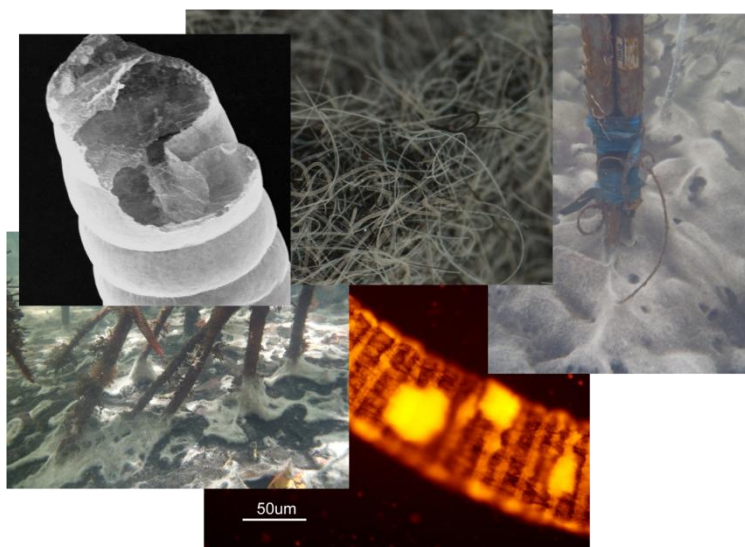


THÈSE
Présentée devant
L'Université des Antilles et de la Guyane

Pour l'obtention du
Diplôme de DOCTORAT

Par
Maïtena R. N. JEAN

**ETUDE DE LA MATTE SULFO-OXYDANTE DE LA MANGROVE DE
GUADELOUPE :**
**Caractérisation des micro-organismes principaux des familles
Beggiatoaceae et Oscillatoriaceae**



Composition du jury

Mr Christian Jeanthon, Directeur de recherche CNRS
Mr Jean-François Humbert, Directeur de recherche INRA, ENS
Mr Jean-Louis Mansot, Professeur Université des Antilles et de la Guyane
Mr Olivier Gros, Professeur Université des Antilles et de la Guyane

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directeur

**Cette thèse a été préparée au sein de l'équipe
"Biologie de la Mangrove" de l'U.M.R. 7138
Systématique Adaptation et Évolution.**

Université des Antilles et de la Guyane
U.F.R. des Science Exactes et Naturelles
Département de Biologie
B.P. 592
97159 Pointe-à-Pitre cedex
Guadeloupe
France

Etude de la matte sulfo-oxydante de la mangrove de Guadeloupe : Caractérisation des microorganismes principaux des familles Beggiatoaceae et Oscillatoriaceae.

Les mattes de procaryotes constituent une niche écologique très diversifiée et sont très répandues dans de nombreux écosystèmes. Toutefois, ces structures ont été peu étudiées au niveau du sédiment marin de mangrove et n'avaient jamais été décrites dans les Antilles. L'objectif principal de cette thèse est de caractériser les interactions existantes entre la matte et le milieu, ainsi qu'entre les différents micro-organismes procaryotes (bactéries sulfo-oxydantes et cyanobactéries) visibles à l'œil nu au sein même de la matte. Tout d'abord, nous avons cherché à caractériser l'environnement chimique du milieu en disposant des capteurs potentiométriques *in situ* puis en utilisant des microcapteurs dans un mésocosme recréé en laboratoire. Ces expériences ont permis de démontrer que la matte se situait dans une zone oxique /anoxique, lui permettant d'oxyder les sulfures émis depuis le sédiment, grâce à l'oxygène du milieu.

La caractérisation des micro-organismes majoritaires de la matte a été effectuée par des analyses des séquences d'ADNr 16S, grâce auxquelles des sondes spécifiques ont pu être élaborés et utilisées lors d'hybridations *in situ* (FISH). Deux nouvelles souches de Beggiatoaceae (bactéries filamenteuses sulfo-oxydantes libres) ont ainsi été décrites, puis étudiées grâce à la microscopie électronique couplée à l'EDX qui a permis de mettre en évidence les réserves de soufre intracellulaires de ces bactéries.

La caractérisation des cyanobactéries filamenteuses du milieu a également permis de décrire quatre souches de la famille des Oscillatoriales, toutes étudiées au microscope électronique. Deux souches du genre *Planktothricoides* se sont révélées toxiques sur les nauplies d'*Artemia salina*. D'autre part, les deux autres ont été identifiées comme proches d'*Oscillatoria spongelliae*, une espèce symbiotique d'éponge, bien que les coupes ultrafines d'une de ces souches aient montré une morphologie interne proche des *Tychonema*.

L'analyse de ces différentes données a ainsi permis d'étoffer les connaissances et le fonctionnement des communautés microbiennes d'un milieu méconnu, la mangrove, en mettant en évidence la grande diversité de ses micro-organismes. De plus, cette étude constitue une base intéressante de travail concernant les toxines cyanobactériennes dans ce milieu ainsi que la contribution des micro-organismes au fonctionnement de l'écosystème mangrove dans son ensemble.

Mots clés : Beggiatoa ; sulfures ; mangrove ; Oscillatoriales

Study of the sulfo-oxidant mat from the mangrove swamp of Guadeloupe: Characterization of the main micro-organisms from the Beggiatoaceae and Oscillatoriaceae family

Prokaryotic mats are very diverse ecological niches, which occur in many ecosystems. However, those structures are little studied in marine mangrove sediment and have never been described in West Indies. The main purpose of this thesis is to characterize the interactions between the mat and the environment, and between the different filamentous micro-organisms (sulfo-oxidant bacteria and cyanobacteria) living into the mat.

In a first place, we characterized the mainly micro-organisms of the mat by sequencing 16S rDNA. We confirmed these sequences by molecular hybridization (FISH) with specific probes designed from sequences obtained. Thus, it was possible to describe two new Beggiatoaceae strains (filamentous free living bacteria), whose structure has been studied by electronic microscopy.

Furthermore, we used potentiometric captors *in situ* and in laboratory, by creating a mesocosm, in order to define the chemical environment where involved these bacteria. These experiences proved that the Beggiatoaceae of the mat oxidized the sulfur taking the oxygen from the medium, while the microscopic analysis coupled with EDX showed intracellular sulfur granules into the bacteria.

The study of the filamentous cyanobacteria of the mat highlighted four new cyanobacteria strains, all studied by electronic microscopy.

Two of them belongs to *Planktothricoides* genus and showed positive toxicity on *Artemia salina*. The as others species are close to *Oscillatoria spongelliae*, a sponge symbiont, nevertheless, one of them showed a internal morphology close to *Tychonema* species.

The analysis of the different results adduces some knowledge about mangrove microbial communities. Furthermore, this study can be used as an interesting base to study cyanobacterial toxins in this medium and the micro-organisms contribution in functioning mangrove ecosystem.

Keywords: Beggiatoa; sulfures; mangrove; Oscillatoriales

Table des matières

INTRODUCTION	1
1. Les mangroves.....	2
2. Les biofilms et mattes bactériens.....	4
3. Les bactéries sulfo-oxydantes.....	8
4. Les cyanobactéries.....	17
5. Toxines cyanobactériennes.....	28
6. Objectifs de l'étude.....	36
MATERIELS ET METHODES	38
1. Présentation du site d'étude :.....	39
2. Mesures avec les capteurs potentiométriques.....	41
3. Mesures avec micro capteurs.....	45
4. Echantillonnage.....	49
5. Hybridation <i>in situ</i>	50
6. Analyses phylogénétiques (S. Gonzalez-Rizzo) :.....	52
7. Microscopie électronique à balayage (MEB).....	54
8. Microscopie électronique à transmission (MET).....	55
9. Essais de culture.....	56
10. Tests de toxicité des Cyanobactéries 1 et 2 (Collaboration avec C. Guidi-Rontani).....	57
11. Caractérisation des pigments de <i>Oscillatoria</i> au microspectromètre (Collaboration avec GTSI, J-L. Mansot et A. Sautdubois).....	58
CHIMIE DE LA MATTE	59
Résultats.....	60
1. Mesures avec les capteurs potentiométriques.....	60
2. Mesures effectuées en mésocosmes avec les microcapteurs.....	65
Discussion.....	68
BACTERIES THIOTROPHES	74
Résultats.....	75
1. Présentation de la matre.....	75
2. Analyses E.D.X.	76
3. Microscopie photonique.....	79
4. Microscopie électronique.....	80
5. Analyses phylogénétiques.....	82

6. Hybridations <i>in situ</i>	86
Discussion.....	90
Cyanobactéries.....	97
Résultats.....	98
1. Hybridations <i>in situ</i>	98
2. Microscopie photonique	99
3. Microscopie électronique.....	101
4. Essais de culture	105
5. Détection de la chlorophylle au spectrophotomètre Raman.....	106
6. Tests de toxicité.....	107
7. Analyses phylogénétiques	111
Discussion.....	116
1. <i>Planktothricoides</i> sp. 1 et 2	116
2. <i>Oscillatoria</i> 1 et 2.....	122
3. Analyse combinée des trois chapitres.	127
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	130
BIBLIOGRAPHIE	135
ANNEXES.....	157
Annexe 1 : UTILISATION DES CAPTEURS DE SULFURES et pH (M. Laurent, 2009)	158
Annexe 2: MILIEUX DE CULTURE	163
Annexe 3 : Statistiques	167

Table des figures

Figure 1: Forêt de mangrove au Mexique dans la région de Cancun et dans les Everglades en Floride.	3
Figure 2: Biofilm algal sur une étendue d'eau douce.	5
Figure 3: Matte de de bactéries au niveau de sources hydrothermales.....	7
Figure 4: Schématisation des processus d'oxydation biologique et chimique des sulfures au niveau d'un fumeur noir, (Laurent, 2009).	10
Figure 5: Réaction d'oxydation du soufre (Maurin 2009).	12
Figure 6: Filaments de <i>Thioploca araucae</i> et de <i>Beggiatoa alba</i>	14
Figure 7: Microphotographies électroniques à transmission des inclusions de quatre différentes souches de <i>Beggiatoa alba</i> . d'après (Strohl <i>et al.</i> , 1981).....	16
Figure 8: Microphotographie photonique d'un trichome de <i>Cylindrospermum sp.</i>	19
Figure 9: Schéma de la photosynthèse oxygénique (d'après Raven <i>et al.</i> , 2000).....	22
Figure 10: Microphotographies de microscopie électronique à transmission de cyanobactéries filamenteuse et coccoïde (Léveillé <i>et al.</i> , 2000).	23
Figure 11: Microphotographie d'une coupe longitudinale d'un trichome de <i>Planktothrix agardhii</i> (Smith & Peat, 1967).	28
Figure 12: Efflorescence de cyanobactéries sur une étendue d'eau douce.	29
Figure 13: Protocole analytique pour la détection des Microcystines et des Nodularines en surface et dans des eaux potables. D'après Triantis <i>et al.</i> (2010).	33
Figure 14: Localisation de la Guadeloupe au sein de l'archipel des Antilles, CIA [®]	39
Figure 15: a.Lieux de prélèvements.	40
Figure 16: Photographie des mattes de procaryotes à proximité des racines de palétuviers.....	41
Figure 17: Capteurs potentiométriques sulfure et pH.....	42
Figure 18: Distribution des formes ioniques H ₂ S, HS ⁻ et S ²⁻ en fonction du pH, (Unisense 2010).	43
Figure 19 : Disposition des capteurs autonomes pour le suivi chimique des mesures dans le sédiment durant trois mois..	44
Figure 20 : Calibration de la sonde sulfures à l'aide du logiciel SensorTrace Basic [®]	47
Figure 21: Montage des microcapteurs pour l'établissement des profils en sulfures.	48
Figure 22: Prélèvement de la matte et décantation avant le tri.	50
Figure 23: Deux photographies de la même zone comprise entre quatre bâtons prises à 4 jours d'intervalle.	60
Figure 24: Représentation graphique des variations de concentrations en sulfures et du de pH (en à la surface de la matte de procaryotes.	61
Figure 25: Représentation graphique des variations de concentrations en sulfures et du de pH enregistrés pendant 28h en mésocosme.	62
Figure 26: Représentation graphique des variations de la concentration en sulfures totaux et du pH pendant trois mois sous le sédiment sans matte.	63
Figure 27: Représentation graphique des variations du pH et de la concentration en sulfures totaux sous la matte pendant trois mois.....	64
Figure 28: Représentation graphique des variations de la concentration en sulfures de la sonde seule sous la matte pendant trois mois.	65
Figure 29: Profils des concentrations en H ₂ S en sulfures totaux et en oxygène en fonction de la profondeur.	67

Figure 30: Moyenne des températures à plusieurs profondeurs d'une nappe d'eau de mangrove située à quinze mètres de la bordure de racines de palétuviers.	71
Figure 31: La nitrification et la dénitrification sont des intermédiaires possibles de l'oxydation en sulfates, des sulfures par l'oxygène (d'après Fenchel, 1995).	73
Figure 32: Photographie de la matre à la loupe binoculaire mettant en évidence les différents filaments étudiés.	75
Figure 33 : Représentation graphique du spectre EDX de « <i>Beggiatoa morphotype 1</i> ».....	76
Figure 34: Microphotographie électronique de « <i>Beggiatoa morphotype 1</i> » et Cartographies EDX de différents éléments dans le filament bactérien.....	77
Figure 35: Représentation graphique du spectre EDX des « <i>Beggiatoa morphotype 2</i> ».....	78
Figure 36: (a.) Photographie de microscopie électronique de « <i>Beggiatoa morphotype 2</i> » et Cartographies EDX de différents éléments dans le filament bactérien.....	79
Figure 37: Photographie en microscopie photonique des filaments de « <i>Beggiatoa morphotype 1</i> » et « <i>Beggiatoa morphotype 2</i> ».....	80
Figure 38: Microphotographies de microscopie électronique à balayage d'un filament « <i>Beggiatoa morphotype 1</i> ».	81
Figure 39: Microphotographies électroniques à transmission des <i>Beggiatoa morphotype 1</i> et 2 .	82
Figure 40: Arbre décrivant les relations phylogénétiques entre les <i>Beggiatoa morphotypes 1</i> et 2 et d'autres bactéries sulfo-oxydantes filamenteuses.....	83
Figure 41: Microphotographies des hybridations <i>in situ</i> de <i>Beggiatoa morphotype 1</i> ..	87
Figure 42: Microphotographies des hybridations <i>in situ</i> de <i>Beggiatoa morphotype 2</i>	88
Figure 43: Microphotographie photonique à épifluorescence des cyanobactéries 1 et 2 ayant hybridé avec la sonde CYANO.....	98
Figure 44: Microphotographie photonique à épifluorescence d' « <i>Oscillatoria 1</i> et 2 » ayant hybridé avec la sonde spécifique des cyanobactéries.....	99
Figure 45: Microphotographie photonique des Cyanobactéries 1 et 2.	100
Figure 46: Microphotographies photoniques des <i>Oscillatoria 1</i> et 2.	101
Figure 47: Microphotographies électroniques environnementales des cyanobactéries 1 et 2.....	101
Figure 48: Microphotographies électroniques des <i>Oscillatoria 1</i> et 2.....	102
Figure 49: Micrographie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d' <i>Oscillatoria 1</i> ..	103
Figure 50: Micrographies électroniques de coupes longitudinales d' <i>Oscillatoria 1</i>	104
Figure 51: Spectres de la feuille brute de <i>L. leucocephala</i> et du filament d' <i>Oscillatoria 1</i>	106
Figure 52: Spectres des différents spots obtenus par chromatographie sur couche mince.	107
Figure 53: Arbre décrivant les relations phylogénétiques entre les Cyanobactéries 1 et 2 et les <i>Oscillatoria 1</i> et 2..	113
Figure 54: Photographies des mattes de cyanobactéries de la mangrove de Guadeloupe.	122

Table des tableaux

Tableau 1: Sondes utilisées pour les hybridations <i>in situ</i>	51
Tableau 2: Liste des différentes amorces utilisées afin d'obtenir les séquences codant pour les gènes spécifiques ou les ADN 16S des individus étudiés.	53
Tableau 3: Protocoles de PCR suivis pour l'amplification de chaque gène considéré (S. Gonzalez-Rizzo).....	54
Tableau 4: Matrice d'homologie entre les séquences de 925 paires de bases de l'ADNr 16S des différentes espèces utilisées pour contruire l'arbre phylogénétique des bactéries thiotrophes. Sont indiqués en rouge les pourcentages d'homologie entre les séquences des deux morphotypes de <i>Beggiatoa</i> retrouvés dans cette étude et les autres espèces choisies pour former l'arbre phylogénétique.	85
Tableau 5: Résultats des expériences menées avec support et les milieux F/2 et Erdschreider.	89
Tableau 6: Tableau synthétisant les résultats obtenus pour les cultures de différentes cyanobactéries.....	106
Tableau 7: Nombre d'individus morts au bout de 24h de contact avec un milieu de culture neutre (Témoin), un milieu de culture où les cyanobactéries 1 et 2 ont poussé.	108
Tableau 8: Nombre d'individus morts observés pour le témoin et la cyanobactérie 1.	108
Tableau 9: Nombre d'individus morts théoriques calculés pour le témoin et la cyanobactérie 1, dans le cas où H0 est vraie.....	108
Tableau 10 : Nombre d'individus morts au bout de 24h de contact avec un milieu de culture neutre (Témoin), un milieu de culture contenant un broyat de cyanobactéries 1 ou 2.	110
Tableau 11: Matrice d'homologie entre les séquences de 925 paires de bases de l'ADNr 16S des différentes espèces utilisées pour construire l'arbre phylogénétique des bactéries thiotrophes. Sont indiqués en rouge les pourcentages d'homologie entre les séquences des quatre cyanobactéries retrouvés dans cette étude et les autres espèces choisies pour former l'arbre phylogénétique.....	115

Liste des abbreviations

EPS : Substance polymérique
extracellulaire

M : molaire

mM : millimolaire

μ M : micromolaire

nm : nanomolaire

m : mètre

cm : centimètre

mm : millimètre

μ m : micromètre

° : degré

°C : degré Celsius

% : pour cent

l : litre

V : volt

h : heure

min : minute

sec : seconde

Véq : volume équivalent

Ag : argent

AgCl : Chlorure d'argent

Ag₂S : sulfure de diargent

Cu : cuivre

Fe : Fer

H : ion hydrogène

H₂O : molécule d'eau

H₂S : sulfure de dihydrogène

I : ion iodure

I₂ : diiode

I³⁻ : ion triiodure

IO₃⁻ : iodate

KCl : chlorure de potassium

Na₂S : sulfure de disodium

O₂ : dioxygène

S : soufre

Zn : zinc

HCl : acide chlorhydrique

KI : iodure de potassium

KIO₃ : iodate de potassium

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

FISH : Fluorescence in situ
hybridization

MEB : Microscopie électronique à
balayage

MET : Microscopie électronique à
transmission

EDX : Energy Dispersive X

pb : paire de bases

PCR : Polymerase Chain

Reaction

PFA : Paraformaldéhyde

μ E : Micro-Einstein

INTRODUCTION

1. Les mangroves

Les mangroves, milieux dans lequel se situe notre étude, sont des forêts ligneuses de palétuviers qui forment un écosystème de transition, situé entre les environnements terrestres, océaniques et d'eau douce dans les régions tropicales et subtropicales (Jennerjahn & Itterkkot, 2002). Les palétuviers qui constituent cette forêt sont capables d'adaptations morphologiques remarquables afin de leur permettre de résister aux contraintes du milieu (température de l'eau et de l'air élevées, sols salés, vaseux, en quasi anaérobie alternant des périodes de sécheresse et d'inondations...) (Odum *et al.*, 1982).

Le terme « mangrove » a plusieurs significations écologiques et se réfère à deux concepts différents. Le premier concept définit les mangroves comme un groupe écologique de plantes halophytes se référant à la diversité écologique des palétuviers. Le second concept définit la mangrove comme une communauté végétale complexe, associée à une flore et à une faune, formant les « communautés de mangrove » (Lugo et Snedaker, 1974). Cependant, aucun de ces concepts ne prend en considération la partie marine du milieu. En général dans la langue française, tout comme dans cette étude, le terme mangrove, se rapporte principalement à la forêt de palétuviers tandis que « l'écosystème mangrove » en revanche, se rapporte aux formations végétales ainsi qu'au biotope, à la flore et à la faune associées.

Les mangroves recouvrent 100 000 à 230 000 km², et sont les écosystèmes majeurs de la frange continentale (Snedaker 1984; Bunt 1992; Schmidt 1995). Elles sont principalement situées dans les pays en voie de développement où elles sont soumises à une déforestation importante pour l'installation de structures aquacoles ou à des fins d'urbanisation (Fig. 1a.), mais également à des pollutions ou à l'assèchement (Fig. 1b) en raison de l'exploitation des terres en amont (Lacerda, 1993 ; Valiela *et al.*, 2001 ; Alongi, 2002).



Figure 1: (a) Forêt de mangrove au Mexique dans la région de Cancun détruite pour la construction d'immeubles. (b) Marécage dans la mangrove humide des Everglades en Floride, asséchée en raison des prélèvements en eau dus à l'urbanisation.

En effet, la disparition de la mangrove mondiale atteint des taux de 1 à 2% par an, soit un taux supérieur à ceux de la disparition des récifs coralliens adjacents, ou de la forêt tropicale humide (FAO, 2003 ; Stone, 2006). Dans 26 des 120 pays où la forêt de mangrove a été recensée, celle-ci est considérée comme en danger critique ou approchant l'extinction (FAO, 2003).

Peu d'importance est portée à ce phénomène, pourtant les mangroves sont un écosystème essentiel des zones tropicales et subtropicales (Duke *et al.*, 2007). En effet, ces zones permettent de limiter l'érosion des côtes (Mazda *et al.*, 2002) et piègent les sédiments provenant de la zone continentale, contribuant ainsi à la préservation des récifs coralliens (Kitheka *et al.*, 2003). C'est également une zone considérée comme une nurserie pour les juvéniles des poissons vivant sur le récif grâce à l'enchevêtrement de racines qui constitue un abri face aux grands prédateurs (Nagelkerken *et al.*, 2000). En effet, certaines espèces d'intérêt commercial comme *Lutjanus griseus* (le vivaneau gris) et *Ocyurus chrysurus* (le colas) sont totalement dépendants des mangroves pour leur développement et sont ainsi absents des récifs insulaires où la mangrove est absente (Nagelkerken *et al.*, 2000 ; 2002 ; Verweij *et al.*, 2008).

De plus, avec une productivité de 2500mg de carbone par mètre carré et par jour, les mangroves sont l'un des écosystèmes les plus productifs sur Terre, dépassant la productivité des régions océaniques d'un facteur 40 (Ong 1982; Berger *et al.* 1989; Bunt 1992). En raison cette très grande productivité et du faible temps de renouvellement de la matière organique, les mangroves sont d'une importance

particulière pour les cycles biogéochimiques du carbone et des éléments chimiques associés le long de la marge continentale (Robertson and Duke 1990).

2. Les biofilms et mattes bactériens

La définition des biofilms bactériens a beaucoup évolué depuis leur première description dans les années 30 (Zobell *et al.*, 1936). Bien que leur structure fût connue depuis ces premières descriptions, ce n'est que 40 ans plus tard que le terme biofilm sera employé pour la première fois par Costerton et collaborateurs, (1978). La définition initiale de ce terme est une population de bactéries adhérentes les unes aux autres et/ou à des surfaces ou interfaces englobées dans une matrice. Cette définition inclut les agrégats et floculats bactériens ainsi que les bactéries fixées dans les interstices de milieux poreux. Ce n'est que vers la fin des années 80 que les biofilms ont été reconnus comme des associations de microorganismes inclus dans une matrice généralement attachée à la surface de toutes sortes de matériaux (Characklis, 1989). Ainsi, la population microbienne formant les biofilms n'est plus considérée comme uniquement constituée de bactéries mais d'une multitude d'organismes tels que des bactéries, des champignons, des algues unicellulaires, en proportions diverses et formant une structure très organisée avec des communications intercellulaires pour un équilibre et un mode de vie coopératif. Tous ces organismes sont liés dans une matrice, appelée substance polymérique extracellulaire (EPS en anglais) (Stal & Caumette, 1994) qui permettent l'adhésion des cellules à d'autres cellules, ou à des surfaces inertes. Certaines de ces substances polymériques extracellulaires ont montré leur capacité à lier des ions métalliques afin de se fixer sur les métaux tels que l'acier (White *et al.*, 1986), en contrepartie, ils sont responsables de la corrosion de ceux-ci. Ces matrices s'avèrent être hautement résistantes aux antibiotiques (Anwar *et al.*, 1992) et aux surfactants naturels (Anwar *et al.*, 1990).

Les biofilms sont caractérisés par une épaisseur pouvant varier de quelques couches de cellules à quelques millimètres et sont liés à leur substrat où à la couche d'eau sous jacente. Ils colonisent tous les milieux, toutes les surfaces, à l'exception des tissus sains animaux ou végétaux. Toutes les surfaces temporairement ou continuellement humides ou exposées à des conditions non physiologiques amenant un stress environnemental, sont amenées à y voir se développer un biofilm (de Beer & Kühn, 2001).

Ainsi, ils colonisent communément les prothèses médicales où ils sont souvent responsables d'infections en hébergeant des pathogènes (Lindsay & Von Holy, 2006).

On les retrouve également dans les conduites d'eau potables (Wingender & Flemming, 2011), mais aussi dans les milieux naturels comme sur des rochers (Maal-Bared *et al.*, 2012), les eaux stagnantes (Fig.2) (Declerck *et al.*, 2007).



Figure 2: Biofilm algal sur une étendue d'eau douce.

Les biofilms et les mattes bactériennes ont longtemps été confondus en une seule et même entité. Ils sont en effet tous deux définis comme des revêtements associés à une surface et inclus dans une substance extracellulaire polymérique. Cependant, ils sont aujourd'hui bien différenciés. Tout d'abord, la couche supérieure de la matte est le plus souvent composée de bactéries phototrophes assurant la production primaire et formant la matrice de la matte, alors que de nombreux biofilms sont hétérotrophes et prélèvent de l'eau environnante ou du substrat leurs nutriments (de Beer & Kühl 2001).

De plus, les mattes bactériennes, reposent toujours sur du sédiment, vaseux (Grünke *et al.*, 2011), sableux (Hovland, 2007) ou terrigène (Stal, 2001), contrairement aux biofilms qui reposent sur des surfaces solides ou des interfaces (de Beer & Kühl, 2001). Elles sont également caractérisées par une épaisseur plus importante que celle des biofilms, de moins de 1 mm à quelques cm. Elles peuvent ressembler à un paillason pouvant être décollé dans son ensemble, d'où leur nom (Stal, 2001) (mat=tapis en anglais). Auparavant, ces structures étaient dénommées « écosystèmes microbiens laminés » ou stromatolithes. Ces concrétions sont formées par calcification et silification du sédiment grâce à la croissance et l'activité de la flore

INTRODUCTION

microbienne (Walter, 1976). Ces formations, qui sont des roches laminées de formation biogéniques, sont connues pour ressembler aux premiers fossiles connus de communautés microbiennes, les plus anciennes formes de vie connues sur terre (Schopf & Walter, 1982). Cependant, la majorité des mattes bactériennes n'effectuent pas de calcification et ce terme de stromatolithe ne leur sied pas.

Les mattes de procaryotes existent donc depuis des millénaires, et elles sont également ubiquistes. On les retrouve dans pratiquement tous les milieux humides ou aquatiques. Elles reposent sur le sédiment des eaux calmes et peu agitées, salées comme douces, souvent peu profondes et peu perturbées par les animaux. Ainsi, de nombreux auteurs ont fait état de la présence de mattes dans des lacs ou des cours d'eau, (Nishino *et al.*, 1998 ; Joh & Lee, 2012). Mais elles sont également très courantes en milieu côtier (Jørgensen, 1977) sur des bancs de sable (Samanta *et al.*, 2011) et même dans la forêt de mangrove (Stal, 2001). Néanmoins, elles sont également retrouvées à des profondeurs importantes, lors de la décomposition des débris organiques des os ou des bois coulés. Typiquement, les habitats réunissant des conditions extrêmes voient se développer des mattes prolifiques comme dans les sources chaudes ou les eaux sur-salées (Fig.3)(de Beer & Köhl, 2001).

Les mattes bactériennes semblent se développer dans des milieux dégradés, instables. La pollution anthropique favorisant l'eutrophisation, en réduisant les sulfates en sulfites qui pourraient alors être utilisés par les bactéries sulfo-oxydantes, il semblerait que les mattes pourraient voir leur nombre et leur étendue se développer fortement ces prochaines années (Nishino *et al.*, 1998). Meyer-Reil & Köster (2000), ont ainsi reporté l'apparition de mattes de bactéries sulfo-oxydantes, ainsi que de cyanobactéries dans la mer Baltique, à la suite des dégradations du milieu suite à son eutrophisation.

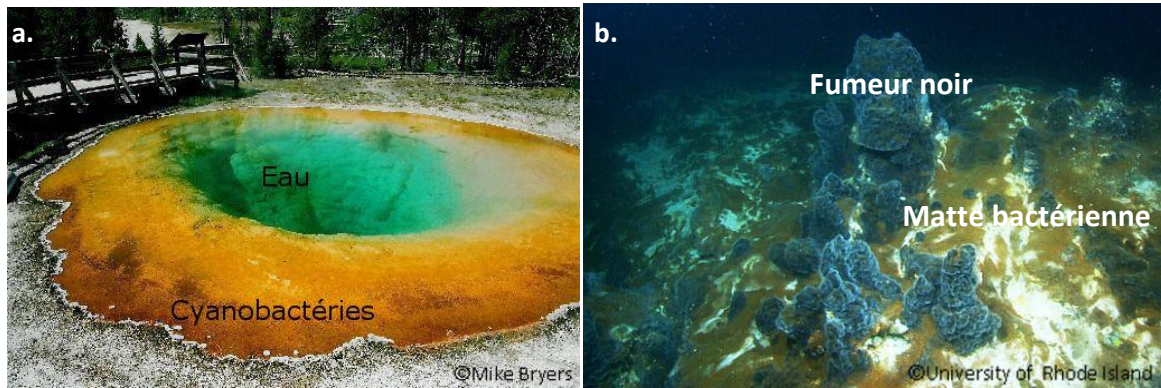


Figure 3: (a.)Matte de cyanobactéries du genre *Phormidium* et *Synechococcus* dans le geyser du Grand Prismatic dans le parc de Yellowstone, **b.** matte de bactéries au niveau d'une source hydrothermale.

Il a également été démontré que ces mattes constituent un véritable écosystème, en jouant un rôle important dans le réseau trophique de leur milieu ou en servant de nourriture et d'abri pour de nombreux organismes (Fauré-Fremiet, 1951; Bernard & Fenchel, 1995). En permettant la mise en place d'un écosystème stable dans un milieu difficilement colonisable, elles assurent la production de matière organique primaire nécessaire à d'autres organismes pouvant ainsi se développer. Ainsi, (Stal, 2001) décrit l'installation d'un écosystème à partir d'une matte de cyanobactéries, sur un banc de sable.

Certaines cyanobactéries nécessitent peu de nutriments, ou sont résistantes à des environnements soumis à de fortes variations de salinité, de températures, ou parfois même à la dessiccation. Ainsi, elles peuvent s'installer dans ces milieux. Une fois le sédiment enrichi en matière organique par la présence de cyanobactéries, celle-ci devient disponible pour d'autres microorganismes qui peuvent ainsi proliférer.

Il existe deux grandes familles de mattes : les mattes sulfo-oxydantes et les mattes de cyanobactéries. Toutes deux se trouvent dans des écosystèmes très variés et peuvent être composées seulement de l'un ou de l'autre des organismes, ou bien associées.

Lorsque des cyanobactéries et des bactéries sulfo-oxydantes cohabitent au sein d'une même matte, elles peuvent occuper des strates différentes au sein de la matte ou être liées dans les mêmes strates (de Beer & Kühl, 2001).

Les bactéries filamenteuses du genre *Beggiatoa* effectuent parfois des migrations diurnes, surtout lorsqu'elles sont associées aux cyanobactéries. En effet, bien que l'on parle de mattes de *Beggiatoa*, ces tapis bactériens sont rarement composés

uniquement de *Beggiatoa*. Celles-ci sont souvent, notamment dans les milieux peu profonds, associées à des organismes phototrophes, principalement les cyanobactéries (de Beer & Kühl, 2001).

Dans la journée, les *Beggiatoa* s'enfoncent dans le sédiment et laissent la place aux cyanobactéries en surface afin de capter les rayons lumineux et effectuer la photosynthèse. La nuit venue, lorsque le sédiment devient anoxique, les *Beggiatoa* remontent à la surface afin de capter de l'oxygène, donnant une apparence laineuse à la matte tandis que les cyanobactéries s'enfoncent dans le sédiment (Fenchel & Bernard, 1995). Ainsi, chaque organisme se place dans la zone où le gradient oxygène/ sulfure est le plus favorable à son métabolisme, et présente le moins de toxicité pour l'organisme considéré (Fenchel & Bernard, 1995; Dunker *et al.*, 2010).

Les mattes mixtes constituent donc une cohabitation entre les organismes où chacun des organismes partage une strate qui peut varier en fonction des conditions du milieu.

3. Les bactéries sulfo-oxydantes

Les bactéries sulfo-oxydantes sont des organismes autotrophes. Elles sont ainsi capables de produire l'énergie et les molécules carbonées nécessaires à leur croissance à partir de composés minéraux.

Deux types d'autotrophie existent, comme la photosynthèse pratiquée par les organismes chlorophylliens, et la chimiosynthèse. La chimiosynthèse est l'élaboration de molécules organiques à partir de l'énergie générée par des réactions chimiques d'oxydation de composés minéraux réduits, contrairement à la photosynthèse, où la source d'énergie est lumineuse. Ce type d'autotrophie fût connu dès 1887 par Winogradsky qui découvre que la bactérie *Beggiatoa* vivant dans les sources sulfureuses terrestres est capable d'utiliser le sulfure d'hydrogène afin de produire de l'énergie et de stocker du soufre sous forme de granules intracellulaires (Ackert, 2006).

Cependant, c'est lors de missions en milieu profond, notamment au niveau des sources hydrothermales que la chimiosynthèse retiendra réellement l'intérêt de la communauté scientifique. Jusqu'alors, bien que de nombreux chalutages en milieu profonds prouvaient que la vie sous marine s'étendait dans les grandes profondeurs,

INTRODUCTION

l'hypothèse de Forbes faisait consensus. Edward Forbes limitait en 1840 la vie du milieu marin à environ 550 m, en raison de la décroissance de l'abondance de celle-ci avec la profondeur.

La découverte des sources hydrothermales dans les années 1970 au niveau des Galapagos (Lonsdale, 1977 ; Corliss *et al.*, 1979) a donc plongé la communauté scientifique dans un grand étonnement, ces sites regorgeant de vie en l'absence totale de toute source de lumière. La photosynthèse y était donc impossible. Ainsi de nombreuses études ont été menées afin de comprendre le développement de ces organismes (Lonsdale 1977).

Les sources hydrothermales se situent à des profondeurs très variables, de la zone intertidale aux abysses, jusqu'à 4000 m de profondeur (Tarasov *et al.*, 2005) au niveau des dorsales où se situe le volcanisme sous marin (Jannasch & Mottl, 1985).

Dans ce milieu, l'activité volcanique crée des fissures dans la croûte océanique. L'eau de mer s'y infiltre et se réchauffe. En fonction de la roche traversée, elle se charge en différents minéraux et s'appauvrit en oxygène. Lorsque le fluide remonte vers le plancher océanique il a atteint une température d'environ 350°C, et possède une forte teneur en métaux, en hydrogène sulfureux ou en méthane. Au contact de l'eau de mer environnante froide (2°C environ), les minéraux contenus dans le fluide précipitent et il se forme des cheminées que l'on appelle des fumeurs noirs.

Les différentes études effectuées ont révélé que ces écosystèmes étaient basés sur la chimiosynthèse. Des procaryotes chimiotrophes s'y développent entre la couche oxygène d'eau de mer et les fluides anoxiques chargés en éléments réduits remontant de la dorsale. Ces procaryotes oxydent alors biologiquement les composés réduits avant même que l'oxydation naturelle ne soit effectuée par contact avec l'oxygène contenu dans l'eau de mer (Fig.4).

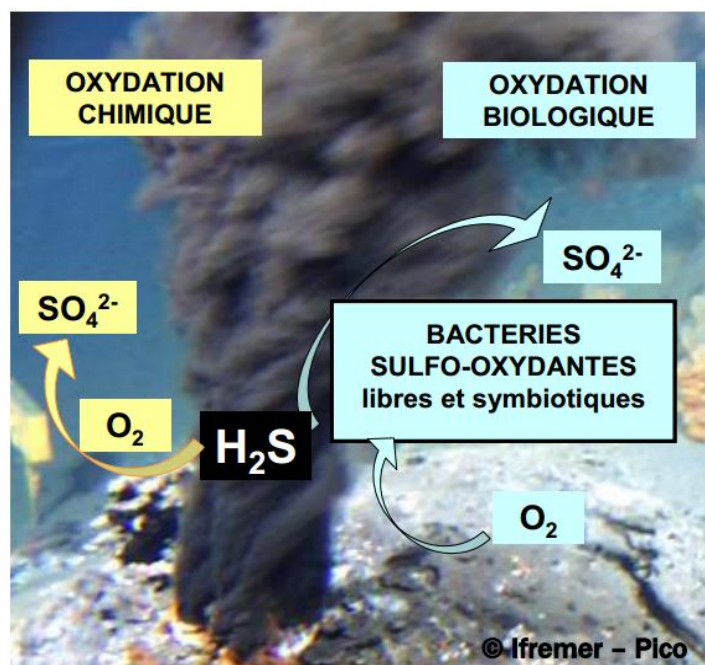


Figure 4: Schématisation des processus d'oxydation biologique et chimique des sulfures au niveau d'un fumeur noir, (Laurent, 2009).

Ainsi, de nombreuses publications décrivent la présence de mattes de bactéries géantes chimiotrophes de quelques mm d'épaisseur dans ces environnements, notamment des *Beggiatoa* (Weber & Jørgensen, 2002; Crépeau *et al.*, 2011). Prince et collaborateurs, (1988) ont même reporté l'existence inhabituelle de mattes de plus de 25 cm au niveau des sources hydrothermales du bassin de Gaymas. La présence de ces mattes de bactéries joue un rôle important dans ces environnements où en produisant de la matière organique et en détoxifiant le milieu, elles permettent à d'autres organismes de se développer. En effet, lorsqu'elles sont retrouvées sous forme libre, elles peuvent devenir une source de nourriture pour d'autres organismes comme des crustacés (Gebruk *et al.*, 2000), mais peuvent également lorsqu'elles vivent en symbiose dans un organisme, lui conférer des capacités d'adaptation à cet environnement toxique comme cela a été montré au niveau des sources hydrothermales (Felbeck *et al.*, 1981; Crépeau *et al.*, 2011) ou des carcasses de baleines coulées (Deming *et al.*, 1997).

Il existe un grand nombre de bactéries sulfo-oxydantes allant de l'unicellulaire comme les espèces du genre *Thiobacillus*, aux bactéries filamenteuses du genre *Beggiatoa*. Certaines bactéries unicellulaires ont développé des modes de vie très différents allant de la forme libre à la forme symbiotique. Ainsi, de nombreuses

protéobactéries se développent au sein d'autres organismes. Les bactéries sulfo-oxydantes peuvent se trouver sous forme libre dans le milieu, mais on peut également les retrouver sous forme intracellulaire comme au niveau des branchies de Mytilidae des sources hydrothermales (Duperron *et al.*, 2009) ou formant un manteau bactérien sur certains organismes comme le cilié *Zoothamnium niveum* (Maurin *et al.*, 2010). De cette manière, les bactéries permettent à leur hôte d'évoluer dans un milieu hostile, tandis que celui-ci leur procure un abri. En revanche, elles deviennent dépendantes de l'hôte qui doit se situer dans un milieu riche en sulfures. Si l'hôte se déplace dans un milieu qui en est exempt, les bactéries perdent leur source d'énergie et meurent, ou quittent leur hôte.

Tous les organismes capables de chimiosynthèse sont des procaryotes, qui peuvent tirer leur énergie de l'oxydation ou de la réduction de divers composés. Chaque procaryote peut tirer son énergie d'une source qui peut être le sulfure d'hydrogène ou le méthane (Borrel *et al.*, 2011), le dihydrogène (Constant, 2008; Petersen *et al.*, 2011), le nitrate (L'Haridon *et al.*, 2006) ou bien encore l'ammonium (Dodsworth *et al.*, 2011).

Dans le cadre de la sulfo-oxydation, les organismes consomment les sulfures du milieu. Dans l'eau, ceux-ci sont disponibles sous trois états différents, en fonction du pH. On retrouve ainsi, le sulfure d'hydrogène H_2S , l'ion sulfure S^{2-} et l'ion hydrosulfure HS^- .

Les bactéries sulfo-oxydantes récupèrent le soufre présent dans le milieu pour l'oxyder en d'autres formes de composés soufrés jusqu'au sulfates, forme la plus oxydée (Meyer *et al.*, 2007). Ces réactions chimiques sont effectuées grâce à l'oxygène prélevé dans le milieu, ces bactéries sont donc obligatoirement aérobies et doivent ainsi forcément se situer dans l'interface oxique/anoxique où elles ont accès à l'oxygène, mais également aux sulfures, afin de les oxyder avant que l'oxydation naturelle n'ait lieu. Les bactéries peuvent également accumuler du soufre élémentaire S^0 dans les cellules, sous forme de granules qui constituent les réserves de la cellule. Lorsqu'il n'y a plus de soufre dans l'environnement, les bactéries oxydent ces granules en sulfates (Fig. 4). Ces réactions d'oxydation fournissent alors l'énergie nécessaire pour la biosynthèse des molécules carbonées dans le cycle de Calvin Benson ou dans le cycle à rebours des acides carboxyliques.

Trois voies d'oxydation des thiosulfates sont connues au sein des bactéries sulfo-oxydantes (Friedrich *et al.*, 2005). Cependant, pour les bactéries produisant des

granules de soufre, les principales enzymes utilisées pour l'oxydation du soufre dans sont l'APS réductase et l'ATP sulfurylase. Celles-ci sont codées respectivement par les gènes *apr* (Hipp *et al.*, 1997) et *soxB* (Friedrich *et al.*, 2005).

La présence de ces gènes chez un organisme est donc le garant de sa capacité à oxyder le soufre. Cependant, il apparaît que le gène *apr* codant pour l'APS réductase est aussi présent chez les bactéries sulfato-réductrices, (Meyer & Kuever, 2008 ; Basen *et al.*, 2011) le gène *sox* deviendrait alors le meilleur marqueur des bactéries sulfoxydantes, puisqu'il est ubiquiste pour celles-ci (Meyer *et al.*, 2007).

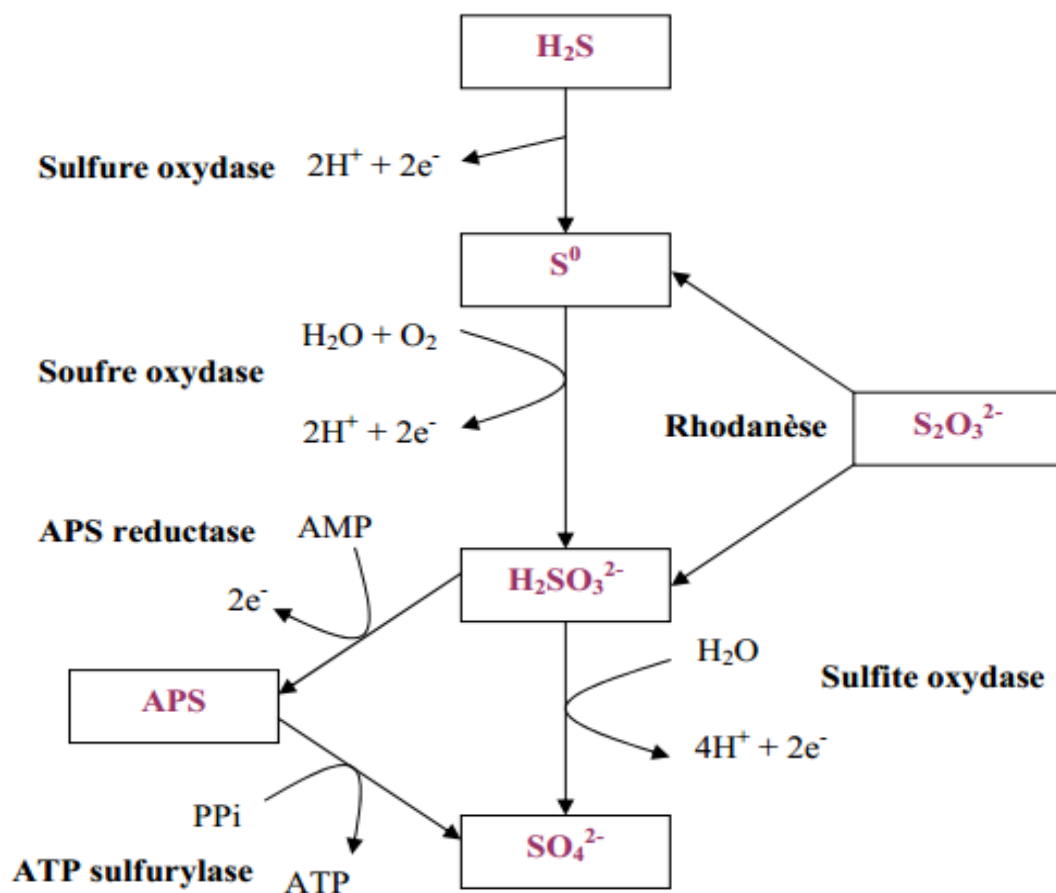


Figure 5: Réaction d'oxydation du soufre (Maurin 2009).

Le sulfure d'hydrogène est connu pour être un élément toxique pour les organismes aérobies. En raison de son pouvoir réducteur et lipophile, il traverse aisément les membranes lipidiques et peut facilement se lier aux composants cellulaires. Il possède la capacité de se lier à l'hémoglobine, formant ainsi de la

INTRODUCTION

sulfhémoglobine, diminuant ainsi son affinité avec l'oxygène (Julian & Dalia, 1998). A très fortes concentration, les hémoglobines sont rendues non fonctionnelles et n'assurent plus le transport de l'oxygène. De plus, c'est un perturbateur de la respiration cellulaire. Il a la capacité d'inhiber la cytochrome c oxydase, dernier élément de la chaîne de transport mitochondriale empêchant la formation d'ATP. Toutefois, ces effets sont réversibles (Reiffenstein *et al.*, 1992).

Pour les organismes vivant à proximité des sources de sulfures, il est donc nécessaire de s'adapter afin de résister à leur toxicité. Certains animaux, plutôt que de se déplacer, ont mis en place des solutions annexes, comme des métabolismes anaérobies, où des symbioses avec des organismes sulfo-oxydants. Chez certains invertébrés, une autre voie possible serait l'excrétion du sulfure d'hydrogène par les organes néphridiens qui serait métabolisé et éliminé sous forme d'un autre composé sulfuré, ou la présence dans le voisinage d'espèces assurant la détoxification du milieu (Grieshaber & Völke, 1998).

Les mattes de bactéries sulfo oxydantes sont parmi les plus répandues dans la nature. Elles comprennent principalement deux genres de bactéries, les *Thioploca* et les *Beggiatoa*, mais on peut aussi y retrouver des bactéries du genre *Thiothrix* et *Thiomargarita* (Girnth *et al.*, 2011), ainsi que des ϵ -protéobactéries (Moussard *et al.*, 2006). Ces bactéries, bien que pouvant vivre isolées, sont surtout connues pour se développer sous forme de mattes blanches sur des sédiments sulfidiques ou des débris organiques en décomposition (Jørgensen, 1977). Leur présence est connue dans divers milieux benthiques, incluant les eaux profondes et les sources hydrothermales (Schauer *et al.*, 2011). Cependant, il apparaît que ces bactéries se retrouveraient en majorité dissimulées dans les quelques mm à cm de la zone suboxique des sédiments côtiers, où l'on ne détecte ni oxygène, si sulfures (Jørgensen *et al.*, 2010).

Ces bactéries chimiotrophes sulfo-oxydantes sont parmi les plus grandes et les plus remarquables dans la nature (Schulz *et al.*, 1996), la première, *Beggiatoa alba* ayant été découverte il y a près de 200 ans par Vaucher qui l'a dénommée « Oscillatoire » en raison de sa ressemblance avec les cyanobactéries du genre *Oscillatoria*.

INTRODUCTION

Les deux genres majoritaires de bactéries thiotrophes peuvent être distingués l'un de l'autre par le fait que les filaments de *Thioploca* forment des paquets entourés d'une membrane de polysaccharides alors que les *Beggiatoa* se retrouvent sous forme de filaments individuels (Fig. 6).

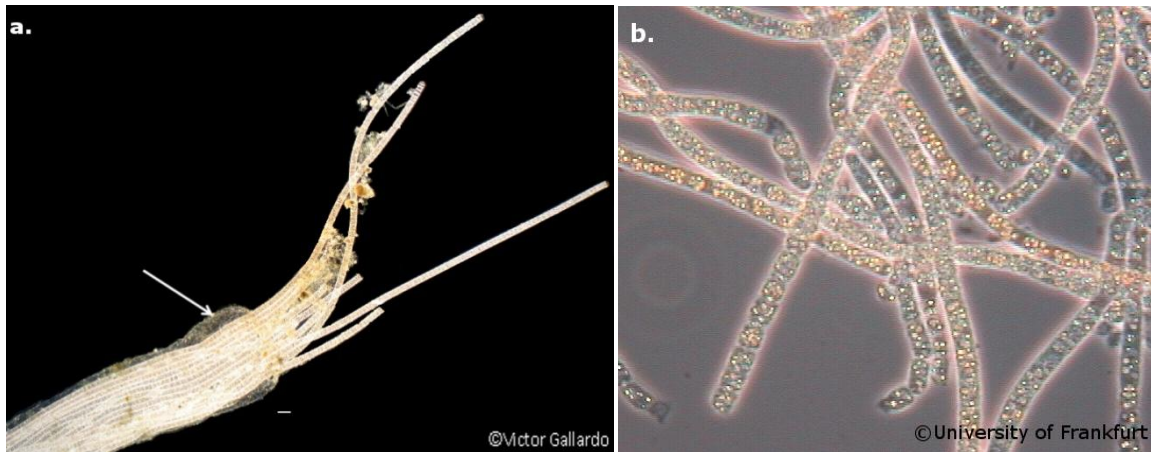


Figure 6: Filaments de *Thioploca araucae* (a.) entourés d'une membrane de polysaccharides (flèche blanche). (b.) Filaments de *Beggiatoa alba*.

➤ Les *Thioploca*

Ces bactéries sont présentes en eaux douces comme en eaux salées. Cependant, les *Thioploca* semblent plus liées aux eaux douces à saumâtres. Effectivement, elles ont jusqu'ici été décrites dans différents lacs, comme plusieurs lacs d'Europe centrale (Maier, 1984), le lac Biwa au Japon (Nishino *et al.*, 1998), et dans les eaux froides et saumâtres du Danemark (Høgslund *et al.*, 2010). A ce jour, seules deux espèces marines ont été identifiées sur les côtes du Chili (Høgslund *et al.*, 2009), et une seule espèce a été observée en milieu tropical (Nemoto *et al.*, 2012).

➤ Les *Beggiatoa*

Ces bactéries sont ubiquistes. De nombreuses colonies ont été reportées dans les eaux douces (Stepanova *et al.*, 2002; Muntyan *et al.*, 2005). Des colonies sont également aussi présentes au niveau des sources hydrothermales (Schauer *et al.*, 2011) mais également au niveau des bois coulés et des os coulés en milieu profond aussi bien que dans les eaux peu profondes de la mangrove, dans des milieux riches en matière organique en décomposition (Jørgensen, 1977; Deming *et al.*, 1997).

INTRODUCTION

Jusqu'ici, plusieurs types de *Beggiatoa* ont été décrits selon les critères morphologiques qui sont toujours ceux qui priment dans la définition de ces organismes (Salman *et al.*, 2011).

Teske et Nelson ont distingué trois groupes phylogénétiques et phénotypiques au sein du genre *Beggiatoa*.

- Les filaments hétérotrophes d'eau douce sans vacuoles dont le diamètre est inférieur à 4µm
- Les filaments autotrophes marins sans vacuoles dont le diamètre est inférieur à 9µm
- Les grands filaments marins de diamètre compris entre 9 et 200 µm possédant des vacuoles, accumulant les nitrates et autotrophes.

Des études plus récentes reportent l'existence de quelques espèces additionnelles des milieux marins ou hyperhyalins possédant des vacuoles mais présentant un diamètre plutôt fin, de 6 à 20 µm (de Albuquerque *et al.*, 2010). D'autres filaments ont récemment été découverts, et bien que visuellement identiques aux *Beggiatoa*, ceux-ci sont génétiquement isolés et sont à l'origine d'un nouveau genre, *Allobeggiatoa* (Hinck *et al.*, 2011).

Tous ces types de filaments sont morphologiquement comparables. En effet, il s'agit toujours de filaments multicellulaires, contenant des granules de soufre, apparaissant comme blancs sous la lumière incidente. Cette classification est donc aujourd'hui remise en cause notamment parce que certains filaments qui étaient auparavant affiliés aux *Thioploca* sont phylogénétiquement proches des *Beggiatoa* (Salman *et al.*, 2011). La présence de trichomes solitaires ou groupés ne permet donc pas seule de différencier les *Beggiatoa* des *Thioploca*.

