February experiments) whereas UVB suppression appeared beneficial when phytoplankton exposed to surface irradiance originated from within an UML deeper than the depth of UVB penetration (March experiment).

### 3.6 DISCUSSION

Responses observed in the presence of lincomycin reflect damage to the PSII without any ongoing D1 synthesis (repair). Blocking D1 repair on sunny days (20 Feb., 21 Feb., 23 Feb., 4 Mar.) prevented the maintenance of  $F_v/F_m$  and caused pronounced losses in PSII efficiency. PSII damage was mostly caused by exposure to PAR and UVA with only a small additional contribution from UVB. In the absence of repair on 4 Mar, no D1 pool was detected after 60 min of incubation for both light treatments (Fig 4J, inset) suggesting either that below a threshold  $F_v/F_m$  value (0.20 in this specific case) the amount of D1 protein left in the water sample was below the detection limit of the technique or that the D1 protein was entirely degraded under these conditions accompanied by a residual low  $F_v/F_m$  characteristic of this type of fluorescence measurement (e.g. Tyystjärvi & Aro 1996). Although UVB-enhancement of photoinhibition in the absence of D1 repair was found in the cultivated *Thalassiosira pseudonana* diatom (Lesser et al. 1994), this was not observed here (Table 4), nor in natural temperate (Canada and Southern Argentina) and tropical (Brazil) phytoplankton communities upon suppression of repair with lincomycin (Bouchard et al. 2005a). In these communities, D1 pools and  $F_v/F_m$  decreased at similar rates under both the local ambient irradiance and upon UVB lamp supplementation (corresponding to a local 60% ozone depletion) (Bouchard et al. 2005a). These results suggest that damage was not significantly increased in the presence of UVB, and are consistent with those of Helbling et al. (1992) who found significantly increased photosynthetic rates in Antarctic phytoplankton upon exclusion of most of UVA and UVB while excluding UVB only had a



limited positive effect on assimilation rates (Helbling et al. 1992). Consistently, Villafañe et al. (2004) found that UVA accounted for most of the inhibition (> 60%) in carbon incorporation during a flagellate-dominated post-bloom period in Patagonia while Marwood et al. (2000), showed a 25% decrease (compared to dark controls) in  $F_v/F_m$  in natural phytoplankton communities from Lake Erie exposed to PAR alone with additional reductions of about one third each with the progressive inclusion of UVA and UVB in the spectrum. On the overcast 24 Feb., PAR and UV irradiances prevailing during the surface incubation period were the lowest compared to the other incubation days (Table 1). On that day, there were no significant UVB nor lincomycin effects (Table 3) confirming that irradiance influences phytoplankton responses. The maintenance of PSII efficiency upon phytoplankton exposure to surface irradiance in the absence of repair suggests that D1 synthesis and PSII turnover were slow. This limited effect of lincomycin at low photon exposure has also been shown for a tropical marine macroalga (Franklin & Larkum 1997). The explanation proposed by these authors is that protein synthesis is required for recovery of PSII activity after high photon exposure while upon low photon exposure, inactive PSII quenching centers accumulate and protein synthesis is required for the reactivation of only some of these centers.

From the results obtained in the absence of D1 repair, it is clear that phytoplankton sensitivity/tolerance to UVB is not only determined by the damage to the D1 protein but also by the ongoing repair (*de novo* synthesis) of this protein (Heraud & Beardall 2000). Phytoplankton response to surface exposure in the absence of lincomycin illustrates the balance between the damage and repair processes. For the 20 Feb., 21 Feb., 23 Feb. and 24

Feb. incubations, the PSII efficiency remained generally unchanged under both UVB light treatments while on 4 Mar., removal of most of the UVB relieved photoinhibition. These results suggest that D1 repair was fast enough to compensate even for the D1 degradation observed in the presence of UVB for the 20 Feb., 21 Feb., 23 Feb. and 24 Feb. incubations but not for the 4 Mar. incubation. The strong relationship determined between D1 relative amounts and  $F_v/F_m$  on 4 Mar. confirms that  $F_v/F_m$  variations were related to changes in D1 protein amounts (Fig. 4J inset). Under +UVB, the D1 pool remained largely unchanged during 60 min but was then undetectable suggesting that the rate of D1 synthesis was more or less equal to the rate of D1 degradation for the first 60 min of surface exposure and that prolonging surface exposure either enhanced the rate of damage, slowed down the rate of D1 synthesis, or both, leading to degradation of most of the D1. The faster net loss of D1 pool observed in the presence of UVB (Fig. 4J, inset) is consistent with the results obtained for temperate and tropical natural phytoplankton communities showing faster net loss of D1 pools (even when D1 repair was occurring) upon UVB lamp supplementation (Bouchard et al. 2005a). Overall, phytoplankton exposed to surface irradiance for a short-period of time in the presence of repair responded differently with phytoplankton sampled in February remaining largely insensitive to the presence of UVB and phytoplankton sampled in March benefiting from UVB removal.

The idea that environmental stresses have more impact on the repair process than on the damage process itself is increasingly current (Lesser et al. 1994, Litchman et al. 2002). Nishiyama et al. (2001) found that reactive oxygen species (ROS) generated as a result of *Synechocystis* sp. exposure to excess light stimulated the net photodamage to PSII by

inhibiting the repair of the damage and not by accelerating the photodamage directly. We propose that UVB has also more net effect on the D1 repair process than on the damage process which is consistent with the conclusions drawn from a series of experiments performed on phytoplankton communities from different latitudes (Bouchard et al. 2005a). Generally, repair processes are influenced by factors such as water temperature, nutrient availability, phytoplankton composition and phytoplankton previous exposure to light. During the experimental period reported here, however, water temperature remained steady and thus cannot account for phytoplankton differential responses to UVB treatments. Neither was protein synthesis limited by nutrient availability. In fact, nutrient concentrations at the sampling station were high and similar to those reported for this region (Smith et al. 1992, Waldron et al. 1995, Stambler 2003). The phytoplankton assemblage, dominated at all times by *Cryptomonas* sp. and small flagellates, was typical of the transition from diatoms, dominating the late spring bloom, to surface populations of cryptophytes during the summer (Helbling et al. 1994, Schloss & Estrada 1994, Moline et al. 2000). Their abundance, which was in the same range as that reported for the region of the Bellingshausen Sea during summer (Rodríguez et al. 2002a), remained similar during the whole experimental period and thus, cannot either explain the differential phytoplankton responses to the UVB treatment. Instead, this study demonstrates that phytoplankton responses to exposure to surface irradiance in the presence of repair was influenced by the phytoplankton previous exposure to light (Barbieri et al. 2002) which was partly influenced by vertical structure of the water column.

Vertical mixing influences the radiation levels received by phytoplankton cells (Denman & Gargett 1983). Under the same incident radiation, cells moving within a shallow UML will be exposed to a higher mean irradiance than those within a deep UML (Neale et al. 2003). In March, the water column was characterized by the presence of an UML of 13 m depth. Phytoplankton within this layer were likely mixed beyond the  $Z_{1\% 305 \text{ nm}}$  (10 m) and thus less acclimated to high surface irradiance. Our results are consistent with this assumption as cells incubated near the surface of the water column on 4 Mar. benefited the most from UVB removal in the presence of D1 repair whereas cells sampled in February were able to cope with surface irradiance even when UVB was present. In February, there were no apparent UMLs but a rather continuous increase in water density with depth over, at least, the first 40 m of the water column. This type of water column showing little vertical structure is similar to that observed in certain regions around Elephant Island (Helbling et al. 1992, 1994, Holm-Hansen et al. 1997) and can only occur in the absence of strong winds (Holm-Hansen et al. 1993). In such weakly stratified water columns phytoplankton cells can be expected to remain and to grow at those depths most favourable for maximal photosynthetic rates (Holm-Hansen et al. 1989). During the February experimental period, the upper part of the water column appears to have remained weakly stratified for at least five consecutive days (20 to 24 Feb.) without any evidence of strong wind events. Although the vertical profile of water density for the 22 Feb. was similar to the other profiles from the February period, the diluted surface nutrient and chl  $a$  concentrations observed on the 23 Feb. (Table 2) as well as the high  $F_v/F_m$  value measured that morning (0.73), suggest that some changes (mixing?) in the vertical structure of the

water column may have occurred overnight (from 22 to 23 Feb.), but this cannot be confirmed with the data available. During the February experimental period, maximal chl *a* concentrations were found near the surface and slowly decreased with depth (Fig. 3B). This vertical chl *a* distribution is consistent with that observed in the weakly stratified regions around Elephant Island (Holm-Hansen et al. 1997) but is different from the deeply and irregularly distributed chl *a* observed for the same regions a few years earlier (Helbling et al. 1994). In this later study, the authors proposed that phytoplankton originating from a weakly stratified water column would generally be mixed vertically to sufficient depths so that the mean irradiance experienced by the cells is relatively low and would limit their ability to photoacclimate through the synthesis of UV-absorbing compounds (Helbling et al. 1994). Our results rather suggest that cells harvested at 1 m depth within the weakly stratified water column were acclimated to or simply able to cope with surface irradiance. In addition, unlike microphytoplankton that commonly synthesize UV-absorbing compounds (Helbling et al. 1996), the small cells dominating the phytoplankton assemblage at the time of sampling were not likely to contain such compounds (Helbling et al. 1994) due to the high energy cost related to their synthesis (Garcia-Pichel 1994).

The response to the increase in light exposure in the surface incubations was contrasted with the response to the diurnal increase in irradiance between morning and noon time in the field samples. The relatively high  $F_v/F_m$  morning values (Büchel & Wilhelm 1993), reflecting the maximal PSII efficiency after a night of recovery, are likely explained by the dominance of Cryptophyceae (Li et al. 2003) and the presence of small chlorophyll *b*-containing phytoflagellates (Buma et al. 1992) in this region. The  $F_v/F_m$

diurnal variation observed (except on 24 Feb.) is consistent with that reported by others (Vassiliev et al. 1994, Lesser et al. 1996, Bergmann et al. 2002) and was dependent upon the incoming irradiance (Fig. 5) with likely 5 to 15 % being attributable to UVB (Figueroa et al. 1997, Xiong & Day 2001, Bergmann et al. 2002). This mid-day drop can either result from the downregulation of the PSII reaction centres (photoprotection not requiring D1 synthesis for recovery) or from their photodamage (requiring D1 synthesis for recovery) (Long et al. 1994). The relatively low  $F_v/F_m$  values (0.30 and 0.43) determined at the beginning of the surface incubations performed on sunny 23 Feb. and 4 Mar. suggest that recovery from the mid-day depression was not completed at the time the short-term incubations were performed (15:45). The large lincomycin response observed on these days implies that D1 protein was actively turning over in the afternoon, possibly playing a crucial role in repairing PSII reaction centers damaged by the high irradiances prevailing during mid-day. The absence of lincomycin effect on the overcast 24 Feb. implies that D1 turnover was slow and PSII undamaged on this low irradiance day.

Overall, our results show that 1) on sunny days, active D1 synthesis was crucial for the maintenance (or recovery) of PSII efficiency for the summer phytoplankton assemblage from this region of Antarctica; 2) in this community mainly dominated by small cells, UVB showed more effect on the D1 repair process than on the photodamage process itself and 3) phytoplankton sensitivity to surface UVB in the presence of repair depended on their previous light history determined, partly, by the vertical structure of the water column.

**4. D1, RUBISCO AND PHOTOCHEMICAL RESPONSES TO UVB  
ENHANCEMENT AND NITRATE SUPPLEMENTATION IN NATURAL  
PHYTOPLANKTON FROM A TEMPERATE AND A TROPICAL  
ENVIRONMENT**

*Bouchard JN, Longhi ML, Campbell DA, Ferreyra G & Roy S*

## 4.1 RÉSUMÉ

L'influence de l'ajout de nitrate et de rayonnement UVB a été testée sur la performance photosynthétique d'assemblages phytoplanctoniques naturels, d'un milieu tempéré (Rimouski, Canada) et d'un milieu tropical (Ubatuba, Brésil). À chacun des deux sites, l'évolution de l'assemblage phytoplanctonique, confiné dans des mésocosmes, a été suivie pour une période de 7 à 10 jours. Des sous échantillons provenant d'un mésocosme soumis à la lumière naturelle ambiante (NUVB) et d'un mésocosme soumis à la lumière naturelle ambiante additionnée d'une forte dose de rayonnement UVB (HUVB) ont été incubés de façon répétitive pour une période de 24 h à la surface de ces mésocosmes. Certains de ces sous échantillons étaient additionnés de nitrate, de phosphate et de silicate (sacs NPS) alors que les autres n'étaient additionnés que de phosphate et de silicate (sacs PS). Les paramètres photosynthétiques ont été déterminés en utilisant la fluorescence *in vivo* de la chl *a* alors que les changements des pools de protéine D1 et de la grande sous-unité de l'enzyme ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase-oxygénase (RuBisCO LSU) ont été déterminés par immunochimie. Les résultats ont montré une variabilité temporelle et inter-latitudinale dans les réponses du phytoplancton au HUVB et à l'ajout de nitrate. Lors d'une première incubation effectuée au site tempéré, les pools de D1 ont augmenté sous HUVB alors qu'ils sont restés constants sous le traitement de rayonnement UVB naturel. Cette augmentation du pool de D1 sous HUVB suggère un engagement du cycle de réparation du PSII, bien qu'il n'ait pas été suffisant pour contrer la photoinhibition (diminution du  $F_v/F_m$ ). À mesure que les concentrations en sels nutritifs sont devenues limitantes à l'intérieur des



mésocosmes, l'assemblage phytoplanctonique a montré une plus grande sensibilité au HUVB comparativement au NUVB menant à la diminution des pools de D1 et de RuBisCO LSU et à la photoinhibition. L'ajout de nitrate lors de cette période de limitation en sels nutritifs n'a pas influencé les pools de D1 mais a permis de maintenir des pools un peu plus élevés de RuBisCO LSU ce qui a diminué la photoinhibition. Au site tropical, caractérisé par des eaux plus oligotrophes et par des intensités lumineuses plus fortes, les pools de D1 ont chuté de façon marquée même sous la lumière naturelle ambiante. À ce site, le phytoplancton n'a pas démontré de sensibilité accrue au HUVB ni répondu clairement à l'ajout de nitrate possiblement parce que les organismes de ce site étaient déjà stressés par le fort éclairement PAR et le fort rayonnement UV prévalant à ce site et possiblement parce que les petites cellules (petits phytoflagellés et cyanobactéries) dominant cet assemblage dépendaient d'autres sources d'azote que le nitrate pour leurs activités métaboliques ou parce qu'elles étaient incapables d'assimiler le nitrate dû à leur condition physiologique déclinante.

## 4.2 ABSTRACT

The influence of nitrate supplementation and UVB enhancement on photosynthetic performance was examined in temperate (Canada) and tropical (Brazil) coastal phytoplankton assemblages exposed to natural or enhanced UVB ambient irradiance, equivalent to a local 60% ozone depletion. During week-long mesocosm experiments, 24-h surface bag incubations were performed repeatedly with half the bags supplemented with  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Si(OH)}_4$  while the other half received only  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Si(OH)}_4$ . Results show a temporal and inter-latitudinal variation in phytoplankton response to enhanced UVB and nitrate supplementation. In the initial temperate assemblage the increase in D1 pools observed under enhanced UVB shows an engagement of the PSII repair cycle, although it was not fully effective in countering photoinhibition (declining  $F_v/F_M$ ). As nutrients became limiting inside the mesocosms, phytoplankton showed an increased sensitivity to enhanced UVB, leading to drops in  $F_v/F_M$ , D1 and RuBisCO pools. Supplementing  $\text{NO}_3^-$  during this last period left D1 pool sizes unaffected but helped to maintain greater RuBisCO pools and slightly relieved photoinhibition. At the tropical site, which was characterised by oligotrophic waters and higher ambient irradiance, phytoplankton suffered fast rates of D1 degradation and did not show an increased sensitivity to enhanced UVB nor did they clearly respond to  $\text{NO}_3^-$  supplementation. This is because the major stress for the surface-incubated cells was high ambient PAR and UV and because the small cells dominating the assemblage at this site were relying on remineralized sources of N for

metabolic activities or simply unable to assimilate  $\text{NO}_3^-$  due to their declining physiological condition.

### 4.3 INTRODUCTION

Aquatic primary producers depend on light to drive photosynthetic carbon and nutrient assimilation. Their requirement for solar radiation renders them vulnerable to ultraviolet radiation (UV; 280-400 nm) exposure. Cellular proteins are especially sensitive because they absorb in the UV region of the solar spectrum (reviewed in Vincent & Neale 2000). Ultraviolet-B (UVB; 280-320 nm) can influence protein synthesis through direct inhibition of macromolecular synthesis, or by inhibition of nitrogen (N) uptake and metabolism (Döhler 1997, Döhler 1998, Fauchot et al. 2000). At the level of the photosynthetic apparatus, photosystem II (PSII) is a primary UVB target (Aro et al. 1993a) while photosystem I (PSI) is relatively insensitive to UVB damage (Strid et al. 1990). In PSII, several possible sites of damage are associated with the D1 protein (reviewed in Franklin et al. 2003), one of the core proteins involved in a PSII repair cycle (Aro et al. 1993a). The primary enzyme involved in CO<sub>2</sub> fixation, the ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase-oxygenase (RuBisCO) is also a suspected target of UVB inhibition (Strid et al. 1990, Wilson et al. 1995, Lesser, 1996a). Both PSII and RuBisCO have been shown to be affected by UVB during the same experiments (Lesser 1996b, Lesser et al. 2002).

N limitation in marine environments (Dugdale 1967) also profoundly affects cellular proteins, the largest cellular nitrogenous pool. In their study examining the effects of N limitation on the photosynthetic efficiency of PSI and PSII in diatoms and cyanobacteria, Berges et al. (1996) showed that major N limitation effects appeared mainly at PSII rather than at PSI so that diatom species, with abundant PSII centres, were more

affected by N limitation than were cyanobacteria with a higher relative PSI content. Dramatic decreases in  $F_V/F_M$  accompanied by drops in D1 protein content were observed in the N-limited cyanobacterium *Prochlorococcus marinus* (Steglich et al. 2001) and in the N-starved diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Geider et al. 1993). Similarly, declines in  $F_V/F_M$  accompanied by a slow drop in cell chlorophyll (Chl) and protein content were also reported for the N-starved green alga *Dunaliella tertiolecta* (Young & Beardall 2003), with N resupply stimulating rapid and complete recovery of  $F_V/F_M$  within 24 h. Bergmann et al. (2002) found that N-limited phytoplankton from the Neuse Estuary were not more susceptible than N-replenished phytoplankton to photoinduced impairment and downregulation of PSII but that the repair capacity of N-limited phytoplankton was adversely affected. Drops in RuBisCO large subunit (RbcL) pools have also been observed in the nutrient-limited green alga *Dunaliella tertiolecta* (Geider et al. 1998) while in the N-starved diatom *Phaeodactylum tricornutum*, the decline in the abundance of the small subunit (RbcS) of RuBisCO was most-marked (Geider et al. 1993).

