

THESE

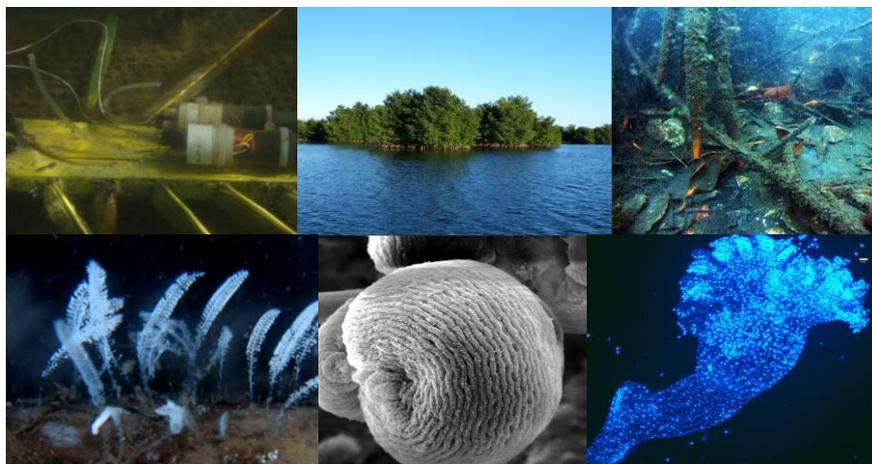
présentée devant
l'Université des Antilles et de la Guyane

pour l'obtention du
diplôme de DOCTORAT
(spécialité Biologie des organismes marins)

par
Méline LAURENT

LES ECOSYSTEMES BOIS COULES EN MANGROVE : DYNAMIQUE DE COLONISATION ET SYMBIOSES BACTERIENNES LIEES A LA PRODUCTION DE SULFURES

Soutenu le **9 novembre 2009**



Composition du jury :

Mr COMPERE Philippe, Professeur - Université de Liège
Mme GAILL Françoise, Directrice de recherche – CNRS
Mme GASPARD Sarra, Professeur – Université des Antilles et de la Guyane
Mr GROS Olivier, Professeur – Université des Antilles et de la Guyane
Mr LALLIER François, Professeur – Université Pierre et Marie Curie
Mme LE BRIS Nadine, Chargée de recherche– Ifremer

Rapporteur
Examinatrice
Examinatrice
Co-directeur de thèse
Rapporteur
Co-directrice de thèse



Ifremer



THESE

présentée devant

l'Université des Antilles et de la Guyane

pour l'obtention du

diplôme de DOCTORAT

(spécialité Biologie des organismes marins)

par

Mélina LAURENT

**LES ECOSYSTEMES BOIS COULES EN MANGROVE :
DYNAMIQUE DE COLONISATION ET SYMBIOSES BACTERIENNES
LIEES A LA PRODUCTION DE SULFURES**

Soutenue le **9 novembre 2009**

Composition du jury :

Mr COMPERE Philippe, Professeur - Université de Liège	Rapporteur
Mme GAILL Françoise, Directrice de recherche – CNRS	Examinatrice
Mme GASPARD Sarra, Professeur – Université des Antilles et de la Guyane	Examinatrice
Mr GROS Olivier, Professeur – Université des Antilles et de la Guyane	Directeur de thèse
Mr LALLIER François, Professeur – Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
Mme LE BRIS Nadine, Chargée de recherche – Ifremer	Co-directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Il m'est agréable de remercier ici toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse. Celles qui ne sont pas citées ne sont pas pour autant oubliées...

Je tiens à adresser mes premiers remerciements à mes co-directeurs de thèse Olivier Gros et Nadine Le Bris. Leur encadrement de qualité a largement contribué à l'aboutissement de mes travaux. Je leur en suis sincèrement reconnaissante.

Mon stage de Master 2 m'a permis de découvrir l'univers des bois coulés, mais surtout d'apprécier les qualités d'encadrant d'Olivier. Son dynamisme et sa constante disponibilité m'ont poussé à me lancer dans l'aventure de la thèse sous sa direction. Je suis consciente de mon immense chance.

Cette thèse n'aurait pas été ce qu'elle est sans la contribution de Nadine. L'utilisation de ses capteurs a fait toute l'originalité de ce travail. Ses passages en Guadeloupe et les nombreux échanges par mail auront été fructueux. J'espère que les résultats obtenus la satisfont autant que moi.

Je remercie les rapporteurs, Mrs Philippe Compère et François Lallier, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. J'ai été heureuse que Mmes Françoise Gaill et Sarra Gaspard, qui ont suivi l'évolution de mes travaux au cours des comités de thèse, aient également accepté d'être mes examinatrices. Je n'oublie pas les autres membres des comités de thèse Mrs Amadou Ba et Jean-Luc Bouchereau, ainsi que Mme Sylvie Gustave Duflo, que je remercie pour leurs bons conseils et leurs suggestions avisées.

Pour l'accueil qu'ils m'ont réservé, j'adresse de vifs remerciements à mon unité de recherche l'UMR 7138 CNRS Systématique Adaptation Evolution, au laboratoire de biologie marine de l'UAG où j'ai réalisé ma thèse, et à l'équipe enseignante du département de biologie de l'UAG avec laquelle j'ai découvert l'activité d'enseignement.

J'adresse également mes remerciements à Deep Oases et à la Région Guadeloupe pour leur soutien financier.

J'exprime toute ma reconnaissance à Félix Müller pour son implication dans les analyses phylogénétiques et son aide dans l'interprétation des résultats.

Je remercie chaleureusement Robert Hamparian et Sébastien Cordonnier pour leur aide précieuse lors des sorties en mangrove, mais aussi Karl de la boîte à gants, Yves du microscope à balayage, Corinne de la chimie... et tous ceux qui ont participé d'une manière ou d'une autre à l'avancée de mes travaux.

A mes collègues et amis du laboratoire de biologie marine pour leur soutien, leur présence, leurs encouragements et tout simplement leur amitié sincère, un grand MERCI. Amandine, Gaëlle, Leslie, Nathalie et Sophie, merci pour ces bons moments partagés au bureau, en mangrove, à l'aquagym, à la marina et au marché du Gosier... Merci Dorothee, Félix, Jean-Marie, Pedro, Sébastien et Yann pour vos agréables visites au « bureau des filles ». Un coucou aux « nouvelles filles » : Charlotte, Léa, Maitena, Nadège et Silvina, ça promet...

A tous ceux qui, en dehors du laboratoire, m'ont soutenue et que j'ai certainement négligés pendant ces trois années, « je suis de retour ».

Je ne saurais remercier assez ma famille. Je lui dois beaucoup trop...

Que l'ensemble de ma famille, et tout particulièrement ma grand-mère, mon père, ma mère, Manu, Sophia, Mick, Chris et la petite Maurane, soient assurés de ma profonde reconnaissance pour leur soutien, leur confiance, leur patience, leur compréhension et tout le reste. Cette aventure a été un peu la votre aussi...

Merci tatie Denise, mon infirmière salvatrice. J'essaierai de faire plus « light » pour la suite.

Ma dernière pensée, pleine d'émotions, est pour Marco : « ça y est, c'est fini ! ».

À mes parents,

TABLE DES MATIERES

Introduction	1
PARTIE I – Cadre de l'étude	5
CHAPITRE 1 – Contexte général de l'étude	5
1 Les associations symbiotiques chimiosynthétiques	5
1.1 La chimiosynthèse	5
1.2 La symbiose	6
1.3 Les symbioses chimiosynthétiques	9
2 Les symbioses chimioautotrophes sulfo-oxydantes	11
3 Les environnements marins favorables aux organismes symbiotiques sulfo-oxydants	18
3.1 Les sources hydrothermales	18
3.2 Les suintements froids	20
3.3 Les bassins anoxiques	21
3.4 Les sédiments côtiers réduits	21
3.5 Les carcasses de baleines coulées	22
3.6 Les bois coulés	24
CHAPITRE 2 – Les bois coulés : état de l'art	25
1 Qu'appelle-t-on les bois coulés ?	25
2 La faune associée aux substrats végétaux coulés	27
3 L'écologie des substrats végétaux coulés	30
4 Une communauté chimioautotrophe	32
5 Les débris végétaux coulés : vecteurs des organismes chimiosynthétiques	35
6 Les limites des études des débris végétaux coulés profonds	36
7 Les milieux côtiers intertidaux	38
CHAPITRE 3 - Présentation de l'étude	39
1 Objectifs de l'étude	39
2 Présentation du site d'étude	42
PARTIE II – Analyse de bois coulés naturels de mangrove	47
CHAPITRE 1 – Analyse chimique de bois coulés de mangrove	47
1 Matériels et méthodes	47
1.1 Les capteurs électrochimiques potentiométriques	47
1.2 Calibration des capteurs	48
1.3 Réalisation des mesures <i>in situ</i>	52
1.4 Analyse des données	54
2 Résultats	57
2.1 Les séquences courtes d'enregistrements	57
2.2 La séquence longue d'enregistrements	58
3 Discussion	60
3.1 Des sulfures provenant du bois en dégradation	60
3.2 La variabilité temporelle des sulfures au niveau du bois	62
3.3 Des conditions chimiques similaires à celles des environnements réduits profonds	64
3.4 L'importance des mesures <i>in situ</i> dans l'approche des environnements réduits	65
CHAPITRE 2 – Analyse des ciliés associés aux bois coulés de mangrove	67
1 Matériels et méthodes	67
1.1 Echantillonnage	67
1.2 Microscopie électronique à balayage	68
1.3 Microscopie électronique à transmission	68
1.4 Analyses phylogénétiques	69
1.5 Hybridations <i>in situ</i>	70
2 Résultats	72
2.1 Observations microscopiques et hybridations	72
2.2 Analyses phylogénétiques	77
3 Discussion	81
3.1 Le cilié de la famille des Zoothamniidae	81
3.2 Le cilié de la famille des Vorticellidae	82

CHAPITRE 3 – Synthèse de l’analyse des bois coulés naturels	85
1 Le bois : un substrat idéal pour le développement de symbioses thiotrophes	85
2 La variabilité des teneurs en sulfures : un atout potentiel pour les organismes symbiotiques	86
PARTIE III – Immersions expérimentales de bois en mangrove	89
CHAPITRE 1 – Etude de la dynamique des sulfures à partir de substrats végétaux expérimentalement immergés	89
1 Matériels et méthodes	89
1.1 Dispositif 1	89
1.2 Dispositif 2	91
1.3 Mesures chimiques complémentaires	92
1.4 Analyse des données	92
2 Résultats	93
2.1 Mesures obtenues à partir du dispositif 1	93
2.2 Mesures obtenues à partir du dispositif 2	97
2.3 Mesures chimiques en laboratoire	98
3 Discussion	100
3.1 Les teneurs en sulfures	100
3.2 L’origine des sulfures	100
3.3 L’influence de la nature du substrat	103
3.4 La dynamique générale des sulfures à la surface des substrats végétaux coulés	104
CHAPITRE 2 – Etude de la dynamique de colonisation de substrats végétaux expérimentalement immergés	107
1 Stratégie expérimentale	107
1.1 Dispositif 1	107
1.2 Dispositif 2	108
1.3 Dispositif 3	108
2 Résultats	110
2.1 La faune colonisant <i>Cocos nucifera</i> et <i>Rhizophora mangle</i>	110
2.2 Les mesures de biomasse	113
2.3 La dynamique de colonisation de <i>Cocos nucifera</i> et <i>Rhizophora mangle</i>	114
2.4 La dynamique de colonisation des cubes de calcaire	118
3 Discussion	120
3.1 Les organismes colonisant les substrats végétaux en mangrove	120
3.2 Les organismes colonisant le substrat inorganique	120
3.3 Pourquoi les organismes colonisent-ils les substrats végétaux coulés en mangrove ?	121
CHAPITRE 3 – Recherche de symbioses sulfo-oxydantes chez les organismes colonisant les substrats végétaux immergés	127
1 Matériels et méthodes	127
1.1 Microscopie électronique	128
1.2 Techniques d’hybridations <i>in situ</i>	128
2 Résultats	130
2.1 Les protistes ciliés	130
2.2 Les entoproctes	132
3 Discussion	137
3.1 Diversité des associations bactériennes observées	137
3.2 Nature des associations bactériennes observées	137
CHAPITRE 4 – Analyse combinée des données chimiques et biologiques concernant les substrats végétaux expérimentalement immergés	139
1 L’installation des organismes sur les substrats végétaux	139
2 L’influence des teneurs en sulfures sur l’abondance des organismes colonisant les substrats végétaux coulés	140
3 Le cas des organismes sulfo-oxydants	142
4 La colonisation des substrats organiques coulés en milieux profonds et côtiers	145
CONCLUSIONS GENERALES ET PERSPECTIVES	149
Bibliographie	155
Annexes	179

LISTE DES FIGURES

1 : Représentation schématique des processus de photosynthèse et de chimiosynthèse	5
2 : Bouquet de <i>Riftia pachyptila</i> vivant au niveau d'une source hydrothermale de la Ride du Pacifique oriental	10
3 : Micrographie électronique des symbiotes extracellulaires de Mytilidae	13
4 : Principales voies d'oxydation des sulfures par les bactéries chimioautotrophes	14
5 : Relations métaboliques entre les bactéries et les cellules branchiales chez les Lucinacea	17
6 : Schématisation des processus d'oxydation biologique et chimique des sulfures au niveau d'un fumeur noir	19
7 : Photo d'une carcasse de baleine coulée, recouverte de mattes bactériennes	23
8 : Représentation schématique des étapes du processus d'émission de sulfures au niveau des carcasses de baleines coulées	23
9 : Photos d'organismes associés à des substrats végétaux coulés	27
10 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARN 16S révélant la position phylogénétique des bactéries associées à des moules de substrats végétaux coulés	33
11 : Schématisation des objectifs des travaux et de la stratégie développée pour les atteindre	41
12 : Localisation de la Guadeloupe dans la Mer des Caraïbes	42
13 : Carte de la Guadeloupe et localisation de la lagune de la Manche-à-Eau	43
14 : Photo des bords de la Rivière Salée constitués exclusivement de palétuviers rouges	44
15 : Photos de débris végétaux coulés en mangrove sur le site de la Manche-à-Eau	44
16 : Présentation des capteurs électrochimiques <i>in situ</i> de pH et de sulfure	48
17 : Représentation graphique des absorbances en fonction des volumes de Na ₂ S dans les solutions de la gamme étalon	50
18 : Représentation schématique de la procédure de calibration des capteurs de sulfures	51
19 : Représentation schématique de la procédure de calibration des capteurs de pH	52
20 : Installation des capteurs autonomes sur un bois coulé pour la réalisation de mesures à court terme	53
21 : Installation des capteurs autonomes pour le suivi chimique d'un bois coulé de mangrove durant 3 jours	54
22 : Graphiques exposant la réponse des capteurs de sulfures aux concentrations en sulfures	56
23 : Evolution des signaux des capteurs de sulfures et de pH, enregistrés dans l'eau de mer, et à la surface d'un bois coulé, lors d'une séquence de plusieurs dizaines de minutes	58
24 : Représentation graphique des variations de la concentration totale de sulfure d'hydrogène et du pH à la surface d'un bois coulé, en relation avec les hauteurs d'eau enregistrées à Pointe-à-Pitre pendant les 72 heures d'enregistrement	59
25 : Représentation schématique du processus supposé d'émissions de sulfures au niveau des bois coulés	61
26 : Représentation schématique de l'influence tidale sur les niveaux de sulfures enregistrés à la surface des bois coulés	63
27 : Photos de débris végétaux présentant des zones blanches, posés sur le sédiment de mangrove	67
28 : Photographies des zones blanches observées à la surface des bois coulés	72
29 : Observations du cilié colonial à la loupe binoculaire et au MEB	73
30 : Micrographies du cilié solitaire des bois coulés, observé en MEB	74
31 : Micrographies du cilié solitaire Vorticellidae des bois coulés, observé au microscope à fluorescence et en MET	76
32 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 18S de 1600 nucléotides	78
33 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARNr 16S de 800 nucléotides	79
34 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse bayésienne des séquences de gène de la sous-unité A de l'adénosine-5'-phosphosulfate réductase/oxydase de 320 nucléotides	80
35 : Récapitulatif des éléments ayant mené à la validation de la nature sulfo-oxydante des bactéries associées aux ciliés <i>Zoothamnium niveum</i> et <i>Pseudovorticella</i> sp.	82
36 : Schéma récapitulatif des principales données acquises à partir des analyses chimique et biologique des bois coulés naturels de mangrove	87
37 : Photos des espèces végétales prélevées pour les montages des capteurs potentiométriques du suivi chimique	90

38 : Paniers contenant les folioles et les pétioles des palmes de <i>Cocos nucifera</i>	91
39 : Récupération des enregistrements des capteurs à l'aide du crayon électronique étanche.....	92
40 : Représentation graphique de l'évolution du pH et des niveaux de sulfures à l'intérieur et à la surface de la palme de <i>Cocos nucifera</i> , sur une durée de 40 jours.....	95
41 : Représentation graphique de l'évolution du pH et de la concentration en sulfures à l'intérieur et à la surface de la branche de <i>Rhizophora mangle</i> sur une durée de 75 jours.....	96
42 : Représentation graphique de l'évolution du pH et de la concentration en sulfure d'hydrogène, enregistrés chez <i>Cocos nucifera</i> sur une durée d'une semaine.....	97
43 : Images des fichiers Winmemo représentant l'évolution des potentiels des capteurs en fonction du temps.....	99
44 : Représentation schématique des étapes successives menant à la production de sulfures au niveau des débris végétaux coulés, à partir de leur immersion.....	102
45 : Représentation schématique de la diffusion de composés solubles provenant de la sève élaborée des substrats végétaux <i>Rhizophora mangle</i> et <i>Cocos nucifera</i>	104
46 : Photo d'un casier utilisé pour les expériences d'immersion de substrats végétaux.....	107
47 : Exemple de détermination des niveaux d'abondance des groupes d'organismes.....	109
48 : Photos du cilié <i>Zoothamnium niveum</i> fixé à la surface d'une palme de <i>Cocos nucifera</i> et sur ses fibres en contact avec l'eau de mangrove.....	112
49 : Photo de la cavité centrale d'une branche de <i>Rhizophora mangle</i> colonisée par des bactéries <i>Beggiatoa</i> sp.....	113
50 : Photo d'une brindille de <i>Rhizophora mangle</i> recouverte de ciliés oligohyménozoaires et de protéobactéries filamenteuses <i>Beggiatoa</i> sp.....	117
51 : Photo de la surface d'un cube de calcaire collecté après 20 jours d'immersion en mangrove sur le site de la Manche-à-Eau.....	118
52 : Micrographies électroniques à balayage de deux ciliés coloniaux vivant en association avec des bactéries.....	131
53 : Structure d'un entoprocte.....	132
54 : Micrographies de l'entoprocte de la famille des Loxosomatidae.....	133
55 : Micrographies de l'entoprocte de la famille des Pedicellinidae obtenues au microscope à épifluorescence.....	134
56 : Micrographies électroniques à balayage d'un entoprocte symbiotique non identifié.....	135
57 : Observation d'un entoprocte dont les tentacules sont recouverts d'un manteau bactérien.....	135
58 : Mise en parallèle de l'évolution des niveaux d'abondance des organismes colonisant <i>Rhizophora mangle</i> et des teneurs en sulfures enregistrées simultanément à sa surface.....	141
59 : Représentation schématique de l'évolution des niveaux d'abondance des organismes colonisant <i>Rhizophora mangle</i> en parallèle à l'évolution des teneurs en sulfures enregistrées simultanément à la surface du bois.....	143

LISTE DES TABLEAUX

1 : Les types de chimiotrophie	7
2 : Exemples de symbioses chimiotrophes sulfo-oxydantes	12
3 : Exemples de substrats végétaux coulés signalés dans la littérature : nature des substrats, zone géographique et profondeur de récolte	26
4 : Les symbioses chimioautotrophes observées sur les substrats végétaux coulés profonds	35
5 : Paramètres physicochimiques mesurés à la lagune de la Manche-à-Eau entre avril et mai 2007	45
6 : Constitution de la gamme d'étalonnage pour le calcul de la concentration de la solution mère de Na ₂ S	49
7 : Valeurs de concentration en sulfure d'hydrogène et de pH obtenues dans l'eau de mangrove, l'eau interstitielle du sédiment, et à la surface du bois	57
8 : Protocole de PCR utilisé pour l'analyse phylogénique	69
9 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des séquences de la sous-unité 18S de l'ARNr des ciliés, la sous-unité 16S de l'ARNr des bactéries et du gène de l'APS reductase / oxydase des bactéries	70
10 : Liste des organismes ayant colonisé les substrats végétaux <i>Rhizophora mangle</i> et <i>Cocos nucifera</i> durant les expériences d'immersion de bois en mangrove	110
11 : Mesures de poids frais de la faune associée aux substrats végétaux de 100 g prélevés sur <i>Cocos nucifera</i> , après différentes durées d'immersion	114
12 : Colonisation de <i>Cocos nucifera</i> : évolution de l'abondance des groupes d'organismes en fonction de la durée de l'immersion du substrat	115
13 : Colonisation de <i>Rhizophora mangle</i> : évolution de l'abondance des groupes d'organismes en fonction de la durée de l'immersion du substrat	116
14 : Colonisation des cubes de calcaire : évolution de l'abondance des groupes d'organismes en fonction de la durée de l'immersion du substrat	119
15 : Propositions d'utilisation des substrats végétaux coulés par la faune colonisatrice	125
16 : Récapitulatif des analyses effectuées sur les groupes d'organismes ayant colonisé les substrats végétaux expérimentalement immergés sur le site de la Manche-à-Eau	127
17 : Liste des séquences oligonucléotidiques utilisées pour les hybridations <i>in situ</i>	129

LISTE DES ABBREVIATIONS

M : molaire
mM : millimolaire
 μ M : micromolaire

m : mètre
cm : centimètre
mm : millimètre
 μ m : micromètre
nm : nanomètre

ha : hectare

mOsm : milliosmole

° : degré
°C : degré Celsius

‰ : pour mille
% : pour cent

g : gramme
mg : milligramme
ng : nanogramme

l : litre
 μ l : microlitre

kV : kilovolt
V : volt

h : heure
min : minute
sec : seconde

S : siemens

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
PBS : Phosphate Buffered Saline

ADN : Acide désoxyribonucléique
ARNr : Acide ribonucléique ribosomal
CARD-FISH : Fluorescence *in situ* hybridization and Catalyzed reporter deposition
FISH : Fluorescence *in situ* hybridization
HRP : Horseradish peroxydase
MEB : Microscopie électronique à balayage
MET : Microscopie électronique à transmission

INTRODUCTION

Pendant longtemps les profondeurs marines ont été considérées par les scientifiques comme des espaces dépourvus de vie. En effet, la photosynthèse, unique base des chaînes trophiques alors connue, ne peut être réalisée en milieu marin à des profondeurs supérieures à 500 m, où la lumière disparaît totalement. Les organismes vivant à ces profondeurs étaient alors supposés dépendre totalement des faibles quantités de matière organique provenant de la couche euphotique (Karl, 2002).

C'est l'expédition britannique du HMS Challenger entre 1872 et 1876 qui a permis de remettre en cause cette vision des profondeurs, en révélant la faune abondante et diversifiée que ces dernières étaient capables d'héberger. A suivi la découverte des sources hydrothermales (Lonsdale, 1977) et des suintements froids (Paull *et al.*, 1984), révélant l'existence dans les eaux profondes d'habitats particuliers capables de rassembler une faune aux biomasses exceptionnelles et à taux d'endémisme élevé (Wolff, 2005). Ces sites très contraignants (forte pression hydrostatique, obscurité, températures extrêmement élevées, anoxie et toxicité des fluides, et gradients physico-chimiques brutaux) offrent dans les fluides des composés inorganiques réduits dont l'oxydation par les micro-organismes peut produire de l'énergie. Il s'agit du métabolisme chimiosynthétique, spécifique de certaines bactéries, mais pouvant être utilisé par les invertébrés vivant en symbiose avec ces bactéries. A partir des organismes chimiosynthétiques, un réseau trophique se développe, permettant la mise en place de communautés complexes.

De ces découvertes est né un engouement particulier pour la faune des zones bathyale et abyssale (de profondeur comprise entre 200 et 6000 m). Le programme scientifique international de recensement de la vie marine « *Census of Marine Life* » (CoML¹) a été mis en place en 2000, avec pour objectif de collecter pendant dix ans des données sur la diversité, l'abondance et la distribution des espèces dans les océans, en utilisant des outils technologiques très variés. Ce programme a été découpé en 14 projets visant les principaux habitats et groupes d'organismes marins.

¹ Census of marine Life (CoML): <http://www.coml.org/> [15/09/2009]

Parmi ces projets le ChEss « *Biogeography of Deep-water Chemosynthetic Ecosystem* » concerne les sites de fluides des milieux profonds. Son objectif premier est de déterminer la biogéographie des espèces des sources hydrothermales et suintements froids profonds et mieux comprendre le fonctionnement général de ces écosystèmes. La stratégie mise en place pour mener à bien le projet consiste en l'identification de sites-cibles à des localisations-clés, permettant ainsi la collecte des données complémentaires en réalisant une étude détaillée d'un nombre limité de sites (Ramirez Llodra *et al.*, 2003 ; Tyler *et al.*, 2003).

Une série d'autres programmes de recherche visant à mieux décrire la biodiversité des zones marines profondes a permis la découverte de centaines de nouvelles espèces. Les missions océanographiques ont permis d'explorer le bassin Indo-Pacifique (programme MUSORSTOM² entre 1976 et 2000), l'Océan Austral (programme ANDEEP [Brandt *et al.*, 2004] entre 2002 et 2005), les zones marines européennes (programme HERMES³ entre 2005 et 2009), le Pacifique Nord (Panglao, aux Philippines en 2005), le Pacifique Sud (programme Santo⁴ au Vanuatu en 2006) et l'Atlantique (mission Serpentine⁵ en 2007).

Ces explorations ont également permis de découvrir de nouveaux environnements réduits favorables au processus de chimiosynthèse : les bassins anoxiques, les sédiments côtiers réduits, mais aussi plus récemment les substrats organiques en décomposition sur le plancher océanique. Ces substrats organiques sont de deux types : des carcasses de baleine coulées et des amas de débris végétaux. Les recherches menées jusqu'ici sur les carcasses de baleines ont permis de rassembler des données sur la dynamique de colonisation de ce substrat (Smith et Baco, 2003), et les processus favorisant le développement d'organismes chimiosynthétiques (Deming *et al.*, 1997).

Les données concernant les débris végétaux sont plus limitées. Ces substrats, appelés bois coulés, font actuellement l'objet de programmes de recherches importants tels que :

- le projet sur les écosystèmes des marges continentales « *Continental Margin Ecosystem* » (COMARGE), au sein du programme international ChEss présenté plus haut, qui intègre l'étude à la fois des sites de fluides, mais également des substrats organiques. Il s'agit de comparer les communautés associées à ces habitats et déterminer l'influence des paramètres de chaque habitat sur la structure de la communauté associée.

² MUSORSTOM (Tropical Deep Sea Benthos): <http://www.mnhn.fr/musorstom/> [02/09/2009]

³ HERMES (Hotspot Ecosystem research on the Margins of European Seas): <http://www.eu-hermes.net/> [02/09/2009]

⁴ Santo 2006 : <http://www.santo2006.org/> [02/09/2009]

⁵ Serpentine : <http://www.ifremer.fr/serpentine/campagne.htm> [02/09/2009]

- le programme européen de l'ESF (European Science Foundation) EuroDeep « *Ecosystem functioning and biodiversity in the deep sea* » visant à identifier les habitats profonds et déterminer les processus biotiques et abiotiques permettant le maintien des communautés autour de ces habitats.
- le GDRE (Groupement De Recherche Européen) DiWood « *Diversity, establishment and fonction of organisms associated to marine wood falls* » incluant le projet BOA (Bois coulés et Organismes Associés) dont l'objectif premier est de déterminer les processus de colonisation des bois coulés en milieu profond, ainsi que les modalités d'interaction des organismes avec le substrat bois. Les missions océanographiques Salomon 2 et Salomon BOA 3 dans l'archipel des Salomon, ainsi que BOA 0, BOA 1 et SantoBOA au Vanuatu intègrent ce projet BOA.
- le programme de l'ANR (Agence Nationale de la Recherche) Deep Oases « *Biodiversité des écosystèmes chimiosynthétiques dans l'océan profond* » dont l'objectif principal est d'établir une comparaison de la biodiversité associée à trois environnements réduits profonds différents : les sources hydrothermales, les suintements froids et les bois coulés.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse entrent dans le cadre du GDRE DiWood et de l'ANR Deep Oases. Ils ont permis d'aborder plusieurs points essentiels de la thématique bois coulés :

- la diversité des organismes associés aux bois coulés en zone tropicale, parmi lesquels les organismes symbiotiques chimiosynthétiques
- la dynamique de colonisation de ces organismes
- les modifications physico-chimiques du milieu liées à la dégradation du substrat.

L'objectif principal de cette étude était de mettre en relation ces trois éléments.

PARTIE I

CADRE DE L'ETUDE

CHAPITRE 1

CONTEXTE GENERAL DE L'ETUDE

1 Les associations symbiotiques chimiosynthétiques

1.1 La chimiosynthèse

La chimiosynthèse est un processus d'élaboration de molécules organiques alternatif à la photosynthèse. Les organismes chimiosynthétiques tirent l'énergie nécessaire à la fabrication de molécules carbonées à partir de réactions chimiques, contrairement aux organismes photosynthétiques, qui utilisent l'énergie lumineuse (Fig. 1).

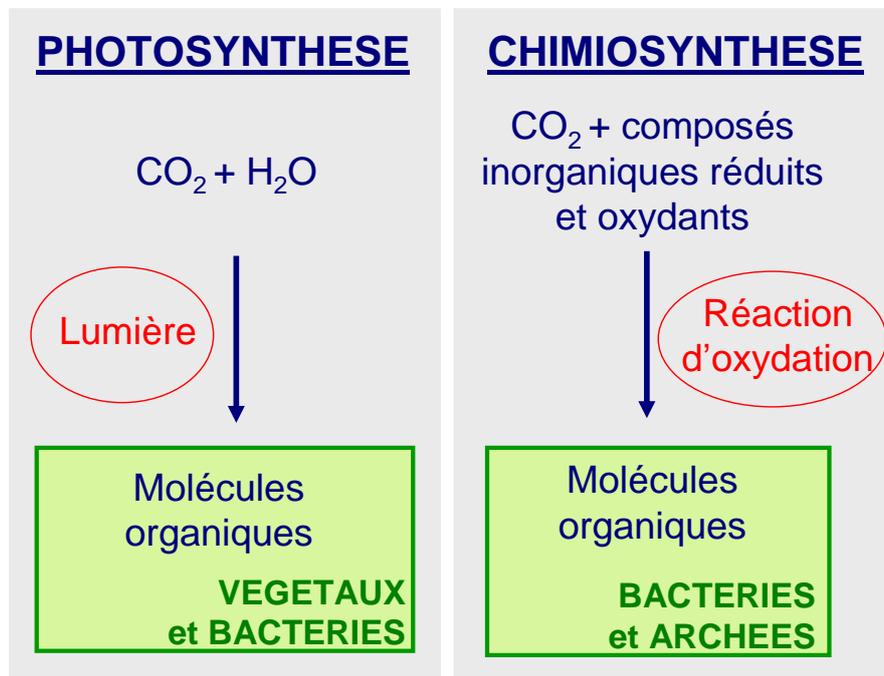


Figure 1 : Représentation schématique des processus de photosynthèse et de chimiosynthèse. Au cours du processus de photosynthèse la matière organique est élaborée par les plantes et certaines bactéries à partir de CO₂ et H₂O en utilisant l'énergie lumineuse. Dans le cas de la chimiosynthèse au sens strict, la matière organique est élaborée par certaines bactéries et archées à partir de CO₂ et de composés inorganiques réduits en utilisant l'énergie résultant de la réaction d'oxydation de ces derniers. Des composés oxydants jouent le rôle d'accepteurs d'électrons.

La chimiosynthèse au sens large englobe tous les processus de synthèse de molécules carbonées à partir de l'énergie chimique, et comprend différents types de métabolismes, selon que le donneur d'électron et la source de carbone soient de nature organique ou minérale. Cependant, le plus souvent, le terme de chimiosynthèse est utilisé en référence aux métabolismes chimioautolithotrophes, c'est-à-dire les métabolismes basés sur les processus de synthèse de molécules à partir d'une source de carbone inorganique (autotrophie), en utilisant l'énergie obtenue à partir de réactions d'oxydation (chimiotrophie) de composés réduits de nature minérale (lithotrophie) [Fig. 1].

Tous les organismes capables de chimiosynthèse au sens strict sont des procaryotes, vivant sous formes libres ou symbiotiques. En symbiose, ils confèrent le caractère chimioautotrophe aux eucaryotes avec lesquels ils sont associés. Parmi les composés minéraux réduits, dont l'oxydation fournit une énergie suffisante pour la biosynthèse, on retrouve le dihydrogène H_2 , le sulfure d'hydrogène H_2S , le méthane CH_4 , l'ammonium NH_4^+ , le fer II... (Tab. 1).

1.2 La symbiose

Il existe plusieurs définitions de la symbiose. La symbiose au sens large correspond à une association durable entre des organismes. Elle englobe alors tous les types d'interactions durables, sans considérer la notion de bénéfice des partenaires ou l'aspect physiologique de l'association. Ainsi le parasitisme (où l'un des partenaires tire bénéfice de l'association au détriment de l'autre) et le mutualisme (bénéfice partagé des partenaires) sont des associations symbiotiques au sens large. La symbiose au sens strict prend en compte la notion de bénéfices des partenaires. Elle est parfois distinguée du mutualisme par l'aspect physiologique, la symbiose étant considérée comme une association plus intégrée que le mutualisme. Dans ce document le terme symbiose sera utilisé en respectant la définition de Sélosse (2001) soit une « coexistence durable de deux organismes, à bénéfice mutuel ». Au sein de l'association, le partenaire le plus grand est appelé hôte, et le plus petit, symbiote (Smith et Douglas, 1987).

Les associations symbiotiques sont caractérisées par plusieurs critères :

- la spécificité de l'association : elle est déterminée par le nombre d'espèces avec lesquelles un organisme donné peut établir une association symbiotique.
- la durée de l'association : les symbioses ont des durées variables. Elles peuvent être limitées à une partie du cycle de vie d'un organisme.

Métabolisme	Donneur d'électrons	Accepteur d'électrons	Source de carbone	Organismes	Groupes représentatifs
Autolithotrophe	H ₂	O ₂	CO ₂	Oxydatrices de l'hydrogène	Protéobactéries, Gram positives, <i>Aquifex</i>
	S ²⁻ , S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	O ₂	CO ₂	Sulfoxydantes	Protéobactéries
	Fe ²⁺ , (Mn ²⁺)	O ₂	CO ₂	Fer et manganèse oxydantes	Protéobactéries
	NH ₄ ⁺ , NH ₃ , NO ₂ ⁻	O ₂	CO ₂	Nitrifiantes	Protéobactéries, <i>Nitrospira</i>
	CH ₄ , CO, composés en C1	O ₂	CO ₂ , Composés en C1	Méthanotrophie et méthylothrophie	Gamma (Type I) et alpha (Type II) protéobactéries (méthanotrophes)
	CH ₄	SO ₄ ²⁻ (partenaire dans le consortium)	CO ₂ ou CH ₄	Oxydation anaérobie du méthane	Archées (groupes ANME)
	H ₂	NO ₃ ⁻	CO ₂	Dénitrifiantes	+
	H ₂	S ⁰ , SO ₄ ²⁻ , S ₄ O ₆ ²⁻	CO ₂	Sulfo, sulfato et thiosulfate réductrices	Delta protéobactéries
Hétérotrophe	H ₂	CO ₂	CO ₂	Méthanogènes et acétogènes	Archées méthanogènes
	NH ₄ ⁺	NO ₂ ⁻ , (NO ₃ ⁻ , Fe ³⁺ ?)	CO ₂	Oxydation anaérobie de l'ammoniac	Planctomycetes
	Substrat organique	O ₂	Substrat organique	Hétérotrophes aérobies	+
	Substrat organique	NO ₃ ⁻	Substrat organique	Dénitrifiantes	+
	Substrat organique	Fe ³⁺ , Mn ²⁺		Fer réductrices	<i>Deferribacter</i> , <i>Geovibrio</i>
	Substrat organique	S ⁰ , SO ₄	Substrat organique	Sulfure et sulfate réductrices	Delta protéobactéries
Substrat organique	Substrat organique	Substrat organique	Hétérotrophes aérobies et bactéries fermentatrices	Gamma protéobactéries, gram positives, <i>Thermotoga</i> , +...	

+ : une grande diversité de procaryotes

Tableau 1 : Les types de chimiotrophie.
Tiré de Duperron, 2005.

- le caractère obligatoire ou facultatif de l'association : une symbiose est dite obligatoire si au moins un des partenaires ne peut vivre qu'au sein de cette association, sinon elle est dite facultative. Quand il existe en dehors de la symbiose, l'hôte sans symbiote est dit aposymbiotique et le symbiote non associé à son hôte est dit sous forme libre.