Les granules de soufre contenus dans les cellules des *Beggiatoa* sont extra-cytoplasmiques et souvent associés à la membrane externe (Fig. 7). Les inclusions de soufre comportent leur propre enveloppe, et sont contenues dans des invaginations de la membrane cytoplasmique de la cellule, (Strohl *et al.*, 1981) contrairement à ce qui a été décrit pour les bactéries du genre *Thioploca* où les granules sont intra-cytoplasmiques.

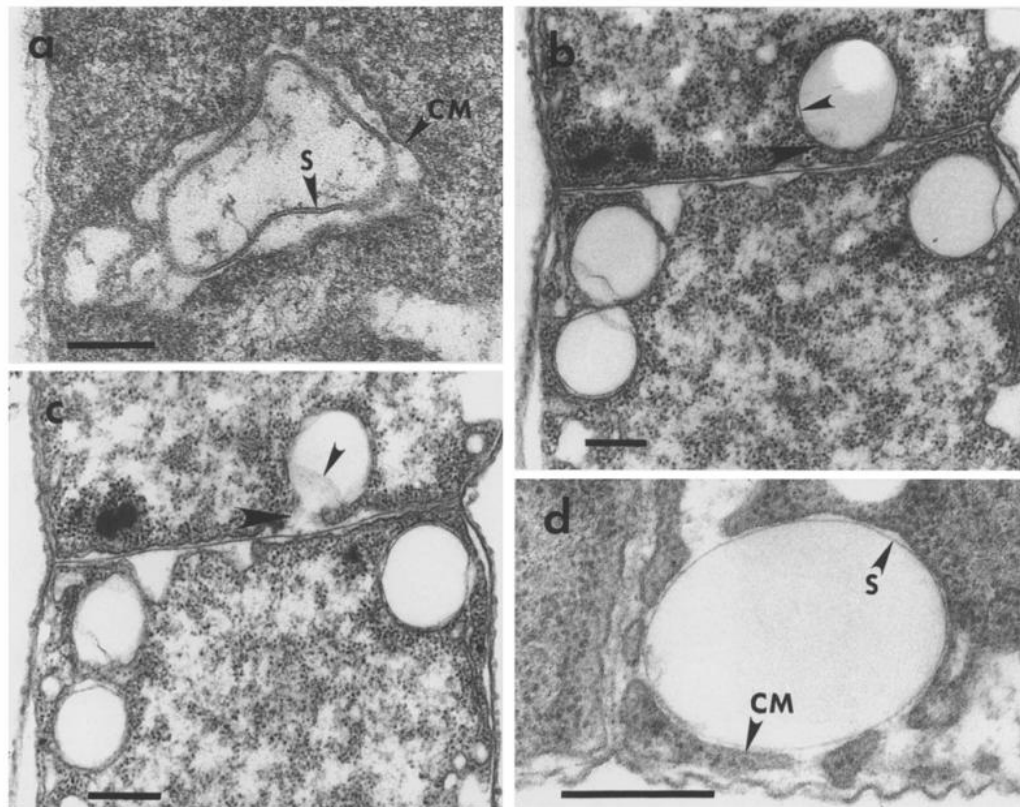


Figure 7: Microphotographies électroniques à transmission des inclusions de quatre différentes souches de *Beggiatoa alba*. (a et d) montrent la structure de l'enveloppe de l'inclusion de soufre entourée de la membrane cytoplasmique. (b et c) Sont des sections sériées des inclusions de soufre dans des régions septales. On note que le plan d'observation affecte l'observation des invaginations de la membrane cytoplasmique (flèches larges) tout comme l'intégrité de l'enveloppe de l'inclusion (petite flèche). Symboles : S= Membrane de l'inclusion de soufre, CM= Membrane cytoplasmique, d'après (Strohl *et al.*, 1981).

Observés au microscope photonique, ces filaments semblent également doués de motilité propre. En fait ces filaments se meuvent par glissement en fabriquant du mucus (Dunker *et al.*, 2010). Ils sont ainsi capables de revenir en arrière lorsqu'ils rencontrent des signaux chimiques défavorables, mais pas de changer de direction (Høgslund *et al.*, 2009). Une étude récente a démontré que les cellules des filaments pouvaient de façon synchrone induire la réversibilité du mouvement. Ceci implique une communication cellule à cellule, par l'intermédiaire de mécanorécepteurs ou par un signal électrochimique, car la communication par diffusion moléculaire serait trop lente pour obtenir une telle rapidité de réponse à un stimulus. De cette manière, le filament peut se déplacer au sein de la matrice afin de trouver le gradient oxygène/soufre le plus favorable à sa croissance (Dunker *et al.*, 2010).

Les *Beggiatoa*, ont d'abord été considérées comme des organismes synthétisant les molécules organiques nécessaires à leur croissance uniquement à partir de composés inorganiques, en utilisant l'énergie produite à partir de l'oxydation de composés réduits de nature minérale, soit des chimioautotrophes stricts. Par la suite des travaux ont montré que ces organismes avaient la capacité de croître en culture avec pour unique source de carbone de l'acétate (Pringsheim & Kowallik, 1964; Pringsheim, 1967).

D'autres types de chimiotrophies ont été découverts par la suite lors de l'exploration de nouveaux milieux. Les suintements froids par exemple, où l'émission des fluides se fait à une température proche de celle de l'eau environnante a permis la découverte d'écosystèmes basés sur la consommation du méthane et des sulfures (Paull *et al.*, 1984). Ici, en plus des nombreuses bactéries sulfo-oxydantes, on retrouve des Archaea méthanotrophes à la base de cet écosystème (Boetius *et al.*, 2000).

Dans la zone tropicale, deux régions côtières retiennent l'attention de la communauté scientifique, quant à la présence d'organismes sulfo-oxydants. Les herbiers de phanérogames marines et la mangrove. Les herbiers sont connus pour héberger des organismes sulfo-oxydants symbiotiques. On y note ainsi la présence de bivalves Lucinidae hébergeant des γ -protéobactéries endosymbiotiques (Durand *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 1996), mais aussi de nématodes possédant des manteaux de bactéries sulfo-oxydantes (Ott *et al.*, 2004; Maurin, 2009). De nombreuses symbioses ont également été observées dans les mangroves de bord de mer, lieu de notre étude. Laurent et ses collaborateurs ont ainsi mis en évidence en 2009 que toute une faune de microorganismes eucaryotes vivant en symbiose avec des γ -protéobactéries sulfo-oxydantes était associée aux écosystèmes de type bois coulés ou « wood falls » (Laurent *et al.*, 2009).

4. Les cyanobactéries

Il existe un grand nombre d'espèces de cyanobactéries, mais aussi un grand nombre de morphologies différentes, allant de l'unicellulaire planctonique comme *Synechococcus sp.*, à des filaments pouvant être composés de centaines de cellules comme *Lyngbya majuscula* (Castenholz & Waterbury, 1989).

INTRODUCTION

Ce sont ces cyanobactéries filamenteuses qui peuvent être à l'origine des mattes de cyanobactéries (Stal, 1995). Tout comme les mattes de bactéries sulfo-oxydantes, les mattes de cyanobactéries sont ubiquistes. On peut les retrouver dans tous les milieux aquatiques, notamment les milieux extrêmes, comme les sources hydrothermales peu profondes (Garcia-Pichel & Castenholz, 1990), les zones intertidales (Fenchel, 1998), les étendues d'eau douce (Jungblut *et al.*, 2012). Elles se développent sur tous types de sédiments mais sont plus couramment retrouvées dans des milieux riches en matière organique qui, lors de sa décomposition produit du sulfure d'hydrogène (Meyer-Reil & Köster, 2000).

Les filaments cyanobactériens, autrement appelés trichomes, sont multicellulaires et peuvent sécréter une enveloppe externe composée de polysaccharides qui leur confère une grande résistance à la dessiccation (Knowles & Castenholz, 2008) et aux rayons ultraviolets (Dillon & Castenholz, 1999).

Certains filaments sont dotés de cellules différenciées, il en existe deux types chez les cyanobactéries (Stal, 1995).

- Les akinètes sont des sortes de spores pouvant germer lorsque les conditions deviennent favorables à la croissance du filament.
- Les hétérocystes sont des cellules dotées d'une membrane externe plus épaisse et spécialisées dans la fixation de l'azote (Fig. 8) qui, contrairement aux autres cellules du filament qui peuvent vivre sous forme libre, ne peuvent survivre seuls. Toutefois, il est important de noter que les cyanobactéries ne possédant pas d'hétérocystes, sont aussi capables de fixer l'azote. En revanche, cette fixation a lieu pendant la nuit et s'avère moins efficace que la fixation d'azote par les cellules spécialisées (Stal, 1995). Une nouvelle espèce de cyanobactérie marine a été découverte depuis peu, nommée UCYN-A. Cet organisme unicellulaire et ne contenant donc pas d'hétérocystes, est capable de fixer l'azote de jour, ce qui semble incompatible avec la photosynthèse. En effet, l'oxygène inhibant la nitrogénase, enzyme nécessaire à la fixation de l'azote, celle-ci ne peut avoir lieu lors de la photosynthèse. Cependant, il est apparu que UCYN-A était incapable d'effectuer la photosynthèse productrice d'oxygène, comme les autres cyanobactéries, ce qui permettrait le fonctionnement des enzymes responsables de la fixation d'azote (Zher *et al.*, 2007).



Figure 8: Microphotographie photonique d'un trichome de *Cyindrospermum* sp. présentant un hétérocyste (H) et un akinète (A) (Gx40).

Seule une classe de cyanobactéries, les Nostocales sont pourvues de ces cellules différenciées. Cependant, les filaments de cyanobactéries marines possédant des hétérocystes sont rares. En effet, si la raison de ce phénomène est encore inconnue, il a au début été avancé que ce serait en raison de la faible interaction entre les hétérocystes et les autres cellules du filament, qui ne résisterait pas aux turbulences plus fréquentes dans ces écosystèmes (Howarth *et al.*, 1993). Toutefois, cette information semble peu crédible en raison des fortes turbulences pouvant être rencontrées dans les cours d'eau. Plus récemment, la modélisation de la solubilité de l'oxygène et de ses coefficients de diffusion dans les eaux océaniques chaudes ont indiqué que la fixation d'azote atmosphérique par des hétérocystes pourrait être limitée par les concentrations d'oxygène et les flux cellulaires (Staal *et al.*, 2007 ; Stal, 2009). Ainsi, sous les tropiques, les cyanobactéries formant des hétérocystes ne seraient pas compétitives face aux formes non hétérocystées qui forment traditionnellement des efflorescences dans ces régions.

De plus, il semblerait que les forts taux de sulfates dans les environnements marins excluent les organismes fixateurs d'azote. Les sulfates présents dans le milieu pourraient entrer ainsi en compétition avec le molybdate, un cofacteur indispensable

à l'action de la nitrogénase, inhibant la réaction (Cole *et al.*, 1993). Toutefois, peu de preuves sont disponibles pour étayer cette hypothèse (Stal, 1995).

Les cyanobactéries appartenant à l'ordre des Oscillatoriales sont toutes dépourvues de cellules différenciées. Ces organismes sont caractérisés par des trichomes solitaires, non ramifiés, pouvant posséder une membrane de polysaccharides (Komárek & Komárková, 2004). Cet ordre est en perpétuelle évolution en raison des nouvelles techniques d'étude des organismes, qui prennent désormais en compte l'ultra-structure, l'écologie, mais aussi les outils de phylogénie, par l'intermédiaire du séquençage du gène codant pour l'ADN ribosomal 16S, en plus des outils phénotypiques. Ainsi, de nombreuses espèces ayant été préalablement placées sous le genre *Oscillatoria* se retrouvent aujourd'hui placées dans de nouveaux genres (Suda *et al.*, 2002; Palinska & Marquardt, 2008 ; Do Carmo Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2009).

Aujourd'hui, selon algeabase® l'ordre des Oscillatoriales comprend les familles Ammatoideadeae, Borziaceae, Gomontiellaceae, Oscillatoriaceae, Oscillatoriales incertae sedis, Phormidiaceae et Schizotrichaceae.

Ces cyanobactéries, comme beaucoup de procaryotes, sont autotrophes, elles possèdent différentes manières de produire la matière organique nécessaire à leur croissance, en fonction de leur environnement. Les cyanobactéries peuvent en effet pratiquer la photosynthèse, oxygénique et anoxygénique, mais sont aussi capables de respiration aérobie et de fermentation lorsque la lumière se fait trop faible dans le milieu.

3.1. La photosynthèse oxygénique

Le terme bactéries photosynthétiques est souvent employé pour décrire tous les organismes utilisant la lumière et un réducteur chimique autre que l'eau. Cependant, bien qu'une cyanobactérie (UCYN-A) ait été identifiée comme ne possédant qu'un seul photosystème (Zher *et al.*, 2008), les cyanobactéries sont pour majorité, les seuls procaryotes capables de photosynthèse à l'aide de deux photosystèmes, tout comme les eucaryotes producteurs d'oxygène (Ho & Krogmann, 1982). Leur grande résistance, leur colonisation de nombreux milieux sur Terre ainsi que leur

INTRODUCTION

ancienneté, auraient permis à ces organismes d'être responsables de la présence d'oxygène sur Terre (Schopf & Walter, 1982).

La photosynthèse oxygénique est la production de matière organique à partir de l'énergie générée par le transport d'électrons ayant été excités par la lumière, de dioxyde de carbone comme source de carbone, et avec pour dernier accepteur d'électrons l'eau.

Le photosystème II (PS II) situé sur les membranes photosynthétiques des cyanobactéries est activé par des photons ayant une longueur d'onde voisine de 680nm. Un électron de ce pigment passe à l'état excité. Cet électron se transmet à la phéophytine, puis la plastoquinone, tout en libérant des protons tandis que les électrons générés par la photolyse de l'eau, vont permettre au PS II de revenir à son état initial, tout en produisant de l'oxygène (Fig 10).

La plastoquinone va se diriger vers le complexe du cytochrome *b/f* qui va libérer de l'énergie sous forme d'ATP en rééquilibrant le gradient de protons et d'électrons de chaque côté de la membrane photosynthétique.

La plastocyanine récupère un électron du cytochrome *b* et l'apporte au photosystème I (PS I) qui est lui aussi excité par la lumière, mais à une longueur d'onde de 700 nm. L'électron va être cédé à plusieurs molécules, jusqu'à la ferrédoxine. Cette molécule est composée de 2 atomes de fer et de 2 atomes de soufre et peut fournir des électrons à plusieurs autres métabolismes, comme la fixation de l'azote où la photosynthèse anoxygénique. Dans le cas de la photosynthèse, la ferrédoxine donne son électron à une molécule appelée ferrédoxine NADP réductase. Cette molécule générera du $\text{NADPH} + \text{H}^+$ qui pourra fournir de l'énergie pour le cycle de Calvin Benson (Fig. 10).

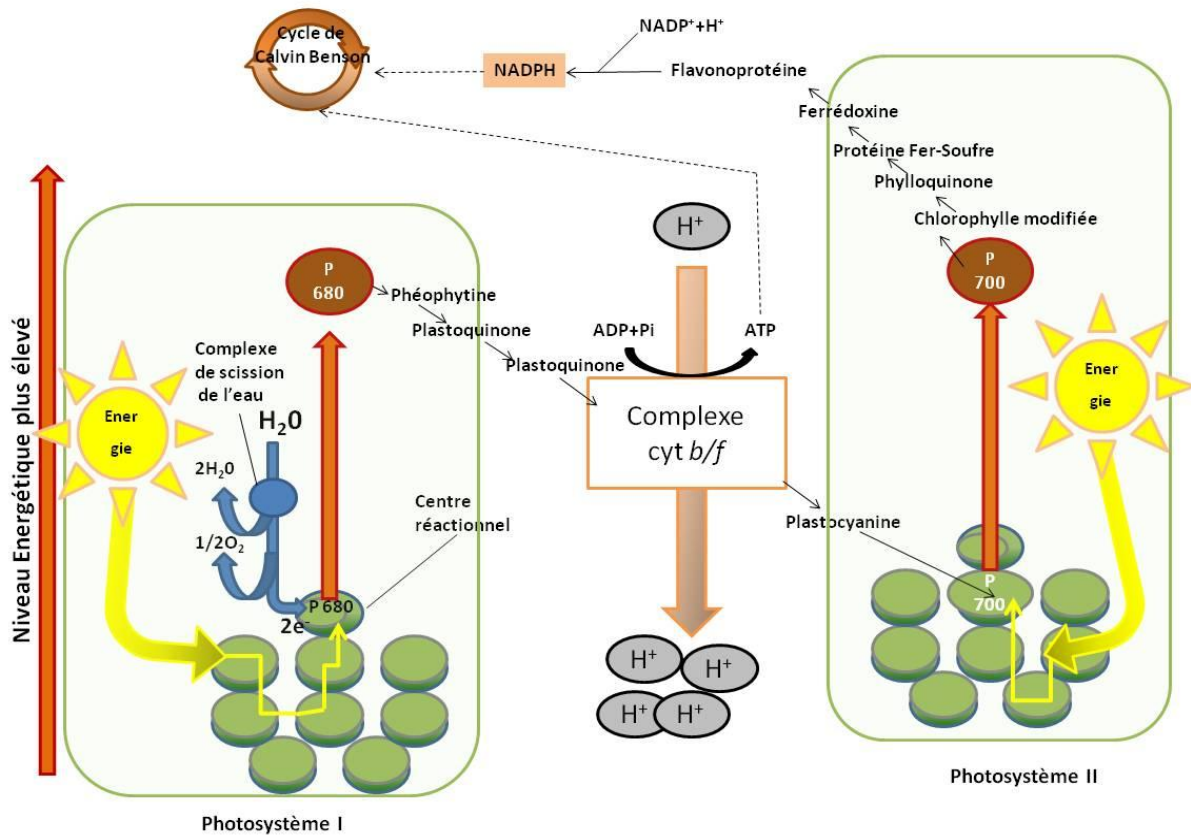


Figure 9: Schéma de la photosynthèse oxygénique (d'après Raven *et al.*, 2000)

Deux traits distinguent l'appareil photosynthétique des bactéries de celui des chloroplastes de la majorité des plantes eucaryotes (Ho & Krogmann, 1982).

- Les cyanobactéries contiennent des phicobiliprotéines organisées en phicobilisomes à la surface de leur membrane photosynthétique. Cette caractéristique est partagée avec les algues rouges, mais a été remplacée par la chlorophylle-b chez les autres eucaryotes photosynthétiques.
- Le second trait est l'organisation des membranes photosynthétiques. Chez les cyanobactéries, les membranes sont dans tout le cytoplasme (Fig. 10), tandis que chez les eucaryotes, les membranes photosynthétiques sont empaquetées dans le chloroplaste, un organe cellulaire possédant sa propre membrane, et souvent organisées en grana.

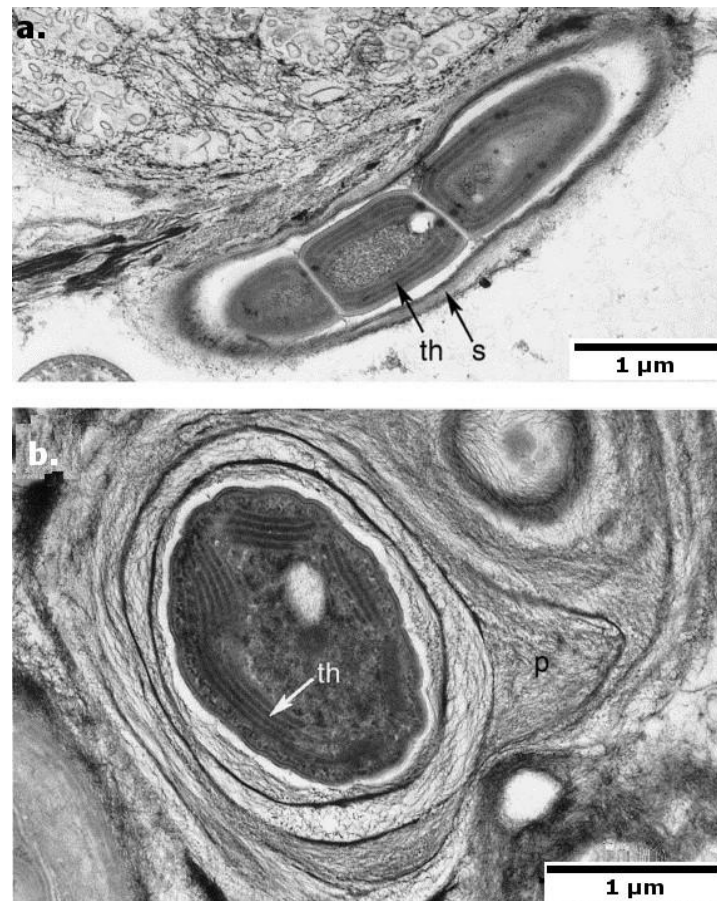


Figure 10: Microphotographies de microscopie électronique à transmission de cyanobactéries filamenteuse (a.) et coccoïde (b.) provenant de la surface d'une matrice microbienne. Les structures analogues aux thylacoïdes y sont très développées (th). La cyanobactérie filamenteuse (a.) montre une gaine peu épaisse (s), tandis que la cyanobactérie coccoïde (b.) possède une épaisse gaine (p). (Léveillé *et al.*, 2000).

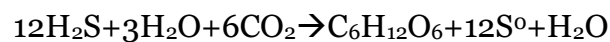
3.2. La photosynthèse anoxygénique

Certaines cyanobactéries peuvent également effectuer la photosynthèse anoxygénique. Ce type de photosynthèse est typique des bactéries, qui nécessitent généralement un environnement anoxique, afin d'effectuer la synthèse de leur pigments photosynthétique, les bactériophylles (Imhoff, 1992). Il existe cependant des bactéries aérobies capables d'effectuer une photosynthèse non productrice d'oxygène à partir de la bactériochlorophylle a (Yurkov & Beatty, 1998). Toutes les bactéries capables de photosynthèse anoxygénique on en revanche pour point commun de ne pas utiliser l'eau comme donneur d'électron terminal, mais les ions sulfures ou d'autres molécules organiques (Imhoff, 1992). Ces cyanobactéries capables de ce type de photosynthèse sont considérées comme un chaînon entre les

INTRODUCTION

algues eucaryotes et les bactéries capables de photosynthèse anoxygénique (Padan & Cohen, 1982).

Ce type de photosynthèse se produit chez les cyanobactéries quand le photosystème II est inhibé, ou quand il ne peut être activé, lorsque la longueur d'onde lumineuse est inférieure à 700 nm. Ce mécanisme de photosynthèse doit être induit, ce qui peut prendre 2 à 3 heures (Padan & Cohen, 1982). Dans ce cas, la photosynthèse se produit uniquement dans le photosystème I et le sulfure d'hydrogène est utilisé comme donneur d'électron. Il est oxydé en sulfure élémentaire qui est expulsé des cellules sous forme de granules selon l'équation (Stal, 1995) :



La majorité des cyanobactéries oxydent le sulfure d'hydrogène sous forme de soufre élémentaire. Cependant, *Microcoleus chthonoplastes* est connue pour former du thiosulfate à la place du soufre élémentaire (de Wit & van Gemerden, 1987). Cette oxydation en thiosulfate permet de tirer plus d'énergie que l'oxydation en sulfure élémentaire. Toutefois, aucune cyanobactérie décrite à ce jour ne peut oxyder complètement le sulfure d'hydrogène en sulfate, comme le font beaucoup de bactéries phototrophes anoxygéniques.

Cependant, l'oxydation en soufre élémentaire permet la consommation plus rapide des sulfures d'hydrogène toxiques pour les cellules. En effet, les cyanobactéries sont elles mêmes sensibles aux effets du sulfure d'hydrogène, qui peut être à l'origine de l'inhibition irréversible du photosystème II, à partir de concentrations allant de 0,1 à 0,2mM. Cette inhibition peut être due à la fixation de sulfure d'hydrogène sur le site donneur du PSII, ce qui bloque le transport d'électrons qui lui est associé (Garcia-Pichel & Castenholz, 1990).

Selon Cohen et collaborateurs (1986), Les cyanobactéries peuvent être divisées en 4 groupes en fonction de leur comportement face au sulfure d'hydrogène :

- Groupe 1 : Ce groupe est composé des organismes pour lesquels le sulfure d'hydrogène est extrêmement toxique, même à des concentrations inférieures à 0,1 mM. Ces organismes voient leur PS II inhibé irréversiblement. Ces cyanobactéries sont plus couramment retrouvées

dans des environnements où les taux de sulfures restent faibles, comme dans la plupart des lacs d'eau douce.

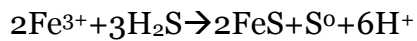
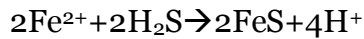
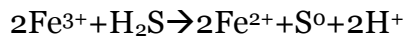
- Groupe 2 : Ce groupe est composé d'organismes montrant une stimulation de la photosynthèse oxygénique en présence de concentrations en sulfures inférieures à 1 mM, mais ne sont pas capables de photosynthèse anoxygénique. Ces organismes sont retrouvés dans des mattes où les sulfures s'accumulent à des intervalles réguliers.
- Groupe 3 : Ces cyanobactéries peuvent être rencontrées dans les mêmes environnements que celles du groupe 2. Contrairement aux organismes du groupe 2, ces cyanobactéries sont capables d'effectuer de manière simultanée les deux types de photosynthèse.
- Groupe 4 : Les organismes composant ce groupe sont des cyanobactéries inhibées par de faibles concentrations en sulfure ($<0,1$ mM), toutefois, elles sont capables de changer de métabolisme et passent en photosynthèse anoxygénique.

Cependant, le fait que les cyanobactéries soient capables d'effectuer la photosynthèse oxygénique ne signifie pas qu'elles peuvent croître sous de telles conditions. Chez certaines espèces comme *Aphanothece halophytica*, la désaturation des acides gras est dépendante de l'oxygène, alors que chez d'autres en revanche comme *Oscillatoria limnetica*, la croissance dans des conditions anoxygènes se déroule normalement (Padan & Cohen, 1982).

3.3. Oxydation des sulfures

Bien que ce phénomène soit rare parmi les cyanobactéries, contrairement à d'autres bactéries comme les bactéries sulfo-oxydantes, Stal (1995) a reporté l'existence d'une cyanobactérie capable de sulfo-oxydation. Celle-ci (*Oscillatoria limosa*), afin de lutter contre la toxicité des sulfures dans le milieu, réagit de deux façons différentes.

Tout d'abord, en faible présence de sulfure d'hydrogène, la photosynthèse est stimulée, de manière à augmenter l'oxydation naturelle des sulfures par l'oxygène produit par les cyanobactéries. Mais, *O. limosa* est également capable d'oxyder les sulfures. Ce mécanisme diffère cependant de celui observé chez les bactéries sulfo-oxydantes. Ici, le sulfure d'hydrogène réagirait chimiquement avec les ions ferriques selon les équations suivantes :



Une partie des sulfures précipiterait sous forme de FeS qui chez *O. limosa* est fréquemment lié au trichome (Stal, 1995).

La mise en évidence de ce mécanisme met en lumière que les interactions des cyanobactéries avec les sulfures ne sont pas uniquement limitées à la photosynthèse anoxygénique, et qu'il pourrait exister de nombreux mécanismes capables d'expliquer leur tolérance aux milieux sulfidiques.

3.4. La fermentation

Durant le jour, les cyanobactéries mobilisent une partie du CO₂ assimilé pour former du glycogène, forme de réserve de leur énergie. Celui-ci sera ensuite dégradé par la voie des pentoses phosphates (Smith, 1982). Ce métabolisme conduit à la complète oxydation du glycogène en CO₂ selon la respiration aérobie. Cependant, la nuit, les réserves en oxygène sont vite consommées. En effet, en raison de la consommation d'oxygène due aux organismes chimiotrophes sulfo-oxydants associés à la matte et à la respiration, la réserve d'oxygène est épuisée en quelques minutes, pouvant rendre toute la colonne d'eau anoxique (Revsbech *et al.*, 1983). La respiration ne peut donc avoir lieu que pendant quelques minutes, et certaines cyanobactéries sont capables de changer de métabolisme afin de produire leur énergie et effectuent la fermentation, (Heyer & Krumbein, 1991).

Le glycogène produit pendant le jour va alors être hydrolysé en lactate, éthanol ou acétate, en fonction des espèces (Heyer & Krumbein, 1991; Stal & Moezelaar, 1997).

3.5. Mobilité des cyanobactéries

Les cyanobactéries dépendent de la lumière comme source d'énergie. Les mattes de cyanobactéries se trouvant généralement dans des zones de sédimentation importante, la mobilité des organismes est importante pour assurer leur survie. De

INTRODUCTION

cette manière les cyanobactéries sont à même de se protéger d'une forte intensité lumineuse et de réguler les gradients des composées chimiques dans lesquels elles évoluent. Deux hypothèses prévalent quant à la façon dont se déplacent les cyanobactéries (Stal, 1995) : (i) comme les *Beggiatoa*, elles se mouvraient par glissement en produisant un mucus, (ii) le mouvement serait produit par des fibres contractiles.

Les études menées depuis ont montré qu'il est probable que le mouvement soit dû à ces deux phénomènes (McBride, 2001).

Toutefois, en plus des déplacements par glissement, l'hypothèse a été émise que certaines cyanobactéries pouvaient évoluer dans la colonne d'eau grâce à la régulation de la quantité de gaz contenue dans leurs cellules (Staley, 1980; Ramsay *et al.*, 2011). De plus, lors des phases de photosynthèse, la quantité de carbohydrates produits alourdirait le filament qui descendrait ainsi dans la colonne d'eau (Ibelings *et al.*, 1991 ; Xiao *et al.*, 2012).

Dans la famille des Phormidiaceae, chez les genres *Planktothrix* et *Planktothricoides*, qui sont planctoniques, le gaz est contenu dans des structures cylindriques, les vésicules à gaz qui occupent une grande partie de la cellule (Fig. 11).

Cependant, il est important de noter que seules certaines cyanobactéries possèdent des vésicules à gaz.

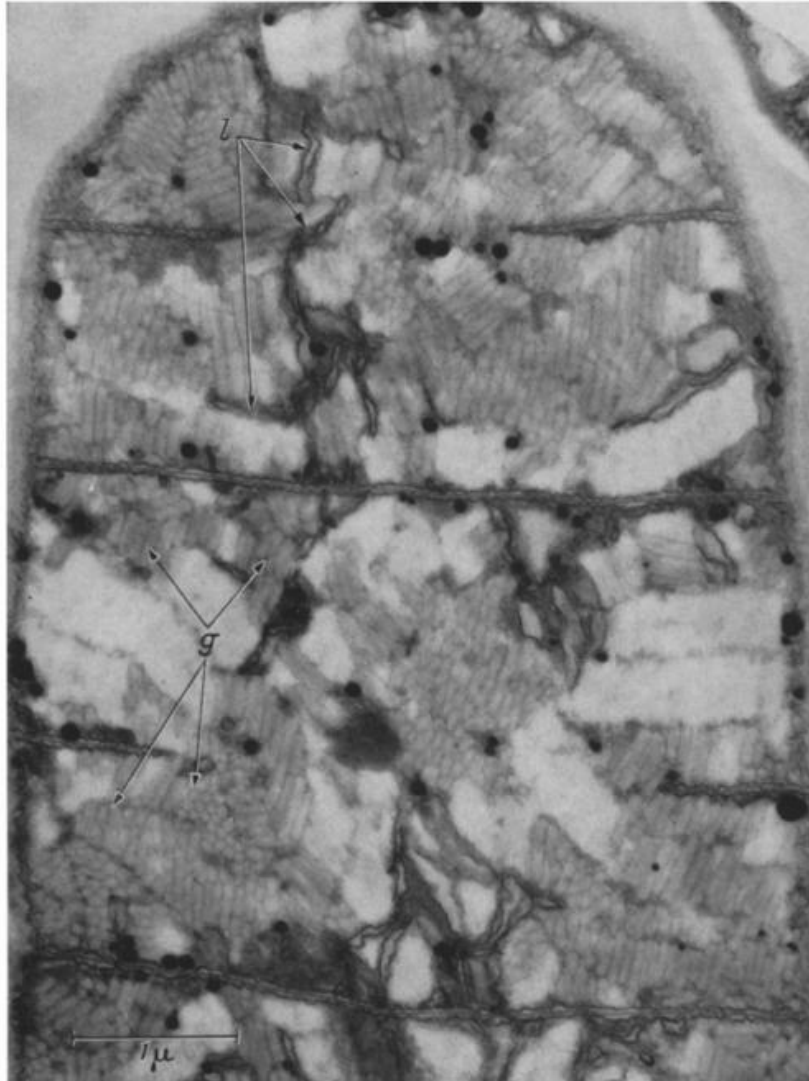


Figure 11: Microphotographie d'une coupe longitudinale d'un trichome de *Planktothrix agardhii* montrant une distribution des vésicules à gaz (g) et des lamelles photosynthétiques, (l) (Smith & Peat, 1967).

5. Toxines cyanobactériennes

Les cyanobactéries sont connues pour sécréter des toxines responsables de plusieurs pathologies, voire mortelles pour les vertébrés (Carmichael *et al.*, 2001 ; Guger *et al.*, 2005 ; Faassen *et al.*, 2012; Rzymiski & Poniedzalek, 2012). La plupart de ces cyanobactéries forment des efflorescences, appelées « fleurs d'eau » en surface d'étendues d'eau douce (Fig. 12). Cependant, les cyanobactéries benthiques comme *Oscillatoria limosa* ou *Lyngbya wollei* (Sivonen & Jones, 1999) sécrètent elles aussi des toxines.



Figure 12: Efflorescence de cyanobactéries sur une étendue d'eau douce. La couleur bleue est due aux cyanobactéries mortes ayant libéré leurs pigments.

Les toxines cyanobactériennes sont classées en plusieurs groupes, en fonction de leur action, mais aussi de leur composition. Chaque espèce peut sécréter une ou plusieurs cyanotoxines différentes (Feuillade, 1992; Sivonen & Jones, 1999). On distingue :

- Les hépatotoxines, qui sont pour la plupart des peptides cycliques. La plupart des proliférations toxiques d'eau douce produisent des toxines provenant de la famille des microcystines, mais aussi des nodularines, des cylindrospermines et des saxitoxines.

Les microcystines, provenant majoritairement de cyanobactéries planctoniques ont été caractérisées à partir des genres *Anabaena*, *Anabaenopsis*, *Microcystis*, *Nostoc* et *Planktothrix*, tandis que les nodularines ont été caractérisées à partir de *Nodularia spumigena* (Sivonen & Jones, 1999). Les cylindrospermines sont des alcaloïdes cytotoxiques produits par *Cylindrospermopsis raciborskii*, mais aussi par des cyanobactéries du genre *Aphanizomenon* et *Anabaena* (Preußel *et al.*, 2006).

Ces toxines sont les plus fréquentes et les plus anciennement connues. Elles sont à l'origine d'hémorragies hépatiques et promotrices de tumeurs (Feuillade, 1992; Carmichael *et al.*, 2001).

INTRODUCTION

- Les neurotoxines d'eau douce sont des alcaloïdes comme les anatoxines, les homoanatoxines et les saxitoxines (Sivonen & Jones, 1999) présentes dans les eaux douces majoritairement. Les neurotoxines produites par les cyanobactéries marines sont des lipopeptides sont l'antillatoxine, la kalkitoxine et la jamaïcamide (Aráoz *et al.*, 2010).

Toutes ces toxines sont très puissantes et provoquent la mort de nombreux animaux par paralysie du système respiratoire (Mahmood & Carmichael, 1987; Feuillard, 1992; Sivonen & Jones, 1999; Briand *et al.* 2003 ; Ballot *et al.*, 2004). Elles sont produites par les cyanobactéries de la famille des *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Lyngbya*, *Oscillatoria* et *Planktothrix* (Aráoz *et al.*, 2010).

Les trois cyanotoxines marines décrites à ce jour sont des lipopeptides cytotoxiques et ichtyotoxique tels que l'antillatoxine, la kalkitoxine et la jamaïcamide. Ces trois neurotoxines sont toutes produites par *Lyngbya majuscula*, une cyanobactérie retrouvée dans les tropiques mais également en zones tempérées (Aráoz *et al.*, 2010).

- Les dermatotoxines qui peuvent être des alcaloïdes comme les lyngbyatoxines, mais aussi des lipopolysaccharides ou des bislactones phénoliques comme les aplysiatoxines (AT) et les debromoaplysiatoxines (DAT).

Ces toxines sont produites par les cyanobactéries du genre *Lyngbya*, *Planktothrix* et *Schizothrix*. Elles sont responsables de dermatites, d'irritations oculaires, cutanées et semblent être des activateurs de tumeurs de la peau chez l'homme (Sivonen & Jones, 1999 ; Rzymiski & Poniedziałek, 2012).

Les cyanotoxines sont nombreuses et possèdent une importance pharmaceutique non négligeable en raison de leurs propriétés anti-tumorales (Nagarajan *et al.*, 2012).

Si la responsabilité de l'eutrophisation dans l'augmentation de ces apparitions massives de cyanobactéries toxiques dans les lacs et les rivières est avérée, l'anthropisation des zones côtières ne semble pas provoquer les mêmes conséquences en milieu marin, où les marées rouges sont principalement composées de diatomées et de dinoflagellés. De nombreuses études portent sur les fleurs d'eau toxiques des

cyanobactéries d'eau douce alors que peu d'études existent sur les développements de cyanobactéries marines, probablement en raison de leur rareté et de la prévalence des efflorescences de bactéries pourpres et de dinoflagellés (Golubic *et al.*, 2010 ; Nagarajan *et al.*, 2012). Cependant, des preuves ont récemment démontré que des cyanobactéries marines, de la famille des Phormidiaceae benthiques, seraient à l'origine de symptômes comparables à ceux d'une sévère ciguatera (Méjean *et al.*, 2010). Ces cyanobactéries produiraient des toxines de la famille des anatoxines-a et homoanatoxines-a (Méjean *et al.*, 2010). Cette étude est la première mettant en évidence la production de ces toxines par des cyanobactéries marines.

De nombreux tests existent afin de tester la toxicité des métabolites cyanobactériens. Les tests les plus connus sont ceux sur des organismes entiers qui permettent de hiérarchiser la mesure des effets sur différents niveaux d'organisation biologique. Parmi ces tests, celui ayant été la référence jusqu'à ce jour est le test de la souris, mis au point par Gorham dans les années 1950. Des injections intra périnéale sont pratiquées chez la souris et le comportement de la souris est observé en réponse à cette injection. On peut ainsi déterminer les doses létales pour lesquelles 50% ou 100% des souris meurent (DL 50 et DL100). Ce bio-essai reste le plus représentatif afin de déterminer les effets des toxines sur l'homme (Feuillade, 1992). Toutefois, les difficultés de mise en œuvre et le coût de ce bio-essai ont conduit au développement de nouveaux tests. Sur les organismes entiers des tests utilisant des poissons tels que *Danio rerio* (le zebrafish) (Baganz *et al.*, 1998) sont maintenant très utilisés, mais le test le plus commun est celui d'*Artemia salina*, considéré comme étant un bon essai préliminaire pour attester de la toxicité de nombreux composés toxiques. Cependant, il doit être complété lorsqu'il s'agit de caractériser l'activité biologique des cyanobactéries, en utilisant des embryons d'invertébrés, ou des lignées cellulaires (Nunes *et al.*, 2006). Ainsi, en raison de leur faible coût et de leur grande quantité, les embryons de poissons comme *Danio rerio* (le poisson zebra) (Best *et al.*, 2002) et *Oryzias latipes* (le médaka) (Jacquet *et al.*, 2004 ; Huynh-Delerme *et al.*, 2005) sont très utilisés dans les tests sur les cyanotoxines . Toutefois, Hisem et collaborateurs (2011) ont ainsi démontré que ces bio-essais s'avéraient moins puissants que les tests sur lignées cellulaires lorsqu'il était question d'attester de la toxicité des toxines cyanobactériennes sur les mammifères. En effet, les tests cellulaires sont très

INTRODUCTION

sensibles et très spécifiques et sont devenus indispensables notamment dans la recherche de molécules d'intérêt pharmaceutique (Nagarajan, et al. 2011).

Toutefois, il est important de noter que toutes les souches d'une même espèce ne sont pas forcément productrices de toxines, comme cela a été démontré chez *Planktothrix argardhii* (Briand *et al.*, 2008), on ne peut donc extrapoler les résultats des bio essais à toutes les souches de cyanobactéries observées et encore moins à toutes les efflorescences rencontrées. D'autres outils moléculaires, capables de séparer les génotypes toxiques des génotypes non toxiques ont donc été développés pour attester de la toxicité potentielle d'une efflorescence (Humbert *et al.*, 2010), sans pour autant pouvoir évaluer les risques associés. En effet, la présence de gènes capables de produire une toxine ne signifie pas toujours que la protéine correspondante soit sécrétée. Dans ce sens, plusieurs techniques ont été développées pour identifier les toxines sécrétées comme les méthodes basées sur la PCR (PCR quantitative (Rueckert *et al.*, 2007 ; Rueckert & Cary, 2009) et RT-PCR (Asai *et al.*, 2002)).

D'autres méthodes permettant de quantifier les toxines ont également été développées. Ainsi, Triantis et collaborateurs (2010), ont proposé un protocole faisant intervenir un éventail de techniques différentes, de plus en plus précises afin de quantifier la présence de nodularines et de microcystines dans des échantillons d'eau (Fig 13). Ainsi, dans des échantillons d'eau inconnus où les méthodes de détection des microcystines par le test ELISA, la chromatographie liquide à haute performance et les tests de phosphatase alcaline avaient échoué, les tests de spectrométrie de masse se sont avérés positifs et ont permis la détection de la toxine à de très faibles concentrations de l'ordre de 5 à 60 ng/L, alors que les autres techniques permettent une détection à partir de 100 ng/L (Triantis *et al.*, 2010).

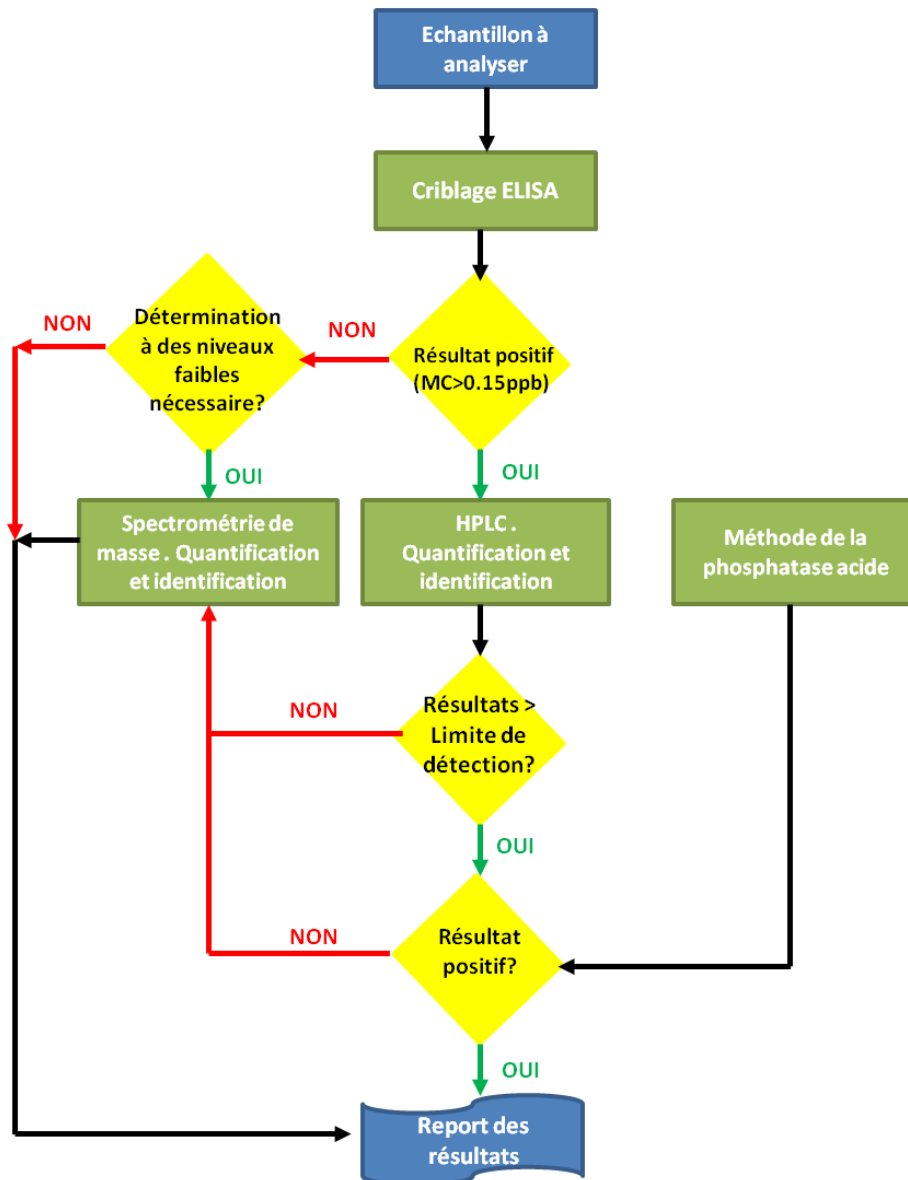


Figure 13: Protocole analytique pour la détection des Microcystines et des Nodularines en surface et dans des eaux potables. D'après Triantis *et al.* (2010).

Toutefois, si ces outils permettent d'identifier et de quantifier la toxine, ils ne donnent aucune information sur sa toxicité sur les organismes vivants. L'utilisation des deux modes d'analyse semble donc nécessaire afin de bien évaluer la toxicité des cyanobactéries.

Plusieurs essences d'arbres composent la mangrove, cependant, la bordure maritime est généralement composée dans le Pacifique, d'espèces du genre *Avicennia* tandis que dans la Caraïbe, cet espace est toujours occupé par les espèces du genre *Rizophora* (Robertson & Alongi, 1992).

INTRODUCTION

La chute des feuilles et des branches de ces arbres assure l'apport en matière organique dans le milieu (Lallier-Verges *et al.*, 1998). Ces feuilles jouent un rôle important dans le renouvellement de la matière organique car elles contiennent environ 40% de composants solubles dans l'eau pouvant être transformés en biomasse bactérienne moins de 8 heures après la chute dans l'eau (Benner *et al.*, 1986). Les crabes jouent un rôle important dans ce phénomène en enterrant les feuilles qui sont ainsi ensuite plus aisément dégradées par les communautés bactériennes et fongiques du milieu (Robertson & Daniel 1989 ; Ashton *et al.*, 1999). Cette communauté microbienne joue un rôle essentiel dans le fonctionnement et la maintenance de l'écosystème en s'engageant dans les cycles biogéochimiques et en approvisionnant les plantes et les animaux en nutriments (Alongi, 1988 ; Kathiresan & Bingham, 2001). Par conséquent, la diversité microbienne est fondamentale pour la productivité, la conservation mais également la récupération des écosystèmes de mangrove (Dos Santos *et al.*, 2011).

Il est toutefois surprenant de noter que malgré son importance, peu d'études ont été menées aussi profondément sur la phylogénie et la description fonctionnelle de la biodiversité microbienne dans l'écosystème de mangrove, comparativement aux autres environnements.

Les publications existantes démontrent tout d'abord que la diversité microbienne est plus importante dans les sédiments vaseux que dans les sédiments sableux, et que celle-ci augmente avec la température (Robertson & Alongi 1992). Dans les mangroves, les bactéries et les champignons constituent 91% de la masse microbienne totale contre 7% et 2% pour les algues et les protozoaires (Alongi 1988). De plus, une étude a démontré dans le nord de l'Australie que la densité microbienne du sol était plus importante dans la zone infralittorale que dans la zone supra littorale (Alongi, 1988). Les communautés microbiennes du sédiment de la mangrove sont très diverses. Les groupes les plus représentés sont les Protéobactéries suivies des Firmicutes, des Actinomycètes, puis des Cyanobactéries et des Archaea (Andreote *et al.*, 2012).

Parmi les protéobactéries, les groupes les plus représentés sont les γ -protéobactéries suivies des δ -protéobactéries (Dos Santos *et al.* 2011 ; Andreote *et al.*, 2012), dont la présence est corrélée aux conditions anoxiques fréquentes dans le sédiment, qui permet l'émergence de groupes spécifiques comme les bactéries sulfato-réductrices (Taketani *et al.*, 2010).

INTRODUCTION

Ce sont ces bactéries qui sont les premières responsables de la dégradation des feuilles de manière anaérobie. Les principales bactéries sulfato-réductrices du sédiment impliquées dans cette dégradation appartiennent aux genres *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina* et *Desulfococcus* spp. (Chandrika *et al.* 1990). Celles-ci produisent lors de la dégradation, du sulfure d'hydrogène qui remonte dans le sédiment et peut être oxydé naturellement par l'oxygène présent dans l'eau sus-jacente. A la surface du sédiment, la présence d'une interface oxydante/anoxique permet le développement de bactéries sulfo-oxydantes oxydant biologiquement les sulfures, avant que l'oxydation naturelle n'ait lieu. C'est pourquoi d'importantes quantités de γ -protéobactéries y ont été recensées (Dos Santos *et al.* 2011 ; Andreote *et al.*, 2012).

De plus, les mangroves étant des milieux peu profonds une grande quantité de lumière est accessible et des organismes photosynthétiques comme les cyanobactéries peuvent s'y développer. Ainsi, une grande quantité de cyanobactéries filamenteuses a été recensée. En effet, les genres *Oscillatoria* y sont largement représentées, ainsi que les cyanobactéries du genre *Lyngbya* (Alongi, 1988), mais on retrouve également des cyanobactéries du genre *Phormidium* et *Microcoleus* (Toledo *et al.*, 1995 ; Silambarasan *et al.*, 2012).

Les mattes de bactéries dans la mangrove jouent plusieurs rôles écologiques. Certaines études ont tout d'abord montré que dans les zones peu profondes ou dans la zone de balancement des marées, ces tapis bactériens pouvaient jouer un rôle d'absorption des rayons ultra-violet, permettant le développement d'autres espèces plus sensibles (Karsten *et al.*, 1998). Mais ces mattes peuvent également servir de source de nourriture pour certains organismes invertébrés comme la crevette *Parapenaeopsis sculptilis* (Newell *et al.*, 1995).

Mais c'est dans les cycles biogéochimiques que les bactéries semblent avoir le plus d'importance car elles permettent le renouvellement de la matière organique et sont une réserve en azote et phosphore dans ce milieu ou ces deux éléments sont souvent limitants (Lee & Joye, 2006). Ces organismes jouent le rôle de puits de carbone, en piégeant le carbone dissout dans l'eau interstitielle, limitant sa fuite aux milieux environnants (Boto *et al.* 1989). De même, l'azote provenant de la dégradation de la matière organique est converti en ammonium par les bactéries et peut être assimilé par d'autres bactéries ou par les plantes. La réduction de l'ammonium ainsi que

l'oxydation anaérobique de l'ammonium sont des réactions qui entrent en jeu dans le cycle de l'azote (Holguin *et al.*, 2001). Il apparaît également que les bactéries sulfato-réductrices, en tant que décomposeurs principaux de la matière organique dans le sédiment anaérobique, jouent un rôle majeur dans la minéralisation du soufre organique ainsi que dans la production de fer et de phosphore soluble, utilisés par les organismes constituant l'écosystème mangrove (Holguin *et al.*, 2001). Les ions sulfures produits lors de la sulfato-réduction réagissent ainsi avec des complexes fer/phosphate insolubles dans l'eau, et permettent le relargage de phosphates solubles lors de la formation de pyrite (FeS_2) (Sherman *et al.*, 1998), dont de très fortes concentrations ont été retrouvées dans les sédiments marins de la mangrove de Guadeloupe. L'excédent d'ions sulfures peut ensuite être consommé par des bactéries sulfo-oxydantes qui libéreront des sulfates dans le milieu (Holguin *et al.*, 2001).

6. Objectifs de l'étude

Les mattes de procaryotes en milieu marin, sont surtout étudiées en milieu profond ou intertidal dans le cas des blooms de cyanobactéries. Finalement, il existe peu d'études portant sur les mattes de procaryotes en mangrove.

Lors des travaux précédents effectués par l'équipe dans la lagune de la Manche-à-eau, des tapis bactériens avaient été observés à plusieurs reprises, cependant, leur fonctionnement n'avait pas été étudié jusqu'alors.

L'objectif de cette thèse était d'apporter des réponses quant à la composition de la matre de procaryotes, mais également de comprendre le milieu dans lequel elle évolue. En effet, connaissant la présence des sulfures dans ce milieu, ainsi que son interaction avec un certain nombre de procaryotes, (Laurent, 2009; Maurin, 2010), les sulfures ont été supposés avoir une interaction avec les mattes observées dans la Manche-à-eau. La présence de sulfure dans le milieu pourrait donc être à l'origine du développement d'organismes thiotrophes, symbiotiques ou non au sein de cette matre. Mais elle pourrait également limiter la présence d'organismes pour lesquels le soufre présenterait une certaine toxicité.

Plusieurs questions se sont alors posées :

- Quel est le fonctionnement de la matre ?