Phytoplankton responses to combined stresses such as exposure to UVB and nutrient limitation are complex. Some studies report no marked effects of UVB in a diatom under N limitation (Behrenfeld et al. 1994) while others, in contrast, report an increased sensitivity to UVB for N-limited cultures of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (Lesser et al. 1994) and of estuarine dinoflagellates (Litchman et al. 2002). In both these studies, the increased sensitivity to UVB in the N-limited cultures was likely the consequence of less efficient repair of UVB damage. Shelly et al. (2002) found increased inhibition of photosynthesis in the green alga *Dunaliella tertiolecta* when UVB was coupled with N

limitation but also observed, under these N-limited conditions and acute UVB exposure, a stimulation of the repair rates which, however, were not fast enough to counteract the increase in damage. Experiments performed on natural phytoplankton communities also generated conflicting results. In their study on phytoplankton from a highly oligotrophic system typical of the upper Great Lakes (Colpoys Bay), Furgal & Smith (1997) found that the varying nutrient status and the photoadaptive state of phytoplankton had no significant influence on their sensitivity (in terms of photosynthetic performance) to UVB and the midsummer mixed community of diatoms, chrysophyceans and green algae was as sensitive as spring diatoms or fall communities. In contrast, Wulff et al. (2000) found that nutrient ( $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , and  $\text{Si(OH)}_4$ ) supplementation lowered UVB effects on Chl *a*, algal intracellular storage of carbohydrates and concentration of extracellular "colloidal" carbohydrates in a diatom-dominated marine microphytobenthic community growing on a sand-substratum. Clearly, phytoplankton response to combined UVB and nutrient stress can not be simply summarised. Indeed, factors including the duration of the experiments, the extent of phytoplankton exposure to UVB (influenced by the presence or not of mixing and by the gradual induction of photoprotective or repair mechanisms) and the degree of nutrient limitation need to be considered because they can modulate the phytoplankton response (Vernet 2000).

In this study, the phytoplankton assemblage from a temperate mesotrophic site (Eastern Canada) was compared with the phytoplankton assemblage from a tropical oligotrophic site (Brazil). The goal of this study was to examine the interactions between UVB (natural and enhanced) and  $\text{NO}_3^-$  limitation (and re-supply) on the photosynthetic

apparatus of these natural phytoplankton assemblages characterized by their different specific phytoplankton composition, light-history and nutritional status.

#### 4.4 MATERIALS AND METHODS

*Study sites and experimental set-up.* A mesocosm experiment was conducted at a temperate site in Canada (Rimouski; 48.4 °N, 68.5 °W) from 18 to 27 June 2000 and a second experiment was performed at a tropical site in Brazil (Ubatuba; 23.5 °S, 45.1 °W) from 10 to 16 February 2001. The experimental set-up was substantially the same at both sites and has been described in detail elsewhere (Bouchard et al. 2005a). Briefly, two mesocosms (~1800 l) made of transparent polyethylene bags transmitting 85% to 93% in the 280 to 750 nm range, were immersed in the water column, tied to a wharf. These mesocosms were filled simultaneously with 500 µm filtered local coastal seawater one day prior to the beginning of the experiments. At the temperate site, water was collected at 5 m from the surface in the St. Lawrence Estuary while at the tropical site, the water was collected at 8 m from the surface in Ubatuba Bay. Water inside the mesocosms was mixed using a Little Giant® pump (model 2-MD-HC, Little Giant Pump Co., USA) with a turnover time of ~ 1 h. One mesocosm was exposed to the natural ambient irradiance (NUVB) while the other mesocosm was exposed to natural ambient irradiance plus lamp-induced enhanced UVB conditions (HUVB). UVB enhancements simulating a local 60% ozone depletion scenario (Díaz et al. 2003) were obtained using four UVB fluorescent light tubes (Philips TL40 W/12RS, Canada) suspended at ~35 cm above the water surface of the mesocosms. These light tubes, which were preburned for > 100 h prior to the experiment and covered with daily-changed cellulose diacetate sheets to filter out ultraviolet-C radiation, were turned on from 10:00 am to 3:00 pm using an electronic dimming ballast at the temperate site while at



the tropical site, the lamps were adjusted using the same dimming ballast which was controlled by a computer system using an electronic unit linked to UVB detectors (Díaz et al. 2003). This computer-controlled system provided a constant proportional enhancement of UVB, following the natural variation of ambient UVB throughout the day. Wooden dummies were installed on top of the NUVB mesocosm to simulate shading caused by the lamps over the HUVB mesocosm.

*Short-term bioassays with nutrient supplementation.* At both experimental sites, nutrient bioassays were performed inside the two mesocosms previously described. In Rimouski, three short-term (24 h) bioassays were performed starting at ~ 6:00 pm on days 1, 5 and 9 which corresponded to the pre-bloom, bloom and post-bloom periods, respectively. In Ubatuba, two short-term bioassays were performed: one starting on day 1 and one starting on day 4. No bloom developed at this site. In summary, for each of these bioassays, six 4l UV-transparent Ziploc-type bags (transmitting 86% to 94% of light in the 280 nm to 750 nm range), were filled with water originating from the respective mesocosms. Half of these bags were supplemented with nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), phosphate ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) and silicate ( $\text{Si(OH)}_4$ ) ("NPS-bags") while the three remaining bags were only supplemented with  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Si(OH)}_4$  and acted as control bags ("PS-bags"). Final nutrient concentrations in the small incubation bags were chosen as a function of natural nutrient concentrations measured below the mixed layer at the respective experimental sites (to mimic mixing events with deeper waters). In Rimouski, added nutrient concentrations were 15  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$  and 15  $\mu\text{M}$   $\text{Si(OH)}_4$  and in Ubatuba, 2  $\mu\text{M}$   $\text{NO}_3^-$ , 0.3  $\mu\text{M}$   $\text{PO}_4^{3-}$  and 2  $\mu\text{M}$   $\text{Si(OH)}_4$  were

added to the incubation bags. Samples for laboratory analyses of nutrient concentrations, Chl *a* biomass, photosynthetic parameters, pigments and proteins were collected at the beginning ( $T_0$ ) and after 24 h of surface incubation ( $T_F$ ).

*Radiometric and temperature measurements.* Incident solar radiation was recorded for wavelengths 305, 313, 320, 340, 380 nm and PAR every 10 min using a GUV541 surface radiometer (Biospherical Instruments, Inc., USA) set on the wharf next to the mesocosms. Irradiance at the surface of the mesocosms was obtained from incident irradiances corrected for the ratio  $I_{\text{surface}}/I_{\text{incident}}$  (shading effects from lamps/dummies). Daily fluence was calculated by integrating these values from 0 to 24 h each day. The daily fluence averaged over the whole water column of the mesocosms was calculated using Riley's equation (Riley 1957) by multiplying daily fluence at surface by  $(1 - e^{-K_d Z})$  and dividing by  $(K_d Z)$ . To assess the relative irradiance increase provided by the UVB lamps, surface irradiances at the five GUV wavelengths from a sunny day around noon in NUVB and HUVB mesocosms were used to integrate over the whole UV range. The average diatoms and dinoflagellates biological weighting function of Neale & Kieber (2000) was then used to assess the weighted lamp-induced UV increase (all UV wavelengths were considered as the lamps caused a slight UVA increase even though their peak is at 313 nm). A PUV-542T radiometer (Biospherical Instruments, Inc.) was used for vertical profiles (same wavelengths as above), enabling the determination of the vertical attenuation coefficient ( $K_d, \text{m}^{-1}$ ) and mean depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}, \text{m}$ ). At both sites surface water

temperature was continuously measured using thermocouples (type “J”) connected to a data logger (21X, Campbell Scientific, Inc., Canada).

*NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, pigment and particulate organic carbon (POC) and nitrogen (PON) determination.*

For NO<sub>3</sub><sup>-</sup> measurements, samples were filtered onto precombusted Whatman<sup>®</sup> GF/F filters and the filtrates were then frozen at -80 °C for later determination of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> concentration according to Parsons et al. (1984) using a Technicon II<sup>™</sup> autoanalyser in Rimouski and an Autoanalyser II Bran-Luebbe in Ubatuba using the method described in Grasshoff et al. (1983). For pigment determination, samples were filtered on Whatman<sup>®</sup> GF/F filters which were frozen in liquid N<sub>2</sub> and then conserved at -80 °C prior to analyses. Analyses were done using high-performance liquid chromatography (HPLC) according to Wright et al. (1991) as modified by Roy et al. (1996) for the Rimouski samples and using the method of Zapata et al. (2000) for Ubatuba samples. Water samples used for photoprotective pigments analyses collected at T<sub>0</sub> and at T<sub>F</sub> of the bioassays were kept in opaque containers for ~ 1 h, which is more than the few minutes required for the reconversion of diatoxanthin (Dt) into diadinoxanthin (Dd) (Demers et al. 1991). The longer-term Dt retention observed under certain circumstances (Demmig-Adams et al. 1999) will be expressed in this paper as Dt/Dd+Dt. For POC and PON determination, samples were filtered on precombusted Whatman<sup>®</sup> GF/F filters which were then stored at -20 °C before being analyzed with a CHN analyser (model 2400, Perkin-Elmer, Inc., USA).

*Chl a fluorescence measurements.* Chl *a* fluorescence was measured using a multiple turnover Xenon-Pulse Amplitude Modulated Fluorometer (Xe-PAM, Walz, Germany). Prior to analysis, phytoplankton samples were kept at *in situ* temperature and were dark adapted for at least 45 min to allow for relaxation of non-photochemical quenching (NPQ). To determine the maximal quantum yield of photochemistry,  $F_V/F_M$ , minimal fluorescence ( $F_0$ ) was determined on the dark-adapted sample then a 600 ms saturation pulse of approximately  $4000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$  emitted by a Schott saturation flash lamp (Schott Inc., Germany) was administered in order to measure the maximum fluorescence ( $F_M$ ). These values were used to estimate  $F_V/F_M$  as  $(F_M - F_0) / F_M$ . For the determination of the fluorescence parameters in an illuminated state, an actinic light was applied at an intensity similar to the natural ambient light prevailing at each site on the specific analysis day.  $F_T$  was determined as the steady-state value of fluorescence immediately prior to the saturating pulse and the maximal ( $F_M'$ ) fluorescence was determined following a 600 ms saturation pulse. The sample was then darkened to determine the minimal ( $F_0'$ ) fluorescence. Using these parameters, the quantum yield of open PSII under illumination ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ), the photochemical fluorescence quenching ( $q_P$ ) and the NPQ were calculated according to Maxwell & Johnson (2000):

$$\Phi_{\text{PSII}} = (F_M' - F_T) / F_M'$$

$$q_P = (F_M' - F_T) / (F_M' - F_0')$$

$$\text{NPQ} = (F_M - F_M') / F_M'$$

*Protein detection by immunoblotting.* D1 protein (PsbA) was detected by immunochemistry as described in Bouchard et al. (2005a). Briefly, total cellular proteins were extracted and solubilised from cells collected on Whatman<sup>®</sup> GF/F filters using 750 µl of 100 mM Tris-base, pH 8.3, 320 mM sucrose, 1 mM EDTA, 1% SDS and 0.5% dithiothreitol. Cells were disrupted by continuous sonication (model XL2010, Heat Systems, USA). A freeze (liquid N<sub>2</sub>) and thaw (water bath at 80 °C) cycle was then applied three times to the samples which were then centrifuged to remove glass fiber debris and insoluble material. The supernatants containing the solubilised proteins were collected and stored at –80 °C until use. The proteins were separated on linear 10% SDS-polyacrylamide ReadyGels (BioRad, Canada) using a Mini-Protean II (BioRad) cell. To optimize the protein detection signal, the maximal volume (15 µl) of solubilised proteins was loaded in each well (thus, slightly different Chl contents, but within the same order of magnitude, were loaded in each well). The gels were electrophoresed at 100V for 100 min in 25 mM Tris-base, 192 mM glycine and 0.1% SDS. Proteins were then electrophoretically transferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (BioRad) in 49 mM Tris-base, 39 mM glycine, 0.04% SDS and 20% methanol in a Semi-Dry Transfer Cell (BioRad) at 13 V for 25 min. The PVDF membrane was then washed in Tris-buffered saline (TBS-T: 20 mM Tris-base, 500 mM NaCl, 0.05 % Tween-20; pH 7.5) and soaked for 1 h at 25 °C in 5% low-fat powdered milk in TBS-T. The membrane was incubated with a primary anti-PsbA global antibody ([www.agrisera.se](http://www.agrisera.se)) diluted (1:4000) in 10 ml of blocking buffer for 40 min, at 25 °C and subsequently rinsed with TBS-T and incubated with a secondary rabbit anti-chicken IgG antibody conjugated to peroxidase (Sigma-Aldrich, Canada) diluted 1:4000 in 10 ml

blocking buffer, for 40 min at 25 °C. The membrane was further rinsed with TBS-T and incubated with ECL Plus (Amersham Biosciences, Inc., Canada) for 5 min at 25 °C. The blots were imaged with a Fluor-S-Max™ MultiImager (BioRad) and quantification performed with the Quantity One® software (BioRad). The relative protein density (pixel count mm<sup>-2</sup>) for each band was then expressed per litre and subsequently standardized per Chl biomass (µg Chl *a* l<sup>-1</sup>). For RuBisCO LSU (RbcL) detection, the procedure described above was followed except that the anti-RbcL antibody ([www.agrisera.se](http://www.agrisera.se)) was diluted 1:8000 in 10 ml of blocking buffer for 40 min, at 25 °C. Protein detection and quantification were then pursued as described for the D1 protein.

*Statistical analyses.* For Chl *a*, photosynthetic parameters and pigment data, repeated measures two-way ANOVAs (SYSTAT, V. 9.0, SPSS Inc., USA) were performed with UV radiation (UV) and nutrient (Nut) treatments acting as factors and incubation day (days) acting as the repeated factor. When significant differences were present ( $p < 0.05$ ), a two-way ANOVA was performed for each specific incubation time (at T<sub>0</sub> and T<sub>F</sub> of each bioassay) with UV and nutrient treatments acting as factors followed by a Tukey test whenever a significant effect was observed. Prior to the repeated measures ANOVAs, normality was checked using a one-sample Kolmogorov-Smirnov test whereas the sphericity assumption that concerns variance homogeneity was checked using the Huynh-Feldt epsilon. Only protein determinations originating from the same electrophoresed gel could be compared between them. Because of the limited number of wells on a gel, each gel was loaded with samples taken under both nutrient conditions under one UV treatment.

Student's *t*-test for independent samples was thus used to compare the two nutrient treatments under one UV treatment (NUVB and HUVB samples loaded on different gels).

## 4.5 RESULTS

*Light, UVB irradiance and temperature.* The ambient incident irradiance was lower at the temperate site with an average (for the incubation days presented in Table 1) noontime maximal incident irradiance of  $\sim 4.5 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  for UVB (305 nm),  $\sim 57.3 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  for UVA (340 nm) and  $\sim 2056 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  for PAR in comparison to the tropical site where the average noontime maximal incident irradiance was  $\sim 9.1 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  for UVB,  $\sim 72.6 \mu\text{W cm}^{-2} \text{ nm}^{-1}$  for UVA and  $\sim 2570 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  for PAR (Table 1). Relative UV irradiance increases provided by the lamps just below water surface at noon on a sunny day were 3.91 (unweighted = 1.73) for temperate Rimouski, and 1.25 (unweighted = 1.02) for tropical Ubatuba (Table 1). The smaller increase in Ubatuba reflects the fact that the ozone depletion scenario predicts smaller changes in ozone (and thus in UVB irradiance) in this region. Water temperature at the surface of the mesocosms was  $\sim 11 \text{ }^\circ\text{C}$  at the temperate site and  $\sim 30 \text{ }^\circ\text{C}$  at the tropical site.

*Phytoplankton taxonomic composition during the course of the mesocosm experiments.* At the temperate site, mesocosm confinement for 10 d resulted in a diatom bloom peaking on day 7 and declining thereafter. Phytoflagellates were also present in these mesocosms at fairly steady absolute counts, but their relative abundance varied through time as the diatom bloom progressed (Table 2). At the tropical site, phytoplankton abundance increased from day 1 to day 4 under NUVB while it remained mostly steady under HUVB. After day 4, the abundance slowly declined until the end of the experiment. The absence of a bloom



Table 4.1 Incident irradiance and UV increase for the three temperate bioassays (Bioas.1, 2 and 3) and for the two tropical bioassays (Bioas.1 and 2). Incident irradiance at noon time (10 min averages) for PAR, UVA (340 nm) and UVB (305 nm). Daily fluence at water surface in the mesocosms was obtained from integration over the incubation period (i.e., from 6:00 pm the first day of the bioassays to 6:00 pm the following day) for PAR, UVA and UVB for the mesocosm exposed to natural ambient irradiance (NUVB) and the mesocosm exposed to enhanced UVB (HUVB). Daily fluence averaged over the whole water column (mesocosms depth = 2.3 m and 1.9 m at the temperate and tropical sites, respectively) for PAR, UVA and UVB was calculated with Riley's (1957) equation. Mean depth of 1% light penetration ( $Z_{1\%}$ ) for PAR, UVA and UVB was calculated from the  $K_d$  values (not shown). The relative UV irradiance increase (unweighted and weighted) provided by the lamps (relative to NUVB conditions) just below water surface at noon on a sunny day was calculated from the five wavelengths detected by the GUV.

	<u>TEMPERATE</u>			<u>TROPICAL</u>	
	Bioas.1	Bioas.2	Bioas.3	Bioas.1	Bioas.2
<b>Noon incident irradiance</b>					
PAR ( $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$ )	2070	2098	2000	2638	2503
UVA (340 nm) ( $\mu\text{W/cm}^2/\text{nm}$ )	59.1	58.3	54.6	74.3	70.8
UVB (305 nm) ( $\mu\text{W/cm}^2/\text{nm}$ )	4.6	4.6	4.2	9.4	8.7
<b>Daily integrated surface irradiance</b>					
PAR ( $\text{mol photons/m}^2$ )	41.61	38.73	29.75	24.66	29.82
UVA (340 nm) ( $\text{kJ/m}^2/\text{nm}$ )	7.92	7.61	5.67	7.75	8.94
305 nm NUVB ( $\text{kJ/m}^2/\text{nm}$ )	0.43	0.41	0.29	0.79	0.92
305 nm HUVB ( $\text{kJ/m}^2/\text{nm}$ )	5.68	5.72	2.77	1.55	1.81
<b>Daily average mesocosm irradiance</b>					
PAR ( $\text{mol photons/m}^2$ )	19.02	14.09	10.10	15.92	15.33
UVA (340 nm) ( $\text{kJ/m}^2/\text{nm}$ )	1.04	1.00	0.65	2.43	2.66
305 nm NUVB ( $\text{kJ/m}^2/\text{nm}$ )	0.04	0.03	0.02	0.17	0.19
305 nm HUVB ( $\text{kJ/m}^2/\text{nm}$ )	0.53	0.43	0.18	0.30	0.36
<b><math>Z_{1\%}</math></b>					
PAR (m)	5.76	4.19	3.84	9.21	5.76
UVA (340 nm) (m)	1.40	1.40	1.21	2.88	2.71
UVB (305 nm) (m)	1.05	0.85	0.78	1.84	1.77
<b>Ratio all UV HUVB/NUVB</b>					
unweighted	1.73			1.02	
weighted	3.91			1.25	

Table 4.2 Total cell abundance inside the NUVB and HUVB mesocosm at T<sub>0</sub> of the three temperate bioassays (Bioas.1, 2 and 3) and of the two tropical bioassays (Bioas.1 and 2). Major phytoplankton groups are presented as percentages of the total cell abundance. At the temperate site, major diatom species were *Thalassiosira* and *Chaetoceros* while the phytoflagellate group was mainly composed of small unidentified phytoflagellates (< 5µm), *Chlorophyceae* and *Eutreptiaceae*. At the tropical site, small unidentified flagellates (< 5 µm) were dominant at all times. The major diatom species was *Cerataulina* aff. *pelagica*, the major cyanobacterium species was *Johannesbaptista pellicida* and the major dinoflagellate species was *Protoperidinium*. -; not detected in the assemblage.