- le contact établi entre les partenaires. On parle d'ectosymbiose quand le symbiote est simplement en contact avec la paroi externe de son hôte, tandis que la mésosymbiose correspond à une pénétration du symbiote dans une cavité de l'hôte, et l'endosymbiose à une pénétration de la paroi de l'hôte par le symbiote (Sélosse, 2001). L'endosymbiose est extracellulaire quand le symbiote est situé dans le plasmalemme de l'hôte, tandis que lorsqu'il pénètre entièrement une cellule de l'hôte on parle d'endosymbiose intracellulaire ou endocytobiose (Sélosse, 2001). La zone de contact entre les partenaires correspond à une interface non seulement d'adhésion, mais également d'échanges entre les partenaires. Ces échanges sont plus ou moins importants selon le degré « d'intégration » de la symbiose. La surface de contact peut d'ailleurs, dans certains cas, subir des modifications de manière à faciliter les échanges entre les partenaires de la symbiose.

- les échanges entre les partenaires. Les échanges principaux observés chez les symbioses sont d'ordre trophique. Les transferts varient selon la nature des partenaires : (1) carbone contre substance minérale lorsque l'association implique un autotrophe et un hétérotrophe (cas des lichens ou des coraux avec les zooxanthelles) (2) échange de molécules carbonées entre des hétérotrophes de capacités de digestion ou de biosynthèse différentes (cas des ruminants avec la microflore de leur rumen) (3) échange d'azote entre un eucaryote et un procaryote fixateur d'azote atmosphérique (cas des Légumineuses avec les Rhizobiacées).

- le mode de transmission. L'acquisition par un hôte de ses symbiotes, s'effectue selon trois modes : (1) le mode vertical pour lequel les gamètes de l'hôte permettent la transmission des symbiotes à la génération suivante (Buchner, 1965) (2) le mode horizontal correspondant à une transmission de symbiotes d'individus symbiotiques vers des individus aposymbiotiques (Soldo *et al.*, 1974) (3) le mode environnemental chez lequel l'hôte entre en contact avec les formes libres du symbiote dans l'environnement (Bauer, 1981).

Tous ces critères de caractérisation des associations symbiotiques révèlent leur grande diversité. Elles participent d'ailleurs à la diversité du vivant puisque chaque association symbiotique forme une entité ayant des capacités trophiques et écologiques, que les partenaires séparés ne possèdent pas. L'aide à l'utilisation, ou à la rencontre de la ressource trophique, et l'acquisition de tolérances écologiques nouvelles, résultant de la symbiose, entraînent des modifications dans les chaînes trophiques, le cycle de la matière, les relations

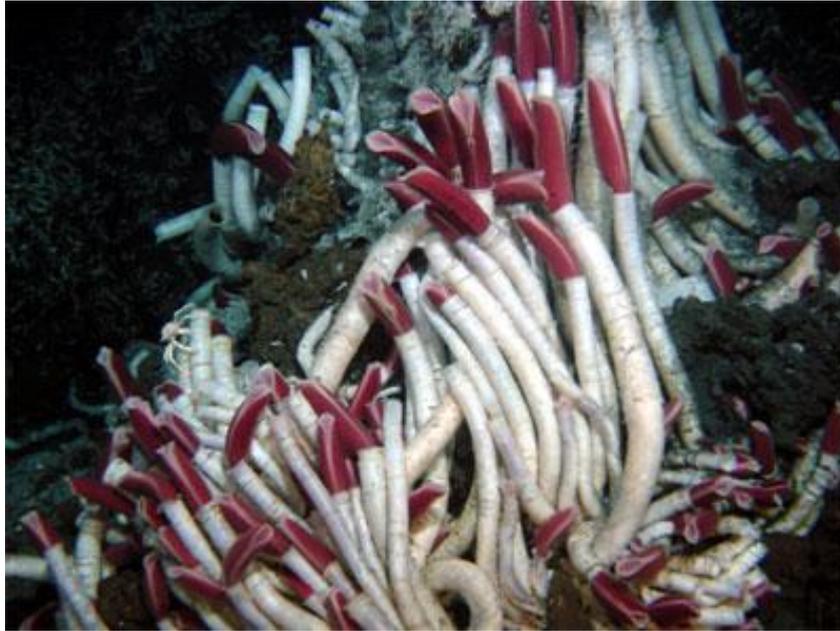
de compétition entre les organismes... La symbiose peut permettre l'acquisition de la locomotion ou encore de la bioluminescence et avoir un rôle protecteur, de nature physique ou chimique : protection contre la prédation ou contre un élément chimique donné. La symbiose pour tous les bouleversements qu'elle entraîne, joue un rôle écologique majeur, et représente une force évolutive considérable (Moran, 2007).

1.3 Les symbioses chimiosynthétiques

Les symbioses chimiosynthétiques sont un type fonctionnel de symbioses, impliquant un échange de carbone contre des substances minérales et de l'oxygène, entre un partenaire autotrophe (le symbiote procaryote) et un hétérotrophe (l'hôte eucaryote). L'hôte permet au symbiote d'accéder aux substances minérales ainsi qu'à l'oxygène, soit en les lui transmettant, soit en lui permettant l'acquisition de la mobilité. L'oxydation des substances minérales fournit de l'énergie utilisée pour la fixation du carbone. Selon la substance minérale oxydée par le symbiote, la symbiose sera dite sulfo-oxydante, méthanotrophe, ferro-oxydante, ... (Tab. 1). Ces oxydations permettent l'élaboration par le symbiote de molécules carbonées, qui sont transférées à l'hôte qui les utilise pour son métabolisme propre. La diversité remarquable de ces symbioses en terme de partenaires impliqués, de modalités des associations, d'adaptations anatomiques, physiologiques et/ou comportementales des partenaires mais également des habitats concernés est discutée par Cavanaugh (1994) et Dubilier *et al.* (2008).

Le premier organisme chez lequel une association symbiotique avec des bactéries chimiosynthétiques a été observée est l'annélide Siboglinidae *Riftia pachyptila* vivant au niveau des sources hydrothermales (Fig. 2).

Cet organisme, pouvant atteindre 2 à 3 m de long, ne comporte ni tube digestif, ni bouche, ni anus (Jones, 1981). Son corps est composé de quatre parties (Jones, 1981) : en partie antérieure l'obturaculum, qui porte le panache branchial en contact avec le milieu extérieur, le vestimentum, structure musculieuse sécrétant le tube extérieur constitué de chitine et de protéines (Gaill et Hunt, 1986), le tronc dont la cavité est occupée par le trophosome, et en partie postérieure l'opisthosome. L'absence de tube digestif et les rapports isotopiques du carbone $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$, indicateurs de la provenance du carbone et de son mode d'acquisition chez un organisme, étonnamment élevés dans les tissus de *R. pachyptila* (Rau, 1981), ont laissé supposer que cet organisme utilisait une source de nourriture inhabituelle.



© Ifremer - Campagne Phare

Figure 2 : Bouquet de *Riftia pachyptila* vivant au niveau d'une source hydrothermale de la Ride du Pacifique oriental.

Cela s'est confirmé avec la mise en évidence d'une forte activité d'enzymes impliquées dans le cycle de Calvin-Benson qui permet la fixation autotrophe du carbone, et dans la génération d'ATP à partir de composés réduits du soufre, et cela au niveau du trophosome uniquement (Felbeck, 1981). Or ce trophosome s'est révélé être tapissé de bactéries (Cavanaugh *et al.*, 1981). C'est sur la base de ces éléments qu'il a été déterminé que *R. pachyptila* vivait en symbiose avec des bactéries chimioautotrophes sulfo-oxydantes.

L'hôte alimente les bactéries en sulfures et en oxygène prélevés par son panache branchial au niveau des sources hydrothermales. Les sulfures et l'oxygène sont transportés des branchies vers le trophosome par le sang de l'hôte. Pour que ce transport soit réalisé sans que les cellules de l'hôte ne soient exposées à la toxicité des concentrations élevées en sulfures, des hémoglobines particulières de deux types entrent en action. Celles du premier type fixent l'oxygène et celles du second type sont spécifiques des sulfures qu'elles fixent avec une affinité élevée. Ce mécanisme permet le transport simultané de l'O₂ et des sulfures, tout en protégeant de l'attaque des sulfures les hémoglobines fixant l'O₂ et la cytochrome c oxydase mitochondriale qui y est particulièrement sensible (Powell et Somero, 1983). Les bactéries symbiotiques ainsi alimentées en sulfures et oxygène utilisent l'énergie libérée (Felbeck *et al.*, 1981) pour synthétiser des molécules carbonées à partir du carbone inorganique dissous dans leur sang, par le cycle de Calvin-Benson (Robinson *et al.* 1998) ou le cycle à rebours des acides tricarboxyliques (Markert *et al.*, 2007). Ces molécules sont

récupérées par l'hôte pour son métabolisme propre, soit directement, soit après digestion des bactéries symbiotiques (Bright *et al.*, 2000). L'hôte est totalement dépendant de ses symbiotes pour son alimentation. Cette symbiose étonnante a fait l'objet de nombreuses revues dont celles de Cavanaugh (1985) et Gaill (1993).

2 Les symbioses chimioautotrophes sulfo-oxydantes

Suite à la découverte de la symbiose de *R. pachyptila*, d'autres symbioses chimiolithotrophes sulfo-oxydantes ont été décrites chez des représentants des annélides, arthropodes, ciliés, mollusques et nématodes (Tab. 2). Les symbiotes sont des bactéries capables d'utiliser les sulfures et/ou les thiosulfates comme source d'énergie (Nelson *et al.*, 1995). Ils vivent en association ectosymbiotique ou endosymbiotique extracellulaire ou intracellulaire, au niveau d'un organe précis de leur hôte : le trophosome des annélides polychètes Siboglinidae, les branchies des mollusques bivalves et gastéropodes, la chambre branchiale des arthropodes Alvinocarididae, le tégument des annélides polychètes Alvinellidae, et la cuticule des oligochètes Tubificidae, des ciliés et des nématodes (Tab. 2).

La microscopie à balayage (MEB) permet d'observer la diversité des morphotypes des bactéries sulfo-oxydantes : de la forme filamenteuse à la forme coccoïde. Les formes bactériennes varient généralement d'une espèce à une autre, cependant le polymorphisme structural existe chez certaines bactéries sulfo-oxydantes, comme cela a été décrit chez les endosymbiotes de *Riftia pachyptila* (Distel *et al.*, 1988) ou les ectosymbiotes du cilié *Zoothamnium niveum* (Rinke *et al.*, 2006). Un des caractères communs aux symbiotes sulfo-oxydants est leur double membrane (Le Pennec et Hily, 1984 ; Cavanaugh *et al.*, 1987) caractéristique des bactéries de type Gram-négatif (Fig. 3), observable en microscopie électronique à transmission (MET).

Le métabolisme des bactéries sulfo-oxydantes peut entraîner la formation de soufre élémentaire. Ce dernier est alors stocké dans des granules dans l'espace périplasmique des bactéries (Shively, 1974). En MET ces granules se présentent comme des zones claires aux électrons (Fig. 3), puisque le soufre est dissous au cours de l'étape de déshydratation des échantillons (Shively, 1974).

Hôtes			Symbiotes sulfo-oxydants			Références
			Groupes de Protéobactéries	Localisation		
Annelida	Polychaeta	Alvinellidae	Epsilon	tégument	Ecto	Desbruyères <i>et al.</i> , 1983 ; Haddad <i>et al.</i> , 1995 ; Cary <i>et al.</i> , 1997
		Siboglinidae	Gamma	trophosome	Intra	Cavanaugh <i>et al.</i> , 1981; Felbeck, 1981
	Oligochaeta	Tubificidae	Gamma	sous la cuticule	Extra	Felbeck <i>et al.</i> , 1983 ; Bright et Giere, 2005
Arthropoda	Malacostraca	Alvinocarididae	Epsilon	chambre branchiale	Ecto	Polz et Cavanaugh, 1995 ; Zbinden <i>et al.</i> 2008
Ciliophora	Oligohymenophora	Zoothamniidae	Gamma	cuticule	Ecto	Rinke <i>et al.</i> , 2006
Mollusca	Bivalvia	Lucinidae	Gamma	branchies	Intra	Felbeck <i>et al.</i> , 1981 ; Berg et Atalo, 1984 ; Durand <i>et al.</i> , 1996
		Mytilidae	Gamma	branchies	Ecto, Intra	Felbeck <i>et al.</i> , 1981 ; Cavanaugh, 1983 ; Distel <i>et al.</i> , 1988 ; Lorion <i>et al.</i> , 2008
		Solemyidae	Gamma	branchies	Intra	Cavanaugh, 1983; Eisen <i>et al.</i> , 1992
		Thyasiridae	Gamma	branchies	Extra, Intra	Dando <i>et al.</i> , 1985; Distel et Wood, 1992 ; Southward, 1986
		Vesicomyiidae	Gamma	branchies	Intra	Cavanaugh, 1983 ; Distel <i>et al.</i> 1988
	Gastropoda	Provannidae	Gamma et Epsilon	branchies	Intra	Stein <i>et al.</i> , 1988; Urakawa <i>et al.</i> , 2005
Nematoda	Adenophorea	Desmodoridae	Gamma	cuticule	Ecto	Polz <i>et al.</i> 1992 ; 1994
		Siphonolaimidae	Gamma	tube digestif	Extra	Musat <i>et al.</i> , 2007

Ecto : ectosymbiose ; Extra : endosymbiose extracellulaire ; Intra : endosymbiose intracellulaire

Tableau 2 : Exemples de symbioses chimiotrophes sulfo-oxydantes.

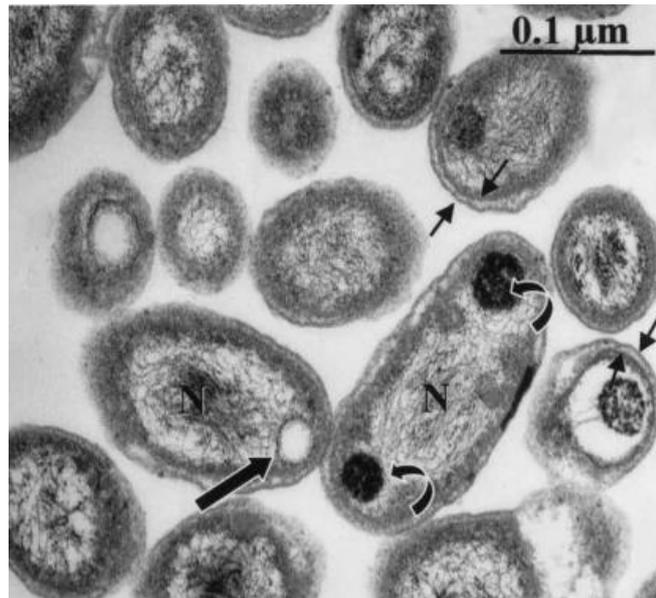


Figure 3 : Micrographie électronique des symbiotes extracellulaires de Mytilidae. Ils possèdent une double membrane (petites flèches) typique des bactéries Gram-négatives. L'ADN (N) occupe la plus grande partie du volume du cytoplasme bactérien, qui contient également des granules denses osmiophiles (flèches incurvées) en plus de nombreux ribosomes et des réserves de glycogène. Les granules clairs aux électrons localisés dans l'espace périplasmique (flèche droite) ressemblent aux granules de soufre élémentaire observés dans la plupart des endosymbiotes thioautotrophes de branchies. Tiré de Gros et Gaill, 2007.

Diverses techniques ont été utilisées pour détecter le soufre contenu dans ces granules, soit à partir de coupes de tissus, ou d'organismes entiers (Lechaire *et al.*, 2008 ; Himmel *et al.*, 2009). Quand les bactéries sulfo-oxydantes contenant des granules de soufre vivent en ectosymbiose avec leur hôte, elles peuvent lui conférer une couleur blanche en lumière incidente, comme chez *Z. niveum* (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a) et des nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae (Ott *et al.*, 2004a) dont la cuticule est couverte d'un manteau bactérien.

Les composés soufrés inorganiques sont oxydés par les bactéries suite à une série de réactions chimiques et enzymatiques (Suzuki, 1999) [Fig. 4] puis les molécules carbonées sont synthétisées au cours du cycle de Calvin-Benson ou du cycle à rebours des acides tricarboxyliques. De nombreux micro-organismes libres utilisent la voie à rebours des acides tricarboxyliques au niveau des sources hydrothermales (Campbell et Cary, 2004), cependant cette voie de fixation du CO₂ a été vérifiée chez peu de bactéries symbiotiques pour le moment.

L'identification de symbiotes sulfo-oxydants peut passer par la détection d'activité des enzymes du métabolisme du soufre en complément de celle des enzymes de la fixation autotrophe du carbone. Les enzymes de l'oxydation du soufre sont l'Adénosine

5'-PhosphoSulfate (APS) réductase / oxydase, l'ATP sulfurylase et la Rhodanèse. Cependant seule l'APS réductase est spécifique aux bactéries (Cavanaugh, 1985).

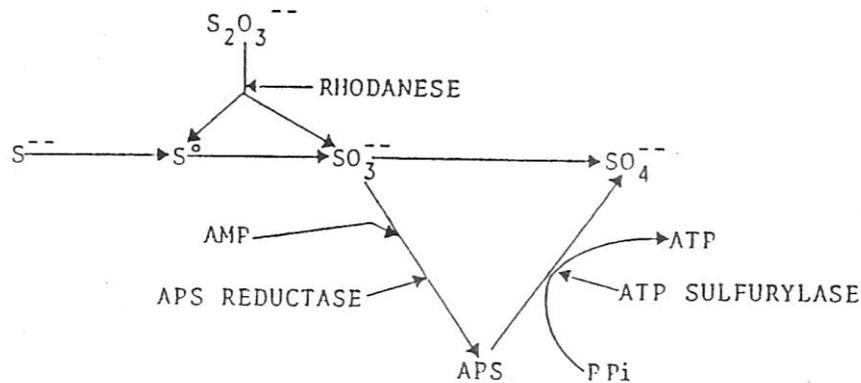


Figure 4 : Principales voies d'oxydation des sulfures par les bactéries chimioautotrophes.
Tiré de Jannash et Wirsén, 1985

Les enzymes clés du cycle de Calvin-Benson sont la Ribulose BiPhosphate Carboxylase et la PhosphoRibulose kinase et celles du cycle à rebours des acides tricarboxyliques sont l'ATP citrate lyase, la 2-oxoglutarate ferredoxine oxydoreductase et la pyruvate ferredoxine oxydoreductase.

La recherche des gènes impliqués dans ces métabolismes s'est également récemment développée. Les analyses métagénomiques ont été utilisées pour déterminer la physiologie des symbiotes sulfo-oxydants de l'oligochète *Olavius algarvensis* (Woyke *et al.*, 2006) ou du polychète *R. pachyptila* (Markert *et al.*, 2007 ; Robidart *et al.*, 2008).

Dans la plupart des cas, les bactéries sulfo-oxydantes appartiennent aux γ -Protéobactéries, et quelques fois aux ϵ -Protéobactéries. Au sein des γ -Protéobactéries, les sulfo-oxydantes forment un groupe monophylétique distinct de celui des bactéries méthanotrophes (Distel *et al.*, 1995), caractérisées en MET par la présence d'empilements de membranes dans le cytoplasme.

Parmi les bactéries sulfo-oxydantes appartenant à la sub-division des ϵ -Protéobactéries, on retrouve les symbiotes du polychète Alvinellidae, *Alvinella pompejana*, découvert au niveau des cheminées des sources hydrothermales de la rive Est-Pacifique. Les observations microscopiques révélant la présence de bactéries associées à son tégument, et les analyses isotopiques de ses tissus, ont rapidement permis de conclure que ce ver avait une source de carbone similaire à celle de *R. pachyptila* (Desbruyères *et al.*, 1983). Plusieurs morphotypes

de bactéries lui sont associés (Gaill *et al.*, 1987), mais les bactéries majoritaires impliquées dans la symbiose sont des ϵ -protéobactéries filamenteuses (Haddad *et al.*, 1995 ; Cary *et al.*, 1997) qui utiliseraient le cycle à rebours des acides tricarboxyliques pour la fixation du carbone (Campbell *et al.*, 2003).

La crevette Alvinocarididae *Rimicaris exoculata*, découverte autour des sources hydrothermales de la ride médio-Atlantique, vit également en symbiose avec plusieurs morphotypes de bactéries, appartenant toutes à la sub-division des ϵ -Protéobactéries (Polz et Cavanaugh, 1995). La nature chimiosynthétique sulfo-oxydante d'une partie de ces symbiotes a été prouvée récemment sur la base du séquençage du gène codant pour l'APS réductase (Zbinden *et al.*, 2008).

Des oligochètes dépourvus de tube digestif, appartenant à la sous-famille les Phallothelminidae au sein de la famille des Tubificidae, vivent dans les sédiments réduits des eaux côtières. Chez toutes les espèces analysées de cette sous-famille, une association symbiotique avec plusieurs morphotypes de bactéries logées entre l'épiderme et la cuticule des vers a été observée. Parmi les symbiotes, des γ -Protéobactéries sulfo-oxydantes ont été identifiées sur la base de détection d'activités enzymatiques (Felbeck *et al.*, 1983) et d'analyses phylogénétiques chez les genres *Olavius* (Dubilier *et al.*, 1999 ; Blazejack *et al.*, 2005 ; Ruehland *et al.*, 2008) et *Inanidrillus* (Dubilier *et al.*, 1995 ; Blazejack *et al.*, 2006). Plus récemment une coopération entre les différents symbiotes d'*Olavius algarvensis* a été mise en évidence : le métabolisme de bactéries sulfato-réductrices permet d'alimenter en sulfures les γ -Protéobactéries sulfo-oxydantes (Dubilier *et al.*, 2001). L'ensemble des données disponibles sur les symbioses thiotrophes des annélides oligochètes et polychètes a été revu par Bright et Giere (2005).

Le phylum des nématodes inclut des espèces endosymbiotiques dans la famille des Siphonolaimidae, et des espèces ectosymbiotiques dans la sous-famille des Stilbonematinae au sein de la famille des Desmodoridae. Les nématodes Siphonolaimidae sont dépourvus de bouche et hébergent au niveau de leur tube digestif non fonctionnel des γ -Protéobactéries sulfo-oxydantes (Musat *et al.*, 2007). Les nématodes ectosymbiotiques Stilbonematinae ont la cuticule couverte de bactéries. La diversité des manteaux bactériens est illustrée dans plusieurs revues (Ott, 1996 ; Ott *et al.*, 2004a et b). La nature sulfo-oxydante de ces bactéries a été déterminée sur la base d'analyses enzymologiques (Polz *et al.*, 1992) et phylogénétiques (Polz *et al.*, 1994).

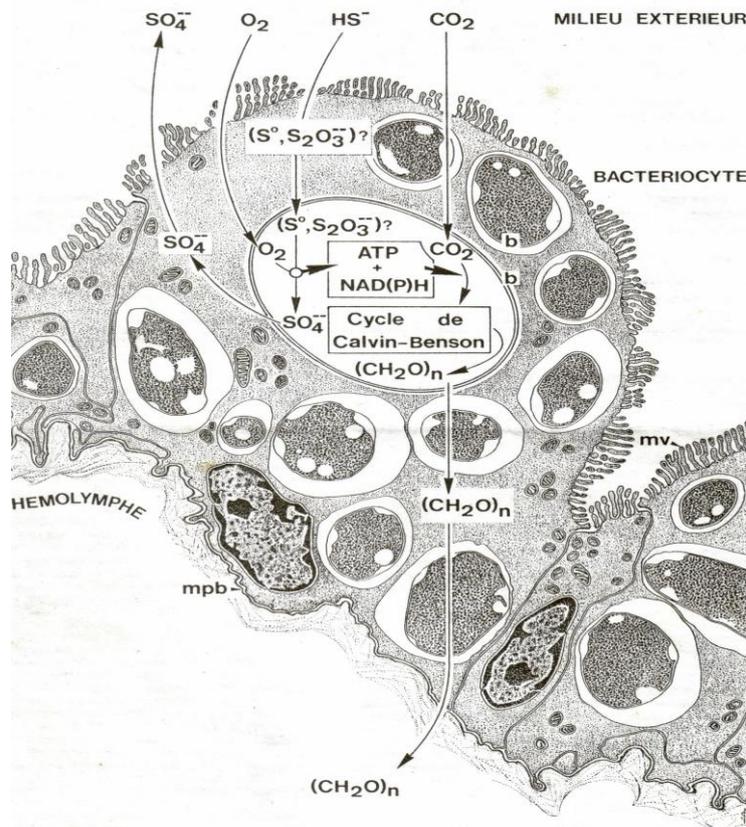
Le gastéropode *Alviniconcha hessleri*, de la famille des Provannidae, a été le premier gastéropode chez lequel une symbiose bactérienne de nature chimiosynthétique a été décrite. Ce gastéropode peut héberger dans des cellules spécialisées de ses branchies, des symbiotes utilisant le métabolisme du soufre et la fixation autotrophe du carbone (Stein *et al.*, 1988) appartenant soit à la sub-division des γ -Protéobactéries (Suzuki *et al.* 2005a) soit à celle des ε -protéobactéries (Suzuki *et al.*, 2005b ; Urakawa *et al.*, 2005). L'autre gastéropode de la même famille, *Ifremeria nautilei*, héberge des γ -Protéobactéries sulfo-oxydantes (Urakawa *et al.*, 2005 ; Suzuki *et al.*, 2006), parfois en association avec des bactéries méthanotrophes.

Les mollusques bivalves sont la classe d'organismes hébergeant la plus grande diversité de symbioses chimioautotrophes sulfo-oxydantes. L'organe hébergeant les symbiotes subit des modifications structurales lui permettant d'acquérir une fonction nutritive d'importance variable (Le Pennec *et al.*, 1995). Des cellules adaptées à l'hébergement des symbiotes, appelées bactériocytes, se sont développées au sein de la zone latérale des filaments branchiaux. Au niveau de ces bactériocytes la surface d'échange avec le milieu extérieur est optimisée par la présence de microvillosités. Les symbiotes sont hébergés dans la plupart des cas à l'intérieur des bactériocytes, mais parfois ils sont positionnés sur la face apicale des bactériocytes (Gros et Gaill, 2007 ; Gros *et al.*, 2007, Duperron *et al.*, 2008 ; 2009). Dans le cas de symbioses intracellulaires l'oxygène, les sulfures et le CO₂ du milieu extérieur sont mis à disposition des symbiotes par diffusion à travers les bactériocytes (Fig. 5).

Ces éléments sont utilisés par les symbiotes dans le cycle de Calvin-Benson pour la synthèse de molécules carbonées qui sont transmises à l'hôte. Chez les Mytilidae la fonction nutritive de l'organe hébergeant les symbiotes a été validée par la mise en évidence de l'incorporation *in situ* d'hydrogénocarbonates et d'acides aminés au niveau des branchies (Fiala-Médioni *et al.*, 1986). Ce transfert au niveau des branchies serait réalisé par phagocytose ou par digestion des bactéries par les lysosomes (Le Pennec et Hily, 1984).

Dans certains cas les symbiotes présents dans les branchies assurent entièrement la nutrition de l'hôte et le tube digestif peut disparaître. C'est le cas des bivalves de la famille des Solemyidae, dont le tube digestif est réduit ou totalement absent selon les espèces (Reid et Bernard, 1980). Les techniques d'autoradiographie ont permis de mettre en évidence la translocation du carbone fixé, du symbiote vers *Solemya reidi* (Fisher et Childress, 1986). De plus l'analyse des rapports isotopiques ¹²C/¹³C, permettant de déterminer la provenance du

carbone transféré, ont révélé la part élevée d'intervention du métabolisme des symbiotes dans la nutrition de l'hôte (Diouris *et al.*, 1989).



b : bactéries ; mpb : membrane plasmique ; mv : microvillosités

Figure 5 : Relations métaboliques entre les bactéries et les cellules branchiales chez les Lucinacea. Tiré de Diouris *et al.*, 1989.

Parmi les bivalves, les Mytilidae ont une particularité, qui est la capacité de leurs branchies à héberger dans une même cellule des symbiotes sulfo-oxydants et des symbiotes méthanotrophes. Cette double symbiose a été mise en évidence chez plusieurs espèces de moules des sources hydrothermales ou des suintements froids (Cavanaugh *et al.*, 1987 ; Fisher *et al.*, 1993 ; Distel *et al.*, 1995 ; Fiala-Médioni *et al.*, 2002). Ces symbioses multiples impliquent une capacité d'adaptation à des conditions environnementales variables en utilisant deux sources différentes de carbone et d'énergie. La proportion de symbiotes sulfo-oxydants par rapports aux méthanotrophes, dépendrait de la disponibilité en source d'énergie et de carbone (Duperron *et al.*, 2005 ; 2006 ; Riou *et al.*, 2008). Il existe donc un lien fort entre les conditions environnementales et les modalités des associations symbiotiques.

3 Les environnements marins favorables aux organismes symbiotiques sulfo-oxydants

Le développement de micro-organismes chimiosynthétiques sulfo-oxydants nécessite la co-existence des sulfures et d'un accepteur d'électrons qui peut être l'oxygène mais aussi le nitrate. Les sulfures correspondent aux formes du soufre dont le degré d'oxydation est égal à -2 soit en solution aqueuse H_2S , HS^- et les formes complexées des différents métaux (Fe, Zn, Cu,...) avec l'ion S^{2-} . De nombreux environnements sont naturellement riches en sulfures dissous H_2S . Dans les milieux marins en équilibre avec l'atmosphère, l'élément soufre se retrouve principalement sous sa forme oxydée de sulfates. Des conditions localisées d'hypoxie ou d'anoxie sont nécessaires pour que le soufre soit stable sous forme réduite. Dans ces conditions les sulfates de l'eau de mer peuvent être convertis en sulfures, soit par des processus géochimiques (interaction avec des roches réductrices ou avec des composés dissous comme l'hydrogène), soit par des processus microbiens (bactéries sulfato-réductrices). Cependant les sulfures peuvent être formés en conditions anoxiques et transportés par diffusion ou advection de fluides dans un environnement oxydant. Les environnements marins offrant les conditions nécessaires au développement de symbioses chimioautotrophes sulfo-oxydantes ont été découverts en premier lieu dans les profondeurs abyssales puis dans les eaux côtières (Cavanaugh, 1985, Dubilier *et al.*, 2008).

3.1 Les sources hydrothermales

Les sources hydrothermales ont été les premiers sites où des écosystèmes basés sur la chimiosynthèse ont été identifiés. Elles sont situées à des profondeurs très variables, de la zone intertidale aux abysses (Tarasov *et al.*, 2005), au niveau des dorsales, sites de volcanisme sous-marin (Jannash et Mottl, 1985). Les émissions de fluides sur ces sites sont liées à l'activité volcanique, et varient en fonction du type de dorsale considéré. Les fluides résultent de la percolation de l'eau de mer dans la croûte océanique nouvellement formée et leur nature est déterminée par la composition des roches traversées. Les fluides remontant vers la surface de la croûte, présentent à leur sortie dans l'eau de mer, de faibles teneurs en oxygène, mais des teneurs élevées en métaux, en hydrogène sulfuré et parfois en méthane (Tunicliffe *et al.*, 2003).

Les fluides formés en profondeur dans la croûte océanique ont des températures très élevées, pouvant atteindre 410 °C. Au contact de l'eau de mer froide les métaux dissous précipitent avec les sulfures et forment des structures minérales complexes appelées fumeurs

noirs. La percolation des fluides par des fissures dans la roche, est à l'origine des fluides plus diffus, dilués, et moins chauds. L'évolution de l'activité volcanique et tectonique sur un site donné entraîne des modifications au niveau des émissions de fluides. Les sources hydrothermales ont donc une durée de vie variant de quelques années à plusieurs siècles (Tarasov *et al.*, 2005).

Les premières sources hydrothermales ont été découvertes sur la dorsale des Galapagos, à 2500 mètres de profondeur (Lonsdale, 1977 ; Corliss *et al.* 1979). Elles ont révélé l'existence de communautés abondantes aux alentours de ces formations volcaniques sous-marines, malgré l'absence de lumière. Ces communautés sont basées sur la chimiosynthèse. En effet les sulfures des fluides sont utilisés par des organismes sulfo-oxydants libres et symbiotiques se développant à l'interface entre l'eau de mer oxygénée et les fluides anoxiques enrichis en sulfures. Ainsi l'oxydation biologique des sulfures par les organismes chimiosynthétiques sulfo-oxydants entre en compétition avec l'oxydation chimique spontanée des sulfures entrant en contact avec l'eau de mer (Fig. 6).

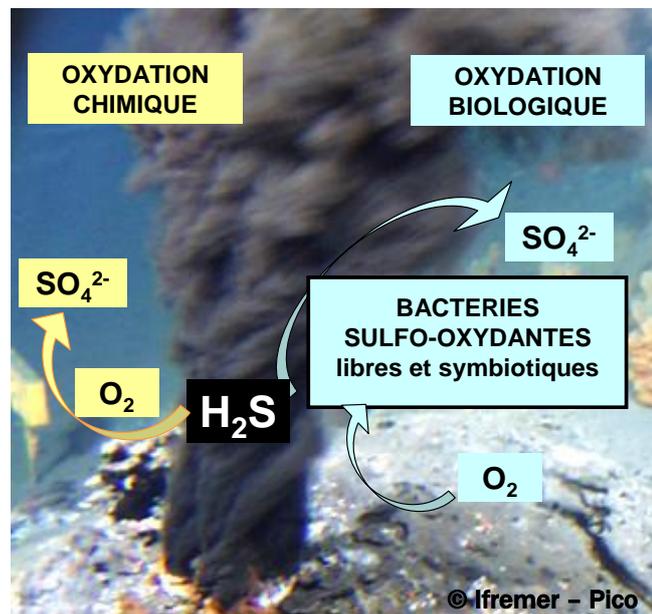


Figure 6 : Schématisation des processus d'oxydation biologique et chimique des sulfures au niveau d'un fumeur noir. (Photo du fumeur noir : Ifremer - Pico)

Les communautés des sources hydrothermales sont constituées principalement d'organismes appartenant aux embranchements des Annélides, Arthropodes, Mollusques et Pogonophores. Elles présentent des biomasses comprises entre 10 et 100 kg/m² au poids frais, atteignant celles des écosystèmes marins considérés comme les plus productifs (Laubier,

1990). L'intérêt suscité par cette découverte a entraîné une série de campagnes d'exploration révélant l'existence de nombreuses communautés similaires sur d'autres sources profondes (Lutz et Kennish, 1993 ; Boetius, 2005 ; Tarasov *et al.*, 2005). De nombreuses espèces de ces communautés au taux d'endémisme élevé, sont nouvelles pour la science (Wolff, 2005). Les organismes représentatifs des sources hydrothermales sont le vestimentifère *Riftia pachyptila*, les bivalves *Calyptogena magnifica* et *Bathymodiolus thermophilus*, l'annélide polychète *Alvinella pompejana*, les crevettes *Rimicaris exoculata*, les gastéropodes du genre *Alviniconcha* et les crustacés Galatheidae. Selon les régions géographiques la composition des communautés des sources hydrothermales change (Lutz et Kennish, 1993).

Au niveau des sources hydrothermales peu profondes (moins de 200 m), la photosynthèse est encore possible, et les organismes chimiosynthétiques ont un rôle moins important, d'où leur présence en faible proportion dans les communautés de ces sites (Tarasov *et al.*, 2005).

3.2 Les suintements froids

Les suintements froids sont des émissions diffuses de fluides au travers des sédiments, dont la température se distingue peu de celle de l'eau environnante (Laubier, 1990). Ces émissions de fluides sont d'origine et de composition très variables. Elles peuvent être relatives à l'activité tectonique (subduction), à des phénomènes de compression du sédiment liés à l'accumulation de matière organique sédimentaire, ou à la formation de réservoirs de gaz (méthane, hydrocarbures volatiles) dans le sédiment, etc.... Les suintements froids sont localisés sur les marges continentales, des pentes de cratères, des rifts océaniques, des zones à haute activité volcanique ou des zones riches en hydrocarbures. Ces fluides sont principalement enrichis en méthane d'origine thermogénique (provenant de la réduction de la matière organique sédimentaire par la chaleur), ou biogénique (issu de processus microbiens méthanogènes). Dans les premiers centimètres ou mètres des sédiments, les fluides se chargent en sulfures provenant de la réduction des sulfates. Ce processus, couplé à l'oxydation du méthane est réalisé par des consortiums entre Archae méthanotrophes et bactéries sulfato-réductrices (Boetius *et al.*, 2000). Les suintements froids sont supposés plus stables et durables que les sources hydrothermales. Ces émissions pourraient être maintenues pendant plusieurs siècles. Leur découverte en 1984 (Paull *et al.* 1984), révèle la présence de communautés riches en bivalves et polychètes symbiotiques capables d'oxydation des sulfures ou de méthanotrophie.

3.3 Les bassins anoxiques

Il existe en milieu profond des bassins appauvris en oxygène. Plusieurs facteurs expliquent la formation de ces bassins : un renouvellement lent des eaux, une forte stratification des eaux liée à leur densité, et un apport de matière organique important. L'activité bactérienne d'oxydation de la matière organique, entraîne un appauvrissement en oxygène des sédiments et de l'eau. Les conditions deviennent totalement anoxiques lorsque l'activité bactérienne devient supérieure à l'apport en oxygène, permettant la réduction des sulfates de l'eau de mer, utilisés comme accepteurs d'électrons, par des micro-organismes anaérobies. Les sites au niveau desquels ces bassins sont observés sont divers : des fjords, estuaires, et certaines mers semi-fermées telles que la mer Baltique ou la mer Noire (Mandernack *et al.*, 2003 ; Volkov et Rozanov, 2006). Des zones anoxiques sont également associées aux zones d'up-welling, telles que les côtes du Chili, du Pérou et de la Namibie.

3.4 Les sédiments côtiers réduits

Les sédiments côtiers s'étendent de la zone intertidale, avec des habitats tels que les herbiers marins, la mangrove et le sable corallien, à la pente continentale, en passant par la plateforme continentale. Dans les sédiments côtiers réduits, l'enrichissement des sédiments en sulfures résulte de la dégradation bactérienne de la matière organique (Cavanaugh, 1985 ; Ott *et al.* 2004b) et permet le développement d'organismes sulfo-oxydants.