INTRODUCTION

- Quels sont les organismes composant la matte et quel y est leur rôle ?

Pour mener à bien cet objectif plusieurs outils ont été utilisés.

Les analyses chimiques ont été réalisées en deux parties. Toutes les mesures *in situ* ont été effectuées avec des capteurs potentiométriques en ayant pour but de mesurer les taux de sulfures et de comprendre les interactions entre ces taux et la matte. De plus, des mesures plus fines ont été effectuées en laboratoire, avec des microcapteurs. Toutes les analyses biologiques, elles, ont été réalisées grâce aux techniques d'observations microscopiques, d'hybridation *in situ* et de phylogénie.

La mise en place de ces expériences sera détaillée dans la seconde partie de ce manuscrit, le matériel et méthode.

Face aux résultats obtenus, ceux-ci ont été divisés en deux chapitres.

Le premier traitera de la chimie de la matte, puis nous aborderons l'étude des bactéries thiotrophes avant de s'intéresser aux cyanobactéries de la matte. Ces trois chapitres contiendront les résultats obtenus au cours de ces trois années de recherche et les discussions correspondantes, le troisième chapitre contenant aussi une analyse combinée des résultats des chapitres précédents.

Ce manuscrit sera clos par une conclusion générale.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Présentation du site d'étude :

L'archipel de la Guadeloupe, Antilles françaises (16° N-61,43 °W), se situe dans la Mer des Caraïbes.

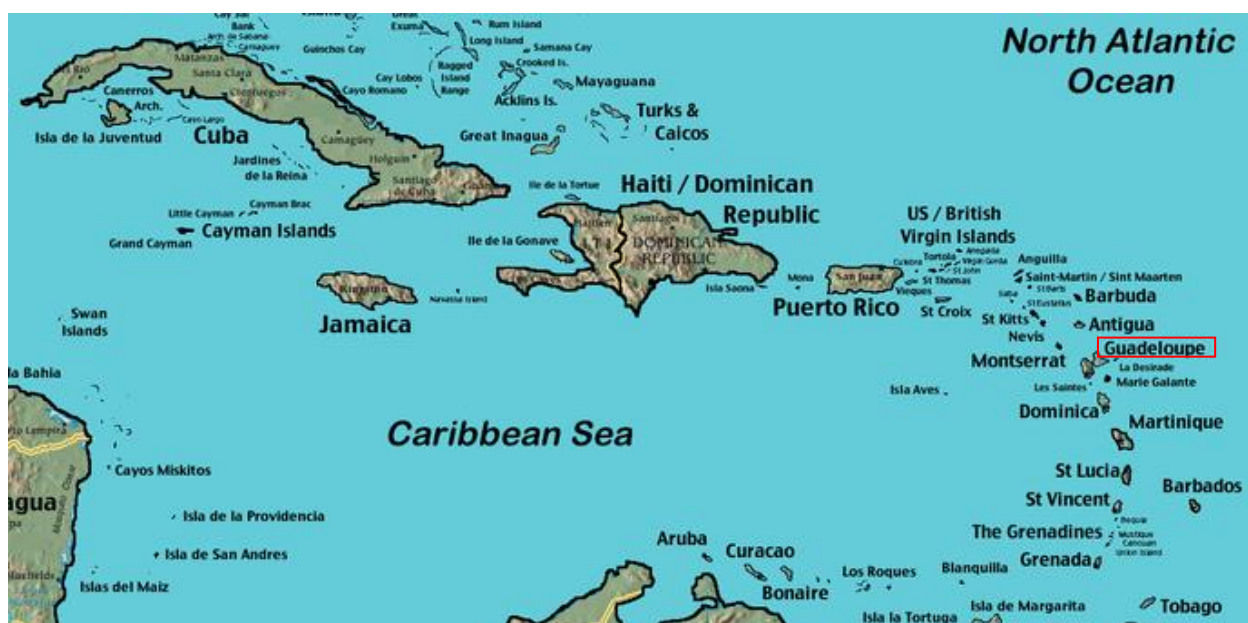


Figure 14: Localisation de la Guadeloupe (encadrée en rouge) au sein de l'archipel des Antilles, CIA®.

Deux îles forment la Guadeloupe, la Basse Terre de nature volcanique à l'Ouest et la Grande Terre à l'Est, de nature calcaire. Ces deux îles sont séparées par un bras de mer dénommé la Rivière Salée qui permet la communication entre le Petit Cul-de-Sac Marin au sud et le Grand-Cul-de-Sac marin au nord.

Cette région constitue la plus grande étendue de mangrove de la Guadeloupe (Imbert *et al.*, 1988).

La mangrove guadeloupéenne est principalement composée de *Rhizophora mangle*, palétuvier rouge qui forme la bordure maritime de la mangrove. En s'éloignant du rivage, on retrouve ensuite deux zones, la mangrove arbustive où apparaissent les palétuviers noirs *Avicennia germinans* et *A. schaueriana* et la mangrove haute où l'on retrouve les palétuviers blancs et gris *Laguncularia racemosa* et *Conocarpus erectus* (Imbert *et al.*, 1988).

Cette ceinture arboricole permet une augmentation de la résilience écologique des écosystèmes après le passage des ouragans (Imbert *et al.*, 1996).

La mangrove de Guadeloupe, et notamment la zone d'échantillonnage de la Manche-à-eau joue un rôle essentiel de nurserie pour les juvéniles de poissons. En effet, il a été montré dans des travaux précédents que 70% de la population piscicole de cette zone était constituée de juvéniles (Vaslet, 2009).

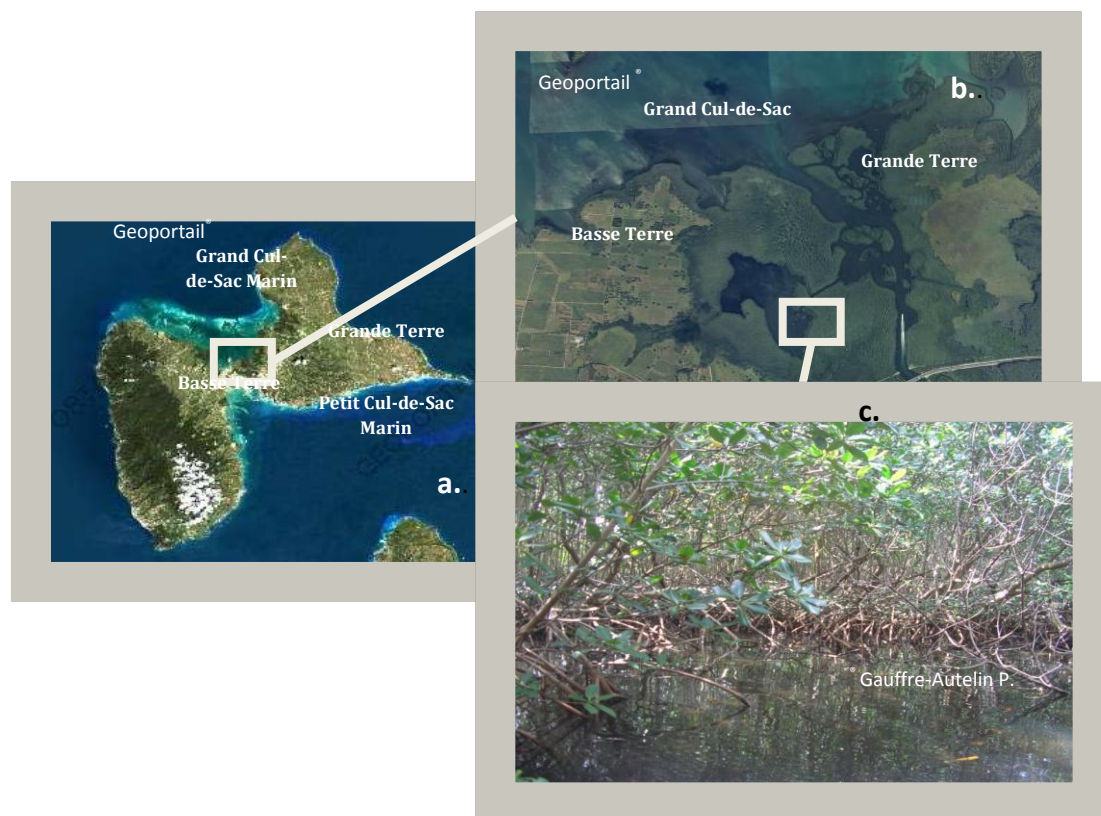


Figure 15: a. Image satellite de la Guadeloupe, b. Localisation de la lagune de la Manche-à-eau, c. Lieu de prélèvement dans la lagune dont le bord est constitué uniquement de palétuviers rouges *Rhizophora mangle*.

De la Rivière Salée partent plusieurs chenaux menant pour un d'entre eux à la lagune de la Manche-à-Eau ($16^{\circ}16'36''N$ $61^{\circ}33'24''W$). Cette lagune est alimentée en eau par la rivière salée grâce à la marée, mais reçoit également les eaux douces de bassin versant alentour.

La lagune de la Manche-à-Eau est de dimension réduite, 910 m de longueur pour 620 m de largeur. Sa profondeur moyenne est de 1,5 m et sa profondeur maximale est de 3 m pour une surface totale de 281 700 m² (Mantran *et al.*, 2009). La courantologie dans la lagune dépend de la morphologie de la lagune qui évolue en fonction des événements cycloniques et de l'accumulation de sédiment. Cependant, 14,8% de l'eau est renouvelée à chaque marée (Mantran *et al.*, 2009).

Lors d'études précédentes réalisées dans la Manche-à-eau, les concentrations en sulfures relevées ont été établies à 1 mM (Maurin, 2009). Ces fortes concentrations

observées expliquent la richesse du milieu en organismes sulfo-oxydants (Laurent, 2009; Muller *et al.*, 2010).

Ce site a été choisi en raison de sa richesse en mattes de procaryotes parfois visibles de la surface et de sa facilité d'accès.



Figure 16: Photographie des mattes de procaryotes à proximité des racines de palétuviers observées de la surface (à gauche) et sous l'eau (à droite).

2. Mesures avec les capteurs potentiométriques

2.1. Capteurs potentiométriques

Les capteurs potentiométriques sont similaires à ceux utilisés par M. Laurent, 2009 pour le capteur sulfure (NKE, France) et Le Bris *et al.* (2001) pour le capteur pH (NKE, France).

Le capteur sulfure est composé d'une électrode de référence de type Ag/AgCl et d'une électrode indicatrice de type Ag/Ag₂S de 0,8mm de diamètre et 2mm de long.

Le capteur pH est composé d'une électrode de référence de type Ag/AgCl et d'une électrode indicatrice en verre (Fig. 16).



Figure 17: Capteurs potentiométriques sulfure et pH comprenant une électrode de référence (flèches blanches) et une électrode de mesure (flèche bleue pour le pH et noire pour l'électrode de sulfure).

Les électrodes sont, dans les deux cas, reliées à un boîtier étanche contenant le système électronique (NKE, France), permettant l'enregistrement des différences de potentiel électrique entre les deux électrodes. Ces modifications de potentiel permettent de calculer la concentration de H_2S , molécule d'intérêt de l'étude. La récupération des données est effectuée grâce au logiciel Winmemo par l'intermédiaire d'un crayon électronique étanche (MICREL, France) relié à un ordinateur et mis en contact avec le boîtier électronique.

Les mesures de pH étaient nécessaires, simultanément des mesures de H_2S car les concentrations dans le milieu des formes relatives H_2S , HS^- et S^{2-} sont dépendantes du pH de l'eau (Millero, 1987) (Fig. 17).

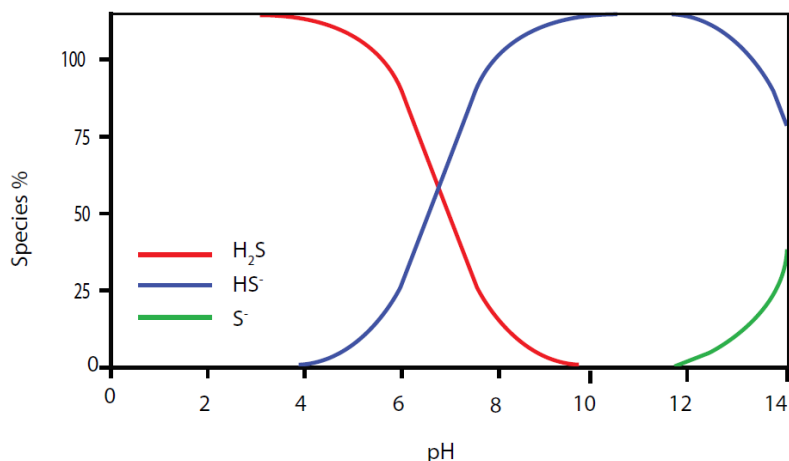


Figure 18: Distribution des formes ioniques H₂S, HS⁻ et S²⁻ en fonction du pH, d'après Hydrogen sulfide sensor manual, (Unisense 2010).

2.2. Calibration des capteurs

La calibration des capteurs a été réalisée à partir de protocoles mis au point par N. Le Bris et décrits par (Laurent, 2009), documents disponibles en annexe n° 1.

2.3. Mesures *in situ*

Les mesures chimiques ont été réalisées sur, sous et dans la matre. Pour toutes les expériences réalisées, les capteurs étaient liés l'un à l'autre afin que les mesures obtenues caractérisent bien le même microenvironnement. Deux expériences ont été menées avec ces capteurs potentiométriques dans lesquelles ils étaient configurés pour enregistrer une mesure toutes les 15 minutes.

- Expérience à court terme : Tout d'abord, les capteurs ont été placés dans la mangrove à l'aide d'une potence réglable permettant de les positionner dans la matre dans laquelle ils ont été maintenus pendant une durée de trois jours. Le but de cette expérience était de caractériser les conditions chimiques de l'environnement de la matre.
- Expérience à long terme : Celle-ci a été menée afin de vérifier une hypothèse pouvant expliquer les déplacements de la matre. Pour vérifier que la matre se déplaçait, nous avons planté quatre bâtons afin de délimiter un carré et avons observé les déplacements de celle-ci

pendant 4 jours. Il nous a semblé intéressant vérifier si des variations de la concentration en sulfures dans le sédiment pouvaient expliquer les déplacements de la matte de procaryotes sus-jacente.

Pour cette expérience, nous disposons de deux couples de capteurs sulfures. Le premier d'entre eux était enfoui dans le sédiment dans un endroit où la matte de procaryotes n'a jamais été observée. Il constituait le témoin négatif de l'expérience. Le second capteur a été installé sous la matte dans le sédiment (Fig. 18). De plus, nous disposons d'un capteur sulfure seul qui a été également disposé dans le sédiment sous la matte. Chaque capteur était configuré afin d'enregistrer une mesure toutes les 15 minutes. Ils ont ensuite été récupérés au bout de trois mois, les données relevées puis analysées.

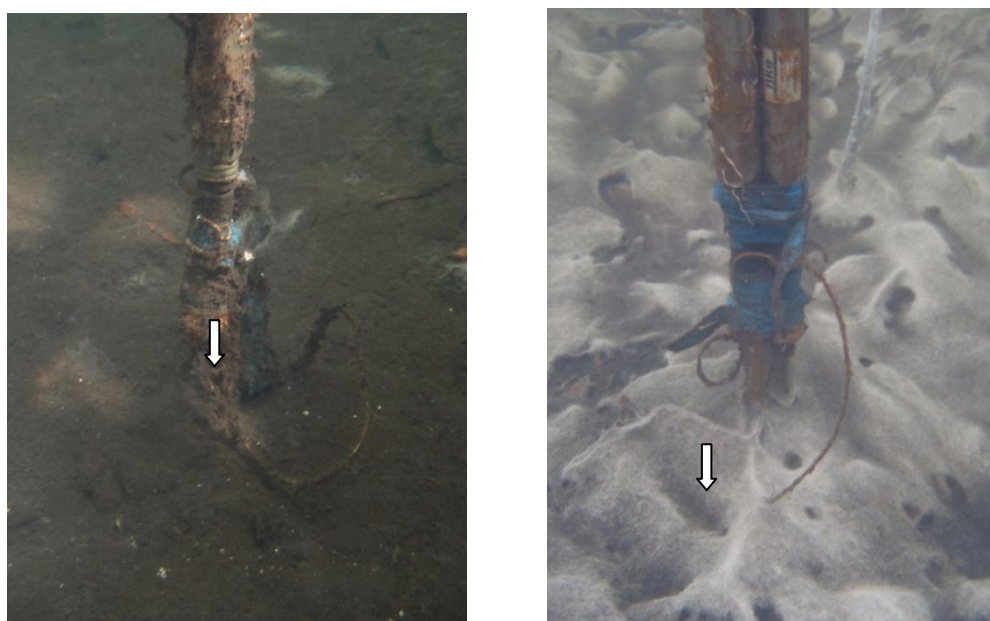


Figure 19 : Disposition des capteurs autonomes pour le suivi chimique des mesures dans le sédiment durant trois mois. A droite, les électrodes (flèche blanche) sont plongées dans le sédiment. A gauche, les électrodes (flèche blanche) sont enfouies sous la matte, dans le sédiment.

2.4. Analyse des données

Les enregistrements ont été récupérés après chaque période de mesure à l'aide du crayon électronique et visualisées avec le logiciel Winmemo.

Le pH du milieu a été calculé selon la base des calibrations initiales, avant mesures et finales, après mesures, tout comme les concentrations en HS^- contenues

dans la solution de calibration. En revanche, les estimations des concentrations en sulfures nécessitent l'intégration des calibrations, mais aussi des valeurs de pH du milieu et des constantes d'acidité de H_2S pour accéder à la concentration en sulfures totaux libres dans le milieu ($[H_2S] + [HS^-]$).

3. Mesures avec micro capteurs

3.1. Micro capteurs électrochimiques potentiométriques de sulfure et d'oxygène

Les mesures de H_2S et d'oxygène en laboratoire ont été réalisées grâce à des capteurs potentiométriques de sulfure et d'oxygène (Unisense, Danemark).

Le micro-capteur d'oxygène (OXY100, Unisense) est une électrode de Clark miniaturisée comprenant une cathode de garde interne permettant de récupérer l'oxygène diffusant autour du capteur comportant l'électrolyte interne (Revsbech, 1989) ce procédé permet une pré-polarisation plus rapide et minimise également le « courant zéro ». Ce micro capteur est relié à un pico ampèremètre (Microsensor Multimeter, Unisense) délivrant un signal en pico ampère.

Le micro-capteur de sulfure d'hydrogène (H_2S) (H2S100, Unisense) est une électrode ampérométrique miniaturisée avec une référence interne, un détecteur et une anode de garde.

Le capteur est connecté à un amplificateur (Microsensor Multimeter, Unisense) délivrant un signal en pico ampère. Grâce à la pression partielle, le sulfure d'hydrogène de l'environnement pénètre dans l'électrode jusqu'à l'électrolyte alcalin où les ions hydrosulfures (HS^-) formés sont aussitôt oxydés par le ferricyanure, produisant du sulfure d'hydrogène et du ferrocyanure. Le signal du capteur est généré par ré-oxydation du ferrocyanure à l'anode, dans la pointe du micro-capteur (Jeroschewski, 1996). Le pico ampèremètre convertit le courant résultant de la réduction en un signal en volts.

De même que pour le capteur oxy-métrique, l'électrode de garde interne est polarisée afin de récupérer le sulfure d'hydrogène (H_2S) et aider à garder un ratio ferri- à ferrocyanure dans l'électrolyte, ce qui minimise le « courant zéro ».

Pour les mesures en oxygène comme en sulfures, l'amplificateur est relié à un ordinateur sur lequel est installé le logiciel SensorTrace Basic® permettant de récupérer les données. Celles-ci sont ensuite converties automatiquement en fichier Excel afin de les exploiter.

Le micro-capteur de sulfures mesure les ions H₂S, qui ne sont qu'une partie des sulfures totaux du système.

En effet, la concentration totale des sulfures [S_{tot²⁻}] peut être définie selon l'équation :

$$[S_{tot^{2-}}] = [H_2S] + [HS^-] + [S^{2-}]$$

Selon la distribution des ions sulfure selon le pH (Fig. 18), les ions sous la forme [S²⁻] sont absents en dessous du pH 9.

On peut donc simplifier cette équation par :

$$[H_2S] = \frac{[S_{tot^{2-}}]}{1 + \frac{K_1}{[H_3O^+]}}$$

$$[H_3O^+] = [H^+] = 10^{-pH}$$

Pour un pH < 9 (Jeroschewski, 1996).

Lors des mesures de sulfures, il est donc nécessaire de mesurer parallèlement le pH.

Le pH a ici été mesuré avec les électrodes NKE selon le protocole de calibration mis au point par (Laurent, 2009) et reporté en annexe.

3.2. Calibration des micro-capteurs

Le micro-capteur oxy-métrique a été calibré en bullant pendant 5 min de l'eau de mer filtrée à 0,2µm avec de l'azote afin d'en ôter tout l'oxygène. Cette solution est le zéro en oxygène appliqué à la sonde grâce au logiciel SensorTrace Basic®. La même solution est ensuite ré oxygénée en la bullant avec de l'air pendant 5 min. Cette solution est le 100% en oxygène. Une fois la calibration effectuée elle est enregistrée sur le logiciel et appliquée aux données perçues par la sonde (Fig. 19).

Le micro-capteur de sulfure a été calibré par ajouts successifs d'une solution de H₂S de concentration connue à une solution de Tris-Eau de mer dont le pH a été ajusté à 7.

A chaque ajout de H₂S, une mesure correspondante en pico ampère est relevée afin de tracer la droite de calibration grâce au logiciel SensorTrace Basic®.

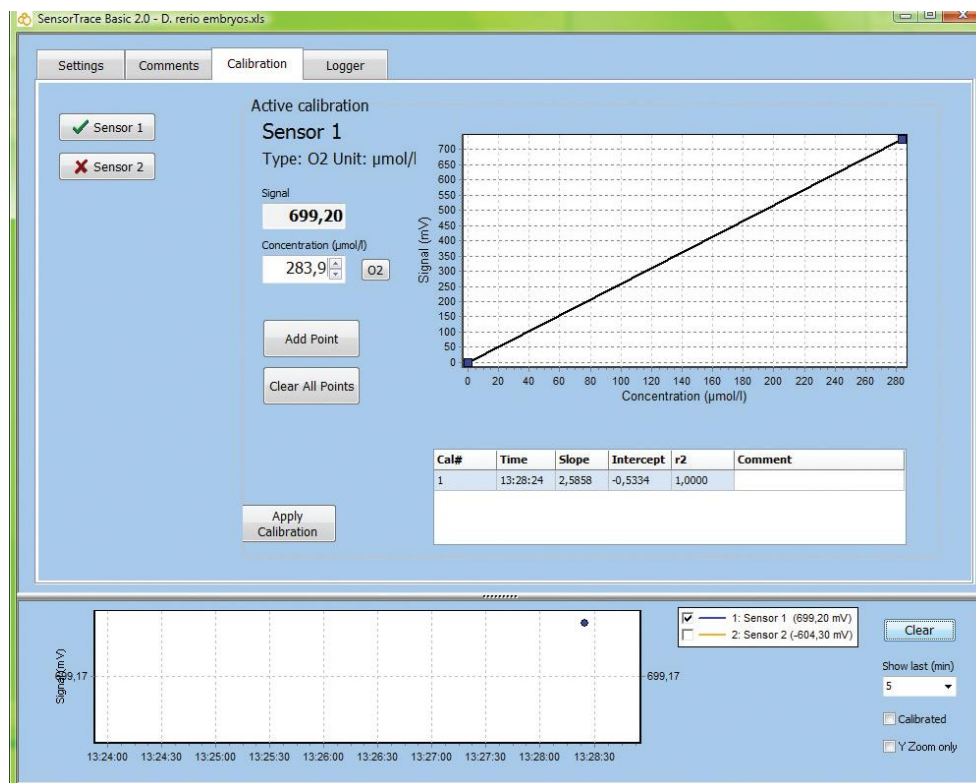


Figure 20 : Calibration de la sonde sulfures à l'aide du logiciel SensorTrace Basic®.

Une fois la calibration effectuée elle est enregistrée sur le logiciel et appliquée aux données reçues par la sonde. Les mesures effectuées par la suite sont directement enregistrées sous format Excel.

L'obtention des sulfures totaux du milieu se fait à partir des concentrations de H₂S obtenues selon l'équation :

$$[S_{\text{tot}}^{2-}] = [H_2S] \times (10^{\text{pH} - \text{p}K_{1_H_2S}} + 1)$$

Où $\text{p}K_{1_H_2S} = 6,51$

Une fois ces concentrations obtenues, les différentes figures ont été réalisées sur Excel.

3.3. Mesures en mésocosme

Des profils verticaux de la variation de la concentration en sulfures et en oxygène de la matte jusque dans le sédiment ont été établis en mésocosme (Fig. 20). Dans ce but, du sédiment était collecté puis laissé à reposer, pendant une nuit afin que sa structure se reforme et que le gradient d'oxydation nécessaire à la production de sulfures se remette en place. Le lendemain, de la matte fraîche était récupérée en mangrove et déposée sur le sédiment d'un des deux mésocosmes, l'autre servant de témoin négatif. Après sédimentation de la matte, les sondes étaient placées sur un micromanipulateur et des profils verticaux établis par pallier de 1 mm de l'eau jusqu'à une profondeur de 1,5 cm sous le sédiment. Afin d'établir la concentration en sulfures totaux, il était nécessaire de mesurer le pH. Des profils de celui-ci ont donc été effectués avec les capteurs autonomes fixés sur une potence.

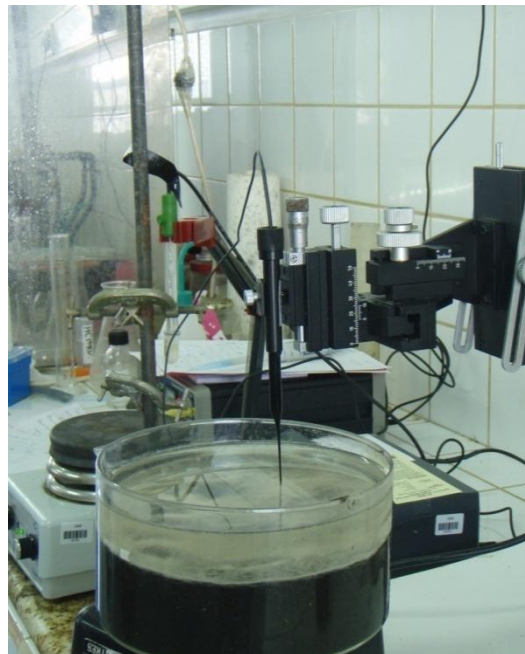


Figure 21: Montage des microcapteurs pour l'établissement des profils en sulfures.

3.4. Analyse des données

Les profils étant réalisés avec les microcapteurs reliés à l'ordinateur et utilisant le logiciel SensorTrace Basic®, les valeurs de H₂S sont données par le logiciel. Toutefois, afin d'éviter tout biais, les valeurs ont été recalculées à partir de la courbe de calibration obtenue et les concentrations en sulfures totaux ont été obtenues [Stot²] en intégrant les valeurs obtenues pour le profil de pH.

4. Echantillonnage

Pour cette étude les filaments ont été récoltés dans la lagune de la Manche à Eau. La fréquence d'échantillonnage était d'une à deux fois par semaine pendant deux ans. L'échantillonnage a consisté à récolter la matre à l'aide d'une seringue de 60ml. Les organismes ont ainsi été aspirés en prenant garde de prélever le moins de sédiment possible. Ils ont ensuite été transvasés dans une bouteille d'eau avec de l'eau de mer jusqu'au retour au laboratoire où ils ont été déposés dans des cristallisoirs et recouverts d'eau de mer. Après quelques dizaines de minutes de sédimentation, la matre se reconstitue et reprend son aspect naturel.

Le tri des filaments a été effectué grâce à une fine tige en métal crochetée permettant de séparer les filaments selon leur morphotype. Ils ont alors été transvasés dans des plus petits piluliers comportant de l'eau de mer filtrée à 0,2µm afin de les débarrasser de leurs impuretés.

En fonction de l'analyse à laquelle l'échantillon était destiné, plusieurs traitements pouvaient ensuite être appliqués.

La taille des filaments a été mesurée au microscope optique à l'aide d'un oculaire gradué sur 40 individus pour chaque type de filament, sauf pour *Oscillatoria* 1 où seules 5 mesures ont été prises en raison de la rareté du filament. Une photographie a été prise pour chaque mesure afin de vérifier celles-ci grâce au logiciel de traitement d'image GIMP. Pour chaque type de filament, la moyenne et l'écart-type ont été calculés.



Figure 22: A gauche, prélèvement à la seringue de la mat, à droite, mat reposant dans un cristallisateur avant le tri.

5. Hybridation *in situ*

Les échantillons destinés à l'hybridation *in situ* ont tous été fixés dans une solution de paraformaldehyde PFA à 2% en eau de mer dont le pH était compris entre 7 et 7,4 pendant une durée de une à deux heures, à 4°C. Ils ont ensuite été rincés trois fois à l'eau de mer puis déshydratés par des bains d'éthanol successifs (30°, 50°, 70°, 95°) de 10 min jusqu'à l'éthanol 100°.

Les échantillons étaient le jour de l'hybridation déposés sur une lame Superfrost® préalablement traitée au silane afin que les filaments restent collés à la lame durant les différents traitements.

Ces échantillons ont ensuite été traités par la technique de FISH.

Pour cela, les échantillons ont été réhydratés par des bains successifs d'éthanol de concentration décroissante (95°, 70°, 50°, 30°) jusqu'à l'eau distillée.

Des bains successifs ont ensuite été réalisés afin de perméabiliser les membranes cellulaires des échantillons. Un premier bain de 12 minutes de HCl 0,2 M (température ambiante), un bain de 10 min de tampon TrisHCl (20 mM à température ambiante), puis un bain de 5 min de Protéinase K (0,5 µg/mL en tampon Tris-HCl 20 mM à 37°C) ont été réalisés avant le dépôt des sondes sur les échantillons (3 ng/µL de tampon d'hybridation (NaCl à 0.9 M, Tris HCl 0.02 M à pH 7.8, 0.01% de SDS, et 35% formamide dans de l'eau ultrapure). L'hybridation a lieu en chambre humide à 56°C pendant 3 heures. Deux rinçages de 15 min avec un tampon de lavage (NaCl à 0.22 M, tampon Tris HCl 0.02 M à pH 7.8, 0.005 M EDTA,

et 0.01% de SDS dans de l'eau ultrapure), ont été réalisés à la fin de l'hybridation afin d'éliminer les sondes n'ayant pas hybridé.

Une goutte de Vecta Shield est déposée sur chaque lame avant l'observation au microscope à épifluorescence epi 80i (Nikon, France).

Dix sondes oligonucléotidiques différentes ont été utilisées afin de caractériser chaque individu de la matrice, archaëa, bactérie, cyanobactérie. Deux types de fluorochromes ont été utilisés, la cyanine 3 (Cya3) absorbe à 550 nm et émet à 570 nm et l'Atto 425 qui absorbe à 436 nm et émet à 484 nm. L'utilisation du fluorochrome Atto 425 a été nécessaire en raison de l'auto fluorescence dans le rouge et le vert de certains organismes. Toutes les amorces utilisées sont répertoriées dans le tableau 1.

Tableau 1: Sondes utilisées pour les hybridations *in situ*.

Sonde	Séquence	Position sur ARNr 16S Cible	Fluorochrome
EUB338 (Amann <i>et al.</i> , 1992)	5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3' 5'-GCT GCC ACC CGT AGG TGT-3'	16S Eubactéries 338 à 355	Cyanine3 Atto425
NONEUB (Wallner <i>et al.</i> , 1993)	5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3'		Cyanine 3
ALF968 (Neef, A. 1997)	5'- ACT CCT ACG GGA GGC AGC -3'	16S α -protéobactéries 968 à 985	Cyanine3
ARCH915 (Stahl <i>et al.</i> , 1991)	5'-GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT-3'	16S Archaea 915 à 934	Cyanine3
THAUMGR1	5'-ACT TGC CCA CCC CTT AT-3'	16S Thaumarchaea 338 à 355	Cyanine3
THAUMPHOTO	5'-CCG GGA TTA TAG GAT TTC-3'	16S Thaumarchaea 338 à 355	Cyanine3
GAM42A (Manz <i>et al.</i> , 1992)	5'-GCC TTC CCA CAT CGT TT-3'	16S γ -protéobactéries 1027 à 1043	Cyanine3
CYA361 (Schönhuber <i>et al.</i> , 1999)	5'-CCC ATT GCG GAA AAT TCC-3'	16S Cyanobactéries 361 à 378	Atto425
BEG_282F (S. Gonzalez-Rizzo, non publié)	5'-GGA TTG CTG TCT TGG TAA GC-3'	16s Beggiatoa-morphotype 2	Cyanine 3
BEG_572F (S. Gonzalez-Rizzo, non publié)	5'-CAA CCG CCT ACG TAC GCT -3'	16S Beggiatoa- morphotype 1	Cyanine 3

6. Analyses phylogénétiques (S. Gonzalez-Rizzo) :

Afin de déterminer les espèces présentes dans la matre, parallèlement aux expériences d'hybridation *in situ* ont été menées des identifications génétiques basées sur l'analyse des séquences du gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARNr des organismes étudiés.

Les échantillons ont préalablement été triés et conservés à -80°C dans de l'eau ultra pure stérile.

L'utilisation du kit Promega pour effectuer les extractions d'ADN étant responsable d'une trop grande perte de matériel, les membranes cellulaires des échantillons ont été rompues par lyse thermique. Les échantillons ont été soumis à une température de 90°C pendant 5 minutes, puis à 80°C pendant 5 minutes, ceci pendant trois cycles. Plusieurs réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont ensuite été menées avec différentes amorces spécifiques du gène 16S des bactéries ou des archaea (Tableau 2.). Pour l'amplification du gène codant pour l'ADNr 16S des Archaea, plusieurs combinaisons d'amorces avec des conditions de PCR différentes ont été testées. Les amorces TH338F et TH779R ayant été les plus efficaces, elles ont été retenues. Ces amplifications ont été réalisées grâce au kit d'ADN polymérase GoTaq® Flexi de Promega (Cat.# 8301), selon les protocoles proposés par le fabricant pour des amorces à 10 µmol/L, à partir des solutions mères à 1000 µmol/L. Les conditions des réactions de PCR de l'amplification de ces différents gènes sont disponibles dans le tableau 3 Pour l'amplification de l'ADNr 16S des Archaea, seules les conditions finales mises au point par S. Gonzalez-Rizzo ont été listées.

Tableau 2: Liste des différentes amorces utilisées afin d'obtenir les séquences codant pour les gènes spécifiques ou les ADN 16S des individus étudiés.

Amorce	Séquence	Cible sur l'ADNr 16S
EUB8F (Amann <i>et al.</i> , 1990)	5'-GGA TCC AGA CTT TGA TYM TGG CTC AG-3'	8-34
EUB907R (Amann <i>et al.</i> , 1990)	5'-CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT-3'	907-927
TH338F (F. Muller, non publié)	5'-CCC AGG CCC TAT GGG GCG C-3'	338-357
TH779R (F. Muller, non publié)	5'-GCT GGG GGA AGC AAA CCG G-3'	779-798
A2F (F. Muller, non publié)	5'-CCG KTT GAT CCT GRC GGA CC-3'	2-22
TH779R (F. Muller, non publié)	5'-CCG TTT GCT CCC CCA GA-3'	779-796
UA1204R (F. Muller, non publié)	5'-TTC GGG GCA TAC TGA CCT-3'	1204-1222
1530R (F. Muller, non publié)	5'-GGA GGT GAT CCG ACC G-3'	1530-1546
CYA106F (Nübel <i>et al.</i> , 1997)	5'-CGG ACG GGT GAGTAA CGC GTG A-3'	106-127
CYA781R (Nübel <i>et al.</i> , 1997)	5'-GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CCT T-3'	781-805

Tableau 3: Protocoles de PCR suivis pour l'amplification de chaque gène considéré (S. Gonzalez-Rizzo).

Conditions PCR Gène	Température (C°)	Durée	Phase	Nombre de cycles
ARNr 16S des bactéries/ archaea	95°C	5 min	Dénaturation	1
	95°C	30 s	Dénaturation	35 cycles
	60°C	1 min	Polymérisation	
	72°C	30 s	Elongation	
	72°C	7 min	Elongation	1
ARNr 16S Cyano	95°	5 min	Dénaturation	1
	95°	45 s	Dénaturation	35 cycles
	55°	45 s	Polymérisation	
	72°	1 min	Elongation	
	72°	7 min	Elongation	1

Pour les morphotype de *Beggiatoa*, les séquences obtenues ont ensuite été éluées en utilisant un extrait de Nucléospin II et clonées avec un kit pGEM-T TA (Promega). Un vecteur, (pGEM-T ; Promega) a été utilisé pour transformer des bactéries compétentes *Escherichia coli* de la souche Dh5 α , puis les plasmides de ces 12 de ces clones positifs ont été extraits en utilisant les plasmides Nucleospin (Macherey-Nagel). Les inserts ont ensuite été séquencés par Genoscreen®.

Les séquences obtenues ont été nettoyées puis analysées par S. Gonzalez-Rizzo qui a ensuite construit les différents arbres avec la méthode de Neighbour joining.

La séquence de l'*Oscillatoria* 1 a été obtenue et analysée par G. Sezonov, l'arbre phylogénétique a ensuite été effectué par S. Gonzalez-Rizzo.

Deux sondes oligonucléotidiques spécifiques de L'ARN 16S des *Beggiatoaceae* ont été réalisées afin de valider les résultats phylogénétiques obtenus.

7. Microscopie électronique à balayage (MEB)

7.1 Microscopie électronique à balayage

Les échantillons destinés au MEB ont été fixés 30 minutes dans de l'osmium 1% en tampon cacodylate 0,1 M à pH 7,2 dont l'osmolarité est de 1900mosmol/l.

Après deux rinçages à l'eau distillée, les échantillons ont été déshydratés progressivement dans des bains d'acétone croissants de 10 min (30°, 50°, 70°, 95°) jusqu'à l'acétone 100°. Les échantillons ont ensuite été traités au point critique du dioxyde de carbone (CO₂) qui est atteint à une température de 32°C pour une pression de 73 bars (EM CPD300, Leica). Les échantillons ont été déposés sur des « stubs » recouverts de scotch carbone puis métallisés à l'or (Sputter Coater SC500, Biorad) afin d'être observés au microscope électronique à balayage (Quanta 250, FEI).

7.2 Microscopie électronique à balayage en mode environnemental

Les échantillons destinés au MEB en mode environnemental ont été préalablement fixés au paraformaldehyde 2% puis rincés à l'eau distillée afin que les sels présents ne soient pas visibles au microscope lors de l'évaporation de l'eau pendant l'observation avec un microscope (Quanta 250 FEI).

7.3 Analyse par dispersion des rayons X

Les échantillons nécessitant une analyse E.D.X. ont été préparés comme pour le MEB en mode environnemental. L'analyse a été effectuée grâce à une sonde EDX.

8. Microscopie électronique à transmission (MET)

Après une fixation à l'osmium, réalisée comme pour le MEB, les échantillons ont été déshydratés dans des bains successifs de 10 min d'alcool croissants (30°, 50°, 70°, 95°, 100°). La substitution en résine a débuté par trois bains d'oxyde de propylène de 10 min chacun. Une imprégnation progressive à la résine Epon-Araldite type Médium (Mélange de: 12g Epon ; 8d DDSA ; 5gMNA ; à 0,75g BDMA) a été effectuée par des bains de deux heures minimum (1/3 Résine-2/3 oxyde de propylène, puis 1/2 Résine-1/2 oxyde de propylène et enfin 2/3 Résine-1/3 oxyde de propylène). Les échantillons ont été ensuite placés une nuit sous vide dans de la résine pure puis déposées et orientées dans des moules pour la polymérisation à 55°C pendant un jour puis à 60°C pendant 2 jours.

Les blocs de résine ainsi obtenus ont ensuite été coupés à l'ultramicrotome (Ultracut E, Reichter). L'observation des coupes fines de 60 μm d'épaisseur a été effectuée à l'aide d'un microscope Léo 912 à 120kV.

9. Essais de culture

Des essais de culture de la matre complète ont été tentés durant ces travaux. Devant les échecs répétés, il a ensuite été essayé de séparer les espèces et morphotypes afin de les cultiver seuls.

9.1. Essais de culture de la matre de procaryotes

Afin de réaliser des essais de culture sur matre complète, celle ci était mise à reposer après prélèvement puis ré-aspirée avec une seringue afin d'éliminer au maximum le sédiment sous jacent.

La matre était ensuite mise en culture dans 100 mL de milieu dans des ballons ou des erlenmeyers fermés par des bouchons de gaze, soumis à une luminosité de 1050 lux avec une photopériode 12 h/12 h. Le bullage perturbant la matre de procaryotes, il n'a pas été mis en place. Tous les 3 jours, 5 mL, soit 5% du milieu était renouvelé.

Plusieurs milieux ont été ainsi testés.

Tout d'abord, le milieu Z8Xsalt (Kotai, 1972) complétement en sulfites à une concentration de 10 mM a été testé. Nous avons ensuite fait des essais avec le milieu F/2 (Guillard et Rythers, 1963). La composition de ces différents milieux est disponible en annexe N°2.

Les observations faites sur la matre nous ont montré qu'elle était intimement liée au sédiment, nous avons alors pensé qu'un support lui était peut être nécessaire afin de survivre.

Nous avons donc d'une part, stérilisé à l'autoclave du sédiment avec de l'eau distillée puis filtré la solution. D'autre part, nous avons utilisé de la poudre de charbon, choisie en raison de son inertie. Un milieu Erdschreiber a également été réalisé en diluant 10 fois le filtrat dans de l'eau de mer filtré à 0,22 μm et complétement par des sulfites à une concentration de 10 mM.

Six cultures ont ensuite été mises en parallèle. Pour chaque milieu, F/2 et Erdschreiber, trois essais ont été réalisés, avec du sédiment stérile, avec du charbon et sans support.

9.2. Essais de culture des individus isolés

Pour ces essais, deux milieux ont été testés, le milieu F/2, ainsi que le milieu BG-11+Turk's+Vitamines.

Après avoir trié les individus, ceux-ci ont été mis en culture dans des tubes à essai, avec 5 mL de solution, dans des erlenmeyers de 100 mL, puis dans des flasques avec 25 mL de milieu de culture.

Pour les cyanobactéries, le milieu n'était pas complété en sulfites. La Cyanobactérie 1 était soumise à une luminosité de 1050 lux tandis que la 2 était soumise à une luminosité de 900 lux. En revanche pour les *Beggiatoa* morphotype 1 et 2 celui-ci était complété en sulfites à une concentration de 10 mM.

10. Tests de toxicité des Cyanobactéries 1 et 2 (Collaboration avec C. Guidi-Rontani)

Afin de savoir si les Cyanobactéries 1 et 2 rencontrées dans la matre contenaient des toxines, des tests de biotoxicité sur des *Artemia salina* ont été effectués.

Les œufs d'*A. salina* ont été mis à éclore à la lumière (1050 lux) pendant 24h dans une flasque de 25 ml d'eau de mer filtrée à 0,22 µm. Les nauplies ont ensuite été séparées des cystes en les attirant d'un côté de la flasque avec une source lumineuse.

De manière à déterminer la toxicité des cyanobactéries, 10 individus ont été déposés dans des puits d'une plaque de 96 puits contenant d'une part le milieu de culture des Cyanobactéries et d'autre part, un broyat de cyanobactéries, mélangé à du milieu de culture. Le broyat a été obtenu en écrasant cinq filaments d'un centimètre et demi de long environ dans 1 ml de milieu de culture vierge puis en soumettant ce broyat aux ultrasons pendant 2 minutes.

Les tests ont été effectués en triplicats, avec trois puits pour le milieu de culture contenant la Cyanobactérie 1, trois autres contenant le milieu de culture de la Cyanobactérie 2 et trois contenant du milieu de culture seul, identifié comme le témoin. La même opération a été effectuée avec le broyat des cyanobactéries.

Les plaques ont ensuite été observées toutes les deux heures pendant les 8 premières heures puis à 24h.

La somme des morts et vivants obtenus à la fin de l'expérience pour chaque variable (Témoin, cyanobactérie 1 et 2) a été analysée grâce à un test de χ^2 d'indépendance de deux variables. Les variables ont ainsi été analysées deux à deux afin de mesurer si la mise en contact avec le broyat ou le milieu de culture des cyanobactéries avait une influence sur la mortalité des *A. salina*.

11. Caractérisation des pigments de *Oscillatoria* au microspectromètre (Collaboration avec GTSI, J-L. Mansot et A. Sautdubois).

Il nous a semblé intéressant de caractériser les pigments de l'*Oscillatoria 1*.

Après avoir isolé une dizaine de filaments de l'*Oscillatoria 1* ceux-ci ont été placés dans de l'éthanol absolu afin d'en extraire les pigments. La même extraction a été effectuée parallèlement avec des feuilles de *Leucaena leucocephala* (Magnoliophyta : Fabaceae), de manière à obtenir un témoin provenant d'un végétal supérieur.

Une chromatographie sur couche mince a ensuite été effectuée sur une feuille de silice (Art.-Nr818133 ALUGRAL SIL G/UV254, Macherey-Nagel, Düren, Germany) avec pour éluant un mélange acétone/hexane (70/30 v/v).

Les tâches obtenues après la chromatographie sur couche mince ont ensuite été analysées par un microspectromètre HR800 Horiba couplé avec un microscope. L'objectif x10 a été utilisé afin de faire la mise au point sur les spots de pigments obtenus et de cibler le point d'analyse du laser dont la sonde a un diamètre de 10 μm . La puissance du laser NdYAG solide (Spectra-Physics Millemmia Pro 5 sJS) a été fixée à 532 nm et un réseau de 300 tr/min a été utilisé permettant d'enregistrer chaque acquisition entre 600 et 900 nm pendant 5s.

Des acquisitions avec un morceau de feuille et un filament contenu dans de l'eau de mer filtrée ont également été effectuées afin de comparer les spectres bruts des échantillons.

CHIMIE DE LA MATTE

Résultats

1. Mesures avec les capteurs potentiométriques

1.1. Déplacements de la matte

L'expérience réalisée afin d'observer les déplacements de la matte confirme que celle-ci change d'aspect et de lieu au cours du temps (Fig. 23). En effet, au jour 1, on observe une matte fine, d'aspect duveteux uniforme entre les bâtons. Au jour 4, la matte est plus épaisse, mais morcelée à l'intérieur de ce même espace.

On peut donc conclure que la matte se déplace et change d'aspect au cours du temps.

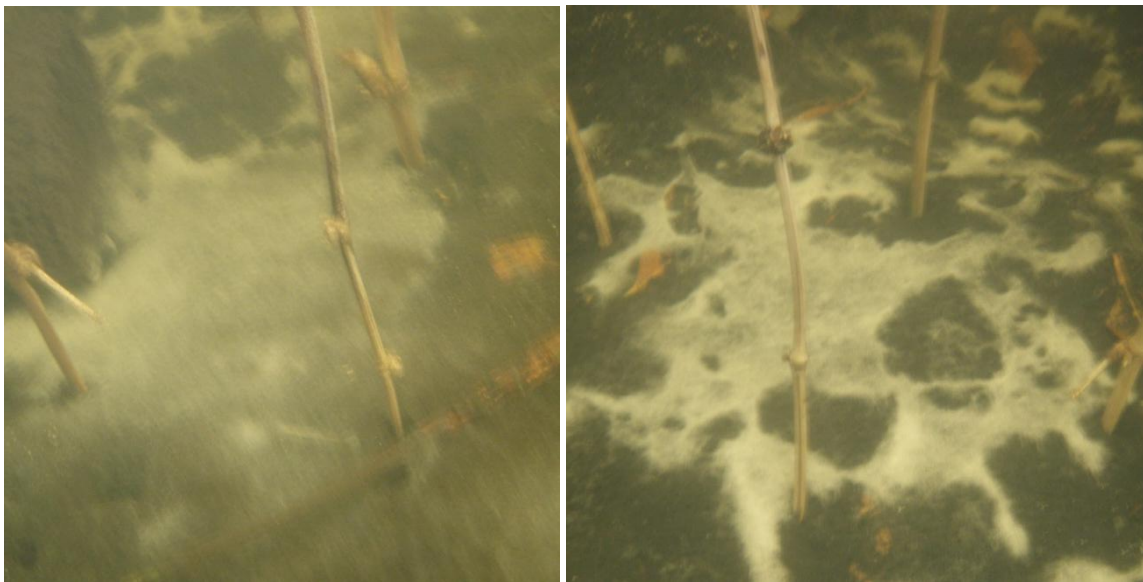


Figure 23: Deux photographies de la même zone comprise entre quatre bâtons prises à 4 jours d'intervalle.

1.2. Mesures à court terme

Ces mesures montrent une variabilité importante des concentrations en sulfures et du pH du milieu pendant les 4 jours d'enregistrement, se produisant sur des pas de temps faibles de l'ordre de 15 à 30 minutes.

La concentration en sulfures mesurée au début de l'expérience augmente sensiblement, passant de 1000 μM à 2200 μM durant les 6 premières heures

d'enregistrement. Ensuite, celle-ci tend à diminuer fortement et ne varie plus qu'entre 0 et 600 μM .

Ici, on observe que lorsque la concentration en sulfures augmente, il y a une augmentation du pH dans le milieu, ce qui est expliqué par les différents états des ions sulfures en fonction du pH (voir Matériel et méthodes).

On peut également noter l'existence de variations semblant se répéter de manière périodique. Ces valeurs étant corrélées à la hauteur d'eau observée à Pointe-à-Pitre (SHOM)¹, on peut donc conclure qu'il y a une augmentation de la concentration en sulfures et une augmentation du pH à marée haute (Fig. 24).

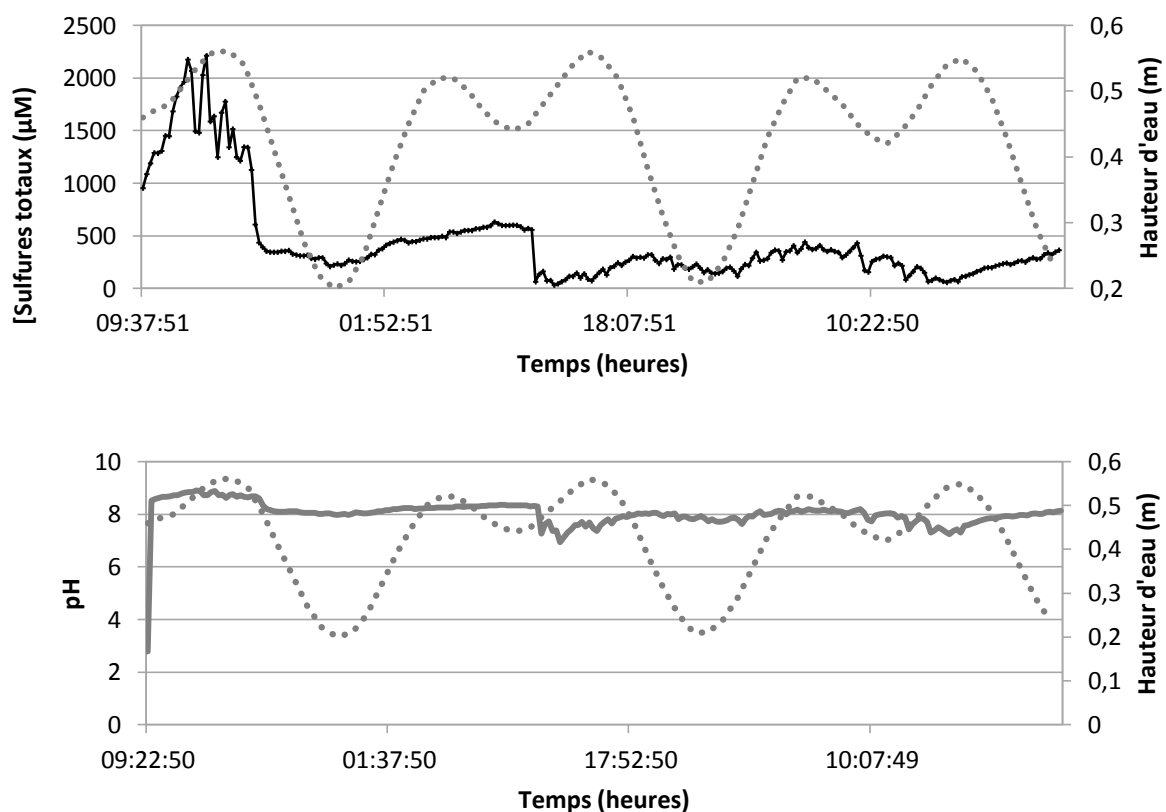


Figure 24: Représentation graphique des variations de concentrations en sulfures (en haut) et du de pH (en bas) à la surface de la matre de procaryotes mis en relation avec les hauteurs d'eau enregistrés à Pointe-à-Pitre pendant la durée de l'enregistrement.

¹ SHOM : Service Hydrographique et Océanologique de la Marine
<http://www.shom.fr/les-services-en-ligne/predictions-de-maree/predictions-en-ligne/>

De plus, les mesures faites en laboratoire en mésocosme démontrent une absence de variations périodiques des potentiels des capteurs sulfure et pH (Fig. 25), confirmant une influence de la marée sur la concentration en sulfures observée dans le milieu.