	TEMPERATE			TROPICAL	
	Bioas.1	Bioas.2	Bioas.3	Bioas.1	Bioas.2
<b>Total cell abundance (10<sup>6</sup> Cell l<sup>-1</sup>)</b>					
NUVB	0.72	2.2	6.4	2.2	3.5
HUVB	0.78	1.4	6.4	3.2	3.3
<b>Diatoms (%)</b>					
NUVB	2.5	54.9	22.5	12.7	8.3
HUVB	9.3	43.8	26.9	4.6	9.4
<b>Phytoflagellates (%)</b>					
NUVB	97.5	45.1	77.5	86.8	89.3
HUVB	90.7	56.2	73.1	85.0	71.6
<b>Dinoflagellates (%)</b>					
NUVB	-	-	-	0.1	0.7
HUVB	-	-	-	0.0	0.4
<b>Cyanobacteria (%)</b>					
NUVB	-	-	-	0.4	1.6
HUVB	-	-	-	10.4	18.6

at this site was related to low initial  $\text{NO}_3^-$  concentrations, typical of tropical oligotrophic environments. At this site, the assemblage was dominated by small phytoflagellates ( $< 5 \mu\text{m}$ ) but diatoms, cyanobacteria and dinoflagellates were also present (Table 2).

*Bioassay initial  $\text{NO}_3^-$ , Chl  $a$  concentrations and POC:PON molar ratios.* When the first bioassay was performed at the temperate site, pre-enrichment  $\text{NO}_3^-$  concentrations were high ( $\sim 15.0 \mu\text{M}$ ) while Chl  $a$  concentrations were less than  $1 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  (Fig. 1A, B). At the start of the second bioassay,  $\text{NO}_3^-$  had decreased to near  $5 \mu\text{M}$  and Chl  $a$  concentrations were near  $7.0 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  (Fig. 1A, B). The post-bloom period (third bioassay) was characterized by low  $\text{NO}_3^-$  concentrations ( $< 1.0 \mu\text{M}$ ) and Chl  $a$  concentrations still near  $5.0 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  (Fig. 1A, B). The POC:PON molar ratio was  $\sim 8.5$  and  $6.5$  at the beginning of the first and the second bioassays, respectively, while it was near  $20.0$  at the beginning of the third bioassay, consistent with N limitation during this last experiment. When the first bioassay was performed at the tropical site, pre-enrichment  $\text{NO}_3^-$  concentrations were slightly greater than  $1.5 \mu\text{M}$  and Chl  $a$  concentrations near  $4.5 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$ . When the second bioassay was performed  $\text{NO}_3^-$  concentrations were low ( $\sim 1.0 \mu\text{M}$ ) and the Chl  $a$  biomass below  $2.0 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  (Fig. 1B, D). The similar POC:PON molar ratio (ca  $9.0$ ) found at the beginning of both bioassays does not suggest N limitation even though  $\text{NO}_3^-$  concentrations were quite low. This can be explained by the use of regenerated N in these mesocosms.

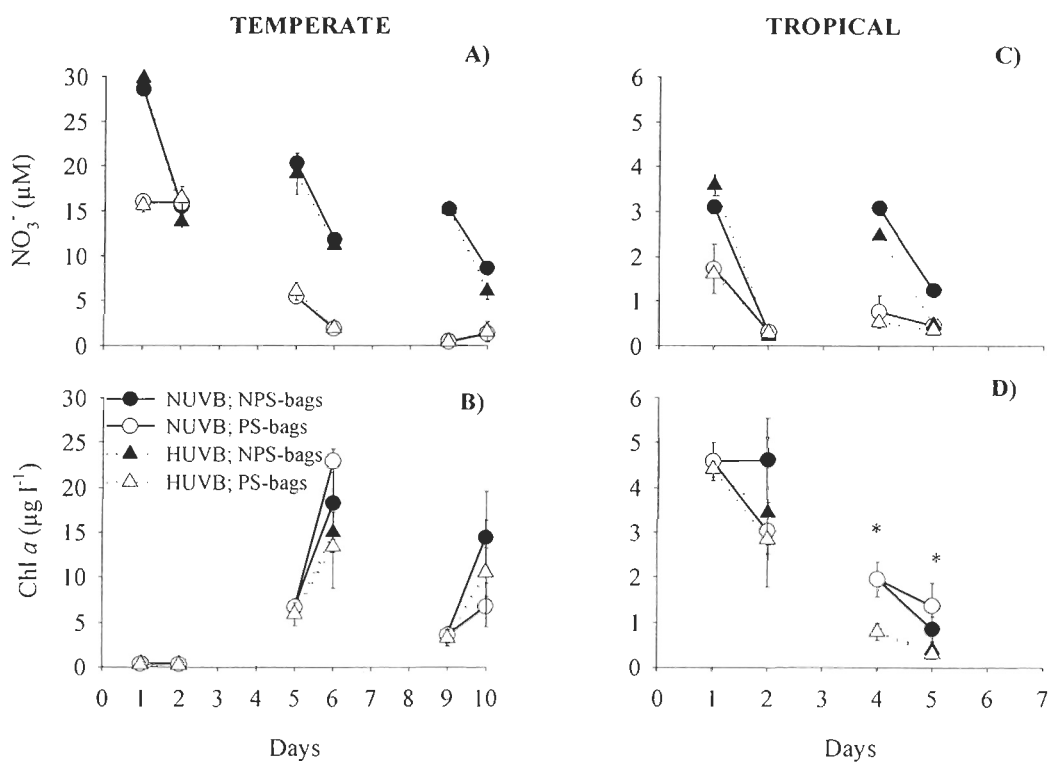


Figure 4.1 Evolution of the  $\text{NO}_3^-$  (A, C) and Chl *a* (B, D) concentrations determined for the bioassays performed at both sites. Treatments were natural ambient light (NUVB) and natural ambient light with lamp-supplemented UVB (HUVB), with the addition of  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Si}(\text{OH})_4$  (NPS-bags) or the addition of  $\text{PO}_4^{3-}$  and  $\text{Si}(\text{OH})_4$  only (PS-bags). Results from the two-way ANOVAS on specific incubation times are indicated by an asterisk (\*) for a significant ( $p \leq 0.05$ ) UVB effect.

*Chl a concentrations.* At the temperate site,  $\text{NO}_3^-$  supplementation had no clear effect on the Chl *a* biomass. Initial Chl *a* concentrations were and remained lower than  $1 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  under all conditions tested during the course of the first bioassay but increased from near  $7.0 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  to more than  $10 \mu\text{g Chl } a \text{ l}^{-1}$  under all conditions tested during the course of the second bioassay (Fig. 1B). This increase in Chl *a* concentrations was also observed under all conditions tested during the course of the last bioassay performed at this site but no significant differences were observed between the different treatments (Fig. 1B). At the tropical site,  $\text{NO}_3^-$  supplementation had no significant effects on Chl *a* during both bioassays (Fig. 1D). Chl *a* biomass remained significantly greater under NUVB compared to HUVB during the last bioassay (Fig. 1D).

*Photosynthetic parameters – dark-adapted and illuminated states.* Temperate phytoplankton was in a poor physiological state ( $F_V/F_M < 0.20$ ) when the first bioassay was performed but this improved over the course of the mesocosm experiment ( $F_V/F_M > 0.45$  at  $T_0$  of the second and third bioassays; Fig. 2A). Exposing the phytoplankton to surface irradiance for 24 h at this site caused a photoinhibitory decline in  $F_V/F_M$  and  $\Phi_{\text{PSII}}$  (Fig. 2A, B). During the second and third bioassays, UVB enhancement caused more photoinhibition, as seen from significantly larger  $F_V/F_M$  declines under HUVB than under NUVB. During the third bioassay only,  $\text{NO}_3^-$  supplementation significantly reduced this photoinhibition and alleviated  $F_V/F_M$  declines under both UV treatments (by about 50%; Fig. 2A; Table 3).  $q_p$ , which approximates the fraction of open reaction centres (RCs) (van

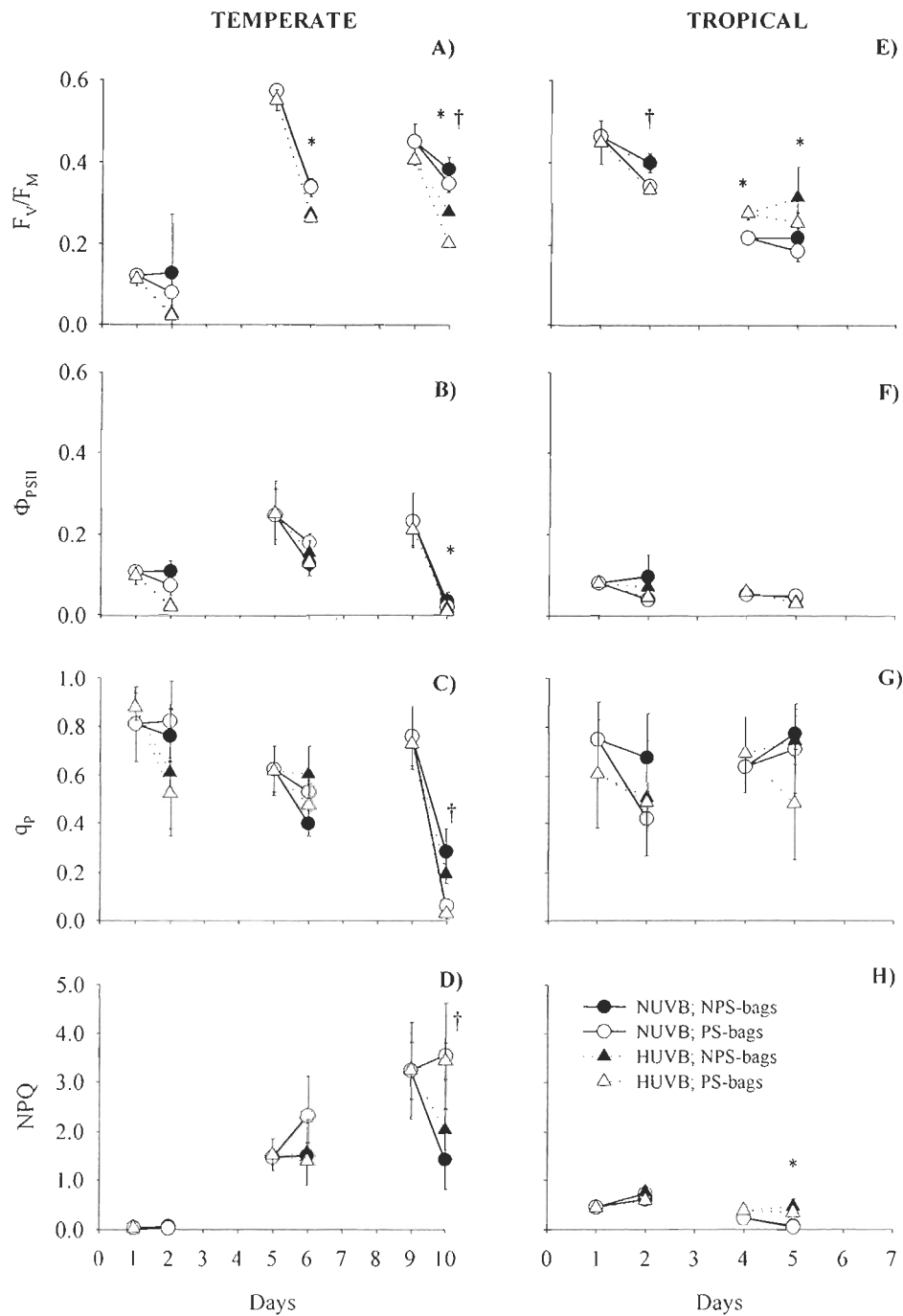


Figure 4.2 Evolution of the maximal quantum yield of photochemistry ( $F_V/F_M$ ; A, E), of the quantum yield of open PSII under illumination ( $\Phi_{PSII}$ ; B, F), photochemical quenching ( $q_P$ ; C, G) and non-photochemical quenching (NPQ; D, H) for the bioassays performed at both sites. Treatments are as described in Fig. 1. Results from the two-way ANOVAS are indicated by an asterisk (\*) for a significant UVB effect and by a cross (†) for a significant nutrient effect.

Table 4.3 Summary of results obtained from the repeated-measures ANOVA for Chl *a*, photosynthetic parameters and photoprotective pigments determined at both sites. The source of variation is partitioned into individual effects of the UV treatment (UV) and nutrient treatment (Nut), their interaction (UV x Nut), the repeated measure (Days) and its interaction with the individual effects (Days x UV, Days x Nut, Days x UV x Nut). \* Indicates significance at  $0.01 < p \leq 0.05$ , \*\*  $0.001 < p \leq 0.01$ , \*\*\*  $p \leq 0.001$ , ns: not significant.

	UV	Nut	UV x Nut	Days	Days x UV	Days x Nut	Days x UV x Nut
<b>TEMPERATE</b>							
Chl <i>a</i>	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub>	*	*	ns	***	***	*	*
Φ <sub>PSII</sub>	*	ns	ns	***	ns	ns	ns
q <sub>P</sub>	ns	*	ns	***	ns	ns	ns
NPQ	ns	**	ns	***	ns	*	ns
Z/Chl <i>a</i>	ns	ns	ns	***	ns	ns	ns
Dd+Dt/Chl <i>a</i>	ns	ns	ns	***	*	ns	ns
Dt/Dd+Dt	ns	ns	ns	***	***	ns	ns
<b>TROPICAL</b>							
Chl <i>a</i>	**	ns	ns	***	ns	*	ns
F <sub>v</sub> /F <sub>M</sub>	*	ns	ns	***	ns	**	ns
Φ <sub>PSII</sub>	ns	*	ns	***	ns	*	ns
q <sub>P</sub>	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns
NPQ	**	ns	ns	***	ns	ns	ns
Z/Chl <i>a</i>	***	ns	ns	***	***	ns	ns
Dd+Dt/Chl <i>a</i>	***	ns	ns	***	**	ns	ns

Kooten & Snell 1990) where a value of 1 indicates that all centres are open (Büchel & Wilhelm 1993), was always greater at the beginning of the bioassays and generally decreased over the 24 h incubation period (Fig. 2C). During the third bioassay,  $\text{NO}_3^-$  supplementation helped in maintaining greater  $q_p$  values under both UV treatments (Fig. 2C). NPQ measured after prolonged darkness reflects photoinhibition ( $q_I$ ) rather than energy-dependent transient down-regulation ( $q_E$ ) (Schreiber & Bilger 1993). NPQ varied little during the first two bioassays (Fig. 2D) while it slightly increased under both UV treatments (from  $\sim 3.2$  to  $\sim 3.4$ ) during the third bioassay but only in the PS-bags (Fig. 2D).  $\text{NO}_3^-$  supplementation induced some relief from photoinhibition, as seen from the significant decrease in NPQ. At the tropical site, surface incubation caused a decline in  $F_V/F_M$  values under all conditions tested during the first bioassay but  $\text{NO}_3^-$  supplementation significantly alleviated this decline under both UV treatments (Fig. 2E; Table 3). Phytoplankton were severely inhibited from the start of the second bioassay and  $F_V/F_M$  values varied only slightly under both UV treatments but were significantly greater under HUVB (Fig. 2E). Initial  $\Phi_{\text{PSII}}$  were near 0.1 remained low under both UV treatments.  $q_p$  values were highly variable, ranging between 0.4 and 0.8 under all conditions tested during both bioassays (Fig. 2G) and NPQ ( $< 1.0$  during the whole experimental period) varied little during the course of the tropical bioassays (Fig. 2H).

*Photoprotective pigments.* Increases in the Chl-specific pool size of photoprotective pigments (Dd + Dt) and retention of Dt were observed after 24 h of surface incubation under all conditions tested during the second and third temperate bioassays (Fig. 3B, C)



despite Chl *a* increases (Fig. 1B). At the tropical site, Dt was undetectable and Dd was in low concentration. The Chl-specific pool of Dd slightly increased under all conditions tested during both bioassays (Fig. 3E) and reached significantly greater values under HUVB during the second bioassay (Fig. 3E) but only because Chl *a* concentrations were significantly lower under HUVB (Fig. 1D).

When green algae are present, the xanthophyll cycle pigments include violaxanthin (V), antheraxanthin (A) and zeaxanthin (Z) instead of Dd and Dt. The absence of A and V at both sites suggests either that strong light converted all V and A into Z, or that Z detected was most likely a marker of cyanobacteria that possess no xanthophyll cycle (Campbell et al. 1998b) and thus have no V or A (but Z still plays a photoprotective role: Kana et al. 1988). On a Chl *a* basis, Z was > 100 fold less than the pool of Dd and Dt at the temperate site (Fig. 3A, B), reflecting the dominance of diatoms at this site. At the tropical site, the Chl-specific pool of Z was 10 times larger than at the temperate site, because of a greater relative abundance of green algae and/or cyanobacteria. The concomitant decrease in Chl *a* (Fig. 1B) and Z concentrations (not shown) with Z decreasing more than Chl *a* lead to a decrease in Chl-specific Z in 24 h under all conditions tested during the first bioassay. Hence pigment photoprotection decreased during surface incubations. During the second bioassay, Chl-specific Z increased under all conditions tested in 24 h but significantly more under HUVB (Fig. 3D), as noted before for Chl-specific Dd.