Dans les herbiers à phanérogames, les processus bactériens de réduction des sulfates en sulfures dans les sédiments, sont susceptibles de provoquer des perturbations dans le développement de la végétation (Borum *et al.*, 2005) mais, en contrepartie, sont favorables au développement d'organismes symbiotiques chimioautotrophes sulfo-oxydants tels que le bivalve Lucinidae *Codakia orbicularis* (Frenkiel et Mouëza, 1995 ; Gros *et al.*, 2003) et des oligochètes Tubicidae (Giere et Erseus, 2002 ; Giere, 2006).

En mangrove les processus bactériens anaérobies responsables de la décomposition de la litière entraînent un épuisement des sédiments en oxygène. Dans ces sédiments rendus anoxiques, les sulfates sont réduits en sulfures. Les sédiments de mangrove riches en sulfures représentent un habitat favorable au développement de symbioses thioautotrophes sulfo-oxydantes : *Lucina pectinata* et *Anodontia alba* dans le sédiment, (Durand *et al.*, 1996; Frenkiel *et al.*, 1996; Gros *et al.*, 2003), mais également les colonies de ciliés précédemment

citées, se développant sur des débris végétaux en décomposition (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a,b ; Ott et Bright, 2004 ; Ott *et al.*, 2004b ; Rinke *et al.*, 2006).

Même les sédiments marins sableux, pourtant plus facilement drainés et oxygénés que les autres types de sédiments, peuvent connaître des enrichissements en sulfures, avec des concentrations atteignant 700 mg/l dans l'eau interstitielle (Fenchel et Riedl, 1970), soit environ 22 mM. Les sédiments marins sableux peuvent alors héberger des organismes symbiotiques tels que des bivalves Solemyidae (Krueger *et al.*, 1996), des nématodes Stilbonematinae, et des oligochètes Tubificidae dépourvus de tube digestif (Dubilier *et al.*, 2008 ; Ott *et al.*, 2004b).

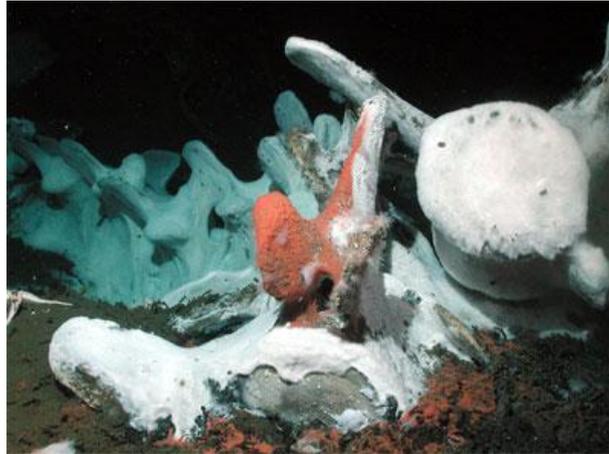
Les zones marines affectées par des rejets massifs de matière organique, telles que les zones portuaires avant les années 90, reproduisent les conditions naturelles d'enrichissement en sulfures (Gallagher et Keay, 1998) rencontrées dans ces divers environnements.

3.5 Les carcasses de baleines coulées

Il a été démontré récemment qu'un écosystème original pouvait se développer autour d'une source abondante de matière organique : les carcasses de baleine coulées sur le plancher océanique (Fig. 7).

Des organismes particuliers se développent sur ces carcasses (Smith et Baco, 2003 ; Bennett *et al.*, 1994 ; Dahlgren *et al.*, 2004), parmi lesquels des vers Siboglinidae du genre *Osedax*, se nourrissant directement des os des baleines (Rouse *et al.*, 2004) ou encore des organismes chimiosynthétiques sulfo-oxydants tels que les bivalves des genres *Idas* (Smith et Baco, 2003), *Adipicola* et *Solemya* (Fujiwara *et al.*, 2007).

Les organismes sulfo-oxydants apparaissent au stade dit d'enrichissement en sulfures, déterminé par Smith et Baco (2003), succédant au stade des nécrophages mobiles et celui des opportunistes, au cours desquels la carcasse est libérée de ses tissus mous. Le stade d'enrichissement en sulfures est dominé par la décomposition bactérienne du squelette (Smith et Baco, 2003), et plus précisément des lipides des os (Deming *et al.*, 1997). Des bactéries sulfato-réductrices s'attaqueraient aux lipides contenus à l'intérieur des os des baleines, en générant une production de sulfures qui diffuseraient vers l'extérieur des os et le sédiment. Ce sont ces sulfures qui expliquent le développement d'organismes sulfo-oxydants (Fig. 8).



© Craig Smith, University of Hawaii

Figure 7 : Photo d'une carcasse de baleine coulée, recouverte de matts bactériennes.

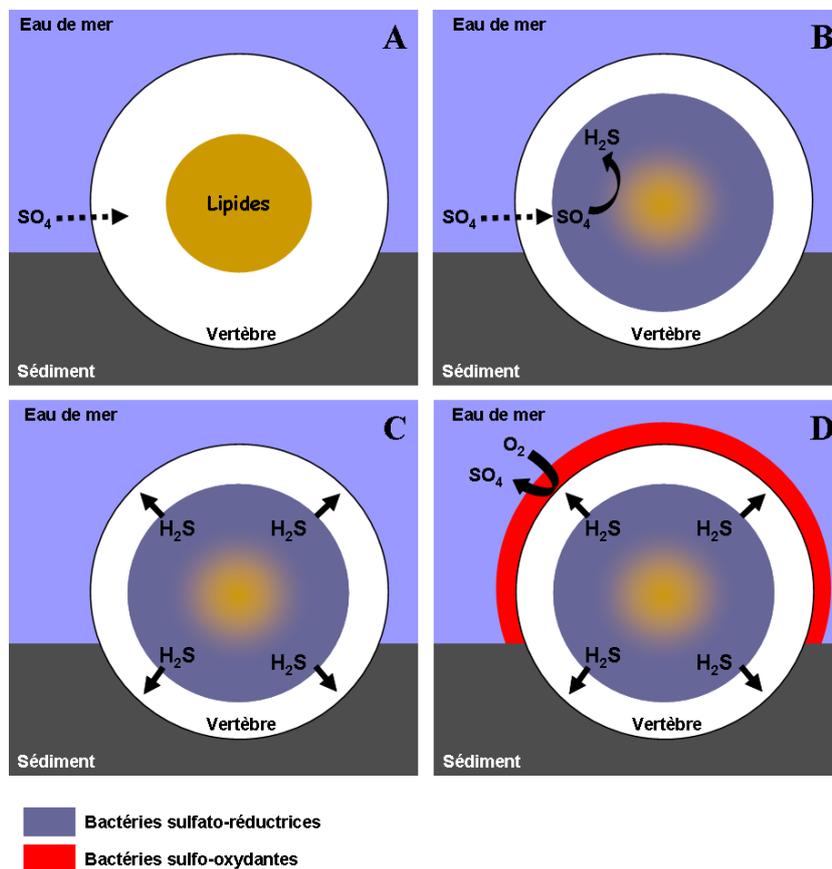


Figure 8 : Représentation schématique des étapes du processus d'émission de sulfures au niveau des carcasses de baleines coulées (modifié selon Smith et Baco, 2003).

La vertèbre de baleine représentée en coupe transversale, posée sur le plancher océanique, subit plusieurs étapes avant que les sulfures ne soient libérés à sa surface. **A** : Diffusion des sulfates de l'eau de mer vers l'intérieur de l'os. **B** : Développement de bactéries sulfato-réductrices qui dégradent les lipides de l'os en réduisant les sulfates de l'eau de mer. **C** : Diffusion des sulfures vers l'extérieur. **D** : Développement de bactéries sulfo-oxydantes dans la zone d'interface entre l'eau de mer oxygénée et l'eau enrichie en sulfures.

3.6 Les bois coulés

De manière similaire aux carcasses de baleines coulées, des débris de matière organique végétale peuvent atteindre le plancher océanique et se décomposer en milieu marin. Ces substrats végétaux font également l'objet d'une colonisation par une faune abondante et diversifiée, présentant certaines similitudes avec celles des sites réduits des milieux profonds.

La capacité du bois à favoriser la production de sulfures par les bactéries sulfato-réductrices (BSR) au cours de sa décomposition dans l'eau de mer a été révélée en laboratoire (Leschine, 1995), et est en accord avec l'accumulation de sulfures révélée dans les bois des épaves archéologiques (Sandström *et al.*, 2002, 2005 ; Fors *et al.*, 2008). Cependant, alors que la présence de moules symbiotiques associées aux bois coulés (Gros *et al.*, 2007) et la confirmation récente de la nature sulfo-oxydante de leurs symbiotes (Duperron *et al.*, 2008), ont suscité un grand intérêt auprès de la communauté scientifique, leur association avec un enrichissement de leur environnement en sulfures n'a pas été démontrée.

CHAPITRE 2

LES BOIS COULES : ETAT DE L'ART

1 Qu'appelle-t-on les bois coulés ?

Sur la base des inventaires faunistiques réalisés lors de campagnes de prélèvement, la notion de bois coulés est parfois étendue à l'ensemble des débris végétaux en décomposition sur le plancher océanique. Ils sont transportés par le vent et / ou les courants marins, avant de couler pour se déposer sur le plancher océanique. La dégradation lente de la fraction réfractaire de ces végétaux, constituée de cellulose et de lignine (Wirsen et Jannash, 1976), leur permet d'atteindre des zones profondes sans modifications structurales considérables (Pailleret *et al.*, 2007a). Les bois coulés sont alors observables depuis les eaux côtières les moins profondes, jusqu'aux profondeurs abyssales, dans tous les océans (Tab. 3). Les épisodes orageux et cycloniques favorisent l'exportation de débris végétaux de la terre vers la mer. Les régions tropicales, soumises aux épisodes cycloniques réguliers, sont alors considérées comme riches en bois coulés. C'est également le cas des zones marines dont la topographie favorise la retenue des débris, tels les canyons sous-marins (Vetter, 1995 ; Vetter et Dayton, 1998, 1999).

La présence de débris végétaux macroscopiques sur le plancher océanique a été signalée dès la fin du XIX^{ème} siècle au cours de l'expédition Challenger réalisée de 1872 à 1876. Des feuilles, fruits et branches d'arbres en quantité considérable ont été collectés par chalutage (Murray et Renard, 1891). Plus tard au cours de l'expédition Galathea, des bouts d'écorce, des graines, des noix de coco, des fruits de Pandanus et des copeaux de bois divers sont également prélevés jusqu'à des profondeurs proches de 10000 m (Bruun, 1959) [Tab. 3].

Dans la littérature scientifique, le terme bois coulés apparaît tardivement et fait référence aux substrats organiques végétaux en décomposition.

Bien qu'il soit parfois utilisé pour désigner les débris végétaux de manière générale, de différentes tailles et natures (troncs, branches, brindilles, feuilles et fruits provenant de phanérogames terrestres et marines, et des algues), le terme bois coulés reste le plus souvent réservé à la désignation de débris de bois au sens strict (xylème des branches, tronc et racines des dicotylédones ligneuses).

Références	Substrats	Localisations	Profondeurs (m)
Bruun, 1959	Branches, brindilles, copeaux de bois, feuilles, fruits, graines, bouts d'écorce	Philippines et Mer des Célèbes	0 à 10000
Duperron <i>et al.</i> , 2008	Bois, noix de coco et palmes de cocotier	Mer de Bohol	219 à 1775
Gros et Gaill, 2007	nd	Vanuatu et Mer de Bohol	300 à 1800
Gros <i>et al.</i> , 2007	nd	Vanuatu	300 à 890
Murray, 1895	Feuilles, fruits et branches	Pacifique Est	1464 à 3935
Ott <i>et al.</i> , 2004b	Plantes terrestres, herbes marines <i>et algues</i>	Zone intertidale	
Pailleret <i>et al.</i> , 2007a	Troncs d'arbres, branches, brindilles, fruits et feuilles	Vanuatu	560 à 580
Pailleret <i>et al.</i> , 2007b	Bois	Philippines, Taiwan, Vanuatu, Mer Méditerranée	0 à 570
Palacios <i>et al.</i> , 2006	Bois, fougère et fibres de cocotier	Noumea (Pacifique)	1200
Samadi <i>et al.</i> , 2007	Bois, graines et noix	Iles Salomon (Pacifique)	100 à 1200
Vetter, 1995	Herbes marines <i>et algues</i>	Canyons Scripps et La Jolla (San Diego, Pacifique)	10 à 1200
Wolff, 1979	Fruits, brindilles, écorce, feuilles, paille, <i>Thalassia</i> et <i>Sargassum</i>	Mer des Caraïbes	775 à 6850

nd : non déterminé

Tableau 3 : Exemples de substrats végétaux coulés signalés dans la littérature : nature des substrats, zone géographique et profondeur de récolte.

2 La faune associée aux substrats végétaux coulés

Les collectes de débris végétaux coulés ont permis d'observer et d'analyser la faune diversifiée qui les colonise (Fig. 9). Cette dernière est composée principalement de mollusques bivalves et gastéropodes ainsi que de crustacés et d'annélides (Turner, 1973, 1977 ; Wolff 1979 ; Williams et Turner 1986 ; Maddock et Steineck, 1987 ; Vetter, 1995 ; Pailleret *et al.* 2007a). De nouvelles espèces des profondeurs, parfois endémiques des bois coulés ont pu être décrites à la suite de ces collectes.



Figure 9 : Photos d'organismes associés à des substrats végétaux coulés.

Montage photo de Sarah Samadi, à partir des photos de Bertrand Richer de Forges, Sarah Samadi, Takuma Haga, Joëlle Dupont, Magali Zbinden. Légendes dans le sens de la lecture : moule associée à une noix de coco (mollusque bivalve), galathées utilisant probablement le bois comme habitat (crustacés décapodes), moules associées à une noix de nippa (mollusque bivalve), lucine associée aux fibres de palmes (mollusque bivalve), *Pectinodonta* se nourrissant sur le bois (mollusque ressemblant à une patelle), chiton sur une noix de coco (mollusque polyplacophore), étoile de mer strictement inféodée aux bois coulés (échinoderme), pagure symétrique utilisant le bois comme habitat (crustacé décapode), « ver » se nourrissant dans le bois (échiurien), cocculine associée aux bois coulés (mollusque en forme de patelle), oursin associé aux bois coulés (échinoderme), bivalve taraudeur (mollusque), micro gastéropodes (mollusques), champignons ascomycètes, cocculine sur une feuille (mollusque en forme de patelle).

Photos et légendes tirées de Santo 2006 (<http://accés.inrp.fr/santo/donnees/biodivmarine/santoboa/presentation-de-la-campagne-santoboa/>) .

Les bivalves Pholadidae font partie des premiers organismes à être décrits en association avec des débris végétaux en décomposition en milieu profond. Pendant l'expédition Galathea 2 (1950 - 1952) les chalutages entre 400 et 10150 m de profondeur ont permis de remonter presque systématiquement des débris végétaux de nature variée (Bruun, 1959), auxquels étaient associées de nombreuses espèces de *Xylophaga*, pour la plupart nouvelles (Knudsen, 1961). Ces bivalves foreurs sont associés aussi bien aux pièces massives de bois, qu'à des débris de plus petite taille tels que des brindilles ou même des fruits (Knudsen, 1961). Les collectes de bivalves foreurs Pholadidae associés aux substrats végétaux coulés permettent de décrire régulièrement de nouvelles espèces (Voight, 2007), leurs modalités d'association avec le substrat et également de préciser leur aire de répartition. Récemment une nouvelle espèce a été collectée à 100 m de profondeur (Voight, 2008), repoussant ainsi la profondeur limite supérieure présumée des Pholadidae, de 150 à 100 m.

Ces foreurs, considérés comme des espèces opportunistes des profondeurs, sont capables de coloniser les débris végétaux rapidement après leur immersion. Des immersions expérimentales de bois ont permis de révéler qu'après seulement 104 jours sous l'eau, le bois subissait déjà une attaque avancée par les foreurs *Xylophaga* et *Xyloredo* (Turner, 1973). Plusieurs espèces différentes de foreurs peuvent coloniser le même débris végétal. Il semblerait qu'elles s'y succèdent dans le temps, en fonction de leur aptitude dans la colonisation rapide ou la compétition (Voight, 2007).

Les bivalves Pholadidae utilisent en milieu profond la même niche écologique que les Teredinidae en milieu côtier. Ces Teredinidae qui eux aussi vivent logés dans le bois, se nourrissent de ce dernier à l'aide de bactéries symbiotiques localisées dans leur branchies, capables à la fois de fixer l'azote et de digérer la cellulose (Waterbury *et al.*, 1983). Compte tenu de la composition de leurs pelotes fécales (Knudsen, 1961), de leur contenu stomacal (Distel et Roberts, 1997), et de la présence de bactéries endosymbiotiques au niveau de leurs branchies, morphologiquement similaires aux symbiotes des Teredinidae (Distel et Roberts, 1997), il semblait fort probable que les Pholadidae se nourrissent également du substrat végétal qu'ils colonisent. Cette hypothèse a été confirmée récemment par une analyse des rapports isotopiques de foreurs Teredinidae et Pholadidae (Nishimoto *et al.*, 2009). Ces bivalves utilisent en effet leurs symbiotes bactériens comme source d'azote et la cellulose du bois comme source de carbone. Le bois sert donc à la fois d'abri et de nourriture aux foreurs Teredinidae et Pholadidae.

C'est également le cas des amphipodes des familles Lysianassidae (*Onesimoides chelatus*) et Gammaridae (*Bathyceradocus stephensi*) qui vivent logés dans les débris

végétaux dont ils se nourrissent (Barnard, 1961). Il peuvent atteindre des densités importantes sur de petits débris : 76 individus de l'espèce *Onesimoides chelatus* ont été observés dans un fruit de Nipa (Barnard, 1961).

Dans les communautés associées aux bois coulés, les gastéropodes sont souvent dominants. De nombreuses espèces ont été observées pour la première fois autour de bois coulés, et sont endémiques de ces environnements. Les individus majoritaires font partie des familles Skeneidae et Cocculinidae et sont observés dans les profondeurs bathyales et abyssales (Waren, 1996 ; Hasegawa, 1997). Cependant certains Cocculinidae peuvent vivre en association avec des bois coulés immergés jusqu'en zone hadale (plus de 6000 m de profondeur) [Leal et Harasewych, 1999].

Les échinodermes *Xyloplax medusiformis* (Baker *et al.*, 1986) découverts en Nouvelle Zélande, *Xyloplax turnerae* (Rowe *et al.*, 1988) en Atlantique, et *Xyloplax janetae* dans le Nord Pacifique (Voight, 2005), n'ont été observés jusqu'ici qu'autour d'accumulations de débris végétaux coulés, à des profondeurs abyssales. Ces échinodermes supposés endémiques des débris végétaux coulés, présentent de telles particularités anatomiques que l'établissement de leur systématique est encore confus (Janies et Mooi, 1998 ; Mah, 2006).

Des immersions expérimentales de bois ont permis de découvrir les ostracodes *Xylocythere*, également supposés endémiques des bois coulés, à des profondeurs comprises entre 1800 et 4000 m (Maddocks et Steineck, 1987), ainsi que les crustacés Galathéidae (Turner, 1977) appartenant au genre *Munidopsis*, qui colonisent les débris végétaux environ un an après leur immersion (Williams et Turner, 1986).

Le crabe *Vultocinus anfractus* associé aux bois coulés a été décrit récemment. Il est l'unique représentant du nouveau genre *Vultocinus* dans la nouvelle famille des Vultocinidae (Ng et Manuel-Santos, 2007).

Les bivalves Mytilidae font également partie des organismes colonisant les débris végétaux coulés en milieu profond. La moule *Idas argenteus* se fixe à l'aide de son byssus dans de petites crevasses du bois (Turner, 1973), ou encore à l'intérieur des tubes désertés de Teredinidae (Jensen, 1912, Turner, 1973). D'autres moules des genre *Idas* (Knudsen, 1961 ; Distel *et al.*, 2000 ; Gros *et al.*, 2007 ; Pailleret *et al.*, 2007a), *Adipicola* (Gros *et al.*, 2007), *Bathymodiolus* (Duperron *et al.*, 2008), *Benthomodiolus* (Distel *et al.*, 2000), *Myrina* (Knudsen, 1961) *Mytilus* (Nishimoto *et al.*, 2009) et *Modiolus* (Wolff, 1979) ont été observées sur des débris végétaux coulés.

Une grande diversité d'annélides polychètes colonise les débris végétaux coulés. Ils y trouvent une source de nourriture, un abri, ou un substrat dur pour leur fixation (Wolff, 1979 ; Pailleret *et al.*, 2007a).

3 L'écologie des substrats végétaux coulés

Le rôle important des débris végétaux coulés dans la structuration des communautés benthiques profondes est énoncé en premier lieu par Grassle et Morse-Porteus (1987). Les bois coulés sont une source d'hétérogénéité dans les fonds marins homogènes. En plus de permettre le développement d'une communauté d'organismes à la surface et à l'intérieur des substrats végétaux, la présence de ces derniers influe également sur les organismes vivant dans le sédiment. Leur densité augmente nettement à proximité des accumulations de substrats végétaux (Grassle et Morse-Porteus, 1987 ; Vetter et Dayton, 1999).

Les substrats végétaux coulés servent de substrat de fixation à certains organismes, dans un environnement où les substrats durs sont rares. Ils jouent également le rôle d'abri, notamment pour les annélides polychètes (Wolff, 1979). L'ensemble des organismes se nourrissant de bois, se fixant sur le substrat ou s'y abritant, attire des prédateurs, formant ainsi une communauté complexe autour des bois coulés.

Les débris végétaux coulés représentent un apport conséquent de matière organique sur le plancher océanique. Cependant les substrats organiques d'origine végétale sont connus pour être difficilement assimilables par les métazoaires sans l'intervention de procaryotes pour la digestion. La chaîne alimentaire autour des débris végétaux coulés était supposée dépendre totalement des rares organismes capables de se nourrir des substrats végétaux, tels que les bivalves foreurs. La capacité de ces derniers à utiliser les substrats végétaux comme source de nourriture a été démontrée (Waterbury *et al.*, 1983 ; Nishimoto *et al.*, 2009). Ils convertissent le bois, matière inutilisable par les autres organismes, en source de nourriture disponible. Ils représentent un maillon important à la base de la chaîne trophique : leurs pelotes fécales étant ingérées par les détritivores et leurs larves par les prédateurs (Turner, 1977). Cependant en 1979, Wolff (1979) identifie plusieurs autres groupes d'organismes capables de se nourrir du bois, tels des polychètes, échiuriens, chitons, gastéropodes, bivalves, et crustacés isopodes et amphipodes.

Les micro-organismes participent eux aussi à la colonisation et la dégradation des substrats végétaux coulés. Des signes microscopiques d'attaque bactérienne du bois en milieu

marin profond ont été signalés par Wirsen et Jannash (1976). En milieu aquatique la dégradation du bois diffère de celle observée en milieu terrestre. Elle est beaucoup plus lente en milieu aquatique, et résulte principalement de l'action des bactéries par rapport aux champignons. Les bactéries sont les seules capables de dégrader le bois même en conditions anoxiques (Holt et Jones, 1983). Plusieurs types de bactéries participent à la dégradation du bois, avec des cellules cibles et des modalités d'attaque propres à chaque type bactérien. Les bactéries prédominantes s'attaquent à la cellulose. L'activité cellulolytique bactérienne détectable sur les bois coulés (Palacios *et al.*, 2006) résulte de l'action combinée de plusieurs populations de bactéries dont la composition est influencée par la nature du bois et la durée d'immersion de celui-ci (Palacios *et al.*, 2009).

En 1995 Leschine (1995) révèle, à partir d'expériences réalisées en laboratoire, que la décomposition bactérienne de la cellulose dans de l'eau de mer, est accompagnée de la production de sulfures. Le bois, composé de 40 à 50 % de cellulose engendrerait probablement cette production de sulfures au cours de sa dégradation en milieu marin.

Cette hypothèse est soutenue par les observations réalisées sur des navires en bois coulés en mer. Du soufre élémentaire ainsi que des composés soufrés à différents degrés d'oxydation ont été détectés dans les structures en bois de navires (Sandström *et al.*, 2002 ; 2005). L'exposition du navire à des conditions anoxiques entraînerait la pénétration dans le bois de sulfure d'hydrogène qui, au contact de structures métalliques du navire, serait oxydé à nouveau en différents composés soufrés dont de l'acide sulfurique (Sandström *et al.*, 2002) qui favorise la détérioration des navires.

Toutefois les éventuels enrichissements en sulfures des bois coulés n'ont fait l'objet que de mesures préliminaires dans les sédiments sous-jacents (Le Bris, communication personnelle). Par conséquent, le lien entre les processus de dégradation bactérienne de la cellulose et la production de sulfures n'est pas fermement validé *in situ*.

Cependant les éléments obtenus permettent de supposer que les bois coulés, de manière similaire aux carcasses de baleine coulées, pourraient offrir les conditions de co-existence de donneurs et accepteurs d'électrons favorables au développement de micro-organismes chimioautotrophes.

Il est alors apparu important de consacrer des travaux à la recherche de symbioses sulfo-oxydantes au sein des communautés associées aux bois coulés afin de déterminer si cet environnement est effectivement propice au développement de symbioses chimiosynthétiques. Dans les autres environnements profonds réduits, les moules bathymodiolines sont des représentants essentiels des organismes symbiotiques

chimiotrophes. Les moules des bois coulés ont donc rapidement suscité un intérêt particulier pour les recherches d'associations symbiotiques.

4 Une communauté chimioautotrophe

L'analyse de moules des genres *Adipicola* et *Idas* associées à des substrats végétaux coulés collectés par chalutage, a révélé leur association avec des bactéries (Gros et Gaill, 2007 ; Gros *et al.*, 2007). Les techniques d'hybridations sur coupes et les observations en MET ont permis de déterminer que ces bactéries étaient ectosymbiotiques. Elles sont localisées à la face apicale de bactériocytes, au niveau de la zone latérale des filaments branchiaux. L'épaisseur de la couche bactérienne recouvrant les filaments semble varier avec le morphotype de moule considéré (Gros et Gaill, 2007).

Les bactéries, présentant une double membrane, sont de type Gram-négatif, et appartiennent au groupe des γ -protéobactéries (Gros et Gaill, 2007 ; Gros *et al.*, 2007), qui intègre, entre autres, tous les symbiotes sulfo-oxydants de moules.

La nature sulfo-oxydante des symbiotes des moules des substrats végétaux coulés a été validée par une étude combinant les techniques d'hybridations *in situ*, les observations en MET, et les analyses phylogéniques. Six spécimens de moules, dont une seule identifiée, *Adipicola longissima*, colonisant des substrats végétaux coulés collectés entre 219 et 1775 m de profondeur, ont été analysés (Duperron *et al.*, 2008). Les symbiotes appartiennent à la subdivision des γ -Protéobactéries, et sont très proches des bactéries endosymbiotes des moules des environnements réduits profonds tels que les sources hydrothermales et suintements froids (Fig. 10).

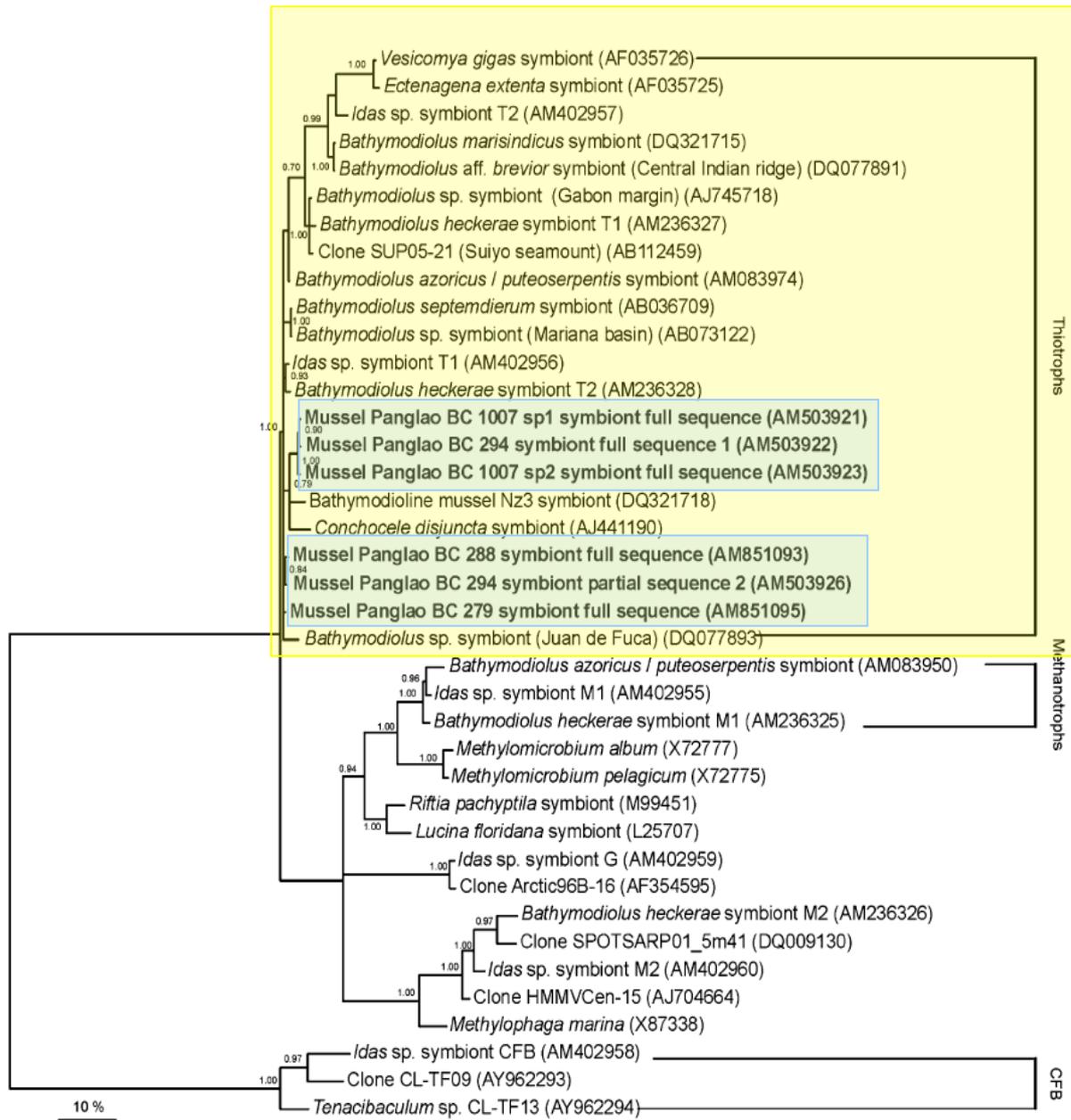


Figure 10 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARNr 16S révélant la position phylogénétique des bactéries associées à des moules de substrats végétaux coulés (cadres bleus). Ces bactéries intègrent le groupe des symbiotes thiotrophes de moules (cadre jaune). Tiré de Duperron et al. (2008).

Les séquences de gène de l'APS réductase viennent confirmer leur place au sein des symbiotes sulfo-oxydants et les rapprochent des symbiotes thiotrophes des moules du genre *Idas* (Duperron *et al.*, 2008). Les profils d'hybridations obtenus en utilisant l'amorce universelle des eubactéries et une amorce spécifique aux symbiotes détectés, suggèrent que les symbiotes thiotrophes sont les symbiotes largement majoritaires sinon uniques au sein des branchies des moules. Cette étude est la première à confirmer que des organismes chimioautotrophes sulfo-oxydants se développent autour des bois coulés. Elle dévoile également la possibilité de co-existence de symbiotes intracellulaires et ectosymbiotes de même nature chez certaines moules, alors que jusqu'ici seule de l'ectosymbiose avait été observée sur les moules associées aux bois coulés (Gros et Gaill, 2007 ; Gros *et al.*, 2007). La deuxième symbiose intracellulaire chez une moule des bois coulés est révélée chez un spécimen d'*Adipicola crypta* récolté sur du bois immergé expérimentalement à plus de 400 mètres de profondeur (Lorion *et al.*, 2008). Les symbiotes adoptent donc des dispositions variées au sein des branchies des moules des bois coulés : ils peuvent être intracellulaires, ectosymbiotiques, ou les deux à la fois.

Les branchies sont l'organe d'échange des bivalves avec le milieu extérieur. L'emplacement des bactéries au niveau des branchies, leur permet de rester en contact avec le milieu extérieur pourvu en oxygène et en sulfures, et de profiter d'une surface d'échange importante. Cette localisation des bactéries pourrait être doublement bénéfique aux hôtes, d'une part pour leur protection face à la toxicité des sulfures, et d'autre part pour leur approvisionnement en molécules carbonées, probablement par endocytose des symbiotes (Gros et Gaill, 2007 ; Gros *et al.*, 2007 ; Duperron *et al.*, 2008).

En dehors des bivalves Mytilidae, des annélides polychètes chimiosynthétiques de la famille des Siboglinidae ont également été signalées sur des débris végétaux coulés (Tab. 4). C'est le cas de polychètes *Siboglinum* (Bright et Giere, 2005) et *Lamellibrachia* (Hugues et Crawford, 2006). Les individus de *Lamellibrachia* ont été observés sur un substrat végétal tout à fait particulier dans une épave à 2800 m de profondeur : la cargaison de papier du navire. Cette découverte a permis d'établir que même un substrat végétal modifié par l'homme est susceptible de permettre le développement d'organismes chimiosynthétiques sulfo-oxydants (Hugues et Crawford, 2006).

Hôtes				Références
Phylum	Ordre	Famille	Espèce	
Annelida	Polychaeta	Siboglinidae	<i>Siboglinum</i> sp.	Bright et Giere, 2005
			<i>Lamellibrachia</i> sp.	Hugues et Crawford, 2006
Mollusca	Bivalvia	Mytilidae	<i>Adipicola</i> sp.	Gros <i>et al.</i> , 2007
			<i>Adipicola crypta</i>	Lorion <i>et al.</i> , 2008
			<i>Adipicola longissima</i>	Duperron <i>et al.</i> , 2008 ; Samadi <i>et al.</i> , 2007
			<i>Adipicola iwaotaki</i>	Lorion <i>et al.</i> , 2008
			<i>Idas</i> sp.	Gros <i>et al.</i> , 2007 ; Lorion <i>et al.</i> , 2008 ; Samadi <i>et al.</i> , 2007
			<i>Idas washingtonia</i>	Distel <i>et al.</i> , 2000 ; Jones <i>et al.</i> , 2005 ; Lorion <i>et al.</i> , 2008
		non identifiés	Gros et Gaill, 2007 ; Duperron <i>et al.</i> , 2008 ; 2009 ; Lorion <i>et al.</i> , 2008	

Tableau 4 : Les symbioses chimioautotrophes observées sur les substrats végétaux coulés profonds.

5 Les débris végétaux coulés : vecteurs des organismes chimiosynthétiques

Les débris végétaux coulés interviennent certainement dans la dispersion des espèces chimiosynthétiques. En servant de site relais à partir duquel les espèces peuvent essaimer, ils permettent à ces dernières d'élargir leur aire de répartition (Cayré et Richer de Forges, 2002).

La dispersion des espèces peut également être réalisée par transport des organismes au sein d'amas de débris végétaux. Certains amphipodes sont soupçonnés de s'introduire dans les débris végétaux dérivants avant qu'ils n'atteignent les grandes profondeurs, leur permettant ainsi d'être transportés sur de longues distances. Cela expliquerait l'étendue de leur aire de répartition (Barnard, 1961).

Les accumulations importantes de débris végétaux au niveau de sites tels que les canyons sous-marins, attirent une densité élevée d'organismes (Vetter et Dayton, 1998). Les débris accumulés peuvent être éparpillés lors d'épisodes de forte houle, reformant plusieurs petits habitats rapidement recolonisés par les organismes (Vetter, 1995).

L'intervention des substrats végétaux coulés dans l'aide à la dispersion des organismes pourrait avoir joué un rôle important dans l'histoire évolutive des communautés chimiosynthétiques. En effet les similitudes entre les communautés associées aux différents

environnements réduits des profondeurs (sources de fluides, carcasses de baleines et bois coulés) ont suggéré que des échanges auraient eu lieu entre ces communautés. Les liens phylogénétiques entre des moules prélevées sur chacun de ces environnements, ont mené à l'hypothèse que les bois et carcasses de baleines coulés auraient pu servir de vecteurs historiques de transport des moules, et certainement d'autres organismes chimiosynthétiques, vers ou à partir des sites chimiosynthétiques profonds tels que les sources de fluides (Distel *et al.*, 2000).

L'aspect évolutif des communautés associées aux environnements réduits a été abordé à l'aide d'études phylogénétiques. Les conclusions sont tantôt favorables (Samadi *et al.*, 2007), tantôt défavorables (Jones *et al.*, 2005) à l'hypothèse de Distel *et al.* (2000). Toutefois l'unique étude combinant les analyses des moules et de leurs symbiotes, reste favorable à cette hypothèse (Lorion *et al.*, 2008). Cependant, dans l'ensemble de ces travaux, le nombre d'échantillons, limité par les difficultés de prélèvement en milieu profond, ne permet pas d'avancer de conclusion définitive.

La contribution de la paléontologie à l'approche évolutive (Kiel et Goedert, 2006a) des communautés chimiosynthétiques vient compléter l'ensemble des données disponibles. Les résultats ne vont pas en faveur de la thèse d'une colonisation des sites profonds par les espèces côtières. Les bois et carcasses de baleines coulés fossilisés indiqueraient que les moules Bathymodioline seraient apparues sur les suintements froids avant qu'elles n'apparaissent sur les bois et carcasses de baleines coulés (Kiel et Goedert, 2006a, b).