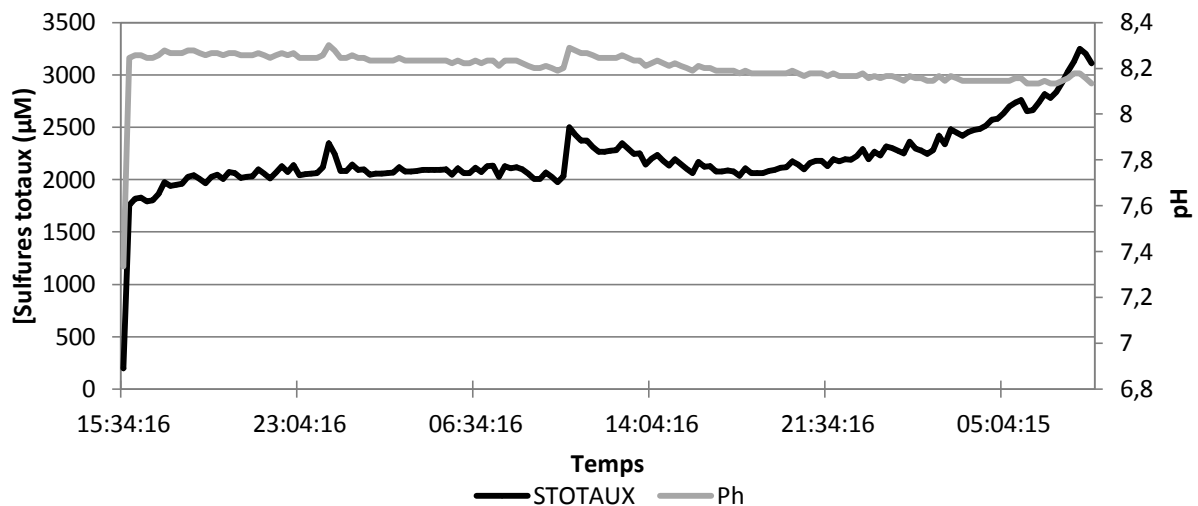


Figure 25: Représentation graphique des variations de concentrations en sulfures (en noir) et du de pH (en gris) enregistrés pendant 28h en mésocosme.

1.3. Mesures sur long-terme

Les concentrations en sulfures obtenues lors de la calibration de ces sondes sont des estimations. Ce sont les variations détectées par la sonde qui sont importantes et qui retiennent notre attention dans cette expérience. Il est important de noter que cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois au cours de la thèse. L'état de la matre a été contrôlé trois fois par semaine, tout au long de l'expérience. Ce pas de temps nous a semblé correct car nous n'avons jamais observé de changement important d'état de la matre, sur une échelle de temps court, en fonction de la marée ou sur une journée.

Les concentrations en sulfures et le pH sous le sédiment, présentent de fortes fluctuations rapides, plusieurs fois par jour, tout au long de la période d'enregistrement (Fig. 26). Toutefois, les concentrations en sulfures et le pH dans le milieu restent relativement stables pendant les 65 premiers jours, de 170 µM à 280 µM pour les sulfures, avec un pic à 50 µM en début d'expérience et de 7,3 à 7,4 pour le pH, avec un pic à 7,17 en début d'expérience. La concentration en sulfures augmente ensuite jusqu'à 1500 µM, tandis que le pH reste stable. Ensuite, le pH, augmente jusqu'à 8, tandis que la concentration en sulfures dans le milieu diminue

brusquement jusqu'à devenir nulle à deux reprises. La concentration en sulfures augmente ensuite jusqu'à atteindre une concentration maximale de 700 μM .

Tout au long de l'expérience, le sédiment n'a jamais été colonisé par une matte bactérienne.

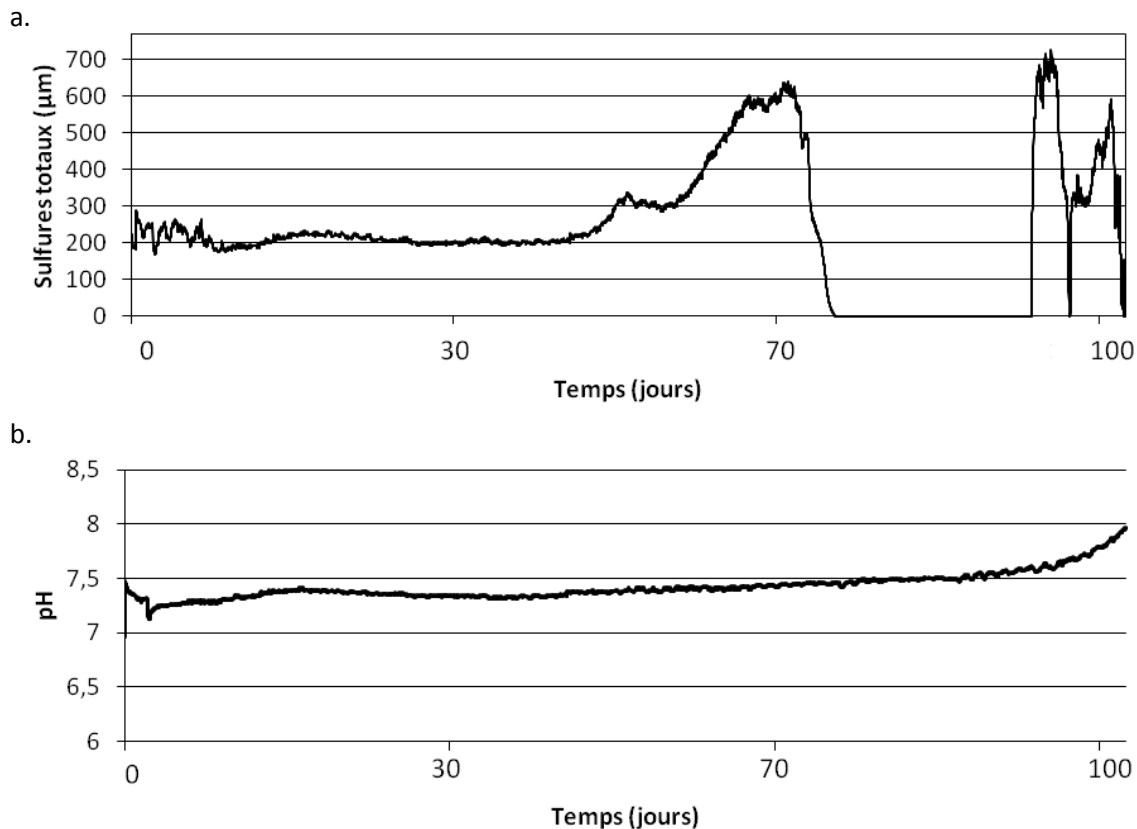


Figure 26: Représentation graphique des variations de la concentration en sulfures totaux (a.) et du pH (b.) pendant trois mois sous le sédiment sans matte.

Sous la matte, les enregistrements des concentrations en sulfures et du pH révèlent une forte variabilité sur une journée. Le pH peut ainsi varier de 0,2 unités et la concentration en sulfures de 100 μM en moins de 24 heures (Fig.27 a. et b.).

Dans les deux expériences menées sous la matte, les concentrations en sulfures varient d'une amplitude moyenne de 400 μM . Pour la sonde seule, les concentrations varient de 150 μM et 550 μM (Fig. 28), tandis que pour les sondes couplées, la concentration varie de 250 à 660 μM (Fig.27 b.). Les concentrations sont donc plus importantes au niveau de la sonde non couplée, à une sonde en sulfures. Le pH, lui varie de 6,85 à 7,27.

Au début de l'expérience, les trois courbes varient globalement de la même façon. On note en effet, une augmentation de la concentration en sulfures, tandis que la matte

change d'état et passe d'un aspect laineux épais, à une couche très fine. La concentration diminue ensuite progressivement jusqu'à $250 \mu\text{M}$ pour le couple de sondes (Fig. 27 b.) et $150 \mu\text{M}$ pour la sonde seule (Fig. 28). La matte disparaît ensuite totalement lorsque les concentrations en sulfure atteignent respectivement $260 \mu\text{M}$ pour la sonde couplée, et $195 \mu\text{M}$ pour la sonde seule et réapparaît quelques jours plus tard.

Pendant le temps où la matte est totalement absente de la zone de la sonde seule, la concentration en sulfures continue à diminuer tandis que la sonde couplée à la sonde pH enregistre seulement des fluctuations observables tout au long de l'expérience.

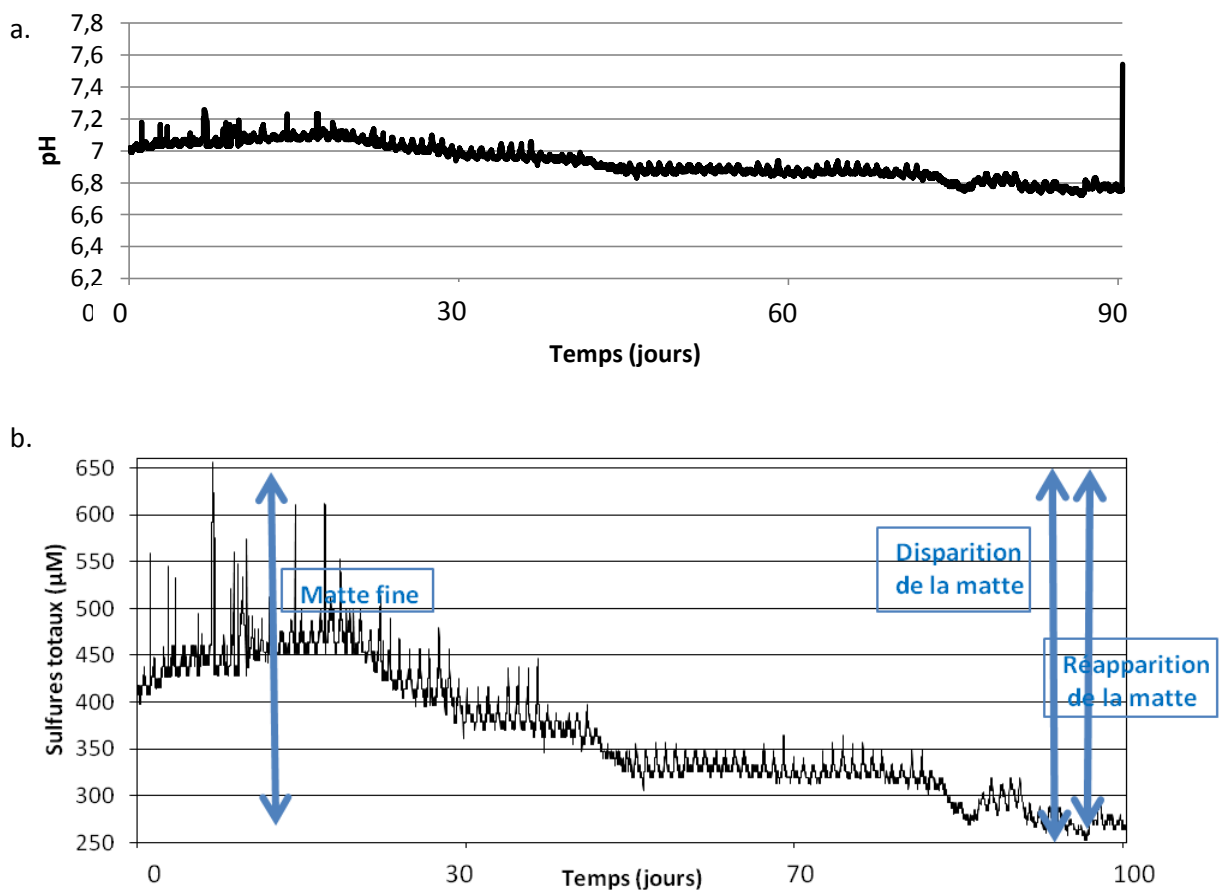


Figure 27: Représentation graphique des variations du pH (a.), et de la concentration en sulfures totaux (b.) sous la matte pendant trois mois.

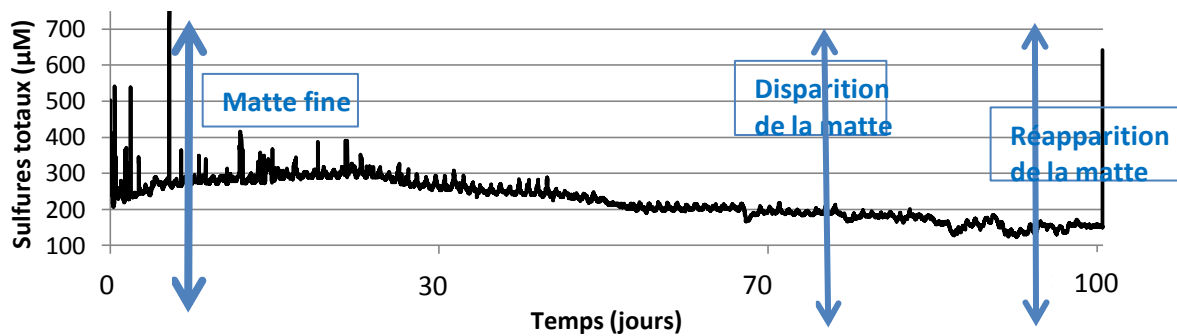


Figure 28: Représentation graphique des variations de la concentration en sulfures de la sonde seule sous la matrice pendant trois mois.

2. Mesures effectuées en mésocosmes avec les microcapteurs

Les profils des concentrations en oxygène, en absence de matrice montrent que celui-ci est présent à une concentration de 202 µM dans le milieu. Au voisinage du sédiment, la concentration en oxygène diminue d'abord progressivement jusqu'à 5 µM avant d'atteindre une concentration nulle dans les premiers millimètres du sédiment (Fig. 29 (a.)).

La concentration en H₂S, tout comme celle des sulfures totaux est nulle dans toute la colonne d'eau. En revanche, elle augmente à l'entrée même du sédiment pour atteindre une concentration de 17 µM. Le maximum est atteint à une profondeur de 37 mm avec une concentration de 137 µM.

Cependant, on peut noter que les concentrations en sulfures totaux sont bien supérieures à ces valeurs. En effet, à l'entrée dans le sédiment, on observe une concentration en sulfures totaux de 640 µM et un maximum de 4100 µM.

Lorsque l'on continue en profondeur (données non affichées sur le graphique), les concentrations en sulfures et en sulfures totaux ne cessent d'augmenter jusqu'à atteindre respectivement un maximum de 638 et 7700 µM pour une profondeur dans le sédiment de 7,5 mm.

En présence de matrice, la concentration d'oxygène dans le milieu diminue bien avant de pénétrer dans le sédiment. Effectivement, la teneur en oxygène du milieu est de 200 µM en haut de la colonne d'eau. Lorsque l'on approche de la matrice,

celle-ci diminue progressivement et devient nulle 1mm au dessus de la matte, soit 3mm avant l'entrée dans le sédiment (Fig. 29 (b.)).

La concentration en sulfures est nulle dans la colonne d'eau. Dans les 500 premiers micromètres de la matte, elle est à 1,6 μM . Elle progresse ensuite et atteint la valeur de 41,34 μM à l'entrée dans le sédiment, jusqu'à atteindre un maximum de 76 μM à une profondeur de 3mm. Comme précédemment lors des mesures, sans la matte, les concentrations de sulfures totaux (H_2S et HS^-) sont environ quarante fois plus importantes que celles en H_2S . La concentration en sulfures totaux est de 1775 μM à l'entrée dans le sédiment et atteint un maximum de 3241 μM à une profondeur de 3 mm.

Entre la matte et le sédiment, lorsque l'on observe la concentration en sulfures totaux, on peut observer une rupture de pente. La quantité de sulfure dans le milieu diminue plus vite dans la matte que dans le sédiment, au fur et à mesure de la remontée vers la surface.

En effet dans la matte, en 1mm, la quantité de sulfures dans le milieu diminue de 1500 μM , alors que dans le sédiment, elle diminue de la même quantité en 3 mm, soit le triple de profondeur.

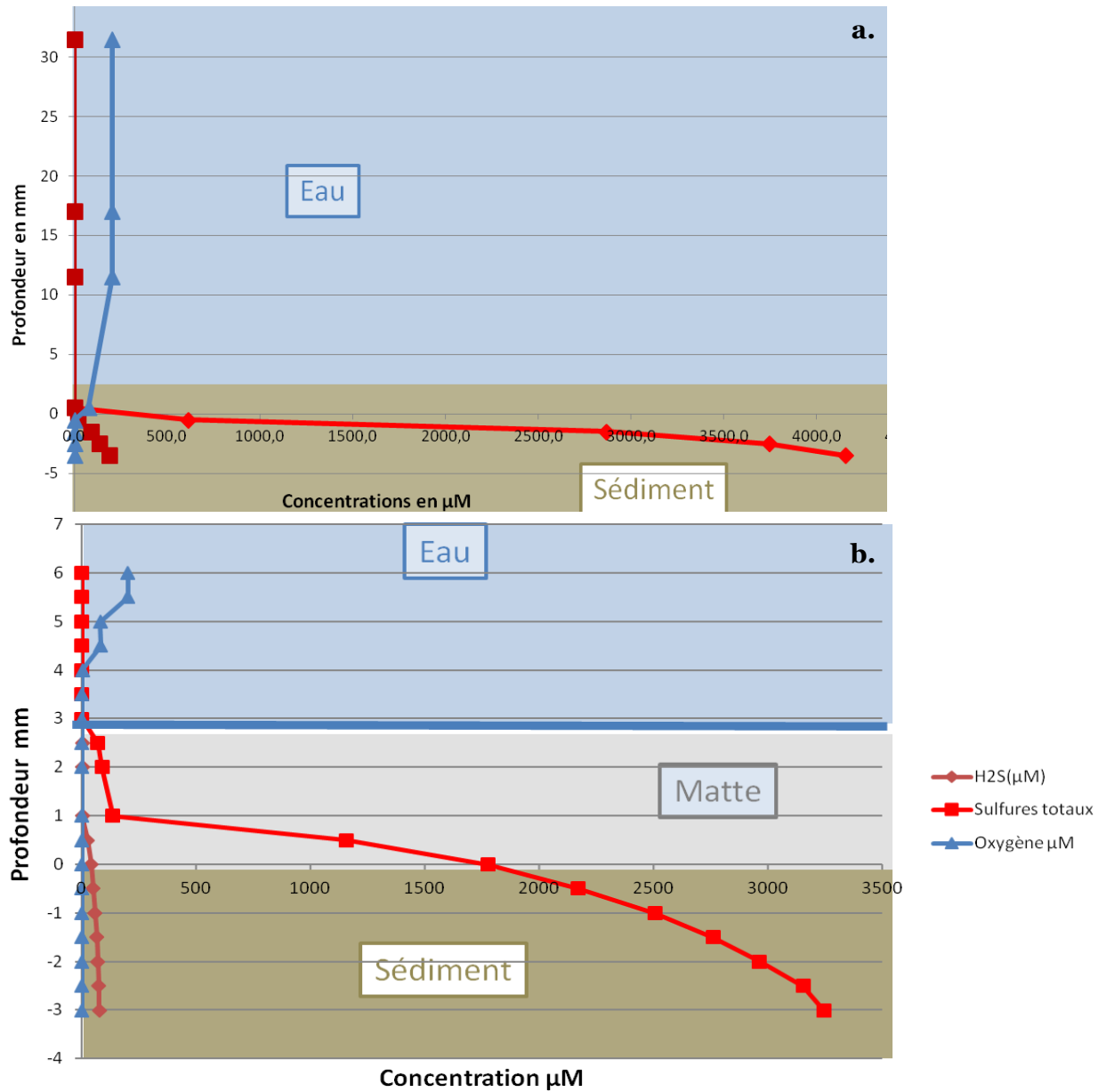


Figure 29: Profils des concentrations en H₂S (rouge avec triangles) en sulfures totaux (rouge avec carrés) et en oxygène (bleu) en fonction de la profondeur, sans mat (a) et avec mat (b).

Discussion

Bien que les concentrations en sulfures ne soient que des estimations, on peut noter que les valeurs obtenues sont cohérentes avec celles relevées lors des mesures en mésocosme. Les mesures effectuées *in situ* ont montré que la marée avait une influence sur les concentrations en sulfures dans la matte.

En effet les valeurs les plus basses de concentration de H₂S sont enregistrées à marée basse, et les valeurs les plus hautes à marée haute. Cette influence tidale avait déjà été observée précédemment dans la lagune lors des travaux sur les bois coulés (Laurent, 2009). Une des hypothèses avancée lors de cette étude était que ces variations de concentrations pourraient refléter le fait que les courants soient plus forts sur le site de la Manche-à-Eau lors de la marée basse (Mantran, 2009). Ces courants plus importants pourraient induire un lessivage de la couche enrichie en sulfures.

Cette hypothèse est en accord avec les résultats de Vopel *et al.* (2005) qui mettent en évidence la diminution de l'épaisseur de la couche riche en sulfures lors de courants forts à la base des colonies de ciliés *Zoothamnium niveum*. Au moment des courants forts, cette couche réduite est remplacée par une couche oxygénée, contrairement au phénomène observé lorsque les courants sont moins importants, où la couche réduite est plus dense.

Lors de la série de mesures longues, on observe des fluctuations sur de courtes périodes. Celles-ci peuvent être le reflet des fluctuations dues à la marée, comme observé lors des courtes périodes. Le but de cette expérience était de mettre en relation les fluctuations en sulfures du sédiment avec les mouvements de la matte.

Ici, on remarque dans les deux cas, que bien que la concentration en sulfures n'augmente pas dans le milieu, la matte change néanmoins d'aspect en devenant plus fine. De plus, dans le cas de la sonde seule, bien que la concentration diminue encore dans le milieu après la disparition totale de la matte, celle-ci recolonise la zone. On ne peut donc pas corréler directement les déplacements de la matte avec les concentrations en sulfures.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer les changements d'état de la matte dans la période étudiée.

Tout d'abord, il est possible que bien que la concentration dans leur milieu initial augmente, la matte blanche se soit déplacée dans un environnement où les concentrations en sulfures étaient plus importantes aux alentours de la zone étudiée. Toutefois, les observations dans le milieu ne peuvent appuyer cette hypothèse, la matte présentant un aspect fin dans une grande zone autour de celle étudiée. De tels changements d'aspects sont récurrents dans l'année, à plusieurs reprises, la matte présente un aspect très fin. Lors de ces trois années d'étude, il a pu être observé que ces changements d'états étaient périodiques et se reproduisaient toujours à la même période.

En effet, en 2010 et 2011, dans la période de décembre à mars, la matte présente un aspect fin morcelé. L'année 2012 ne peut être prise en compte en raison de la consommation massive de la matte par des mollusques du genre *Aplysia*, qui l'ont totalement fait disparaître en surface. Toutefois, des facteurs environnementaux liés à ces périodes peuvent être pris en compte pour expliquer les variations d'état du tapis bactérien.

Cette période de l'année est celle où les températures les plus froides sont relevées dans les eaux tropicales de la Guadeloupe (Fig. 30) (F. Bompuy, communication personnelle). Dans une eau plus froide, l'oxygène se dissout plus facilement. Etant présent en concentrations plus grandes dans le milieu, il pourrait pénétrer plus profondément dans le sédiment. Les bactéries sulfo-oxydantes n'auraient donc pas besoin de remonter en surface de la matte afin de prélever l'oxygène nécessaire à l'oxydation des sulfures et peuvent rester enfouies dans les premiers millimètres du sédiment. En revanche, en été, lorsque la température augmente et que l'oxygène dissout diminue dans le milieu, des mattes blanches sont plus nombreuses dans la journée, prenant un aspect laineux. Bien que l'écart de température soit bien moindre en l'absence de vraies saisons en milieu tropical, il n'est pas exclu qu'un tel phénomène puisse se produire.

Cette théorie, serait en accord avec les observations faites par Fenchel & Bernard (1995) dans les eaux danoises sur les *Beggiatoa*, bien que les observations soient inversées. Au Danemark, en hiver, la luminosité est plus faible et la population d'organismes phototrophes diminue, l'oxygène est donc présent dans le milieu à de plus faibles concentrations et les *Beggiatoa* remontent à la surface pour pouvoir oxyder des sulfures. En été, les organismes phototrophes sont présents en plus grande quantité permettant une plus grande production d'oxygène, les *Beggiatoa*

peuvent donc rester enfouis dans le sédiment la journée et ne remontent que pendant la nuit, lorsque le sédiment devient anoxique.

Sous les tropiques, la luminosité change peu en fonction de la période de l'année, et reste suffisante pour les organismes phototrophes qui sont donc toujours présents en quantité importante. Toutefois, la température de l'eau peut varier de plusieurs degrés (Fig. 30), pouvant induire des modifications du taux d'oxygène dissout dans le milieu, ce qui pourrait expliquer les changements d'état de la matte à cette période de l'année. Une observation de nuit pendant cette période pourrait permettre de répondre à ces interrogations et de valider, ou d'invalider cette hypothèse, car si les bactéries sont présentes en profondeur, elles remonteront pendant la nuit afin de capter l'oxygène présent dans le milieu.

Il est important de noter que les déplacements de la matte ont lieu toute l'année et que bien que notre expérience n'ait pu prouver que l'hétérogénéité des sulfures émis par le sédiment en soit la cause, rien à ce jour, ne permet de réfuter totalement cette hypothèse.

Il est important de noter que les mesures effectuées *in situ*, n'ont été effectuées qu'une fois. En effet, bien que les capteurs potentiométriques soient capables de fournir une information sur la concentration en sulfures, celle-ci reste une estimation, en raison de la déviation des mesures sur une longue durée, malgré les corrections. Le caractère qui semblait le plus important dans cette expérience était l'observation des fluctuations de concentrations dans le milieu. L'hétérogénéité du sédiment quant à sa concentration en sulfures, rend ces expériences d'un point de vue des valeurs de concentrations au cours du temps peu reproductibles. Cependant, le comportement de la matte au cours du temps ne semblant pas corrélé aux concentrations en sulfures dans le sédiment, il est probable que celui-ci reste inchangé en fonction des périodes de l'année.

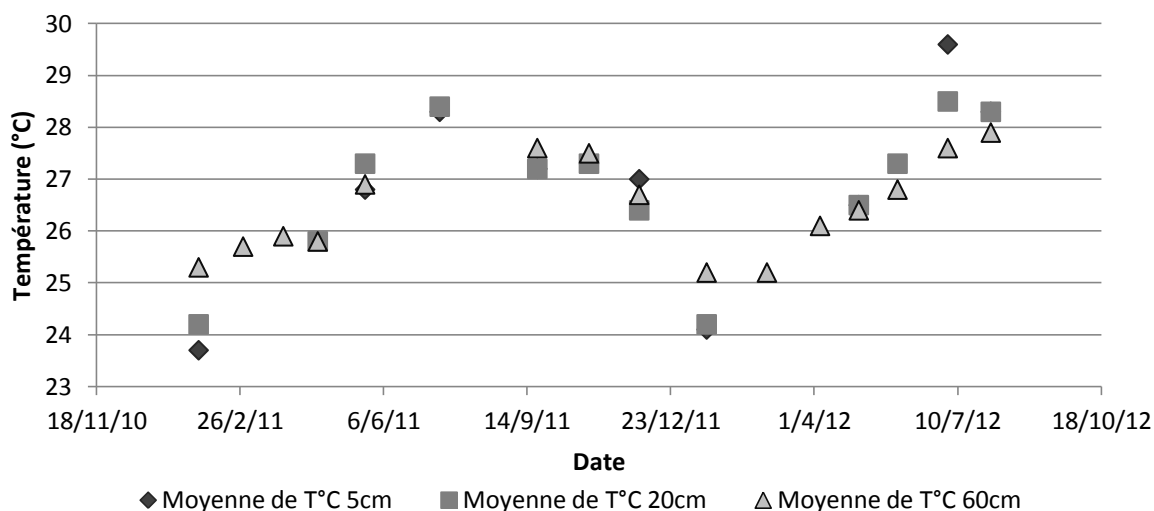


Figure 30: Moyenne des températures à plusieurs profondeurs (5 cm, 20 cm, 60 cm et 1m) d'une nappe d'eau de mangrove située à quinze mètres de la bordure de racines de palétuviers (F. Bompy, données non publiées).

Les mesures en mésocosme sont cohérentes avec ce qui a été observé précédemment dans différentes études. En mangrove dans la partie marine, Lee (2008), a mis en évidence que les taux de sulfures augmentaient avec la profondeur, et que l'oxygène se trouvait totalement consommé environ 1 à 2 cm avant l'entrée dans la matte. Dans notre étude, la zone anoxique intervient seulement quelques millimètres avant la matte. Toutefois, à l'entrée de la matte, on se situe déjà dans une zone sub-oxique. Une différence notable est observable au niveau des concentrations en sulfures relevées dans le sédiment de la mangrove du Belize, qui atteignent 40 mM à 40 cm dans le sédiment (Lee, 2008), il faut attendre 5 cm pour observer une concentration de 3 mM, contrairement à notre étude où cette concentration est atteinte dès 2 mm.

Ces écarts observés peuvent s'expliquer par le caractère confiné du mésocosme, où la production en H₂S des bactéries sulfato-réductrices dans le sédiment dispose de moins d'espace pour se diffuser. Cette étude est la seule à avoir été réalisée en mangrove. Dans les autres études où l'on peut retrouver une étude des profils en sulfure et en hydrogène dans le sédiment, les résultats sont toujours conformes avec ceux obtenus lors de nos travaux. En effet, la consommation de l'oxygène intervient dans les premiers millimètres dans le sédiment dans le cas où il n'y a pas de matte, et les taux de sulfures augmentent avec la profondeur (Dillon *et al.*, 1999; Schauer *et al.*, 2011).

Dans les mesures en mésocosme, on peut noter que bien que l'oxygène soit totalement consommé dès l'entrée dans la matte, les *Beggiatoaceae* s'y développent tout de même. Ceci peut être expliqué par deux phénomènes. Soit, toutes les bactéries sulfo-oxydantes ont assez d'oxygène pour pouvoir oxyder les sulfures, soit, les *Beggiatoa* profitent de la présence d'oxygène pour oxyder les sulfures, mais également pour oxyder l'ammonium diffusant de la zone anoxique en nitrates. Elles peuvent alors utiliser ces nitrates pour oxyder les sulfures en zone anoxique.

En effet, plusieurs études ont démontré que toutes les *Beggiatoa* connues de grande taille possèdent des vacuoles contenant des nitrates (McHatton *et al.*, 1996; Salman *et al.*, 2011). Les nitrates stockés dans les vacuoles lors des processus de nitrification aérobie, peuvent être utilisés pour l'oxydation des sulfures, par l'intermédiaire de la dénitrification, lorsque les organismes manquent d'oxygène (Fig. 31). Ceci expliquerait que dans un environnement anoxique, comme ce qui est observé dans les mesures en mésocosme, les *Beggiatoaceae* soient capables d'effectuer la sulfo-oxydation.

Ainsi, de forts taux de nitrification ont déjà été observés dans les mattes de *Beggiatoa*, cependant, ils ne sont probablement pas dus à leur seule activité (de Albuquerque *et al.*, 2010). Au sein de notre laboratoire, des travaux d'une thèse en cours ont également démontré que la matte était capable d'oxyder l'ammonium provenant du sédiment en nitrates, conformément à notre hypothèse (A. Boc, communication personnelle).

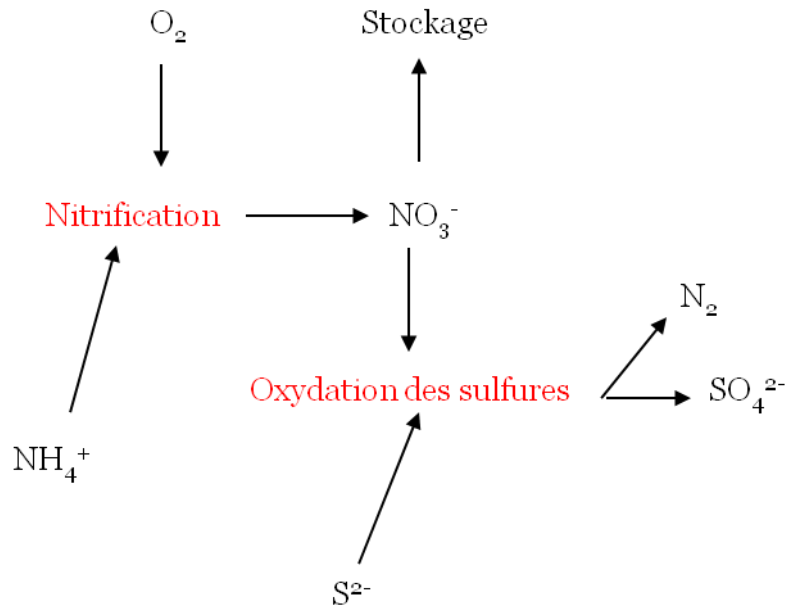


Figure 31: La nitrification et la dénitrification sont des intermédiaires possibles de l'oxydation en sulfates, des sulfures par l'oxygène (d'après Fenchel, 1995).

D'après ces données, il est possible d'affirmer que la matte consomme le soufre produit par les bactéries sulfato réductrices du sédiment. Elle fait donc partie des organismes entrant dans le cycle du soufre se déroulant dans la mangrove. La matte permet ainsi la détoxification du milieu et le développement d'autres organismes incapables d'oxyder les sulfures en provenance du sédiment.

L'étude chimique du milieu nous a permis de mettre en évidence certains facteurs pouvant influencer le développement des bactéries mais surtout, de pouvoir placer la matte au sein des cycles biogéochimiques dans lesquels elle était susceptible d'intervenir. La suite de ce manuscrit aura pour but d'identifier les principales bactéries filamenteuses de la matte, ainsi que leur rôle au sein de celle-ci.

BACTÉRIES
THIOTROPES

Résultats

1. Présentation de la matre

L'observation à la loupe binoculaire de la matre montre que celle-ci est un enchevêtrement de filaments de différentes couleurs et de différentes tailles (Fig.21). Toutefois, en fonction des sites de prélèvements, et de la période de l'année, la composition de la matre est différente. En effet, il peut être rencontré jusqu'à sept morphotypes différents présents en plus ou moins grande quantité, en fonction des prélèvements et pouvant même être absents de la matre. Tous ont été baptisés en fonction de leur taille et de leur couleur. On rencontre ainsi les filaments « *Beggiatoa*-morphotype 1 », « *Beggiatoa*-morphotype 2 », « Cyanobactérie-1 », « Cyanobactéries 2 », « *Oscillatoria* 1 » et « *Oscillatoria* 2 ». Les *Beggiatoa*-morphotype 2 sont les seuls filaments à être omniprésents dans la matre de procaryotes.



Figure 32: Photographie de la matre à la loupe binoculaire mettant en évidence les *Beggiatoa* morphotype 1 (flèche pleine noire ; gros filament blanc), les *Beggiatoa* morphotype 2 (petite flèche noire ; petit filament blanc), Cyanobactérie 1 (petite flèche bleue ; filament rose) ; les Cyanobactérie 2 (flèche pleine bleue ; filament noir), les *Oscillatoria* 1 (flèche pleine blanche ; gros filament vert), et les *Oscillatoria* 2 (petite flèche blanche ; petit filament vert).

2. Analyses E.D.X.

2.1. «*Beggiatoa* morphotype 1»

L'observation des «*Beggiatoa* morphotype 1» au microscope électronique à balayage en électrons rétrodiffusés montre des régions de densité atomique plus importante (apparaissant plus claires sur les images). Ces régions plus denses pourraient donc correspondre à des éléments chimiques comme le soufre. Afin de déterminer la nature de ces éléments, une analyse EDX (Fig.33) suivie d'une cartographie des éléments détectés a été faite (Fig. 34).

Le spectre EDX obtenu présente un pic de soufre important, ce qui montre que la bactérie contient du soufre. On remarque également la présence d'autres pics correspondant probablement aux autres éléments de la bactérie, ou à la surface sur laquelle elle repose. La cartographie du carbone et de l'oxygène dans l'échantillon ne fait pas apparaître celui-ci à l'image (Fig. 34 b et c). Ceci s'explique par le fait, que l'échantillon est posé sur un adhésif en carbone qui émet donc un signal fort en carbone. En revanche, la cartographie du soufre met en évidence la présence de celui-ci dans la bactérie, au niveau des régions de plus fortes densités atomiques. Le filament est donc bien un organisme thiotrophe.

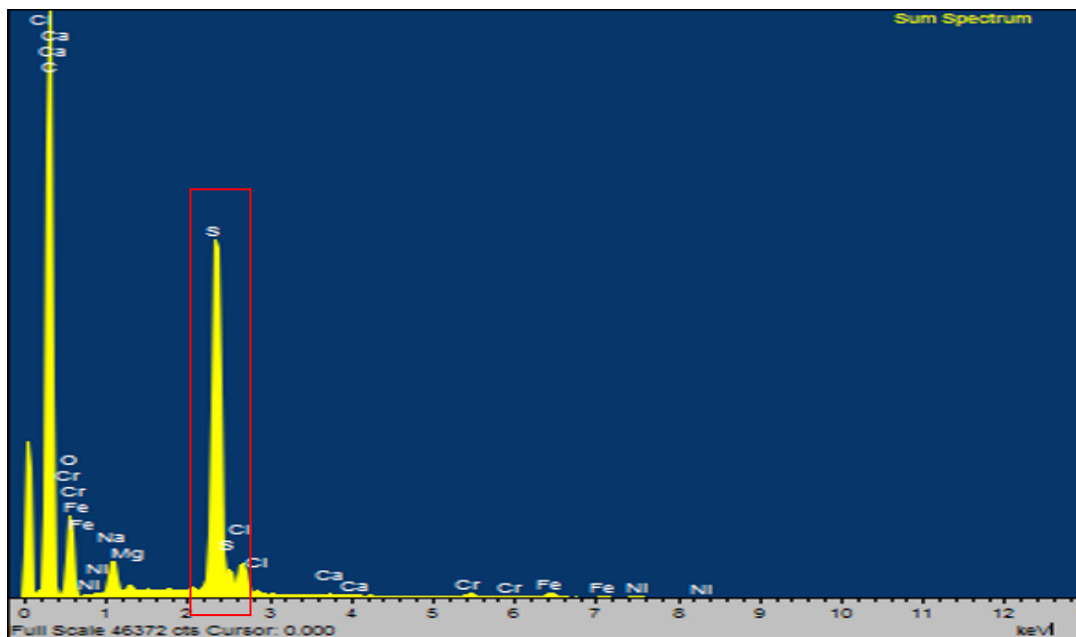


Figure 33 : Représentation graphique du spectre EDX de «*Beggiatoa* morphotype 1».

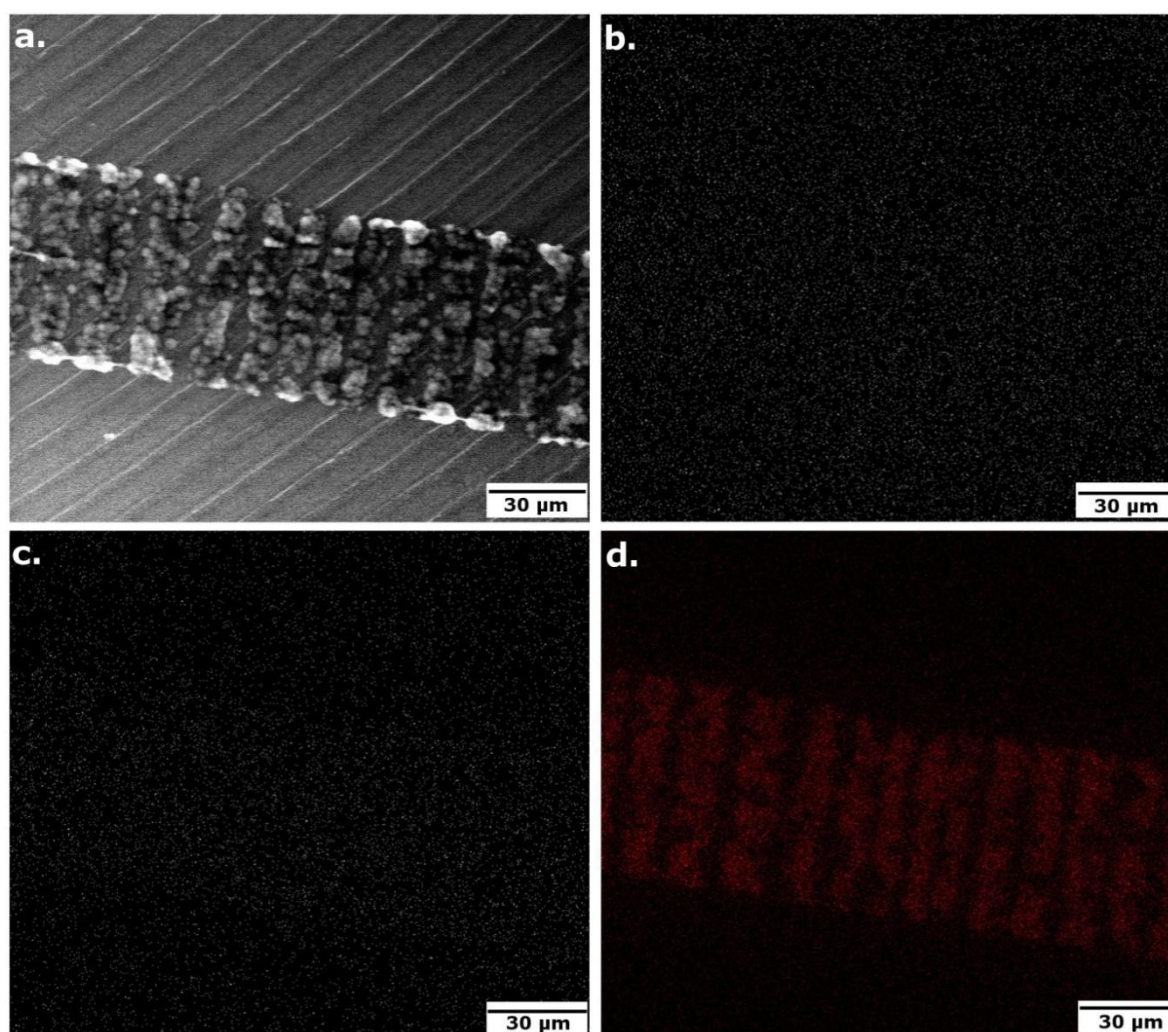


Figure 34: (a.) Microphotographie électronique de « *Beggiatoa morphotype 1* ». Cartographies EDX des éléments carbone (b.), oxygène (c.) et soufre (d.) dans le filament bactérien.

2.2. « *Beggiatoa morphotype 2* »

L'observation au MEB environnemental, en mode électrons rétrodiffusés, montre des taches blanches sur le filament (Fig. 36 a.). Le spectre EDX du filament (Fig. 35), nous montre la présence de nombreux éléments chimiques. Beaucoup sont des composants habituels des cellules vivantes, (carbone, azote, oxygène), toutefois, on note la présence de nombreux éléments provenant en fait du porte échantillon (chrome, fer, nickel, manganèse), sur lequel est déposé le filament, contrairement au spectre précédent (Fig. 33), où le filament était déposé sur un adhésif en carbone.

Un très fort pic de soufre peut également être observé, qui n'est pas présent lorsque le spectre EDX de l'adhésif est effectué. Le soufre étant absent du porte échantillon, on

peut donc conclure qu'il se situe dans l'organisme observé. Le filament contient donc bien du soufre.

Ceci est confirmé par la cartographie EDX localise le soufre au niveau des taches blanches (Fig. 36d). Les témoins carbone et oxygène (Fig 36 b et c), montrent que ces éléments sont présents uniformément dans l'adhésif en carbone, comme dans le filament.

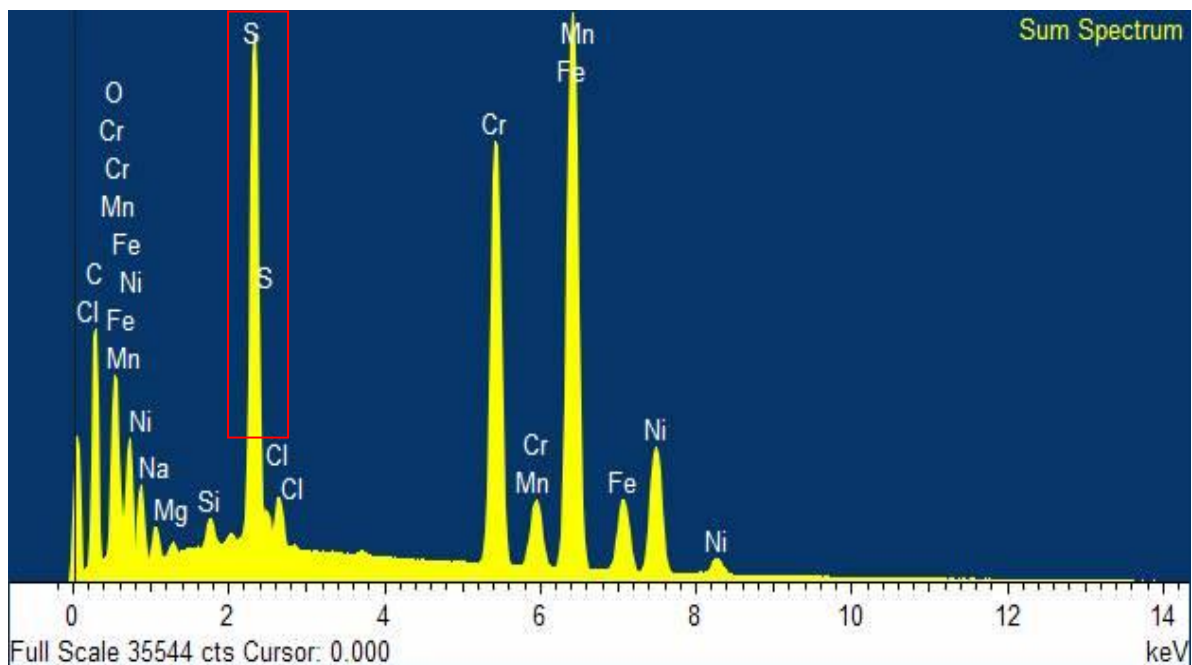


Figure 35: Représentation graphique du spectre EDX des «*Beggiatoa morphotype 2*».

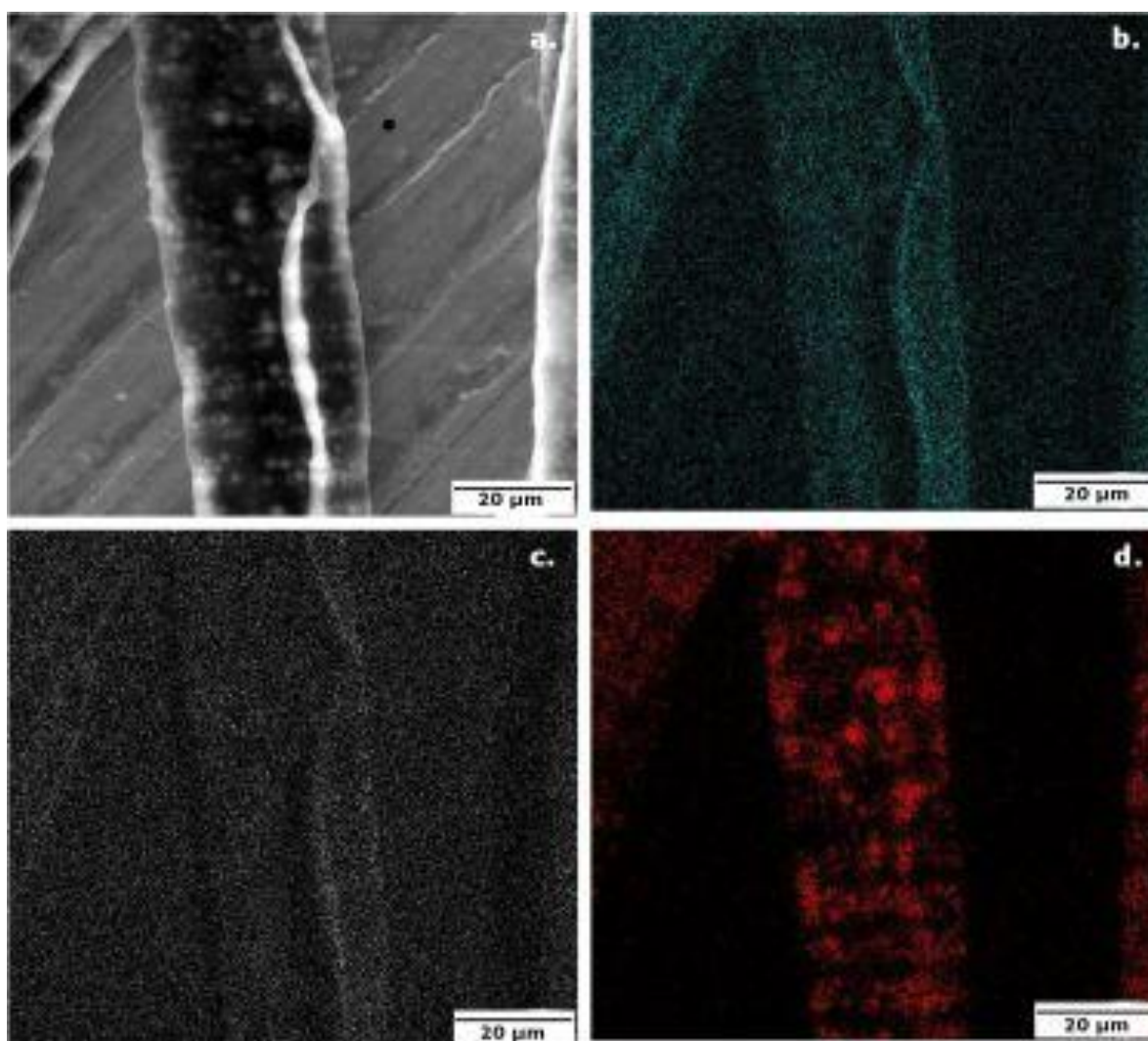


Figure 36: (a.) Photographie de microscopie électronique de « *Beggiatoa* morphotype 2 » mode électrons rétrodiffusés. Cartographies des éléments chimiques Carbone (b.), Oxygène (c.) et Soufre (d.), dans le filament bactérien.

3. Microscopie photonique

Les filaments des *Beggiatoaceae* de la matre, bien que de longueur variable et de diamètre différent, possèdent tous la même structure. On retrouve sur chaque filament un empilement de cellules, dont la membrane interne est bien visible au microscope optique (Fig. 37). Chaque cellule du filament mesure $59,34 \pm 2,54 \mu\text{m}$ de large μm par $18,6\mu\text{m} \pm 0,9 \mu\text{m}$ de haut pour les « *Beggiatoa* morphotype 1 », tandis que les cellules de « *Beggiatoa* morphotype 2 » mesurent $30,22 \pm 3,21\mu\text{m}$ de, sur $3,8 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de haut.

De plus, on note un épaissement au niveau de la membrane externe des cellules composant les filaments des deux espèces, laissant supposer la présence

d'une gangue externe (Fig. 37). De petites vacuoles sont également observables dans chaque cellule du filament. On remarque que ces vacuoles sont situées sur les membranes internes de la cellule, mais semblent en microscopie photonique absentes des membranes intercellulaires.

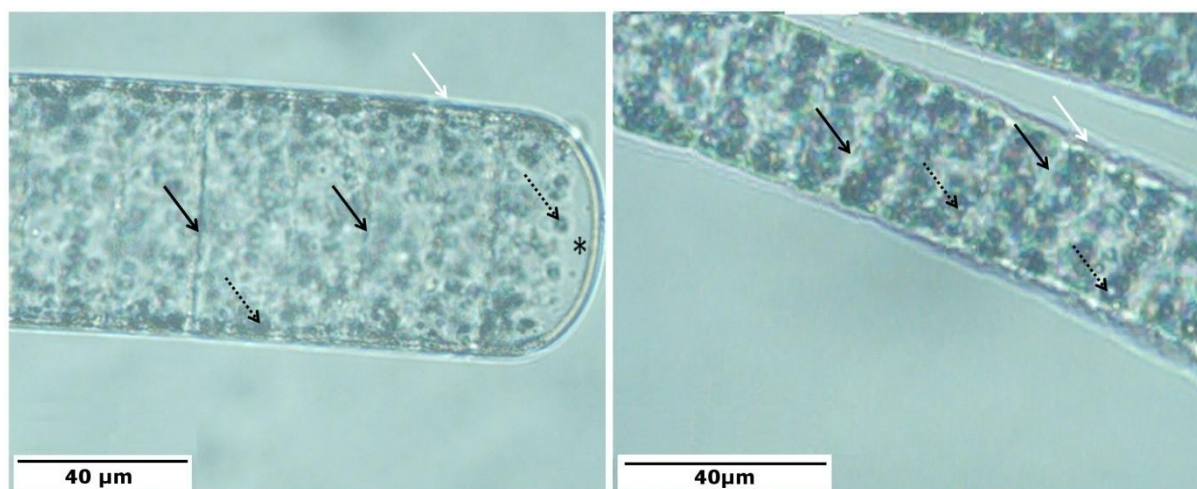


Figure 37: Photographie en microscopie photonique des filaments de « *Beggiatoa* morphotype 1 » à droite et « *Beggiatoa* morphotype 2 » à gauche. Les membranes internes sont mises en évidence par les flèches noires, la gangue externe par les flèches blanches et les vacuoles internes par les flèches en pointillés. On peut apercevoir l'apex du filament de « *Beggiatoa* morphotype 2 » (étoile).