*Protein pools.* At the temperate site, there were no significant effects of  $\text{NO}_3^-$

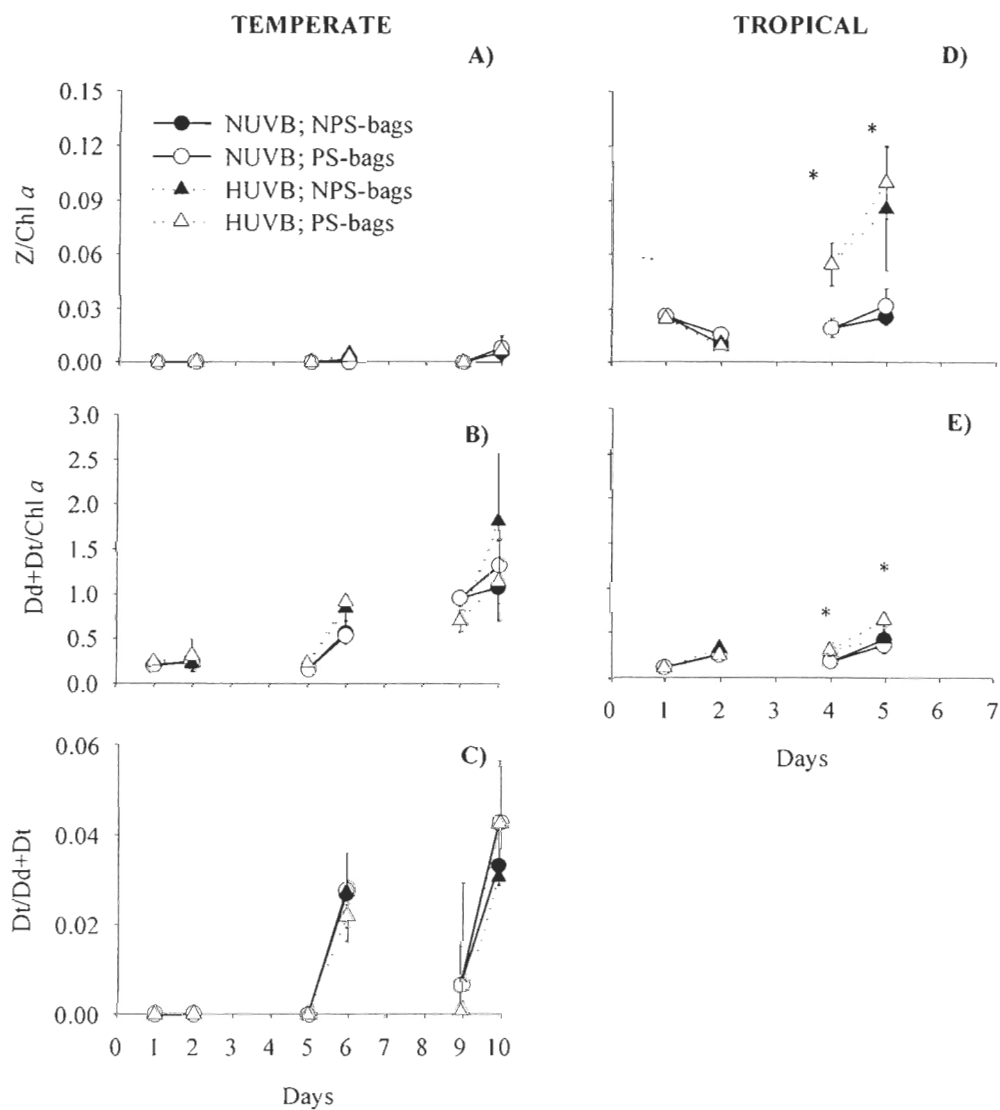


Figure 4.3 Evolution of the Chl-specific zeaxanthin (Z) during the bioassays performed at both sites (A, D) and of the Chl-specific pool of diadinoxanthin (Dd) and diatoxanthin (Dt) (B, E). Note that Dt was undetectable at the tropical site; retention of Dt (Dt/Dd+Dt) is thus shown for the temperate bioassays only (C). Treatments and results from statistical analyses are as described in Fig. 1.

supplementation on the different proteins detected. During the course of the first bioassay, D1 and RuBisCO LSU pool sizes remained near initial levels under NUVB but greatly increased under HUVB (Fig. 4A, B) (see Fig. 4D for examples of D1/PsbA and RuBisCO LSU/RbcL detection). During the course of the second bioassay, both pools decreased to a greater extent under HUVB compared to NUVB (Fig. 4A, B). The initial D1 pool was thus drawn down in the HUVB treatment, to help maintain photosynthetic performance, but this was insufficient to prevent a decrease in  $F_V/F_M$ . During the course of the third bioassay, D1 pools decreased to a greater extent under HUVB than under NUVB while RuBisCO pools decreased to a greater extent under NUVB than under HUVB (Fig. 4A, B). The RuBisCO LSU to D1 ratio remained mostly constant ( $< 0.5$ ) during the course of the first two bioassays (Fig. 4C) while for the third bioassay, it increased under both UV treatments (NPS-bags). During the first tropical bioassay, D1 pools decreased under all conditions tested but more markedly, although not significantly, in the PS-bags (Fig. 4E). At the start of the second bioassay, Chl-specific D1 pools were slightly smaller than at the start of the first bioassay. D1 pools  $l^{-1}$  (not shown), however, showed near complete depletion of the protein pool at this time. The 54 kDa-band referring to RbcL was also too faint to be adequately quantified but a high molecular weight (HMW) band ( $\sim 70$  kDa) was detected under all conditions tested in Ubatuba (Fig. 4F).

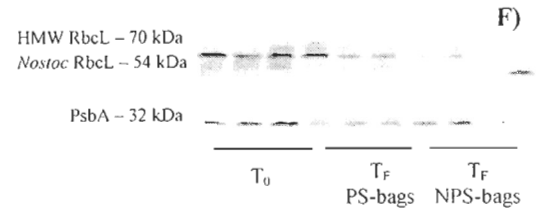
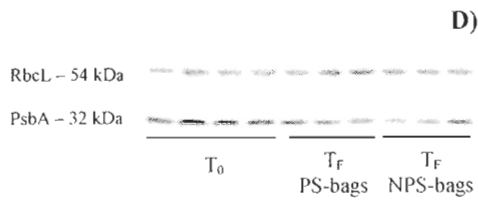
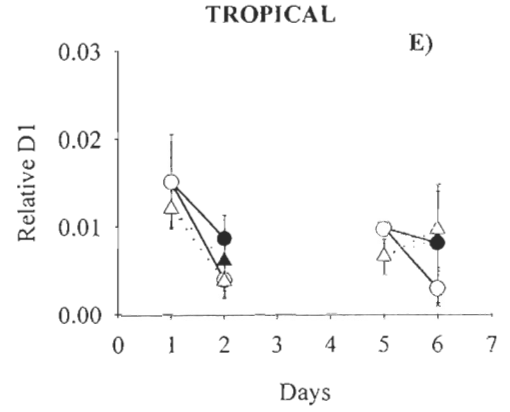
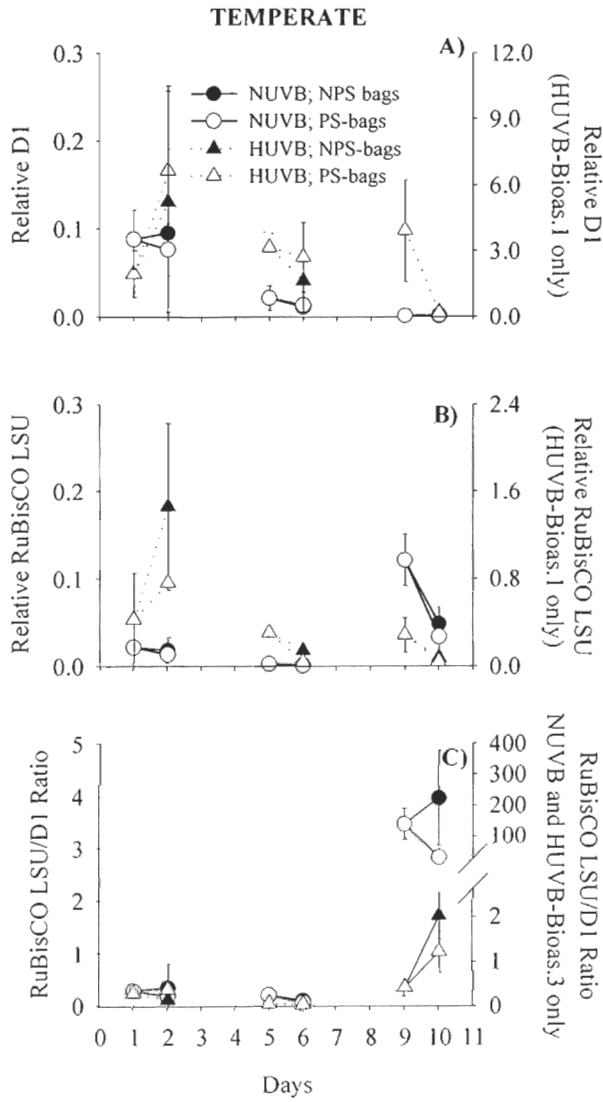


Figure 4.4 Evolution of the relative D1 protein pool size (pixel count  $\text{mm}^{-2}$   $\text{pg Chl } a^{-1}$ ) for both sites (A, E) and of the relative RuBisCO LSU pool size (pixel count  $\text{mm}^{-2}$   $\text{pg Chl } a^{-1}$ ) for the temperate site only (B). Note that the different Y-axis on the right side of the graphs for temperate D1 (A) and RuBisCO (B) applies only for the protein data under HUVB during the first bioassay. The RuBisCO LSU to D1 ratio is also shown for the temperate site (C). Here the different Y-axis on the right side of the graph applies for the third bioassay only. Treatments are as described in Fig. 1. Examples of D1 protein (PsbA) and RuBisCO LSU (RbcL) detection by immunochrometry are shown for the different incubation bags exposed to HUVB during the second temperate bioassay (D) and to NUVB during the first tropical bioassay (F). At the tropical site, the RuBisCO LSU band at 54 kDa was too faint to be quantified and, instead, a strong band with a molecular weight of  $\sim 70$  kDa appeared under all conditions tested at this site. The band in the 10<sup>th</sup> well is a RuBisCO LSU band of the cyanobacterium *Nostoc* at 54 kDa while the strongest bands in sample wells are the 70 kDa bands (F).

## 4.6 DISCUSSION

*Temperate phytoplankton in surface incubations showed variable D1 responses.* During the pre-bloom period at the temperate site, cells were in a poor physiological state ( $F_V/F_M < 0.20$  at  $T_0$ ). This can be related to the transfer of cells from 5 m (water collection depth) to a 2.3 m deep mesocosm. Gradual acclimation to higher irradiance was observed from increases in  $I_k$  values (S. Demers, unpublished) and cells attained a much better physiological state ( $F_V/F_M > 0.45$  at  $T_0$ ) at the start of the two subsequent bioassays. Gradual increases in the pool size of photoprotective pigments (at  $T_0$  of bioassays 1 to 3) at this temperate site is consistent with cells inside the mixed mesocosms attempting to protect themselves from high surface irradiance by dissipating the excess excitation energy (Olaizola et al. 1994) partly, at least, through the activity of the xanthophyll cycle (Demmig-Adams et al. 1999). As the increase in photoprotection occurred to a similar extent under both NUVB and HUVB, it was related to the gradual nutrient depletion occurring inside the mesocosms (Geider et al. 1993, Latasa 1995) and not influenced by UVB (Schofield et al. 1995).

The series of bioassays performed at the temperate site showed a temporal variation in the phytoplankton response to HUVB exposure. When cells were taken from the mixed mesocosm and put directly at the surface for 24 h during the pre-bloom period (first bioassay), little happened for NUVB but large increases of Chl-specific D1 and RuBisCO were observed under HUVB. Hence under NUVB D1 repair was in balance with D1 damage while under HUVB D1 repair was activated causing an accumulation of D1 (Aro et

al. 1993a). This strong engagement of the PSII repair cycle under HUVB, was nonetheless insufficient to counteract the rate of photoinactivation (decreasing  $F_V/F_M$ ) which is consistent with the results of Shelly et al. (2002). This (and the low  $F_V/F_M$ ) confirms that some of the D1 detected were not part of functional PSII centers but rather belonged to intermediates of the PSII repair cycle, as found for cyanobacteria (Burns et al. 2005). The strong engagement of PSII repair under HUVB maybe at the expense of growth (van Leeuwe et al. 2005) since a smaller increase in Chl *a* biomass was observed in the HUVB compared to the NUVB surface-incubated bags. Net Chl-specific D1 losses observed over the course of the two subsequent bioassays indicate that under surface irradiance (similar values for the first and second bioassays: Table 1) the rate of D1 replacement was no longer fast enough to cope with the fast rate of D1 degradation. Although these losses were observed under both UV treatments, they were more important under HUVB possibly due to the partial inhibition of the repair process. In a companion study performed with the same community, HUVB was shown to inhibit the D1 repair process when cells were maintained at the surface for 3 h at noon time (Bouchard et al. 2005a). The Chl-specific D1 pool declines in the 24 h surface incubations (except for the first day incubation) accompanied by decreases in  $F_V/F_M$  and RuBisCO pools are similar to the short-term inhibitory response, characterized by a reduction of variable fluorescence, RuBisCO activity and increased destruction of the D1 protein, observed upon exposure of a subtropical diatom to ambient UVB for a short (< 24 h) period of time (Hazzard et al. 1997).

*Temperate phytoplankton in surface incubations showed an increased sensitivity to enhanced UVB as nutrients became limiting.* After the demise of the bloom, i.e., when N limiting conditions prevailed ( $\text{NO}_3^- < 0.76 \mu\text{M}$ ; POC:PON  $\sim 20$ ), a clear synergistic effect (Folt et al. 1999) of HUVB and  $\text{NO}_3^-$  limitation was observed. During this period, enhanced UVB caused more photoinhibition than ambient UVB and the small RuBisCO LSU pools found under HUVB are indicative of UVB damage to the enzyme (Lesser et al. 1996, Bischof et al. 2002).  $\text{NO}_3^-$  supplementation did not relieve photoinhibition when nutrients were still abundant inside the mesocosms (bioassays 1 and 2) but helped, although not significantly, to maintain greater RuBisCO LSU pools while D1 pools remained unaffected by this treatment (Fig. 4C). The small effect of  $\text{NO}_3^-$  supplementation on the different protein pools could be related to UVB inhibition of N uptake (Döhler 1997, Fauchot et al. 2000). Since photosynthesis was already affected under the light conditions studied (Fig. 2B), the subsequent low ATP production may have limited  $\text{NO}_3^-$  uptake (Döhler & Buchmann 1995). Nevertheless, the slightly greater RuBisCO LSU pools inside the NPS-bags may have ensured a more efficient downstream removal of electrons, thereby maintaining a greater fraction of open PSII RCs (significantly greater  $q_P$  in the NPS-bags), limiting the excess excitation pressure on PSII and slightly relieving photoinhibition (significantly greater  $F_V/F_M$  in the NPS-bags). The lower excitation pressure on PSII may ultimately have limited the acidification of the lumen and prevented the establishment of pH-dependent NPQ (significantly lower NPQ in the NPS-bags) (Niyogi et al. 1999). Dt retention observed under both UV treatments during the third bioassay coincides with the retention of Dt under high light, when the synthesis rate of various PSII core components is



slowed down (Demmig-Adams et al. 1999). The decrease in NPQ in the NPS-bags while Dt was retained could result from *de novo* pigment synthesis triggered by the high irradiance and hindrance of the epoxidase activity (Olaizola et al. 1994, Goss et al. 1999, Lavaud et al. 2004). Compared to the NPS-bags, Dt was retained to a greater extent in the PS-bags possibly as a result of nutrient depletion (Latasa 1995). Dt may have contributed to NPQ through the xanthophyll cycle activity but a contribution of the photoinhibitory component to NPQ (Maxwell & Johnson 2000) can not be ruled out.

*Tropical phytoplankton in surface incubations were more affected by ambient light than by UVB enhancement.* The relatively low  $F_v/F_M$  values observed throughout the experiment in Ubatuba, the decrease in these values during the 24 h surface incubation and the absence of negative HUVB effects compared to NUVB for the different photosynthetic parameters measured during the first bioassay show that most of the inhibition observed during the 24 h incubation occurred as a result of surface exposure to high PAR + UV irradiance. At this site, cells collected at a depth of 8.0 m were possibly acclimated to lower irradiances than those prevailing inside the 2.0 m deep mesocosms in which they were transferred. In addition, phytoplankton communities confined inside the mesocosms were intermittently exposed to high surface irradiance. This mixing can have exacerbated UVB effects upon them since in their natural environment tropical phytoplankton generally show sub-surface maxima (Longhurst 1998) where irradiances are lower than at the surface. The experimental design (and the presence of mixing) used at this tropical site can have exacerbated UVB effects on phytoplankton. Consequently, observed responses, which are

not truly representative of the expected tropical phytoplankton responses to UVB, should be extrapolated with caution to the natural environment. Nevertheless, the choice of using the same experimental design than that used at the temperate site facilitates comparisons among sites. The lack of response of cells to UVB can be explained by the already strong light stress in the mesocosms themselves, with UVB almost reaching the bottom and high ambient PAR and UV irradiances (Table 1). So cells could not avoid the UVB-exposed zone during the day, and even if they possessed high concentrations of mycosporine-like amino acids (B. Mohovic, personal communication), their photochemical performance was affected (low  $F_v/F_M$ , Fig. 2E). Low NPQ values and low Chl-specific photoprotective pigments pool size at this site, is consistent with low xanthophyll cycle-related photoprotection (Lavaud et al. 2004). Net D1 losses occurred under all conditions tested indicating that, under surface irradiance (and in the absence of mixing) the rate of D1 synthesis was not fast enough to cope with the rate of D1 degradation. Indeed, D1 pools in the PS-bags, decreased to similar extent under both UV treatments, confirming that most of the damage was caused by high PAR and UV exposure more than by UVB enhancement (Bouchard et al. 2005b). The detection of a HMW band of ~70 kDa for the RuBisCO LSU at this site instead of the commonly reported 54 kDa band is indicative of UVB damage to this enzyme as a similar band with a molecular weight of 66 kDa has also been observed in plants (Wilson et al. 1995) and macroalgae (Bischof et al. 2000) upon UVB exposure. As this HMW band was detected under both NUVB and HUVB, damage was presumably already induced under NUVB conditions with no supplementary effect of HUVB exposure. At the start of the second bioassay, low  $F_v/F_M$  values ( $< 0.3$ ) associated with almost

depleted D1 pools give indications of strong photoinhibition even prior to the bioassay. Forcing the cells to stay at the surface for 24 h had little further effects. Indeed, losses of Chl *a* were observed under all conditions here (Fig. 1D), suggesting that cells were dying out.

*No synergistic effect of enhanced UVB and nitrate limitation at the tropical site.* In contrast to the temperate site, there was no evidence for a synergistic effect of HUVB and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> limitation at the tropical site, not surprisingly as there were no enhanced UVB effects. During the first bioassay, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supplementation had a beneficial effect on F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub> but not on the other variables studied. NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supplementation during this bioassay was perhaps beneficial to some species (e.g. diatoms) present in the assemblage. During the second bioassay, the absence of NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supplementation effect could be related to small cells preference for reduced forms of N in the inshore waters of Brazil (Metzler et al. 1997) or to cells inability to assimilate nutrients due to their declining physiological condition.

*Conclusions.* This study shows major differences in phytoplankton responses to UVB enhancement and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> supplementation between a temperate site (Rimouski, Canada) and a tropical one (Ubatuba, Brazil). The temperate phytoplankton in surface incubations showed a temporal variability in the D1, RuBisCO and photochemical response. In the initial temperate bioassay, the increase in D1 pools observed under HUVB is indicative of an engagement of the PSII repair cycle, although it was not fully effective in countering photoinhibition (declining F<sub>v</sub>/F<sub>M</sub>). As NO<sub>3</sub><sup>-</sup> became limiting inside the mesocosms,

phytoplankton became increasingly UVB sensitive leading to net D1 losses, especially under HUUVB. Supplementing  $\text{NO}_3^-$  during this period left D1 pool sizes unaffected but helped to maintain greater pools of RuBisCO LSU and slightly relieved photoinhibition. At the tropical site, phytoplankton suffered fast rates of D1 degradation even under ambient irradiance. In contrast to the temperate site, the tropical phytoplankton was not negatively affected by enhanced UVB nor did they clearly respond to  $\text{NO}_3^-$  supplementation. This is because the major stress for the surface-incubated cells was high ambient PAR and UV and because the small cells dominating the assemblage at this site were relying on remineralized sources of N for metabolic activities or simply unable to assimilate  $\text{NO}_3^-$  due to their declining physiological condition.