6 Les limites des études des débris végétaux coulés profonds

Les connaissances actuelles sur les débris végétaux coulés concernent principalement leur répartition, la composition des communautés qui leur sont associées, et leur capacité à soutenir le développement d'organismes chimiotrophes, principalement les Mytilidae. La compréhension du fonctionnement général de l'écosystème associé aux substrats végétaux coulés n'est basée actuellement que sur des hypothèses issues de résultats d'études de nature très diverses, dont chacune présente des limites.

Les études basées sur les bois coulés fossilisés (Kiel et Goedert, 2006a, b; Kiel et Goedert, 2007; Kiel *et al.*, 2008) permettent d'appréhender l'évolution sur une échelle géologique des communautés associées, mais écartent des analyses tous les organismes

dépourvus de parties minérales. De plus, elles n'informent évidemment que sur des associations anciennes (temps géologiques).

Les collectes de débris végétaux coulés naturels (Wolff, 1979 ; Pailleret, 2007a, b) permettent d'étudier d'une part le substrat bois (composition, modalités de la dégradation) et d'autre part les organismes associés (composition de la communauté, biologie des organismes, leur utilisation du substrat végétal). Cependant elles ne permettent pas d'aborder la dynamique temporelle de colonisation des débris végétaux, puisque leurs durées d'immersion sont inconnues. Des immersions expérimentales de bois sont utilisées afin de répondre à cette problématique. Toutefois les travaux réalisés jusqu'ici (Williams et Turner, 1986 ; Maddocks et Steineck, 1987 ; Southwell et Bultman, 1971 ; Turner, 1977 ; Lorion *et al.*, 2008) ont rarement traité de la colonisation globale des bois coulés, mais se sont focalisés sur un groupe d'organismes en particulier. Contrairement aux carcasses de baleines coulées (Smith et Baco, 2003), aucune donnée n'est disponible sur les successions faunistiques observables chez les substrats végétaux coulés. C'est aussi le cas pour la caractérisation chimique du milieu. Aucune donnée quantitative n'était disponible au début de ce travail concernant l'enrichissement en sulfures des habitats d'organismes colonisant les bois coulés, ni aucune estimation de la dynamique de production de ces sulfures au cours de la dégradation du substrat végétal en milieu marin. Seules des mesures préliminaires avaient été effectuées sur un échantillon de bois naturel placé en aquarium après récolte (Le Bris, communication personnelle). Mais en raison de la réactivité des sulfures et de la sensibilité des BSR aux conditions environnementales, ces mesures ne peuvent être extrapolées aux concentrations rencontrées sur ce bois avant sa récolte. Les mesures *in situ* sont les seules à pouvoir renseigner sur les conditions chimiques auxquelles sont exposés les organismes colonisant les bois en milieu naturel. La réalisation de mesures de gradients de concentration à la surface des substrats coulés directement *in situ* exige également une résolution spatiale fine qui ne peut être obtenue par des prélèvements. Cependant la réalisation de ces mesures exige l'utilisation d'instruments immergeables spécifiques qui ne sont pas disponibles commercialement.

Les analyses phylogénétiques des organismes associés aux débris végétaux coulés sont réalisées à partir d'un nombre réduit d'échantillons, limitant les possibilités de validation des résultats. De même la détermination des zones de répartition des espèces ou encore de leur spécificité à un substrat donné, passe par la réalisation d'un nombre élevé d'observations.

La restriction de l'échantillonnage est commune à toutes les études portant sur les écosystèmes profonds. Toutefois, certaines difficultés sont spécifiques aux substrats végétaux

coulés. En effet, contrairement aux sites de fluides pour lesquels des techniques de détection ont été développées, les débris végétaux ne sont pas repérables à partir de la surface. Le choix des zones de chalutage se fait sur la base d'indications topographiques. Les chalutages sont réalisés au niveau de zones susceptibles de recevoir des apports importants de débris végétaux. Le chalutage implique un lessivage du substrat lors de sa remontée vers la surface. La faune récupérée se limite donc aux organismes fixés au substrat, ou logés à l'intérieur. Ce lessivage ne peut être évité que par l'utilisation de submersibles ou véhicules télé-opérés, ce qui en contrepartie limite la zone de recherche. Ces engins ne sont généralement utilisés que pour la récupération de substrats végétaux expérimentalement immergés dont la position est connue.

7 Les milieux côtiers intertidaux

Bien que les scientifiques se soient intéressés d'avantage aux substrats végétaux coulés des milieux profonds pour leur capacité à attirer une communauté dans un environnement pauvre en apports organiques, ces derniers ont également fait l'objet d'études dans les milieux côtiers. Ces études traitent majoritairement de débris végétaux de petite taille, ou d'amas de débris tels que des algues ou des herbes marines, mais peu de débris comparables aux branches et troncs récoltés en grandes profondeurs. La taille réduite des débris n'est cependant pas incompatible avec le développement d'organismes chimioautotrophes sulfo-oxydants tels que des nématodes (Ott, 1996 ; Ott *et al.*, 2004a) ou des protistes ciliés (Ott et Bright, 2004). Des colonies de ciliés se développant sur les radicelles de palétuvier en décomposition sur la tourbe de mangrove (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a, b ; Ott et Bright, 2004 ; Ott *et al.*, 2004b; Rinke *et al.*, 2006) vivent en ectosymbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes (Rinke *et al.*, 2006). Ces micro-habitats réduits éphémères ont ainsi été décrits au niveau même des débris de macrophytes. La dégradation des débris végétaux par les micro-organismes serait à l'origine de la production de sulfures (Vopel *et al.*, 2005).

CHAPITRE 3

PRESENTATION DE L'ETUDE

1 Objectifs de l'étude

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont pour objectif de répondre aux questions ouvertes par les études précédentes concernant deux aspects de l'écosystème formé à partir de l'accumulation de débris végétaux : les organismes associés au substrat végétal et les émissions de sulfures au niveau de ce substrat.

Les sulfures ont été proposés comme étant un élément-clé du fonctionnement des écosystèmes formés par l'accumulation de débris végétaux, comme c'est le cas pour les carcasses de baleines. L'enrichissement au niveau des débris végétaux coulés est suggéré par la présence d'organismes sulfo-oxydants. Si le schéma proposé pour les carcasses est applicable aux substrats végétaux, leur dynamique spatiale et temporelle serait un facteur prédominant dans la succession des espèces colonisatrices des débris végétaux immergés.

Le processus de décomposition du substrat végétal semble être à l'origine de ces émissions de sulfures. Les variations de ce processus d'un type de débris à un autre entraînent probablement des différences dans les émissions de sulfures qui en résultent. La relation entre la nature des substrats végétaux et les émissions de sulfures, notamment leur dynamique temporelle et spatiale a également été abordée au cours des travaux.

La présence de sulfures est supposée influencer fortement la colonisation des substrats végétaux, puisqu'elle autorise d'une part le développement d'organismes sulfo-oxydants, donc dépendants des sulfures, et d'autre part limite probablement, par la toxicité des sulfures, la présence des organismes non tolérants aux sulfures. La nature du substrat intervient aussi sur les modalités de sa colonisation par divers organismes. La composition des communautés d'organismes et leur dynamique de colonisation des substrats végétaux ont été étudiées en tentant d'estimer l'influence respective de la présence des sulfures et de la nature du substrat sur ces éléments.

Une originalité des systèmes formés par l'accumulation de débris végétaux en décomposition étant leur capacité à héberger des organismes chimiosynthétiques sulfoxydants, un effort particulier a porté sur la description des organismes symbiotiques sulfoxydants et leur dynamique de colonisation en relation avec les émissions de sulfures dont ils dépendent.

Les questions posées au début de l'étude étaient les suivantes :

- Les débris végétaux coulés sont-ils réellement enrichis en sulfures au cours de leur dégradation ?
- S'il y a réellement des émissions de sulfures au niveau des débris végétaux coulés, permettent-elles le développement d'organismes thioautotrophes ?
- A quel moment et où les sulfures sont-ils émis et quelle évolution temporelle respectent-ils ?
- Quels organismes colonisent les débris végétaux coulés en décomposition et quelle est leur dynamique de colonisation ?
- Parmi la faune colonisatrice des débris végétaux coulés, quels organismes vivent en symbiose avec des bactéries thioautotrophes ?
- La nature du substrat végétal influence-t-elle les processus d'émissions de sulfures et de colonisation par la faune ?

Afin de répondre aux questions ci-dessus, diverses techniques ont été utilisées, dans le cadre d'une stratégie expérimentale simple (Fig. 11). Celle-ci se base sur l'étude de substrats végétaux coulés naturels et immergés expérimentalement. Ces études sont en effet complémentaires pour l'approche du fonctionnement global des débris végétaux coulés. Toutes les analyses chimiques ont été réalisées à l'aide de capteurs électrochimiques *in situ*. Les observations microscopiques, les analyses phylogénétiques, et les hybridations moléculaires sont les techniques principales utilisées pour la partie biologique de cette étude.

	Problématique	Stratégie	Matériels et méthodes	Organisation du mémoire	
Bois coulés naturels	Débris végétaux coulés = émetteurs de sulfures ?	Mesures chimiques <i>in situ</i>	Capteurs électrochimiques	Chap. 1	Partie II
	Les sulfures permettent-ils la chimiotrophie ?	Recherche de symbioses sulfo-oxydantes	MEB, MET, hybridations <i>in situ</i> et phylogénie	Chap. 2	
Bois expérimentalement immergés	Dynamique d'enrichissement en sulfures	Suivi chimique continu	Capteurs électrochimiques	Chap. 1	Partie III
	Dynamique de colonisation des substrats végétaux coulés	Suivi biologique régulier	Echantillonnage et identification	Chap. 2	
	Diversité de la faune symbiotique	Recherche de symbioses	MEB, MET et hybridations	Chap. 3	
	Influence du substrat	Immersion de plusieurs substrats			

Figure 11 : Schématisation des objectifs des travaux et de la stratégie développée pour les atteindre. L'organisation du mémoire respecte la démarche scientifique de l'étude.

Un environnement nous est paru favorable à la réalisation de cette étude : la mangrove. Il s'agit d'un écosystème marin intertidal que l'on retrouve dans les régions tropicales et subtropicales (entre 25°N et 25°S). Cet écosystème particulier héberge une grande biodiversité et assure des fonctions diverses : nursery, lieu de reproduction, refuge, pâture... Il est également considéré comme un des environnements les plus productifs, dans lequel les processus microbiens ont une place importante.

La forêt de palétuviers bordant la mangrove alimente les sédiments immergés en débris végétaux variés. La mangrove est donc un environnement où l'on retrouve des substrats végétaux immergés d'une part, et des organismes sulfo-oxydants d'autre part, atout majeur pour la réalisation de notre étude.

De plus un milieu côtier peu profond comme la mangrove permet de contourner les problèmes d'accessibilité des bois coulés et de ce fait permet de diminuer les difficultés d'échantillonnage. La réalisation d'études en milieux peu profonds favorise une meilleure description de la faune associée aux substrats végétaux coulés, grâce à un échantillonnage plus complet et régulier. La mise en place d'analyses chimiques *in situ* est également plus aisée dans ces milieux.

Ces milieux sont donc beaucoup plus adaptés que les sites profonds, à l'étude de la relation entre les caractéristiques chimiques des substrats végétaux coulés, et les processus de

colonisation, notamment par les organismes chimiosynthétiques, et cela aussi bien pour des débris végétaux coulés naturels, que pour des substrats immergés expérimentalement.

La détermination des similitudes et différences avec les bois coulés observés en grande profondeur, chez lesquels les associations symbiotiques d'invertébrés avec des bactéries sulfo-oxydantes ont été décrites en premier lieu, serait également possible sur cette base.

2 Présentation du site d'étude

La mer des Caraïbes (Fig. 12) est localisée dans la zone tropicale confrontée à des épisodes cycloniques réguliers, amplifiant le transfert de débris végétaux du milieu terrestre vers le milieu marin. Elle abrite un écosystème particulièrement propice à ce transfert : la mangrove. Cette dernière présente un couvert végétal à proximité du milieu marin, permettant l'alimentation continue de ce dernier en débris végétaux.

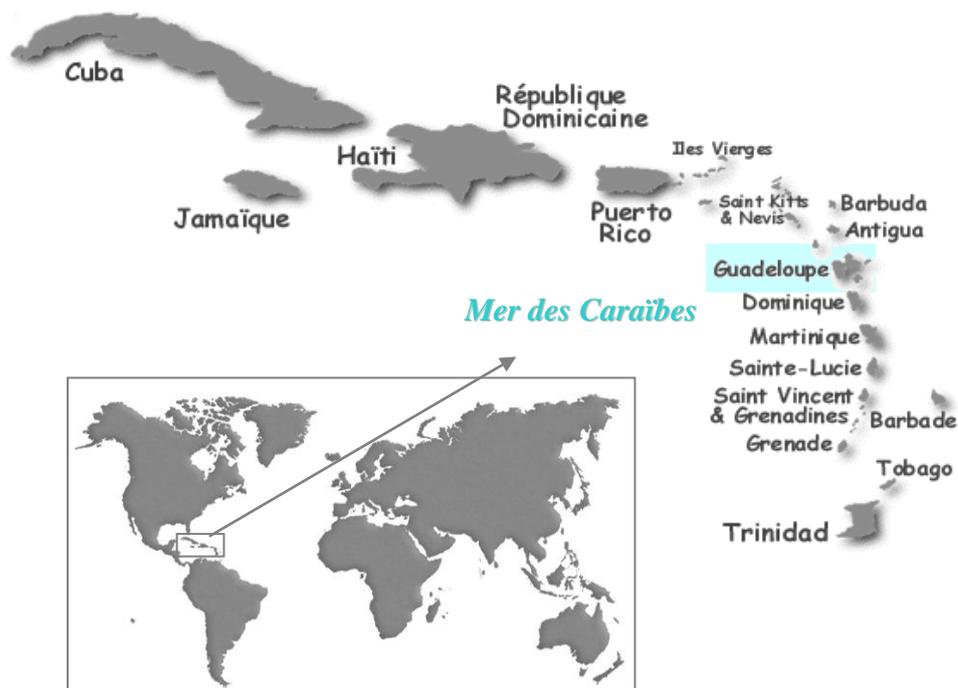


Figure 12 : Localisation de la Guadeloupe dans la Mer des Caraïbes.

L'archipel de la Guadeloupe (16°N, 61,5°W) est situé dans la mer des Caraïbes. Les deux îles principales formant la Guadeloupe proprement dite, la Basse-Terre, d'origine volcanique, et la Grande-Terre, de nature calcaire, sont séparées par la Rivière salée (Guilcher et Marec, 1978). Cette Rivière Salée, large de 40 à 60 m et profonde d'environ 3 m, met en

communication le Grand Cul-de-Sac Marin et le Petit Cul-de-Sac Marin (Fig. 13) en traversant la zone de mangrove la plus importante de la Guadeloupe, dont la superficie atteint 2325 ha (Chauvaud *et al.*, 2001).

Les mouvements de marée déterminent le sens d'écoulement de la Rivière Salée. Au cours de la marée descendante elle s'écoule du Nord au Sud, tandis qu'au cours de la marée montante elle s'écoule du Sud vers le Nord. La marée en Guadeloupe est à inégalités diurnes, avec deux pleines mers et deux basses mers par jour, de hauteurs inégales et d'un marnage moyen de 30 cm.



Figure 13 : Carte de la Guadeloupe et localisation de la lagune de la Manche-à-Eau.

La zone de mangrove autour de la Rivière salée est composée de trois zones : la mangrove du bord de mer, la mangrove arbustive et la mangrove haute (Imbert *et al.*, 1988). Dans la mangrove du bord de mer, au rivage inondé quotidiennement, le palétuvier rouge (*Rhizophora mangle*) est omniprésent (Lescure, 1980). Les bords de la Rivière Salée sont constitués exclusivement de palétuviers rouges, qui forment une ceinture d'environ 10 m (Fig. 14).

Un chenal étroit partant de la Rivière Salée mène à une lagune nommée la Manche-à-Eau (Fig. 13). Elle est située à la latitude de 16°16'36''N et la longitude de 61°33'24''W (Mantran *et al.*, 2009). La lagune est alimentée en eau de mer par la Rivière Salée, selon des modalités différentes en fonction de la marée (Mantran *et al.*, 2009), et reçoit de l'eau douce du bassin versant alentour. Cette lagune a été choisie comme site d'étude pour sa richesse en bois coulés, visibles parfois de la surface (Fig. 15), et sa facilité d'accès.



Figure 14 : Photo des bords de la Rivière Salée constitués exclusivement de palétuviers rouges.



Figure 15 : Photos de débris végétaux coulés en mangrove sur le site de la Manche-à-Eau. De nombreux débris végétaux jonchent le sédiment de mangrove à proximité des racines de palétuvier (à gauche). Certains bois coulés sont visibles depuis la surface (à droite).

La lagune de la Manche-à-Eau a une étendue de 281 700 m², une profondeur moyenne de 1,5 m et une profondeur maximale de 3 m (Mantran *et al.*, 2009). La courantologie de cette lagune est régulièrement modifiée suite aux changements de morphologie, dus au processus d'accumulation de sédiment et aux épisodes cycloniques. Cependant les courants restent de manière générale très faibles (non mesurables avec un courantomètre) (Mantran *et al.*, 2009). Les données les plus récentes concernant les paramètres physico-chimiques de cette lagune, sont reportées dans le tableau 5. Ces paramètres sont soumis à l'influence des saisons : le carême (de décembre à mai) et l'hivernage ou saison des pluies (de juin à novembre).

Paramètres	Valeurs
Osmolarité	1021,7 mOsm
Température	28,3 à 31,8 °C
Salinité	36,24 ‰
pH	8,32
Turbidité	3,55 mg/l
Conductivité	5,45 S/m
Oxygène dissous	7,37 mg/l
Solides dissous	32,73 g/l

Tableau 5 : Paramètres physicochimiques mesurés à la lagune de la Manche-à-Eau entre avril et mai 2007 (selon Mantran, 2007).

PARTIE II

ANALYSE DE BOIS COULES **NATURELS DE MANGROVE**

CHAPITRE 1

ANALYSE CHIMIQUE DE BOIS COULES DE MANGROVE

1 Matériels et méthodes

1.1 Les capteurs électrochimiques potentiométriques

Les mesures de concentrations en H_2S ont été réalisées à l'aide de capteurs autonomes électrochimiques potentiométriques de sulfures et de pH. Chaque capteur est composé de deux électrodes (une électrode de référence et une électrode indicatrice), connectées de manière étanche à un boîtier immergeable (Fig. 16). Ce dernier protège la partie électronique (NKE, France), assurant l'enregistrement des modifications du potentiel électrique entre les électrodes. Selon le principe de fonctionnement des capteurs potentiométriques, la différence de potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode indicatrice, permet de déterminer la concentration du composé d'intérêt (ici H^+ et H_2S). La récupération des données est réalisée à l'aide du logiciel Winmemo, par mise en contact du boîtier électronique et d'un crayon électronique submersible (MICRELTM, France) relié à un ordinateur.

Le capteur de sulfures comporte une électrode indicatrice de sulfures, de 0,8 mm de diamètre et 2 mm de long, de type $\text{Ag}/\text{Ag}_2\text{S}$ et une électrode de référence de type Ag/AgCl . L'électrode indicatrice de sulfures est spécifique aux ions sulfures. Ce type de capteur a été utilisé auparavant pour caractériser des habitats chimiosynthétiques profonds (Le Bris *et al.*, 2008). Ces électrodes ont une précision limitée par la nature logarithmique de leur réponse, mais elles présentent l'avantage d'une large gamme de détection : de moins de 1 μM à plus de 10 mM.

Le capteur de pH est similaire à celui décrit par Le Bris *et al.* (2001). Il est composé d'une électrode de verre et d'une électrode de référence de type Ag/AgCl . Ce capteur de pH, développé pour caractériser les fluides des sources hydrothermales sur une échelle du centimètre au décimètre, effectue des mesures avec un temps de réponse rapide.

L'utilisation simultanée des capteurs de sulfures et de pH est nécessaire pour les mesures de sulfures dans l'environnement, les concentrations relatives des formes H_2S , HS^- et S^{2-} étant déterminées par le pH de l'eau (Millero *et al.* 1987).

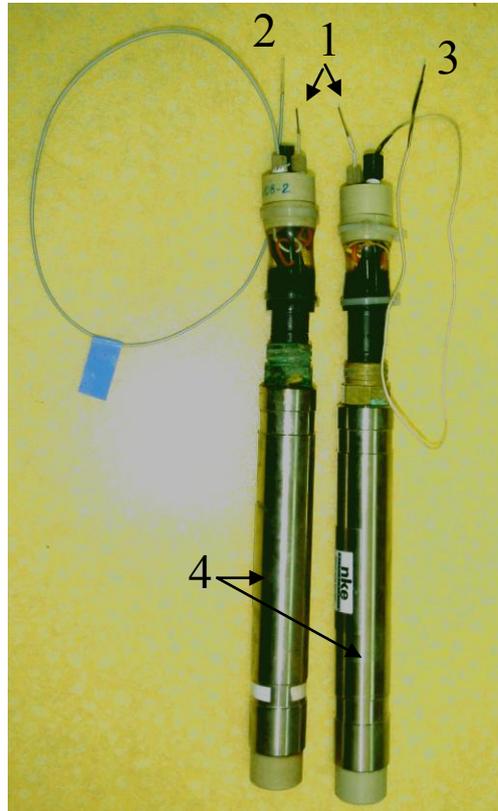


Figure 16 : Présentation des capteurs électrochimiques *in situ* de pH (à gauche) et de sulfures (à droite). 1 : électrodes de référence ; 2 : électrode de pH ; 3 : électrode de sulfures ; 4 : boîtiers électroniques.

1.2 Calibration des capteurs

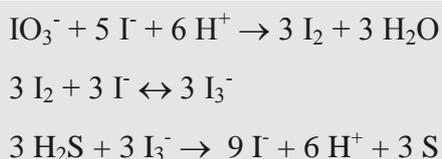
Les capteurs ont été préparés en laboratoire avant et après chaque utilisation, à partir d'un protocole établi par N. Le Bris. Avant leur utilisation pour une expérience *in situ* les électrodes étaient reconditionnées puis calibrées. A leur récupération les capteurs étaient calibrés avant reconditionnement des électrodes afin de vérifier la stabilité de ces dernières au cours de l'expérience. La calibration proprement dite correspond à l'examen de la réponse des électrodes aux modifications de pH et de concentrations en sulfures.

Le reconditionnement de l'électrode de référence des capteurs de sulfure et de pH consiste en la reconstitution de la couche de chlorure d'argent recouvrant le fil d'argent qui

constitue la base de l'électrode. Elle est réalisée par électrolyse de l'électrode en présence d'une contre-électrode en acier, dans une solution de KCl 3 M.

Le film de sulfure d'argent recouvrant l'électrode indicatrice des sulfures est régénéré par bain du fil d'argent dans une solution de Na₂S d'environ 100 mM pendant 12 h. L'électrode indicatrice de pH étant une électrode de verre, elle ne nécessite pas de régénération. Ces régénérations d'électrode peuvent entraîner une modification de la réponse des capteurs aux concentrations de sulfures, ou au pH. Une calibration des capteurs est alors nécessaire après chaque régénération d'électrode.

La calibration proprement dite des capteurs de sulfures nécessite la préparation de solutions étalons à partir d'une solution de sulfures de sodium (Na₂S). Elle est obtenue par dissolution de cristaux de Na₂S dans de l'eau ultra-pure. Sa concentration est déterminée par iodométrie, sur la base des réactions suivantes :



L'ion iodure (I₃⁻) est formé par réaction d'une solution étalon d'iodate (IO₃⁻) en présence d'un excès d'iodure (I⁻) en milieu acide. L'ion iodure, de couleur jaune, est ensuite neutralisé par les sulfures pour former I⁻, qui est incolore.

La concentration en sulfures peut alors être déterminée par mesure de l'absorbance des échantillons d'une gamme étalon similaire à celle présentée dans le tableau 6.

Echantillon	Eau ultrapure	KI (100 mg/ml)	KIO ₃ (1,667 mM)	H ₂ SO ₄ (5 %)	Na ₂ S (diluée 1/10)
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

Tableau 6 : Constitution de la gamme d'étalonnage pour le calcul de la concentration de la solution mère de Na₂S.

La représentation graphique des absorbances mesurées à une longueur d'onde de 400 nm, en fonction des volumes de Na_2S ajoutés (Fig. 17), permet de déterminer le volume équivalent ($V_{\text{éq}}$), soit le volume de Na_2S nécessaire pour la neutralisation de I_3^- (absorbance nulle).

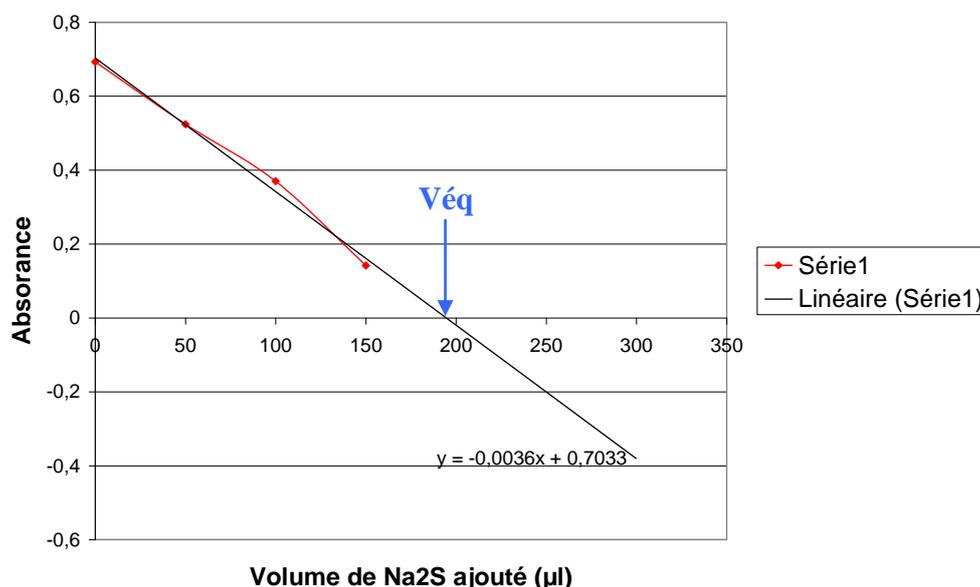


Figure 17 : Représentation graphique des absorbances en fonction des volumes de Na_2S dans les solutions de la gamme étalon. Le volume équivalent ($V_{\text{éq}}$) correspond au volume de Na_2S nécessaire pour la neutralisation de l'ion iodure, menant à une absorbance nulle.

La concentration de la solution de Na_2S est alors calculée à partir de la formule suivante :

$$[\text{Na}_2\text{S}] = 10 \times 3 \times 500 \times [\text{KIO}_3] / V_{\text{éq}}$$

Avec $[\text{KIO}_3] = 1,667 \text{ mmol.l}^{-1}$; $V_{\text{éq}}$ en μL ; $[\text{Na}_2\text{S}]$ en mmol.l^{-1} ; 3 : facteur stœchiométrique ; 10 : facteur de dilution de la solution mère de sulfures ; 500 : volume de KIO_3 introduit.

Les électrodes des capteurs de sulfures sont calibrées par la méthode des ajouts. Elles sont immergées, ainsi qu'un pH-mètre de laboratoire, dans un volume connu d'eau de mer filtrée à $0,2 \mu\text{m}$, dans lequel sont injectées des doses connues de solution de Na_2S (Fig. 18). Les capteurs, configurés pour effectuer une mesure toutes les 5 secondes, enregistrent les modifications de potentiels dues aux changements de concentration en sulfures résultant des ajouts de Na_2S . Sur le graphe obtenu, la valeur de potentiel électrique de chaque palier

correspond à une concentration en sulfures et dépend également du pH du milieu. Le potentiel électrique diminue lorsque les concentrations en sulfures augmentent.

Sur cette base l'équivalence entre les potentiels enregistrés par les capteurs et la concentration en sulfures dans l'eau de mer (calculée à partir de la concentration de la solution mère de Na_2S , du volume d'eau de mer, et du pH) peut alors être établie (Fig. 18).

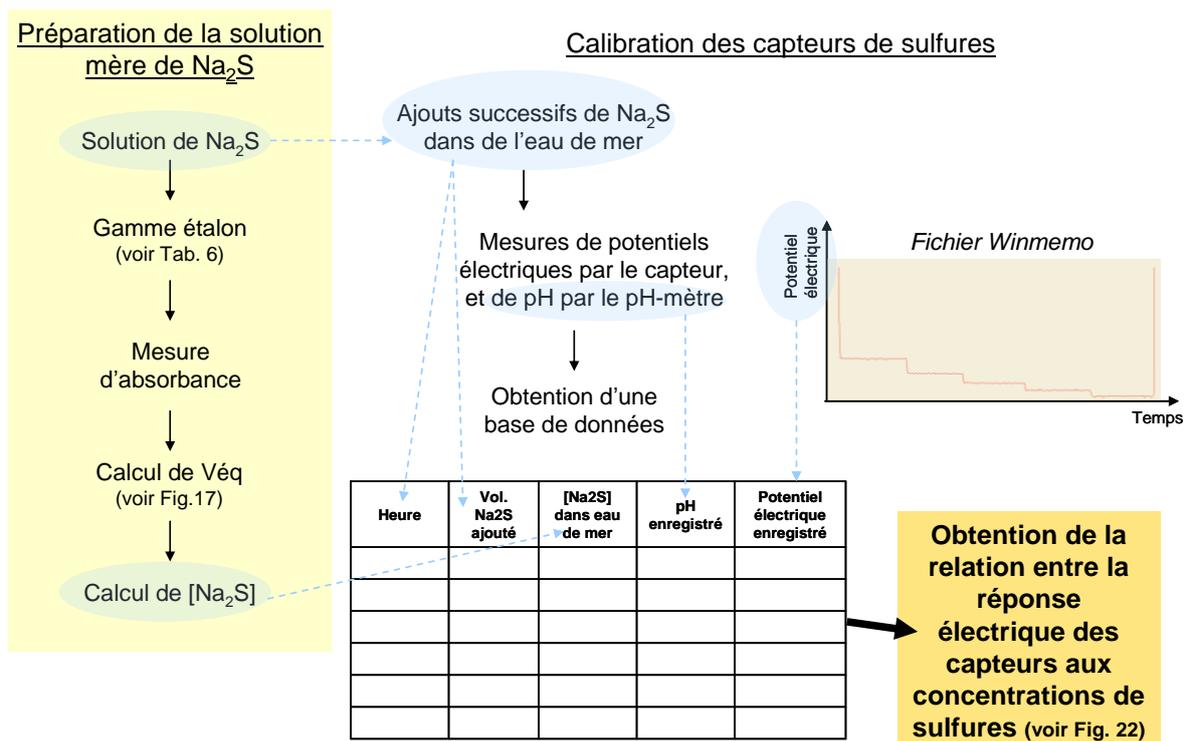


Figure 18 : Représentation schématique de la procédure de calibration des capteurs de sulfures. $[\text{Na}_2\text{S}]$: concentration en sulfures de sodium ; Véq : volume équivalent ; vol. : volume.

Pour la calibration des capteurs de pH, une série de quatre à six solutions de Tris 1 M dans de l'eau de mer (filtrée à $0,2 \mu\text{m}$) est préparée. Le pH des solutions est ensuite abaissé par ajout de HCl concentré, de manière à constituer une gamme de pH variant de 4 à 9. Les capteurs de pH sont configurés de manière à effectuer une mesure toutes les 5 secondes, puis plongés, ainsi qu'un pH-mètre de laboratoire, pendant 1 à 2 min successivement dans chaque solution étalon. Les pH affichés par le pH-mètre, et les potentiels enregistrés par les capteurs, sont notés pour chaque solution de la série (Fig. 19). L'équivalence entre les deux valeurs est calculée à partir de la courbe représentant l'évolution du voltage enregistré, en fonction du pH de la solution (mesuré par le pH-mètre de laboratoire).

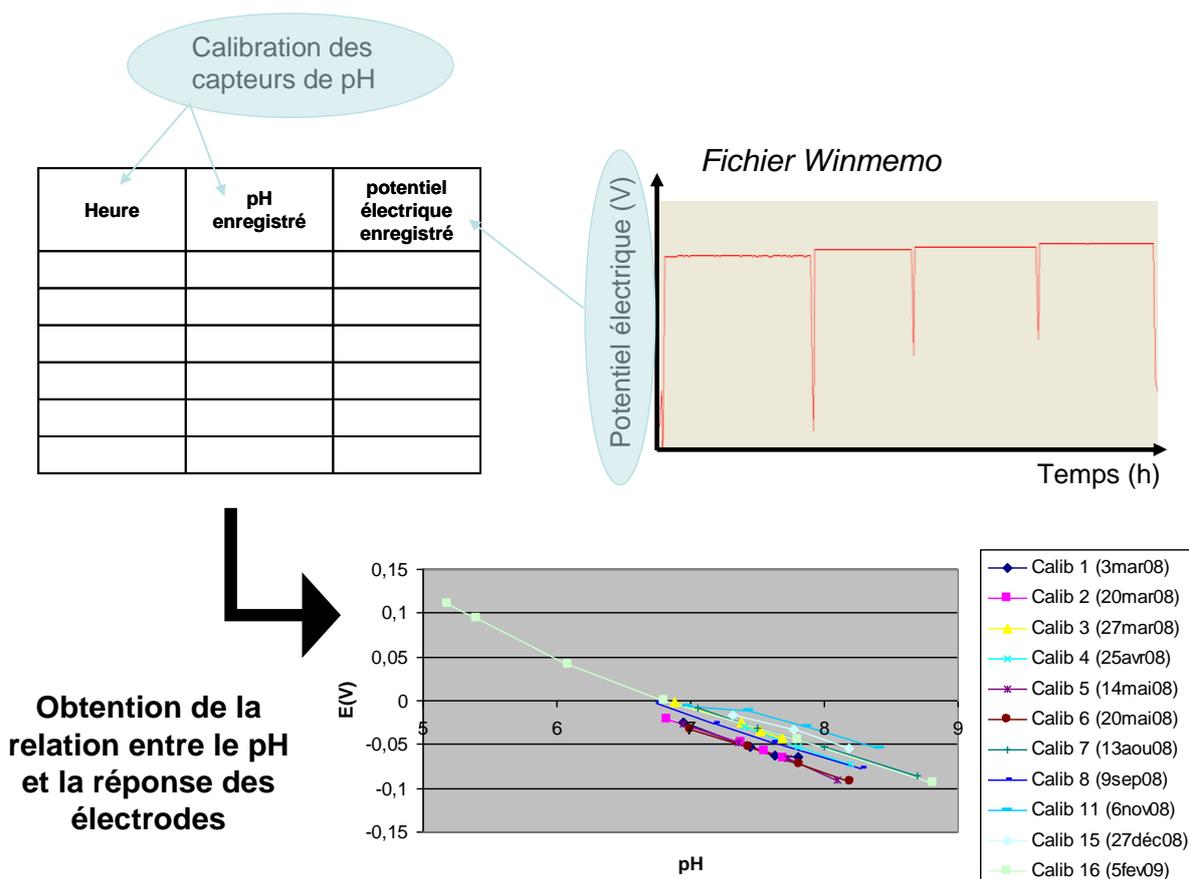


Figure 19 : Représentation schématique de la procédure de calibration des capteurs de pH.
E(V) : Potentiel électrique exprimé en Volt

1.3 Réalisation des mesures *in situ*

Les mesures chimiques ont été réalisées dans le sédiment de mangrove, à l'interface sédiment / eau, et à la surface de bois coulés. Les bois coulés, de quelques cm à 1 m de long, et de diamètre supérieur à 15 cm, étaient immergés à moins d'un mètre de profondeur dans la lagune de la Manche-à-Eau. Tous les débris de bois provenaient des palétuviers rouges *Rhizophora mangle* (Linnaeus, 1753), constituant la végétation alentour.

Plusieurs séquences courtes de mesures (quelques minutes) ont été réalisées à la surface de divers bois coulés, ainsi que dans le sédiment et l'eau du site. Pour chaque séquence, les électrodes de pH et de sulfures étaient fixées l'une à l'autre, pour s'assurer que les mesures obtenues caractérisent bien le même micro-environnement (Fig. 20). Les capteurs étaient configurés pour effectuer une mesure toutes les 5 secondes. Des manipulations minutieuses au moment du positionnement des électrodes, ont permis de limiter la perturbation des conditions hydrodynamiques des micro-environnements analysés.