4. Microscopie électronique

L'étude des filaments au MEB met en évidence des membranes externes dépourvues de bactéries (Fig. 38).

La structure en bourrelets est retrouvée sur les images de microscopie électronique à balayage des « *Beggiatoa* morphotype 1 » (Fig. 38) et la fracture montre la délimitation interne de chaque cellule. On remarque également la présence de nombreuses petites vacuoles laissées vides après les différents traitements effectués pour la MEB qui pourraient avoir contenu les granules de soufre (flèches blanches). Comme le laissent supposer les photos de microscopie photonique, les vacuoles ne sont pas présentes sur les membranes intercellulaires (flèche noire).

On remarque également l'absence de la membrane externe visible en microscopie photonique. Cette gangue est détruite par le passage au point critique et n'est ainsi pas visible en microscopie électronique à balayage.

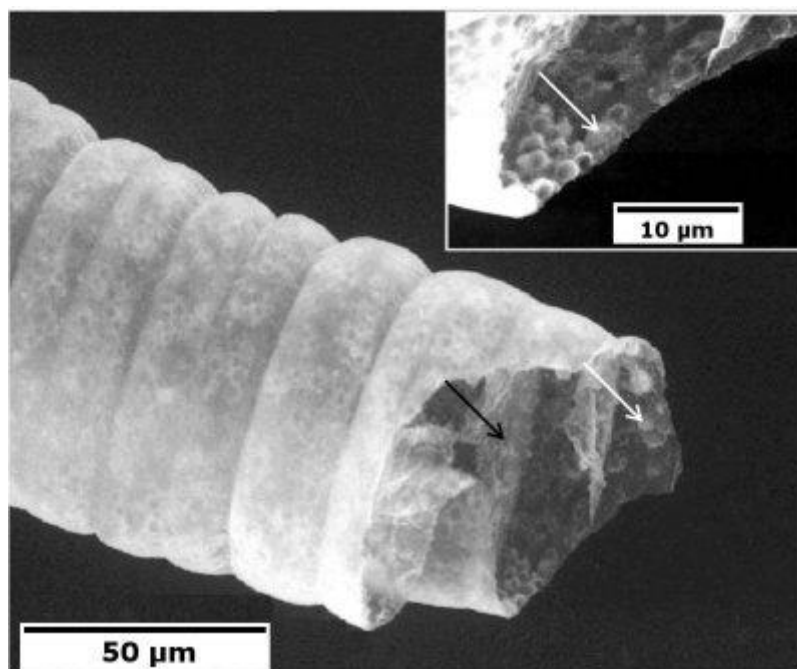


Figure 38: Microphotographies de microscopie électronique à balayage d'un filament « *Beggiatoa* morphotype 1 ».

Des coupes ultrafines longitudinales des deux morphotypes de *Beggiatoa* ont été effectuées, pour évaluer les interactions possibles entre les vésicules et la membrane.

L'aspect tordu des coupes est lié à des artefacts de préparation. Les filaments sont des organismes relativement fins ayant tendance à se replier, ce qui rend difficile les coupes longitudinales. Néanmoins, on peut observer que les membranes intercellulaires internes sont dans les deux morphotypes dépourvues de vésicules (Fig. 39), tandis que les membranes externes sont recouvertes de vésicules de différentes tailles sur leur face interne, donnant à la cellule un aspect granuleux. Certaines des vésicules semblent liées à la membrane, mais aucune ne paraît fusionner directement avec elle. En revanche, toutes les vésicules sont périplasmiques, aucune d'entre elles n'est retrouvée dans le cytoplasme, conformément à ce qui a été précédemment observé chez les *Beggiatoa* (Strohl *et al.*, 1981).

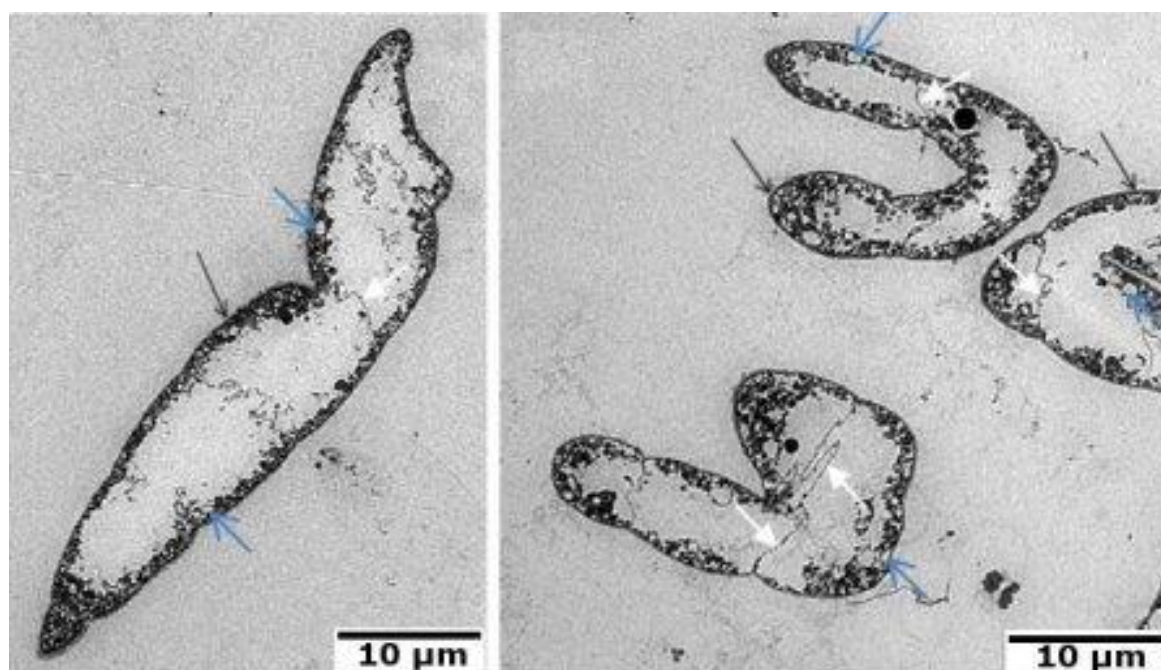


Figure 39: Microphotographies électroniques à transmission des *Beggiatoa* morphotype 1 (a.) et 2 (b.). Les inclusions de soufre (flèches bleues) tapissent l'intérieur des membranes externes (flèches noires) tandis que les membranes intercellulaires (flèches blanches) en sont dépourvues.

5. Analyses phylogénétiques

Afin d'analyser les séquences de l'ADNr 16S des deux morphotypes de *Beggiatoa* de notre étude, nous les avons comparées à des séquences d'autres bactéries non colorées sulfo-oxydantes.

La bactérie *E. coli* a été choisie comme extra-groupe afin d'enraciner l'arbre (Fig. 40). Dans cet arbre, deux branches peuvent être distinguées. Tout d'abord, la branche formée par les bactéries sulfo-oxydantes non apparentées aux *Beggiatoa* (genres *Leucothrix*, *Thiothrix* et *Achromatium*), puis celle formée par des bactéries du genre *Thioploca* et *Beggiatoa*.

Cette branche formée par les bactéries du genre *Thioploca* et *Beggiatoa*, se divise en deux sous groupes, d'une part l'espèce type, *Beggiatoa alba* qui forme une branche isolée, et d'autre part plusieurs groupes frères, correspondant aux groupes proposés par Salman et collaborateurs (2011). Parmi ces groupes frères, on retrouve le groupe *Isobeggiatoa* formant une branche plus éloignée des quatre autres groupes. De plus, les groupes *Parabeggiatoa* et *Thioploca* sont issus d'une branche commune, alors que les groupes *Maribeggiatoa* et *Marithioploca* sont issus d'une autre branche.

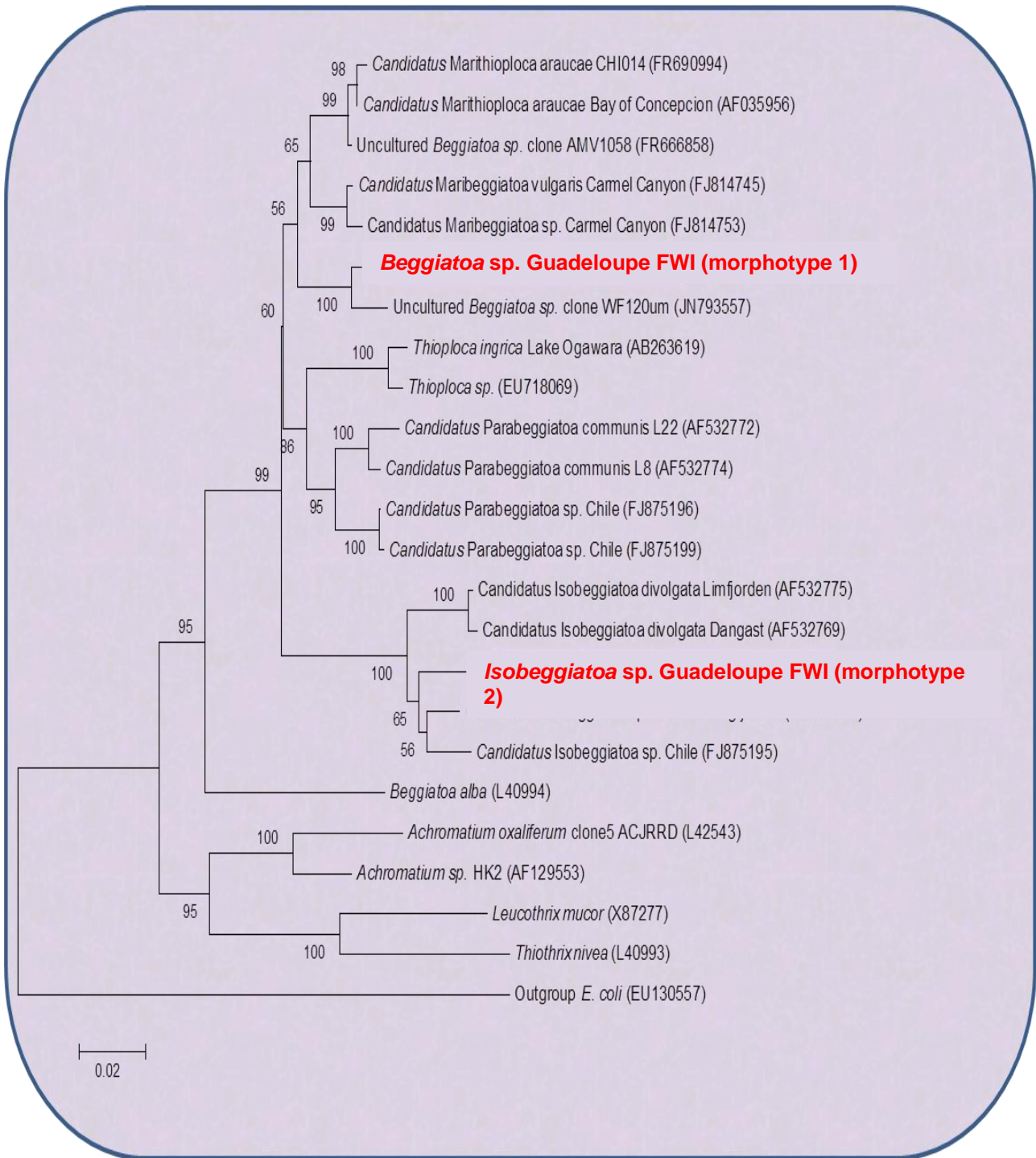


Figure 40: Arbre décrivant les relations phylogénétiques entre les *Beggiatoa* morphotypes 1 et 2 (en rouge) et d'autres bactéries sulfo-oxydantes filamenteuses. Arbre basé sur l'analyse des séquences de 925 nucléotides du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S et la méthode de Neighbor Joining. *E. coli* a été choisie comme groupe externe. Les valeurs aux nœuds indiquent les valeurs de bootstrap. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées (S. Gonzalez-Rizzo).

Dans la branche donnant naissance aux groupes *Maribeggiatoa* et *Marithioploca*, on remarque qu'il existe un troisième groupe, plus éloigné phylogénétiquement des deux autres, comprenant deux espèces, le morphotype *Beggiatoa* 1 et une autre espèce de grande taille (120 μm) découvertes il y a peu (McKay *et al.*, 2012). Ces deux espèces partagent 89,6% de leurs séquences (Tableau 4), ce qui les rend relativement distantes l'une de l'autre. On peut également noter que le morphotype 1 ne possède que 85% d'homologie avec l'espèce type *Beggiatoa alba*. De plus, certaines séquences sont plus homologues à celles du morphotype 1, que celles appartenant au même cluster, comme par exemple le morphotype 2 qui partage 90,8% des séquences avec le morphotype 1.

En raison de la grande taille du filament et de sa position isolée par rapport aux groupes proposés par Salman et collaborateurs (2011), ce filament a été nommé uncultured *Beggiatoa* sp. Guadeloupe FWI selon l'ancienne dénomination, tout comme l'autre espèce appartenant à ce cluster.

Les groupes les plus proches du morphotype 2 sont les *Marithioploca* et les *Maribeggiatoa*. Le groupe des *Marithioploca* comporte des filaments libres, tout comme des filaments multiples enserrés dans une gaine commune d'un diamètre compris entre 12 et 37 μm , et présentant des vacuoles de nitrates (Salman *et al.*, 2011). Le groupe des *Maribeggiatoa*, lui, est composé de filaments d'un diamètre généralement compris entre 65 to 85 μm , mais pouvant être également plus petits, de 20 à 30 μm . Ces bactéries sont retrouvées sous forme de filaments libres présentant également des vacuoles internes contenant des nitrates.

La *Beggiatoa* morphotype 2, en revanche, se situe clairement dans le groupe des *Isobeggiatoa*, elle a donc été renommée *Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI, conformément aux propositions de Salman et collaborateurs, (2011). La séquence utilisée pour identifier ce morphotype possède une homologie semblable à plus de 89% à celles des autres espèces de ce groupe (Tableau 4). De plus il existe une division au sein de ce groupe, qui forme deux branches, la séquence de l'ADNr 16S du morphotype 2 partageant plus de 90% d'homologie avec les séquences des autres espèces de ce groupe.

Le genre *Isobeggiatoa* est un groupe dont les micro-organismes constitutifs présentent une morphologie comparable aux *Beggiatoa* avec des trichomes libres de diamètre compris entre 10 et 40 μm et se déplaçant par glissement.

Tableau 4: Matrice d'homologie entre les séquences de 925 paires de bases de l'ADNr 16S des différentes espèces utilisées pour contruire l'arbre phylogénétique des bactéries thiotrophes. Sont indiqués en rouge les pourcentages d'homologie entre les séquences des deux morphotypes de *Beggiatoa* retrouvés dans cette étude et les autres espèces choisies pour former l'arbre phylogénétique.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	
1. <i>Achromatium oxaliferum</i> clone5 ACJRRD (L42543)																									
2. <i>Achromatium</i> sp. HK2 (AF129553)	93,7																								
3. <i>Leucothrix mucor</i> (X87277)	82,8	85,3																							
4. <i>Thiothrix nivea</i> (L40993)	82,8	84,3	85,8																						
5. <i>Isobeggiatoa</i> sp. Antilles FWI	79,7	80,2	77,1	75,5																					
6. <i>Ca. Isobeggiatoa</i> sp Smeerenburgfjorden (FN561862)	81,8	82,7	79,2	77,5	93,8																				
7. <i>Ca. Isobeggiatoa divolgata</i> Limfjorden (AF532775)	82,1	82,8	79,9	77,8	91,8	94,6																			
8. <i>Ca. Isobeggiatoa divolgata</i> Dangast (AF532769)	81,9	82,4	79,8	77,8	91,8	94,6	99,0																		
9. <i>Ca. Isobeggiatoa</i> sp Chile (FJ875195)	81,0	82,6	79,7	77,0	92,7	95,9	94,2	94,0																	
10. <i>Thioploca ingraca</i> Lake Ogawara (AB263619)	84,5	84,8	81,6	78,7	85,3	87,6	87,5	87,6	87,0																
11. <i>Thioploca</i> sp (EU718069)	83,4	83,7	81,7	78,7	85,9	88,3	87,5	87,7	87,8	97,2															
12. Uncultured <i>Beggiatoa</i> sp. Guadeloupe FWI	85,1	87,2	83,7	79,4	87,3	90,8	89,7	89,4	90,2	90,1	89,6														
13. <i>Ca. Marithioploca araucae</i> CHI014 (FR690994)	84,6	86,7	83,1	79,4	87,6	90,4	89,6	89,7	90,5	91,0	90,6	94,3													
14. Uncultured <i>Beggiatoa</i> sp. clone WF120um (JN793557)	85,0	87,0	83,3	79,0	87,3	90,1	89,9	89,5	90,1	89,9	89,6	97,8	94,3												
15. <i>Ca. Marithioploca araucae</i> Bay of Concepcion (AF035956)	84,8	86,5	83,0	79,6	87,9	90,7	89,7	89,8	90,6	91,4	90,8	94,4	99,4	94,4											
16. Uncultured <i>Isoeggiatoa</i> sp. clone AMV1058 (FR666858)	84,8	86,8	83,5	79,5	88,2	90,9	89,8	89,9	90,6	91,3	90,8	94,6	99,1	94,6	99,2										
17. <i>Ca. Maribeggiatoa vulgaris</i> Carmel Canyon (FJ814745)	85,0	86,5	82,9	79,4	88,3	91,0	89,7	89,6	90,3	92,1	91,8	93,8	96,4	93,4	96,7	97,1									
18. <i>Ca. Maribeggiatoa</i> sp. Carmel Canyon (FJ814753)	84,9	86,8	82,6	79,4	87,8	90,2	89,0	88,9	90,2	92,1	91,8	93,2	96,1	93,2	96,3	96,5	99,0								
19. <i>Ca. Parabeggiatoa communis</i> L22 (AF532772)	84,4	85,4	82,1	79,4	86,9	89,0	89,4	89,4	89,6	91,1	90,9	90,7	93,5	90,2	93,7	93,8	93,7	93,4							
20. <i>Ca. Parabeggiatoa communis</i> L8 (AF532774)	85,2	86,2	82,7	80,0	86,6	89,4	88,6	88,6	89,2	92,2	91,9	91,7	94,3	91,0	94,4	94,5	94,4	94,2	98,8						
21. <i>Ca. Parabeggiatoa</i> sp Chile (FJ875196)	84,6	85,3	82,6	79,4	86,4	89,0	88,2	88,4	88,8	92,5	92,5	91,8	94,0	91,2	94,3	94,2	94,2	94,0	96,0	97,0					
22. <i>Ca. Parabeggiatoa</i> sp Chile (FJ875199)	84,4	85,3	82,7	79,5	86,2	88,8	88,0	88,1	88,7	92,3	92,2	91,6	93,8	91,0	94,1	94,0	94,0	93,8	95,8	96,8	99,8				
23. <i>Beggiatoa alba</i> (L40994)	83,1	84,8	83,1	81,1	83,6	84,7	84,9	84,4	84,5	85,4	85,5	86,5	86,8	87,1	87,0	87,2	86,8	87,1	85,9	86,2	86,8	86,7			
24. Outgroup <i>E. coli</i> (EU130557)	73,2	74,2	71,7	73,0	70,5	72,4	71,8	71,6	72,2	72,3	72,4	73,3	73,5	72,9	73,7	73,9	73,4	73,5	72,7	73,3	73,5	73,5	73,0		

6. Hybridations *in situ*

6.1. *Beggiatoa sp.* Guadeloupe FWI

Les hybridations *in situ*, ont d'abord permis d'effectuer une première identification succincte des filaments de la matre. Ainsi, *Beggiatoa sp. Guadeloupe FWI* a été identifiée comme une eubactérie par la sonde EUB 338. Le marquage avec la sonde spécifique des γ -protéobactéries s'est révélé positif et donc permis de restreindre l'identification ce à groupe de bactéries (Fig. 41).

Puis, l'utilisation de sondes spécifiques, créées à partir du séquençage du gène 16S des bactéries, a permis d'identifier les organismes de la matre auxquels appartenaient ces séquences. L'hybridation avec la sonde spécifique créée à partir des analyses phylogénétiques obtenues, s'est révélée positive (Fig. 41 d.). Le filament isolé est donc bien l'espèce identifiée par les analyses phylogénétiques, uncultured *Beggiatoa sp. Guadeloupe FWI*. L'absence d'hybridation avec la sonde NON EUB permet de valider les autres marquages par comparaison. En effet, cette sonde n'hybride pas avec les bactéries, mais permet de s'affranchir des biais qui pourraient être dus aux différents produits utilisés, en faisant subir à tous les échantillons les mêmes traitements.

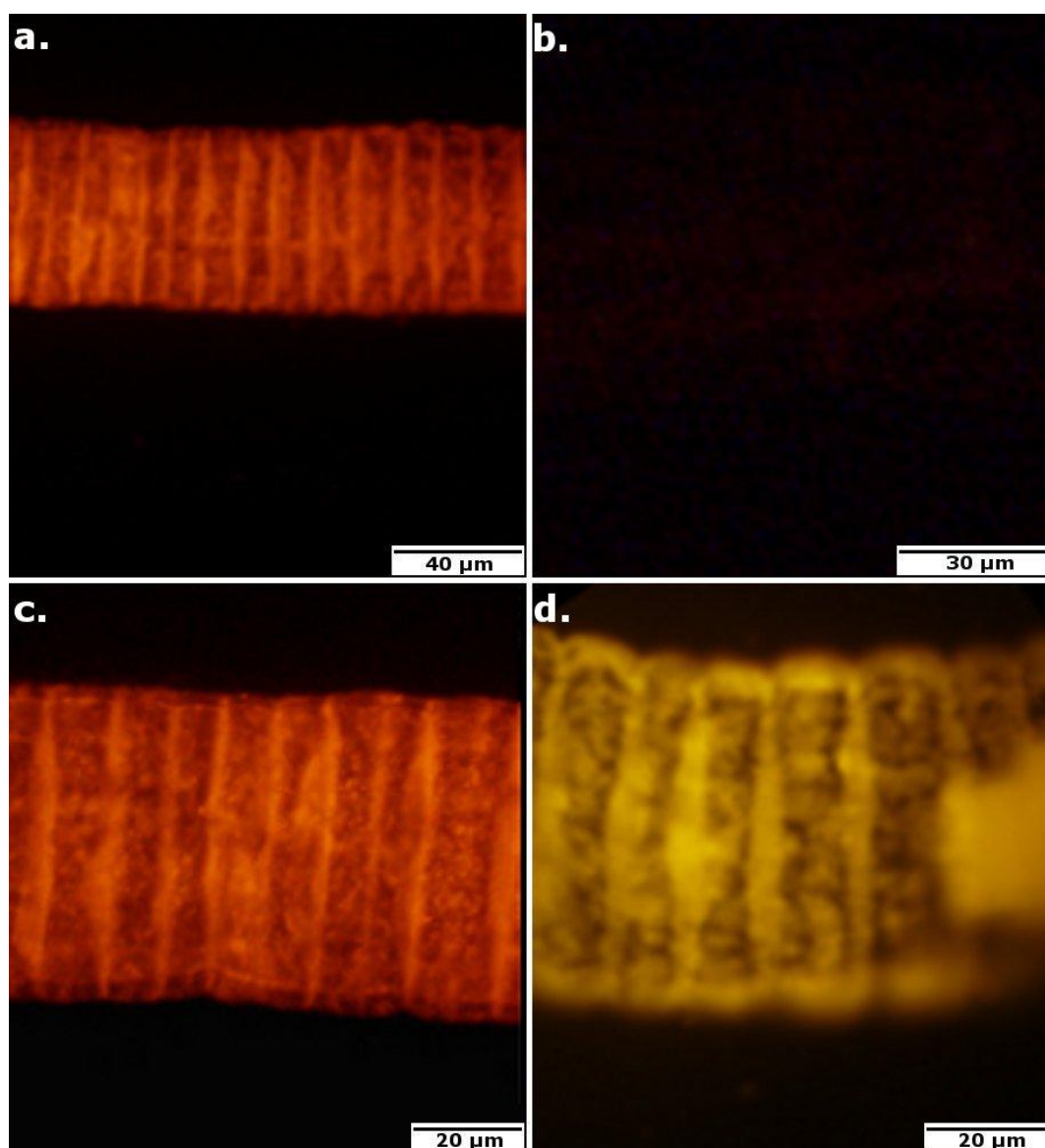


Figure 41: Microphotographies des hybridations *in situ* de *Beggiatoa* morphotype 1. Le filament hybride positivement avec la sonde EUB 338 (a.), la sonde GAM42A (c.) et avec la sonde spécifique BEG-282G (d.). Le témoin négatif, est obtenu avec la sonde NONEUB où aucun marquage n'a été obtenu (b.).

6.2. *Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI

Les hybridations *in situ* ont permis de confirmer l'identité des organismes. En effet, ces organismes ont été identifiés comme étant des eubactéries par la sonde EUB338. En revanche, le marquage avec la sonde spécifique des γ -protéobactéries ne s'est pas révélé positif. Cependant, la sonde créée afin de vérifier si la bactérie observée correspondait bien à la séquence obtenue lors des analyses phylogénétiques effectuées au cours de ce travail hybride bien avec l'organisme observé. Celui-ci est donc bien l'*Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI.

De plus, il a pu être observé sur quelques filaments, un marquage positif aux Archaea (Fig.42 d). Sur tous les filaments soumis à l'hybridation, seuls quelques uns ont été marqués, les Archaea ne sont donc pas présentes de façon systématique. De plus, nous avons essayé d'amplifier, puis de cloner les séquences génétiques des Archaea contenues dans les filaments, mais aucune espèce d'Archaea n'a pu être isolée en particulier par les techniques de biologie moléculaire.

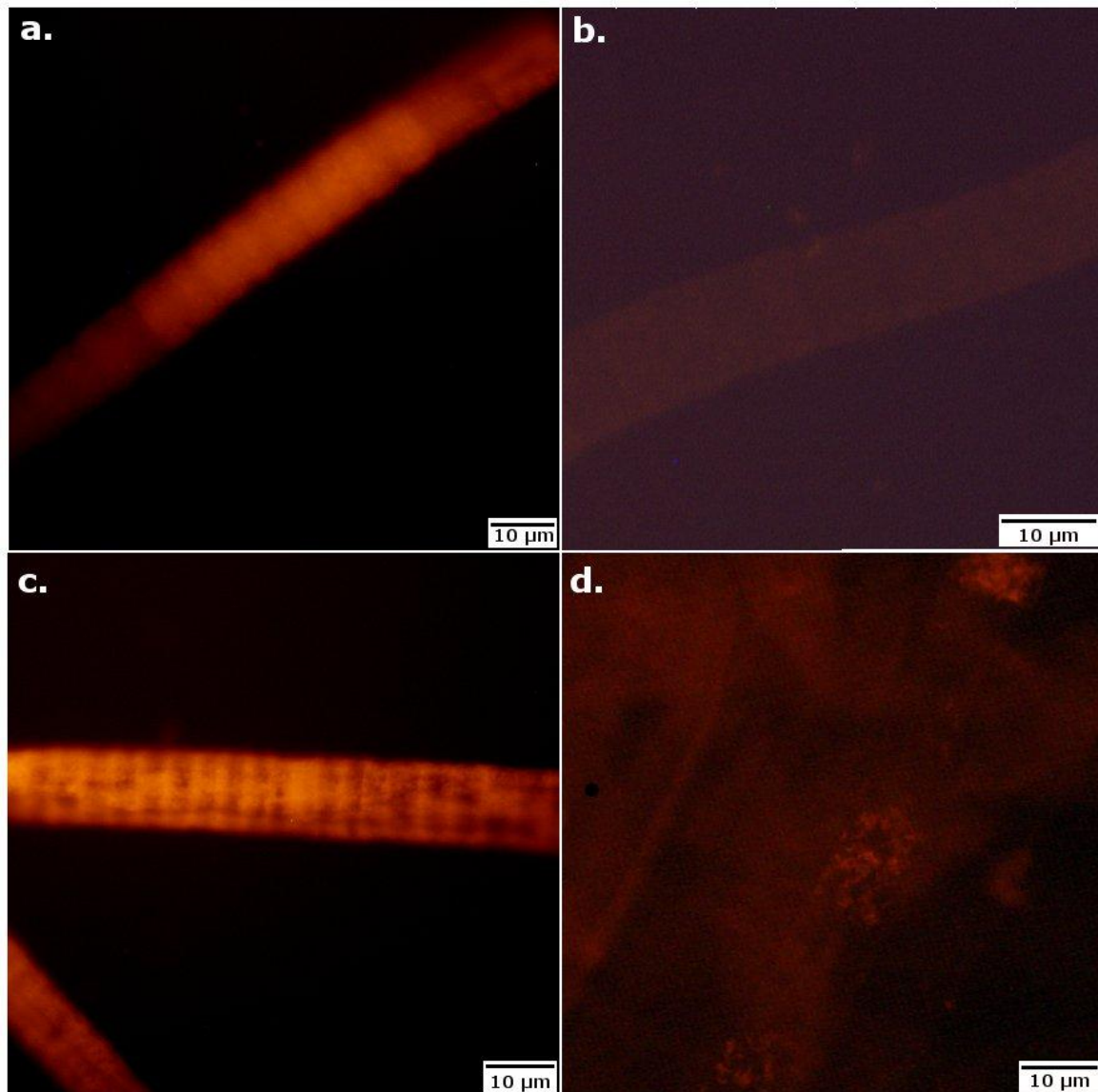


Figure 42: Microphotographies des hybridations *in situ* de *Beggiatoa* morphotype 2. Le filament hybride positivement avec la sonde EUB 338 (a.), et avec la sonde spécifique BEG-282G (c.). Le témoin négatif, est obtenu avec la sonde NONEUB où aucun marquage n'a été obtenu (b.). Un marquage positif a également été obtenu avec la sonde Thaumgr1 spécifique des Thaumarchaea (d.).

7. Essais de culture avec la matre

Les essais avec le milieu Z8X-salt n'ont pas été concluants. En effet, La mort de toute la population intervenant en moins de trois jours, ce milieu a donc vite été abandonné.

Avec le milieu F/2, des observations différentes ont pu être effectuées. Si la « matre blanche », dans ce milieu a également disparue au bout de 3 jours, en revanche, au bout de 27 jours, les cyanobactéries vertes étaient toujours présentes. A partir de 27 jours, seuls des filaments verts très fins restaient. Leur population avait alors crû de façon spectaculaire, ils colonisaient ainsi tout le ballon.

Les résultats des expériences menées avec les milieux Erdschreider et F/2 ainsi qu'avec le charbon et le sédiment sont reportés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5: Résultats des expériences menées avec support et les milieux F/2 et Erdschreider.

Milieu	Charbon	Sédiment stérile	Sans support
Erdschreider	Mort au 2 ^{ème} jour avec remontée de la matre à la surface	Mort au 2 ^{ème} jour avec remontée de la matre à la surface	Mort au 2 ^{ème} jour avec remontée de la matre à la surface.
F/2	Disparition de la matre blanche à partir du 7 ^{ème} jour près formation d'un anneau blanc. Cyanobactéries collées sur les parois de l'erlenmeyer. Mort de tous les individus au bout de 13 jours.	Disparition de la matre blanche au 8 ^{ème} jour. Conservation et développement des cyanobactéries vertes. Développement d'un biofilm sur les parois.	Mort de la matre blanche au bout de trois jours, conservation et développement des cyanobactéries vertes. Cyanobactéries se fixant préférentiellement sur les parois et à l'interface eau/air.

Lors des essais avec les organismes isolés, une faible croissance a été observée. En revanche, aucune multiplication des individus n'a été observée. Il a fallu également

protéger les organismes de la lumière et les soumettre à une luminosité de 950 lux pour les maintenir en vie. Des contaminations ont ensuite envahi la culture et ont probablement provoqué la mort des *Beggiatoaceae*.

Discussion

Etude morphologique des filaments

Depuis leur découverte, la classification des bactéries sulfo-oxydantes géantes a d'abord été basée sur leurs caractéristiques morphologiques : (i) les filaments libres ont été identifiés comme des *Beggiatoa* spp. ; (ii) les multiples trichomes enveloppés dans une gaine commune comme des *Thioploca* spp. ; (iii) et les filaments attachés contenant des inclusions de soufre comme des *Thiothrix* spp. ou ne contenant pas d'inclusions étant dénommés *Leucothrix* spp. (Salman *et al.*, 2011).

Les filaments rencontrés dans cette étude étant des trichomes libres, et possédant avec *Beggiatoa alba*, l'espèce type, les traits communs de mobilité par glissement et d'inclusions de soufre intracellulaire, nous les avons tout d'abord identifiés macroscopiquement parlant comme deux morphotypes de *Beggiatoa*.

En effet, la morphologie externe de ces deux bactéries est très similaire, on observe dans les deux cas, deux filaments multicellulaires présentant des cellules discoïdes, avec des granules de soufre visibles en lumière incidente. De plus, les filaments sont capables de se déplacer par glissement sur des surfaces solides et sont recouverts par une membrane externe de polysaccharides. Aucune des deux études de microscopie électronique réalisées au cours de ces travaux n'a pu mettre en évidence la gangue externe. Toutefois, on remarque en comparant les images de microscopie photonique et les images de balayage, que la forme des cellules est différente, le caractère bombé des cellules discoïdales n'étant pas visible en microscopie photonique.

L'observation au microscope à balayage, montre que le centre de la cellule est majoritairement composé d'un espace vide, laissant penser qu'il existe une grande vacuole centrale, et que tout le contenu cytoplasmique est projeté contre les membranes externes. Ces grandes vacuoles observées pourraient être les vacuoles contenant des nitrates régulièrement observées chez les *Beggiatoa* marines de grand

diamètre (McHatton *et al.*, 1996 ; Ahmad *et al.*, 1999 ; Mußman *et al.*, 2007 ; De Albuquerque *et al.*, 2010 ; Hinck *et al.*, 2011).

Les images de balayage mettent également en relief la présence de granules vides accolés aux membranes externes de la cellule, ce qui est confirmé par les images de microscopie électronique à transmission. Ces deux modes d'observation montrent aussi que les granules sont absents des membranes intercellulaires. En revanche, on ne distingue pas si les granules de soufre sont entourés d'une membrane simple contre la membrane externe, dans des invaginations de la membrane cytoplasmique, en raison de faible grossissement, comme suggéré par Strohl et collaborateurs, (1981).

Le morphotype 1 de *Beggiatoaceae*, a été identifié comme proche des *Marithioploca* et des *Maribeggiatoa*. Ces deux genres comprennent des bactéries sulfo-oxydantes libres, autrefois associées aux *Beggiatoa*. Ces deux genres étaient auparavant tous deux identifiés comme *Beggiatoa*, en raison de la classification basée uniquement sur des critères morphologiques. Les travaux de Salman et collaborateurs (2011), ont maintenant démontré que seuls les critères morphologiques ne pouvaient être pris en compte pour la classification des filaments. Ceci est appuyé par l'exemple du genre *Marithioploca*, qui comprend des filaments solitaires libres et d'autres entourés par une gaine commune, autrefois unique, critère différenciant les *Thioploca* des *Beggiatoa*.

Alors que le diamètre des filaments des *Marithioploca* se situe entre 25 et 37 μm , celle des *Maribeggiatoa* est comprise entre 65 à 85 μm , soit plus proche de celle observée dans cette étude, de 60 μm .

De plus, l'espèce la plus proche de celle étudiée ici est un filament de 120 μm de diamètre, qui a, dans une étude précédente été affilié aux *Maribeggiatoa* (McKay *et al.*, 2012).

Lors de l'étude effectuée par Salman et collaborateurs (2011), une séparation au sein même de ce groupe avait déjà été notée. Ils suggéraient alors que celle-ci était due justement à la différence de diamètre entre les espèces, une branche comprenant les espèces de 12 à 18 μm , et l'autre les espèces de 25 à 37 μm . Il se pourrait donc qu'il existe une troisième branche avec des organismes dont le diamètre pourrait atteindre 120 μm .

Toutefois, dans notre étude, il apparaîtrait en fait que ces deux espèces formeraient un groupe à part entière, éloigné des deux autres genres proposés par Salman (2011).

En raison de ces différences, l'ancienne terminologie a été conservée pour identifier l'espèce observée dans notre étude. Ainsi, le nom de genre auquel a été ajouté le lieu de découverte de la bactérie a été utilisé pour décrire la souche présentée ici, qui se nomme donc *Beggiatoa* sp. Guadeloupe FWI

Le genre *Isobeggiatoa*, lui, ne comprend que des filaments simples, similaires à l'espèce de référence, *Beggiatoa alba*. La taille des filaments appartenant à cette famille est comprise entre 10 et 40 μm (Salman *et al.*, 2011). Le filament étudié dans cette étude correspond donc bien à la description morphologique des filaments appartenant à ce genre.

Les deux espèces rencontrés ici regroupent des filaments se déplaçant par glissement, possédant des inclusions de granules de soufre et dotés de vacuoles internes conformément à ce qui est observé chez les bactéries marines de grande taille (Mußman *et al.*, 2003).

Traditionnellement, ces vacuoles sont identifiées comme des vacuoles de nitrates, grâce auquel les bactéries peuvent survivre en anaérobie, en pratiquant l'oxydation des sulfures à partir de la réduction des nitrates en dihydrogène et ammonium (Vargas & Strohl, 1985; Schulz & Jørgensen, 2001; Mußman *et al.*, 2003; Sayama *et al.*, 2005; Preisler *et al.*, 2007). Dans notre étude, nous n'avons pas identifié le contenu de ces vacuoles mais leur description obtenue grâce à la microscopie électronique à transmission, nous informe que la grande vacuole centrale ne possède pas de membrane intracytoplasmique. Ceci est conforme aux précédentes études portant sur la morphologie des *Beggiatoa*. De Albuquerque *et al.* (2010), ont effectivement confirmé que dans les filaments de mattes hypersalées et marines étudiées, aucune membrane entourant les vacuoles internes n'a pu être observée, tout comme ce qui avait précédemment été observé chez les *Thioploca* (Maier, 1984).

Cependant, chez une bactérie marine du genre *Thiothrix*, qui sont des filaments sulfo-oxydants attachés, de telles vacuoles ont été identifiées, mais aucune accumulation de nitrate n'a été détectée dans la cellule (Kalanetra *et al.*, 2004), nous ne pouvons donc affirmer que les vacuoles présentes dans les *Beggiatoaceae* de notre étude contiennent des nitrates.

Les hybridations *in situ* ont confirmé les analyses phylogénétiques. En effet, les organismes ont bien hybridé avec les sondes réalisées à partir des séquences obtenues. Toutefois, il peut être noté qu'*Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI n'a pas

hybridé avec la sonde GAM42A spécifique des γ -protéobactéries, ce qui démontre que cette sonde ne possède pas une totale spécificité envers ces organismes.

Généralement, l'identification des espèces de bactéries se fait grâce à de hybridations ADN/ADN. Cependant, dans le cas de notre étude, nous ne disposons pas de souches axéniques des bactéries étudiées. Ainsi, dans le cas d'hybridations ADN/ADN, nous ne pourrions savoir si l'ADN ayant hybridé correspond bien à l'espèce voulue, cette technique est donc inutilisable ici.

Etude fonctionnelle des filaments

Les *Beggiatoa* sont connues pour être des organismes sulfo-oxydants, toutefois, de nombreux métabolismes différents existent en leur sein même. En effet, parmi les souches d'eau douce, on retrouve différentes souches, toutes capables de chimiohétérotrophie et utilisant un nombre limité de composés organiques pour générer de l'énergie (Pringsheim 1967 ; Strohl & Larkin 1978 ; Strohl *et al.*, 1981). Certaines souches sont également capables de mixotrophie (Güde *et al.*, 1981 ; Grabovich *et al.*, 2001). Chez les *Beggiatoa* marines, seuls deux métabolismes ont été étudiés à ce jour. Une espèce marine de *Beggiatoa* a été identifiée comme chimioautotrophe facultative, capable à de faibles concentrations en sulfures, d'utiliser de nombreux composés organiques comme le carbone pour source d'énergie, tandis que l'autre est une chimioautotrophe stricte (Hagen & Nelson, 1996). En raison de cette grande diversité, il était nécessaire de confirmer le métabolisme des bactéries rencontrées dans cette étude.

Chez les organismes sulfo-oxydants, la détection du soufre par la technique de l'EDX n'a que très peu été utilisée. En effet, seule une étude a permis de mettre en évidence du soufre sur des organismes de la famille des Beggiatoaceae (de Albuquerque *et al.*, 2010). Ces travaux, comme les nôtres, identifient les granules blancs comme des grains de soufre. Ces grains, identifiés comme des vacuoles blanches au MET sont en fait des artéfacts dus à la dissolution du soufre lors des étapes de déshydratation en alcool ou en acétone, lors de l'inclusion des échantillons précédent les étapes de coupes.

Il est important de noter que la présence de granules de soufre ne constitue pas une preuve de la consommation de soufre de l'organisme. En effet, certains organismes le stockent sous forme de granules, souvent couplés à du métal, puis l'excrètent comme un déchet, ce qui constitue un moyen de protection de l'organisme contre les effets toxiques du soufre (Windoffer *et al.*, 1999). Toutefois, ici, la nature des organismes, des *Beggiatoaceae*, ainsi que les mesures effectuées par les sondes en mésocosme où nous avons mis en évidence que la matrice est responsable de la consommation des sulfures produits par le sédiment, nous permettent d'affirmer que les *Beggiatoa* sont un des groupes de bactéries responsables de l'oxydation des sulfures dans la matrice.

Parallèlement à ces travaux, des gènes responsables de l'ammonium oxydase bactériens (*amoB*) ont pu être amplifiés (Lavermann, communication personnelle). La présence de ces gènes dans les *Beggiatoaceae* ainsi que la présence de vacuoles importantes dans les filaments, nous incite à penser que les organismes ici présents, pourraient également jouer un rôle dans le cycle de l'azote de la mangrove en piégeant celui-ci et en le relargant sous forme d'azote atmosphérique.

Des Archaea dans les Beggiatoa ?

La présence d'Archaea dans les filaments des *Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI est très étonnante car aucune relation symbiotique intracellulaire au sens large n'a été décrite à ce jour entre une Archae et une eubactérie. En effet, les symbioses avec les Archaea sont limitées à des associations extracellulaires. Ainsi, on peut énoncer les consortia de δ -protéobactéries et d'Archaea responsables de l'oxydation anaérobie du méthane au niveau des puits de méthane marins (Boetius *et al.*, 2000). Une autre communauté d'Archaea et de bactéries a été également décrite dans des sources sulfidiques, entre une Euryarchaea et des bactéries filamenteuses du genre *Thiotrix* (Moissl *et al.*, 2002). Plus récemment, une Archae présentant un manteau bactérien de γ -protéobactéries sulfo-oxydante, a été découverte dans la mangrove. Ce manteau bactérien permettrait à l'Archaea de se protéger des effets toxiques des sulfures émis par le sédiment environnant (Muller *et al.*, 2010). De plus, aucune Archae pathogène ni parasite n'a été décrite à ce jour (Reeve & Schleper, 2011). Or, la présence d'Archaea n'a pas été détectée sur tous les filaments d'*Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI étudiés par hybridation *in situ*. Il est donc

impossible que la relation entre les deux organismes soit une symbiose obligatoire. La nature de cette relation se situe probablement entre le commensalisme et le parasitisme. Toutefois, en raison d'un milieu non axénique et de l'absence d'images de microscopie électronique montrant la présence intracellulaire de l'Archaea, nous ne pouvons affirmer que celle-ci n'est pas une Archaea extracellulaire, ou présente dans le milieu et qui n'aurait pas disparu lors des lavages successifs.

Lors du clonage des séquences codant pour l'ARN 16S des Archaea chez les *Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI, deux séquences appartenant à des Archaea différentes ont été obtenues. Cette variabilité ne permet donc pas d'affirmer qu'une espèce particulière ait pu coloniser les filaments.

Pour les *Beggiatoa* sp. Guadeloupe FWI, aucune Archaea n'a pu être observée lors des hybridations *in situ*. De même, lors des amplifications avec les amorces spécifiques du gène codant pour l'ADNr 16S des Archaea, aucun fragment de gène n'a pu être amplifié. Il est donc peu probable que cette bactérie héberge également des Archaea de façon transitoire.

Une autre étude parallèle à celle-ci, confirme également nos résultats, en effet, une amplification du gène *amoA* codant pour l'ammonium oxygénase a été obtenue pour les *Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI, mais pas pour les *Beggiatoa* sp. Guadeloupe, FWI, ce qui confirme la présence des Archaea chez les *Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI, et leur absence chez les *Beggiatoa* sp. Guadeloupe FWI.

A ce jour, il est donc fortement probable qu'*Isobeggiatoa* sp. Guadeloupe FWI possède des Archaea intracellulaires, toutefois, il serait intéressant de poursuivre les investigations afin de confirmer ou infirmer les résultats des hybridations *in situ*.

Culture des Beggiatoceae

Les essais de culture de la matte entière n'ont pas été concluants. Ceci est probablement dû à la grande diversité d'organismes présents, qu'il a été difficile de maintenir en vie tous les besoins différents de ceux-ci. La matte n'ayant pas été triée il est également probable que la mort des eucaryotes et de certains procaryotes ait contaminé le milieu et provoqué le développement de certaines bactéries et/ou toxines responsables de la mort des différents morphotypes de *Beggiatoa*.

La culture des organismes seuls, s'avère quelque peu contraignante car il faut veiller à l'oxygénation du milieu. Les bactéries ne supportant pas le bullage, il est nécessaire de maintenir les récipients ouverts afin de faciliter les échanges gazeux, mais ceci facilite l'évaporation du milieu de culture. L'utilisation d'un milieu agar pourrait permettre de résoudre cet inconvénient. De plus, cela permettrait de mettre en place un gradient sulfure oxygène, comme celui préconisé par Nelson et Jannasch (1983). Toutefois, l'échec de cette mise en culture est à relativiser. En effet, à ce jour, il n'existe que deux *Beggiatoa* marines en cultures pures (Hagen & Nelson, 1996) et aucune espèce vacuolée (Ahmad *et al.*, 2006).

Les Beggiatoaceae n'étant pas les seuls organismes filamenteux présents dans la matre, nous avons également tenté de caractériser les cyanobactéries qui la composent. Cette étude fait l'objet du chapitre trois qui poursuit ce manuscrit.

CYANOBACTÉRIES

Résultats

1. Hybridations *in situ*

1.1. «Cyanobactéries 1 et 2 »

En raison de leur auto fluorescence dans le rouge et le vert, les hybridations *in situ* ont été effectuées avec des sondes marquées à l'Atto 425 qui fluoresce dans le bleu. On remarque que celui-ci est positif pour la sonde spécifique des cyanobactéries CYANO pour les deux morphotypes de filaments (Fig. 43) Les filaments sont donc des cyanobactéries.

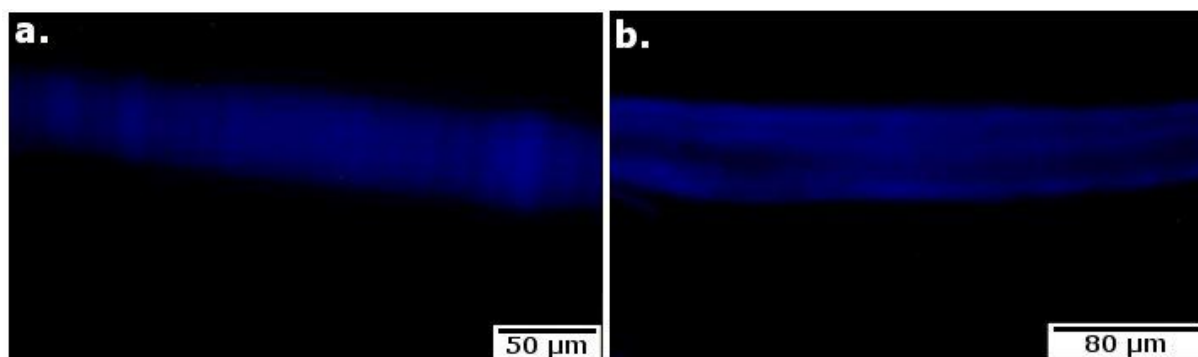


Figure 43: Microphotographie photonique à épifluorescence des cyanobactéries 1 et 2 ayant hybridé avec la sonde CYANO.

1.2. *Oscillatoria* 1 et 2

Pour les mêmes raisons, que pour les « Cyanobactéries 1 et 2 », les hybridations *in situ* ont été effectuées avec des sondes marquées à l'Atto 425. Les résultats ont été positifs pour les deux types de filaments pour la sonde CYANO. Les deux filaments sont donc des cyanobactéries (Fig. 44).

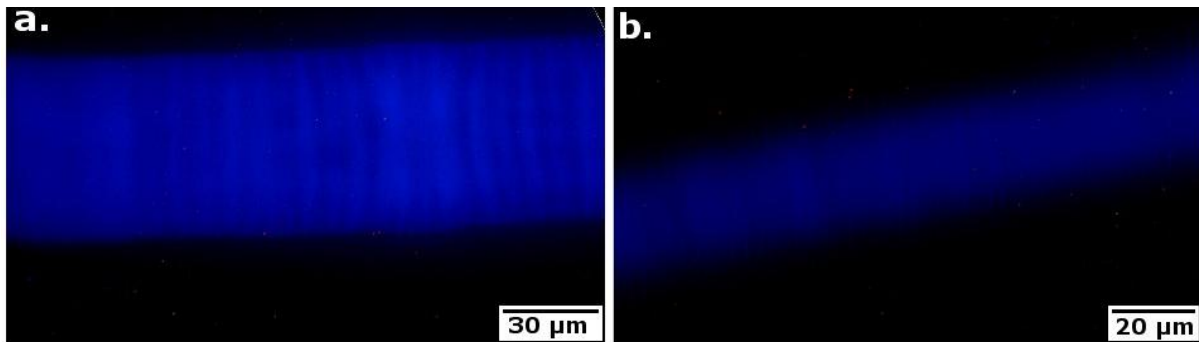


Figure 44: Microphotographie photonique à épifluorescence d' « *Oscillatoria* 1 et 2 » ayant hybridé avec la sonde spécifique des cyanobactéries.

2. Microscopie photonique

2.1. « Cyanobactéries 1 et 2 »

Les filaments observés, bien que de longueur variable, possèdent tous la même organisation. Les cyanobactéries 1 sont de couleur rose clair à rose vif et sont constituées d'un empilement de cellules d'une moyenne de $49,28 \pm 2,30 \mu\text{m}$ de large sur $14,5 \pm 0,6 \mu\text{m}$ de haut, de forme discoïdale. La longueur totale du filament atteint jusqu'à 3 cm.

La même organisation est présente pour les filaments noirs, en revanche la taille des cellules est ici de $21,45 \pm 0,90 \mu\text{m}$ de large par $10 \pm 0,3 \mu\text{m}$ de haut, donnant à ces cellules une forme cylindrique. Le filament ne dépasse jamais la taille de 2 cm.

Un épaissement de la membrane externe est observable sur les deux cyanobactéries (flèches blanches Fig. 45).

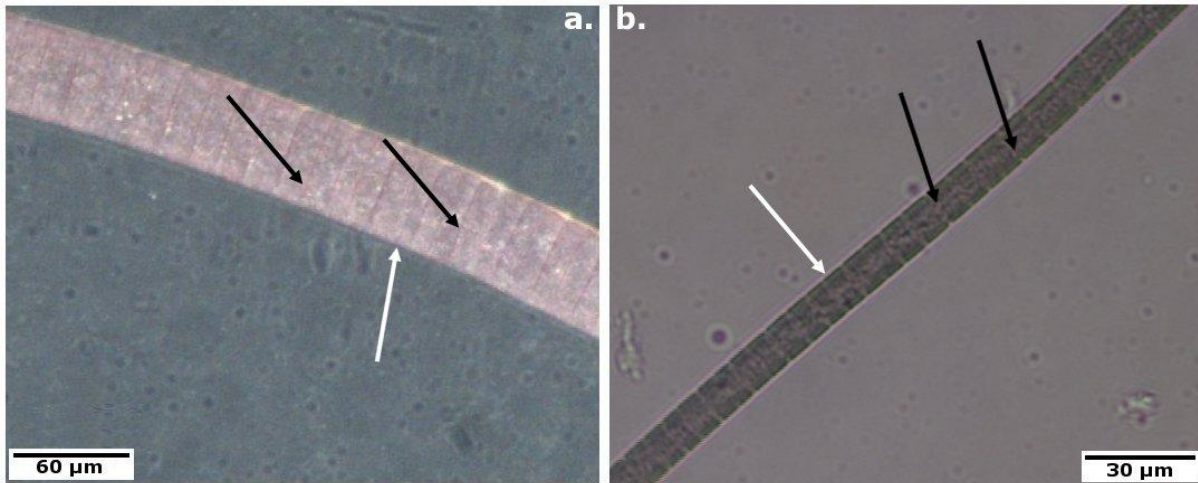


Figure 45: Microphotographie photonique des Cyanobactéries 1 (a.) et 2 (b.). Les membranes intercellulaires sont mises en évidence par les flèches noires et la gaine externe par les flèches blanches.