## **5. CONCLUSIONS GÉNÉRALES & PERSPECTIVES**

L'inhibition de la photosynthèse suite à l'exposition du phytoplancton au rayonnement UVB est l'une des réponses les plus fréquemment observées. À ce jour, le site spécifique du dommage causé par le rayonnement UVB est encore incertain. Le PSII, impliqué dans les réactions lumineuses de la photosynthèse, a fréquemment été signalé comme étant l'une des cibles principales du rayonnement UVB. Cette étude démontre l'influence négative du rayonnement UVB sur la protéine D1, une protéine constitutive du PSII, et confirme l'importance du turnover de la protéine D1 pour le maintien de l'activité du PSII chez des communautés phytoplanctoniques naturelles de diverses latitudes.

L'objectif principal de ce travail de recherche était de vérifier l'effet du rayonnement UVB sur la réponse photosynthétique de communautés phytoplanctoniques naturelles et d'évaluer plus spécifiquement l'effet du rayonnement UVB sur la protéine D1 qui joue un rôle crucial au sein du processus de réparation du PSII.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient :

1. d'examiner l'influence de l'augmentation du rayonnement UVB sur le cycle de réparation du PSII impliquant la protéine D1 de communautés phytoplanctoniques naturelles provenant de deux sites tempérés et d'un site tropical.
2. d'étudier l'influence du rayonnement UVB local en Antarctique sur l'activité photosynthétique des communautés phytoplanctoniques en supprimant les longueurs d'ondes du rayonnement UVB.

3. d'étudier l'influence du statut nutritionnel sur la sensibilité du phytoplancton au rayonnement UVB en examinant plus spécifiquement la réponse de la protéine D1 du phytoplancton tempéré de Rimouski et du phytoplancton tropical d'Ubatuba.
4. d'effectuer une comparaison inter-latitudinale quant à l'importance du cycle de réparation du PSII pour le maintien de l'activité photosynthétique.

Pour atteindre le premier objectif, des incubations de courte durée ( $\leq 3$  h) ont été effectuées à la surface de mésocosmes exposés à la lumière ambiante (NUVB) et à la lumière ambiante additionnée d'une forte dose de rayonnement UVB (HUVB). Certaines de ces incubations ont été effectuées en présence de lincomycine afin d'inhiber la synthèse de la protéine D1 et de bloquer la réparation du PSII. Les résultats issus de ces travaux ont permis de démontrer que la protéine D1 des communautés naturelles issues de milieux tempérés et tropical est effectivement sensible à l'exposition au rayonnement UVB. La chute plus rapide du pool de protéine D1 sous le traitement de lumière HUVB comparativement au traitement de lumière NUVB en est la preuve. Les résultats de cette première étude ont cependant montré que l'effet du rayonnement UVB est plus marqué au niveau du processus de re-synthèse de la protéine D1 et de la réparation du PSII plutôt qu'au niveau des dommages à la D1. En effet, l'augmentation du rayonnement UVB semble inhiber, partiellement du moins, la re-synthèse de la D1 et donc la réparation du PSII, plutôt qu'augmenter les dommages à la D1. Ces résultats confirment notre hypothèse de travail qui stipulait que *l'exposition de communautés phytoplanctoniques naturelles à de*

*fortes intensités de rayonnement UVB (mais aussi de PAR et de rayonnement UVA) devrait augmenter le dommage net à la protéine D1.* Nos résultats s'inscrivent donc dans la lignée des observations récentes faites sur le cycle de réparation du PSII qui démontrent que les stress environnementaux tels que la salinité, la température et les fortes intensités lumineuses entravent le processus de réparation du PSII plutôt que d'augmenter les dommages à la D1 (Allakhverdiev & Murata 2004). Étonnamment, lors des incubations de surface de courte durée effectuées aux deux sites tempérés et au site tropical, l'ajout de rayonnement UVB n'a pas eu d'effet supplémentaire sur le  $F_v/F_m$  comparativement au traitement de lumière NUVB. Le maintien de l'efficacité photochimique ( $F_v/F_m$ ) sous HUVB alors que les pools de D1 étaient largement diminués suggère une acclimatation des CRs du PSII au rayonnement UVB ou alors une récupération lors de l'exposition des échantillons à l'obscurité avant la mesure du  $F_v/F_m$ .

Pour atteindre le second objectif, des incubations de courte durée (60 à 90 min) ont été effectuées sous la surface de l'eau en Antarctique, sous lumière ambiante (+UVB) et sous rayonnement UVB fortement réduit (-UVB). Ces incubations ont également été effectuées en présence de lincomycine afin d'inhiber la synthèse de la protéine D1 et de bloquer la réparation du PSII. Bien que la protéine D1 n'ait pu être détectée qu'à une seule occasion en milieu polaire, les résultats obtenus chez le phytoplancton de l'Antarctique, i.e., une dégradation nette plus rapide du pool de D1 en présence de rayonnement UVB (+UVB) qu'en absence de rayonnement UVB (-UVB) corroborent les résultats obtenus lors de la première étude. Les incubations effectuées en Antarctique ont également permis d'observer que le passé lumineux du phytoplancton influence sa réponse à l'exposition au



rayonnement UVB. En effet, dans quatre incubations sur cinq, le traitement de lumière +UVB n'a pas eu d'effet supplémentaire sur le  $F_v/F_m$  comparativement au traitement de lumière -UVB lors des incubations de surface de courte durée. Lors de ces incubations, la colonne d'eau était peu stratifiée, sans couche de mélange bien définie. Dans ces conditions, le phytoplancton se maintient aux profondeurs qui lui sont le plus favorables au niveau photosynthétique (dans ce cas, près de la surface). Le phytoplancton échantillonné à 1 m de profondeur pour ces incubations était donc possiblement acclimaté au rayonnement UVB ce qui explique l'absence d'effet de la suppression du rayonnement UVB sur le  $F_v/F_m$  lors des incubations de surface de courte durée. En une seule occasion, pendant cette expérience, la présence de rayonnement UVB (+UVB) a eu un effet négatif sur le  $F_v/F_m$  comparativement au traitement de lumière sous un rayonnement UVB réduit (-UVB). Dans ce cas spécifique, les organismes phytoplanctoniques prélevés à 1 m de profondeur dans la colonne d'eau n'étaient possiblement pas acclimatés aux fortes irradiances de surface puisque la couche de mélange au moment de l'échantillonnage était plus profonde (13 m) que la profondeur de pénétration du 1% du rayonnement UVB (à 305 nm; 10 m). Par conséquent, les organismes échantillonnés dans la couche de mélange n'étaient que périodiquement exposés aux fortes intensités de surface et donc possiblement peu acclimatés au rayonnement UVB. Les résultats issus de cette dernière incubation corroborent la seconde hypothèse de travail qui stipulait que *la suppression du rayonnement UVB devrait limiter le dommage net à la protéine D1, permettre le maintien du processus de réparation de PSII et permettre un maintien plus efficace de l'activité photosynthétique*. Les résultats issus des quatre premières incubations et montrant l'absence

d'effet de la suppression du rayonnement UVB sur le  $F_v/F_m$  infirment par contre l'hypothèse de travail. Ces résultats s'expliquent par le passé lumineux différent des cellules, lesquelles étaient plus acclimatées aux fortes intensités lumineuses de surface et donc peu sensibles au rayonnement UVB.

Pour atteindre le troisième objectif, des incubations de moyenne durée (~ 24 h) ont également été effectuées à la surface de mésocosmes exposés à la lumière naturelle ambiante (NUVB) et à la lumière naturelle ambiante additionnée d'une forte dose de rayonnement UVB (HUVB). Ces incubations ont été effectuées en présence de différents enrichissements en sels nutritifs. Les résultats issus de ces travaux ont permis de démontrer que le phytoplancton tempéré de Rimouski devenait graduellement sensible au HUVB à mesure que les concentrations en sels nutritifs diminuaient à l'intérieur des mésocosmes. Cette sensibilité accrue a été observée par des diminutions marquées des pools de protéine D1 et de RuBisCO LSU, de même que par des diminutions du  $F_v/F_m$ . L'ajout de nitrate, lors de cette période de limitation en sels nutritifs n'a pas influencé les pools de protéine D1 mais a permis, bien que non significativement, de maintenir des pools un peu plus élevés de RuBisCO LSU, de maintenir une plus grande fraction de CRs du PSII ouverts et de diminuer la photoinhibition. En milieu tropical, l'ajout de rayonnement UVB n'a pas eu d'effet supplémentaire comparativement au traitement de lumière ambiante puisque le phytoplancton était déjà trop photoinhibé pour répondre à ce stress supplémentaire. À ce site, les pools de D1 ont chuté de façon similaire sous les deux traitements de lumière. De la même manière, une bande de protéine de ~ 70 kDa a été détectée sous NUVB et HUVB au lieu de la bande de 54 kDa normalement détectée pour la grande sous-unité de l'enzyme

RuBisCO (RbcL) ce qui suggère que le phytoplancton du site tropical était déjà stressé par l'exposition aux fortes intensités lumineuses prévalant à ce site, sans effet supplémentaire de l'ajout de rayonnement UVB. Le phytoplancton tropical n'a pas réagi clairement à l'ajout de nitrate possiblement parce que les petites cellules dominant l'assemblage phytoplanctonique à ce site utilisaient des sources reminéralisées d'azote pour leurs activités métaboliques ou simplement parce qu'elles étaient incapables d'incorporer le nitrate dû à leur condition physiologique déclinante. Les résultats de ces travaux de recherche infirment la troisième hypothèse de travail qui stipulait que *l'ajout de nitrate à des communautés limitées en azote devrait permettre une augmentation des pools de protéine D1, aider au maintien de l'activité photosynthétique et diminuer la sensibilité au rayonnement UVB*. En fait, l'ajout de nitrate n'a pas permis une augmentation nette des pools de protéine D1 ni au site tempéré ni au site tropical mais a plutôt aidé au maintien de pools un peu plus élevés de RuBisCO LSU au site tempéré, ce qui pourrait avoir diminué la pression sur le PSII.

Les réponses observées lors des diverses études effectuées présentent une grande variabilité, laquelle s'explique principalement par l'interaction de plusieurs facteurs. Un de ces facteurs est la durée des incubations de surface effectuées. Lors des incubations de courte durée ( $\leq 3$  h) effectuées lors de la première étude, l'ajout de rayonnement UVB n'a pas eu d'effet supplémentaire sur le  $F_v/F_m$  comparativement au traitement de lumière NUVB pour le site tempéré de Rimouski et le site tropical d'Ubatuba. Ainsi, le phytoplancton soumis au mélange vertical dans les mésocosmes a été capable de maintenir une activité photochimique similaire sous NUVB et HUVB lors de la suppression du

mélange et de l'exposition aux irradiances de surface pour une courte période de temps. Par contre, lors des incubations de surface de moyenne durée (~ 24 h) effectuées lors de la troisième étude, l'ajout de rayonnement UVB a eu un effet négatif sur le  $F_v/F_m$  comparativement au traitement de lumière NUVB pour les deuxième et troisième incubations effectuées au site tempéré de Rimouski mais non au site tropical d'Ubatuba. Le phytoplancton de Rimouski incubé en surface pendant 24 h a donc moins bien réussi à maintenir son efficacité photochimique sous HUVB que sous NUVB sans doute à cause de la durée plus longue des incubations combinée à la déplétion graduelle des nutriments. Au site polaire, la durée des incubations de surface (60 à 100 min) peut également avoir influencé la réponse du phytoplancton à l'exposition au rayonnement UVB. En effet, l'incubation à la surface de communautés phytoplanctoniques provenant d'une couche de mélange relativement profonde (13 m ; 4 mars) peut avoir exacerbé l'effet du rayonnement UVB sur la réponse phytoplanctonique alors qu'une moins grande amplification des effets du rayonnement UVB s'est sans doute produite suite à l'incubation de phytoplancton provenant d'une colonne d'eau peu stratifiée et se maintenant près de la surface, là où les conditions lumineuses lui étaient plus favorables au niveau photosynthétique (incubations effectuées en février).

Le fait d'avoir effectué les incubations de surface lors du zénith solaire, i.e., au moment où le phytoplancton était stressé maximale, peut également avoir influencé les résultats obtenus. Il aurait été intéressant d'effectuer des analyses temporelles afin de comparer les réponses du phytoplancton au rayonnement UVB entre les différents moments de la journée. Des expériences effectuées en fin de journée, i.e., au moment où l'intensité

lumineuse est plus faible que lors du zénith solaire, auraient nécessairement influencé la balance nette entre les taux de dommage et de réparation et montrer des patrons de variations différents à la fois pour la protéine D1 (dommage net moins important en fin de journée) et pour le  $F_v/F_m$  (récupération du  $F_v/F_m$  en fin de journée).

L'influence du mélange vertical sur la réponse photosynthétique a été mise en évidence lors des incubations de courte durée (~ 1 h) effectuées en Antarctique. Dans quatre cas sur cinq, le traitement de lumière +UVB n'a pas eu d'effet supplémentaire sur le  $F_v/F_m$  comparativement au traitement de lumière -UVB. Lors de ces quatre incubations, le phytoplancton échantillonné à 1 m de profondeur était possiblement acclimaté au rayonnement UVB puisqu'il provenait d'une colonne d'eau peu stratifiée et se maintenait près de la surface, où les conditions lumineuses lui étaient plus favorables au niveau photosynthétique. Lorsque le phytoplancton a été échantillonné à partir d'une colonne d'eau mélangée, la suppression du rayonnement UVB lors de l'incubation de surface a eu un effet positif sur le  $F_v/F_m$  possiblement parce que le phytoplancton échantillonné à 1 m de profondeur était peu acclimaté aux irradiances de surface dû au mélange vertical se produisant dans la colonne d'eau. Cette étude démontre dans un premier temps que le mélange vertical dans la colonne d'eau peut moduler l'exposition à la lumière et influencer l'acclimatation des cellules à la lumière et, dans un deuxième temps, que le passage d'un environnement mélangé à un environnement stable (incubations de surface) peut modifier l'effet du rayonnement UVB sur le phytoplancton. Bien qu'à Rimouski le  $F_v/F_m$  se soit moins bien maintenu lors des incubations de surface de courte durée que sous les conditions mélangées des mésocosmes ( $F_v/F_m$  mesuré dans les sacs d'incubation comparé

au  $F_v/F_m$  mesuré dans les mésocosmes lors de la première étude), à Ubatuba et Ushuaia, par contre, le  $F_v/F_m$  est resté le même sous les conditions mélangées et statiques ( $F_v/F_m$  mesuré dans les sacs d'incubation comparé au  $F_v/F_m$  mesuré dans les mésocosmes lors de la première étude). Ces différences entre les sites s'expliquent entre autres par la transparence différente de l'eau. Au site tempéré de Rimouski, le PAR seulement atteignait la partie inférieure des mésocosmes alors qu'à Ubatuba et à Ushuaia, toutes les longueurs d'onde du rayonnement UV atteignaient la partie inférieure des mésocosmes. Le phytoplancton de Rimouski n'était donc que périodiquement exposé au rayonnement UV dans les mésocosmes et donc plus sensible au fort rayonnement UV de surface alors que le phytoplancton d'Ubatuba et de Ushuaia était constamment soumis aux longueurs d'ondes du rayonnement UV même lorsque mélangé dans les mésocosmes et répondait donc moins au fort rayonnement UV de surface. Ainsi, en plus de la durée de l'exposition aux irradiances de surface et du passage d'un environnement mélangé à un environnement stable (incubations de surface), la transparence de l'eau peut également moduler la réponse du phytoplancton au rayonnement UVB.

La troisième étude a permis de démontrer qu'en plus de la durée des incubations de surface, du moment de la journée où les expériences sont effectuées, de l'influence du mélange vertical et de la transparence de l'eau, le statut nutritionnel du phytoplancton et aussi le type d'organismes présents dans l'assemblage phytoplanctonique peuvent influencer la réponse du phytoplancton suite à l'exposition au rayonnement UVB. L'assemblage phytoplanctonique provenant d'un milieu méso-eutrophe et dominé majoritairement par des diatomées, est devenu graduellement plus sensible au HUVB

lorsque les concentrations de nitrates devenaient limitantes alors que l'assemblage phytoplanctonique tropical, provenant d'un milieu oligotrophe et dominé majoritairement par de petites cellules (petits phytoflagellés et cyanobactéries), n'a généralement été que peu influencé par la diminution des concentrations de nitrates (ou par son ajout) et par l'ajout de rayonnement UVB. L'ajout de rayonnement UVB au site tropical n'a pas eu d'effet négatif comparativement au traitement de lumière ambiante puisque le phytoplancton de ce site tropical était déjà inhibé par les fortes irradiances de PAR et de rayonnement UV prévalant à ce site. Ces résultats sont en accord avec l'idée générale qui veut que les petites cellules soient plus sensibles au rayonnement UVB que les cellules de plus grande taille. Les cellules de plus grande taille du site tempéré n'ont pour leur part été influencées négativement par l'ajout de rayonnement UVB que lors des incubations de surface de ~ 24h et surtout lorsque les concentrations d'azote sont devenues limitantes pour la croissance dans les mésocosmes.

Au niveau de la protéine D1, les résultats issus des diverses études effectuées ont montré des réponses différentes de celles du  $F_v/F_m$ . L'absence de corrélation entre les pools de protéine D1 et le  $F_v/F_m$  observée entre autres lors de la première étude, indique que l'exposition au rayonnement UVB entraîne un coût énergétique au niveau moléculaire lequel n'est pas toujours apparent dans les mesures de photosynthèse. De plus, le haut coût énergétique associé au maintien des processus de réparation via la synthèse rapide de la protéine D1 peut également se traduire au niveau cellulaire par des taux de croissance diminués.

Les résultats issus de la première étude ont permis de démontrer que la protéine D1 des communautés naturelles issues de milieux tempérés et tropical est sensible à l'exposition au rayonnement UVB puisque les pools de protéine D1 ont chuté plus rapidement sous le traitement de lumière HUVB que sous le traitement de lumière NUVB. Bien que les pools de protéine D1 n'aient pu être détectés qu'en une seule occasion dans le milieu polaire, les résultats obtenus montrent également une dégradation plus rapide des pools de D1 en présence de rayonnement UVB (+UVB) plutôt qu'en l'absence de rayonnement UVB (-UVB). Ces résultats indiquent que même si le  $F_v/F_m$  reste parfois constant sous le rayonnement UVB des changements peuvent tout de même se produire au niveau moléculaire, entre autres, au niveau de la protéine D1.