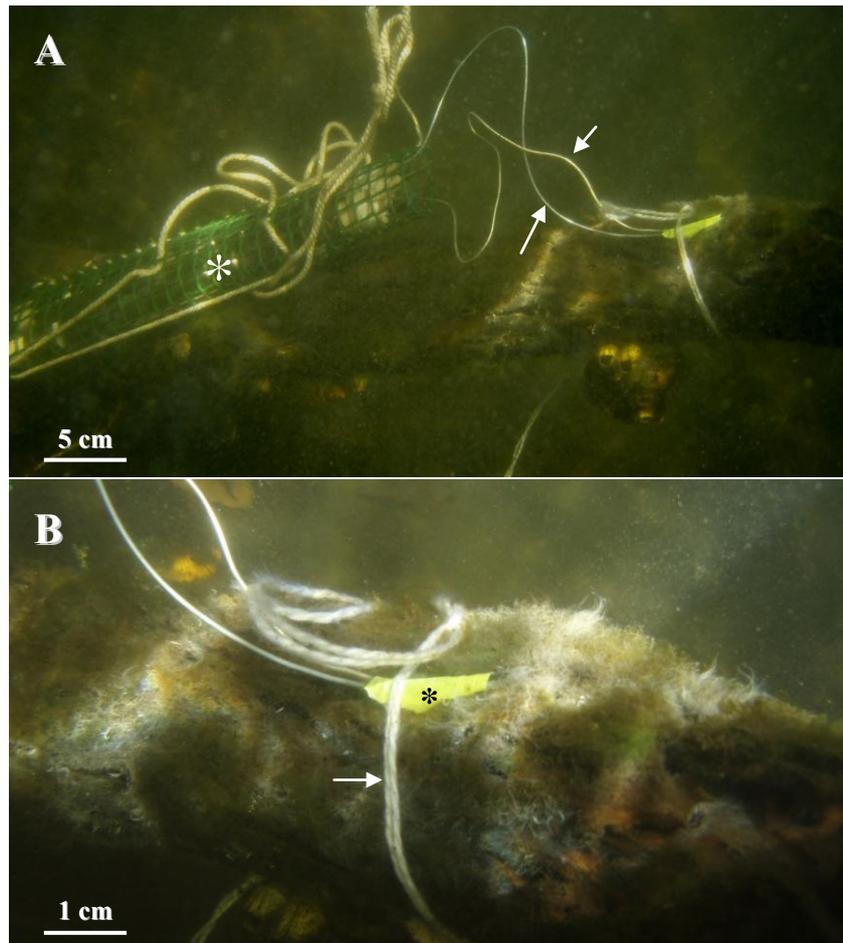


Figure 20 : Installation des capteurs autonomes sur un bois coulé pour la réalisation de mesures à court terme. A : Vue d'ensemble du montage : les boîtiers électroniques des capteurs sont glissés dans une pochette grillagée (astérisque) fixée au bois, alors que leurs électrodes de mesure (flèches) sont positionnées à la surface du bois. B : Gros plan sur les électrodes de mesures, qui, fixées l'une à l'autre par du ruban adhésif (astérisque), sont plaquées sur une zone donnée de la surface du bois à l'aide d'une ficelle (flèche).

Une séquence plus longue de mesures (72 heures) a également été réalisée au niveau de zones blanches observées à la surface des bois coulés (Fig. 21). Ces zones rappelaient celles qui sont formées par des colonies de protistes ciliés spécifiques des milieux soufrés de mangrove, vivant en ectosymbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes (Bauer-Nebelsick *et al.*, 2006a, b ; Rinke *et al.*, 2006). L'objectif de cette séquence de mesures était de caractériser les conditions chimiques de l'habitat de ces organismes.

Pour la réalisation de cette séquence de mesures, les électrodes de sulfures et de pH ont exceptionnellement été séparées et placées sur deux zones blanches distinctes, distantes de quelques centimètres (Fig. 21b). Cette précaution a été prise afin d'éviter de perturber trop fortement le micro-environnement, en y plaçant deux électrodes. En plus du couple

d'électrodes pH / sulfures positionné sur le bois, une électrode de sulfure supplémentaire, a été placée dans l'eau, à quelques centimètres du bois, comme témoin.

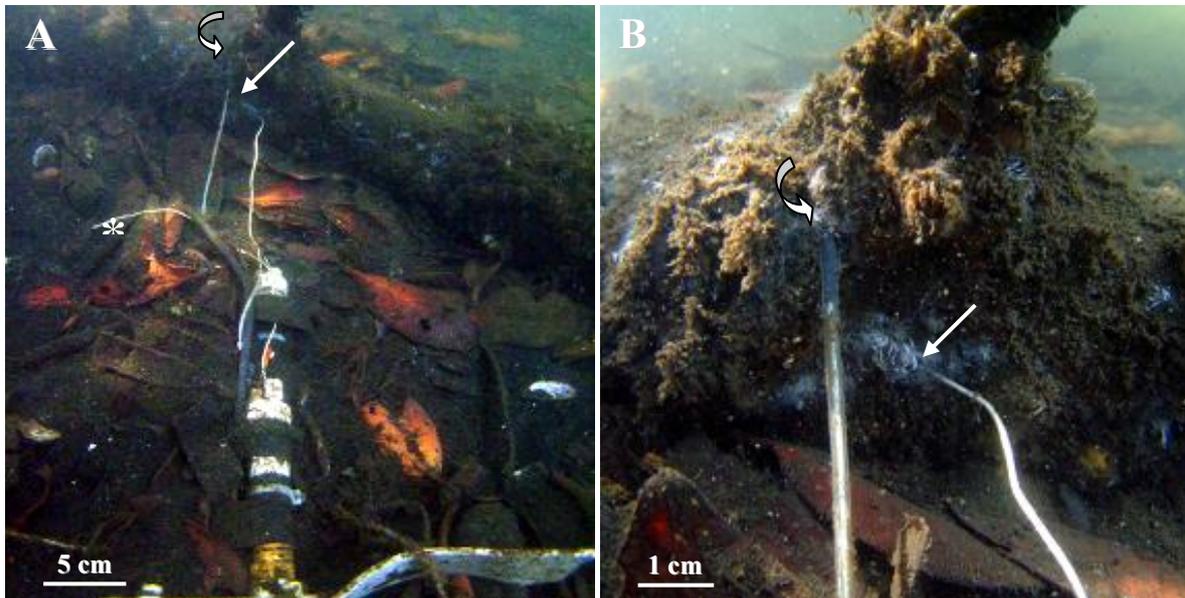


Figure 21 : Installation des capteurs autonomes pour le suivi chimique d'un bois coulé de mangrove durant 3 jours. A : Des électrodes de pH (flèche rectiligne) et de sulfures (flèche incurvée) ont été placées à la surface du bois, tandis qu'une autre électrode de sulfures (astérisque) baigne dans l'eau de mangrove à quelques centimètres du bois. B : Gros plan sur les électrodes de pH (flèche rectiligne) et de sulfures (flèche incurvée) placées précisément au niveau de deux zones blanches à la surface du bois, distantes de quelques centimètres.

1.4 Analyse des données

Les enregistrements ont été récupérés à la fin de chaque série de mesures, à l'aide du crayon électronique, et visualisés sur le logiciel Winmemo. Les calculs permettant d'établir les valeurs de pH et de concentration totale en sulfures libres ont été réalisés par N. Le Bris, à partir de ces enregistrements. Le pH du milieu a été calculé sur la base des calibrations des capteurs de pH et de la réponse de l'électrode. Les calculs de concentration en sulfures nécessitent la prise en compte non seulement des calibrations, mais également des valeurs de pH du milieu et des constantes d'acidité de H_2S pour accéder à la concentration totale de sulfures libres dans le milieu ($[H_2S] + [HS^-]$). Les valeurs utilisées sont celles reportées par Rickard et Luther (2007).

Les graphes obtenus à partir des calibrations des capteurs de sulfures illustrent la relation entre la réponse du capteur et les concentrations en sulfures (Fig. 22). Ils révèlent la linéarité des réponses des capteurs sur une plage de potentiels électriques inférieurs à -0,5 V,

tandis que pour des potentiels supérieurs à $-0,5$ V, la réponse présente une nette courbure. La linéarité de la réponse et les pentes observées sont en accord avec le fonctionnement théorique de ces électrodes.

La courbure observée est caractéristique de la réponse des électrodes à des pH basiques pour les basses concentrations en sulfures. Des calibrations témoins pour lesquelles un pH acide était maintenu tout au long de la calibration, ont montré que la gamme de linéarité s'étendait sur une gamme de potentiels nettement plus large dans ces conditions (Fig. 22b). Cette observation justifie le choix qui a été fait, d'extrapoler les parties linéaires des calibrations aux faibles concentrations.

Ces calibrations révèlent une relative stabilité de la réponse de l'électrode au cours du temps. Les variations de pente et de potentiel d'électrode restent cependant significatives. L'incertitude sur les résultats qui en résultent est importante, du fait de la réponse logarithmique de l'électrode. Les mesures présentées doivent donc être considérées comme semi-quantitatives. Les performances des électrodes sont cependant suffisantes pour suivre les variations très importantes observées dans cette étude.

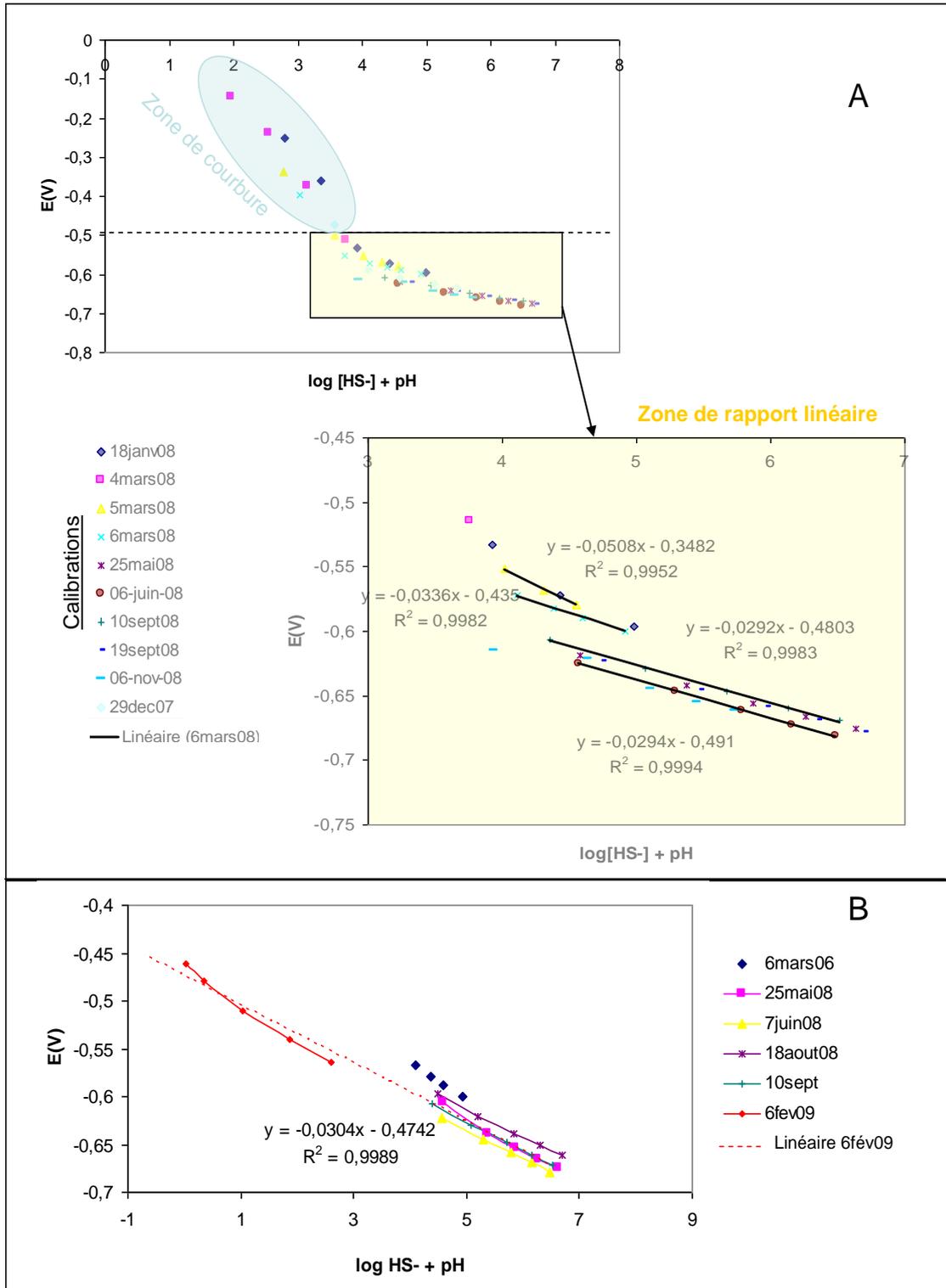


Figure 22 : Graphiques exposant la réponse des capteurs aux concentrations en sulfures.

A : La réponse linéaire des capteurs (zone jaune sur les deux graphiques) est restreinte aux potentiels inférieurs à -0,5 V. Au-delà, les réponses présentent une courbure (zone bleue). **B** : Le maintien d'un pH acide au cours des calibrations (courbe rouge) permet d'étendre la linéarité de la réponse des capteurs. **E(V)** : Potentiel électrique exprimé en Volts ; **R²** : coefficient de corrélation. La formule **log [HS⁻] + pH** reflète la double influence du pH et de la concentration en HS⁻ sur la réponse des capteurs.

2 Résultats

2.1 Les séquences courtes d'enregistrements

Aucune trace de sulfure n'a été détectée dans l'eau de mangrove, alors que les concentrations mesurées dans les sédiments peuvent atteindre la millimole par litre. Ces concentrations varient considérablement dans les premiers centimètres de sédiment. Les mesures réalisées à la surface des débris végétaux révèlent également des teneurs élevées en sulfures (Tab. 7).

Les enregistrements des signaux des capteurs ont mis en évidence un changement rapide de potentiel électrique au moment du déplacement des électrodes de l'eau de mangrove vers la surface du bois (Fig. 23), indiquant une modification significative des conditions chimiques au contact du bois. Les potentiels électriques varient inversement avec les valeurs de pH et de concentration en sulfures. La diminution du potentiel du capteur de sulfures révèle une augmentation brutale de la concentration en sulfures à la surface du bois, tandis que l'augmentation du potentiel du capteur de pH indique une diminution du pH du milieu. La concentration en H₂S libre calculée atteint $114 \pm 19 \mu\text{M}$ (Tab. 7), tandis que les sulfures sont indétectables dans l'eau environnante. Cet enrichissement en sulfures au niveau du bois est corrélé à une diminution du pH, de 8 dans l'eau de mangrove à $7,5 \pm 0,05$ à la surface du bois. D'après les potentiels enregistrés, les niveaux de sulfures sur le bois restent stables sur toute la période d'enregistrement, soit environ 10 min.

Environnements	Concentrations en H₂S (μM)	pH
Eau de mangrove (n = 4)	< 0,1	7,86 – 7,99
Sédiment de mangrove < 5 cm (n = 7)	<0,1 - 375	nd
Sédiment de mangrove 20-35 cm (n = 4)	71 - 850	7,33 – 7,78
Surface du bois (n = 8)	< 0,1 - 114	7,42 – 7,92

n : nombre de répliqués ; nd : non déterminé

Tableau 7 : Valeurs de concentration en sulfure d'hydrogène et de pH obtenues dans l'eau de mangrove, l'eau interstitielle du sédiment, et à la surface du bois.

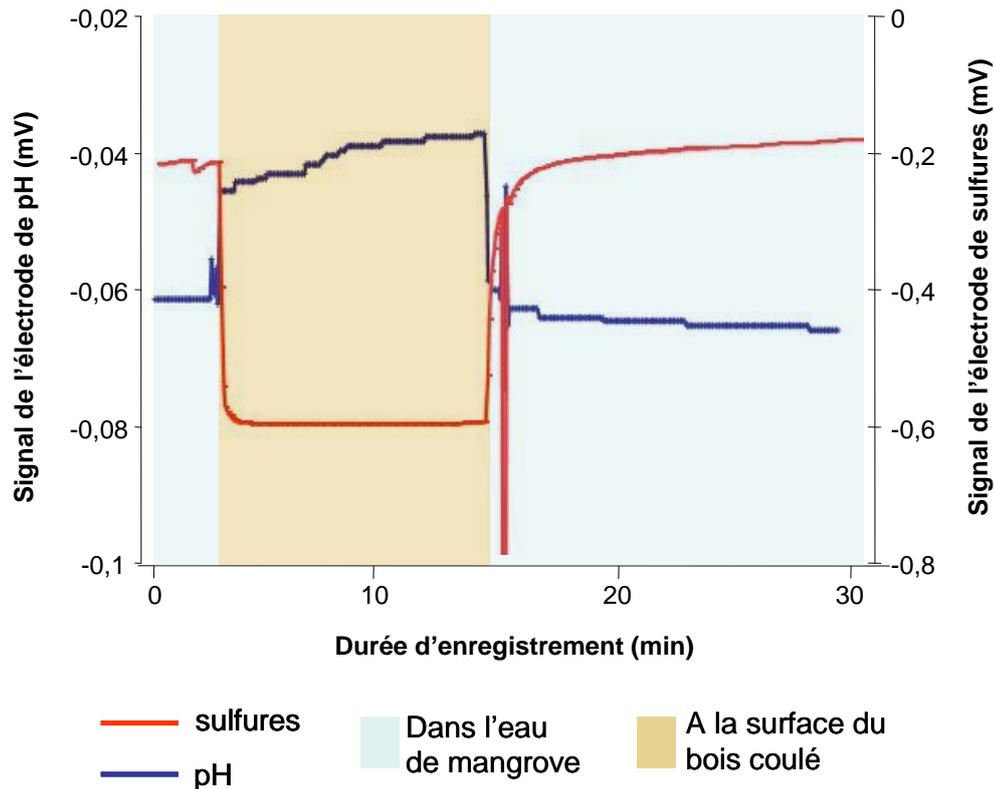


Figure 23 : Evolution des signaux (en mV) des capteurs de sulfures et de pH, enregistrés dans l'eau de mer, et à la surface d'un bois coulé, lors d'une séquence de plusieurs dizaines de minutes.

2.2 La séquence longue d'enregistrements

Les enregistrements réalisés sur une durée de 72 heures, révèlent une variabilité importante des teneurs en sulfures et des valeurs de pH à la surface du bois (Fig. 24). Les concentrations en H_2S fluctuent de niveaux indétectables à des valeurs maximales proches de $400 \mu M$. En parallèle, le pH varie de 7,1 à 7,6 unités. Les fluctuations peuvent être très rapides et de forte amplitude : la concentration en H_2S peut fluctuer de plus de $100 \mu M$ en moins d'une heure.

En plus de ces fluctuations rapides, une tendance plus lente et semi-périodique des valeurs minimales de pH et maximales de concentrations en H_2S est observable. Certaines périodes sont caractérisées par des maxima (compris entre 0 et $50 \mu M$) et sont suivies de périodes où les maxima dépassent $100 \mu M$. L'amplitude de variation des valeurs de pH est de l'ordre de 0,3 à 0,4 unités. Les concentrations en H_2S et le pH varient inversement : les concentrations sont maximales quand le pH est le plus faible, et réciproquement. La tendance

périodique observée est parfaitement corrélée aux variations de la hauteur d'eau enregistrée à Pointe-à-Pitre (SHOM⁶) pendant l'expérience (Fig. 24), révélant une influence des mouvements de marée sur les conditions chimiques des micro-environnements analysés.

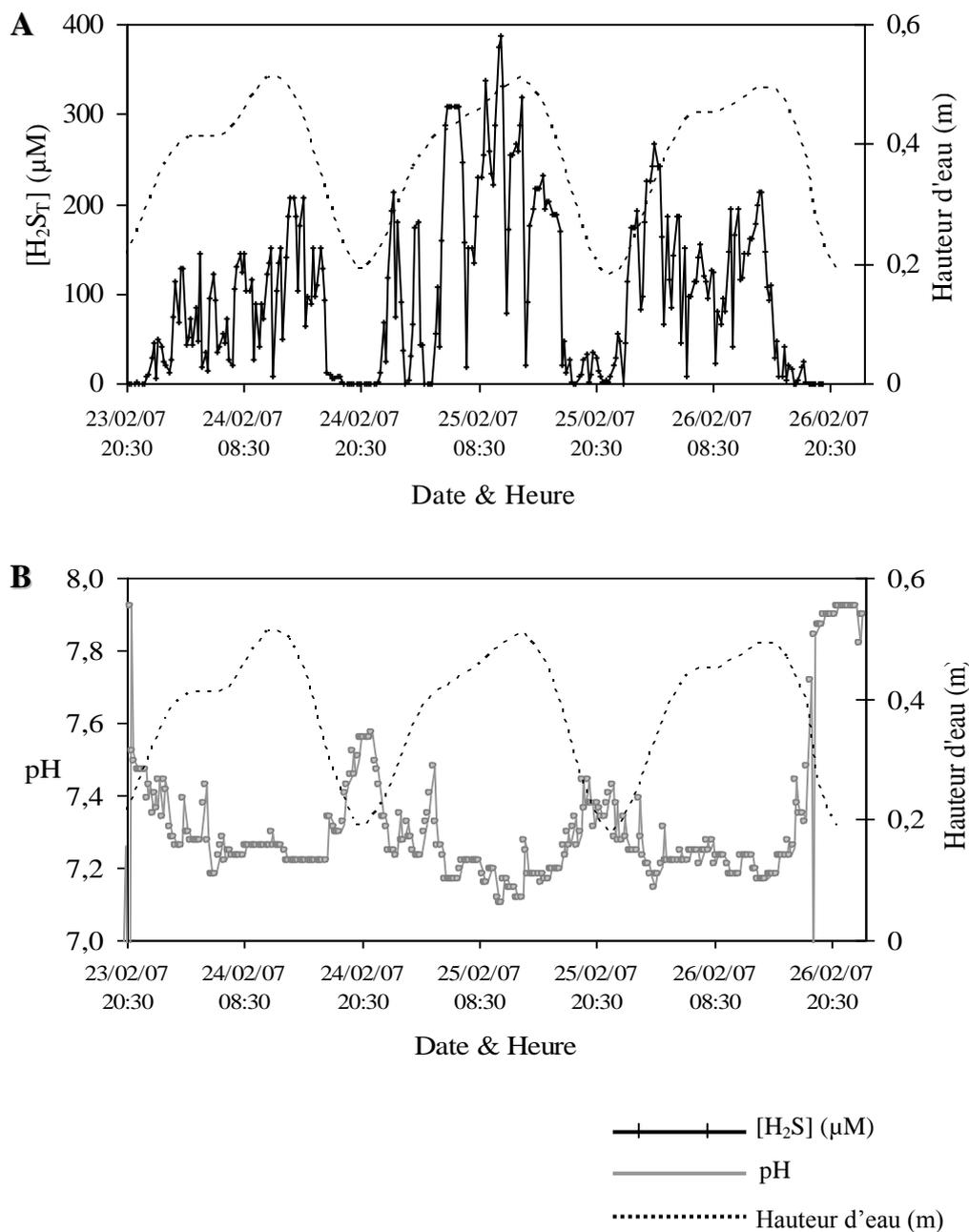


Figure 24 : Représentation graphique des variations de la concentration totale de sulfure d'hydrogène (A) et du pH (B) à la surface d'un bois coulé, en relation avec les hauteurs d'eau enregistrées à Pointe-à-Pitre pendant les 72 heures d'enregistrement.

⁶ SHOM: Service Hydrographique et Océanographique de la Marine
http://www.shom.fr/ann_marees/cgi-bin/predit_ext/choixp?opt=0&zone=2&port=POINTE-A-PITRE

3 Discussion

3.1 Des sulfures provenant du bois en dégradation

Les mesures réalisées à l'aide des capteurs électrochimiques au cours de cette étude sont les premières mesures de sulfures sur des bois coulés naturels *in situ*. Elles permettent de confirmer que des sulfures sont bien détectables à la surface des bois coulés en mangrove. Les concentrations peuvent atteindre plusieurs centaines de micromoles par litre.

Les concentrations en H₂S enregistrées dans les sédiments du site d'étude varient avec la profondeur dans le sédiment, comme indiqué par une précédente étude sur un site de mangrove en Guadeloupe (Lallier-Vergès *et al.*, 1998). Les concentrations maximales calculées sont d'environ 800 µM à plus de 20 cm dans le sédiment. Ces concentrations sont du même ordre de grandeur que celles mesurées dans la mangrove des îles Twin Cays au Belize, atteignant 1,4 mM (Ott *et al.*, 1998).

Les bois coulés naturels analysés au cours de cette étude étaient posés sur le sédiment. Cependant il est possible d'affirmer que les sulfures mesurés à la surface du bois ne résultent pas d'une contamination par le sédiment environnant. En effet, des mesures effectuées dans l'eau autour des bois coulés révèlent que les sulfures y restent inférieurs à la limite de détection. Il n'y aurait donc pas de diffusion de sulfures des sédiments vers la surface des bois. D'après les enregistrements, les sulfures ne sont plus détectables à seulement quelques millimètres de la surface du bois, ce qui reflète les taux d'émission faibles et l'oxydation rapide par l'oxygène dissout dans l'eau (Cline et Richards, 1969; Millero *et al.*, 1987). En conséquence seule l'interface bois-eau présente un enrichissement en sulfures.

Lors de la réalisation des mesures aucune accumulation de sédiment au niveau des zones analysées n'a été observée. Cependant il ne peut pas être exclu que les sulfures détectés soient le résultat de la dégradation de débris organiques présents à la surface du bois. Des mesures complémentaires à l'intérieur même du substrat restent nécessaires pour vérifier que l'enrichissement en sulfures détecté à la surface du bois résulte bien d'un processus se déroulant au niveau du bois lui-même.

Le mécanisme conduisant à la production de sulfures à partir du bois est mal connu. Cependant l'hypothèse admise jusqu'ici est celle de l'activité des BSR. Une étude récente de Fors *et al.* (2008) suggère que la dégradation microbienne du bois génère des conditions anoxiques favorables au développement de bactéries sulfato-réductrices (BSR), de manière similaire à ce qui est observé dans les milieux enrichis en matière organique (Hargrave *et al.*,

2008) où le processus de réduction des sulfates en sulfures est favorisé (Westrich et Berner, 1979). La différence importante de pH entre l'eau de mangrove (8) et la surface du bois (7,3 à 7,6) est également en accord avec l'hypothèse d'une modification des conditions chimiques locales par une attaque bactérienne. De plus les travaux de Leschine (1995) réalisés en laboratoire, précisent que la dégradation de la cellulose du bois plus précisément provoquerait les émissions de sulfures au niveau des bois coulés (Fig. 25).

Il existe une variabilité spatiale des enrichissements de sulfures sur un même débris de bois. Certaines zones seraient plus favorables au développement des BSR, probablement par l'établissement de conditions anoxiques par des apports limités d'oxygène (zones confinées).

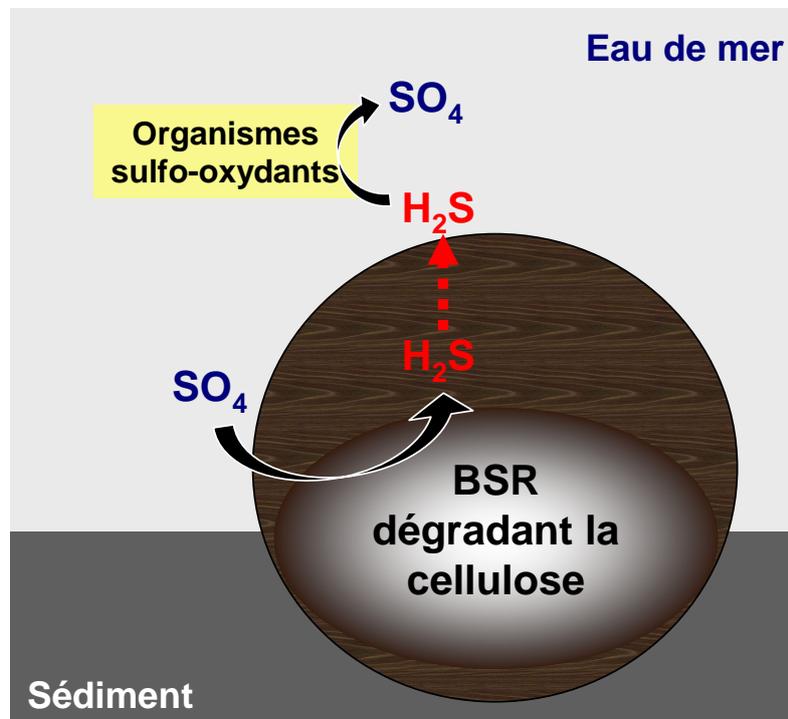


Figure 25 : Représentation schématique du processus supposé d'émissions de sulfures au niveau des bois coulés.

L'eau de mer pénètre vers l'intérieur du débris de bois (représenté en coupe transversale) posé sur le sédiment marin. Les BSR se développent à l'intérieur du bois (en conditions anaérobies) et dégradent la cellulose en utilisant les sulfates de l'eau de mer comme accepteurs d'électrons. Les sulfures résultant de cette réduction des sulfates diffusent vers la surface du débris, permettant ainsi le développement d'organismes sulfo-oxydants à l'interface entre l'eau de mer et la couche d'eau enrichie en sulfures.

3.2 La variabilité temporelle des sulfures au niveau du bois

Lors des calculs de concentration en sulfure d'hydrogène pour la séquence longue de mesures, il a été admis que les conditions au niveau des deux zones blanches étaient similaires, ce qui n'est probablement pas strictement le cas. Les concentrations obtenues sur la base de cette hypothèse ne doivent donc pas être considérées comme des données très précises. Elles permettent cependant d'aborder la question de la variabilité temporelle des concentrations en sulfures.

Une des informations importantes révélée par cette étude est la variabilité des niveaux de sulfures. Ces derniers peuvent être parfaitement stables sur une échelle de temps de la dizaine de minutes, puis varier brutalement. Sur une échelle de plusieurs heures, les niveaux de sulfures sont très fortement variables. La cause des fluctuations rapides n'est pour le moment pas établie, mais plusieurs hypothèses peuvent être avancées. Selon Cline et Richards (1969) la teneur en sulfures d'un milieu varie dans le temps sur la base des processus d'oxydation biologique ou chimique (Cline et Richards, 1969). Des modifications de l'activité des BSR, ou des modifications physico-chimiques complexes de la surface du bois pourraient intervenir. Cependant l'hypothèse la plus probable pour expliquer ces variations reste la variabilité des conditions hydrodynamiques à micro-échelle, due à des phénomènes de turbulence.

Les valeurs de pH et de sulfures suivent toutes deux des fluctuations à l'échelle journalière, bien que les mesures soient totalement indépendantes. Il ne peut donc s'agir d'un artefact, ni d'un effet ponctuel. Au contraire, elles sont corrélées aux hauteurs d'eau enregistrées à Pointe-à-Pitre pendant la séquence d'enregistrement. Cela suggère une influence de la marée sur les conditions chimiques locales à la surface du bois. 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 pourrait refléter le fait que les courants soient plus forts sur le site de la Manche-à-Eau lors de la marée basse (Mantran *et al.*, 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, lors de courants forts, de l'épaisseur de la couche riche en H₂S à la base des colonies de ciliés *Zoothamnium niveum*. Cette couche réduite est remplacée par une couche oxygénée au moment des courants forts. A l'opposé quand les courants sont moins importants, la couche réduite est plus importante.

En considérant qu'un phénomène similaire à celui décrit par Vopel *et al.* (2005) se produise effectivement à la surface des bois coulés, dans ce cas, à marée basse, les courants forts seraient responsables de la chasse de l'eau enrichie en sulfures détectée à la surface du bois. De ce fait, les niveaux de sulfures diminuent, le pH augmente, et le taux d'O₂ à la surface du bois augmente également. Par contre, à marée haute, quand les courants sont moins importants, la surface du bois est peu perturbée par les mouvements d'eau, et les niveaux de sulfures atteignent leur maximum dans des conditions d'hypoxie conservées (Fig. 26).

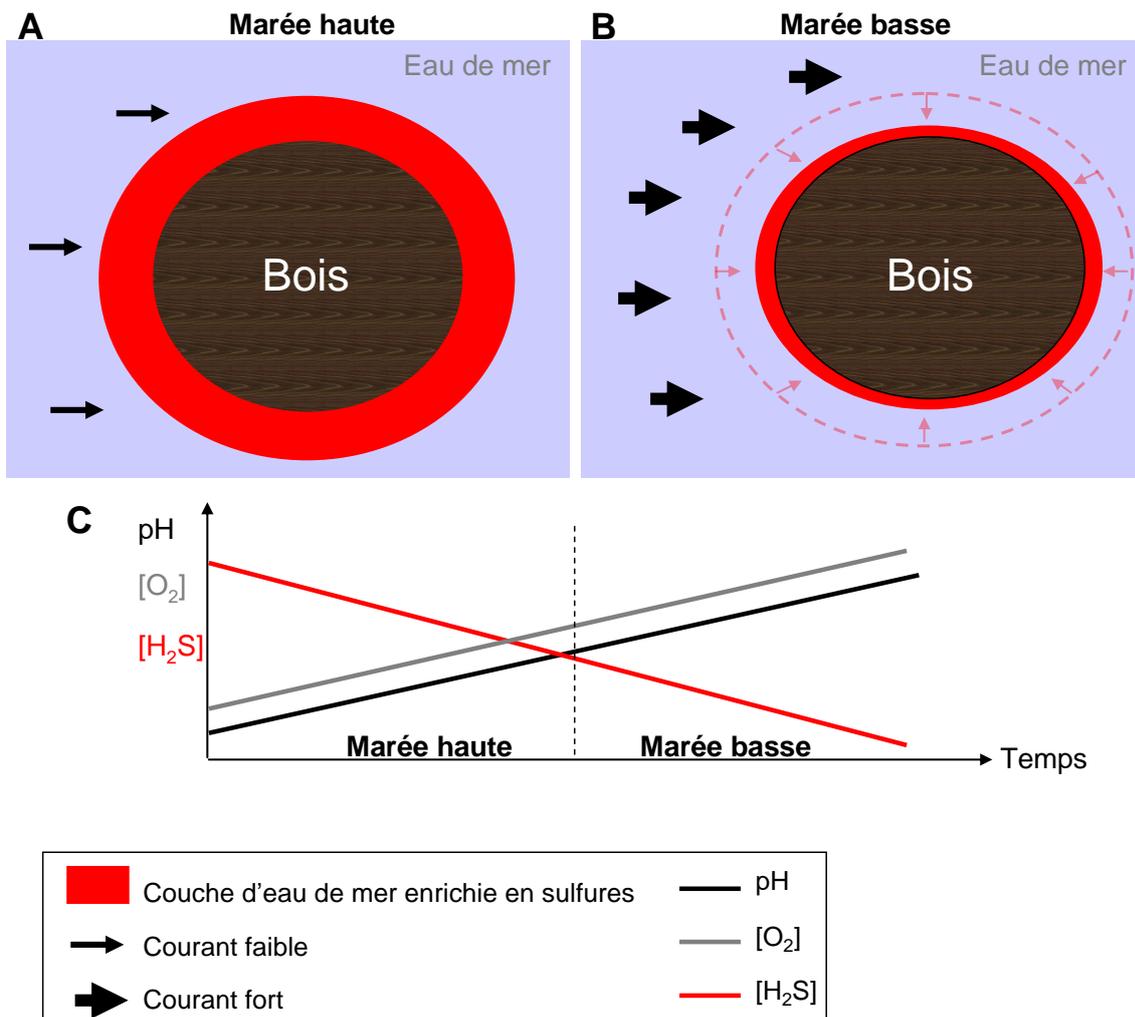


Figure 26 : Représentation schématique de l'influence tidale sur les niveaux de sulfures enregistés à la surface des bois coulés.

A : La couche d'eau enrichie en sulfures à la surface des bois coulés est peu perturbée par les courants faibles mesurables à marée haute. **B :** A marée basse les courants plus forts provoquent un effet de chasse de la couche d'eau enrichie en sulfures. **C :** A marée haute la surface des bois coulés est alors caractérisée par de fortes teneurs en sulfures, un faible pH et un faible taux d'oxygène. Au passage à la marée basse, les teneurs en sulfures diminuent tandis que le pH et la concentration en oxygène augmentent.

Les conditions d'hypoxie à la surface du bois sont donc associées à un pH faible. Le fait que le pH enregistré ne dépasse jamais le pH de l'eau de mangrove, même lorsque les sulfures ne sont pas détectables, signifie alors que les micro-environnements dans les premiers millimètres d'eau en contact avec le bois, restent constamment en condition d'hypoxie, probablement sous l'influence des processus de dégradation du bois.

Les mesures chimiques d'une durée de 72 h ont été enregistrées au niveau des zones blanches du bois, résultant de la présence de ciliés. Elles exposent donc les conditions auxquelles sont confrontés ces ciliés dans leur habitat. Cette étude est la première à révéler l'influence de la marée sur les conditions chimiques des micro-habitats des ciliés. Cependant ces conditions fluctuantes ont également été mises en évidence sur d'autres micro-environnements des bois coulés de la mangrove au cours de mesures complémentaires. Elles ne sont donc pas spécifiques des habitats des ciliés, et se combinent probablement avec les fluctuations à haute fréquence résultant de l'activité des ciliés eux-même mise en évidence par Vopel *et al.* (2001, 2002).

3.3 Des conditions chimiques similaires à celles des environnements réduits profonds

Les teneurs en sulfures mesurées à la surface du bois en mangrove sont comparables à celles mesurées dans divers milieux réduits profonds, hébergeant des symbioses thiotrophes. Bien que les valeurs de concentration en H₂S enregistrées sur le bois (plusieurs centaines de micromolaires) n'atteignent pas les dizaines de millimoles par litre observées dans les sédiments anoxiques des suintements froids (Sahling *et al.*, 2003; Arvidson *et al.*, 2004; De Beer *et al.*, 2006), elles sont comparables à celles obtenues au niveau des sources hydrothermales dans la zone de mélange des fluides et de l'eau de mer (Le Bris *et al.*, 2000; 2003; 2006a, b), soit la zone où les organismes symbiotiques se développent.

Des variations temporelles de température et de concentrations en oxygène et en sulfures, similaires à celles observées dans cette étude au niveau des bois coulés de mangrove, ont été décrites autour de sources hydrothermales profondes (Childress et Fisher, 1992 ; Luther III *et al.*, 2008). Elles sont supposées intervenir dans l'approvisionnement en sulfures et oxygène des organismes symbiotiques tels que *Riftia pachyptila* ou les moules bathymodiolines. Cette variabilité semble un pré-requis chez diverses symbioses sulfo-oxydantes pour l'accès à la fois aux donneurs et aux accepteurs d'électrons.