2.2. « *Oscillatoria* 1 et 2 »

L'*Oscillatoria* 1 comme tous les filaments observés jusqu'alors, est un assemblage de cellules discoïdes de $9,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ de haut par $60,67 \pm 1,89 \mu\text{m}$ de large et dont la taille du filament peut atteindre 3 cm.

L'*Oscillatoria* 2 est un assemblage de cellules discoïdes de $3,5 \pm 1,1 \mu\text{m}$ de haut par $35,04 \mu\text{m} \pm 3,2 \mu\text{m}$ de large. En revanche, ici, le filament atteint la taille maximale de 1,5 cm.

Les cellules composant ces deux filaments sont recouvertes par une membrane externe, repérable par un épaissement (Fig. 46 flèches blanches). Cette membrane est mise en évidence lors de la division des filaments (Fig. 46).

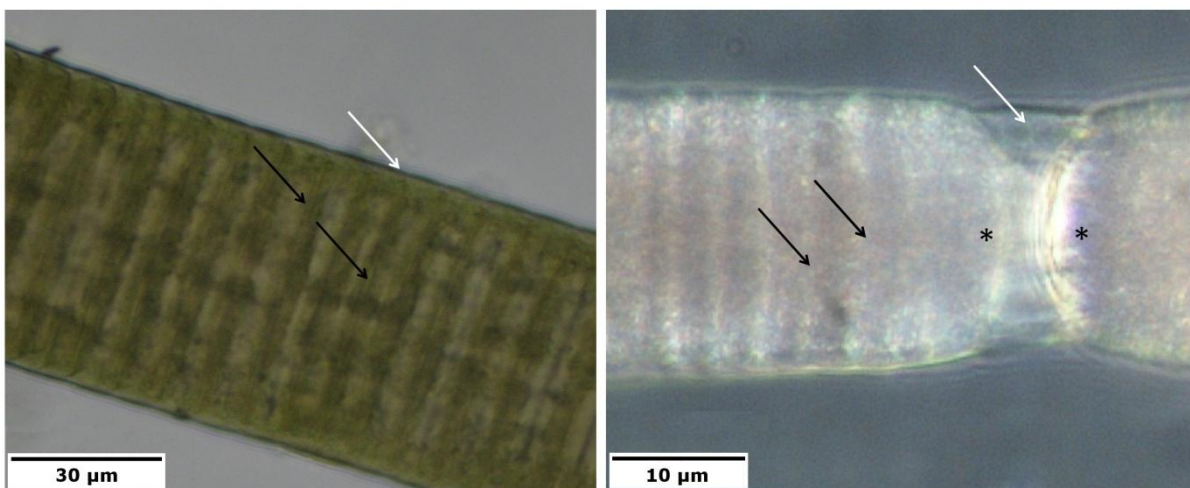


Figure 46: Microphotographies photoniques des *Oscillatoria* 1 (a.) et 2 (b.) en division. Les flèches noires montrent les membranes intercellulaires et les flèches blanches la gangue externe. (b.), le futur apex des deux futurs filaments est désigné par des étoiles.

3. Microscopie électronique

3.1. « Cyanobactéries 1 et 2 »

La gangue externe recouvrant les filaments est bien visible en microscopie électronique. Sur la « Cyanobactérie 1 » (Fig. 47 a.), cette membrane n'a pu être ôtée. Elle apparaît comme lumineuse (flèche blanche) sur la photographie et dissimule les cellules sous jacentes qui composent le filament.

L'observation au MEB de la « Cyanobactérie 2 » (Fig. 47 b.) où la membrane externe est abîmée (observable au niveau de la flèche blanche), laisse deviner la surface des cellules.

On peut noter qu'aucune des deux bactéries n'est recouverte d'un manteau bactérien.

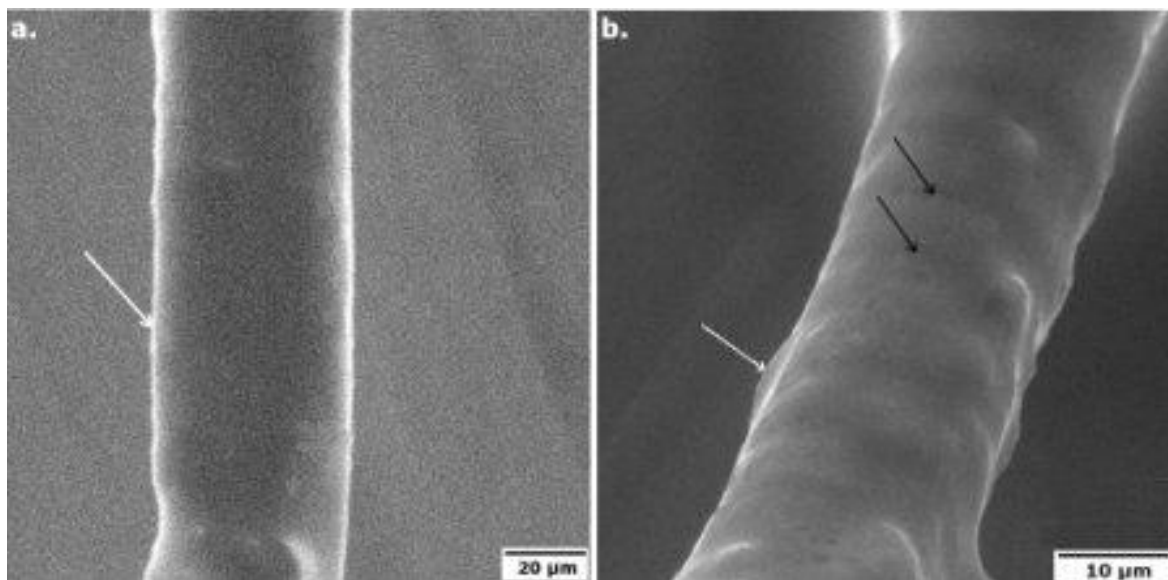


Figure 47: Microphotographies électroniques environnementales des cyanobactéries 1 (a.) et 2 (b.). Les flèches blanches désignent les gaines externes des filaments, les flèches noires désignent les limites cellulaires des cellules composant la cyanobactérie 2.

3.2. « *Oscillatoria* 1 et 2 »

Les cellules composant les filaments des deux *Oscillatoria* sont recouvertes par une membrane externe visible en MEB en mode environnemental (Fig.48 b et c.). Lorsque la gangue entourant l'« *Oscillatoria* 1 » est ôtée par le passage au point

critique, on distingue nettement les différentes cellules composant le filament (Fig. 48 a.).

Lors de l'observation au microscope à balayage du filament de l' « *Oscillatoria 2* », lorsque l'on détériore la gangue externe, des cellules présentant une structure différente des autres, plus sphériques, sont révélées dans le filament de manière périodique. (Fig. 48 c et d.).

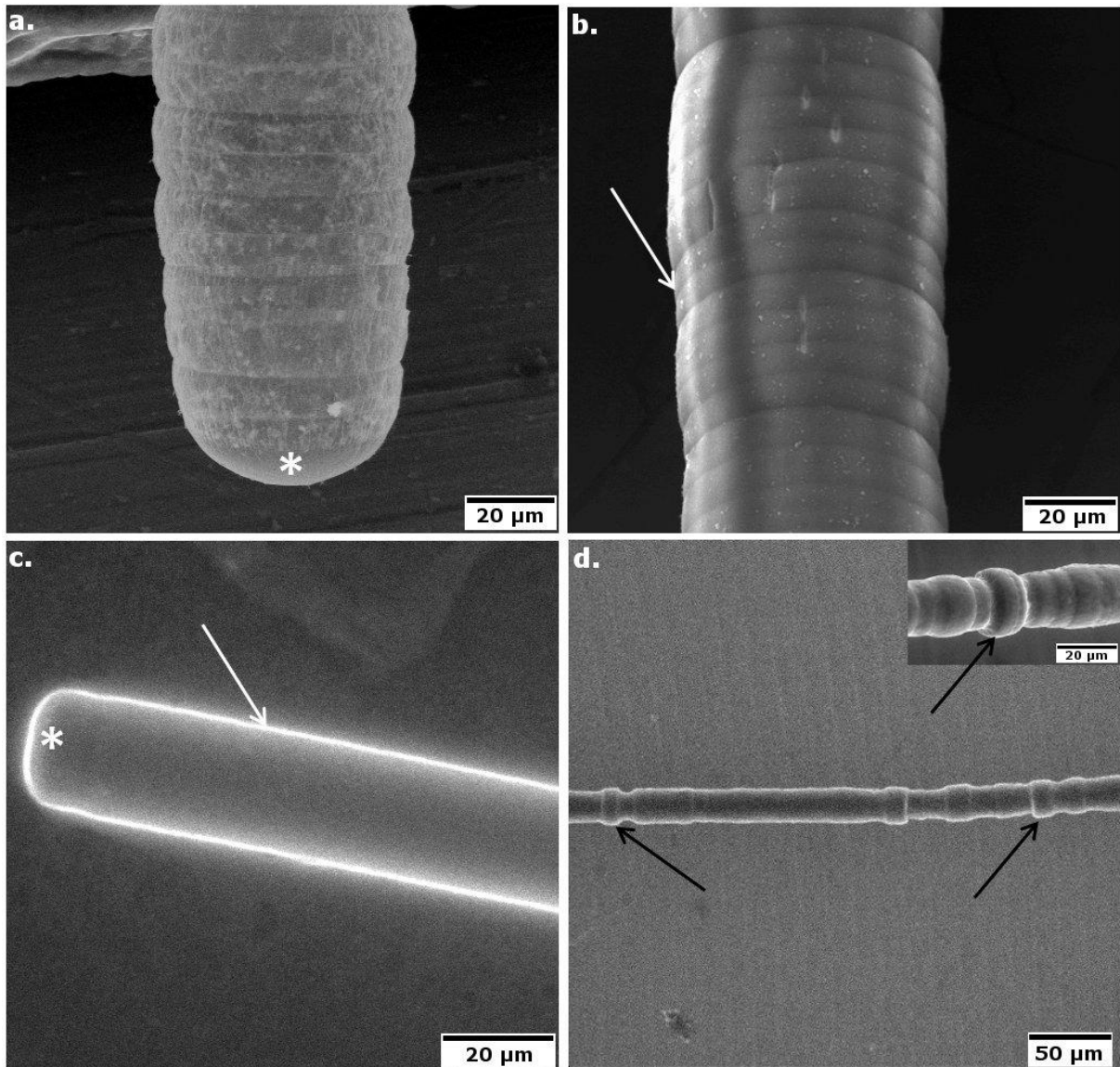


Figure 48: Microphotographies électroniques des *Oscillatoria 1* (a. et b.) et 2 (c. et d.). b.c.d. en mode environnemental. Les flèches blanches mettent en évidence la gangue externe, l'apex des filaments par des étoiles et les cellules différenciées par des flèches noires.

Les coupes ultrafines de l'*Oscillatoria* 1 observées au MET diffèrent de celles traditionnellement observées pour les cyanobactéries. Sur la figure 49, on observe que la gangue externe se détache légèrement de la membrane externe de la cellule (flèche noire). A ce grossissement, on ne distingue aucune membrane photosynthétique. Néanmoins, toutes ces structures semblent accolées aux membranes cellulaires (flèche bleue).

Dans la vue d'ensemble, (Fig. 49) on observe des cellules plus larges que hautes dont la majorité de l'espace est occupé par des vacuoles de très grande taille. La structure interne de ce filament correspond à celle des *Tychonema* (Anagnostidis & Komárek, 1988) qui comporte de grandes zones réticulées, ou zones de « kéritomisation » correspondant aux grandes zones claires marquées par des étoiles bleues. Ces vacuoles pourraient contenir un liquide qui aurait été dissout lors de la préparation des échantillons.

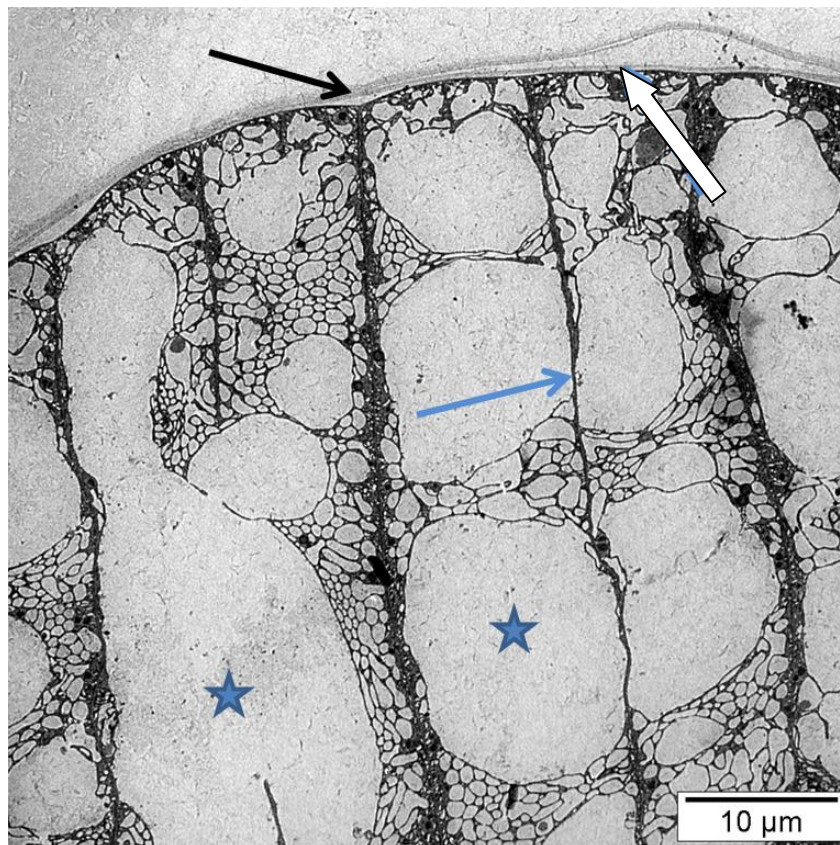


Figure 49: Micrographie électronique à transmission d'une coupe longitudinale d'*Oscillatoria* 1. Vue de plusieurs cellules séparées par des membranes intercellulaires (flèches bleues) contenant de grandes vacuoles vides (étoiles bleues). La membrane externe du trichome (flèche pleine blanche) est recouverte d'une gangue externe de polysaccharides (flèche noire).

A plus fort grossissement à proximité des membranes (Fig. 50 a et b.), on observe des saccules superposés les uns au dessus des autres, ou présentant une forme striée qui ressemblent néanmoins aux thylacoïdes des végétaux supérieurs. L'apparence striée de ces saccules est probablement due à une superposition de membrane dans les deux plans au niveau du plan de coupe.

On note également la présence de grosses gouttelettes denses aux électrons (Fig. 50 a et b.). La structure de ces gouttelettes semble différente, bien que celles-ci soient toutes les deux associées aux structures en saccules. Elles pourraient être des phycobilisomes associées aux thylacoïdes.

On observe également des petites vacuoles blanches qui semblent vidées par les traitements, dont le contenu pourrait être gazeux ou lipidique.

Bien que l'on puisse observer des ribosomes éparés à l'intérieur de la cellule, aucun matériel génétique n'est visible dans la cellule.

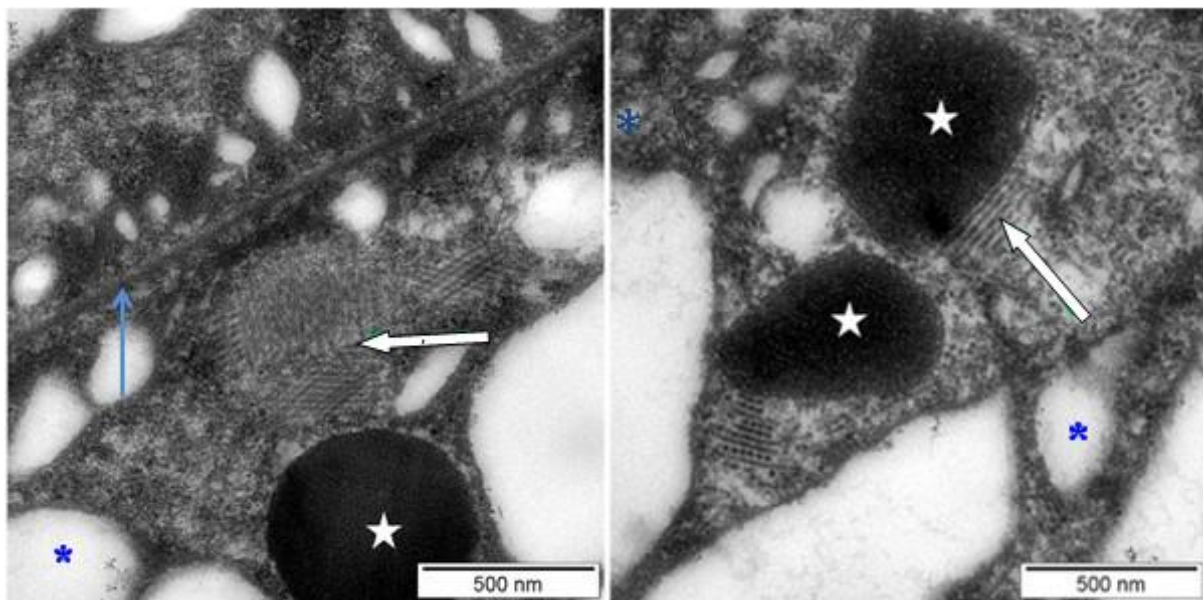


Figure 50: Micrographies électroniques de coupes longitudinales d'*Oscillatoria 1*. A plus fort grossissement, (a. et b.) à proximité de la membrane intercellulaire (flèche bleue) des saccules superposés analogues aux thylacoïdes (flèches pleines blanches) sont présents sur deux plans d'où leur apparence striée. A ces structures sont accolés des grains denses aux électrons contenant des phycobilines (étoiles blanches). De plus petites vacuoles semblant vides (astérisques bleues) pourraient contenir des molécules lipidiques ou du gaz.

4. Essais de culture

Devant les échecs répétés à cultiver la matre entière, les organismes ont été triés puis mis en culture dans des tubes à essais, puis dans des flasques de 25 mL.

La croissance en présence du milieu F/2 s'est avérée infructueuse. En revanche, en présence du milieu BG11, les cyanobactéries 1 et 2 ainsi que l'*Oscillatoria* 2 ont montré une forte croissance, tandis que l'*Oscillatoria* 1 n'a poussé dans aucun milieu. Toutefois, des précautions sont à prendre au niveau de la luminosité, les organismes isolés ne croissant pas à la même luminosité.

En effet, à une luminosité de 14,9 μE , les cyanobactéries 1 sont lysées en raison d'une trop forte luminosité (observation personnelle). Il est donc nécessaire de disposer des filtres devant les tubes afin d'abaisser la luminosité à 12,2 μE afin d'obtenir une croissance de ces individus.

Après une latence d'environ trois jours après la mise en culture, on observe la croissance du filament. Ainsi, un filament mesurant 0,5 mm voit sa taille doubler en 5 jours en moyenne pour la cyanobactérie 2 et l'*Oscillatoria* 2 et 7 jours pour la cyanobactérie 1. Puis, après que le filament ait atteint sa taille maximale de 3 cm pour cyanobactérie 1 et *Oscillatoria* 2 et 2cm pour la cyanobactérie 2, on observe une cassure des filaments ainsi que la croissance des deux filaments obtenus.

Dans les tubes à essais comme dans les flasques, tous les filaments ont eu un comportement benthique.

A l'ajout de sable stérile dans le fond des flasques, alors que l'*Oscillatoria* 2 et la cyanobactérie 2 restaient sur le fond, les filaments roses de la cyanobactérie 1 ont planté une voire deux extrémités dans le sable formant des boucles, reproduisant le même comportement que dans la matre.

Cependant, on peut noter que lors des cultures, en raison de la contamination du milieu par des diatomées et d'autres bactéries, il est nécessaire de repiquer les filaments au bout d'environ un mois. A ce jour, aucune culture totalement stérile n'a pu être réalisée.

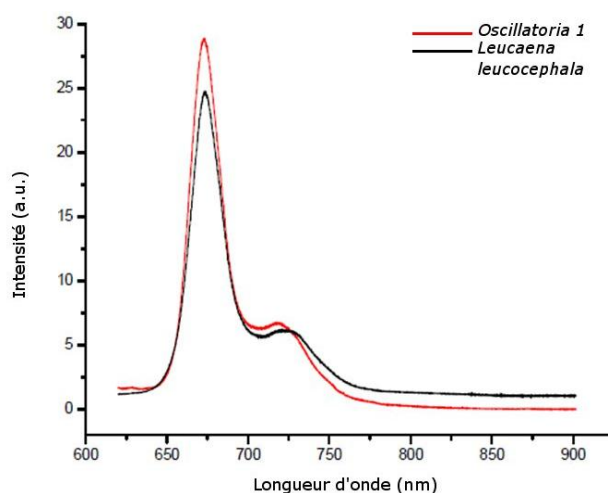
Tableau 6: Tableau synthétisant les résultats obtenus pour les cultures de différentes cyanobactéries.

	Croissance	Comportement dans récipient		Luminosité
		Tube à essai	Flasque	
<i>Oscillatoria 1</i>	Non	---	---	---
<i>Oscillatoria 2</i>	Oui	Benthique	Benthique	14.9 μ E
Cyanobactérie 1	Oui	Benthique	Benthique	14.9 μ E
Cyanobactérie 2	oui	Benthique	Benthique	12.2 μ E

5. Détection de la chlorophylle au spectrophotomètre Raman

Les spectres obtenus avec le filament entier et la feuille de *L. leucocephala* montrent que les pigments contenus dans ces deux organismes sont identiques (Fig. 51) Toutefois, on remarque que la réponse du filament est plus intense que celle de la feuille. Entre 700 et 800 nm, on note également un léger décalage du spectre de l'*Oscillatoria 1* vers les longueurs d'ondes inférieures, en comparaison de celui de la feuille du végétal.

Le spectre obtenu, avec le pic vers 680 nm est caractéristique de la chlorophylle a, tandis que l'absence de spectre vers 900 nm indique l'absence de bactériochlorophylle (Weigl & Livingston, 1953; Goedheer, 1955).

**Figure 51: Spectres de la feuille brute de *L. leucocephala* et du filament d'*Oscillatoria 1*.**

En associant la spectrométrie avec la chromatographie sur couche mince (Fig. 52) qui permet de séparer les pigments, on peut mettre en évidence la présence de chlorophylle a (Fig. 52 a.) et de phéophytine a (Fig. 52 c.) dans le filament. En revanche, le filament ne possède pas de chlorophylle b.

On peut noter dans ces spectres, qu'aucun décalage n'est visible entre les courbes du filament et de la plante, contrairement aux spectres des organismes entiers.

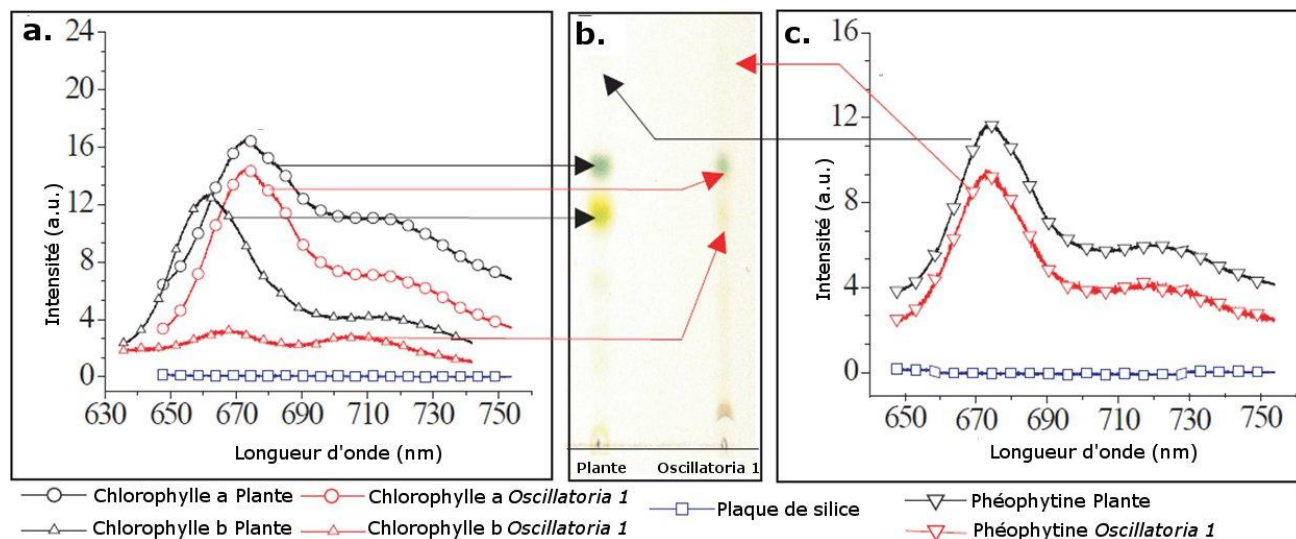


Figure 52: Spectres des différents spots obtenus par chromatographie sur couche mince (a.) Spectres des chlorophylles a et b de *L. leucocephala* et de *Oscillatoria 1*. (b.) Photographie du résultat de la chromatographie sur la plaque de silice. (c.) Spectres de la phéophytine de *L. leucocephala* et de *Oscillatoria 1*. Le spectre de la plaque de silice est représenté par la courbe bleue à carrés.

6. Tests de toxicité

6.1. Avec le milieu de culture

Les résultats obtenus, lors de la mise en contact des artémies avec le milieu de culture, sont résumés dans le tableau 7.

Tableau 7: Nombre d'individus morts au bout de 24h de contact avec un milieu de culture neutre (Témoin), un milieu de culture où les cyanobactéries 1 et 2 ont poussé.

	Témoin	Cyanobactérie 1	Cyanobactérie 2
Mort	10	17	13
Vivant	20	13	17

Afin d'analyser ces résultats, des tests de χ^2 d'indépendance entre les différents traitements deux à deux ont été effectués. Seuls les calculs de la comparaison entre la toxicité du milieu de culture ayant contenu les cyanobactéries 1 et le témoin seront détaillés ici. Pour les autres tests, seuls les χ^2 obtenus seront mentionnés dans le texte, les autres calculs étant disponibles en annexe 3.

• Comparaison du nombre de morts au bout de 24h entre le témoin et le milieu de culture de la Cyanobactérie 1 :

Hypothèse Ho : Il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements ; témoin et Cyanobactérie 1.

Tableau 8: Nombre d'individus morts observés pour le témoin et la cyanobactérie 1.

Effectifs observés	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	10	20	30
Cyanobactérie 1	17	13	30
Total	27	33	60

Tableau 9: Nombre d'individus morts théoriques calculés pour le témoin et la cyanobactérie 1, dans le cas où Ho est vraie.

Effectifs théoriques	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	13,5	16,5	30
Cyanobactérie 1	13,5	16,5	30
Total	27	33	60

$$\chi^2 = \frac{(10-13.5)^2}{13.5} + \frac{(20-16.5)^2}{16.5} + \frac{(17-13.5)^2}{13.5} + \frac{(13-16.5)^2}{16.5}$$

$$\chi^2=3.56$$

$$ddl=1$$

$$p=3.84$$

$$\chi^2 < 3.84 \text{ Non rejet de } H_0$$

Les *Artemia salina* mis en contact avec le milieu de culture de la cyanobactérie 1 ne meurent pas plus que ceux mis en contact avec le milieu de culture seul, au bout de 24h.

• **Comparaison du nombre de morts au bout de 24h entre le témoin et le milieu de culture de la Cyanobactérie 2 :**

Hypothèse H_0 : Il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements ; témoin et Cyanobactérie 2.

$$\chi^2 < 3.84 \text{ Non rejet de } H_0$$

Les *Artemia salina* mis en contact avec le milieu de culture de la cyanobactérie 2 ne meurent pas plus que ceux mis en contact avec le milieu de culture seul, au bout de 24h.

• **Comparaison du nombre de morts au bout de 24h entre les milieux de culture de la Cyanobactérie 2 et de la Cyanobactérie 1 :**

Hypothèse H_0 : Il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements ; Cyanobactérie 2 et Cyanobactérie 1.

$$\chi^2 < 3.84 \text{ Non rejet de } H_0$$

Les *Artemia salina* mis en contact avec le milieu de culture de la cyanobactérie 1 ne meurent pas plus que ceux mis en contact avec le milieu de culture de la cyanobactérie 2, au bout de 24h.

Les trois tests de χ^2 d'indépendance des variables ont montré qu'il n'existait pas de différence significative entre les trois traitements. Le milieu de culture dans lequel ont poussé les cyanobactéries 1 et 2 ne présente donc pas de toxicité sur les *Artemia*. Les résultats des tests du χ^2 ont montré que le milieu de culture ayant contenu des Cyanobactérie 1 comme des Cyanobactérie 2 ne provoquent pas une mortalité accrue des *Artemia salina*.

6.2. Avec le broyat de cyanobactéries

Les résultats obtenus lors de la mise en contact des artémies avec les différents broyats de cyanobactéries sont résumés dans le tableau 8.

Afin d'analyser ces résultats, des tests de χ^2 d'indépendance entre les différents traitements deux à deux ont été effectués. Les tableaux et calculs utilisés afin d'effectuer les tests sont disponibles en annexe 3.

Tableau 10 : Nombre d'individus morts au bout de 24h de contact avec un milieu de culture neutre (Témoin), un milieu de culture contenant un broyat de cyanobactéries 1 ou 2.

	Témoin	Cyanobactérie 1	Cyanobactérie 2
Mort	15	23	22
Vivant	15	7	8

• Comparaison de l'effet du milieu de culture entre le témoin et Cyanobactérie 1 :

Hypothèse H_0 : Il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements ; témoin et Cyanobactérie 1.

$$\chi^2 > 3.84 \text{ Rejet de } H_0$$

Les *Artemia salina* mis en contact avec le broyat de la cyanobactérie 1 meurent plus que ceux mis en contact avec le milieu de culture seul, au bout de 24h.

• Comparaison de l'effet du milieu de culture entre le témoin et Cyanobactérie 2 :

Hypothèse H_0 : Il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements ; témoin et Cyanobactérie 2.

$$\chi^2 < 3.84 \text{ Non rejet de } H_0$$

Les *Artemia salina* mis en contact avec le broyat de la cyanobactérie 2 ne meurent pas plus que ceux mis en contact avec le milieu de culture seul, au bout de 24h.

• Comparaison de l'effet du milieu de culture entre le témoin et Cyanobactérie 1 :

Hypothèse Ho : Il n'y a pas de différence significative entre les deux traitements ; Cyanobactérie 1 et Cyanobactérie 2.

$$\chi^2 = \frac{(23-22.5)^2}{22.5} + \frac{(7-7.5)^2}{7.5} + \frac{(22-22.5)^2}{22.5} + \frac{(8-7.5)^2}{7.5}$$

$$\chi^2 = 0.441$$

$$ddl = 1$$

$$p = 3.84$$

$$\chi^2 < 3.84 \text{ Non rejet de Ho}$$

Les *Artemia salina* mis en contact avec le broyat de la cyanobactérie 1 ne meurent pas plus que ceux mis en contact avec le broyat de la cyanobactérie 2, au bout de 24h.

Les trois tests de χ^2 d'indépendance des variables ont montré qu'il existait une différence significative entre les traitements broyat de cyanobactéries 1 et témoin. Ainsi, il semblerait que le broyat de cyanobactéries contienne des substances favorisant la mort des crustacés. En revanche, entre le témoin et le broyat de cyanobactéries 2, ainsi qu'entre les deux broyats de cyanobactéries, il n'existe pas de différence significative. Le lot « broyat de cyanobactéries 2 » se situe donc entre les lots « témoin » et « broyat de cyanobactéries 1 » en ce qui concerne la toxicité. Toutefois, la toxicité du milieu ne peut pas être, sans étude génétique plus étayée, attribuée uniquement aux cyanobactéries précitées, en raison du fait que les cultures ne sont pas axéniques. En effet, il est possible que d'autres organismes présents dans le milieu soient responsables de la production de toxines.

7. Analyses phylogénétiques

Pour les analyses, des séquences de l'ADNr 16S des quatre cyanobactéries de notre étude, les séquences de tous les organismes choisis pour former l'arbre font partie de l'ordre des Oscillatoriales et forment trois familles, les Pseudanabaenaceae, les Oscillatoriaceae et les Phormidiaceae, en accord avec la classification d'algaebase^{®2}.

² <http://www.algaebase.org/>

La famille des Oscillatoriales comprend de nombreux genres aux modes de vie très différents, en raison du fait que tous les organismes étaient auparavant placés dans cette famille. Aujourd'hui encore, de nombreuses espèces sont étudiées afin de les replacer dans les familles plus proches phylogénétiquement (Suda *et al.*, 2002). La famille des Phormidiaceae elle aussi comprend des organismes possédant différents modes de vie, de planctonique pour le genre *Planktothrix* à benthique pour les organismes du genre *Tychonema*, qui possèdent par ailleurs une structure interne particulière (Castenholz *et al.*, 2001).

La cyanobactérie *Gloeobacter violaceus* a été choisie comme groupe externe afin d'enraciner l'arbre (Fig. 22).

Les cyanobactéries 1 et 2 appartiennent à un cluster comportant plusieurs groupes frères. Tous les organismes appartenant à ce cluster font partie de la famille des Phormidiaceae qui comprend 28 genres notamment *Planktotrichoides* et *Planktothrix* proches morphologiquement (Suda *et al.*, 2002).

Au sein des *Planktotrichoides*, les deux cyanobactéries étudiées se différencient et forment deux groupes, les cyanobactéries 2 étant plus proches des autres *Planktotrichoides* connues que les cyanobactéries 1. Ceci se retrouve en effet dans les pourcentages d'homologie entre les séquences. Ainsi, les cyanobactéries 1 et 2 partagent 97% d'homologie de séquence sur mes 643 paires de bases étudiées. La cyanobactérie 2 partage en moyenne 96,5% d'homologie des autres espèces appartenant à la famille des *Planktotrichoides*, tandis que la cyanobactérie 1 n'en partage que 95,2% en moyenne. En revanche, l'homologie entre les deux espèces est supérieure et atteint les 97% pour la séquence étudiée.

Les deux *Oscillatoria* spp. étudiées appartiennent bien à ce genre. Elles sont toutes deux identifiées comme des organismes très proches de deux souches d'*Oscillatoria spongelliae* qui se situe dans un cluster correspondant à la famille des Oscillatoriaceae. L'homologie des séquences montre que l'*Oscillatoria* 2 est très proche de la souche d'*Oscillatoria spongelliae* 31OP1, puisque l'homologie entre les deux cyanobactéries étudiées atteint 99,2% alors qu'elle n'est que de 98,1% entre les deux espèces étudiées dans cette étude. L'*Oscillatoria* 1 présente une homologie de 97,9% avec les deux souches connues d'*Oscillatoria spongelliae*. En revanche, elles partagent toutes deux moins de 91% d'homologie avec *Oscillatoria princeps* qui reste la cyanobactérie de référence pour cette famille.

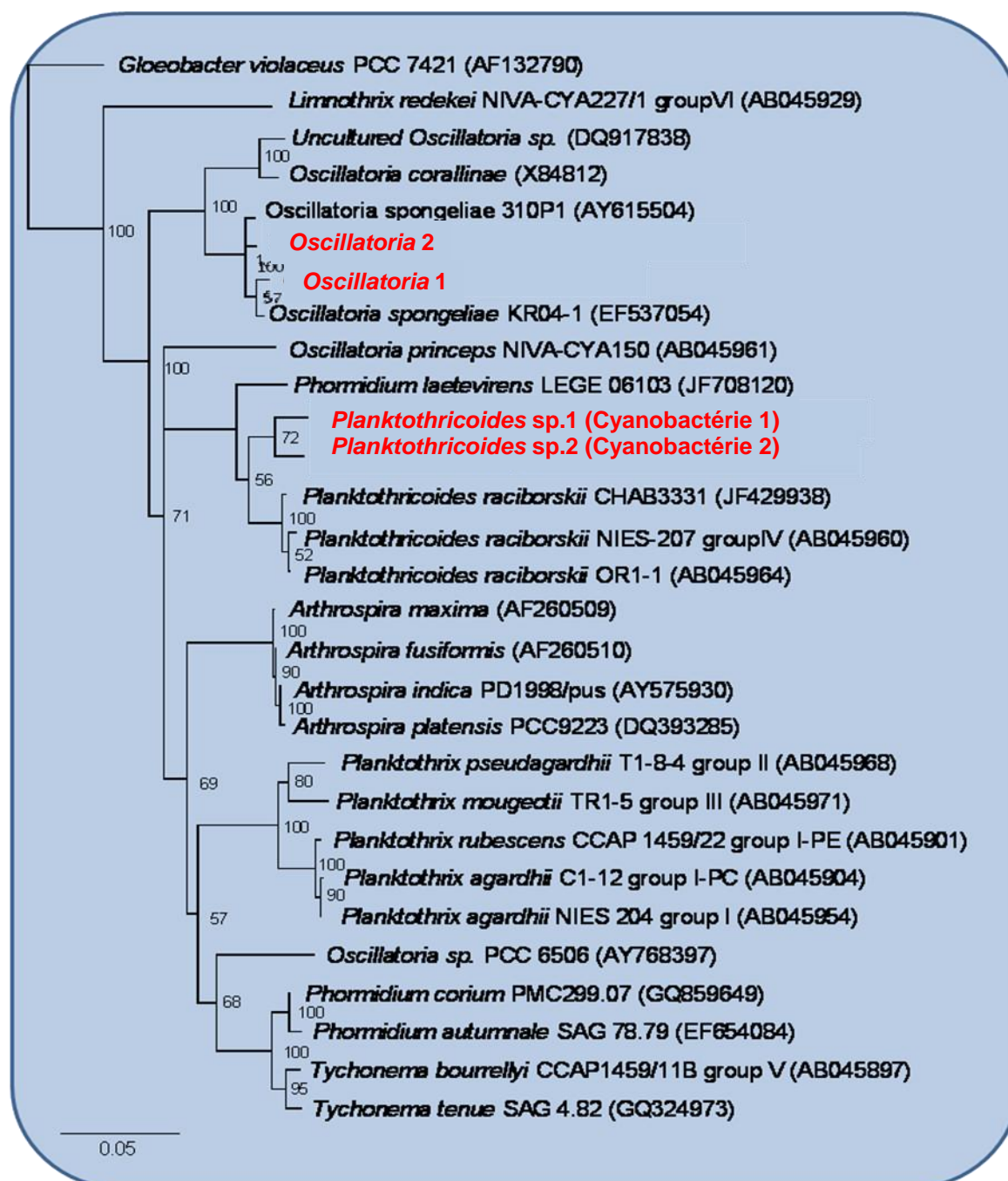


Figure 53: Arbre décrivant les relations phylogénétiques entre les Cyanobactéries 1 et 2 et les *Oscillatoria* 1 et 2 (en rouge) appartenant à l'ordre des Oscillatoriales qui comprend 7 familles d'après algaebase®. Arbre basé sur l'analyse phylogénétique des séquences de 643 nucléotides du gène codant pour l'ARN ribosomal 16S et réalisé par la méthode de Neighbor joining. *Gloeobacter violaceus* a été choisi comme groupe externe. Les valeurs aux nœuds indiquent les valeurs de bootstrap. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont indiquées (S. Gonzalez-Rizzo).

Les cyanobactéries appartenant au genre *Planktothricoides* se développent surtout en profondeur, dans la colonne d'eau (Lavoie *et al.*, 2007), et ne sont pas connues pour sécréter des toxines (Komárek & Komárková, 2004).

Le genre *Planktothricoides*, comprend des trichomes planctoniques pouvant occasionnellement posséder une fine gangue externe, sans akinètes et hétérocystes. Les cellules des deux espèces connues de ce genre, *P. attenuata* et *P. raciborskii*, sont cylindriques, moins hautes que larges, les cellules apicales sont arrondies, et on peut observer des poches de gaz à la périphérie des cellules du filament (Suda *et al.*, 2002). *Planktothricoides raciborskii*, possède une couleur jaune-vert tandis que *P. attenuata* possède une couleur bleu-vert. Les deux espèces sont tropicales, et vivent en eau douce (Komárek & Komárková, 2004).

Dans la suite de ce manuscrit, les Cyanobactéries 1 et 2 seront rebaptisées respectivement *Planktothricoides* sp. 1 et *Planktothricoides* sp. 2.

Les *Oscillatoria* 1 et 2 sont très proches d'une espèce symbiotique d'une éponge, *Oscillatoria spongelliae*. Cette cyanobactérie est retrouvée dans de nombreuses éponges de l'Indo-Pacifique (Usher, 2008). Plus récemment, elle a été également observée dans les Caraïbes (Diaz, 1997). Cette espèce est de très petite taille et composée de peu de cellules (7 à 40).

Les deux *Oscillatoria* étudiées dans ce manuscrit conserveront leur appellation d'origine, soit l'*Oscillatoria* 1 et 2.

CYANOBACTÉRIES

Tableau 11: Matrice d'homologie entre les séquences de 925 paires de bases de l'ADNr 16S des différentes espèces utilisées pour construire l'arbre phylogénétique des bactéries thiotrophes. Sont indiqués en rouge les pourcentages d'homologie entre les séquences des quatre cyanobactéries retrouvés dans cette étude et les autres espèces choisies pour former l'arbre phylogénétique.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	
1. <i>Tychonema bourrellyi</i> CCAP1459/11B (AB045897)																														
2. <i>Tychonema tenue</i> SAG 4.82 (GQ324973)	99,2																													
3. <i>Phormidium corium</i> PMC299.07 (GQ859649)	98,9	98,7																												
4. <i>Phormidium autumnale</i> SAG 78.79 (EF654084)	99,2	99,0	99,7																											
5. <i>Oscillatoria</i> sp. PCC 6506 (AY768397)	93,0	93,2	92,7	92,8																										
6. <i>Planktothrix agardhii</i> C1-12 (AB045904)	91,1	90,9	91,4	91,6	90,5																									
7. <i>Planktothrix agardhii</i> NIES204 (AB045954)	91,2	91,1	91,6	91,7	90,6	99,8																								
8. <i>Planktothrix rubescens</i> CCAP 1459/22 (AB045901)	91,1	90,9	91,4	91,6	90,5	100	99,8																							
9. <i>Planktothrix pseudagardhii</i> T1-8-4 (AB045968)	90,9	90,8	91,2	91,4	90,9	96,3	96,2	96,3																						
10. <i>Planktothrix mougeotii</i> TR1-5 (AB045971)	90,1	90,0	90,3	90,6	90,5	95,9	95,7	95,9	97,8																					
11. <i>Arthrospira maxima</i> (AF260509)	92,4	92,2	92,5	92,8	91,4	92,0	92,2	92,0	92,7	92,2																				
12. <i>Arthrospira indica</i> PD1998/pus (AY575930)	92,4	92,2	92,5	92,8	91,4	92,0	92,2	92,0	92,7	92,2	100																			
13. <i>Arthrospira fusiformis</i> (AF260510)	92,4	92,2	92,5	92,8	91,4	92,0	92,2	92,0	92,7	92,2	100	100																		
14. <i>Arthrospira platensis</i> PCC9223 (DQ393285)	92,4	92,2	92,5	92,8	91,4	92,0	92,2	92,0	92,7	92,2	100	100	100																	
15. <i>Planktothricoides</i> sp. 2 (Cyanobactérie 2)	87,9	88,2	87,7	88,1	88,6	87,9	88,1	87,9	88,1	87,9	90,9	90,9	90,9	90,9																
16. <i>Planktothricoides</i> sp. 1 (Cyanobactérie 1)	89,2	89,5	88,7	89,0	89,7	87,6	87,7	87,6	87,7	88,2	91,4	91,4	91,4	91,4	97,0															
17. <i>Phormidium laetevirens</i> LEGE06103 (JF708120)	88,5	88,7	89,0	89,0	89,7	88,4	88,5	88,4	89,2	89,0	91,7	91,7	91,7	91,7	96,2	95,2														
18. <i>Planktothricoides raciborskii</i> CHAB331 (JF429938)	89,4	89,3	89,1	89,4	89,1	88,8	88,9	88,8	89,4	89,4	91,5	91,5	91,5	91,5	96,7	95,2	96,7													
19. <i>Planktothricoides raciborskii</i> NIES207 (AB045960)	88,5	88,5	88,2	88,5	88,9	88,4	88,5	88,4	89,0	89,2	91,2	91,2	91,2	91,2	95,9	94,7	96,5	99,0												
20. <i>Planktothricoides raciborskii</i> OR1-1 (AB045964)	88,7	88,9	88,5	88,9	89,2	88,7	88,9	88,7	88,9	89,0	92,2	92,2	92,2	92,2	96,8	95,7	96,8	99,0	99,0											
21. <i>Oscillatoria princeps</i> NIVA-CYA150 (AB045961)	91,1	91,1	90,6	90,9	91,1	89,3	89,5	89,3	90,1	90,3	91,4	91,4	91,4	91,4	91,7	91,7	90,9	92,2	92,2	91,7										
22. <i>Uncultured Oscillatoria</i> sp. (DQ917838)	87,4	87,4	87,0	87,3	89,7	87,8	87,9	87,8	88,6	88,4	89,5	89,5	89,5	89,5	89,8	90,6	89,3	90,0	89,3	89,0	89,8									
23. <i>Oscillatoria corallinae</i> (X84812)	88,2	88,4	87,8	88,1	90,3	87,8	87,9	87,8	88,1	88,1	90,3	90,3	90,3	90,3	89,8	90,9	89,7	90,3	90,0	89,7	91,1	98,1								
24. <i>Oscillatoria</i> 2	88,7	88,9	88,9	89,2	90,5	89,0	89,2	89,0	89,8	89,3	91,6	91,6	91,6	91,6	91,7	90,9	90,8	90,8	90,0	90,3	91,1	94,4	94,8							
25. <i>Oscillatoria</i> 1	87,8	87,5	87,8	88,3	88,1	86,8	87,0	86,8	87,8	87,3	90,3	90,3	90,3	90,3	88,5	88,0	88,5	88,7	88,7	88,3	91,4	92,6	98,1							
26. <i>Oscillatoria spongelliae</i> 310P1 (AY615504)	88,9	89,0	89,0	89,3	90,6	89,2	89,3	89,2	90,0	89,7	91,4	91,4	91,4	91,4	90,9	90,9	89,8	90,5	89,7	89,8	91,4	94,8	95,1	99,2	97,9					
27. <i>Oscillatoria spongelliae</i> KR04-1 (EF537054)	88,4	88,4	88,4	88,7	90,0	88,9	89,0	88,9	89,5	89,2	91,1	91,1	91,1	91,1	90,5	90,1	86,8	90,3	89,3	89,2	90,9	94,0	94,3	98,3	97,9	98,9				
28. <i>Limnothrix redekei</i> NIVA-CYA227/1 (AB045929)	85,5	85,2	85,4	85,7	85,7	85,5	85,7	85,5	85,4	85,8	87,1	87,1	87,1	87,1	85,5	85,0	86,8	87,9	87,1	86,8	88,2	86,3	87,1	87,9	89,8	88,2	87,9			
29. <i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421 (AF132790)	85,0	85,2	85,5	85,5	85,2	85,0	85,2	85,0	85,0	85,0	85,5	85,5	85,5	85,5	84,4	84,4	85,4	85,6	84,7	84,7	87,2	86,2	86,2	87,0	90,1	87,3	87,0	86,5		

Discussion

1. *Planktothricoides* sp. 1 et 2

Etude morphologique des filaments

Les analyses phylogénétiques ont confirmé les hybridations *in situ* qui avaient identifié les deux *Planktothricoides* comme des cyanobactéries. Ce genre de la famille des Phormidiaceae ne comprend que deux espèces décrites à ce jour, bien que de nombreuses séquences aient été recensées. Du fait de ce manque d'informations, la biologie et l'écologie des organismes identifiés ici, souffrent du manque de comparaison. Cependant, ces espèces sont proches de celles du genre *Planktothrix* à qui elles peuvent être comparées, ces deux genres étant composés de cyanobactéries planctoniques possédant des vésicules à gaz (Komárek & Komárková, 2004).

Tout d'abord, la morphologie externe des filaments des *Planktothricoides* spp.1 et 2 est en accord avec celle des Oscillatoriales. Ces organismes sont multicellulaires, libres et ne possèdent pas d'hétérocystes ou d'akinetes (Komárek & Komárková, 2004). Chez ces deux espèces, on peut aisément remarquer que la forme des cellules dépend du diamètre du filament. En effet, les filaments fins comme la *Planktothricoides* sp. 2 présentent des cellules cylindriques, alors que les filaments de la *Planktothricoides* sp. 1, de plus gros diamètre, présentent des cellules de forme discoïdale. Ceci est en accord avec les observations précédemment effectuées sur les espèces appartenant au genre *Phormidium* qui appartient à la même famille que les *Planktothricoides* (Marquardt & Palinska, 2007). En revanche, l'apex des cellules, dans les deux cas, était arrondi, contrairement aux autres espèces du genre où le pôle apical des cellules est réduit dans sa partie terminale (Komárek & Komárková, 2004). On peut également noter que les deux espèces observées possédaient une gangue externe, mais celle-ci reste fine, comme ce qui est observé chez les autres espèces de Phormidiaceae (Suda *et al.*, 2002).

On peut également noter que les deux espèces observées montrent une grande variabilité de pigments, les filaments étant rosâtres à rose vif pour *Planktothricoides*

sp. 1 et de couleur bleu-noir pour *Planktothricoides* sp. 2. Dans une autre étude menée parallèlement à cette thèse, le pigment dominant de *Planktothricoides* sp. 1 a été identifié, grâce à son spectre visualisé via un microscope confocal, comme un type de phycoérythrine, largement majoritaire (Guidi-Rontani *et al.*, 2013 soumis) L'autre pigment majoritaire est un type de phycocyanine, classiquement retrouvée chez les cyanobactéries (Ho *et al.*, 1982). Ce rapport diffère de ce qui a précédemment été observé chez *Planktothricoides raciborskii* où il n'a pas été détecté de phycoérythrine (Suda *et al.*, 2002). Cette même analyse n'a pas été effectuée pour les *Planktothricoides* sp. 2, il n'y a donc aucune information disponible concernant sa composition en pigments.

Mode de vie des filaments

Les études de Smith et Peat (1967), ont permis de mettre en évidence chez *Oscillatoria agardhii*, maintenant affiliée aux *Planktothrix*, des vésicules à gaz. Dans notre étude des cyanobactéries, des mouvements de gaz ont été observés en microscopie optique, pour les deux espèces de *Planktothricoides*. Cependant, si le gaz à l'intérieur des cellules était visible, les vésicules ne se sont pas rompues sous la lumière du microscope en émettant des bulles de gaz, comme cela est énoncé par Komárek et Komárková (2004). Aucune coupe des *Planktothricoides* n'ayant été réalisée dans cette étude afin d'étudier la structure de ces vésicules à gaz, nous ne pouvons conclure avec certitude que celles-ci sont présentes au sein des deux espèces. Les vésicules à gaz semblent être des structures cellulaires les plus anciennes permettant aux organismes les possédant, de réguler leur position verticale (Cohen-Bazire *et al.*, 1969; Staley, 1980), leur présence probable dans les filaments rendrait ceux-ci capables de se déplacer dans la colonne d'eau.

En effet, les vésicules à gaz sont présentes chez les organismes dont le mode de vie est planctonique et le genre *Planktothricoides* ne comprenait à ce jour que des organismes planctoniques, ce qui est considéré comme étant la spécificité des organismes en faisant partie (Komárek & Komárková, 2004). Les deux organismes étudiés ici sont retrouvés dans des mattes bactériennes, et bien que le plancton de la Manche à Eau n'ait pas été étudié jusqu'à présent, il est fort peu probable que ces filaments soient retrouvés dans le plancton. En effet, le comportement de ceux-ci

reste benthique. En culture, les filaments se retrouvaient toujours collés contre la paroi inférieure du récipient, que ce soit dans une flasque ou dans un tube à essai.

Nous avons également noté, que lorsque le sable a été ajouté à la culture, les *Planktothricoides* sp. 1 ont planté une, voire les deux extrémités dans le sable, formant des boucles dans l'eau, reproduisant le comportement observé en milieu naturel. Il a été avancé que ce phénomène aurait pu être expliqué par un moyen pour des organismes planctoniques de capter des nutriments contenus dans la matre. Cependant, cette hypothèse ne tient pas, car les cyanobactéries possèdent le même comportement en culture, où tous les nutriments disponibles pour la croissance sont présents dans le milieu de culture, le sédiment ayant été remplacé par du sable stérile. Il est vrai que plusieurs études ont montré que les organismes en culture perdaient leur capacité à former des vésicules à gaz, les gènes responsables de l'apparition de ces structures ayant muté (Beard *et al.*, 2002). Toutefois, jamais ces filaments n'ont été retrouvés en suspension dans le milieu, même en début de culture, ce qui contredit l'existence d'une communauté planctonique.

Il est également possible que le comportement benthique des filaments ne soit qu'une phase du cycle naturel des espèces qui pourrait comporter deux phases, une benthique et une planctonique. Ce phénomène est retrouvé chez de nombreuses cyanobactéries comme les nostocales du genre *Anabaena* et *Aphanizomenon*, qui forment des akinètes benthiques lors de conditions défavorables, cellules qui germent et donnent naissance à des filaments planctoniques (Lee, 1999). Mais ce phénomène a également été observé chez *Microcystis aeruginosa* qui ne produit pas d'akinètes mais forme des colonies « dormantes » dans le sédiment (Takamura 1984, 1985 ; Humbert *et al.*, 2004). C'est la température qui semble impliquée dans ce phénomène, le recrutement planctonique des cyanobactéries commençant après 20 jours passés à 20°C (Yamamoto, 2009).