Pour atteindre le quatrième et dernier objectif, les résultats issus des travaux effectués lors des trois études précédentes ont été colligés et comparés. Les résultats de la première étude comparant les communautés phytoplanctoniques de trois latitudes ont permis de mettre en lumière que les taux de dégradation nets (en présence de dégradation et réparation) de la protéine D1 étaient plus rapides en milieu tropical qu'en milieux tempérés. La variation des pools de D1 observée lors de l'incubation effectuée en Antarctique permet d'estimer que les taux de dégradation nets de la D1 en milieu polaire seraient semblables à ceux déterminés pour le site tempéré d'Ushuaia. Les taux de dégradation rapides notés en milieu tropical s'expliquent par les fortes intensités lumineuses qui favorisent une dégradation rapide de la D1 et ce malgré la température élevée de l'eau du milieu tropical qui permet des activités enzymatiques de réparation accélérées. Comme la synthèse de la D1 dépend d'enzymes, la température élevée à ce site favorise une re-synthèse rapide de



cette protéine. Ces résultats corroborent l'hypothèse de travail qui stipulait que *le cycle de réparation du PSII impliquant la protéine D1 n'a pas la même importance pour les communautés phytoplanctoniques naturelles des quatre sites expérimentaux étudiés : la dégradation et la re-synthèse (turnover) de la protéine D1 devraient être plus lents pour les communautés phytoplanctoniques des milieux tempérés et polaire et plus rapides pour les communautés phytoplanctoniques du milieu tropical en vertu de l'intensité lumineuse plus forte et de la température de l'eau plus élevée à ce site*. Il est intéressant de noter qu'au site d'Ushuaia (Argentine), les taux de dégradation nette de la protéine D1 ont diminué avec le temps (du jour 4 au jour 8) ce qui suggère une acclimatation physiologique de la part des communautés phytoplanctoniques présentes dans l'assemblage ou alors un changement de communautés favorisant les espèces plus résistantes au rayonnement UVB. Une acclimatation (ou un changement de communautés) entraîne nécessairement une variabilité temporelle au niveau des réponses du phytoplancton et complique l'interprétation des données provenant de milieux naturels. Elle implique également que la sévérité des effets d'une augmentation de rayonnement UVB peut difficilement être évaluée sur la base de données ponctuelles. Contrairement au site Argentin, les taux de dégradation nette de la protéine D1 au site tropical d'Ubatuba ont augmenté avec le temps (du jour 3 au jour 5 sous HUUVB) ce qui suggère l'absence d'acclimatation de la part des communautés phytoplanctoniques étudiées. À ce site tropical, il est possible que les cellules prélevées à 8 m de profondeur dans leur milieu naturel étaient acclimatées à des irradiances plus faibles que celles prévalant dans les mésocosmes de moins de 2 m de profondeur (avec une pénétration de rayonnement UVB jusqu'à fond de ceux-ci). De plus, le fait de subir

périodiquement une exposition à la surface à cause du mélange induit par la pompe, alors que dans le milieu naturel le phytoplancton tropical montre plutôt des maxima en subsurface, peut avoir exacerbé l'effet du rayonnement UVB sur ces organismes et avoir mener à la production de réponses peu représentatives de celles attendues en milieu tropical. Il serait donc avisé d'user de réserve quant à l'extrapolation de ces résultats aux milieux naturels.

En conclusion, ces travaux de recherche démontrent qu'en plus de l'intensité lumineuse et de la température de l'eau prévalant à un site spécifique, la durée des incubations, le moment de la journée où ces incubations sont effectuées, la transparence de l'eau, le statut nutritionnel du phytoplancton, la composition spécifique de l'assemblage phytoplanctonique, les changements de communautés, le passé lumineux des organismes (déterminé, en partie, par la structure verticale de la colonne d'eau) et par conséquent l'acclimatation à la lumière des organismes sont autant de facteurs à considérer lors de l'évaluation de l'effet du rayonnement UVB sur les communautés phytoplanctoniques naturelles. Afin d'arriver à mieux saisir l'essence même des réponses phytoplanctoniques à l'exposition au rayonnement UVB, il est essentiel d'étudier non seulement la physiologie des organismes mais d'examiner également les réponses au niveau moléculaire, puisque les réponses de l'un ne sont que rarement le reflet parfait des réponses de l'autre. Il serait d'ailleurs intéressant de mieux comprendre la relation entre les pools de protéine D1 et la réponse du  $F_v/F_m$  puisque celle-ci a souvent été montrée comme étant linéaire, ce qui n'a pas toujours été observé lors cette étude.

Des modèles développés récemment et examinant les effets de la photoinhibition sur la photosynthèse incorporent désormais les mécanismes physiologiques et moléculaires sous-jacents à la photoinhibition. En plus du dommage et de la dégradation de la protéine D1, certains de ces modèles tentent d'incorporer le processus de réparation via la biosynthèse de la protéine D1 comme paramètre additionnel. Mis à part le présent travail, il existe à ce jour encore peu d'information sur la protéine D1 des communautés phytoplanctoniques naturelles. Dans une perspective future, il serait donc intéressant d'intégrer les résultats obtenus dans le cadre de ce travail doctoral à des modèles mathématiques servant à prédire l'effet de photoinhibition sur la photosynthèse. De plus, des efforts supplémentaires devraient être investis afin de déterminer le processus de réparation du PSII impliquant la protéine D1 sous une gamme de conditions environnementales et océanographiques. Par exemple, l'influence du mélange vertical sur la réponse du phytoplancton au rayonnement UVB de même que l'influence d'autres mécanismes de protection (synthèse d'acides aminés de type mycosporine ou l'activation du cycle xanthophyllien) sur le cycle de réparation du PSII pourraient être approfondis.

Il serait également intéressant d'étudier l'effet combiné de l'exposition du phytoplancton au rayonnement UVB et au réchauffement climatique puisque le réchauffement climatique peut exacerber la déplétion d'ozone en permettant la formation de nuages polaires stratosphériques au sein desquels les processus de destruction de l'ozone sont favorisés. Un réchauffement climatique devrait se traduire par un réchauffement des eaux de surface et une augmentation de la stratification de la colonne d'eau (surtout aux pôles). L'augmentation de la température de l'eau pourrait accélérer les activités

enzymatiques (et par conséquent la synthèse de la protéine D1) et modifier la balance entre les processus de dommage et de réparation. De tels changements pourraient également influencer la composition spécifique des espèces phytoplanctoniques présentes dans un assemblage en favorisant les espèces les plus thermo-tolérantes et celles pouvant le mieux supporter la stratification thermique et l'exposition aux fortes irradiances de surface qui en découlera.

Enfin, l'étude de l'implication de l'enzyme RuBisCO dans le processus de photoinhibition de la photosynthèse constitue une autre avenue qu'il serait intéressant d'explorer puisqu'un dommage à cette enzyme lors de l'exposition du phytoplancton au rayonnement UVB pourrait se traduire par une augmentation de pression sur le PSII et mener à la dégradation éventuelle de la protéine D1.

## 6. RÉFÉRENCES

- Adir, N., Hagit, Z., Shochat, S. & Ohad, I. 2003. Photoinhibition – a historical perspective. *Photosynth. Res.* 76: 343-70.
- Allakhverdiev, S.I. & Murata, N. 2004. Environmental stress inhibits the synthesis *de novo* of proteins involved in the photodamage-repair cycle of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochim. Biophys. Acta* 1657: 23-32.
- Allakhverdiev, S.I., Nishiyama, Y., Takahashi, S., Miyairi, S., Suzuki, I. & Murata, N. 2005. Systematic analysis of the relation of electron transport and ATP synthesis to the photodamage and repair of photosystem II in *Synechocystis*. *Plant Physiol.* 137: 263-73.
- Anderson, J.G., Toohey, D.W. & Brune, W.H. 1991. Free radicals within the Antarctic vortex: The role of CFCs in Antarctic ozone loss. *Science* 251: 39-46.
- Anderson, J.M., Park, Y.-I. & Chow, W.S. 1997. Photoinactivation and photoprotection of photosystem II in nature. *Physiol. Plant.* 100: 214-33.
- Aro, E.-M., Virgin, I. & Andersson, B. 1993a. Photoinhibition of photosystem II. Inactivation, protein damage and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* 1143: 113-34.
- Aro, E.M., McCaffery, S. & Anderson, J.M. 1993b. Photoinhibition and D1 Protein degradation in peas acclimated to different growth irradiances. *Plant Physiol.* 104: 1033-41.
- Austin, J. & Butchart, N. 1994. The influence of climate change and the timing of stratospheric warmings on Arctic ozone depletion. *J. Geophys. Res.* 99: 1127-45.
- Austin, J., Butchart, N. & Shine, K.P. 1992. Possibility of an Arctic ozone hole in a doubled-CO<sub>2</sub> climate. *Nature* 360: 221-5.
- Babu, T.S., Jansen, M.A.K., Greenberg, B.M., Gaba, V., Malkin, S. & Edelman, M. 1999. Amplified degradation of the photosystem II D1 and D2 proteins under a mixture of photosynthetically active radiation and ultraviolet-B radiation: dependence on redox-status of photosystem II. *Photochem. Photobiol.* 69: 553-9.
- Baker, K.S. & Smith, R.C. 1982. Spectral irradiance penetration in natural waters. In Calkins, J. [Ed.] *The role of solar UV radiation in marine ecosystems*. Plenum Press, pp. 233-46.
- Baker, N.R., Nogués, S. & Allen, D.J. 1997. Photosynthesis and photoinhibition. In Lumsden, P. [Ed.] *Plants and UV-B. Responses to environmental change*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 95-111.

- Banaszak, A.T. 2003. Photoprotective physiological and biochemical responses of aquatic organisms. In Helbling, E.W. & Zagarese, H. [Eds.] *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 329-56.
- Barbato, R., Bergo, E., Szabò, I., Dalla Vecchia, F. & Giacometti, G.M. 2000. Ultraviolet B exposure of the whole leaves of barley affects structure and functional organisation of photosystem II. *J. Biol. Chem.* 275: 10976-82.
- Barbato, R., Frizzo, A., Friso, G., Rigoni, F. & Giacometti, G.M. 1995. Degradation of the D1 protein of photosystem-II reaction center by ultraviolet-B radiation requires the presence of functional manganese on the donor side. *Eur. J. Biochem.* 227: 723-9.
- Barber, J. 1992. *The photosystems : Structure, Function and Molecular Biology*. (Topics in Photosynthesis, vol. 2). Elsevier, Amsterdam.
- Barbieri, E.S., Villafañe, V.E. & Helbling, E.W. 2002. Experimental assessment of UV effects on temperate marine phytoplankton when exposed to variable radiation regimes. *Limnol. Oceanogr.* 47: 1648-55.
- Baroli, I. & Melis, A. 1996. Photoinhibition and repair in *Dunaliella salina* acclimated to different growth irradiances. *Planta* 198: 640-6.
- Behrenfeld, M.J., Lee II, H. & Small, L.F. 1994. Interactions between nutritional status and long-term responses to ultraviolet-B radiation stress in a marine diatom. *Mar. Biol.* 118: 523-30.
- Behrenfeld, M.J., Prásil, O., Kolber, Z.S., Babin, M. & Falkowski, P.G. 1998. Compensatory changes in photosystem II electron turnover rates protect photosynthesis from photoinhibition. *Photosynth. Res.* 58: 259-68.
- Belzile, C., Demers, S., Lean, D.R.S., Mostajir, B., Roy, S., de Mora, S., Bird, D., Gosselin, M., Chanut, J.-P. & Levasseur, M. 1998. An experimental tool to study the effects of ultraviolet radiation on planktonic communities: A mesocosm approach. *Environ. Technol.* 19: 667-82.
- Bergmann, T., Richardson, T.L., Paerl, H.W., Pinckney, J.L. & Schofield, O. 2002. Synergy of light and nutrients on the photosynthetic efficiency of phytoplankton populations from the Neuse River Estuary, North Carolina. *J. Plankton Res.* 24: 923-33.

- Berges, J.A., Charlebois, D.O., Mauzerall, D.C. & Falkowski, P.G. 1996. Differential effects of nitrogen limitation on photosynthetic efficiency of photosystems I and II in microalgae. *Plant Physiol.* 110: 689-96.
- Bischof, K., Hanelt, D. & Wiencke, C. 2000. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis and related enzyme reactions of marine macroalgae. *Planta* 211: 555-62.
- Bischof, K., Kräbs, G., Wiencke, C. & Hanelt, D. 2002. Solar ultraviolet radiation affects the activity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase and the composition of photosynthetic and xanthophyll cycle pigments in the intertidal green alga *Ulva lactuca* L. *Planta* 215: 502-9.
- Blumthaler, M. & Ambach, W. 1990. Indication of increasing solar ultraviolet-B radiation flux in Alpine regions. *Science* 248: 206-8.
- Booth, C.R., Coohill, T.P., Cullen, J.J., Frederick, J.E., Häder, D.P., Holm-Hansen, O., Jeffrey, W.H., Mitchell, D.L., Neale, P.J., Sobolev, I., van der Leun J. & Worrest, R.C. 1997. Impacts of solar UVR on aquatic microorganisms. *Photochem. Photobiol.* 65: 252-69.
- Böttger, E.C., Springer, B., Prammananan, T., Kidan, Y. & Sander, P. 2001. Structural basis for selectivity and toxicity of ribosomal antibiotics. *EMBO reports* 41: 318-23.
- Bouchard, J.N., Campbell, D. & Roy, S. 2005a. Effects of UV-B radiation on the D1 protein repair cycle of natural phytoplankton communities from three latitudes (Canada, Brazil, Argentina). *J. Phycol.* 41: 287-93.
- Bouchard, J.N., Roy, S., Ferreyra, G., Campbell, D.A. & Curtosi, A. 2005b. Ultraviolet-B effects on photosystem II efficiency of natural phytoplankton communities from Antarctica. *Polar Biol.* 28: 607-18.
- Bracher, A.U. & Wiencke, C. 2000. Simulation of the effects of naturally enhanced UV radiation on photosynthesis on Antarctic phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 196: 127-41.
- Büchel, C. & Wilhelm, C. 1993. *In vivo* analysis of slow chlorophyll fluorescence induction kinetics in algae: process, problems and perspectives. *Photochem. Photobiol.* 58: 137-48.



- Buma, A.G.J., Gieskes, W.W.C. & Thomsen, H.A. 1992. Abundance of Cryptophyceae and chlorophyll *b*-containing organisms in the Weddell-Scotia Confluence area in the spring of 1988. *Polar Biol.* 12: 43-52.
- Bumann, D. & Oesterhelt, D. 1995. Destruction of a single chlorophyll is correlated with the photoinhibition of photosystem II with a transiently inactive donor side. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 12195-99.
- Burns, R.A., MacKenzie, T.D.B. & Campbell, D.A. 2005. Inorganic carbon repletion constrains steady-state light acclimation in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus*. *J. Phycol.* in final revision.
- Calkins, J. & Thordardottir, T. 1980. The ecological significance of solar UV radiation on aquatic organisms. *Nature* 283: 563-6.
- Campbell, D.A., Cockshutt, A.M. & Porankiewicz-Asplund, J. 2003. Analysing photosynthetic complexes in uncharacterized species or mixed microalgal communities using global antibodies. *Physiol. Plant.* 119: 322-7.
- Campbell, D., Eriksson, M.-J., Öquist, G., Gustafsson, P. & Clarke, A. 1998a. The cyanobacterium *Synechococcus* resists UV-B by exchanging photosystem II reaction-center D1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 364-9.
- Campbell, D., Hurry, V.M., Clarke, A.K., Gustafsson, P. & Öquist, G. 1998b. Chlorophyll fluorescence analysis of cyanobacterial photosynthesis and acclimation. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 62: 667-83.
- Carreto, J.I., Carignan, M.O., Daleo, G. & De Marco, S.G. 1990. Occurrence of mycosporine-like amino acids in the red tide dinoflagellate *Alexandrium excavatum*: UV-photoprotective compounds? *J. Plankton Res.* 12: 909-21.
- Chatila, K., Demers, S., Mostajir, B., Gosselin, M., Chanut, J.-P. & Monfort, P. 1999. Bacterivory of a natural heterotrophic protozoan community exposed to different intensities of ultraviolet-B radiation. *Aquat. Microb. Ecol.* 20: 59-74.
- Chaturvedi, R. & Shyam, R. 2000. Degradation and *de novo* synthesis of D1 protein and *psbA* transcript levels in *Chlamydomonas reinhardtii* during UV-B inactivation of photosynthesis and its reactivation. *J. Biosci.* 25: 65-71.
- Critchley, C. 2000. Photoinhibition. In Raghavendra, A.S. [Ed.] *Photosynthesis - A Comprehensive Treatise*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 264-72.

- Cullen, J.J. & Lesser, M.P. 1991. Inhibition of photosynthesis by ultraviolet radiation as a function of dose and dosage rate : results for a marine diatom. *Mar. Biol.* 111: 183-90.
- Cullen, J.J. & Neale, P.J. 1993. Quantifying the effects of ultraviolet radiation on aquatic photosynthesis. In Yamamoto, H. & Smith, C.M. [Eds.] *Photosynthetic responses to the environment*. American Society of Plant Physiologists, Washington, DC. pp.45-60.
- Cullen, J.J. & Neale, P.J. 1994. Ultraviolet radiation, ozone depletion, and marine photosynthesis. *Photosyn. Res.* 39: 303-20.
- Cullen, J.J., Neale, P.J. & Lesser, M.P. 1992. Biological weighting function for the inhibition of phytoplankton photosynthesis by ultraviolet radiation. *Science* 258: 646-50.
- Davidson, A.T. 1998. The impact of UVB radiation on marine plankton. *Mutat. Res.* 422: 119-29.
- Davison, I.R. 1991. Environmental effects on algal photosynthesis : temperature. *J. Phycol.* 27: 2-8.
- 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. Progr. Ser.* 76: 185-93.
- Demmig-Adams, B., Adams III, W.W., Ebbert, V. & Logan, B.A. 1999. Ecophysiology of the xanthophyll cycle. In Frank, H.A., Young, A.J., Britton, G. & Cogdell, R.J. [Eds.] *The Photochemistry of Carotenoids*. Kluwer Academic, Dordrecht. pp. 245-69.
- 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: 801-15.
- Díaz, S., Nelson, D., Deferrari, G. & Camilión, C. 2003. A model to extend spectral and multi-wavelength UV irradiances time series. Model development and validation. *J. Geophys. Res.* 108: 1-12.
- Döhler, G. 1997. Effects of UVB radiation on utilization of inorganic nitrogen by Antarctic microalgae. *Photochem. Photobiol.* 66: 831-6.