3.4 L'importance des mesures chimiques *in situ* dans l'approche des environnements réduits

Depuis leur mise en place, les capteurs électrochimiques ont permis la réalisation d'une multitude de mesures chimiques dans l'eau, les sédiments, les mattes microbiennes... La résolution temporelle et spatiale et l'absence d'échantillonnage préalable aux mesures sont les atouts principaux de ces capteurs (Taillefert *et al.*, 1999). Contrairement aux capteurs ampérométriques, les capteurs potentiométriques présentent l'inconvénient d'une réponse logarithmique. Cependant leurs électrodes en métal présentent l'avantage d'un déploiement possible sur des substrats durs tels que les bois coulés, contrairement aux micro-électrodes ampérométriques en verre plus délicates à utiliser sur ce type de substrats.

Les résultats de cette étude valident la pertinence de l'utilisation des capteurs pour des mesures *in situ* autonomes sur des durées de plusieurs semaines, même si l'exactitude et la précision de ces mesures restent très limitées.

Les émissions de sulfures au niveau des bois coulés ont été caractérisées pour la première fois grâce à l'utilisation de ces capteurs. La spécificité aux sulfures des capteurs déployés au cours de cette étude, permet de donner une indication de la biodisponibilité de ces sulfures dans des environnements où les métaux complexables influencent la spéciation du soufre (Le Bris *et al.*, 2008). Les résultats de cette étude démontrent que les bois coulés rassemblent toutes les caractéristiques, en terme de concentrations et de variabilité de formes biodisponibles de sulfures, permettant le développement d'organismes sulfo-oxydants.

La mise en relation de la présence de formes biodisponibles de sulfures avec le développement d'organismes peut être abordée par l'analyse de cette faune associée à la surface du bois (présentée dans le chapitre suivant).

CHAPITRE 2

ANALYSE DES CILIES DES BOIS COULES DE MANGROVE

1 Matériels et méthodes

1.1 Echantillonnage

L'échantillonnage pour ces travaux a consisté en la collecte manuelle des bois coulés sur lesquels ont été réalisées les mesures chimiques avec les capteurs autonomes *in situ* (voir II – chap. 1), ainsi que d'autres débris végétaux sur lesquels des zones blanches ont été observées (feuilles, graines de palétuvier, brindilles...) [Fig. 27].

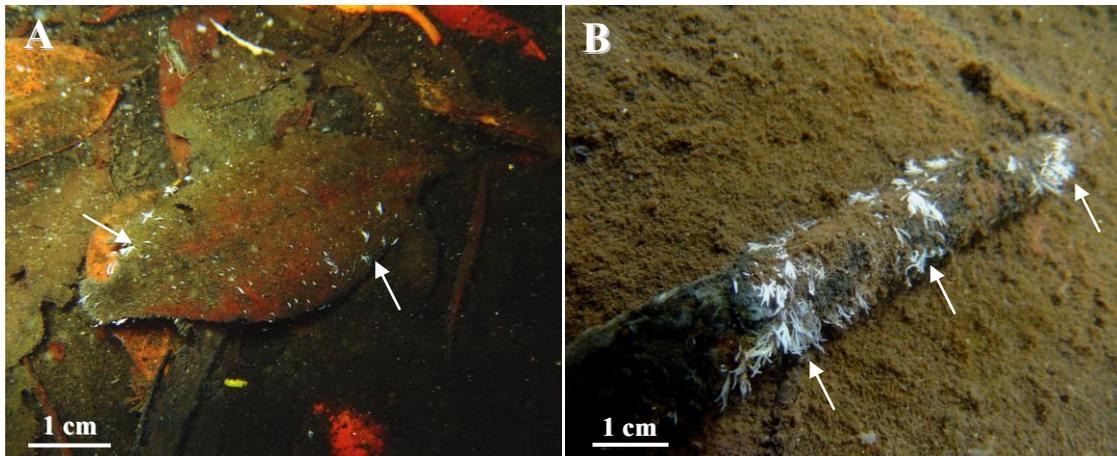


Figure 27 : Photos de débris végétaux présentant des zones blanches (flèches), posés sur le sédiment de mangrove. A : tas de feuilles de palétuviers ; B : graine de palétuvier.

Dès leur sortie de l'eau, ils étaient plongés dans un bac rempli d'eau de mer prélevée sur le site, en attendant d'être traités dès l'arrivée au laboratoire. Les observations des zones blanches à la loupe binoculaire ont permis de vérifier qu'elles résultaient bien de la présence de protistes ciliés.

Ces derniers ont alors été collectés afin de procéder aux préparations pour les observations en microscopie électronique (MEB et MET), mais également aux techniques d'hybridations *in situ*, et aux analyses phylogénétiques. Afin de réaliser les observations ultrastructurales en MET et les hybridations *in situ* sur le même échantillon, la résine LRWhite a été choisie pour les inclusions. Elle est en effet adaptée à ces deux types de travaux (Gros et Maurin, 2008).

1.2 Microscopie électronique à balayage

Les ciliés, détachés du substrat végétal ou prélevés avec un bout de tissu végétal, ont été fixés 2 heures à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde à 2 % en tampon cacodylate à pH 7,2 dont l'osmolarité a été ajustée à 900 mOsm. Ils ont ensuite été déshydratés par des bains successifs de 10 minutes dans des solutions d'acétone de concentration croissante : 30°, 50°, 70°, 95° et deux à 100°. La déshydratation à l'acétone a été complétée par une dessiccation au point critique atteint vers 32 °C et 80 bars (appareil Biorad, Polaron). Les échantillons déshydratés ont ensuite été déposés sur des stubs recouverts d'un autocollant double-face en carbone, puis métallisés à l'or (métalliseur Sputter Coater SC500, Biorad) afin de les rendre conducteurs avant l'observation au microscope électronique à balayage Hitachi S 2500 à 20 kV.

1.3 Microscopie électronique à transmission

Les échantillons choisis pour les observations en MET ont été fixés 1 à 3 heures à 4 °C dans une solution de paraformaldéhyde 4 % dans de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm. Ils ont ensuite été rincés à l'eau de mer pendant 10 min trois fois de suite, puis déshydratés par bains successifs de 10 min dans de l'éthanol à 30°, 50°, 70°, 90° et trois fois dans de l'éthanol 100°. Leur inclusion dans de la résine LRWhite (Biovalley Inc.) a été réalisée selon le protocole établi par Gros et Maurin (2008). Après trois bains d'imprégnation de 2 h, puis un bain d'environ 12 h à température ambiante dans la résine LRWhite, les échantillons ont été plongés et orientés (en utilisant la loupe binoculaire) dans un tube plein de résine pour la polymérisation. L'absence d'oxygène améliorant la polymérisation, les tubes ont été placés, pendant 48 h à 37 °C, dans une boîte à gants dont l'atmosphère était saturée en argon. A la fin des 48 h les blocs de résine ont été démoulés et des coupes fines de 60 nm d'épaisseur réalisées à l'aide d'un ultramicrotome Ultracut E (Reichert). Les coupes récupérées sur des

grilles cuivre-rhodium de 100 mesh, ont été contrastées 30 minutes à l'acétate d'uranyle 2 % puis 10 minutes au citrate de plomb (Reynold, 1963), et enfin observées avec un microscope électronique à transmission Leo 912 sous une tension d'accélération de 80 kV.

1.4 Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques basées sur les séquences des gènes de la sous-unité 18S de l'ARNr des ciliés formant les zones blanches, ainsi que les analyses des séquences des gènes de la sous-unité 16S de l'ARNr et de la sous-unité A de l'Adénosine-5'-phosphosulfate réductase/oxydase de bactéries associées à un de ces ciliés, ont été réalisées par F. Muller, selon le protocole suivant.

Les ciliés observés à la loupe binoculaires à la surface des débris végétaux, ont été coupés au niveau de leur pédoncule, en évitant la partie la plus basale, comme proposé par Rinke *et al.* (2009). En effet, la perte des symbiotes sur la partie basale du pédoncule du cilié *Zoothamnium niveum* entraîne une recolonisation par des bactéries et diatomées diverses au moment de la phase dite de dégénérescence de ce cilié (Ott *et al.*, 1998 ; Ott et Bright, 2004). Cette précaution permet alors d'éviter une contamination des échantillons par des bactéries autres que d'éventuelles bactéries symbiotiques. Les ciliés ainsi coupés, ont été plongés dans de l'éthanol 100° avant de réaliser les extractions d'ADN avec le kit Blood & Tissue® de Qiagen (Cat. No 69504), et l'amplification avec le kit d'ADN polymérase GoTaq® Flexi de Promega (Cat. No M8306), selon les protocoles proposés par les fabricants respectifs. Les PCR (Polymerase Chain Reaction) ont été réalisées sur un thermocycleur GeneAmp® 2700 (Applied Biosystems) selon les conditions indiquées dans le tableau 8.

Température (°C)	Durée (secondes)	Phase	Nombre de cycles
94	180	Dénaturation	1
94	30	Dénaturation	10
65 à 52	30	Polymérisation	
72	60	Elongation	
94	30	Dénaturation	25
52	30	Polymérisation	
72	60	Elongation	
72	300	Elongation	1

Tableau 8 : Protocole de PCR utilisé pour l'analyse phylogénique (F. Muller).

Trois couples d'amorces ont permis l'amplification des séquences de la sous-unité 18S de l'ARNr des ciliés, la sous-unité 16S de l'ARNr et du gène codant pour l'APS reductase / oxydase des bactéries (Tab. 9).

Amorce	Séquence (5'-3')	ARNr cible
18S1F	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG	ARNr 18S des ciliés
18S9R	GATCCTTCCGCAGGTTACCTAC	ARNr 18S des ciliés
8F	GGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG	ARNr 16S des bactéries
907R	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	ARNr 16S des bactéries
AprA-1-FW	TGGCAGATCATGATYMA YGG	AprA des bactéries
AprA-5-RV	GCGCCAACYGGRCCRTA	AprA des bactéries

M = C :A. ; Y =C :T ; R = A :G

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'amplification des séquences de la sous-unité 18S de l'ARNr des ciliés, la sous-unité 16S de l'ARNr des bactéries et du gène de l'APS reductase / oxydase (AprA) des bactéries.

Les produits des réactions de PCR ont été directement séquencés par GATC Biotech⁷. Les séquences obtenues ont été comparées avec les bases de données RDP (Ribosomal Database Project) et NCBI⁸ avec BLAST, et alignées avec CLUSTALX 2.0.8, puis manuellement. Les arbres phylogénétiques ont été réalisés selon les méthodes de maximum de vraisemblance (PhyML) et bayésienne (MrBayes), et l'évaluation de la robustesse des nœuds respectivement par 1000 répliquats bootstrap et 4 chaînes Markov de 1000000 générations.

Une sonde oligonucléotidique spécifique de l'ARNr 16S des bactéries associées à un type de cilié a été mise en place afin de valider les résultats phylogénétiques par des hybridations *in situ*.

1.5 Hybridations *in situ*

Une partie des hybridations a été réalisée sur des coupes de 1 µm d'épaisseur, obtenues à partir des mêmes blocs de résine LRWhite que ceux utilisés pour les coupes fines de la MET. Afin d'obtenir un signal de fluorescence suffisant malgré la finesse des coupes, la technique du CARD-FISH (CATalase Reporter Deposition and Fluorescence *In situ* Hybridization) a été choisie, plutôt que celle du FISH (Fluorescence *In situ* Hybridization) qui est moins sensible (Schönhuber *et al.*, 1997). En effet le FISH, bien que très largement utilisé,

⁷ GATC Biotech : <http://www.gatc-biotech.com> [02/08/2009]

⁸ NCBI (National center for biotechnology information) : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [02/08/2009]

présente une efficacité limitée. Il ne permet de détecter que 56 % des cibles présentes dans le tissu (Bouvier et Del Giorgio, 2003). Sur des coupes fines où les molécules cibles sont peu nombreuses, le CARD-FISH est mieux adapté. Les amorces utilisées pour le CARD-FISH portent une protéine HRP (Horseradish Peroxydase), sur laquelle peuvent se fixer plusieurs molécules de tyramide, portant le fluorochrome, alors que chaque amorce de FISH ne porte qu'un seul fluorochrome.

Le protocole de CARD-FISH suivi est celui proposé par Pernthaler *et al.* (2002). Avant de procéder aux hybridations, les tissus des coupes sont réhydratés par des bains d'alcool à concentration décroissante, puis en eau distillée. Les membranes sont perméabilisées par les actions successives des solutions de HCl (0,2 M à température ambiante), de tampon Tris-HCl (20 mM à température ambiante), puis de Protéinase K (0,5 µg/mL à 37 °C). Les peroxydases endogènes au tissu sont inhibées par du HCl 0,01 M et du PBS (Phosphate Buffered Saline) 1x. L'application de lysozyme sur les tissus (en chambre d'incubation à température ambiante pendant 1 heure) permet de compléter la perméabilisation des membranes des bactéries. Après un lavage à l'eau distillée puis un à l'éthanol 95 %, les amorces (0,5 ng/µl dans du tampon d'hybridation à 50 % de formamide) sont déposées sur les coupes. Les incubations à 46 °C pendant 2 à 3 heures sont suivies de lavages au tampon de lavage puis au PBS afin d'éliminer les amorces non hybridées. La dernière étape est l'étape d'amplification : les lames sont recouvertes d'une solution d'amplification contenant le colorant fluorescent : la fluorescéine thiocyanate-5 (FITC), et mises à incuber à 37 °C pendant 10 à 15 minutes avant d'être lavées au PBS, à l'eau distillée et à l'éthanol 95 %. Une goutte de milieu de montage fluorescent est déposée sur chaque lame avant de poser les lamelles pour l'observation au microscope à épifluorescence epi 80i (Nikon, France). L'excitation des fluorochromes est réalisée à une longueur d'onde de 494 nm provoquant une émission à 518 nm. Ce type d'hybridation a été réalisé avec l'amorce universelle eubactérienne EUB 338 (5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') (Sekar *et al.* 2004).

Les hybridations avec la sonde ARNr 16S spécifique aux bactéries associées à un des types de ciliés, mise en place par F. Muller (5'-CGTCATCATCTTCCCAACTGAAAG-3'), ont été réalisées sur des organismes entiers, sans inclusion préalable. Les ciliés ont été déshydratés en éthanol 30°, 50° et 70°, puis traités selon la technique du FISH comme préconisé par Rinke *et al.* (2006). La technique du FISH était adaptée au type d'amorce disponible. Etant, comme indiqué plus haut, moins sensible que le CARD-FISH, des hybridations sur organismes entiers plutôt que sur coupes ont été choisies.

2 Résultats

2.1 Observations microscopiques et hybridations

Les zones blanches observées à la surface des bois coulés (Fig. 28a) étaient formées de deux types de protistes ciliés sessiles (Fig. 28b) : un cilié colonial dont la longueur varie entre 3 et 6 mm, en forme de plume, probablement de la famille des Zoothamniidae, et un cilié solitaire de plus petite taille (0,5 mm), en forme de cloche, morphologiquement proche des Vorticellidae, tous deux d'une couleur blanche en lumière incidente.

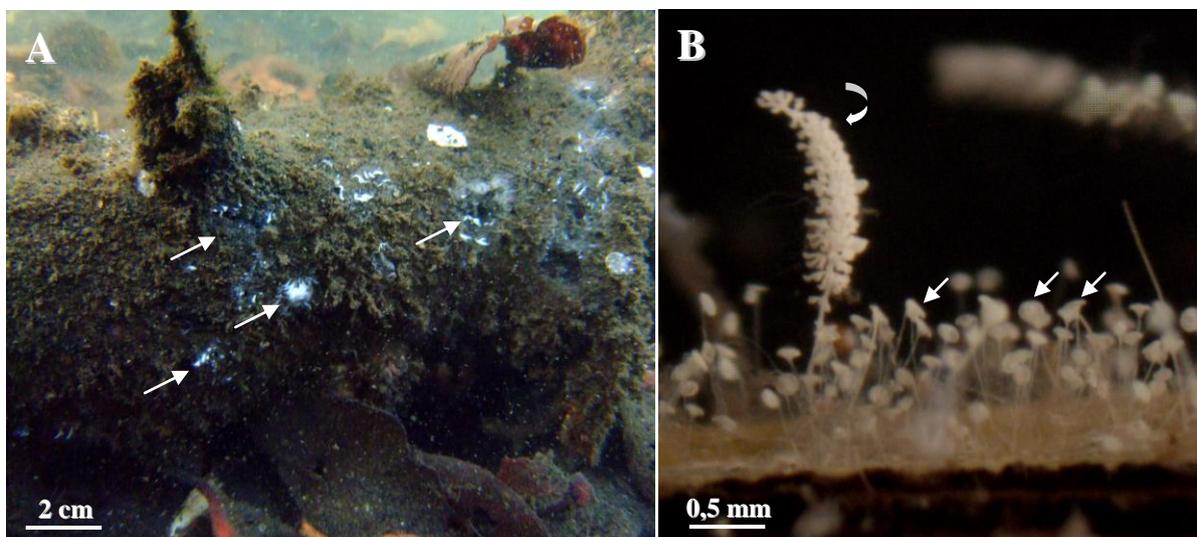


Figure 28 : Photographies des zones blanches observées à la surface des bois coulés. A : observation *in situ* d'un bois coulé, posé sur le fond vaseux de mangrove, présentant plusieurs zones blanches à sa surface (flèches). B : Observation d'une zone blanche à la loupe binoculaire révélant la présence de protistes ciliés sessiles, coloniaux (flèche incurvée) et solitaires (flèches rectillignes).

Le cilié colonial est formé d'un long stolon central à partir duquel se développent des branches en position alternée, portant des zoïdes agencés également en position alternée sur ces branches (Fig. 29a). Les zoïdes des ciliés sessiles correspondent au corps cellulaire proprement dit, soit les « clochettes » sans les branches et le stolon. L'ensemble de la colonie peut se rétracter, le stolon adoptant alors une forme en zigzag (Fig. 29b). Sur la base de ces caractères, il semblerait que ce cilié appartienne à la famille des Zoothamniidae (Sommer, 1951) dans la classe des péritriches sessiles.

Les observations en MEB ont permis de mettre en évidence l'association de cet organisme avec des bactéries couvrant l'ensemble de ses zoïdes ainsi que son stolon (Fig. 29c), excepté le disque adhésif. Les bactéries présentent une transition de forme en

bâtonnets à des formes plus coccoïdes, de la partie basale vers la partie apicale de chaque microzoïde (Fig. 29d), tandis qu'elles conservent une forme en bâtonnet sur le stolon et les autres types de zoïdes.

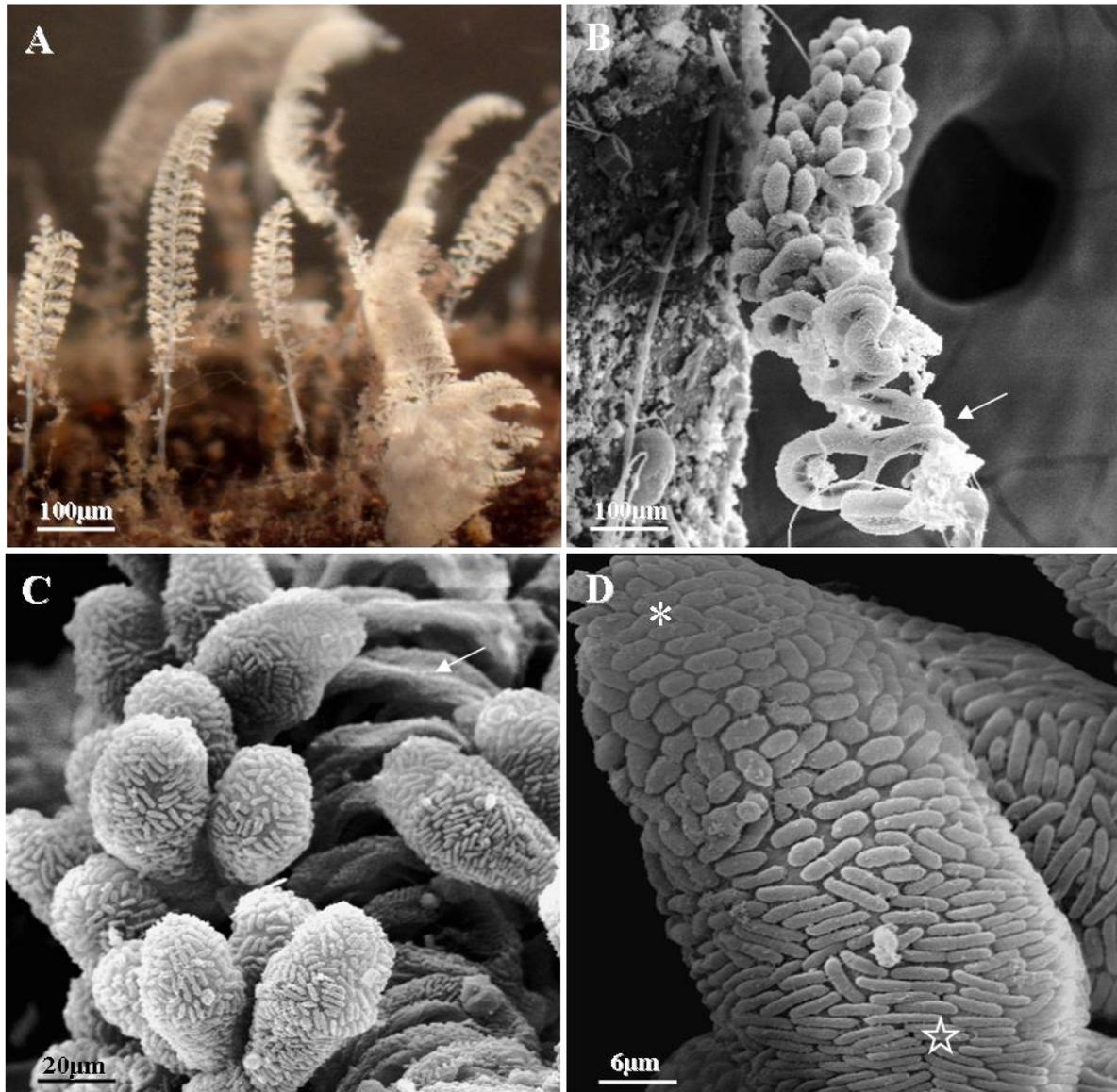


Figure 29 : Observations du cilié colonial à la loupe binoculaire (A) et au MEB (B-D). A : Colonies blanches de ciliés coloniaux, fixées à la surface du bois. B : Colonie rétractée du cilié avec le stolon replié en zigzag (flèche). C : Vue rapprochée du stolon (flèche) et des zoïdes, tous deux couverts de bactéries. D : Les bactéries, agencées en monocouche à la surface des microzoïdes, présentent une transition de forme en bâtonnet dans la partie basale (étoile) vers une forme plus coccoïdale dans la partie apicale du zoïde (astérisque).

Le cilié solitaire est en forme de cloche, portée par un long stolon (Fig. 30b). Lorsqu'il se rétracte le cilié change d'aspect général : le stolon s'enroule sur lui-même en spirale et le

zoïde se referme, adoptant alors une forme beaucoup plus arrondie (Fig. 30a). Ces caractères placent cet organisme dans la famille des Vorticellidae, au sein de la classe des pérित्रiches sessiles. Un manteau bactérien recouvre également l'ensemble de ce cilié, hormis le disque adhésif et la partie la plus basale du stolon (Figs. 30a-b). Les bactéries en bâtonnets, d'environ 1,5 μm de long, sont organisées en couche unique à la surface de l'organisme (Fig. 30c). Dans certains cas des bactéries filamenteuses ont été observées, fixées par une extrémité, au niveau de la partie basale du stolon (Fig. 30d).

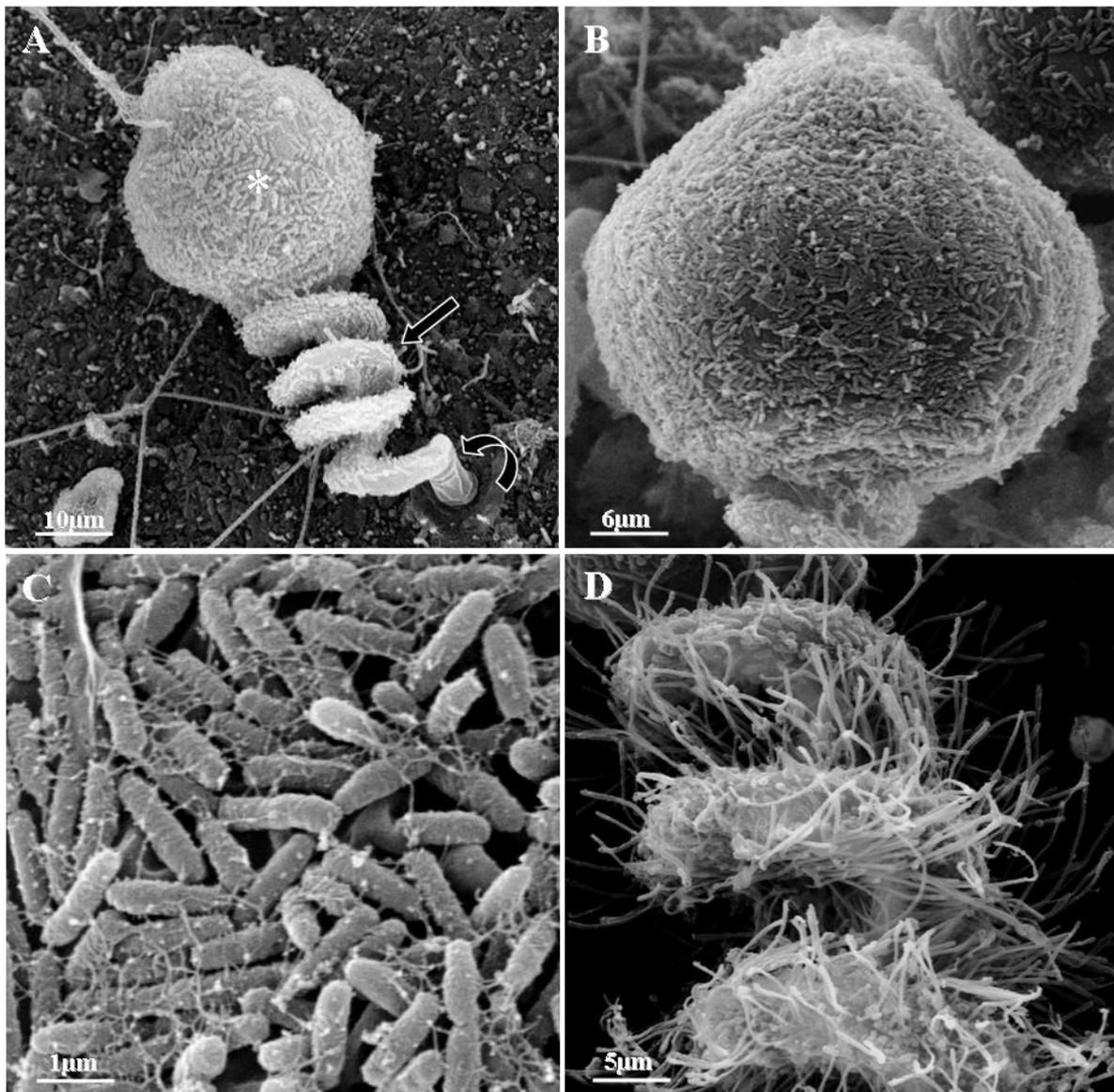


Figure 30 : Micrographies du cilié solitaire des bois coulés, observé en MEB. A : Un individu rétracté, avec le zoïde en boule (astérisque) et le stolon rétracté en spirale (flèche rectiligne), tous deux recouverts de bactéries. Seule la partie la plus basale du stolon et le disque adhésif (flèche incurvée) permettant l'accrochage du cilié à la surface du bois, sont dépourvus de bactéries. B : Le manteau bactérien couvre de manière régulière toute la surface de l'organisme en monocouche. C : Les bactéries sont en forme de bâtonnets d'environ 1,5 μm de long. D : Certains ciliés ont le stolon recouvert de bactéries filamenteuses.

Les hybridations *in situ* avec l'amorce EUB 338 permettent de confirmer l'association du cilié avec des Eubactéries. Les zones fluorescentes vertes observées avec le microscope à fluorescence (Figs. 31a-b) correspondent aux zones où l'amorce EUB 338 a hybridé, soit les zones où des eubactéries sont localisées. Ces observations sur coupe, ont permis de révéler la présence de bactéries à l'intérieur des zoïdes, au niveau des vacuoles digestives (Fig. 31b).

La MET permet de confirmer la localisation des bactéries : à la surface de l'organisme au niveau du zoïde et du stolon (Fig. 31c), mais également à l'intérieur du zoïde, enclavées dans les vacuoles digestives (Fig. 31d). Sur certaines micrographies, des bactéries donnent l'impression, d'être situées à l'intérieur du zoïde, bien qu'elles soient en réalité, localisées à sa surface. Ce phénomène est uniquement lié au plan de coupe au niveau du repli péristomial du zoïde contracté.

Les bactéries en bâtonnets observées sur toute la surface du cilié solitaire sont similaires. Elles ont une double membrane et présentent dans leur cytoplasme des zones claires aux électrons (Fig. 31e). Parmi les bactéries des vacuoles digestives, certaines sont semblables aux bactéries de surface. Les échantillons préparés pour la MET ne comportaient pas de bactéries filamenteuses similaires à celles observées en MEB.

Les hybridations réalisées avec l'amorce spécifique des bactéries associées au cilié Vorticellidae, ont été réalisées sur les ciliés Vorticellidae et Zoothamniidae des bois coulés. Des hybridations positives ont été obtenues avec le premier exclusivement. L'hybridation positive valide le fait que l'amorce mise en place provient bien des gènes des bactéries associées au Vorticellidae.

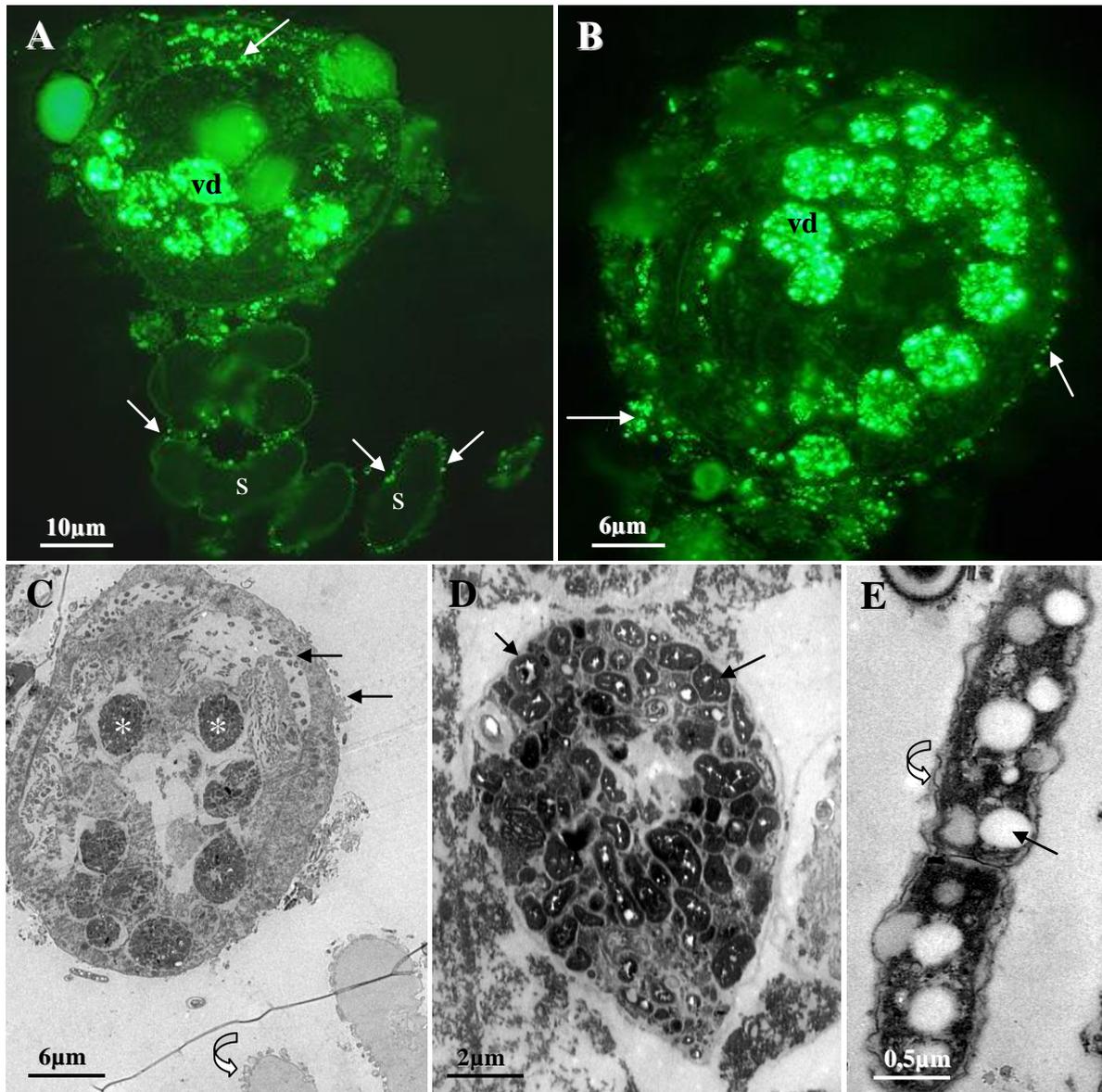


Figure 31 : Micrographies du cilié solitaire Vorticellidae des bois coulés, observé au microscope à fluorescence (A-B), et en MET (C-E). A : Coupe du cilié révélant la fluorescence verte obtenue après les hybridations *in situ* avec l'amorce EUB 338 au niveau du zoïde et à la surface du stolon spiralé (s) (flèches). B : La fluorescence est localisée à la surface du zoïde (flèches) mais également à l'intérieur, au niveau des vésicules digestives (vd). C : Coupe du cilié confirmant la présence des vacuoles digestives (astérisque) et des bactéries à la surface du zoïde (flèches rectilignes) et du stolon (flèche incurvée). D : Les vacuoles digestives contiennent de nombreuses bactéries (flèches) similaires aux bactéries recouvrant le corps de l'organisme. E : Bactérie en division, associée au zoïde du cilié. Elle comporte une double membrane (flèche incurvée) et des zones claires dans son cytoplasme (flèche rectiligne).

2.2 Analyses phylogénétiques

2.2.1 Analyses basées sur les séquences d'ARN 18S des ciliés

Pour les analyses des séquences d'ARNr 18S, des représentants du groupe des péritriches sessiles appartenant aux familles Vorticellidae, Zoothamniidae et Epistylididae ont été choisis. Le cilié *Loxodes magnus* (Karyorelictida, Loxodidae) a été utilisé comme extra-groupe pour l'enracinement de l'arbre phylogénétique obtenu (Fig. 32). Cet arbre révèle que le cilié colonial observé au niveau des zones blanches des bois coulés en Guadeloupe (*Zoothamnium* str. Guadeloupe) est très proche de *Zoothamnium niveum*. Ces groupes frères, avec d'autres représentants du genre *Zoothamnium* exclusivement, *Z. alternans*, *Z. pelagicum* et *Z. pluma*, forment un groupe monophylétique soutenu par de fortes valeurs de bootstrap.

Les représentants de la famille des Vorticellidae forment un groupe monophylétique, au sein duquel se retrouve le cilié solitaire des bois coulés. Ce dernier est très proche des représentants du genre *Pseudovorticella*, également rassemblés dans un groupe monophylétique.

2.2.2 Analyses basées sur les séquences d'ARN 16S des bactéries associées aux ciliés Vorticellidae

Pour les analyses des séquences d'ARNr 16S des bactéries associées au cilié Vorticellidae, des séquences de γ -protéobactéries sulfo-oxydantes libres, endosymbiotiques et ectosymbiotiques ont été choisies. La bactérie méthanotrophe *Methylocystis parvus* a été utilisée comme extra-groupe afin d'enraciner l'arbre. Dans l'arbre phylogénétique obtenu (Fig. 33), les bactéries associées au cilié du genre *Pseudovorticella* intègrent le groupe des γ -protéobactéries sulfo-oxydantes. Elles sont proches d'un groupe monophylétique constitué de bactéries ectosymbiotiques ou libres, dont le symbiote de *Z. niveum*.