Dans la zone d'échantillonnage, les cyanobactéries n'ont jamais été retrouvées dans la colonne d'eau quelle que soit la période de l'année, ce qui rend cette hypothèse improbable. Toutefois, il se pourrait que la raison de cette absence soit liée à la luminosité, qui serait alors trop importante pour le développement des organismes.

Lors des cultures, il a été observé qu'une luminosité de 14.9 µE conduisait à la lyse des cellules de *Planktothricoides* sp. 2. Au sein de la matre, ces filaments sont toujours plus ou moins enfouis, ou liés aux autres filaments, ne se dressant jamais au dessus de la matre comme le font les *Planktothricoides* sp. 1. Or, la luminosité au

niveau de la matre est de 14.9 μE (M. Dulorme, communication personnelle), ce comportement pourrait permettre aux filaments de se protéger des rayons lumineux trop intenses. Dans le cas d'une forme de vie planctonique, ces organismes ne résisteraient pas à l'intensité lumineuse qui serait plus importante que celle observée au niveau de la matre, et ne pourraient s'en protéger. Ceci se prononce donc en faveur d'un mode de vie benthique de ces filaments dans notre zone d'échantillonnage, où la profondeur est réduite au niveau des matres de procaryotes.

Cependant, la totalité de la Manche-à-eau n'ayant pas été observée tout au long de l'année, il est impossible d'affirmer que ces deux espèces n'existent pas sous forme planctonique.

Il est également important de noter que les deux espèces connues de *Planktothricoides*, *P. raciborskii* et *P. attenuata* sont des espèces colonisant les eaux douces d'Asie du Sud (Suda *et al.*, 2002; Komárek & Komárková, 2004; Lin *et al.*, 2010). Les deux espèces découvertes ici sont donc les premières espèces marines et hors continent asiatique faisant partie du genre *Planktothricoides*. Ceci, laisse entendre que ce genre possède une répartition plus grande que celle présumée. Toutefois, la faible longueur de la séquence étudiée (643 pb), le faible pourcentage d'homologie avec l'espèce type *Planktothricoides raciborskii* et les différences citées ci-dessus (mode de vie benthique ; espèces marines) ne permet pas d'affirmer avec certitude que ces deux cyanobactéries soient bien affiliées aux *Planktothricoides*. Il se pourrait donc que ces deux espèces constituent un nouveau genre dans la sous-famille des Phormidiaceae. L'étude d'une séquence plus longue pourrait permettre de lever le doute quant à cette hypothèse.

Toxicité

A ce jour, aucune information n'est disponible sur la toxicité des *Planktothricoides* (Komárek & Komárková, 2004). Le test effectué avec *Artemia salina* dans cette étude reste sommaire, car il n'apporte pas d'informations sur la toxicité des molécules, aucune mesure n'ayant été effectuée afin de quantifier celle-ci. De plus l'identification de la toxine, n'a pas été conduite lors de cette thèse. Cependant, cette étude démontre pour la première fois que les cyanobactéries du

genre *Planktothricoides* produisent également des toxines, comme un grand nombre de cyanobactéries (Sivonen & Jones, 1999 ; Aráoz *et al.*, 2010).

La mortalité s'avère beaucoup plus importante en présence d'un broyat de cellules, qu'en présence du milieu de culture seul. Ceci peut être expliqué par le fait que les cyanobactéries n'excrètent pas les toxines dans le milieu de culture et celles-ci ne se retrouvent dans le milieu, que lors de la lyse des cellules. Ainsi, la mortalité de certains individus dans le milieu pourrait expliquer qu'il présente des toxines.

Les analyses statistiques ont révélé que la *Planktothricoides* sp. 2 ne se révélait pas toxique pour les *Artemia*. Cependant, il n'existe pas non plus de différence significative de la mortalité entre les organismes mis en contact avec la *Planktothricoides* sp. 1 et ceux mis en contact avec la *Planktothricoides* sp. 2. Ainsi, il a pu être dégagé deux groupes, au milieu duquel se situe *Planktothricoides* sp. 2.

Il est donc probable que la cyanobactérie 2 produise également des toxines, mais que celles-ci aient été en trop faible concentration pour avoir un effet notable sur les *Artemia*. Ceci peut être expliqué par la différence de taille entre les deux cyanobactéries.

En effet, des travaux annexes à cette thèse, ont permis d'identifier des gènes codant pour les toxines dans les *Planktothricoides* sp. 1 et 2. Il a ainsi été mis en évidence que les deux cyanobactéries possédaient les groupes de gènes *cyrJ*, *cyrB* et *anaB*, connus pour être responsables de la biosynthèse des alcaloïdes de la famille de l'anatoxine-a et de l'homoanatoxine-a (*anaB*) ainsi que des cylindrospermopsines (*cyrJ*, *cyrB*) (Guidi-Rontani *et al.*, 2013 soumis). On peut également noter que les séquences des neurotoxines obtenues, correspondent à des toxines produites par des cyanobactéries d'eau douce et ne sont pas similaires à celles produites par *Lyngbya majuscula*, la jamaïcamide, l'antillatoxine et la kalkitoxine (Aráoz *et al.*, 2010). Cependant, aucune étude n'a encore été effectuée afin de déterminer si toutes les protéines correspondantes sont produites par les cyanobactéries, ou seulement certaines d'entre elles. Les deux toxines retrouvées ici sont cependant rares en milieu marin, car une seule autre étude a, à ce jour, mis en évidence la production d'homoanatoxine-a par des cyanobactéries marines, dans le Pacifique (Méjean *et al.*, 2010).

L'excrétion de toxines par les cyanobactéries, pourrait être un moyen de protection contre la prédation par les invertébrés de la matrice.

Les deux cyanobactéries étudiées ici ne sont pas constamment retrouvées dans la matre. Il est également probable qu'elles possèdent un cycle en milieu naturel, ou que les conditions nécessaires à leur développement n'étant pas toujours optimales, les organismes disparaissent du milieu. La lyse des cellules, pourrait entraîner une émission importante des toxines dans le milieu qui pourrait s'avérer toxique pour les invertébrés présents dans le milieu, si la proportion de cyanobactéries y devenait plus importante.

Récemment, des mattes composées exclusivement de cyanobactéries roses ont été observées à la sortie de la Manche-à-eau. Celles-ci forment des efflorescences sous marines (Fig.54) en se fixant sur les herbiers de phanérogames marines (Fig. 54 a. et b), mais également sur le sédiment (Fig. 54 c). Ces mattes composées exclusivement de *Planktothricoides* sp. 1, se situent le plus souvent dans la colonne d'eau ou les sulfures sont absents, mais cependant toujours fixées sur un substrat.

Des mattes noires ont elles, été observées en bordure des mattes de Beggiatoaceae (Fig. 54 d). Ces mattes étant étudiées depuis peu de temps, aucune information concernant leur occurrence au cours de l'année n'est encore disponible. Il serait intéressant de les suivre au cours du temps afin d'observer d'éventuelles évolutions de ces efflorescences et de savoir si ces espèces disparaissent au cours de l'année, comme de nombreuses espèces des régions tempérées (Takamura 1984, 1985 ; Humbert *et al.*, 2004 ; Yamamoto, 2009)

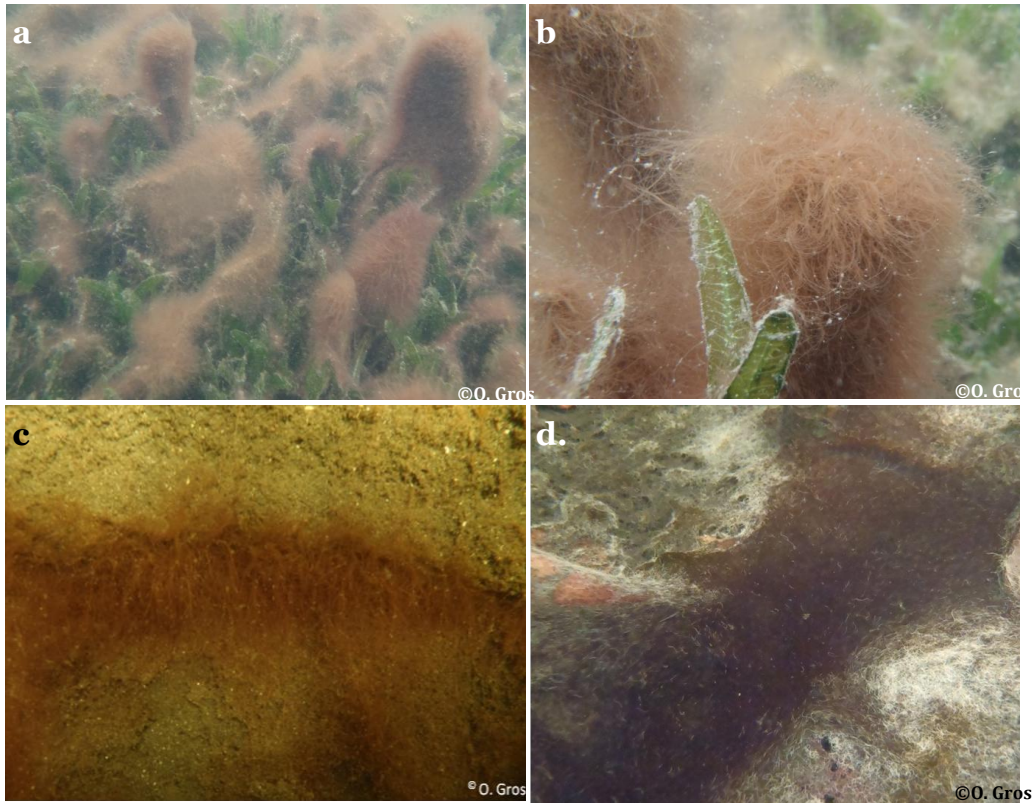


Figure 54: Photographies des mattes de cyanobactéries de la mangrove de Guadeloupe. (a et b) Mattes roses de *Planktothricoides* sp. 1 sur les herbiers de *Thalassia testudinum*. (c.) Matte de *Planktothricoides* sp. 1 roses sur le sédiment de la Manche-à-Eau. (d.) Matte noire de *Planktothricoides* sp. 2 en bordure des mattes de *Beggiatoaceae*, dans la Manche-à-eau.

2. *Oscillatoria* 1 et 2

La morphologie externe des filaments d'*Oscillatoria* 1 et 2 est également en accord avec celle des Oscillatoriales, comme ce qui a été observé pour les *Planktothricoides* spp. 1 et 2. Ces organismes sont multicellulaires, libres et ne possèdent pas d'hétérocystes ou d'akinetes. (Komárek & Komárková, 2004). Chez ces organismes, les cellules sont plus larges que hautes, de forme discoïde, et ne semblent pas rétrécies au niveau de la paroi transversale, en raison de la présence d'une gangue externe.

Oscillatoria 2, possède une morphologie externe proche de celle de l'espèce la plus proche, *O. spongelliae*, telle que décrite par Gaumont (1892), où les cellules apicales sont rondes. Cependant, cette description ne correspond pas à celle de (Ridley *et al.*, 2005) où les cellules apicales sont plus pointues.

Lorsque l'on a ôté la gangue externe des filaments de nos échantillons, nous avons pu noter des différences structurelles sur *Oscillatoria* 2. En effet, celle-ci laisse apparaître au balayage des structures cycliques. La gaine externe d'*Oscillatoria* 2 n'ayant pas été ôtée par le passage au point critique, mais par un abaissement de l'humidité dans la chambre d'observation du microscope, il est probable que les structures observées soient des artéfacts dus à la dessiccation de certaines cellules du filament. En effet, la non appartenance de cette cyanobactérie à la famille des Nostocales exclut d'emblée que ces structures soient des hétérocystes. De plus, leur structure est différente de ces cellules spécialisées dans la fixation de l'azote atmosphérique, car elles semblent fortement liées aux autres cellules du filament, contrairement à ce qui est observé de manière habituelle, où les hétérocystes sont des cellules circulaires bien différenciées du reste du trichome et visibles au microscope optique (Kumar *et al.*, 2010 ; Raven *et al.*, 2000).

La comparaison des images de MEB classique et environnemental de la structure externe de l'*Oscillatoria* 1, a également mis en évidence la présence d'une gangue externe, et une morphologie classique pour une Oscillatoriaceae.

En revanche, lorsque l'on observe les coupes ultrafines de l'*Oscillatoria* 1, la première chose qui frappe est la présence de nombreuses vacuoles semblant vides. La cyanobactérie observée ici possède une morphologie analogue à celle des cyanobactéries du genre *Tychonema* (R. Rippka, communication personnelle), dont les trichomes sont dépourvus de vacuoles de gaz (Castenholz *et al.*, 2001), ce qui explique que les coupes ultrafines n'aient pas permis de mettre en évidence la présence de vacuoles de gaz cylindriques, identiques à celles observées traditionnellement dans les cyanobactéries (Cohen-Bazire *et al.*, 1969; Smith & Peat, 1967; Venter *et al.*, 2003).

Ces trichomes comportent de larges zones de kéritomisation, apparaissant comme vides sur les images de microscopie électronique. Ces vacuoles contiennent probablement des lipides, sous forme de Poly- β -Hydroxybutyrate (PHB). En effet, on observe au niveau de certaines vacuoles, des zones où les membranes vacuolaires sont interrompues, provoquant la fusion de deux vacuoles. Ces structures sont semblables aux membranes formant les adipocytes dans les cellules animales (Fawcett & Raviola, 1994). Il est donc plus probable que les vacuoles renferment un

contenu qui aurait été dissous par les traitements pour la fixation, comme des molécules lipidiques ou un autre liquide.

L'absence des nombreuses membranes photosynthétiques traditionnellement observées chez les cyanobactéries est également notable. Les cyanobactéries du genre *Tychonema* présentent en effet des thylacoïdes au sein du réseau réticulé, ou zone de kéritomisation. Ici, tout le contenu semble accolé à la membrane plasmique.

Cette structure est totalement différente de celle observée chez les autres cyanobactéries de l'ordre des Oscillatoriales, où l'on observe traditionnellement des cercles concentriques de membranes photosynthétiques, partant de la membrane plasmique vers le centre de la cellule (Smith & Peat, 1967; Venter *et al.*, 2003; Do Carmo Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2009).

Les thylacoïdes assemblés sous forme de lamelles superposées dans les deux plans, sont le siège de la photosynthèse. Ils sont organisés en granum, structures composées de saccules disposées les uns sur les autres, et pouvant leur donner une apparence striée selon le plan de coupe. Ces structures sont de plus très souvent associées à des granules dont le contenu est très dense aux électrons. Ces granules, très proches des thylacoïdes, sont les phycobilisomes contenant des pigments tels que la phycocyanine, ou de la phycoérythrine. En effet, les phycobilisomes sont des structures toujours proches des membranes photosynthétiques, comme ce qui est observé chez les autres cyanobactéries (Yamanaka *et al.*, 1982). A ce jour, toutes les espèces dulçaquicoles de *Tychonema* étudiées ont présenté de la phycoérythrine, mais aussi de la myxoxantophylle et de l'oscillaxantine (Skulberg & Skulberg, 1985). Cependant, dans notre étude, aucune phycobiline n'a pu être mise en évidence, probablement en raison de la méthode d'extraction des pigments utilisés. Les phycobilines n'étant pas solubles dans l'alcool, leur identification est rendue impossible par cette méthode. En effet, il a été démontré que les méthodes d'extraction des phycobilines doivent comprendre des digestions par des lysozymes et/ou l'utilisation d'un tampon avec une rupture mécanique des cellules obtenues par pression, par utilisation d'ultrasons, ou par alternance de chaud/froid (Lawrenz *et al.*, 2011).

Les résultats concernant la composition en pigments d'*Oscillatoria* 1 sont toutefois conformes à ceux attendus. En effet, les cyanobactéries ne comportent pas de chlorophylle b, contrairement aux algues vertes et aux végétaux supérieurs (Ho *et al.*,

1982). En revanche, on retrouve dans le filament de la phéophytine, qui permet l'absorption des rayons lumineux nécessaires au fonctionnement du photosystème II. Le contenu intracellulaire observé chez *Oscillatoria* 1 contredit totalement les résultats obtenus lors de l'étude phylogénétique. En effet, celle-ci plaçait l'*Oscillatoria* 1 comme proche d'une espèce de cyanobactérie symbiotique d'une éponge, *O. spongelliae* qui est retrouvée communément dans les éponges de l'indopacifique et plus récemment dans des éponges de la mer Méditerranée et dans la mer de Caraïbes (Diaz, 1997; Usher *et al.*, 2008).

Les coupes ultrafines de cette espèce, montrent qu'elle possède une structure comparable à la plupart des cyanobactéries (Berthold *et al.*, 1982 ; Ridley *et al.*, 2005). On y retrouve effectivement, les structures traditionnellement observées chez les cyanobactéries, comme les membranes photosynthétiques, partant de la membrane plasmique vers le centre de la cellule (Smith & Peat, 1967; Venter *et al.*, 2003 ; Do Carmo Bittencourt-Oliveira *et al.*, 2009), sans réseau réticulé. Ceci est totalement incohérent avec ce qui est observé lors des études phylogénétiques, où les cyanobactéries du genre *Tychonema* sont très éloignées d'*Oscillatoria* 1, ne partageant que 87,8 et 87,5% d'homologie avec respectivement *Tychonema bourrellyi* et *T. tenue*. Cependant, ces deux espèces sont toutes deux des espèces d'eaux douces (Skulberg & Skulberg, 1991) et sont donc peu comparables à nos espèces marines. De plus ces deux espèces présentent une taille bien inférieure à celle de notre étude. En effet, à ce jour, les espèces de *Tychonema* répertoriées mesurent entre 4 et 16 µm de diamètre (Skulberg & Skulberg, 1985 ; Castenholz *et al.* 2001). Ce mauvais placement au sein de l'arbre peut être expliqué par la faible longueur de la séquence d'*Oscillatoria* 1, mais également, par le faible nombre de séquences de *Tychonema* disponibles à ce jour. L'homologie existant entre les deux espèces *Oscillatoria* 1 et *Oscillatoria spongelliae*, de 97,9% sur 643 nucléotides reste faible et montre ainsi qu'il est fort probable que cet arbre soit revu lorsque des séquences de longueur plus importante seront disponibles. Il est toutefois possible que l'ADN séquencé provienne d'une autre cyanobactérie, plus proche d'*O. spongelliae* qui aurait contaminé l'échantillon. L'utilisation d'une sonde spécifique dans des hybridations *in situ* pourrait lever le doute quant à cette hypothèse.

La culture d'*Oscillatoria* 1 s'est avérée infructueuse. Quelque soit le milieu de culture utilisé F/2, ou BG11, il n'a été observé aucune croissance de ces organismes. Ceci peut s'expliquer par des problèmes à trouver la luminosité optimale pour leur croissance.

Il est toutefois important de noter qu'à ce jour, aucune espèce de *Tychonema* marine n'existe en culture et seule une espèce subtropicale des Bermudes, de diamètre proche de l'espèce étudiée ici (60 µm), a pu être maintenue en culture, mais a, par la suite, été perdue (Castenholz *et al.*, 2001). Cette cyanobactérie était cultivée dans le milieu Z8X salt, qui n'a pas été testé pour la culture isolée d'*Oscillatoria* 1. Il serait donc intéressant de tester si ce milieu convient à la croissance de l'espèce étudiée ici.

Aucune coupe fine n'a été réalisée pour *Oscillatoria* 2 dans cette étude. Celle-ci est également identifiée comme une espèce proche d'*O. spongelliae*. Toutefois, les pourcentages d'homologie entre ces deux espèces atteignent ici 99% et nous permettent ainsi de penser que cette espèce est bien placée dans l'arbre. En revanche, la taille et le mode de vie d'*O. spongelliae* sont très différents de ceux de l'espèce rencontrée ici. Ainsi, *O. spongelliae* est une espèce mesurant entre 7 et 10 µm pour 4 µm de diamètre. Ce filament est relativement court et se compose de 7 à 50 cellules (Ridley *et al.* 2005). *Oscillatoria* 2, en revanche, est de très grande taille (60 µm environ), en comparaison des espèces symbiotiques, ce qui rend improbable la possibilité d'existence de formes symbiotiques de cette espèce. De plus, *O. spongelliae* effectue sa transmission chez l'hôte de manière verticale, (Usher *et al.*, 2008), et aucune étude n'a encore reporté la présence de cet organisme sous forme libre. Il apparaît donc que nous soyons bien en présence de deux espèces différentes.

La culture des *Oscillatoria* 2 a toujours été très fructueuse, dès les essais avec le milieu F/2. En effet, lors de la culture de la matre entière ce sont les seuls filaments qui étaient capables de se développer. Ils se sont également très fortement développés dans le milieu BG 11, alors qu'un filament avait contaminé une culture de *Planktothricoides* sp.1.

Aucune étude n'a porté sur les toxines que pourraient produire ces deux cyanobactéries. Cependant, il a été démontré qu'*O. spongelliae* est connue pour produire des composés chlorés, sensés protéger, les cyanobactéries comme leur hôte, de la prédation (Ridley *et al.*, 2005). De même, des composés secondaires responsables d'allélopathie ont pu être détectés chez *Tychonema bourrellyi* (Shao *et al.*, 2013). L'étude des composés secondaires potentiellement toxiques de ces deux cyanobactéries, pourrait être une perspective intéressante de travail.

Cette étude des cyanobactéries de la matre, nous a permis de mettre en évidence quatre souches très intéressantes de cyanobactéries, qui pourraient être identifiées, après des études phylogénétiques plus poussées, comme des espèces nouvelles, voire des genres nouveaux. Une étude plus poussée de leur morphologie et de leur toxicité s'avère également nécessaire car, en raison de l'eutrophisation importante dont sont victimes de plus en plus les milieux côtiers, il est important de connaître cet aspect des cyanobactéries afin d'anticiper des effets d'éventuelles fleurs d'eau toxiques.

3. Analyse combinée des trois chapitres.

Les trois chapitres étudiés ici ont permis d'identifier les organismes composant la matre, mais également d'évaluer les facteurs chimiques pouvant influencer son évolution. Cette analyse a pour but de mettre en relation ces trois chapitres, afin de comprendre quelles interactions pourraient se jouer entre la matre de procaryotes et le milieu.

Les mesures *in situ*, combinées aux températures relevées à proximité du milieu nous ont permis d'émettre des hypothèses, quant au fonctionnement de la matre et aux rôles joués par chacun des organismes.

Le jour, les cyanobactéries produiraient une partie de l'oxygène qui permettrait aux Beggiatoaceae et aux autres bactéries sulfo-oxydantes présentes dans la matre, d'effectuer l'oxydation des sulfures. De plus, ces mêmes cyanobactéries sont peut être également capables d'effectuer la photosynthèse anoxygénique, lorsque les taux de sulfures inhibent l'activité du photosystème II.

Durant les mois de janvier à avril, lorsque la température diminue, il est possible que les Beggiatoaceae, bénéficiant de plus d'oxygène qui peut pénétrer plus profondément dans le sédiment, migrent en profondeur, on remarque que par ailleurs, la matre devient plus riche en cyanobactéries. La nuit, les cyanobactéries, ne pouvant plus effectuer la photosynthèse oxygénique, l'oxygène du milieu serait très vite consommé, et le milieu deviendrait anoxique, comme cela a été observé dans d'autres milieux (Stal, 1995). Cependant aucune mesure n'a été réalisée ici afin de confirmer cette hypothèse. Certaines cyanobactéries, incapables de respiration cellulaire en raison du manque d'oxygène, passeraient alors en métabolisme anaérobie, en fermentant les composés accumulés pendant la journée, ou remonteraient dans la colonne d'eau si

elles en sont capables, tandis que les *Beggiatoaceae* remonteraient en surface de la matte, chercher de l'oxygène provenant de la colonne d'eau. Lorsque celui-ci n'est plus disponible, les bactéries sulfo-oxydantes pourraient alors utiliser les nitrates accumulés dans la journée dans leurs vacuoles, afin d'oxyder les sulfures présents dans le milieu.

Ces hypothèses, quant aux interactions des différents organismes entre eux et avec le milieu, mériteraient d'être étayées par de plus amples études. Il serait en effet intéressant d'effectuer des observations en mangrove afin de vérifier si les *Beggiatoaceae* remontent au dessus du sédiment pendant la nuit. Un suivi de température ainsi que de l'oxygène pendant la nuit et pendant les deux saisons pourrait également être envisagé.

L'association des deux types d'organismes au sein de la matte serait ainsi à bénéfice mutuel. En effet, les cyanobactéries, bien qu'elles soient capables d'effectuer la photosynthèse anoxygénique, ne peuvent croître par ce métabolisme (Stal, 1995). Ainsi, l'association avec les *Beggiatoaceae*, leur permettrait d'évoluer dans un milieu détoxifié des sulfures. Dans le cadre de notre étude, les concentrations en sulfures relevées *in situ* peuvent atteindre 2 mM, concentration où même les cyanobactéries ne peuvent se développer. Toutefois, la plupart du temps, la présence de *Beggiatoa* dans le milieu, permet de maintenir cette concentration à environ 500 μ M concentration où la photosynthèse est possible, voire même stimulée, si les cyanobactéries sont tolérantes aux sulfures (Cohen *et al.*, 1986). Les *Beggiatoaceae*, elles, grâce aux cyanobactéries, pourraient bénéficier d'un environnement plus riche en oxygène qui pourrait diffuser plus profondément dans les premiers millimètres du sédiment.

La capacité de se déplacer par glissement, permettrait aux trichomes des cyanobactéries et bactéries sulfo-oxydantes observés, de trouver au sein de la matte, le gradient le plus favorable à leur croissance.

Les observations récentes de mattes composées exclusivement de cyanobactéries dans d'autres zones proches de la zone d'échantillonnage, sous forme de mattes composées de une à deux espèces de cyanobactéries (C. Dartron, communication personnelle), permettent d'émettre un doute quant aux interactions réelles existant entre les cyanobactéries et les *Beggiatoaceae*. En effet, ces mattes roses, noires mais aussi vertes, sont composées uniquement de cyanobactéries, et l'absence totale de *Beggiatoaceae*, qui pourrait être due à une absence de sulfures dans ces zones, peut

parfois y être notée. Toutefois, ces observations ne remettent pas en cause le comportement des Beggiatoaceae dans la matte. De plus, d'*Oscillatoria* 1 n'a jamais été retrouvée en grande quantité hors de la matte de Beggiatoaceae, où elle est présente de façon sporadique. Ainsi, il est probable qu'une véritable interaction existe entre cette espèce et la matte de Beggiatoaceae, tandis qu'il est plus probable que la présence des trois autres cyanobactéries *Planktothricoides* spp. 1 et 2 et *Oscillatoria* 2 au sein de la matte blanche soit en fait accidentelle, ces organismes ayant été transportés par les courants dans la matte de Beggiatoaceae.

Il est cependant possible que la disparition de la matte blanche soit également due à une toute autre raison, qui pourrait faire intervenir les toxines cyanobactériennes. En effet, lors de cette étude, nous avons pu observer que les cyanobactéries de la matte étaient capables de produire des toxines. Celles-ci pourraient avoir un impact sur la population de Beggiatoaceae qui serait ainsi dégradée, ou qui fuirait les toxines. Lors de ces épisodes, la matte est souvent plus brune, et riche en cyanobactéries qui pourraient donc être plus compétitives et leur nombre l'emporterait donc sur celui des Beggiatoaceae. Récemment, une étude a ainsi mis en évidence que *Tychonema bourrellyi* possédait un effet allélopathique, inhibant la croissance de *Microcystis aeruginosa* (Shao *et al.*, 2013). Il n'est donc pas impossible que de tels effets aient lieu entre les cyanobactéries et les Beggiatoaceae, qui disparaîtraient alors périodiquement du milieu.

En revanche, en raison de la prédominance des Beggiatoaceae dans le milieu, il faudrait d'abord que la population de cyanobactéries augmente fortement, avant qu'un effet allélopathique puisse être efficace. Il a été démontré que les efflorescences de cyanobactéries sont souvent liées à une augmentation du phosphore dans le milieu (Walter, 1976; Tian *et al.*, 2012), il serait donc intéressant d'étudier les taux de phosphore dans le milieu afin de vérifier s'il n'existe pas de corrélation entre ceux-ci et la domination temporaire des cyanobactéries dans le milieu.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude avait pour but de caractériser les micro-organismes visibles à l'œil nu, composant les mattes de procaryotes. Les organismes majoritaires ont été identifiés comme des cyanobactéries et des Beggiatoaceae.

Toutes les cyanobactéries rencontrées font partie de l'ordre des Oscillatoriales, alors que les bactéries sulfo-oxydantes font partie de la famille des Beggiatoaceae. Lors de cette étude, aucun de ces micro-organismes géants n'a été observé vivant en symbiose avec des γ -protéobactéries. Toutefois, il est peu probable que tous les organismes composant la matte aient été décrits. En effet, il faut tenir compte de tous les organismes unicellulaires composant le tapis comme les diatomées, mais également d'autres bactéries sulfo-oxydantes microscopiques, des cyanobactéries et des Archaea unicellulaires, cette étude n'ayant traité que des filaments multicellulaires.

Parmi les cyanobactéries, nous avons pu identifier quatre souches. Deux appartiennent au genre *Planktothricoides*, ce qui nous a permis de démontrer dans cette étude que celui-ci n'était pas uniquement constitué d'espèces d'eau douce, mais qu'il comportait également des espèces marines, capables de produire des toxines. Nous avons également identifié deux autres cyanobactéries, une très proche d'une espèce symbiotique d'une éponge, *O. spongeliae*, et l'autre, donc la phylogénie n'a pu être établie avec certitude, en raison de sa structure interne proche des *Tychonema*, dont elle est pourtant phylogénétiquement éloignée.

La présence intracellulaire d'Archaea dans un autre procaryote, une Beggiatoaceae, a également été suggérée ici. Cependant, cette association n'a pas pu être étudiée plus en profondeur, en raison des difficultés techniques consistant à retrouver les Archaea dans les filaments. Toutefois, la présence d'Archaea dans un autre procaryote constituerait une première.

Les mesures *in situ* ont permis de mettre en évidence que le sédiment est riche en sulfures qui remontent jusqu'à la surface du sédiment, et sont oxydés de façon naturelle par l'eau de mer. Dans les zones où les courants le permettent et favorisent le développement de zones oxique-anoxiques, des mattes de procaryotes peuvent s'installer afin d'effectuer une oxydation biologique des sulfures.

L'étude des taux d'oxygène et des sulfures de cette matte nous a permis de comprendre, que la matte consommait le H₂S produit dans le sédiment.

Lors de cette étude, quelques réponses ont été apportées quant au fonctionnement de la matre dans son environnement et à la biologie des organismes qui la composent. Elle a cependant également soulevé beaucoup d'interrogations dont certaines restent aujourd'hui sans réponses. Trois axes de recherche importants peuvent ainsi être dégagés de ces travaux de thèse.

Le premier point concerne la chimie de la matre. Ainsi, ces expériences n'ont pas pu mettre en évidence que le mouvement des bactéries était corrélé aux taux de sulfures relevés dans le sédiment. Cependant, cette hypothèse ne peut totalement être réfutée, des mesures des taux de sulfures dans l'eau interstitielle contenue dans le sédiment, ayant permis de mettre en évidence que la matre se situait préférentiellement qu'au dessus des zones où du soufre était présent à de fortes concentrations (O. Gros, communication personnelle). Il serait également intéressant de suivre les taux d'oxygène dans la matre et dans les premiers centimètres du sédiment sur du long terme, afin d'observer s'il existe des variations nyctémérales, et selon les saisons, ceci afin de vérifier si le comportement de la matre peut être corrélé à ces facteurs abiotiques.

Une thèse portant sur l'étude du cycle biogéochimique de l'azote est également déjà en place au sein du laboratoire afin de comprendre et d'approfondir les relations de la matre avec les cycles de nitrification et de dénitrification. Cette étude a d'ores et déjà démontré que la matre consommait l'ammonium. Des dosages sur colonne de cadmium des nitrates ont également été effectués sur les Beggiatoaceae, confirmant leur présence au sein de ces bactéries (A. Boc, communication personnelle).

Il serait intéressant que cette étude s'accompagne d'une étude de structure sur les vacuoles pouvant être le siège des nitrates contenus dans les Beggiatoaceae.

Ainsi, grâce à notre étude ainsi qu'à cette nouvelle thèse en cours, les connaissances sur les cycles du soufre et de l'azote en mangrove pourront être complétées.

Le second point présentant également un intérêt majeur concerne l'étude des toxines cyanobactériennes. En effet, les fleurs d'eau cyanobactériennes, bien que rares en milieu marin, peuvent produire des composés toxiques nocifs pour la faune marine, tout comme pour les humains (Faassen *et al.*, 2012). Dans le cas où les conditions idéales de développement de ces organismes se produiraient dans la

Manche-à-Eau, lors de la lyse cellulaire, il se pourrait que des effets soient observables sur la faune, comme sur la matte elle-même, celle-ci disparaissant régulièrement de manière inexplicée.

De plus, l'étude de ces composés pourrait permettre la découverte de molécules d'intérêt dans le secteur médical (Sharma *et al.*, 2011).

Une thèse a ainsi commencé cette année, avec pour but de caractériser les espèces composant les mattes de cyanobactéries et d'identifier par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) quelles sont les toxines produites par les cyanobactéries. L'étude de l'ultrastructure des cyanobactéries est également nécessaire, permettant peut être, de caractériser plus amplement l'*Oscillatoria 1*, dont la phylogénie reste inexplicée. Ceci passe cependant par la mise en culture de toutes ces espèces. Si cette thèse s'est avérée prometteuse quant à la culture de certains organismes, il est nécessaire de poursuivre cette voie et il serait à terme, indispensable d'obtenir des cultures axéniques des nombreuses espèces étudiées, ceci afin d'éviter toute contamination.

Des études au sein du laboratoire poursuivent donc cette thèse, en continuant à caractériser les cyanobactéries présentes dans la mangrove. Aucun résultat n'est pour l'instant disponible, toutefois, il apparaît déjà que le nombre d'espèces de cyanobactéries filamenteuses entrant dans la formation de mattes soit très supérieur à celui énoncé dans la présente étude.

Cette future thèse permettra d'étoffer ainsi le peu de connaissances disponibles sur les cyanobactéries marines, et plus particulièrement de la mangrove.

La caractérisation de la relation entre les Archaea et les Beggiatoaceae reste un axe important à explorer. En effet, il serait très intéressant d'identifier les Archaea intracellulaires sur des coupes ultrafines, afin de comprendre comment l'Archaea se situe dans l'organisme, si elle est située dans une vacuole ou non. D'autre part, la nature des interactions entre les deux organismes mériterait d'être étudiée. Toutefois, en raison de la nature procaryotique des deux organismes, une analyse génétique s'avèrerait difficile. Il faudrait donc s'intéresser à d'autres outils capables de mettre en évidence le passage des molécules entre les différents organismes, comme le NanoSIMS. Cependant, la rareté de cette association pose des problèmes de détection des Archaea dans le filament. En effet, il faut pouvoir s'assurer de retrouver dans

chaque échantillons des filaments porteurs d'Archaea, ce qui n'a pas été possible à ce jour.

La culture des individus isolés en laboratoire ayant été jusqu'à présent prometteuse, permettrait de disposer d'organismes en permanence dans le laboratoire, ceci afin d'en étudier la structure et la biologie.

Il est toutefois essentiel de rappeler qu'ici seules les bactéries filamenteuses ont été étudiées. Il est ainsi nécessaire de ne pas oublier que ces mattes de procaryotes constituent un écosystème à part entière, composé également d'organismes microscopiques, souvent la base d'un réseau trophique (Stal & Caumette, 1994). Les différents niveaux de ce réseau n'ont pas été étudiés ici, mais sont toutefois en cours d'étude au sein du laboratoire.

Cette thèse s'inscrit dans la volonté d'une meilleure connaissance des écosystèmes, notamment celui de la mangrove. Elle a permis la mise en relief du fait que la mangrove, lieu souvent négligé et dégradé par l'anthropisation, regorge d'écosystèmes et de micro-organismes qui méritent d'être étudiés. Cet environnement constitue en effet un lieu de prédilection pour l'étude des mattes de bactéries sulfo-oxydantes, plus accessible que dans les sources hydrothermales, mais aussi d'autres micro-organismes comme les cyanobactéries. Ces deux aspects présentent un intérêt qui devrait s'avérer croissant, en raison des récentes découvertes sur la détoxification de l'eau par des bactéries sulfo-oxydantes (Lavik *et al.*, 2009), tout comme l'augmentation des efflorescences cyanobactériennes dues à l'anthropisation (O'Neil *et al.*, 2012; Paerl & Paul, 2012).

BIBLIOGRAPHIE

A

- Ackert Jr. LT (2006). The role of microbes in agriculture: Sergei Vinogradskii's discovery and investigation of chemosynthesis, 1880-1910. *J Hist Biol* 39:373-406.
- Ahmad A, Barry JP, Nelson CD (1999). Phylogenetic Affinity of a Wide, Vacuolate, Nitrate-Accumulating *Beggiatoa* sp. from Monterey Canyon, California, with *Thioploca* spp. *Appl Environ Microbiol.* 1999 January; 65(1): 270–277.
- Alongi, D.M., 1998. Coastal Ecosystem Processes. CRC Press
- Alongi D, (2002). Present state and future of the world's mangrove forests. *Environ.l Conserv.* 29:3 pp 331–349.
- Amann RI, Zarda B, Stahl DA, Schleifer K- (1992). Identification of individual prokaryotic cells by using enzyme-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 58:3007-3011.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990). Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl Environ Microbiol* 56:1919-1925.
- Andreote FD, Jiménez DJ, Chaves D, Dias ACF, Luvizotto DM, Dini-Andreote F, Cipola Fasanella C, Varon Lopez M, Baena S, Gouvêa Taketani R, Soares de Melo I, (2012) The Microbiome of Brazilian Mangrove Sediments as Revealed by Metagenomics. *PLoS ONE* 7(6)
- Anwar H, Strap JL, Costerton W (1992). Establishment of aging biofilms: Possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 36:1347-1351.
- Anwar H, Dasgupta MK, Costerton JW (1990). Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 34:2043-2046.
- Aráoz R, Molgó J, Tandeau de Marsac N (2010). Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon* 56:813-828.
- Asai R, Nakamura C, Ikebukuro K, Karube I, Miyake J (2002) Detection technique of asymmetric RT-PCR-based amplified single-stranded DNA and its application to biosensor for detection of mRNA for cyanobacteria, *Anabaena variabilis*. *Biotechnol Lett.* 24 pp 1677-1682.
- Ashton EC, Hogarth PJ, Ormond R, (1999). Breakdown of mangrove leaf litter in a managed mangroveforest in Peninsular Malaysia. *Hydrobiol* 413 pp 77–88.

B

- Baganz D, Staaks G and Steinberg C. (1998) Impact of the cyanobacteria toxin, microcystin-Lr on behaviour of zebrafish, *Danio rerio* Wat. Res. Vol. 32, No. 3, pp. 948-952
- Ballot, A., Krienitz, L., Kotut K., Wiegand C., Metcalf JS., Codd GA., Pflugmacher S. (2004) Cyanobacteria and cyanobacterial toxins in three alkaline Rift Valley lakes of Kenya - Lakes Bogoria, Nakuru and Elmenteita Journal of Plankton Research 26 (8) , pp. 925-935
- Basen M, Krüger M, Milucka J, Kuever J, Kahnt J, Grundmann O, Meyerdierks A., Widdel, F., Shima S. (2011). Bacterial enzymes for dissimilatory sulfate reduction in a marine microbial mat (Black Sea) mediating anaerobic oxidation of methane. Environ Microbiol 13:1370-1379.
- Beard SJ, Handley BA, Walsby AE (2002). Spontaneous mutations in gas vesicle genes of *Planktothrix* spp. affect gas vesicle production and critical pressure. FEMS Microbiol Lett 215:189-195.
- Benner R, Peele ER, Hodson RE, (1986). Microbial utilization of dissolved organic matter from leaves of the red mangrove, *Rhizophora mangle*, in the Fresh Creek Estuary, Bahamas. Estuar. coast. shelf Sci. 23 pp 607-6.
- Bernard C, Fenchel T (1995). Mats of colourless sulfur bacteria. II. Structure, composition of biota and successional patterns. Mar Ecol Prog Series 128:171-179.
- Berthold RJ, Borowitzka MA, and Mackay MA, (1982) The ultrastructure of *Oscillatoria spongelliae*, the blue-green algal endosymbiont of the sponge *Dysidea herbacea*. Phycol: 21,3, pp. 327-335.
- Berger W.H., V.S. Smetacek, G. Wefer (1989). Ocean productivity and paleoproductivity an overview. In: Productivity of the Ocean: Present and Past, W.H. Berger, V.S. Smetacck, G. Wcfer, ed. Dahlem Workshop Reports, Wiley and Sons, Chichester. pp 1-34.
- Best JH, Pflugmacher S, Wiegand C, Eddy FB, Metcalf JS, Codd GA (2002). Effects of enteric bacterial and cyanobacterial lipopolysaccharides, and of microcystin-LR, on glutathione S-transferase activities in zebra fish (*Danio rerio*). Aqua Toxicol 60 pp 223-231
- Boetius A, Ravenschlag K, Schubert CJ, Rickert D, Widdel F, Gleseke A, Amann, R.; Jørgensen, B.B.; Witte, U.; Pfannkuche, O. (2000). A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation methane. Nature 407:623-626.
- Borrel G, Jézéquel D, Biderre-Petit C, Morel-Desrosiers N, Morel J-, Peyret P, Fonty, G.; Lehours, A.-C. (2011). Production and consumption of methane in freshwater lake ecosystems. Res Microbiol 162:833-847.

BIBLIOGRAPHIE

Boto KG, Alongi DM, Nott ALJ (1989) Dissolved organic carbon-bacteria interactions at sediment-water interface in a tropical mangrove system. *Mar Ecol Prog Ser* 51 pp 243–251.

Briand E, Yéprémian C, Humbert J-, Quiblier C (2008). Competition between microcystin- and non-microcystin-producing *Planktothrix agardhii* (cyanobacteria) strains under different environmental conditions. *Environ Microbiol* 10:3337-3348.

Bunt J.S. (1992). How can fragile ecosystems best be conserved'? In: Use and Misuse of the Seajoor, K.J. Hsü, J. Thiede, ed. Dahlem Workshop Reports, Wiley and Sons, Chichester pp 229-242.

C

Carmichael WW, Azevedo SMFO, An JS, Molica RJR, Jochimsen EM, Lau S, Rinehart,K.L.;Shaw,G.R.; Eaglesham,G.K. (2001). Human fatalities form cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins. *Environ Health Perspect* 109:663-668.

Castenholz RW, Waterbury JB (1989). Cyanobacteria. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 3*. Williams & Wilkins: Baltimore, pp 1710-1806.

Chandrika V, Nair PVR, Khambhadkar LR (1990) Distribution of phototrophic thionic bacteria in the anaerobic and micro-aerophilic strata of mangrove ecosystem of Cochin. *J Mar Biol Assoc India* 32:77-84

Characklis WG (1989). *Biofilms*. Wiley: New york, pp 55-89.

Cohen Y, Jorgensen BB, Revsbech NP, Poplawski R (1986). Adaptation to hydrogen sulfide of oxygenic and anoxygenic photosynthesis among cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 51:398-407.

Cohen-Bazire G, Kunisawa R, Pfennig N (1969). Comparative study of the structure of gas vacuoles. *J Bacteriol* 100:1049-1061.

Cole JJ, Lane JM, Marino R, Howarth RW (1993). Molybdenum assimilation by cyanobacteria and phytoplankton in freshwater and salt water. *Limnol Oceanogr* 38:25-35.

Constant P, Poissant L, Villemur R (2008). Isolation of *Streptomyces* sp. PCB7, the first microorganism demonstrating high-affinity uptake of tropospheric H₂. *ISME J* 2:1066-1076.

Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, Von Herzen RP, Ballard RD, Green,K.; Williams,D.;Bainbridge,A.; Crane,K.; Van Andel,T.H. (1979). Submarine thermal springs on the Galápagos Rift. *Science* 203:1073.

BIBLIOGRAPHIE

Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ (1978). How bacteria Stick. *Scient American* 238:86-95.

Crépeau V, Cambon Bonavita M-, Lesongeur F, Randrianalivelo H, Sarradin P-, Sarrazin J, *et al.* (2011). Diversity and function in microbial mats from the Lucky Strike hydrothermal vent field. *FEMS Microbiol Ecol* 76:524-540.

D

de Albuquerque JP, Keim CN, Lins U (2010). Comparative analysis of *Beggiatoa* from hypersaline and marine environments. *Micron* 41:507-517.

de Beer D, K hl M (2001). Interfacial microbial mats and biofilms. In: *The Benthic Boundary Layer*. Oxford University Press: New York.

De Wit R, van Gernerden H (1987). Oxidation of sulfide to thiosulfate by *Microcoleus chthonoplastes* *FEMS Microbiol Ecol* 45:7-13-.

Declerck P, Behets J, van Hoef V, Ollevier F (2007). Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Water Res* 41:3159-3167.

Deming JW, Reysenbach A-, Macko SA, Smith CR (1997). Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: Bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Microsc Res Tech* 37:162-170.

Diaz MC (1997). Molecular detection and characterization of specific bacterial groups associated with tropical sponges. *Proc of the 8th Internat Coral Reef Sy.:* 1399-1402.

Dillon JG, Castenholz RW (1999). Scytonemin, a cyanobacterial sheath pigment, protects against UVC radiation: Implications for early photosynthetic life. *J Phycol* 35:673-681.

Do Carmo Bittencourt-Oliveira M, Do Nascimento Moura A, De Oliveira MC, Sidnei Massola Jr. N (2009). Geitlerinema species (oscillatoriales, cyanobacteria) revealed by cellular morphology, ultrastructure, and DNA sequencing. *J Phycol* 45:716-725.

Dodsworth JA, Hungate BA, Hedlund BP (2011). Ammonia oxidation, denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium in two US Great Basin hot springs with abundant ammonia-oxidizing archaea. *Environ Microbiol* 13:2371-2386.

Dos Santos HF, Cury JC, Do Carmo FL, Dos Santos AL, Tiedje J, van Elsas JD, Rosado AS, Peixoto RS (2011). Mangrove Bacterial Diversity and the Impact of Oil Contamination Revealed by Pyrosequencing: Bacterial Proxies for Oil Pollution. *PLoS ONE* 6(3)

BIBLIOGRAPHIE

Duke NC, Meynecke JO, Dittmann S, Ellison AM, Anger K, Berger U, Cannicci S, Diele K, Ewel KC, Field CD, Koedam N, Lee SY, Marchand C, Nordhaus I, Dahdouh-Guebas F, (2007). A world without mangroves? *Science* 317 pp 41-42.

Dunker R, Roy H, Jørgensen BB (2010). Temperature regulation of gliding motility in filamentous sulfur bacteria, *Beggiatoa* spp. *FEMS Microbiol.Ecol.* 73:234-242.

Duperron S, Lorion J, Samadi S, Gros O, Gaill F (2009). Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C R Biol* 332:298-310.

Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP, DeChaine,E.;Cavanaugh,C.M.; Dubilier,N.. (2006). A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern Mid-Atlantic Ridge. *Environ Microbiol* 8:1441-1447.

Durand P, Gros O, Frenkiel L, Prieur D (1996). Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical Lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. *Mol Mar Biol Biotechnol* 5:37-42.

F

Faassen EJ, Harkema L, Begeman L, Lurling M (2012). First report of (homo)anatoxin-a and dog neurotoxicosis after ingestion of benthic cyanobacteria in The Netherlands. *Toxicon* 60:378-384.

FAO, 2003. Status and trends in mangrove area extent worldwide. By Wilkie ML and Fortuna S, Forest Resources Assessment Working Paper No. 63. Forest Resources Division. FAO, Rome.

Fauré-Fremiet E (1951). Associations infusoriennes a *Beggiatoa*. *Hydrobiologia* 3:65-71.

Fawcett DW, Raviola E (1994). Adipose Tissue. In: Bloom and Fawcett, a Textbook of Histology. : NewYork, pp 170-177.

Felbeck H (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213:336-338.

Fenchel T (1998). Formation of laminated cyanobacterial mats in the absence of benthic fauna. *Aquatic Microb.Ecol.* 14:235-240.

Fenchel T, Bernard C (1995). Mats of colourless sulfur bacteria. I. Major microbial processes. *Marine Ecology Progress Series* 128:161-170.

BIBLIOGRAPHIE

Feuillade JC (1992). Les toxines des cyanobactéries: Revue de synthèse. *Journal of Water Science* 5:489-508.

Friedrich CG, Bardischewsky F, Rother D, Quentmeier A, Fischer J (2005). Prokaryotic sulfur oxidation. *Curr Opin Microbiol* 8:253-259.

G

Garcia-Pichel F, Castenholz RW (1990). Comparative anoxygenic photosynthetic capacity in 7 strains of a thermophilic cyanobacterium. *Arch Microbiol* 153:344-351.

Girnth A-, Grunke S, Lichtschlag A, Felden J, Knittel K, Wenzhofer F, De Beer, D.; Boetius, A. (2011). A novel, mat-forming *Thiomargarita* population associated with a sulfidic fluid flow from a deep-sea mud volcano. *Environ Microbiol* 13:495-505.

Goedheer JC (1955). Chlorophyll spectra and molecular structure. *Nature* 176:928-929.

Golubic S, Abed RMM, Palińska K, Pauillac S, Chinain M, Laurent D (2010). Marine toxic cyanobacteria: Diversity, environmental responses and hazards. *Toxicon* 56:836-841.

Grabovich MY, Patrinskaya VY, Muntyan MS, Dubinina GA (2001) Lithoautotrophic growth of the freshwater strain *Beggiatoa* D-402 and energy conservation in a homogenous culture under microoxic conditions. *FEMS Microbiol Lett* 204 pp 341-345.

Grieshaber MK, Völke S (1998). Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu Rev Physiol* 60:33-53.

Gros O, Guibert J, Gaill F (2007). Gill-symbiosis in mytilidae associated with wood fall environments. *Zoomorphology* 126:163-172.

Gros O, Darrasse A, Durand P, Frenkiel L, Mouëza M (1996). Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Appl Environ Microbiol* 62:2324-2330.

Grünke S, Felden J, Lichtschlag A, Girnth A-, De Beer D, Wenzhöfer F, Boetius A. (2011). Niche differentiation among mat-forming, sulfide-oxidizing bacteria at cold seeps of the Nile Deep Sea Fan (Eastern Mediterranean Sea). *Geobiology* 9:330-348.

Güde H, Strohl WR, Larkin JM, (1981). Mixotrophic and heterotrophic growth of *Beggiatoa alba* in continuous culture. *Arch Microbiol* 129:5, pp 357-360.

BIBLIOGRAPHIE

Gugger M, Lenoir S, Berger C, Ledreux A, Druart JC, Humbert JF, Guette C, Bernard C (2005). First report in a river in France of the benthic cyanobacterium *Phormidium favosum* producing anatoxin-a associated with dog neurotoxicosis. *Toxicon*. 1;45(7) pp919-28.

Guidi-Rontani C., Jean MNR, Gonzalez-Rizzo S, Bolte-Kluge S, Dulormne M, Gros O. (2013) Description of new filamentous toxic cyanobacteria (Oscillatoriaceae) colonizing sulphidic periphyton mat in marine mangrove. *Soumis à Env Microbiol*.

H

Hagen, K.D., and Nelson, D.C. 1996. Organic carbon utilization by obligately and facultatively autotrophic *Beggiatoa* strains in homogeneous and gradient cultures. *Appl. Environ. Microbiol*. 62: 947–953

Heyer H, Krumbein WE (1991). Excretion of fermentation products in dark and anaerobically incubated cyanobacteria. *Arch Microbiol* 155:284-287.

Hinck S, Mußmann M, Salman V, Neu TR, Lenk S, de Beer D, Jonkers,H.M. (2011). Vacuolated *Beggiatoa*-like filaments from different hypersaline environments form a novel genus. *Environ Microbiol* 13:3194-3205.

Hipp WM, Pott AS, Thum-Schmitz N, Faath I, Dahl C, Trüper HG (1997). Towards the phylogeny of APS reductases and sirohaem sulfite reductases in sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes. *Microbiology* 143:2891-2902.

Hisem D, Hrouzek P, Tomek P, Tomšíčková J, Zapomělová E, Skácelová K, Lukešová,A.; Kopecký,J. (2011). Cyanobacterial cytotoxicity versus toxicity to brine shrimp *Artemia salina*. *Toxicon* 57:76-83.

Ho KK, Krogmann DW (1982). Photosynthesis. In: *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications, pp 191.

Holguin G, Vazquez P, Bashan Y, (2001). The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. *Biol Fertil Soils* (2001) 33 pp 265–278.

Høgslund S, Nielsen JL, Nielsen LP (2010). Distribution, ecology and molecular identification of *Thioploca* from Danish brackish water sediments. *FEMS Microbiol Ecol* 73:110-120.