- Döhler, G. 1998. Effect of ultraviolet radiation on pigmentation and nitrogen metabolism of Antarctic phytoplankton and ice algae. *J. Plant Physiol.* 153: 603-9.
- Döhler, G. & Buchmann, T. 1995. Effects of UV-A and UV-B irradiance on pigments and <sup>15</sup>N-ammonium assimilation of the haptophycean *Pavlova*. *J. Plant Physiol.* 146: 29-34.
- Dugdale, R.C. 1967. Nutrient limitation in the sea. Dynamics, identification and significance. *Limnol. Oceanogr.* 12: 685-95.
- Duysens, L.N.M. & Sweers, H.E. 1963. Mechanisms of the two photochemical reactions in algae as studied by means of fluorescence. In Japanese Society of Plant Physiologists [Ed.] *Studies on Microalgae and Photosynthetic Bacteria*. University of Tokyo Press, Tokyo. pp 353-72.
- Ekelund, N.G.A. 1996. Effects of protein synthesis inhibitors on photoinhibition by UV-B (280-320 nm) radiation in the flagellate *Euglena gracilis*. *Sci. Mar.* 60: 95-100.
- Falkowki, P.G. & Raven, J.A. 1997. Aquatic Photosynthesis. Blackwell Science. Oxford.
- Farman, J.C., Gardiner, B.G. & Shanklin, J.D. 1985. Large losses of total ozone in Antarctica reveal seasonal ClO<sub>x</sub> NO<sub>x</sub> interaction. *Nature* 315: 207-10.
- Fauchot, J., Gosselin, M., Levasseur, M., Mostajir, B., Belzile, C., Demers, S., Roy, S. & Zulema Villegas P. 2000. Influence of UV-B radiation on nitrogen utilization by a natural assemblage of phytoplankton. *J. Phycol.* 36: 484-96.
- Figuerola, F.L., Salles, S., Aguilera, J., Jiménez, C., Mercado, J., Viñepla, B., Flores-Moya, A. & Altamirano, M. 1997. Effects of solar radiation on photoinhibition and pigmentation in the red alga *Porphyra leucosticta*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 151: 81-90.
- Flanigan, Y. & Critchley, C. 1996. Light response of D1 turnover and photosystem II efficiency in the seagrass *Zostera capricorni*. *Planta* 198: 319-23.
- Fleischmann, E.M. 1989. The measurement and penetration of ultraviolet radiation into tropical marine water. *Limnol. Oceanogr.* 34: 1623-29.
- Folt, C.L., Chen, C.Y., Moore, M.V. & Burnaford, J. 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.* 44: 864-977.

- Forster, R.M. & Schubert, M. 2001. The effects of ultraviolet radiation on the planktonic community of a shallow, eutrophic estuary: results of mesocosm experiments. *Helgol. Mar. Res.* 55: 23-34.
- Fouilland, E., Gosselin, M., Mostajir, B., Levasseur, M., Chanut, J.-P., Demers, S. & de Mora, S. 2003. Effects of ultraviolet-B radiation and vertical mixing on nitrogen uptake by a natural planktonic community shifting from nitrate to silicic acid deficiency. *Limnol. Oceanogr.* 48: 18-30.
- Franklin, L.A. & Larkum, A.W.D. 1997. Multiple strategies for a high light existence in a tropical marine macroalga. *Photosynth. Res.* 53: 149-59.
- Franklin, L.A., Osmond, C.B. & Larkum, A.W.D. 2003. Photoinhibition, UV-B and algal photosynthesis. In Larkum, A.W.D., Douglas, S.E. & Raven, J.A. [Eds.], *Photosynthesis in Algae*. Kluwer Academic Publishers pp. 351-84.
- Frederick, J.E. & Lubin, D. 1994. Solar ultraviolet irradiance at Palmer Station, Antarctica. In Weiler, C.S. & Penhale, P.A. [Eds.] *Ultraviolet Radiation in Antarctica: Measurements and Biological Effects*. Antarctic Research Series, Volume 62, American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 43-52.
- Furgal, J.A. & Smith, R.E.H. 1997. Ultraviolet radiation and photosynthesis by Georgian Bay phytoplankton of varying nutrient and photoadaptive status. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54: 1659-67.
- Garcia-Pichel, F. 1994. A model for internal self-shading in planktonic organisms and its implications for the usefulness of ultraviolet sunscreens. *Limnol. Oceanogr.* 39: 1704-17.
- Geider, R.J., La Roche, J., Greene, R.M. & Olaizola, M. 1993. Response of the photosynthetic apparatus of *Phaeodactylum tricornerutum* (Bacillariophyceae) to nitrate, phosphate, or iron starvation. *J. Phycol.* 29: 755-66.
- Geider, R.J., MacIntyre, H.L., Graziano, L.M. & McKay, M.L. 1998. Responses of the photosynthetic apparatus of *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to nitrogen and phosphorus limitation. *Eur. J. Phycol.* 33: 315-32.
- Gerber, S. & Häder, D-P. 1995. Effects of artificial UV-B and simulated solar radiation on the flagellate *Euglena gracilis*: Physiological, spectroscopical and biochemical investigations. *Acta Protozool.* 34: 13-20.

- Giacometti, G.M., Barbato, R., Chiamonte, S., Friso, G. & Rigoni, F. 1996. Effects of ultraviolet-B radiation on photosystem II of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 242: 799-806.
- Gieskes, W.W.C. & Kraay, G.W. 1990. Transmission of ultraviolet light in Weddell Sea: Report of the first measurements made in the Antarctic. *BIOMASS Newsletter* 12: 12-4.
- Goss, R., Mewes, H. & Wilhelm, C. 1999. Stimulation of the diadinoxanthin cycle by UV-B radiation in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Photosynth. Res.* 59: 73-80.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M. & Kremling, K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. 2<sup>nd</sup> edition. Verlag Chemie, Weinheim.
- Greenberg, B.M., Gaba, V., Canaani, O., Malkin, S., Mattoo, A.K. & Edelman, M. 1989. Separate photosensitizers mediate degradation of the 32-kDa photosystem II reaction centre protein in the visible and UV spectral regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 6617-20.
- Greer, D.H., Berry, J.A. & Björkman, O. 1986. Photoinhibition of photosynthesis in intact bean leaves: role of light and temperature, and requirement for chloroplast protein synthesis during recovery. *Planta* 168: 253-60.
- Grzymski, J., Orrico, C. & Schofield, O.M. 2001. Monochromatic ultraviolet light induced damage to photosystem II efficiency and carbon fixation in the marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (3H). *Photosynth. Res.* 68: 181-92.
- Hanelt, D. 1996. Photoinhibition of photosynthesis in marine macroalgae. *Sci. Mar.* 60: 243-8.
- Hardy, J.T. & Gucinski, H. 1989. Stratospheric ozone depletion: Implications for marine ecosystems. *Oceanography* 2:18-21.
- Hazard, C., Lesser, M. & Kinzie III, R.A. 1997. Effects of ultraviolet radiation on photosynthesis in the subtropical marine diatom, *Chaetoceros gracilis* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 33: 960-8.
- Helbling, E.W., Villafañe, V. & Holm-Hansen, O. 1994. Effects of ultraviolet radiation on Antarctic marine phytoplankton photosynthesis with particular attention to the influence of mixing. In Weiler, C.S. & Penhale, P.A. [Eds.] *Ultraviolet Radiation in Antarctica : Measurements and Biological Effects*. Antarctic Research Series, Volume 62, American Geophysical Union, Washington, DC, pp: 207-228.

- Helbling, E.W., Chalker, B.E., Dunlap, W.C., Holm-Hansen, O., Villafañe, V.E. 1996. Photoacclimation of Antarctic marine diatoms to solar ultraviolet radiation. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 204: 85-101.
- Helbling, E.W., Villafañe, V., Ferrario, M. & Holm-Hansen, O. 1992. Impact of natural ultraviolet radiation on rates of photosynthesis and on specific marine phytoplankton species. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 80: 89-100.
- Heraud, P. & Beardall, J. 2000. Changes in chlorophyll fluorescence during exposure of *Dunaliella tertiolecta* to UV radiation indicate a dynamic interaction between damage and repair processes. *Photosynth. Res.* 63: 123-34.
- Hoffman, D.J. & Deschler, T. 1991. Evidence from balloon measurements for chemical depletion of stratospheric ozone in the Arctic winter of 1989-1990. *Nature* 349: 300-5.
- Holm-Hansen, O., Lubin, D. & Helbling, E.W. 1993. Ultraviolet radiation and its effects on organisms in aquatic environments. In Young, A.R., Björn, L.O., Moan, J. & Nultsch, W. [Eds.] *Environmental UV Photobiology*. Plenum Press Co Ltd, New York pp 379-425.
- Holm-Hansen, O., Mitchell, B.G., Hewes, C.D. & Karl, D.M. 1989. Phytoplankton blooms in the vicinity of Palmer station, Antarctica. *Polar Biol.* 10: 49-57.
- Holm-Hansen, O., Hewes, C.D., Villafañe, V.E., Helbling, E.W., Silva, N. & Amos, T. 1997. Distribution of phytoplankton and nutrients in relation to different water masses in the area around Elephant Island, Antarctica. *Polar Biol.* 18: 145-53.
- Huner, N.P.A., Öquist, G., Hurry, V.M., Krol, M., Falk, S. & Griffith, M. 1993. Photosynthesis, photoinhibition and low temperature acclimation in cold-tolerant plants. *Photosynth. Res.* 37: 19-39.
- Ivanov, A.G., Miskiewicz, E., Clarke, A.K., Greenberg, B.M., Huner N.P.A. 2000. Protection of photosystem II against UV-A and UV-B radiation in the cyanobacterium *Plectonema boryanum*: The role of growth temperature and growth irradiance. *Photochem. Photobiol.* 72: 772-779.
- Jansen, M.A.K., Gaba, V., Greenberg, B., Mattoo, K.A. & Edelman, M. 1994. UVB driven degradation of the D1-reaction-center protein of photosystem II proceeds via plastoquinone. In Yamamoto, H.Y. & Smith, C.M. [Eds.] *Photosynthetic responses to the environment*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland. pp. 142-9.

- Jerlov, N.G. 1950. Ultraviolet radiation in the sea. *Nature* 166: 111-2.
- Jerlov, N.G. 1976. Marine optics. Elsevier Scientific Publishing.
- Jokiel, P.L. & York, R.H.J. 1984. Importance of ultraviolet radiation in photoinhibition of microalgal growth. *Limnol. Oceanogr.* 29: 192-9.
- Kana, T.M., Glibert, P.M., Goericke, R. & Welschmeyer, N.A. 1988. Zeaxanthin and  $\beta$ -carotene in *Synechococcus* WH7803 respond differently to irradiance. *Limnol. Oceanogr.* 33: 1623-27.
- Kanervo, E., Mäenpää, P. & Aro, E.-M. 1993. D1 protein degradation and *psbA* transcript levels in *Synechocystis* PCC 6803 during photoinhibition *in vivo*. *J. Plant Physiol.* 142: 669-75.
- Karentz, D, J.E. Cleator & Mitchell, D.L. 1991. Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic to ultraviolet-B radiation. *J. Phycol.* 27: 326-41.
- Karentz, D., Bothwell, M.L., Coffin, R.B, Hanson, A., Herndl, G.J., Kilham, S.S., Lesser, M.P., Lindell, M.J., Moeller, R.E., Morris, D.P., Neale, P.J., Sanders, R.W., Weiler, C.S. & Wetzel, R.G. 1994. Impact of UV-B radiation on pelagic freshwater ecosystems: Report of working group on bacteria and phytoplankton. *Arch. Hydrobiol.* 43: 31-69.
- Kerr, J.B. & McElroy, C.T. 1993. Evidence of large upward trends of ultraviolet-B radiation linked to ozone depletion. *Science* 262: 1032-4.
- Kettunen, R., Pursiheimo, S., Rintamäki, E., Van Wijk, K.-J. & Aro, E.-M. 1997. Transcriptional and translational adjustments of *psbA* gene expression in mature chloroplasts during photoinhibition and subsequent repair of photosystem II. *Eur. J. Biochem.* 247: 441-8.
- Kim, J.H., Nemson, J.A. & Melis, A. 1993. Photosystem II reaction center damage and repair in *Dunaliella salina* (green alga). *Plant Physiol.* 103: 181-9.
- Kirk, J.T.O. 1994. Optics of UV-B radiation in natural waters. *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.* 43: 1-16.
- Kolber, Z & Falkowski, P.G. 1993. Use of active fluorescence to estimate phytoplankton photosynthesis *in situ*. *Limnol. Oceanogr.* 38: 1646-65.

- Kroon, B.M.A. 1994. Variability of photosystem II quantum yield and related process in *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyta) acclimated to an oscillating light regime simulating a mixed photic zone. *J. Phycol.* 30: 841-52.
- Latasa, M. 1995. Pigments composition of *Heterocapsa* sp. and *Thalassiosira weissflogii* growing in batch cultures under different irradiances. *Sci. Mar.* 59: 25-37.
- 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 tricornerutum*. *Plant Physiol.* 129: 1398-406.
- Lavaud, J., Rousseau, B. & Etienne, A. 2004. General features of photoprotection by energy dissipation in planktonic diatoms (Bacillariophyceae). *J. Phycol.* 40: 130-7.
- Larkum, A.W.D., Karge, M., Reifarth, F., Eckert, H.-J., Post, A. & Renger, G. 2001. Effect of monochromatic UV-B radiation on electron transfer reactions of photosystem II. *Photosynth. Res.* 68: 49-60.
- Lefèvre, F., Figarol, F., Carlslaw, K.S. & Peter, T. 1998. The 1997 Arctic ozone depletion quantified from three dimensional model simulations. *Geophys. Res. Lett.* 25: 2425-8.
- Lesser, M. 1996a. Acclimation of phytoplankton to UV-B radiation – oxidative stress and photoinhibition of photosynthesis are not prevented by UV-absorbing compounds in the dinoflagellate *Prorocentrum micans*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 132: 287-97.
- Lesser, M. 1996b. Elevated temperatures and ultraviolet radiation cause oxidative stress and inhibit photosynthesis in symbiotic dinoflagellates. *Limnol. Oceanogr.* 41: 271-83.
- Lesser, M.P., Barry, T.M. & Banaszak, A.T. 2002. Effects of UV radiation on a chlorophyte alga (*Scenedesmus* sp.) isolated from the fumarole fields of Mt. Erebus, Antarctica. *J. Phycol.* 38: 473-81.
- Lesser, M.P., Cullen, J.J. & Neale, P.J. 1994. Carbon uptake in a marine diatom during acute exposure to ultraviolet B radiation: relative importance of damage and repair. *J. Phycol.* 30: 183-92.
- Lesser, M. Neale, P.J. & Cullen, J.J. 1996. Acclimation of Antarctic phytoplankton to ultraviolet radiation: ultraviolet-absorbing compounds and carbon fixation. *Mol. Mar. Biol. Biotech.* 5: 314-25.



- Li, X., Qin, X. & McKay, R.M.L. 2003. Physiological and biochemical response of freshwater cryptomonads (*Cryptophyceae*) to Fe deficiency. *J. Basic Microb.* 43: 121-30.
- Litchman, E., Neale, P.J. & Banaszak, A.T. 2002. Increased sensitivity to ultraviolet radiation in nitrogen-limited dinoflagellates: photoprotection and repair. *Limnol. Oceanogr.* 47: 86-94.
- Long, S.P., Humphries, S. & Falkowski, P.G. 1994. Photoinhibition of photosynthesis in nature. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 633-62.
- Longhurst, A.R. (Ed.) 1998. Ecological geography of the sea. Academic Press, San Diego, California, Toronto.
- Lumsden, P. (Ed.) 1997. Plants and UV-B. Responses to environmental change. Cambridge University Press, Cambridge.
- MacDonald, T.M., Dubois, L., Smith, L.C. & Campbell, D.A. 2003. Sensitivity of cyanobacterial antenna, reaction centre and CO<sub>2</sub> assimilation transcripts and proteins to moderate UVB: Light acclimation potentiates resistance to UVB. *Photochem. Photobiol.* 77: 405-12.
- Madronich, S. 1993. The atmosphere and UV-B radiation at ground level. In Young, A.R., Bjorn, L.O., Mohan, J. & Nultsch, W. [Eds.] Environmental UV Photobiology. Plenum Press, New York. pp. 1-39.
- Madronich, S., McKenzie, R.L., Björn, L.O. & Caldwell, M.M. 1998. Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 46: 5-19.
- Marwood, C.A., Smith, R.E.H., Furgal, J.A., Charlton, M.N., Solomon, K.R. & Greenberg, B.M. 2000. Photoinhibition of natural phytoplankton assemblages in Lake Erie exposed to solar ultraviolet radiation. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 371-9.
- Mattoo, A.K., Hoffman-Falk, H., Marder, J.B. & Edelman, M. 1984. Regulation of protein metabolism: coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 1380-4.
- Maxwell, K. & Johnson, G.N. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659-68.

- McConnell, J.C. & Chartrand, D.J. 1997. Ozone chemistry: Simulation and depletion. In Wardle, D.J., Kerr, J.B. McElroy, C.T. & Francis, D.R. [Eds.] *Ozone science: A Canadian Perspective on the Changing Ozone Layer*. Rapport d'Environnement Canada, pp. 57-72.
- Melis, A. 1999. Photosystem-II damage and repair cycle in chloroplasts: what modulates the rate of photodamage *in vivo*? *Trends Plant Sci.* 4: 130-5.
- Melis, A., Nemson, J.A. & Harrison, M.A. 1992. Damage to functional components and partial degradation of photosystem II reaction center proteins upon chloroplast exposure to ultraviolet-B radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1109: 312-20.
- Metzler, P.M., Glibert, P.M., Gaeta, S.A. & Ludlam, J.M. 1997. New and regenerated production in the South Atlantic off Brazil. *Deep-Sea Res. I* 44 : 363-84.
- Mitchell, B.G. & Holm-Hansen, O. 1991. Observations and modeling of the Antarctic phytoplankton crop in relation to mixing depth. *Deep-Sea Res.* 38: 981-1007.
- Moline, M.A., Claustre, H., Frazer, T.K., Grzyski, J., Schofield, O. & Vernet, M. 2000. Changes in phytoplankton assemblages along the Antarctic Peninsula and potential implications for the Antarctic food web. In Davison, W., Howard-Williams, C. & Broady, P. [Eds.] *Antarctic Ecosystems. Models for Wider Ecological Understanding*. SCAR VII Proceedings, The Caxton Press, Christchurch, New Zealand, pp 263-71.
- Mostajir, B., Demers, S., de Mora, S., Belzile, C., Chanut, J.-P., Gosselin, M., Roy, S., Villegas, P.Z., Fauchot, J., Bouchard, J., Bird, D., Monfort, P. & Levasseur, M. 1999. Experimental test of the effect of the UV-B radiation on a phytoplanktonic community. *Limnol. Oceanogr.* 44: 586-96.
- Möhler, R., Crutzen, P.J., Groß, J.-U., Brühl, C., Russell, J.M., Gernandt, H., McKenna, D.S. & Tuck, A.F. 1997. Severe chemical ozone loss in the Arctic during the winter of 1995-1996. *Nature* 389: 709-12.
- Mulo, P., Laakso, S., Mäenpää, P. & Aro, E.-M. 1998. Stepwise photoinhibition of photosystem II. *Plant Physiol.* 117: 483-90.
- Neale, P.J. 2000. Spectral weighting functions for quantifying effects of UV radiation in marine ecosystems. In de Mora, S.J., S. Demers & Vernet, M [Eds.] *The effects of UV radiation in the marine environment*. Cambridge University Press, UK, pp. 72-100.