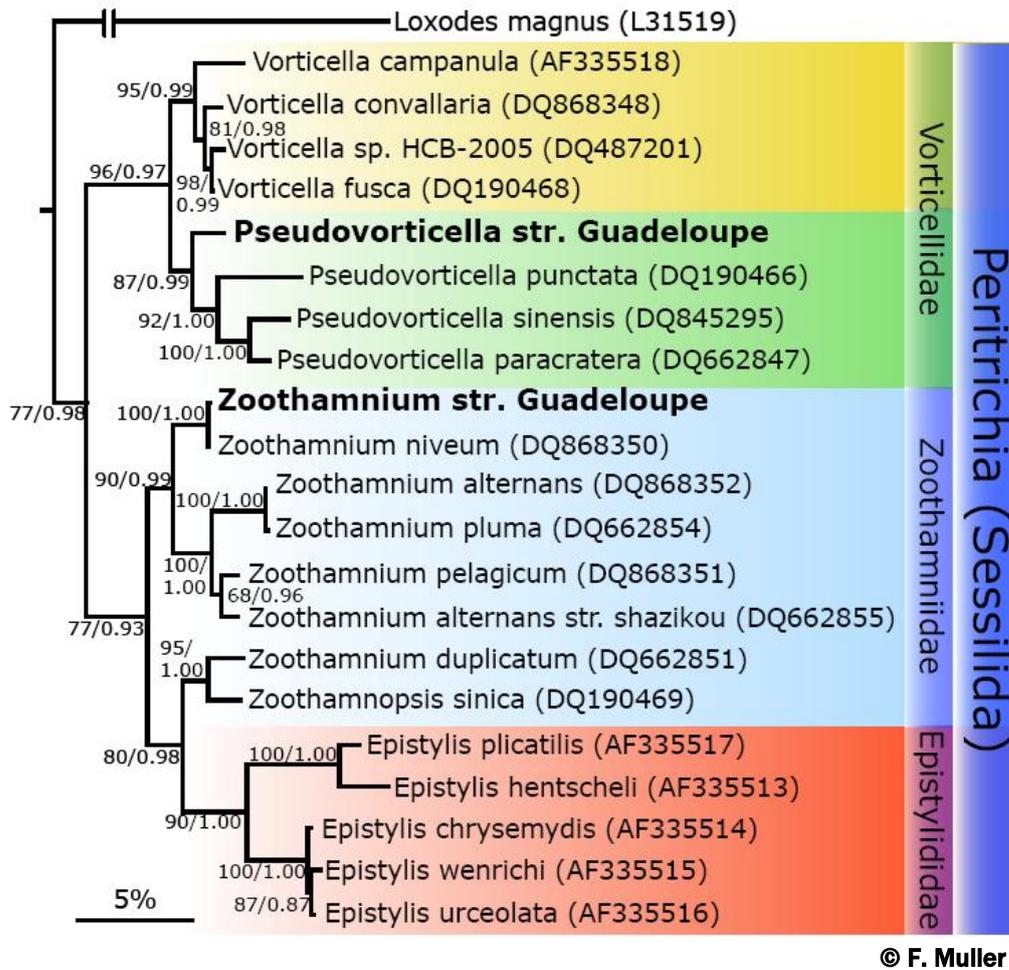


Figure 32 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène de l'ARNr 18S de 1600 nucléotides. Cet arbre expose les relations entre les deux ciliés observés sur les bois coulés de mangrove, notés *Pseudovorticella str. Guadeloupe* et *Zoothamnium str. Guadeloupe* (en gras), et d'autres ciliés péritriches. *Loxodes magnus* est utilisé comme extra-groupe. Les valeurs portées aux nœuds correspondent aux valeurs de bootstrat et de probabilités a posteriori (maximum de vraisemblance / analyse bayésienne).

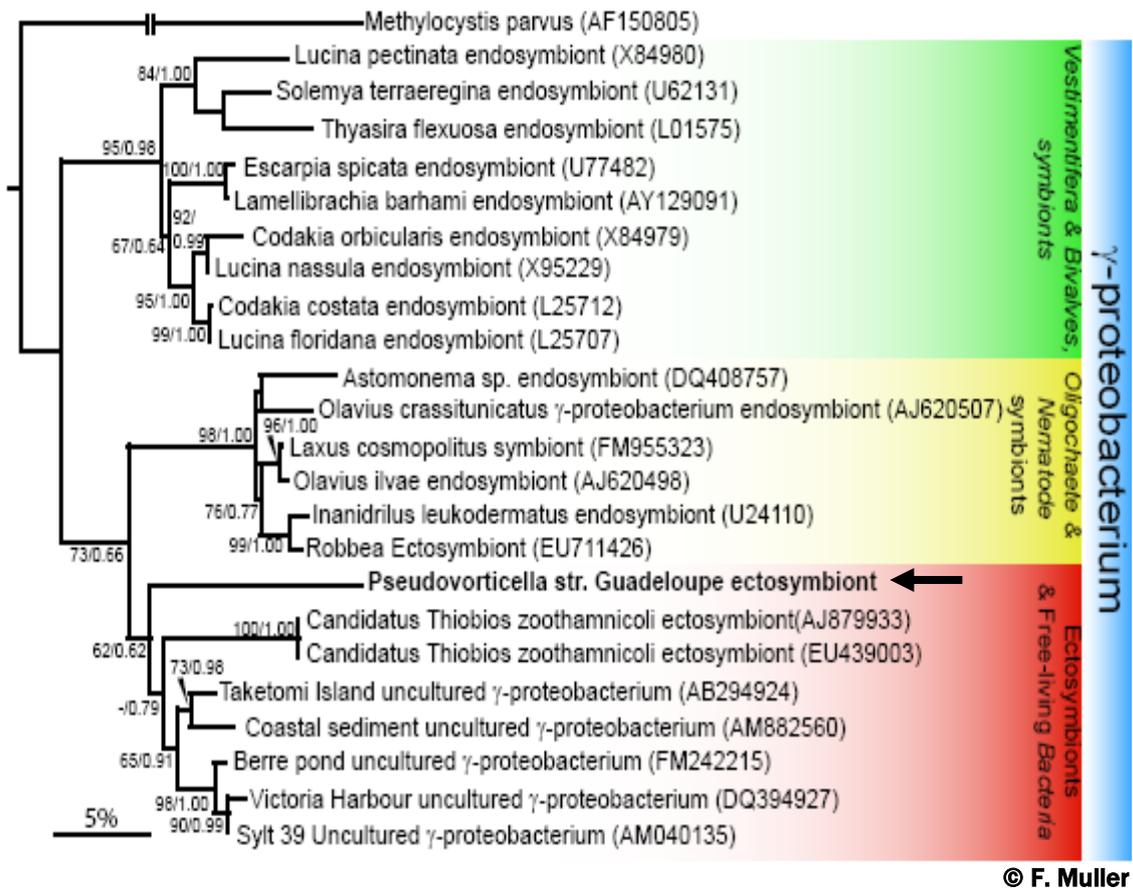


Figure 33 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARNr 16S de 800 nucléotides. Cet arbre expose les relations entre les bactéries associées au cillé du genre *Pseudovorticella* des bois coulés (flèche) avec d'autres bactéries, dont des γ -protéobactéries symbiotiques et libres. *Methylocystis parvus* a été utilisé comme extra-groupe. Les valeurs notées aux noeuds de l'arbre correspondent aux valeurs de bootstrap et probabilités a posteriori (maximum de vraisemblance / analyse bayésienne). Seuls les nœuds dont les valeurs de bootstrap étaient supérieures à 60 % ont été retenus.

2.2.3 Analyses basées sur les séquences de gène de la sous-unité A de l'Adénosine-5'-phosphosulfate réductase / oxydase

Les séquences de gène de la sous-unité A de l'APS réductase / oxydase de bactéries sulfo-oxydantes et sulfato-réductrices et d'archéobactéries sulfato-réductrices ont été utilisées pour réaliser un arbre phylogénétique (Fig. 34). Dans cet arbre, les bactéries associées aux *Pseudovorticella* des bois coulés intègrent un clade regroupant des bactéries sulfo-oxydantes possédant une APS réductase / oxydase de la lignée 1. Les bactéries les plus proches d'elles, sont les ectosymbiotes de *Z. niveum* (lignées du Belize et de la mer Méditerranée).

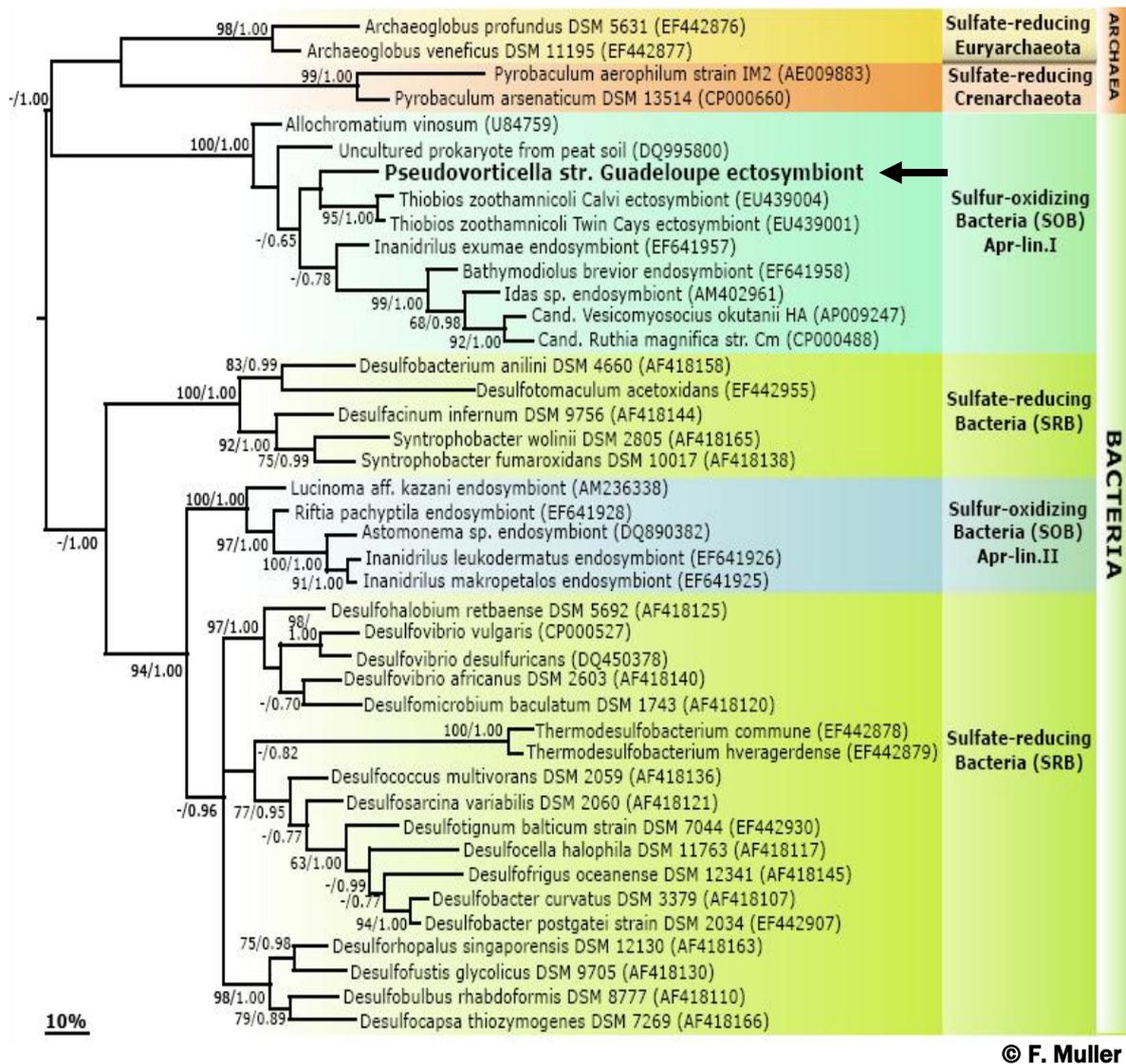


Figure 34 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse bayésienne des séquences de gène de la sous-unité A de l'adénosine-5'-phosphosulfate réductase / oxydase de 320 nucléotides. Il expose les relations entre les bactéries associées au cilié Vorticellidae des bois coulés, noté *Pseudovorticella* str. Guadeloupe ectosymbiont (flèche) et des archéobactéries, bactéries symbiotiques et libres, de nature sulfo-oxydante ou sulfato-réductrice. Les valeurs indiquées aux nœuds de l'arbre correspondent aux valeurs de bootstrap et de probabilités à posteriori (maximum de vraisemblance / analyse bayésienne). Seuls les nœuds dont les valeurs de bootstrap étaient supérieures à 60 %, ont été retenus.

3 Discussion

3.1 Le cilié de la famille des Zoothamniidae

Les observations à la loupe binoculaire et en microscopie électronique ont permis de déterminer que les zones blanches présentes à la surface des débris végétaux, résultaient de la présence de deux types de ciliés péritriches sessiles : un cilié solitaire de la famille des Vorticellidae et un cilié colonial de la famille des Zoothamniidae.

La famille des Zoothamniidae comprend un unique genre : *Zoothamnium* (Bory de St. Vincent, 1826). Les données phylogénétiques confirment que le cilié colonial de cette étude intègre bien ce genre et présente une forte similarité avec *Z. niveum*. Le cilié colonial observé à la surface des débris végétaux appartient donc probablement à l'espèce *Z. niveum*.

Ces résultats phylogénétiques sont soutenus par les caractéristiques morphologiques du cilié. Sa forme, sa taille, sa couleur, l'organisation de ses branches sur le stolon et des zoïdes sur les branches sont autant de caractères similaires à ceux de *Z. niveum* (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a). S'y ajoutent les caractéristiques du manteau bactérien, avec la forme et l'agencement des bactéries (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a, b). La transition de formes des bactéries sur les microzoïdes, rappelle le polymorphisme structural observé chez *Z. niveum* (Bauer-Nebelsick *et al.* 1996b ; Rinke *et al.*, 2006).

Au vu de tous ces éléments, il est possible de considérer que le cilié colonial constituant les zones blanches sur les bois coulés de mangrove, correspond à *Z. niveum*. Or cette espèce vit en symbiose obligatoire avec des bactéries sulfo-oxydantes (Rinke *et al.*, 2006). Cela implique que les bactéries associées au *Z. niveum* observés sur les bois coulés dans cette étude, sont également des bactéries sulfo-oxydantes. La détection de soufre élémentaire par spectrométrie Raman (Maurin *et al.*, 2008) au niveau du manteau bactérien du *Z. niveum* de cette étude, a permis de déterminer que les zones claires observées en MET dans le cytoplasme des bactéries, correspondaient à des granules de soufre, similaires à ceux des ectosymbiotes de *Z. niveum* du Belize (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996b).

En résumé une multitude d'éléments permettent de valider la nature sulfo-oxydante des bactéries associées au cilié *Zoothamnium niveum* vivant à la surface des bois coulés de mangrove (Fig. 35).

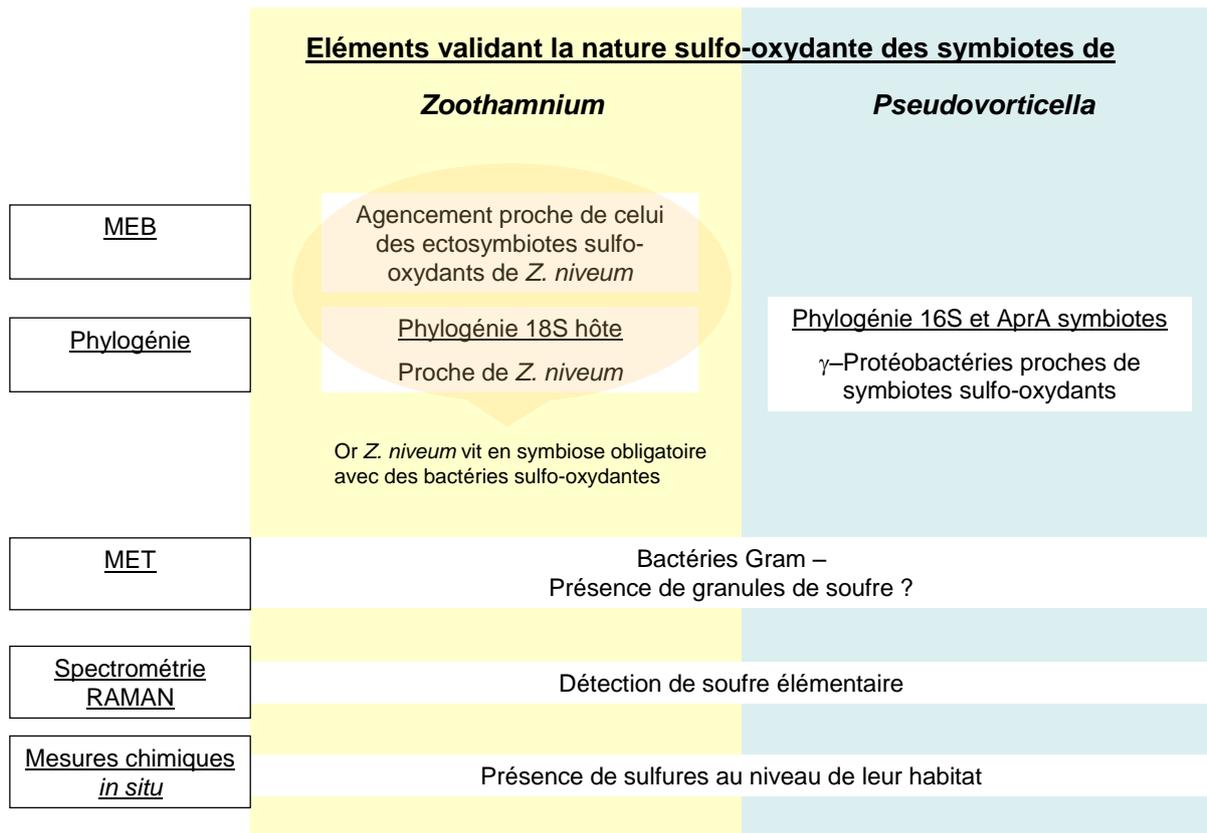


Figure 35 : Récapitulatif des éléments ayant mené à la validation de la nature sulfo-oxydante des bactéries associées aux ciliés *Zoothamnium niveum* et *Pseudovorticella* sp.

3.2 Le cilié de la famille des Vorticellidae

La famille des Vorticellidae regroupe plusieurs genres, morphologiquement proches. L'identification du cilié solitaire des bois coulés a été réalisée à partir d'analyses phylogénétiques basées sur les séquences d'ARNr 18S. Ce cilié appartient au genre *Pseudovorticella* (Foissner et Schiffmann, 1974).

Les bactéries en bâtonnet observées à la surface de ce *Pseudovorticella* sp. ont une répartition similaire à celle des ectosymbiotes de *Z. niveum* : une couche unique de bactéries, recouvrant de manière organisée la surface du zoïde et du stolon, en évitant la partie la plus basale de ce dernier, et le disque adhésif. Cette association correspond probablement à de l'ectosymbiose.

Les bactéries possèdent une double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatives, et présentent des zones claires dans leur cytoplasme, similaires aux granules de soufre de *Z. niveum*. La détection de soufre élémentaire à la surface de l'organisme, par la

technique de spectrométrie Raman (Maurin *et al.*, 2008), renforce l'hypothèse de la présence de granules de soufre, suggérant une nature sulfo-oxydante de ces bactéries.

Les bactéries filamenteuses, observées dans certains cas sur la partie basale du stolon de *Pseudovorticella* sp., correspondraient plutôt à des épibiontes. Elles colonisent certainement le cilié au cours de sa phase de dégénérescence, comme cela est observé chez *Z. niveum* (Ott *et al.*, 1998 ; Ott et Bright, 2004). Ces bactéries ont été évitées lors des analyses phylogénétiques en coupant la partie la plus basale du stolon avant les extractions d'ADN.

La nature sulfo-oxydante, ainsi que la nature ectosymbiotique des bactéries en bâtonnet, sont confirmées par les analyses des séquences d'ARNr 16S et de l'APS reductase / oxydase. L'APS reductase / oxydase est considérée comme une enzyme diagnostique du métabolisme du soufre. La présence de son gène de fonction vient confirmer que les symbiotes de *Pseudovorticella* sp. utilisent bien le métabolisme sulfo-oxydant, comme suggéré par les données obtenues à partir des séquences de l'ARNr 16S.

Les arbres obtenus à partir des séquences de l'ARNr 16S et de l'APS reductase / oxydase sont cohérents, et rapprochent les bactéries associées à *Pseudovorticella* sp. du groupe des γ -protéobactéries sulfo-oxydantes ectosymbiotiques. Les hybridations à partir de l'amorce spécifique confirment que les séquences obtenues correspondent bien à celles des ectosymbiotes de *Pseudovorticella* sp. Elles valident également la spécificité de l'amorce, car aucune hybridation positive n'est obtenue avec les ectosymbiotes de *Z. niveum*, bien qu'ils soient phylogénétiquement proches de ceux de *Pseudovorticella* sp.

Tous ces éléments prouvent que *Pseudovorticella* sp. vit en ectosymbiose, comme *Z. niveum*, avec des bactéries sulfo-oxydantes (Fig. 35). Cela est parfaitement cohérent avec les conditions chimiques identifiées dans leur micro-habitat à la surface du bois.

Pseudovorticella sp. présente également des similarités avec un autre cilié Vorticellidae, *Vorticella* sp., décrit par Ott et Bright (2004). *Vorticella* sp. est observé à proximité de *Z. niveum* en mangrove au Belize. L'association de *Vorticella* sp. avec un manteau bactérien a été décrite, et l'hypothèse d'une nature sulfo-oxydante des bactéries a été émise (Ott et Bright, 2004 ; Vopel *et al.*, 2001), sans être vérifiée sur la base d'analyses phylogénétiques.

Vorticella sp. ainsi que *Z. niveum* semblent se nourrir de leurs symbiotes, détachés de la surface du cilié par ses mouvements de contraction (Vopel *et al.*, 2002), expliquant la présence de bactéries similaires aux ectosymbiotes de *Z. niveum* dans ses vacuoles digestives (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a). Le fait que les bactéries observées dans les vacuoles digestives des *Pseudovorticella* sp. soient similaires à ses symbiotes, laisse supposer que ce cilié peut également s'en nourrir.

La symbiose en tant qu'association à bénéfice mutuel semble être remise en cause dans le cas où un des partenaires est consommé par l'autre, comme ce qui est suspecté pour les ciliés précédemment cités. Cependant l'hôte acquérant la capacité de se développer dans un environnement soufré réduit grâce à ses symbiotes, et les symbiotes profitant des mouvements de l'hôte pour assurer leur approvisionnement en sulfures et oxygène (Vopel *et al.*, 2001), la notion de bénéfice mutuel reste valable. Le fait que l'hôte se nourrisse de ses symbiotes pourrait être considéré comme un système de transfert de matière carbonée du symbiote vers son hôte comme cela est observé dans le cas des endosymbioses. Dans le cas des ectosymbioses les symbiotes entiers sont digérés par leur hôte. La phagocytose des ectosymbiotes bactériens révélée chez les ciliés du genre *Kentrophoros* (revue de Ott *et al.*, 2004) et suspectée chez les Mytilidae des bois coulés (Duperron *et al.*, 2008) correspondrait à un processus plus intégré mais équivalent à celui des ciliés des substrats végétaux coulés. La notion de symbiose reste donc valable pour ces organismes, confortée par le caractère obligatoire de l'association dans le cas de *Z. niveum* (Rinke *et al.*, 2006).

Les résultats de ces travaux ont prouvé que les bois coulés en mangrove sont capables de soutenir le développement d'organismes sulfo-oxydants, de manière similaire aux bois coulés des milieux profonds (Duperron *et al.*, 2008). Ils valident donc le fait que les niveaux de sulfures mesurés au niveau des micro-habitats des ciliés symbiotiques, et les conditions instables mises en évidence, sont bien favorables à la croissance chimioautotrophe sulfo-oxydante.

CHAPITRE 3

SYNTHESE DE L'ANALYSE DES BOIS COULES NATURELS

1 Le bois : un substrat idéal pour le développement de symbioses thiotrophes

Z. niveum et *Vorticella* sp. ont été décrits dans des micro-habitats éphémères constitués de matière végétale en décomposition : des radicelles de palétuvier sur la tourbe de mangrove (Ott et Bright, 2004 ; Vopel *et al.*, 2002), ou encore des algues (Ott et Bright, 2004) ou herbiers (Rinke *et al.*, 2009). Cette étude est la première à signaler la présence de *Z. niveum* et d'un Vorticellidae solitaire proche de celui décrit par Ott et Bright (2004), ici *Pseudovorticella* sp., sur des bois coulés massifs, comparables à certains récupérés en milieu profond. Les pièces massives de bois, considérées comme moins facilement dégradables que les autres débris végétaux (racines, feuilles, algues), peuvent donc également constituer un environnement favorable au développement de ces organismes sulfo-oxydants en milieu peu profond.

L'enrichissement en sulfures, mesuré au niveau des zones blanches du bois (voir II – Chap. 1) est comparable à celui déterminé en laboratoire au niveau des radicelles de palétuvier en décomposition sur lesquelles se développaient des colonies de *Z. niveum* (110 et 360 μM) (Vopel *et al.*, 2001), et mesuré *in situ* au niveau de l'eau contenue à l'intérieur des tubes formés par ces radicelles (plus de 739 μM) (Vopel *et al.*, 2005).

Des observations régulières des zones blanches des bois coulés de mangrove ont révélé que les colonies de *Z. niveum* pouvaient persister plusieurs semaines à la surface d'un même bois coulé. Sachant que la durée de vie des colonies de *Z. niveum* est estimée à environ 7 jours (Ott et Bright, 2004), la persistance des ciliés signifie que leur population est renouvelée. Les conditions à la surface du bois restent donc favorables à leur développement et leur maintien, notamment en termes de disponibilité de sulfures pour leurs symbiotes.

Les bois coulés massifs sont supposés subir une dégradation plus lente que les autres types de débris végétaux, considérés comme plus labiles, tels que les amas d'herbes marines, algues, brindilles ou feuilles.

Puisque les émissions de sulfures sont liées à la dégradation du bois, les débris massifs sont susceptibles de permettre le maintien d'émissions de sulfures à plus long terme que les autres débris. Ils peuvent alors représenter des environnements enrichis en sulfures, localisés à des profondeurs variables, favorisant ainsi la dispersion d'organismes dépendants des sulfures. Cette hypothèse est soutenue par les récentes conclusions de Rinke *et al.* (2009), concernant la répartition géographique de *Z. niveum* : les bois coulés de mangrove, auraient permis la dispersion de *Z. niveum* sur de longues distances, expliquant qu'il soit observable dans des régions distantes de plusieurs milliers de kilomètres. Plusieurs étapes de colonisation d'un nouveau substrat sont nécessaires à la réalisation d'une telle dispersion.

Les autres environnements réduits interviennent probablement aussi dans cette dispersion, à condition que les organismes y soient adaptés. *Z. niveum*, par exemple, semble coloniser les bois coulés ainsi que les carcasses de baleines coulées (Fujiwara, communication personnelle). Ces deux substrats organiques sont donc susceptibles de représenter des sites étapes à la dispersion géographique de cette espèce.

2 La variabilité des teneurs en sulfures : un atout potentiel pour les organismes symbiotiques

La concentration des ciliés en grand nombre dans des zones restreintes de la surface du bois, suppose que les conditions favorables à leur développement ne sont retrouvées que sur ces zones limitées. Celles-ci respectent des caractéristiques topographiques particulières permettant d'éviter un lessivage continu de la surface du bois par l'eau riche en oxygène, lessivage renforcé par les courants liés à la marée.

L'instabilité des concentrations en sulfure d'hydrogène en un point donné, avec des fluctuations d'amplitude supérieure à 100 μM en moins d'une heure (voir II - Chap. 1), peut être considérée comme un atout pour les organismes symbiotiques.

Au-delà des pulsations hydrodynamiques et de l'intervention des ciliés hôtes dans l'approvisionnement de leurs symbiotes par l'intermédiaire de leurs mouvements de cils (Vopel *et al.*, 2001), la modulation de l'oxygène et des sulfures par la marée, semble influencer fortement la disponibilité des substrats chimiques pour la croissance chimioautotrophe.

Les travaux réalisés sur les bois coulés naturels de mangrove ont permis d'acquérir des données intéressantes sur les conditions chimiques caractéristiques des bois coulés, et leur

capacité à soutenir le développement d'organismes chimiolithotrophes sulfo-oxydants (Fig. 36).

Cependant des expériences d'immersion de bois sont nécessaires pour examiner la dynamique des sulfures à partir de l'immersion du substrat et au cours de sa dégradation, ainsi que l'évolution de la colonisation du bois en relation avec la dynamique du milieu.

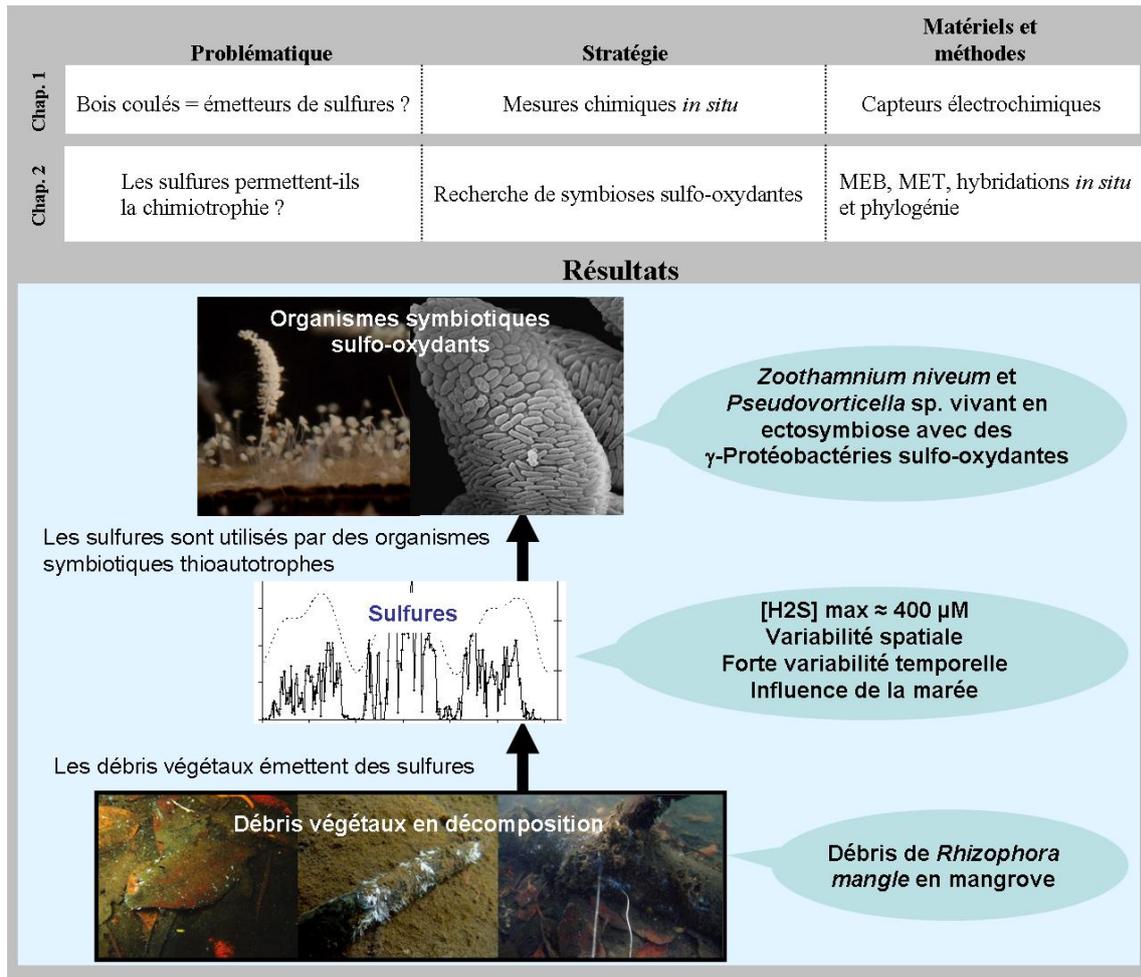


Figure 36 : Schéma récapitulatif des principales données acquises à partir des analyses chimique et biologique des bois coulés naturels de mangrove.

PARTIE III

IMMERSIONS EXPERIMENTALES

DE SUBSTRATS VEGETAUX

EN MANGROVE

CHAPITRE 1

ETUDE DE LA DYNAMIQUE DES SULFURES A PARTIR DE SUBSTRATS VEGETAUX EXPERIMENTALEMENT IMMERGES

1 Matériels et méthodes

Deux espèces végétales ont été choisies pour les prélèvements de substrats végétaux à immerger : la monocotylédone *Arecaceae Cocos nucifera* (le cocotier) et la dicotylédone *Rhizophora mangle* (le palétuvier rouge) [Fig. 37a-b]. Ce choix s'explique par le fait que le palétuvier rouge est l'espèce végétale majoritaire sur notre site d'étude. Il y représente la source principale de débris végétaux. Le cocotier est une espèce végétale très répandue dans les zones tropicales. Il semble également que les débris provenant de cet arbre soient exportés vers le milieu marin, puisque plusieurs chalutages d'environnements profonds en zones tropicales ont mené à la remontée de débris provenant de *Cocos nucifera* (Palacios *et al.*, 2006 ; Duperron *et al.*, 2008).

1.1 Dispositif 1

Des bouts de branches et de palmes, prélevés respectivement sur des palétuviers et des cocotiers vivants, ont servis de substrats expérimentaux pour la réalisation de mesures de sulfures et de pH. Deux couples de capteurs *in situ* (présentés en II - Chap. 1) ont été fixés à chaque bout de substrat végétal à analyser. Pour chaque couple, comportant un capteur de sulfures et un capteur de pH, les électrodes de mesures ont été fixées l'une à l'autre afin que leurs enregistrements caractérisent un même micro-environnement. Les substrats ont été fendillés volontairement sur quelques centimètres afin d'insérer dans une fissure un couple d'électrodes, tandis que le deuxième était fixé à la surface du substrat végétal (Fig. 37c-d).

Les capteurs ont été configurés pour une fréquence d'enregistrement d'une mesure toutes les 15 min. Juste après le lancement des enregistrements, les substrats équipés de leurs

capteurs ont été immergés sur le site de la Manche-à-eau, fixés à un support métallique les maintenant à environ 50 cm au-dessus du sédiment (Fig. 37c-d).

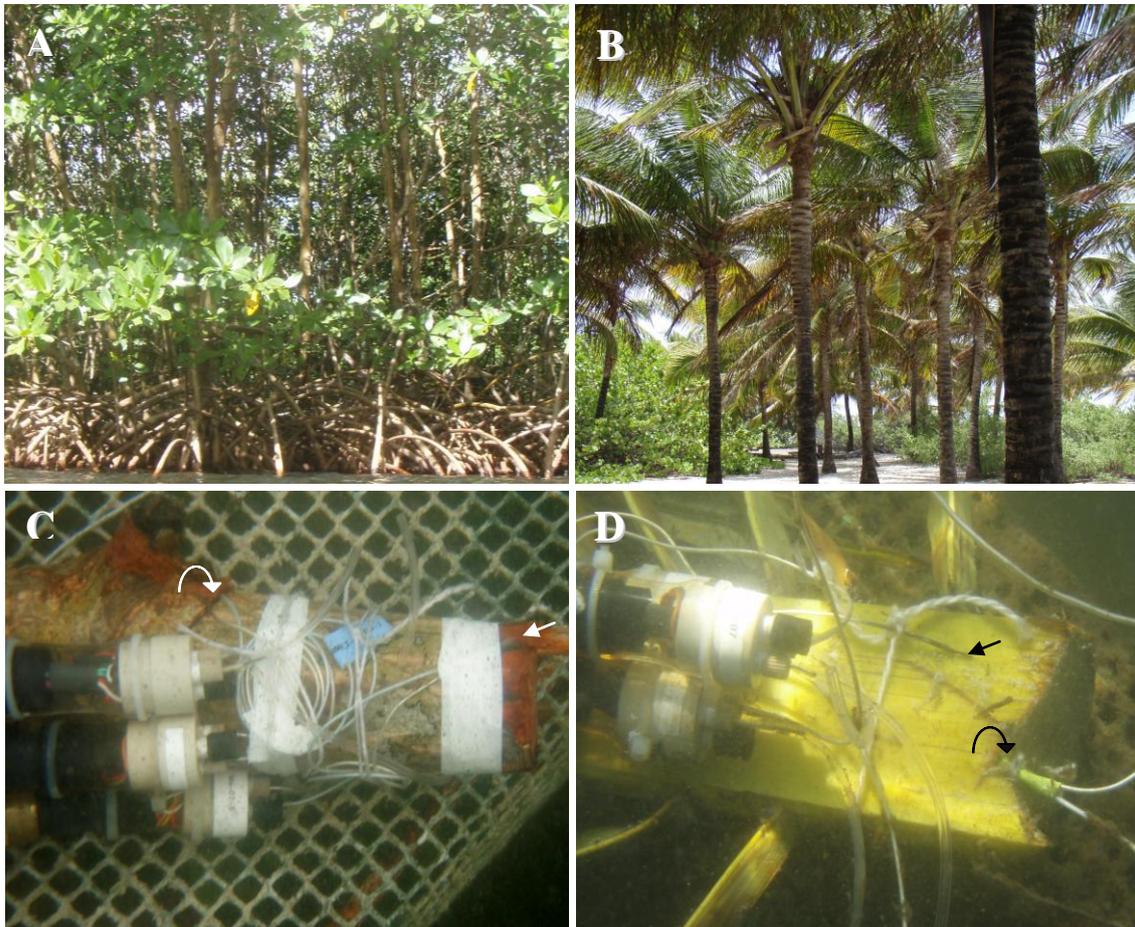


Figure 37 : Photos des espèces végétales (A-B) prélevées pour les montages des capteurs potentiométriques (C-D) du suivi chimique. Les espèces végétales sont le palétuvier rouge *Rhizophora mangle* (A) et le cocotier *Cocos nucifera* (B). Les couples d'électrodes (pH et sulfures) des capteurs potentiométriques sont placés à la surface du bois (flèches rectilignes) et à l'intérieur d'une fissure (flèches incurvées) sur un bout de branche de palétuvier (C) et un bout de palme de cocotier (D).