Høgslund S, Revsbech NP, Kuenen JG, Jørgensen BB, Gallardo VA, Van De Vossenberg J, Nielsen,J.L.; Holmkvist,L.; Arning,E.T.; Nielsen,L.P. (2009). Physiology and behaviour of marine *Thioploca*. *ISME J* 3:647-657.

Hovland, M. Discovery of prolific natural methane seeps at Gullfaks, northern North Sea. *Geo-Marin Lett*, 2007, vol. 27, no. 2-4, pp. 197-201.

BIBLIOGRAPHIE

Howarth RW, Butler T, Lunde K, Swaney D, Chu Chia Ren (1993). Turbulence and planktonic nitrogen fixation: A mesocosm experiment. *Limnol Oceanogr* 38:1696-1711.

Humbert JF, Duris-Latour D, Le Berre B, Giraudet H, Salençon MJ, (2005). Genetic Diversity in *Microcystis* Populations of a French Storage Reservoir Assessed by Sequencing of the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer. *Microb ecol* 49 pp 1-7.

Humbert JF, Quiblier C, Gugger M (2010). Molecular approaches for monitoring potentially toxic marine and freshwater phytoplankton species. *Analyt and Bioanalyl Chem* 397:1723-1732.

Huynh-Delerme C, Edery M, Huet H, Puiseux-Dao S, Bernard C, Fontainec JJ, Crespeau F F, de Luze A. (2005). Microcystin-LR and embryo-larval development of medaka fish, *Oryzias latipes*. I. Effects on the digestive tract and associated systems. *Toxicon* 46 :1, pp 16-23

I

Ibelings BW, Mur LR, Walsby AE. (1991) Diurnal changes in buoyancy and vertical distribution in populations of *Microcystis* in two shallow lakes . *Journal of Plankton Research*, 13 (2), pp. 419-436.

Imbert D, Labbé P, Rousteau A (1996). Hurricane damage and forest structure in Guadeloupe, French West Indies. *J Trop Ecol* 12:663-680.

Imbert D, Bland F, Russier F (1988). *Les Milieux Humides Du Littoral Guadeloupéen. : Baie-Mahault.*

Imhoff JF (1992). Taxonomy, phylogeny, and general ecology of anoxygenic phototrophic bacteria, p. 53-92. In N. H. Mann and N. G. Carr [eds.], *Photosynthetic prokaryotes*. Plenum.

J

Jacquet C, Thermes V, de Luze A, Puiseux-Dao S, Bernard C, Joly J-S, Bourrat F, Edery M, (2004). Effects of microcystin-LR on development of medaka fish embryos (*Oryzias latipes*). *Toxicon* 43 pp 141-147

Jannasch HW, Mottl MJ (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* 229:717-725.

Jennerjahn TC, Ittekkot V, (2002). Relevance of mangroves for the production and deposition of organic matter along tropical continental margins. *Naturwiss.*89 :1 pp 23-30

BIBLIOGRAPHIE

Jeroschewski P (1996). An amperometric microsensor for the determination of H₂S in aquatic environments. *Anal Chem* 68:4351-4357.

Joh G, Lee J (2012). Cyanobacterial biofilms on sedimentation basins in a water treatment plant in South Korea. *J Appl Phycol* 24:285-293.

Jørgensen BB, Dunker R, Grönke S, Røy H (2010). Filamentous sulfur bacteria, *Beggiatoa* spp., in arctic marine sediments (Svalbard, 79°N). *FEMS Microbiol Ecol* 73:500-513.

Jørgensen BB (1977). Distribution of Colourless Sulfur Bacteria (*Beggiatoa* sp.) in Coastal Marine Sediment. *Marine Biology* 41:19-28.

Julian D, Dalia WE, Arp AJ (1998). Neuromuscular sensitivity to hydrogen sulfide in the marine invertebrate *Urechis caupo*. *J Exp Biol* 201:1393-1403.

Jungblut AD, Vincent WF, Lovejoy C (2012). Eukaryotes in Arctic and Antarctic cyanobacterial mats. *FEMS Microbiol Ecol* .

K

Kalanetra KM, Huston SL, and Nelson DC (2004). Novel, attached, sulfur-oxidizing bacteria at shallow hydrothermal vents possess vacuoles not involved in respiratory nitrate accumulation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7487-7496.

Karsten U, Maier J, Garcia-Pichel F, (1998). Seasonality in UV-absorbing compounds of cyanobacterial mat communities from an intertidal mangrove flat. *Aquat Microb Ecol* 16 pp 37-44.

Kathiresan, K. & Bingham, B.L. (2001) Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology* 40: 81-251.

Kitheka J., Ongwenyi GS, Mavuti KM (2003). Fluxes and exchange of suspended sediments in tidal inlets draining a degraded mangrove forest in Kenya. *Estu, Coast Shelf Sci*, 56, pp.655-667.

Knowles EJ, Castenholz RW (2008). Effect of exogenous extracellular polysaccharides on the desiccation and freezing tolerance of rock-inhabiting phototrophic microorganisms. *FEMS Microbiol Ecol* 66 pp261-270.

Komárek J, Komárková J (2004). Taxonomic review of the cyanoprokaryotic genera *Planktothrix* and *Planktothricoides*. *Czech Phycology* 4:1-18.

Kotai J (1972). Instruction of preparations of modified nutrient medium Z8 for algae. *Norwegian Instit Wat Res* 11:5.

Kumar K, Mella-Herrera RA, Golden JW (2010). Cyanobacterial heterocysts. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2.

L

Lacerda LD, (1993) Conservation and Sustainable Utilization of Mangrove Forests and Their Present State of Conservation in Latin America and Africa Regions, Part I-Latin America, Mangrove Ecosystems Technical Reports, Volume 2. Okinawa, Japan: International Society for Mangrove Ecosystems: 272 pp.

Lallier-Verges E, Perrussel BP, Disnar J-R, Baltzer, F, (1998). Relationships between environmental conditions and the diagenetic evolution of organic matter derived from higher plants in a modern mangrove swamp system (Guadeloupe, French West Indies). *Org. Geochem.* 29, 1663–1686.

Laurent MCZ (2009). Les écosystèmes bois coulés en mangrove: Dynamique de colonisation et symbioses bactériennes liées à la production de sulfures. Thèse, Université des Antilles et de la Guyane .

Laurent MCZ, Gros O, Brulport J-, Gaill F, Bris NL (2009). Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. *Mar Environ Res* 67:83-88.

Lavik G, Stührmann T, Brüchert V, Van Der Plas A, Mohrholz V, Lam P, Mußmann M, Fuchs BM, Amann R, Lass U, Kuypers MMM (2009). Detoxification of sulphidic African shelf waters by blooming chemolithotrophs. *Nature* 457:581-584.

Lavoie I, Laurion I, Warren A, Vincent WF (2007). Les fleurs d'eau de cyanobactéries, revue de littérature. 916.

Lawrenz E, Fedewa E J, Richardson T L (2011). Extraction protocols for the quantification of phycobilins in aqueous phytoplankton extracts, *J. Ap. Phyco.* 23:5 , pp 865-871

Le Bris N, Sarradin P-, Pennec S (2001). A new deep-sea probe for in situ pH measurement in the environment of hydrothermal vent biological communities. *Deep-Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 48 pp1941-1951.

Lee RE (1999) *Phycology*. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge, 614 pp

Lee RY, Joye SB (2006) Seasonal patterns of nitrogen fixation and denitrification in oceanic mangrove habitats. *Mar Ecol Prog Ser* 307 pp 127–141

Lee RY, Porubsky WP, Feller IC, McKee KL, Joye SB (2008). Porewater biogeochemistry and soil metabolism in dwarf red mangrove habitats (Twin Cays, Belize). *Biogeochemistry* 87:181-198.

Léveillé RJ, Fyfe WS, Longstaffe FJ (2000). Geomicrobiology of carbonate–silicate microbialites from Hawaiian basaltic sea caves. *Chem Geol* 169:339-355.

L'Haridon S, Miroshnichenko ML, Kostrikina NA, Tindall BJ, Spring S, Schumann P, Stackebrandt, E. ; Bonch-Osmolovskaya, E.A.; Jeanthon,C..(2006).

BIBLIOGRAPHIE

Vulcanibacillus modesticaldus gen. nov., sp. nov., a strictly anaerobic, nitrate-reducing bacterium from deep-sea hydrothermal vents. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:1047-1053.

Liberge M, Gros O, Frenkiel L (2001). Lysosomes and sulfide-oxidizing bodies in the bacteriocytes of *Lucina pectinata*, a cytochemical and microanalysis approach. *Mar Biol* 139:401-409.

Lin S, Wu Z, Yu G, Zhu M, Yu B, Li R (2010). Genetic diversity and molecular phylogeny of *Planktothrix* (Oscillatoriales, cyanobacteria) strains from China. *Harmful Algae* 9:87-97.

Lindsay D, von Holy A (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *J Hosp Infect* 64:313-325.

Lonsdale P (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Res* 24:857-858,IN3-IN4,859-863.

Lonsdale P (1977). Deep-tow observations at the mounds abyssal hydrothermal field, Galapagos Rift. *Earth Plan Sci Lett* 36:92-110.

Lugo AE, Snedaker SC (1974). The ecology of mangroves. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 5 : 39-64.

M

Maal-Bared R, Bartlett KH, Bowie WR, Hall ER (2012). *Campylobacter* spp. distribution in biofilms on different surfaces in an agricultural watershed (Elk Creek, British Columbia): Using biofilms to monitor for *Campylobacter*. *Int J Hyg Environ Health* 215:270-278.

Mahmood NA, Carmichael WW (1987). Anatoxin-a(s), an anticholinesterase from the cyanobacterium *Anabaena flos-aquae* NRC-525-17. *Toxicon* 25:1221-1227.

Maier S (1984). Description of *Thioploca ingraca* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol* 34:344-345.

Maier S, Preissner WC (1979). Occurrence of *Thioploca* in Lake Constance and Lower Saxony, Germany. *Microb Ecol* 5:117-119.

Mantran M, Hamparian R, Bouchereau J (2009). Géomorphologie et hydrologie de la lagune de la Manche-à-Eau (Guadeloupe, Antilles françaises). *Géomorpho: relief, process, environn* 3/2009:199-210.

Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K- (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *Syst Appl Microbiol* 15:593-600.

BIBLIOGRAPHIE

Marquardt J, Palinska KA (2007). Genotypic and phenotypic diversity of cyanobacteria assigned to the genus *Phormidium* (Oscillatoriales) from different habitats and geographical sites. *Arch Microbiol* 187:397-413.

Maurin LC, Himmel D, Mansot JL, Gros O (2010). Raman microspectrometry as a powerful tool for a quick screening of thiotrophy: An application on mangrove swamp meiofauna of Guadeloupe (F.W.I.). *Mar Environ Res* 69:382-389.

Maurin LC (2009). La symbiose chimioautotrophe comme adaptation évolutive de la méiofaune des écosystèmes peu profonds de Guadeloupe. Thèse Université des Antilles et le Guyane.

Mazda Y, Magi M, Nanao H, Kogo M, Miyagi T, Kanazawa N and Kobashi D (2002). Coastal erosion due to longterm human impact on mangrove forests. *Wetlands Ecol. Manage.* 10: 1-9

McBride MJ (2001). Bacterial gliding motility: Multiple mechanisms for cell movement over surfaces. *Annu Rev Microbiol* 55:49-75.

McGregor GB, Rasmussen JP (2008). Cyanobacterial composition of microbial mats from an Australian thermal spring: A polyphasic evaluation. *FEMS Microbiol Ecol* 63:23-35.

McHatton SC, Barry JP, Jannasch HW, Nelson DC (1996). High nitrate concentrations in vacuolate, autotrophic marine *Beggiatoa* spp. *Appl Environ Microbiol* 62:954-958.

McKay LJ, MacGregor BJ, Biddle JF, Albert DB, Mendlovitz HP, Hoer DR, Lipp, J.S.; Lloyd, K.G.; Teske, A.P. (2012). Spatial heterogeneity and underlying geochemistry of phylogenetically diverse orange and white *Beggiatoa* mats in Guaymas Basin hydrothermal sediments. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 67:21-31.

Méjean A, Peyraud-Thomas C, Kerbrat AS, Golubic S, Pauillac S, Chinain M, Laurent, D (2010). First identification of the neurotoxin homoanatoxin-a from mats of *Hydrocoleum lyngbyaceum* (marine cyanobacterium) possibly linked to giant clam poisoning in New Caledonia. *Toxicon* 56:829-835.

Meyer B, Kuever J (2008). Homology modeling of dissimilatory APS reductases (AprBA) of sulfur-oxidizing and sulfate-reducing prokaryotes. *PLoS ONE* 3.

Meyer B, Imhoff JF, Kuever J (2007). Molecular analysis of the distribution and phylogeny of the *soxB* gene among sulfur-oxidizing bacteria - Evolution of the Sox sulfur oxidation enzyme system. *Environ Microbiol* 9:2957-2977.

Meyer B, Kuever J (2007). Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. *Appl Environ Microbiol* 73:7664-7679.

Meyer-Reil L-, Köster M (2000). Eutrophication of marine waters: Effects on benthic microbial communities. *Mar Pollut Bull* 41:255-263.

BIBLIOGRAPHIE

Millero FJ (1987). Oxidation of H₂S in seawater as a function of temperature, pH and ionic strength. *Environ Sci and Technol* 21:439-443.

Misson B, Donnadiu-Bernard F, Godon J-, Amblard C, Latour D (2012). Short- and long-term dynamics of the toxic potential and genotypic structure in benthic populations of *Microcystis*. *Water Res* 46:1438-1446.

Moissl C, Rudolph C, Huber R (2002). Natural communities of novel archaea and bacteria with a string-of-pearls-like morphology: Molecular analysis of the bacterial partners. *Appl Environ Microbiol* 68:933-937.

Moissl-Eichinger C, Huber H (2011). Archaeal symbionts and parasites. *Curr Opin Microbiol* 14:364-370.

Moussard H, Corre E, Cambon-Bonavita M-, Fouquet Y, Jeanthon C (2006). Novel uncultured Epsilonproteobacteria dominate a filamentous sulphur mat from the 13°N hydrothermal vent field, East Pacific Rise. *FEMS Microbiol Ecol* 58:449-463.

Muller F, Brissac T, Le Bris N, Felbeck H, Gros O (2010). First description of giant Archaea (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. *Environ Microbiol* 12:2371-2383.

Muntyan MS, Grabovich MY, Patrinskaya VY, Dubinina GA (2005). Regulation of metabolic and electron transport pathways in the freshwater bacterium *Beggiatoa leptomitiformis* D-402. *Microbiology* 74:388-394.

Mußmann, M., Schulz, H. N., Strotmann, B., Kjær, T., Nielsen, L. P., Rosselló-Mora, R. A., Amann, R. I. and Jørgensen, B. B. (2003). Phylogeny and distribution of nitrate-storing *Beggiatoa* spp. in coastal marine sediments. *Environ. Microbiol.*, 5: 523–533.

Mußmann M, Hu FZ, Richter M, de Beer D, Preisler A, Jørgensen BB, Huntemann M, Glöckner FO, Amann R, Koopman WJH, Lasken RS, Janto B, Hogg J, Stoodley P, Boissy R, Ehrlich GD (2007) Insights into the Genome of Large Sulfur Bacteria Revealed by Analysis of Single Filaments. *Plos Biol* 5(9).

N

Nagarajan M, Maruthanayagam V, Sundararaman M (2012). A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. *J Appl Toxicol* 32:153-185.

Nagelkerken I, Van Der Velde G, Gorissen MW, Meijer GJ, Van't Hof T, Den Hartog C (2000). Importance of mangroves, seagrass beds and the shallow coral reef as a nursery for important coral reef fishes, using a visual census technique. *Estuar Coast Shelf Sci* 51:31-44.

BIBLIOGRAPHIE

Nagelkerken I, Roberts CM, van der Velde G, Dorenbosch M, van Riel MC, Cocheret de la Morinière E, Nienhuis PH (2002). How important are mangroves and seagrass beds for coral-reef fish? The nursery hypothesis tested on an island scale. *Mar Ecol Prog Ser* 244 pp 299–305.

Neef A (1997). Anwendung der in situ-Einzelzell-Identifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen.

Nemoto F, Kojima H, Ohtaka A, Fukui M (2012). Filamentous sulfur-oxidizing bacteria of the genus *Thioploca* from Lake Tonle Sap in Cambodia. *Aquatic Microb Ecol* 66:295-300.

Newell RIE, Marshall N, Sasekumar A, Chong VC, (1995). Relative importance of benthic microalgae, phytoplankton, and mangroves as sources of nutrition for penaeid prawns and other coastal invertebrates from Malaysia. *Mar Biol* September 123: 3 pp 595-606.

Nishino M, Fukui M, Nakajima T (1998). Dense mats of *Thioploca*, gliding filamentous sulfur-oxidizing bacteria in lake Biwa, central Japan. *Water Research* 32:953-957.

Nübel U, Garcia-Pichel F, Muyzer G (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Appl Environ Microbiol* 63:3327-3332.

Nunes BS, Carvalho FD, Guilhermino LM, Van Stappen G (2006). Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environ Pollut* 144:453-462.



Odum WE, Rosze LP, McIvor CC. (1982). *The Ecology of the Mangroves of South Florida: A Community Profile*. Washington (DC): US Fish and Wildlife Service.

O'Neil JM, Davis TW, Burford MA, Gobler CJ (2012). The rise of harmful cyanobacteria blooms: The potential roles of eutrophication and climate change. *Harmful Algae* 14:313-334.

Ong JE, (1982). Mangroves and aquaculture in Malaysia. *Ambio* 11 pp 252–257.

Ott J, Bright M, Bulgheresi S (2004). Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* 36:103-126.



BIBLIOGRAPHIE

Padan E, Cohen Y (1982). Anoxygenic Photosynthesis. In: The Biology of Cyanobacteria. Blackwell Scientific Publications, pp 194-235.

Paerl HW, Paul VJ (2012). Climate change: Links to global expansion of harmful cyanobacteria. *Water Res* 46:1349-1363.

Palinska KA, Marquardt J (2008). Genotypic and phenotypic analysis of strains assigned to the widespread cyanobacterial morphospecies *Phormidium autumnale* (Oscillatoriales). *Arch Microbiol* 189:325-335.

Palińska KA, Abed RMM, Wendt K, Charpy L, Łotocka M, Golubic S (2012). Opportunistic Cyanobacteria in benthic microbial mats of a tropical lagoon, Tikehau Atoll, Tuamotu Archipelago: Minor in natural populations, major in cultures. *Fottea* 12:127-140.

Pascal PY, Dubois S, Boschker HTS, Gros O (En préparation) Trophic role of giant benthic thiobacteria in a Caribbean mangrove (Guadeloupe, FWI).

Paull CK, Hecker B, Commeau R, Freeman-Lynde RP, Neumann C, Corso WP, Golubic, S.; Hook, J.E.; Sikes, E.; Curray, J. (1984). Biological communities at the Florida Escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* 226:965-967.

Petersen JM, Zielinski FU, Pape T, Seifert R, Moraru C, Amann R, *et al.* (2011). Hydrogen is an energy source for hydrothermal vent symbioses. *Nature* 476:176-180.

Preußel K, Stüken A, Wiedner C, Chorus I, Fastner J (2006). First report on cylindrospermopsin producing *Aphanizomenon flos-aquae* (Cyanobacteria) isolated from two German lakes. *Toxicon* 47:156-162.

Preisler A, de Beer D, Lichtschlag A, Lavik G, Boetius A, Jørgensen BB, (2007). Biological and chemical sulfide oxidation in a *Beggiatoa* inhabited marine sediment. *ISMEJ* (2007) 1pp 341–353.

Pringsheim EG (1967). The mixotrophy of *Beggiatoa*. *Archiv Mikrobiol* 59:247-254.

Pringsheim EG, Kowallik U (1964). Ist *Beggiatoa* chemo-autotroph? *Naturwissenschaften* 51:492.

R

Ramsay JP, Williamson NR, Spring DR, Salmond GPC (2011). A quorum-sensing molecule acts as a morphogen controlling gas vesicle organelle biogenesis and adaptive flotation in an enterobacterium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:14932-14937.

BIBLIOGRAPHIE

- Raven PH, Evert RF, Eichhorn SE (2000). In: Biologie Végétale. : Paris.
- Reeve JN, Schleper C (2011). Archaea: Very diverse, often different but never bad? *Curr Opin Microbiol* 14:271-273.
- Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH (1992). Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 32:109-134.
- Revsbech NP (1989). An oxygen microsensor with a guard cathode. *Limnol and Oceano* 34:474-478.
- Revsbech NP, Jorgensen BB, Blackburn TH, Cohen Y (1983). Microelectrode studies of the photosynthesis and O₂, H₂S, and pH profiles of a microbial mat. *Limnol Oceanogr* 28:1062-1074.
- Robertson AI, Alongi DM, (1992). Tropical Mangrove Ecosystems, ed. A.I. Robertson & D.M. Alongi, pp. 225-249. Washington DC, USA: American Geophysical Union.
- Robertson AI, Daniel PA, (1989). Decomposition and annual flux of detritus from fallen timber in tropical mangrove forests. *Limnol. Oceanogr.* 34 pp 640-646.
- Robertson AI, Duke NC, (1990). Mangrove fish-communities in tropical Queensland, Australia: Spatial and temporal patterns in densities, biomass and community structure . *Mar. Biol.* 104 pp 369-379.
- Ridley CP, Faulkner DJ, Haygood MG (2005). Investigation of *Oscillatoria spongelliae*-dominated bacterial communities in four dictyoceratid sponges. *Appl Environ Microbiol* 71:7366-7375.
- Rueckert A, Craig Cary S, (2009) Use of an armored RNA standard to measure microcystin synthetase E gene expression in toxic *Microcystis sp.* by reverse transcription QPCR. *Limnol. Oceanogr.: Methods* 7, pp 509-520.
- Rueckert A, Wood SA, Cary C (2007). Development and field assessment of a quantitative PCR for the detection and enumeration of the noxious bloom-former *Anabaena planktonica*. *Limnol. Oceanogr. Methods* 5 pp 474-483.
- Rzymiski P, Poniedziałek B (2012). Dermatotoxins synthesized by blue-green algae (Cyanobacteria). *Postepy Dermatol Alergol* 29:47-50.

S

- Salman V, Amann R, Girth A-, Polerecky L, Bailey JV, Høglund S, Jessen,G.; Pantoja,S.; Schulz-Vogt,H.N. (2011). A single-cell sequencing approach to the classification of large, vacuolated sulfur bacteria. *Syst Appl Microbiol* 34:243-259.

BIBLIOGRAPHIE

Samanta P, Mukhopadhyay S, Mondal A, Sarkar S (2011). Microbial mat structures in profile: The Neoproterozoic Sonia Sandstone, Rajasthan, India. *J Asian Earth Sci* 40:542-549.

Sayama M, Risgaard-Petersen N, Nielsen LP, Fossing H, Christensen PB (2005) Impact of bacterial NO₃-transport on sediment biogeochemistry. *Appl Environ Microbiol* 71 pp 7575–7577.

Schauer R, Røy H, Augustin N, Gennerich H-, Peters M, Wenzhoefer F, Amann,R.; Meyerdierks,A. (2011). Bacterial sulfur cycling shapes microbial communities in surface sediments of an ultramafic hydrothermal vent field. *Environ Microbiol* 13:2633-2648.

Sherman RE, Fahey TJ, Howarth RW (1998) Soil-plant interactions in a neotropical mangrove forest: iron, phosphorus and sulfur dynamics. *Oecologia* 115 pp 553–563

Schönhuber W, Zarda B, Eix S, Rippka R, Herdman M, Ludwig W, Amann,R. (1999). In situ identification of cyanobacteria with horseradish peroxidase-labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 65:1259-1267.

Schopf JW, Walter MR (1982). Origin and early evolution of cyanobacteria: The geological evidence. In: *The Biology of Cyanobacteria*. Blackwell Scientific Publications, pp 543-564.

Schulz HN, Jørgensen BB, Fossing HA, Ramsing NB (1996). Community structure of filamentous, sheath-building sulfur bacteria, *Thioploca* spp., off the coast of Chile. *Appl Environ Microbiol* 62:1855-1862.

Schulz HN, Jørgensen BB, (2001). Big bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55 pp 105–37.

Shao J, Peng L, Luo S, Yu G, Gu J-D, Lin S, Li R (2013). First report on the allelopathic effect of *Tychonema bourrellyi* (Cyanobacteria) against *Microcystis aeruginosa*(Cyanobacteria) *J Appl Phycol en ligne* Janvier 2013

Sharma NK, Tiwari SP, Tripathi K, Rai AK (2011). Sustainability and cyanobacteria (blue-green algae): Facts and challenges. *J Appl Phycol* 23:1059-1081.

Silambarasan G, Ramanathan T and Kathiresan . (2012) Diversity of Marine Cyanobacteria from Three Mangrove Environment in Tamil Nadu Coast, South East Coast of India. *Curr Res J of Biol Sci* 4(3): 235-238.

Sivonen K, Jones G (1999). Cyanobacterial Toxins. In: *Toxic Cyanobacteria in Water: A Guide to their Public Health Consequences, Monitoring and Management* : London, pp 41-111.

BIBLIOGRAPHIE

Skulberg OM, & Skulberg R, (1985). Planktonic species of Oscillatoria (Cyanophyceae) from Norway: Characterisation and classification. Arch Hydrobiol Suppl 71 (Algol Stud 38/39), pp 157-174.

Skulberg, OM & Skulberg, R (1991). A comparative investigation and taxonomic relationships of *Tychonema tenuis* and *Tychonema bourrellyi*. Arch Hydrobiol Algol Stud 64, pp 271-279.

Smith AJ (1982). Modes of cyanobacterial carbon metabolism. In: The Biology of Cyanobacteria. Blackwell Scientific Publications, pp 47-85.

Smith RV, Peat A (1967). Comparative structure of the Gas-vacuoles of Blue-green Algae. Archiv für Mikrobiologie 57:111-122.

Stahl DA, Amann RI (1991). Development and application of nucleic acid probes. In: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Ltd: Chichester, England, pp 205-248.

Stal LJ (2001). Coastal microbial mats: The physiology of a small-scale ecosystem. South Afr J of Bot 67:399-410.

Stal LJ (1995). Physiological ecology of cyanobacteria in microbial mats and other communities. New Phytologist 131:1-32.

Stal LJ, Caumette P (1994). Microbial Mats: Structure, Development and Environmental Significance. : Heidelberg.

Stal LJ, Moezelaar R (1997). Fermentation in cyanobacteria. FEMS Microbiol Rev 21:179-211. Staley JT (1980). The gas vacuole: An early organelle of prokaryote motility? Origins Life Evol Biosphere 10:111-116.

Stepanova IY, Eprintsev AT, Falaleeva MI, Parfenova NV, Grabovich MY, Patriitskaya VY, Dubinina, G.A. (2002). Dependence of malate dehydrogenase structure on the type of metabolism in freshwater filamentous colorless sulfur bacteria of the genus *Beggiatoa*. Microbiology 71:377-382.

Stone R, (2006). A Rescue Effort for Tsunami-Ravaged Mangrove Forests. Science 314: 5798 p 404.

Strohl WR, Geffers I, Larkin JM (1981). Structure of the sulfur inclusion envelopes from four *Beggiatoa*s. Curr Microbiol 6:75-79.

Strohl, WR, and Larkin, JM (1978). Enumeration isolation and characterization of *Beggiatoa* from fresh water sediments. Appl. Environ. Microbiol. 36: 755-770.

Strohl WR, Cannon GC, Shively JM, Guede H, Hook LA, Lane CM, and Larkins, JM (1981). Heterotrophic carbon metabolism by *Beggiatoa alba*. J. Bacteriol. 148: 572-583

BIBLIOGRAPHIE

Suda S, Watanabe MM, Otsuka S, Mahakahant A, Yongmanitchai W, Nopartnaraporn N, *et al.* (2002). Taxonomic revision of water-bloom-forming species of oscillatoriod cyanobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* 52:1577-1595.

T

Takamura N, Yasuno M, Sugahara K (1984) Overwintering of *Microcystis aeruginosa* Kütz. in a shallow lake. *J Plankton Res* 6 pp 1019–1029.

Takamura N, Iwakuma T, Yasuno M (1985) Photosynthesis and primary production of *Microcystis aeruginosa* Kütz. in Lake Kasumigaura. *J Plankton Res* 7: 303–312.

Taketani RG, Yoshiura CA, Dias ACF, Andreote FD, Tsai SM (2010). Diversity and identification of methanogenic archaea and sulphate-reducing bacteria in sediments from a pristine tropical mangrove. *Antonie van Leeuwenhoek* 97 pp 401–411.

Tarasov VG, Gebruk AV, Mironov AN, Moskalev LI (2005). Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: Two different phenomena? *Chem Geol* 224:5-39.

Teske A, Jørgensen BB, Gallardo VA (2009). Filamentous bacteria inhabiting the sheaths of marine *Thioploca* spp. on the Chilean continental shelf. *FEMS Microbiol Ecol* 68:164-172.

Tian C, Pei H, Hu W, Xie J (2012). Variation of cyanobacteria with different environmental conditions in Nansi Lake, China. *J Environ Sci* 24:1394-1402.

Tien C, Wu W, Chuang T, Chen CS (2009). Development of river biofilms on artificial substrates and their potential for biomonitoring water quality. *Chemosphere* 76:1288-1295.

Toledo G., Bashan Y. and Soeldner A. (1995) Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots *Can. J. Microbiol.* 41: 999-1011.

Triantis T, Tsimeli K, Kaloudis T, Nicholas Thanassoulas, Lytras E, Hiskia A (2010). Development of an integrated laboratory system for the monitoring of cyanotoxins in surface and drinking waters. *Toxicon* 55 : 5 pp 979–989.

U

Usher KM (2008). The ecology and phylogeny of cyanobacterial symbionts in sponges. *Mar Ecol* 29:178-192.

V

Valiela I, Bowen JL, York, JK (2001) Mangrove forests: one of the world's threatened major tropical environments, *Bioscience*, 51, pp 807–815.

Vargas A, Strohl WR, (1985). Utilization of nitrate by *Beggiatoa alba*. *Arch. Microbiol.* 142:279-284.

Vaslet A (2009). Ichtyofaune des mangroves des Antilles: Influence des variables du milieu et approche isotopique des réseaux trophiques. Thèse Université des Antilles et de la Guyane.

Venter A, Jordaan A, Pieterse AJH (2003). *Oscillatoria simplicissima*: A taxonomical study. *Water SA* 29:101-104.

Verweij MC, Nagelkerken I, Hans I, Ruseler SM, Mason PRD (2008). Seagrass nurseries contribute to coral reef fish populations. *Limnol. Oceanogr.*, 53(4), pp 1540–1547.

Vopel K, Thistle D, Ott J, Bright M, Røy H (2005). Wave-induced H₂S flux sustains a chemoautotrophic symbiosis. *Limnol Oceanogr* 50:128-133.

W

Wallner G., Amann R. and Beisker W. (1993). Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*. 14: 136-143.

Walter, M. R. Stromatolites. *Developments in Sedimentology*. ed., 1976, vol. 20.

Weber A, Jorgensen BB (2002). Bacterial sulfate reduction in hydrothermal sediments of the Guaymas Basin, Gulf of California, Mexico. *Deep-Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* 49:827-841.

Weigl JW, Livingston R (1953). Infrared spectra of chlorophyll and related compounds. *J Am Chem Soc* 75:2173-2176.

White DC, Nivens DE, Nichols PD, Mikell AT, Kerger BD, Henson JM, Geesey, G.G.; Clarke, C.K. (1986). Role of aerobic bacteria and their extracellular polymers in the facilitation of corrosion; use of Fourier transforming infrared spectroscopy and signature' fatty acid analysis. In: *Biologically Induced Corrosion*. : Houston, Texas, pp 233-243.

BIBLIOGRAPHIE

Windoffer R, Jahn A, Meyberg F, Krieger J, Giere O (1999). Sulphide-induced metal precipitation in the mantle edge of *Macoma balthica* (Bivalvia, Tellinidae) - A means of detoxification. *Mar Ecol Prog Ser* 187:159-170.

Wingender J, Flemming H (2011). Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health* 214:417-423.

X

Xiao Y, Gan N, Liu J, Zheng L, Song L (2012) Heterogeneity of buoyancy in response to light between two buoyant types of cyanobacterium *Microcystis*. *Hydrobiologia* 679 (1) pp 297-311.

Y

Yamamoto Y, (2009) Effect of temperature on recruitment of cyanobacteria from the sediment and bloom formation in a shallow pond. *Plankton Benthos Res* 4(3) pp 95-103.

Yamanaka G, Lundell DJ, Glazer AN (1982). Molecular architecture of a light-harvesting antenna. Isolation and characterization of phycobilisome subassembly particles. *J Biol Chem* 257:4077-4086.

Yurkov VV, and Beatty T (1998). Aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 695-724.

Z

Zher JP, Montoya JP, Jenkins BD, Hewson I, Mondragon E, Short CM, Church MJ, Hanse A, Karl DM. (2007) Experiments linking nitrogenase gene expression to nitrogen fixation in the North Pacific subtropical gyre. *Limnol Oceanogr* 52(1) pp 169-183.

Zobell CE, Anderson DQ (1936). Observations of the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol Bull Woods Hole* 71:324-342.

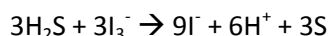
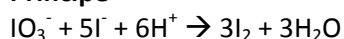
ANNEXES

Annexe 1 : UTILISATION DES CAPTEURS DE SULFURES et pH (M. Laurent, 2009)

Utilisation des capteurs de sulfures

1 CALIBRATION DE LA SOLUTION MERE DE SULFURES

Principe



L'ion iodure (I_3^-) est formé par réaction d'une solution étalon d'iodate en présence d'un excès d'iodure en milieu acide. I_3^- de couleur jaune est ensuite neutralisé par les sulfures pour former I^- (iodure), incolore.

Produits utilisés:

Eau ultrapure

Solution de KI à 100mg/ml

Solution de KIO_3 à 1,667mM (ampoules Merck à 1/60 mol/l)

Solution de H_2SO_4 à 5%

Solution de sulfures Na_2S

Attention : la solution de Na_2S ne se conserve pas lgtps. La préparer le jour même de la calibration.

Préparation de la solution mère de Na_2S

Sous la hotte aspirante dissoudre un cristal de Na_2S (frigo) de 0,5 à 1g dans 25ml d'eau MQ.

Protocole opératoire

Préparer la solution de KI à 100 mg/ml par pesée (10g de KI dans une fiole de 100 ml).

Diluer la solution de KIO_3 commerciale par 10 (concentration initiale de 1/60M) pour obtenir une solution à 1,667mM.

Diluer la solution mère de sulfures par 10.

Introduire dans chaque mélange et selon le tableau suivant dans l'ordre, 20 ml d'eau ultrapure puis 1 ml de KI, 500 μl de KIO_3 pour les échantillons 2 à 5, 500 μl de H_2SO_4 et enfin le volume de solution de sulfures diluée à doser pour les échantillons 3 à 5.

Echantillon	V Eau ultrapure	V KI	V KIO_3	V H_2SO_4	V Na_2S diluée
1	20 ml	1 ml	0	500 μl	0
2	20 ml	1 ml	500 μl	500 μl	0
3	20 ml	1 ml	500 μl	500 μl	50 μl
4	20 ml	1 ml	500 μl	500 μl	100 μl
5	20 ml	1 ml	500 μl	500 μl	150 μl

Chaque échantillon est ensuite analysé par colorimétrie à 400 nm, le zéro étant fait avec l'échantillon 1.

La représentation graphique des absorbances mesurées par rapport aux volumes de Na₂S ajoutés permet de déterminer V_{éq}, volume de Na₂S nécessaire pour la neutralisation de I₃⁻ (absorbance nulle).

La concentration de la solution mère est alors donnée par la relation suivante:

$$[\text{Na}_2\text{S}] = 10 \cdot 3 \cdot 500 \cdot [\text{KIO}_3] / \text{V}_{\text{éq}}$$

Avec: [KIO₃] = 1,667 mmol.l⁻¹ ; V_{éq} en μL; [Na₂S] en mmol.l⁻¹ ; 3: facteur stœchiométrique; 10: facteur de dilution de la solution mère de sulfures; 500: volume de KIO₃ introduit.

2 PREPARATION / REGENERATION DES ELECTRODES

• ELECTRODE DE REFERENCE

Principe

L'électrode de référence est la plus courte des deux électrodes. Elle doit être le moins possible exposée aux sulfures. *In situ* il faut faire attention à la positionner dans l'eau (et pas au contact du bois ou du sédiment) ou la protéger par un tube rempli d'eau de mer filtrée (0,2μm). C'est un fil d'argent sur lequel on dépose du chlorure d'argent, en la trempant dans une solution de KCl 3M et en appliquant une tension de 1.5 V entre cette électrode et une contre électrode en inox (simple vis ou écrou en inox), elle aussi trempant dans la solution de KCl.

Matériel

Alimentation basse tension 1,5V
Ecrou et vis en inox
Pincés crocodiles
Fils électriques
Solution de KCl 3M (soit 44,73 g dans 200ml)

Protocole opératoire

Poncer et nettoyer à l'alcool l'électrode de référence (électrode courte)

Faire le montage suivant (voir photos MetM 34 et 35) :

- Brancher le contact 2 du connecteur à la borne + de l'alimentation
- Tremper le fil d'argent de l'électrode dans la solution de KCl 3M
- Poser la vis inox dans la solution de KCl en laissant une partie hors du liquide

Attention : l'électrode et la vis ne doivent pas entrer en contact !!!

- Attraper la partie émergée de la vis avec une pince crocodile et la brancher sur la borne – de l'alimentation

Démarrer l'alimentation et laisser tourner le circuit pendant 4 à 5 minutes en agitant la solution

Vérifier que la référence soit devenue marron avant d'arrêter le circuit

Conservation des électrodes

Toujours protéger les références du H₂S en gardant un tube plastique contenant du KCl 3M ou de l'eau de mer filtrée, dépourvue de H₂S (ne pas récupérer à la pompe mais filtrer à la main). Vérifier l'absence de bulle dans le tube.

- **ELECTRODE INDICATRICE DE SULFURES**

Principe

L'électrode indicatrice de sulfure est la plus longue des deux électrodes. C'est un fil d'argent sur lequel on dépose à l'extrémité un film de sulfure d'argent en la trempant dans une solution concentrée de sulfure de sodium (Na_2S environ 100 mM). Une nuit c'est suffisant. Ensuite il faut la garder dans l'eau de mer et éviter de la laisser à l'air.

Protocole opératoire

Poncer les électrodes des sondes sulfures avec du papier de verre.

Laisser tremper dans la solution mère de sulfures pendant une nuit. Les électrodes doivent devenir noires.

Rincer les électrodes à l'eau distillée puis les sécher avec du papier.

Conservation des électrodes

Ne pas laisser les électrodes en contact avec l'air. Les conserver dans de l'eau de mer. Vérifier l'absence de bulle dans le tube contenant l'eau de mer.

3 CALIBRATION DES CAPTEURS

Configuration des capteurs

Configurer les capteurs dans Winmemo afin qu'ils enregistrent une valeur toutes les 5 secondes.

Calibration

Mélanger 500ml d'eau de mer filtrée.

Abaissé le pH à 7 avec du HCl 1M.

Mettre en place un système d'agitation.

Plonger les 2 électrodes dans la solution.

Plonger également un pHmètre.

Noter l'heure de début de mesure de la sonde et le pH de la solution.

Ajouter successivement des doses calculées de la solution mère de Na_2S toutes les 4 min.

A chaque ajout de Na_2S noter l'heure et le pH.

Lors de la lecture des mesures des sondes, le tracé obtenu doit présenter des paliers permettant de déterminer le voltage correspondant à une concentration donnée de Na_2S (concentration à calculer en fonction de la quantité de Na_2S rajoutée et de la concentration calculée de la solution mère).

Utilisation des capteurs pH

1 PREPARATION / REGENERATION DES ELECTRODES

- **ELECTRODE DE REFERENCE**

Principe

L'électrode de référence est la plus courte des deux électrodes. *In situ* il faut faire attention à la positionner dans l'eau (et pas au contact du bois ou du sédiment) ou la protéger par un tube rempli d'eau de mer filtrée (0,2µm). C'est un fil d'argent sur lequel on dépose du chlorure d'argent, en la trempant dans une solution de KCl 3M et en appliquant une tension de 1.5 V entre cette électrode et une contre électrode en inox (simple vis ou écrou en inox), elle aussi trempant dans la solution de KCl.

Matériel

Alimentation basse tension 1,5V
Ecrou et vis en inox
Pincés crocodiles
Fils électriques
Solution de KCl 3M (soit 44,73 g dans 200ml)

Protocole opératoire

Poncer et nettoyer à l'alcool l'électrode de référence (électrode courte)
Faire le montage suivant (voir photos MetM 34 et 35) :
- Brancher le contact 2 du connecteur à la borne + de l'alimentation
- Tremper le fil d'argent de l'électrode dans la solution de KCl 3M
- Poser la vis inox dans la solution de KCl en laissant une partie hors du liquide
Attention : l'électrode et la vis ne doivent pas entrer en contact !!!
- Attraper la partie émergée de la vis avec une pince crocodile et la brancher sur la borne – de l'alimentation
Démarrer l'alimentation et laisser tourner le circuit pendant 4 à 5 minutes en agitant la solution.
Vérifier que la référence soit devenue marron avant d'arrêter le circuit

Conservation des électrodes

Toujours protéger les références en gardant un tube plastique contenant du KCl 3M ou de l'eau de mer filtrée. Vérifier l'absence de bulle dans le tube.

- **ELECTRODE INDICATRICE DE pH**

Cette électrode est une électrode de verre (voir article Le Bris)
Elle se conserve en eau de mer filtrée à 0,2µm.

CALIBRATION DES SONDÉS pH

Configuration des capteurs

Configurer les capteurs dans Winmemo de manière à ce qu'ils enregistrent une valeur toutes les 5 secondes.

Préparation de la solution de calibration

Préparer une solution de Tris-edm 1M à répartir dans 4 tubes. Abaisser le pH de 3 des tubes par ajout de HCl de manière à obtenir une gamme de pH. Mesurer les pH avec un pHmètre.

Calibration

Plonger simplement les électrodes dans les différents tubes successivement pendant 2 minutes.

Lors de la lecture des mesures des sondes, le tracé obtenu doit présenter des paliers permettant de déterminer le voltage (lu sur le tracé) correspondant à une valeur de pH donnée (mesurée avec le pHmètre).

Pour une calibration aux pH 4 et 7 dans des solutions tampons, garder les tubes protecteurs sur les électrodes de référence et bien vérifier l'absence de bulle à l'intérieur.

Annexe 2: MILIEUX DE CULTURE**Milieu f/2 (Guillard and Ryther 1963)³**

FOUR STOCK SOLUTIONS (1-4)

For all solutions, use sterilized distilled deionized water!

For 1L For 0.5L

1. NaNO₃ stock solution: NaNO₃ 75.0 g 37.5 g

2. NaH₂PO₄ stock solution: NaH₂PO₄ 5.0 g 2.5 g

3. Trace Metals stock solution:

To distilled water add the following:

For 1L For 0.5L

Na₂EDTA 4.36 g 2.18 g

FeCl₃•6H₂O (Ferric Chloride) 3.15 g 1.575 g

Primary Metals Stocks (below) 1ml of each of the five 0.5ml of each of five

Primary Trace Metals stock solutions (make up five separate stocks)

To the chosen volume of sterile distilled deionized water add the following:

	100ml	50ml	10ml
CuSO ₄ •5H ₂ O	1.0 g	0.50 g	0.10 g
ZnSO ₄ •7H ₂ O	2.2 g	1.10 g	0.22 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	1.0 g	0.50 g	0.10 g
MnCl ₂ •4H ₂ O	1.8 g	0.90 g	0.18 g
NaMoO ₄ •2H ₂ O	0.63 g	0.315g	0.063 g

4. Vitamin Stock solution

Light sensitive – keep covered in foil!

	For 1.0 L	For 0.5L
Biotin	10.0 mL of 0.1 mg•mL ⁻¹ solution (1mg in 10ml)	5.0 mL
Vitamin B12	1.0 mL of 1.0 mg•mL ⁻¹ solution (1mg in 1ml)	0.5 mL
Thiamine HCl	0.2g	0.1 g

Lastly: Making Final Medium

To 950 mL of 0.22 µM filtered seawater (FSW) add:

To make 100 tubes:

NaNO ₃ Stock solution	1.0 mL	100 ml
NaH ₂ PO ₄ Stock Solution	1.0 mL	100 ml
Trace Metals Stock Solution	1.0 mL	100 ml
Vitamin Stock Solution	0.5 mL	50 ml

Filter sterilize at 0.22 µM before use and store at 4° C. * Si has been removed from this recipe to reduce the growth of contaminating diatoms.

Tip: Make up a larger batch, just multiply each stock by how many tubes you want to set up. For example, for 100 tubes of 3.5ml total of f/2 final medium stock, add 100ml of each of the first three stocks and 50 ml of the Vitamin stock. That gives a total of 350 ml, which gives 100 15ml falcon tubes of 3.5 ml each of f/2 final medium stock, each of which is ready to make up one each of 1.0L working f/2 media (one tube of 3.5 ml plus 950ml of filtered seawater).

Milieu complété à une concentration de Na₂S 10 mM

³ <http://www.nsm.buffalo.edu/Bio/burr/BURR%20Cultures/F2%20Media.pdf>

Milieu Z8X SALT:

Préparation des solutions stocks:

Solution Stock Z8XI (minus nitrogen) Masse (g) pour 1L

MgSO ₄ , 7H ₂ O	2.50
CaCl ₂ , 2H ₂ O	3.70

A dissoudre séparément dans de l'eau milliQ et mélanger. « q.s.p. » 1L d'eau milliQ. Autoclaver 15 min à 120°.

Solution Stock Z8XII Masse (g) pour 1L

K ₂ HPO ₄ , 3H ₂ O	4.10
Na ₂ CO ₃	2.10

« q.s.p. » 1L d'eau milliQ. Autoclaver 15 min à 120°.

N°1 Solution stocks Z8III Masse (g) pour 1L

Fe-solution : FeCl ₃ ,6H ₂ O	2.80
--	------

Dissoudre dans 100ml de HCl (0.1 M)

N°2 Solutions stocks Z8III Masse (g) pour 1L

EDTA-solution : EDTA	3.90
----------------------	------

Dissoudre dans 100ml de NaOH (0.1 M)

Pour 1L de solution Z8III :

Mélanger 10mL de Fe-solution, 9,5 mL d'EDTA-solution. « q.s.p. » 1L d'eau milliQ. Autoclaver 15 min à 120°.

Solution Z8SALT Masse (g) pour 1L

NaCl	87.50
MgSO ₄ , 7H ₂ O	37.50

Préparation des solutions stocks pour la solution trace de Z8X SALT :

Solution stocks pour solution trace	Masse (g) pour 1L
1 (NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ , 2H ₂ O	0.88
2 KI	0.83
3 ZnSO ₄ , 7H ₂ O	2.87
4 Cd(NO ₃) ₂ , 4 H ₂ O	1.55
5 CO(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	1.46
6 CuSO ₄ , 5H ₂ O	1.25
7 H ₃ BO ₃	31.0
MnSO ₄ , 4H ₂ O	22.30

ANNEXES

Préparation de la solution trace du milieu Z8X SALT :

N° solution stock	Volume (mL) pour 1L
1	1
2	1
3	1
4	1
5	
6	1
7	1

Préparation de la solution Z8X SALT :

Solution Stock	Volume (mL) pour 1L
Solution Stock Z8XI	10
Solution Stock Z8XII	10
Solution stocks Z8III	10
Solution Z8SALT	1
Solution trace	1

Milieu complété à une concentration de Na₂S 10 mM

BG-11+Turk's+Vitamines

Turk's

Turk's and Island salt mix	Concentration finale
NaCl	481 µM
MgSO ₄ , 7H ₂ O	28 µM
MgCl ₄ , 6H ₂ O	27 µM
CaCl ₂ , 2H ₂ O	10 µM
KCl	9 µM
Macronutriments	
NaH ₂ PO ₄	50 µM
(NH ₄) ₂ SO ₄	400 µM
Tampons	
NaHCO ₃	6 µM
HEPES	
Métaux traces	1 µM
Na ₂ EDTA, 2H ₂ O	0.1170 µM
FeCl ₃ , 6H ₂ O	0.1180 µM
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.0008 µM
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.0005 µM

*Note: La solution de NaH₂PO₄ et le tampon HEPES doivent être ajustées à pH7.5 avant stérilisation.
Filtrer la solution à 0.22 µm.

BG-11 préparé par Sigma®

ANNEXES

Vitamines

Biotine
Vitamine B12
Thiamine

Pour 1L de solution

1 mg
1 mg
20 mg

Milieu final :

1mL de BG-11
5 ml de Turk's
100 μ L de vitamines

Annexe 3 : Statistiques

1) Comparaison de la toxicité des milieux de culture des cyanobactéries 1 et 2 sur les *Artemia salina*.

Tableau 1: Nombre d'individus morts observés pour le témoin et la cyanobactérie 2.

Effectifs observés	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	10	20	30
Cyanobactérie 2	13	17	30
Total	23	37	60

Tableau 2: Nombre d'individus morts théoriques calculés pour le témoin et la cyanobactérie 2, dans le cas où H_0 est vraie.

Effectifs théoriques	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	11,5	18,5	30
Cyanobactérie 1	11,5	18,5	30
Total	23	37	60

$$\chi^2 = \frac{(10-11.5)^2}{11.5} + \frac{(20-18.5)^2}{18.5} + \frac{(13-11.5)^2}{11.5} + \frac{(17-18.5)^2}{18.5}$$

$$\chi^2 = 0.6344$$

$$ddl = 1$$

$$p = 3.84$$

$$\chi^2 < 3.84 \text{ Non rejet de } H_0$$

Tableau 3 : Nombre d'individus morts observés pour le témoin et la cyanobactérie 1.

Effectifs observés	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Cyanobactérie 2	13	17	30
Cyanobactérie 1	17	13	30
Total	30	30	60

Tableau 4: Nombre d'individus morts théoriques calculés pour les cyanobactéries 1 et 2, dans le cas où H0 est vraie.

Effectifs théoriques	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
<i>Cyanobactérie 2</i>	15	15	30
<i>Cyanobactérie 1</i>	15	15	30
Total	30	30	60

$$\chi^2 = \frac{(13-15)^2}{15} + \frac{(17-15)^2}{15} + \frac{(17-15)^2}{15} + \frac{(13-15)^2}{15}$$

$$\chi^2 = 1.06$$

$$ddl = 1$$

$$p = 3.84$$

$\chi^2 < 3.84$ Non rejet de H0

2) Comparaison de la toxicité des broyats des cyanobactéries 1 et 2 sur les *Artemia salina*.

Tableau 5: Nombre d'individus morts observés pour le témoin et le broyat de cyanobactérie 1.

Effectifs observés	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	15	15	30
Cyanobactérie 1	23	7	30
Total	38	22	60

Tableau 6: Nombre d'individus morts théoriques calculés pour le témoin et le broyat de cyanobactéries 1, dans le cas où H0 est vraie.

Effectifs théoriques	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	19	11	30
Cyanobactérie 1	19	11	30
Total	38	22	60

$$\chi^2 = \frac{(15-19)^2}{19} + \frac{(15-11)^2}{11} + \frac{(23-19)^2}{19} + \frac{(7-11)^2}{11}$$

$$\chi^2 = 4.59$$

$$ddl = 1$$

$$p = 3.84$$

$\chi^2 > 3.84$ Rejet de H0

ANNEXES

Tableau 7.: Nombre d'individus morts observés pour le témoin et le broyat de cyanobactérie 2.

Effectifs observés	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	15	15	30
Cyanobactérie 2	22	8	30
Total	37	23	60

Tableau 8: Nombre d'individus morts théoriques calculés pour le témoin et le broyat de cyanobactéries 2, dans le cas où H0 est vraie.

Effectifs théoriques	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Témoin	18,5	11,5	30
Cyanobactérie 2	18,5	11,5	30
Total	37	23	60

$$\chi^2 = \frac{(15-18.5)^2}{18.5} + \frac{(15-11.5)^2}{11.5} + \frac{(22-18.5)^2}{18.5} + \frac{(8-11.5)^2}{11.5}$$

$$\chi^2 = 3.45$$

$$ddl = 1$$

$$p = 3.84$$

$\chi^2 < 3.84$ Non rejet de Ho

Tableau 9: Nombre d'individus morts observés pour les broyats de cyanobactéries 1 et 2.

Effectifs observés	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Cyanobactérie 2	23	7	30
Cyanobactérie 1	22	8	30
Total	45	15	60

Tableau 10: Nombre d'individus morts théoriques calculés pour les broyats de cyanobactéries 1 et 2, dans le cas où H0 est vraie.

Effectifs théoriques	Nombre de morts au bout de 24h	Nombre de vivants au bout de 24h	Total
Cyanobactérie 2	22,5	7,5	30
Cyanobactérie 1	22,5	7,5	30
Total	45	15	60

ANNEXES

$$\chi^2 = \frac{(23-22.5)^2}{22.5} + \frac{(7-7.5)^2}{7.5} + \frac{(22-22.5)^2}{22.5} + \frac{(8-7.5)^2}{7.5}$$

$$\chi^2 = 0.441$$

$$\text{ddl} = 1$$

$$p = 3.84$$

$\chi^2 < 3.84$ Non rejet de H_0