- Neale P.J. & Kieber D.J. 2000. Assessing biological and chemical effects of UV in the marine environment: Spectral weighting functions. *In* Hester, R.E. & Harrison, R.M. [Eds], *Causes and Environmental Implications of Increased UV.-B. Radiation*. Royal Society of Chemistry, Cambridge. pp. 61-83.
- Neale, P.J., Cullen, J.J & Davis, R.F. 1998a. Inhibition of marine photosynthesis by ultraviolet radiation : Variable sensitivity of phytoplankton in the Weddell-Scotia Confluence during the austral spring. *Limnol. Oceanogr.* 43: 433-48.
- Neale, P.J., Davis, R.F. & Cullen, J.J. 1998b. Interactive effects of ozone depletion and vertical mixing on photosynthesis of Antarctic phytoplankton. *Nature* 392: 585-9.
- Neale, P.J., Lesser, M.P. & Cullen, J.J. 1994. Effects of ultraviolet radiation on the photosynthesis of phytoplankton in the vicinity of McMurdo station, Antarctica. *In* Weiler, C.S. & Penhale, P.A. [Eds.] *Ultraviolet Radiation in Antarctica : Measurements and Biological Effects*. Antarctic Research Series, Volume 62, American Geophysical Union, Washington, DC, pp. 125-42.
- Neale, P.J., Helbling, E.W. & Zagarese, H.E. 2003. Modulation of UVR exposure and effects by vertical mixing and advection. *In* Helbling, E.W. & Zagarese, H. [Eds.] *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 107-34.
- Newman, P.A., Gleason, G.F., McPeters R.D. & Richard, S. 1997. Anomalously low ozone over the Arctic. *Geophys. Res. Lett.* 24: 2689-92.
- Nishiyama, Y., Yamamoto, H., Allakhverdiev, S.I., Inaba, M., Yokota, A. & Murata, N. 2001. Oxidative stress inhibits the repair of photodamage to the photosynthetic machinery. *EMBO J.* 20: 5587-94.
- Niyogi, K.K. 1999. Photoprotection revisited: genetic and molecular approach. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 333-59.
- Ohad, I., Kyle, D.J. & Arntzen, C.J. 1984. Membrane protein damage and repair : removal and replacement of inactivated 32-kilodalton polypeptides in chloroplast membranes. *J. Cell Biol.* 99: 481-5.
- Ohnishi, N.S., Allakhverdiev, S.I., Takahashi, S., Higashi, S., Watanabe, M., Nishiyama, Y. & Murata, N. 2005. Two-step mechanism of photodamage to photosystem II: Step 1 occurs at the oxygen-evolving complex and step 2 occurs at the photochemical reaction centre. *Biochem.* 44: 8494-9.

- Olaizola, M., La Roche, J., Kolber, Z. & Falkowski, P.G. 1994. Non-photochemical fluorescence quenching and the diadinoxanthin cycle in a marine diatom. *Photosynth. Res.* 41: 357-70.
- Osmond, C.B. 1994. What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In Baker, N.R. & Bowyer, N.R. [Eds.] *Photoinhibition of Photosynthesis, from the Molecular Mechanisms to the Field*. Oxford University Press, Oxford, pp 1-24.
- Ottander, C., Hundal, T., Andersson, B., Huner, N.P.A. & Öquist, G. 1993. Photosystem II reaction centres stay intact during low temperature photoinhibition. *Photosynth. Res.* 35: 191-200.
- Parkhill, J.-P., Maillet, G. & Cullen, J.J. 2001. Fluorescence-based maximal quantum yield for PSII as a diagnostic of nutrient stress. *J. Phycol.* 37: 517-29.
- Parsons, T.R., Maita, Y. & Lalli, C.M. 1984. *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, Toronto.
- Pestka, S. & Brot, N. 1971. Studies on the formation of transfer ribonucleic acid-ribosome complexes. IV. Effect of antibiotics on steps of bacterial protein synthesis: some new ribosomal inhibitors of translocation. *J. Biol. Chem.* 246: 7715-22.
- Prásil, O., Adir, N. & Ohad, I. 1992. Dynamics of photosystem II: mechanism of photoinhibition and recovery processes. In Barber, J [Ed.] *The Photosystems: Structure, Function and Molecular Biology*. Topics in Photosynthesis, Vol. 11, Elsevier, Amsterdam, pp. 295-348.
- Rae, R., Howard-Williams, C., Hawes, I. & Vincent, W.F. 2000. Temperature dependence of photosynthetic recovery from solar damage in Antarctic phytoplankton. In Davison, W., Howard-Williams, C. & Broady, P. [Eds.] *Antarctic Ecosystems. Models for Wider Ecological Understanding*. SCAR VII Proceedings, The Caxton Press, Christchurch, New Zealand, pp. 183-9.
- Renger, G., Völker, M., Eckert, H.J., Fromme, R., Hohm-Veit, S. & Graäber, P. 1989. On the mechanism of photosystem II deterioration by UVB irradiation. *Photochem. Photobiol.* 49: 97-105.
- Rex, M., Harris, N.R.P., Von der Gathen, P., Lehmann, R., Braathen, G.O., Reimer, E., Beck, A., Chipperfield, M.P., Alfier, R., Allaart, M., O'Connor, F., Dier, H., Dorokhov, V., Fast, H., Gil, M., Kyrö, E., Litynska, Z., Mikkelsen, I.B., Molyneux, M.G., Nakane, H., Notholt, J., Rummukainen, M., Viatte P. & Wenger, J. 1997.

- Prolonged stratospheric ozone loss in the 1995-1996 Arctic winter. *Nature* 389: 835-7.
- Riley, G.A. 1957. Phytoplankton from the North Central Sargasso Sea. *Limnol. Oceanogr.* 2: 252-70.
- Rodríguez, J., Varela, M. & Zapata, M. 2002a. Phytoplankton assemblages in the Gerlache and Bransfield Straits (Antarctic Peninsula) determined by light microscopy and CHEMTAX analysis of HPLC pigment data. *Deep-Sea Res. II* 49: 723-47.
- Rodríguez, J., Jiménez-Gómez, F., Blanco, J.M. & Figueroa, F.L. 2002b. Physical gradients and spatial variability of the size structure and composition of phytoplankton in the Gerlache Strait (Antarctica). *Deep-Sea Res. II* 49: 693-706.
- Roos, J.C. & Vincent, W. F. 1998. Temperature dependence of UV radiation effects on Antarctic cyanobacteria. *J. Phycol.* 34: 188-25.
- Roy, S. 2000. Strategies for the minimisation of the UV-induced damage. In de Mora, S.J., Demers, S. & Vernet, M. [Eds.] *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 177-205.
- Roy, S., Chanut, J.-P., Gosselin, M. & Sime-Ngando, T. 1996. Characterization of phytoplankton communities in the lower St. Lawrence Estuary using HPLC-detected pigments and cell microscopy. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142: 55-73.
- Samuelsson, G. & Öquist, G. 1977. A method for studying photosynthetic capacities of unicellular algae based on *in vivo* chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* 40: 315-19.
- Sandmann, G., Kuhn, M. & Böger, P. 1993. Carotenoids in photosynthesis: Protection of D1 degradation in the light. *Photosynth. Res.* 35: 185-90.
- Santabarbara, S., Barbato, R., Zucchelli, G., Garlaschi, F.M. and Jennings, R.C. 2001. The quenching of photosystem II fluorescence does not protect the D1 protein against light induced degradation in thylakoids. *FEBS* 505: 159-62.
- Sass, L., Spetea, C., Maté, Z., Nagy, F. & Vass, I. 1997. Repair of UV-B induced damage of photosystem II via *de novo* synthesis of D1 and D2 reaction centre subunits in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Photosynth. Res.* 54: 55-62.
- Scheiner, S.M. & Gurevitch, J. 2001. *Design and analysis of ecological experiments*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press, New York.

- Schloss, I. & Estrada, M. 1994. Phytoplankton composition in the Weddell-Scotia Confluence area during austral spring in relation with hydrography. *Polar Biol.* 14: 77-90.
- Schofield, O., Kroon, B.M.A. & Prézelin, B.B. 1995. Impact of ultraviolet-B radiation on photosystem II activity and its relationship to the inhibition of carbon fixation rates for Antarctic ice algae communities. *J. Phycol.* 31: 703-15.
- Schreiber, U. & Bilger, W. 1993. Progress in chlorophyll fluorescence research: major developments during the past years in retrospect. In Dietmar, B.H., Heidelberg, U.L., Darmstadt, D.E., Kadereit, J.W. & Mainz, M.R. [Eds.], *Progress in Botany*. Springer Verlag, Berlin. pp. 151-73.
- Schreiber, U., Neubauer, C. & Schliwa, U. 1993. PAM fluorometer based on medium-frequency pulsed Xe-flash measuring light: a highly sensitive tool in basic and applied photosynthesis research. *Photosynth. Res.* 36: 65-72.
- Setlow, R.B. 1974. The wavelengths in sunlight effective in producing skin cancer. A theoretical analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 71: 3363-6.
- Shelly, K., Heraud, P. & Beardall, J. 2002. Nitrogen limitation in *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) leads to increased susceptibility to damage by ultraviolet-B radiation but also increased repair capacity. *J. Phycol.* 38: 713-20.
- Shelly, K., Heraud, P. & Beardall, J. 2003. Interactive effects of PAR & UVB radiation on the PSII electron transport in the marine alga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 39: 509-12.
- Shindell, D.T., Rind, D. & Lonergan, P. 1998. Increased polar stratospheric ozone losses and delayed eventual recovery owing to increasing greenhouse-gas concentrations. *Nature* 392: 589-92.
- Sicora, C., Máté, Z. & Vass, I. 2003. The interaction of visible and UVB light during photodamage and repair of PSII. *Photosynth. Res.* 75: 127-37.
- Smith, R.C. & Baker, K.S. 1979. Penetration of UV-B and biologically effective dose-rates in natural waters. *Photochem. Photobiol.* 31: 585-92.
- Smith, R.C., Prézelin, B.B., Baker, K.S., Bidigare, R.R., Boucher, N.P., Coley, T., Karentz, D., McIntyre, S., Matlick, H.A., Menzies, D., Ondrusek, M.E., Wan, Z. & Waters, K.J. 1992. Ozone depletion: Ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255: 952-9.

- Sommaruga, R. 2003. UVR and its effects on species interaction. *In* Helbling, E.W. & Zagarese, H. [Eds.] *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 485-508.
- Stambler, N. 2003. Primary production, light absorption and quantum yields of phytoplankton from the Bellingshausen and Amundsen Seas (Antarctica). *Polar Biol.* 26: 438-51.
- Steglich, C., Behrenfeld, M., Koblizek, M., Claustre, H., Penno, S., Prášil, O., Partensky, F. & Hess, W.R. 2001. Nitrogen deprivation strongly affects photosystem II but not phycoerythrin level in the divinyl-chlorophyll b-containing cyanobacterium *Prochlorococcus marinus*. *Biochem. Biophys. Acta* 1503: 341-9.
- Stolarski, R.S., Bojkov, R., Bishop, L., Zerefos, C., Staehelin, J. & Zawodny, J. 1992. Measured trends in stratospheric ozone. *Science* 256: 342-9.
- Strid, A., Chow, W.S. & Anderson, J.M. 1990. Effects of supplementary ultraviolet-B radiation on photosynthesis in *Pisum sativum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1020: 260-8.
- Sundby, C., McCaffery, S. and Anderson, J.M. 1993. Turnover of the photosystem II D1 protein in higher plants under photoinhibitory and nonphotoinhibitory irradiance. *J. Biol. Chem.* 268: 25476-82.
- Tarasick, D.W. & Fioletov, V.E. 1997. The distribution of ozone and ozone-depleting substances in the atmosphere and observed changes. *In* Wardle, D.J., Kerr, J.B., McElroy, C.T. & Francis, D.R. [Eds.] *Ozone Science: A Canadian Perspective on the Changing Ozone Layer*. Rapport d'Environnement Canada, pp.15-40.
- Thorndsen, J. 1978. Preservation and storage. *In* Sournia, A. [Ed.] *Phytoplankton Manual*. Monographs on Oceanographic Methodology 6, UNESCO, Paris, France. pp 69-74.
- Tichy, M., Lupinkova, L., Sicora, C., Vass, I., Kuvikova, S., Prášil, O. & Komenda, J. 2003. *Synechocystis* 6803 mutants expressing distinct forms of the Photosystem II D1 protein from *Synechococcus* 7942: relationship between the psbA coding region and sensitivity to visible and UV-B radiation. *Biochim. Biophys. Acta* 1605: 55-66.
- Tyystjärvi, E. & Aro, E.M. 1996. The rate constant of photoinhibition, measured in lincomycin-treated leaves, is directly proportional to light intensity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 2213-8.

- Utermöhl, H. 1958. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton-Methodik *Mitt. Int. Ver. Theor. Angew. Limnol.* 9: 1-38.
- van de Poll, W.H., Bischof, K., Buma, A.G.J. & Breeman, A.M. 2003. Habitat related variation in UV tolerance of tropical marine red macrophytes is not temperature dependent. *Physiol. Plant.* 118: 74-83.
- van Kooten, O. & Snell, J.F.H. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynth. Res.* 25: 147-50.
- van Leeuwe, M.A., van Sikkelerus, B., Gieskes, W.W.C. & Stefels, J. 2005. Taxon-specific differences in photoacclimation to fluctuating irradiance in an Antarctic diatom and a green flagellate. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 288: 9-19.
- Vass, I., Kirilovsky, D. & Etienne, A.-L. 1999. UVB radiation induced donor- and acceptor-side modifications of the photosystem II in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Biochem.* 38: 12786-94.
- Vass, I., Sass, L., Spetea, C., Bakou, A., Ghanotakis, D.F. & Petrouleas, V. 1996. UV-B induced inhibition of photosystem II electron transport studied by EPR and chlorophyll fluorescence. Impairment of donor and acceptor side components. *Biochem.* 35: 8964-73.
- Vass, I., Styring, S., Hundal, T., Koivuniemi, A., Aro, E.-M. & Andersson, B. 1992. Reversible and irreversible intermediates during photoinhibition of photosystem II: stable reduced  $Q_A$  species promote chlorophyll triplet formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 1408-12.
- Vass, I., Kirilovsky, D., Perewoska, I., Maté, Z., Nagy, F. & Etienne, A.-L. 2000. UV-B radiation induced exchange of D1 reaction centre subunits produced from the *psbA2* and *psbA3* genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 6803. *Eur. J. Biochem.* 267: 2640-8.
- Vassiliev, I.R., Prásil, O., Wyman, K.D., Kolber, Z., Hanson Jr, A.K., Prentice, J.E. & Falkowski, P.G. 1994. Inhibition of PSII photochemistry by PAR and UV radiation in natural phytoplankton communities. *Photosynth. Res.* 42: 51-64.
- Vernet, M. 2000. Effects of UV radiation on the physiology and ecology of marine phytoplankton. In de Mora, S.J., Demers, S. & Vernet, M. [Eds.] *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 237-78.



- Villafañe, V.E., Barbieri, E.S. & Helbling, E.W. 2004. Annual pattern of ultraviolet radiation effects on temperate marine phytoplankton off Patagonia, Argentina. *J. Plankton Res.* 26: 167-74.
- Villafañe, V.E., Helbling, E.W., Holm-Hansen, O. & Chalker, B.E. 1995. Acclimatization of Antarctic natural phytoplankton assemblages when exposed to solar ultraviolet radiation. *J. Plankton Res.* 17: 2295-306.
- Villafañe, V.E., Sundbäck, K., Figueroa, F.L. & Helbling, E.W. 2003. Photosynthesis in the aquatic environment as affected by UVR. In Helbling, E.W. & Zagarese, H. [Eds.] *UV Effects in Aquatic Organisms and Ecosystems*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp 357-97.
- Vincent, W.F. & Neale, P.J. 2000. Mechanisms of UV damage to aquatic organisms. In de Mora, S.J., Demers, S. & Vernet, M. [Eds.] *The Effects of UV Radiation in the Marine Environment*. Cambridge University Press, United Kingdom, pp. 149-76.
- Vincent, W.F. & Roy, S. 1993. Solar ultraviolet-B radiation and aquatic primary production: Damage, protection, and recovery. *Environ. Rev.* 1: 1-12.
- Waldron, H.N., Attwood, C.G., Probyn, T.A. & Lucas, M.I. 1995. Nitrogen dynamics in the Bellingshausen Sea during the Austral Spring of 1992. *Deep-Sea Res.* 42: 1253-76.
- Wängberg, S.-Å., Garde, K., Gustavson, K. & Selmer, J.-S. 1999. Effects of UVB radiation on marine phytoplankton communities. *J. Plankton Res.* 21: 147-66.
- Warner, M.E., Fitt, W. K. & Schmidt, G.W. 1999. Damage to photosystem II in symbiotic dinoflagellates : A determinant of coral bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96: 8007-12.
- Wilson, M.I. & Greenberg, B.M. 1993. Protection of the D1 photosystem II reaction center protein from degradation in ultraviolet radiation following adaptation of *Brassica napus* L. to growth in ultraviolet-B. *Photochem. Photobiol.* 57: 556-63.
- Wilson, M.I., Ghosh, S., Gerhardt, K.E., Holland, N., Sudhakar Babu, T., Edelman, M., Dumbroff, E.B. & Greenberg, B.M. 1995. *In vivo* photomodification of ribulose-1,5-biphosphatase carboxylase/oxygenase holoenzyme by ultraviolet-B radiation. *Plant Physiol.* 109: 221-9.
- Wright, S.W., Jeffrey, S.W., Mantoura, R.F.C., Llewellyn, C.A., Bjørnland, T., Repeta, D. & Welschmeyer, N. 1991. Improved HPLC method for the analysis of

- chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 77: 183-96.
- Wulff, A., Wängberg, S.Á., Sundbäck, K., Nilsson, C. & Underwood, G.J.C. 2000. Effects of UVB radiation on a marine microphytobenthic community growing on a sand-substratum under different nutrient conditions. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1144-52.
- Xiong, F. 2001. Evidence that UV-B tolerance of the photosynthetic apparatus in microalgae is related to the D1-turnover mediated repair cycle *in vivo*. *J. Plant Physiol.* 158: 285-94.
- Xiong, F.S. & Day, T.A. 2001. Effects of solar ultraviolet-B radiation during springtime ozone depletion on photosynthesis and biomass production of Antarctic vascular plants. *Plant Physiol.* 125: 738-51.
- Xiong, F., Komenda, J., Kopecký, J. & Nedbal, L. 1997. Strategies of ultraviolet-B protection in microscopic algae. *Physiol. Plant.* 100: 378-88.
- Yentsch, C.S. & Menzel, D.W. 1963. A method for the determination of chlorophyll and phaeophytin by fluorescence. *Deep Sea Res.* 10: 221-31.
- Young, E.B. & Beardall, J. 2003. Photosynthetic function in *Dunaliella tertiolecta* (chlorophyta) during a nitrogen starvation and recovery cycle. *J. Phycol.* 39: 897-905.
- Zapata, M., Rodríguez, F. & Garrido, J.L. 2000. Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C<sub>8</sub> column and pyridine-containing mobile phases. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 195: 29-45.
- Zar, J.H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, Englewood Cliffs, NJ, 2<sup>nd</sup> Ed.