Deux suivis chimiques de plus de 40 jours à partir de l'immersion des dispositifs ont été réalisés pour le palétuvier, et trois pour le cocotier. Ces enregistrements longs ont été complétés par des séquences de mesures plus courtes, d'une durée de quelques minutes à plusieurs jours. Au cours de certaines expériences un couple supplémentaire de capteurs a été utilisé pour détecter d'éventuelles perturbations du milieu environnant. Pour cela les capteurs ont été fixés au support maintenant les substrats végétaux, leurs électrodes placées dans l'eau, sans contact avec les substrats végétaux. La fréquence d'enregistrement de ces capteurs témoins était d'une mesure toutes les 5 minutes.

1.2 Dispositif 2

Le deuxième dispositif est un ensemble de petits paniers en grillage plastifié contenant des paquets de substrats végétaux de 100 g chacun. Ces paquets sont composés de feuilles de *R. mangle*, de folioles de *C. nucifera* (Fig 38a), ou de pétiole de *C. nucifera* (Fig 38b), chaque panier ne contenant qu'un type de substrat végétal.

La préparation des montages pour les mesures chimiques a été réalisée avant l'immersion des paniers. Dans le cas du pétiole, les électrodes des capteurs ont été insérées dans une fissure (Fig. 38c), tandis que pour les deux autres substrats, les électrodes ont été glissées au centre des tas de feuilles. Les capteurs ont été placés dans les paniers et immergés en même temps que les substrats végétaux sur le site de la Manche-à-Eau. Afin d'éviter le contact avec les sédiments réduits, l'ensemble des paniers a été attaché à une structure métallique à environ 30 cm au-dessus du sédiment. Les enregistrements ont duré 15 jours, 1 mois et 3 mois respectivement pour les feuilles de palétuvier, les folioles, et les pétioles de cocotier.

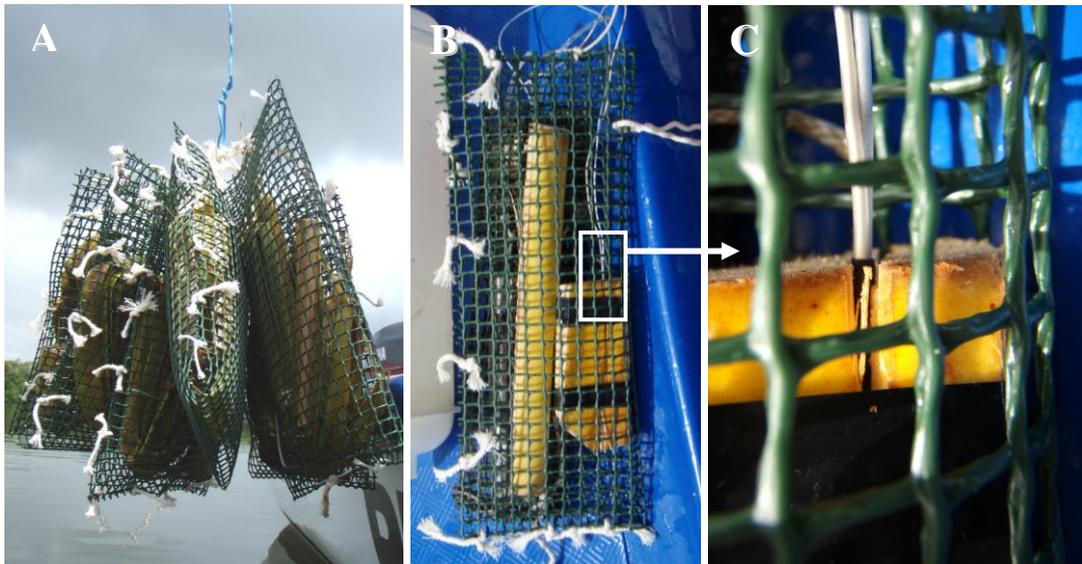


Figure 38 : Paniers contenant les folioles (A) et les pétioles (B) des palmes de *Cocos nucifera*. Les électrodes des capteurs sont insérées dans une fissure du pétiole (C).

1.3 Mesures chimiques complémentaires

Des expériences d'immersion ont également été réalisées en laboratoire, dans un bac d'eau de mer dont le renouvellement en eau était assuré en continu. Une première expérience a été menée avec une palme de cocotier équipée d'un couple de capteurs effectuant des mesures à sa surface et dans l'eau du bac, et une seconde expérience avec une branche de palétuvier, équipée de deux couples de capteurs, dont les électrodes étaient placées à sa surface et dans une fissure. Les mesures ont duré respectivement 7 et 9 jours.

1.4 Analyse des données

Les principaux risques rencontrés lors d'une utilisation prolongée des capteurs *in situ*, dans des environnements biologiquement actifs, sont le bio-fouling et la dégradation des électrodes, pouvant créer une déviation du potentiel de référence et une perte de sensibilité des capteurs. L'utilisation d'un crayon électronique étanche a permis de vérifier le bon fonctionnement des capteurs au cours des expériences en récupérant régulièrement les données. Le transfert des données, effectué par contact entre le crayon et le capteur sous l'eau (Fig. 39), n'entraînait donc pas d'arrêt des mesures, ou de perturbations du dispositif en place.

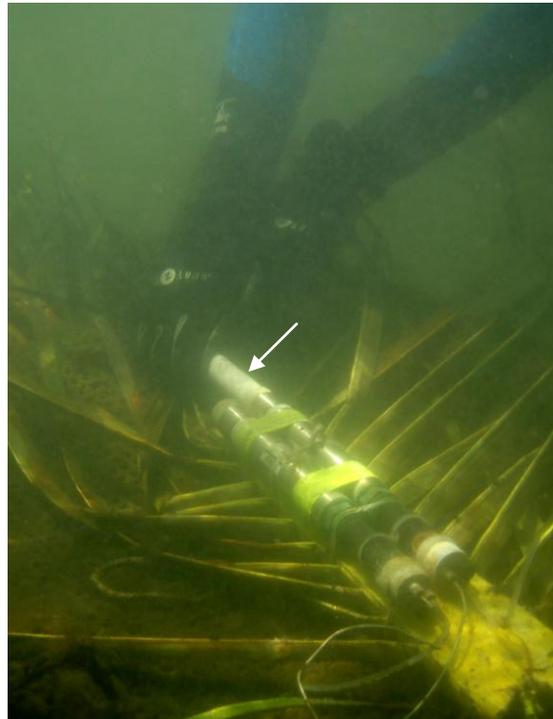


Figure 39 : Récupération des enregistrements des capteurs à l'aide du crayon électronique étanche (flèche).

En plus de cette précaution, des calibrations ont été effectuées avant et après chaque utilisation des capteurs afin de détecter et d'estimer au mieux la dérive éventuelle des électrodes. Les calculs ont été effectués par N. Le Bris en tenant compte de la dérive des électrodes dans le cas où celle-ci était mise en évidence par les calibrations.

2 Résultats

La non reproductibilité des calibrations avant et après utilisation des capteurs a été observée pour toutes les expériences longues de plusieurs semaines. Ce phénomène reflète la sensibilité des électrodes aux conditions du milieu, bien connue pour ce type d'électrode. Cette instabilité relative ne remet pas en question le fonctionnement des capteurs, cependant elle limite la précision des mesures. En effet, des écarts faibles identifiés dans les réponses électriques des capteurs induisent des incertitudes importantes sur les valeurs de pH et plus encore sur les concentrations en sulfures puisque le potentiel varie en fonction du logarithme de la concentration. C'est la raison pour laquelle les données de concentration sont présentées en échelle logarithmique. Les ordres de grandeur de $[H_2S]$ totale indiqués, sont déterminés à partir de $\log [H_2S]$ totale. Les concentrations sont de l'ordre du nanomolaire pour $\log [H_2S] = -9$, du micromolaire pour $\log [H_2S] = -6$, du millimolaire pour $\log [H_2S] = -3$, ou du molaire pour $\log [H_2S] = 0$. L'imprécision des mesures n'est pas incompatible avec l'analyse de la dynamique des sulfures au niveau des substrats végétaux coulés puisque des variations de plusieurs ordres de grandeur de la concentration en H_2S libre sont effectivement observées.

2.1 Mesures obtenues à partir du dispositif 1

Plusieurs expériences d'immersion de substrats végétaux avec un suivi chimique ont été réalisées pour chacun des types de substrats présentés précédemment. Bien que les données obtenues ne soient pas validées statistiquement, des caractéristiques communes à l'ensemble des résultats obtenus suggèrent que l'on puisse dresser un schéma général des conditions chimiques au niveau des substrats.

Les sulfures n'ont pas été détectés dans l'eau de mangrove à proximité des dispositifs immergés. Par contre les enregistrements obtenus au niveau des substrats eux-mêmes, révèlent un net enrichissement en sulfures à leur surface ainsi qu'à l'intérieur (Figs. 40-41).

Les sulfures apparaissent en quelques jours seulement à la surface et à l'intérieur des substrats végétaux. Les concentrations dépassent rapidement la millimole par litre, atteignant parfois la mole par litre. Des spécificités dans la dynamique des émissions sont observables selon le type de substrat considéré.

L'enrichissement en sulfures est précédé d'une importante et rapide acidification du milieu (Figs. 40a ; 41a). Dès le premier jour d'immersion, le pH atteint des valeurs inférieures à 4 à l'intérieur (Fig. 40a) comme à la surface du bois (Fig. 41a), quelque soit le substrat considéré. Cette acidification dure 27 et 32 jours respectivement pour *R. mangle* et *C. nucifera*, puis le pH revient progressivement à des valeurs neutres, voire alcalines, qui sont maintenues tout au long de l'expérience. La progression du pH au cours des semaines d'immersion est similaire chez les deux substrats végétaux (Figs. 40a ; 41a).

Chez *C. nucifera* les sulfures sont détectés dès le 3^{ème} jour d'immersion, à l'intérieur de la palme, puis au 6^{ème} jour à sa surface (Fig. 40b-c). Des concentrations dépassant la millimole par litre sont maintenues environ 3 semaines puis les niveaux de sulfures sous la surface du bois se stabilisent à des valeurs comprises entre 100 μM et 1 mM. Les émissions de sulfures prennent fin à 4 semaines à la surface de la palme alors qu'elles sont maintenues au-delà de six semaines sous la surface. Le moment de l'arrêt de ces dernières émissions n'est pas connu car l'expérience a été interrompue.

Chez *R. mangle* les émissions de sulfures durent plus de 8 semaines (Fig. 41b-c). Les sulfures sont détectés d'abord à la surface de la branche de palétuvier après 4 jours d'immersion, puis à l'intérieur, au 6^{ème} jour, à l'inverse de ce qui est observé chez la palme de cocotier. Les concentrations élevées maintenues pendant 3 semaines, sont suivies de niveaux de sulfures compris entre 10 μM et 1 mM pour *R. mangle*. Les sulfures ne sont plus détectables à l'intérieur après 2 mois d'immersion tandis qu'à la surface du bois ils le sont encore à 78 jours au moment de l'arrêt de l'expérience.

La différence principale entre les deux substrats analysés réside dans les étapes successives de la dynamique des sulfures à leur surface. La période initiale pendant laquelle les sulfures ne sont pas détectables (étape I) est suivie par une période courte d'augmentation rapide des sulfures (étape II). Une période d'enrichissement important en sulfures à la surface du bois (étape III) pendant environ 6 semaines est observable chez *R. mangle*. Durant cette période les moyennes sur 24 h des teneurs en sulfures sont comprises entre 200 μM et 20 mM. L'étape suivante (étape IV) est caractérisée par des fluctuations importantes des teneurs en sulfures, avec des valeurs moyennes sur 24 h inférieures à 200 μM , parfois indétectables. Les étapes I, II et IV sont communes aux deux substrats et leurs durées sont variables selon le

substrat considéré. Par contre l'étape III n'est observable que chez *R. mangle*. Chez *Cocos nucifera* les concentrations en sulfures fluctuent fortement jusqu'à ce qu'elles diminuent et ne soient plus mesurables après 28 jours d'immersion. Cette disparition des sulfures correspond à la dernière étape (étape V) de la dynamique temporelle des sulfures. Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer si les faibles teneurs en sulfures mesurées à la surface du cocotier sont caractéristiques du substrat.

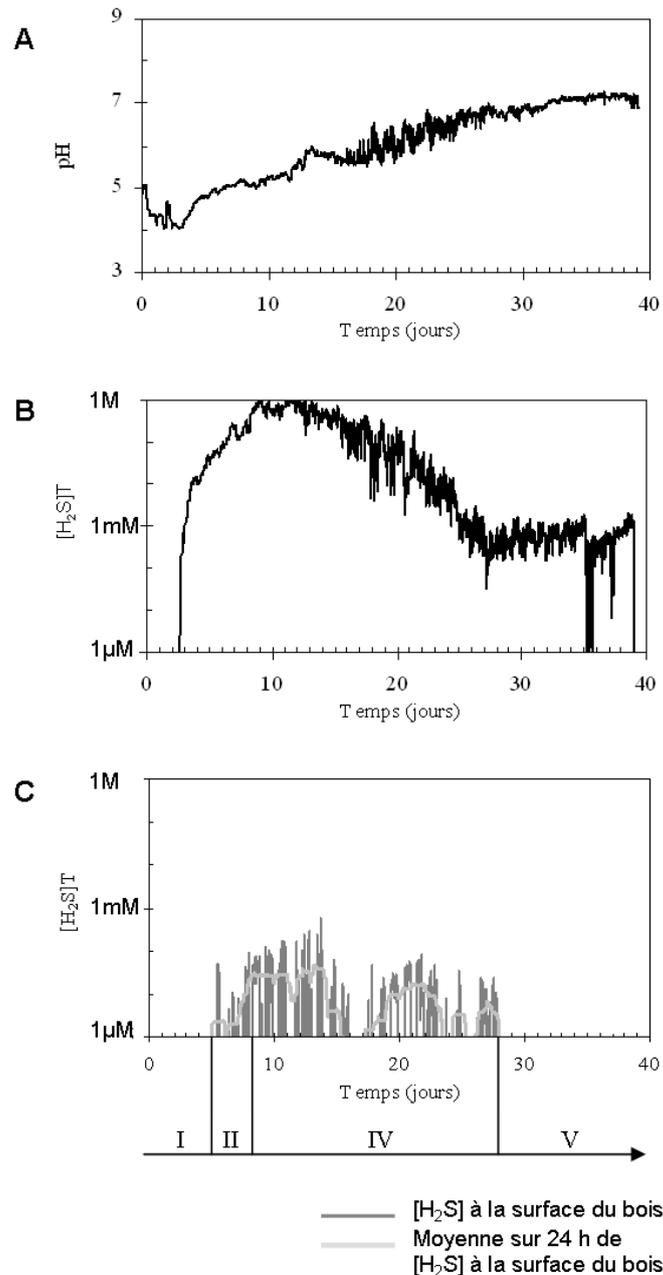


Figure 40 : Représentation graphique de l'évolution du pH (A) et des niveaux de sulfures à l'intérieur (B) et à la surface (C) de la palme de *Cocos nucifera*, sur une durée de 40 jours. Les numéros (I, II, IV et V) indiquent les étapes de la dynamique temporelle des émissions de sulfures à la surface du substrat végétal.

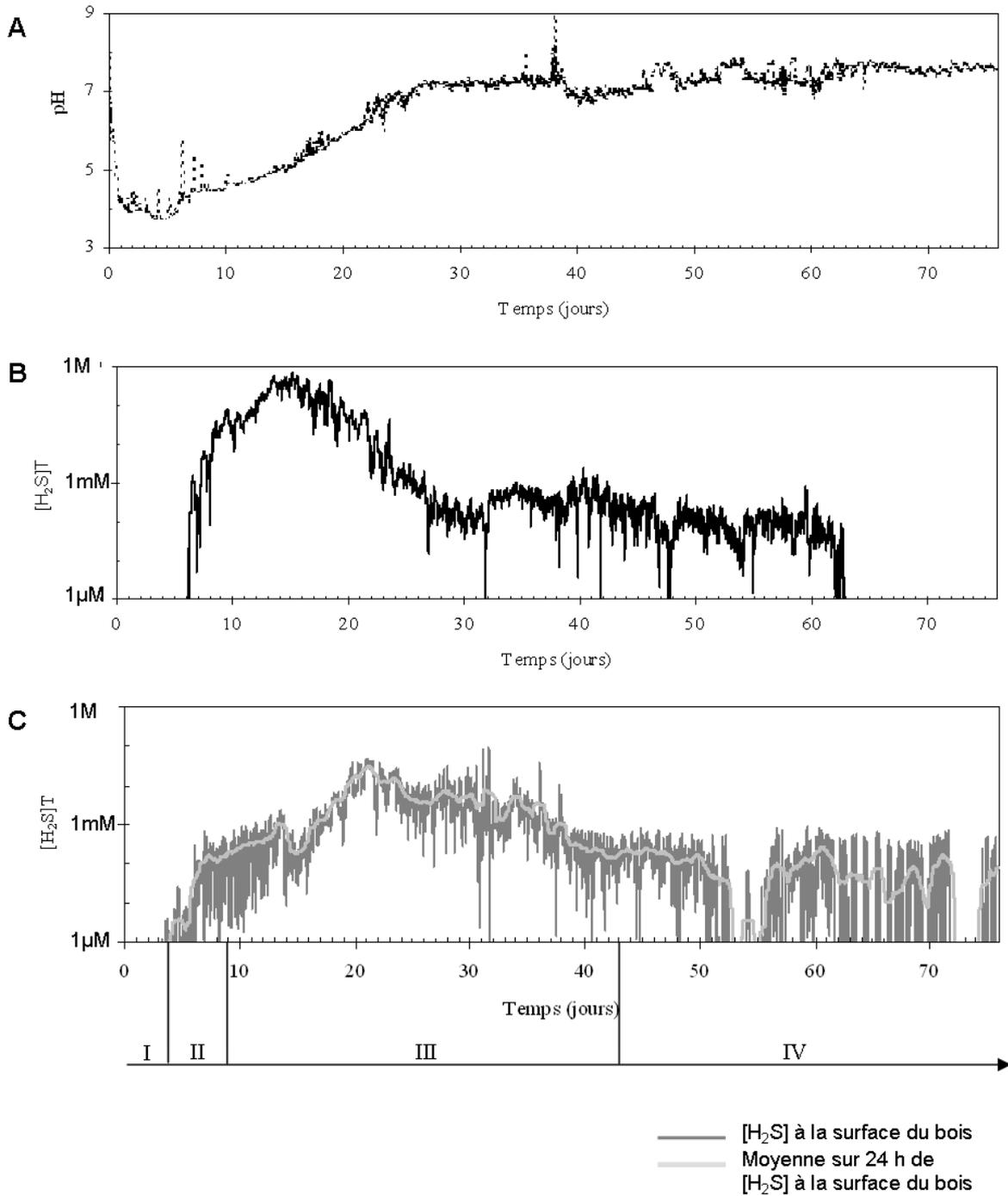


Figure 41 : Représentation graphique de l'évolution du pH (A) et de la concentration en sulfures à l'intérieur (B) et à la surface (C) de la branche de *Rhizophora mangle* sur une durée de 75 jours. Les numéros (I, II, III et IV) indiquent les étapes de la dynamique temporelle des émissions de sulfures à la surface du substrat végétal.

L'analyse détaillée des fluctuations observables pour les mesures réalisées à la surface des végétaux a permis de mettre en évidence des variations régulières du pH et des teneurs en sulfures sur une période journalière. Cette tendance, observable sur tous les enregistrements réalisés en mangrove est corrélée aux mouvements de marée sur le site de la Manche-à-eau. Le profil de ces fluctuations est présenté en figure 42 avec des enregistrements réalisés sur *Cocos nucifera*.

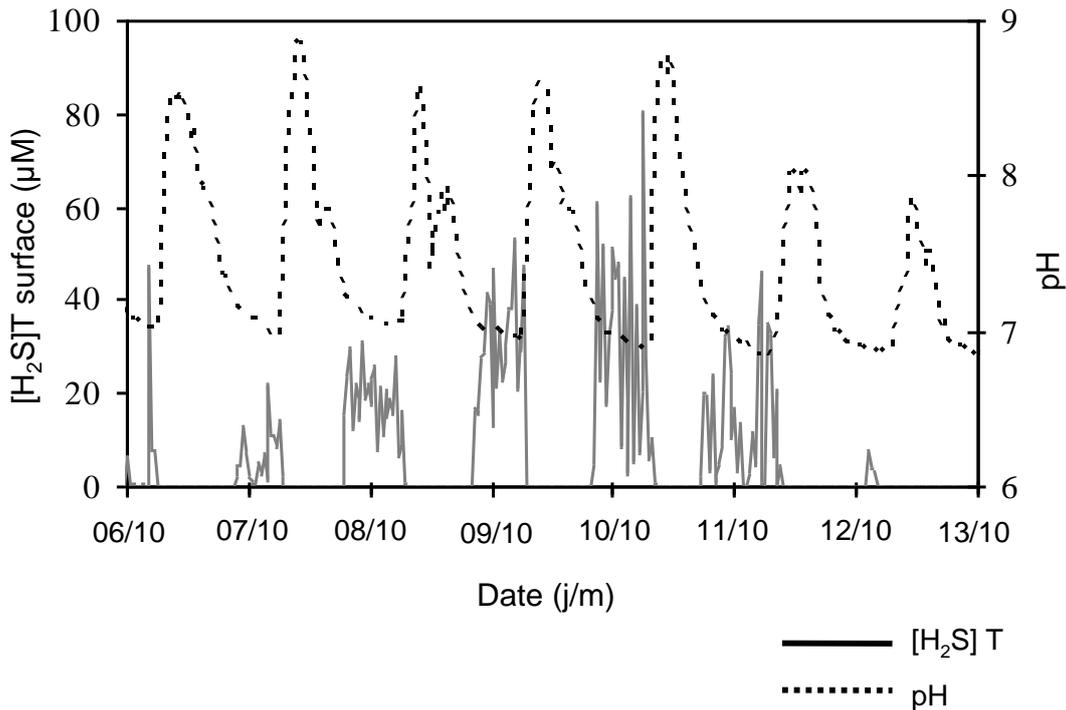


Figure 42 : Représentation graphique de l'évolution du pH et de la concentration en sulfure d'hydrogène, enregistrés chez *Cocos nucifera* sur une durée d'une semaine.

2.2 Mesures obtenues à partir du dispositif 2

Les enregistrements de potentiels obtenus à partir des immersions expérimentales des substrats calibrés, respectent les principaux éléments de la dynamique des sulfures et du pH, mis en évidence précédemment. Les graphes présentés en figure 43 correspondent aux fichiers obtenus à l'aide du logiciel Winmemo, figurant les modifications de potentiel électrique enregistrées par les capteurs (exprimé en Volt), en fonction du temps (exprimé en heures). Aucune valeur de concentration ou de pH n'est donnée sur la base de ces graphes, cependant leur lecture informe sur la tendance générale de la dynamique temporelle du pH et des sulfures.

Les enregistrements (Fig. 43) révèlent que quelque soit la nature du substrat végétal, la première étape après son immersion consiste en une acidification du milieu, indiquée par l'augmentation de potentiel des capteurs de pH. Cette phase est plutôt courte (environ 3 jours) pour les folioles et pétioles de cocotier, et plus longue (environ 8 jours), découpée en deux phases, pour les feuilles de palétuvier. Une autre étape importante est l'apparition des sulfures, qui est toujours précoce (quelques jours seulement après l'immersion des substrats) et rapide, révélée par une chute brutale du potentiel enregistré par les capteurs de sulfures. Les sulfures sont détectables sur tous les substrats pendant plusieurs semaines. Au bout d'environ 40 jours les niveaux de sulfures diminuent nettement à l'intérieur des pétioles de cocotier.

2.3 Mesures chimiques en laboratoire

Les expériences d'immersion en laboratoire ont également permis de mettre en évidence une phase d'acidification du bois avant l'apparition rapide des sulfures, et cela quelques jours après l'immersion des substrats. Elles ont confirmé la différence de schéma d'apparition des sulfures entre la branche de *R. mangle* et la palme de *C. nucifera*. Les sulfures sont détectés d'abord à la surface de la branche de *R. mangle*, puis à l'intérieur, tandis que l'inverse est observé avec la palme de *C. nucifera*. Les fluctuations journalières des sulfures et pH n'ont par contre pas été observées.

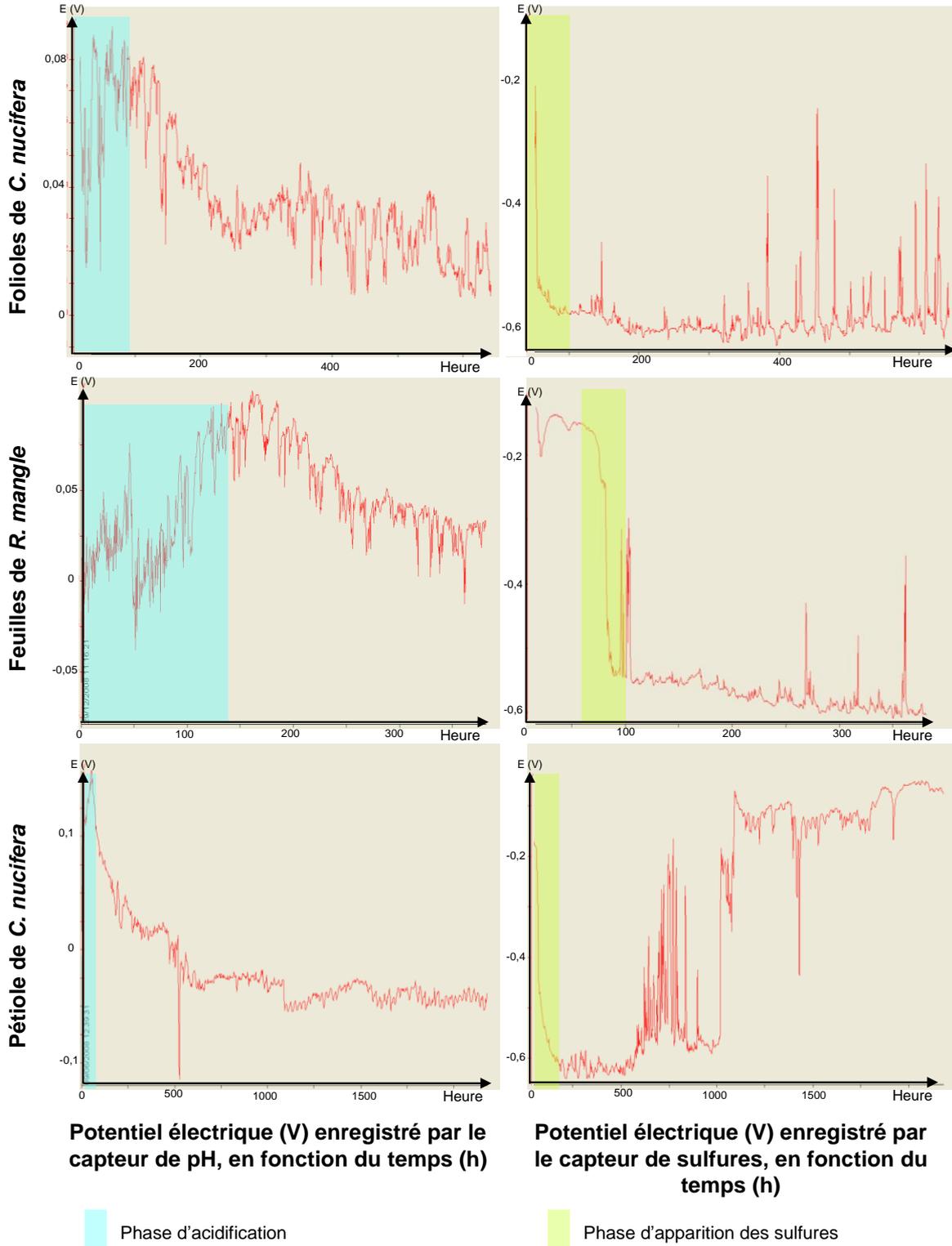


Figure 43 : Images des fichiers Winmemo représentant l'évolution des potentiels des capteurs en fonction du temps. L'évolution des potentiels est inversée par rapport à celle du pH ou des concentrations en sulfures. Les expériences ont été considérées sur toute leur durée. Les échelles de temps ne sont donc pas les mêmes pour tous les graphes : la longueur de l'axe horizontal correspond à 1 mois pour l'expérience réalisée sur les folioles de palmes de cocotier, 15 jours pour les feuilles de palétuvier et 3 mois pour les pétioles de palmes de cocotier.

3 Discussion

3.1 Les teneurs en sulfures

Malgré la précision limitée des mesures réalisées au cours de cette étude, résultant de l'utilisation prolongée des capteurs en mangrove, une estimation des niveaux de sulfures atteints a été possible.

La surélévation des dispositifs afin d'éviter le contact avec le sédiment soufré réduit, la confirmation de l'absence de sulfures dans l'eau de mangrove à proximité des dispositifs, et la détection de sulfures à l'intérieur des substrats végétaux, sont autant d'éléments permettant d'affirmer que la présence de ces sulfures n'est pas le résultat d'une contamination du substrat végétal par le milieu environnant, mais résulte d'un processus se produisant au niveau du substrat lui-même.

De plus les niveaux d'enrichissement enregistrés sont supérieurs aux concentrations de sulfures mesurées dans le sédiment du site de la Manche-à-Eau (voir II - Chap. 1). De telles concentrations confirment à nouveau que les sédiments ne sont pas à l'origine de l'enrichissement en sulfures du substrat végétal.

Les mesures de sulfures sur les substrats végétaux coulés expérimentaux ont permis d'observer à l'intérieur du substrat des niveaux d'enrichissement supérieurs à ceux mesurés en surface des bois coulés naturels de mangrove (voir II - Chap. 1). En effet au cours de cette étude, des concentrations de l'ordre du millimolaire, voire plusieurs centaines de millimolaires ont été mesurées quelques millimètres sous la surface, contre plusieurs centaines de micromolaires ou de l'ordre du millimolaire au maximum en surface des substrats végétaux coulés naturels ou artificiels. Ces niveaux de sulfures sont supérieurs à ceux mesurés dans les sédiments anoxiques des suintements froids (Sahling *et al.*, 2003 ; Arvidson *et al.*, 2004 ; De Beer *et al.*, 2006).

3.2 L'origine des sulfures

Comme cela est le cas dans les processus de diagenèse de la matière organique dans les sédiments marins, la dégradation biologique du substrat végétal favoriserait l'activité des BSR, qui utilisent les sulfates comme accepteurs d'électrons pour l'oxydation des composés carbonés réduits, en conditions anaérobies. Les BSR en milieu marin sont capables d'utiliser des composés organiques tels que le lactate, l'acétate, le propionate et le butyrate, mais

également l'hydrogène, résultant de la dégradation de molécules complexes par des bactéries hétérotrophes et fermentatives (Loka-Bharathi, 2004 ; 2008). Les BSR peuvent même utiliser des composés dérivant du bois tels que le glucose et les sucres résultant de la décomposition de la cellulose (Fors *et al.*, 2008). La phase d'acidification suivant l'immersion des substrats végétaux et le délai avant l'apparition des sulfures sont cohérents avec le déroulement d'un processus en deux étapes : les BSR se développent sur la base de molécules adéquates à leur croissance, libérées par un processus plus précoce.

Cependant un des résultats importants de cette étude est la rapidité d'apparition des sulfures. Il est improbable que ces émissions soient en relation avec la dégradation de la cellulose, élément considéré comme difficilement dégradable. Il est plus probable que le substrat permettant le développement d'une population bactérienne en quelques jours soit un composé chimique plus labile.

Selon Aké-Castillo *et al.* (2006) chez les feuilles de palétuvier, les deux premiers mois suivant l'immersion sont caractérisés par les processus de décomposition des feuilles par l'action des bactéries et des champignons, mais également par la lixiviation. Les composés solubles dans l'eau de mer tels que les sucres et les tannins peuvent représenter 30 à 50 % de la matière organique des feuilles de palétuvier (Cundell *et al.*, 1979). Ces composés solubles sont rapidement minéralisés, tandis que les composés lignocellulosiques sont beaucoup plus résistants à la biodégradation (Benner et Hodson, 1985). Bien que le bois soit colonisé par des bactéries dès les premiers jours d'immersion, les bactéries dégradant le bois proprement dit n'apparaissent qu'après plusieurs mois (Kim et Singh, 2000). La lixiviation peut mener à une perte de poids sec de 14 à 40 % après seulement 9 jours d'immersion des feuilles de palétuvier (Camilleri et Ribí, 1986). Ce phénomène de lixiviation est totalement abiotique mais est accompagné d'une utilisation rapide du lixiviat par des bactéries (Benner et Hodson, 1985).

Sur la base de ces informations, il est possible d'imaginer que des substances beaucoup plus labiles que la cellulose, résultant de la lixiviation des substrats végétaux, puissent servir de substrat à l'activité de bactéries fermentatrices utilisant l'oxygène, puis de BSR lorsque le milieu devient complètement anoxique, induisant une libération de sulfures au niveau du substrat (Fig. 44).

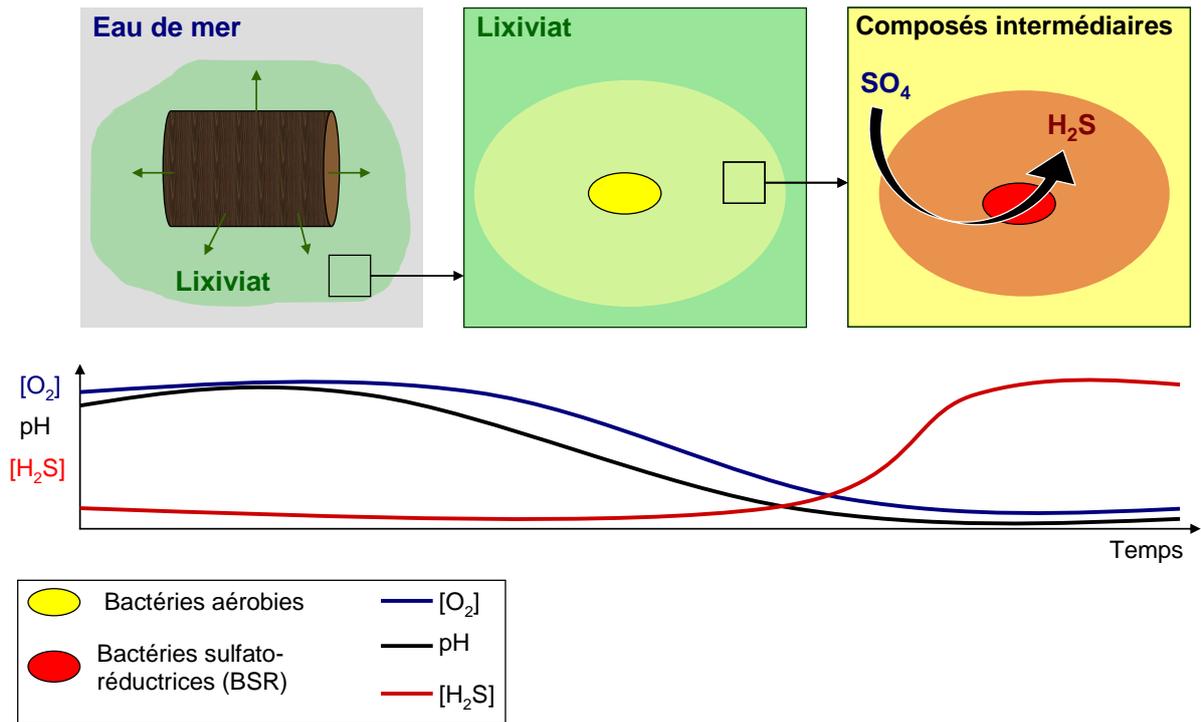


Figure 44 : Représentation schématique des étapes successives menant à la production de sulfures au niveau des déchets végétaux coulés, à partir de leur immersion.

A l'immersion des déchets végétaux, les composés labiles solubles sont libérés dans l'eau de mer. Il s'agit du phénomène de lixiviation. Des composés du lixiviat sont dégradés par des bactéries du milieu en molécules organiques plus simples. Ces bactéries utilisant l'oxygène au cours de leur métabolisme, entraînent un appauvrissement du milieu en oxygène. Les conditions deviennent favorables au développement des BSR, également capables de dégrader les composés intermédiaires résultant de la dégradation du lixiviat par les premières bactéries. C'est l'activité de ces BSR réduisant les sulfates de l'eau de mer, qui mène à la libération de sulfures au niveau des substrats végétaux coulés.

Cependant les niveaux de sulfures enregistrés à l'intérieur du substrat végétal coulé dépassent la concentration des sulfates de l'eau de mer ($\approx 30 \text{ mM}$). Or les concentrations des formes libres des sulfures (H_2S et HS^-) sont limitées par la concentration de sulfates dans l'eau de mer. En conséquence de telles teneurs en sulfures ne peuvent être expliquées que par un processus d'accumulation des sulfures dans le substrat végétal coulé. La formation de polysulfures est probablement à l'origine de ce résultat. L'accumulation de formes organiques de sulfures, principalement des thiols (R-SH), ainsi que du soufre élémentaire, a été mise en évidence récemment (Fors *et al.*, 2008). Suite à une telle accumulation, les teneurs en sulfures dans le bois peuvent être multipliées par 10 au bout de deux ans (Fors *et al.*, 2008). Bien qu'aucune étude n'ait révélé ce processus à plus court terme, il est possible de supposer que des formes organiques du soufre, ainsi que des polysulfures puissent s'accumuler sur une période plus courte. La réponse des électrodes à ces composés reste cependant à vérifier.

3.3 L'influence de la nature du substrat

La principale différence entre les substrats végétaux utilisés pour nos expériences d'immersion réside dans le fait que la production de sulfures est détectée d'abord à l'intérieur du bois puis à la surface chez *C. nucifera*, alors que l'inverse est valable pour *R. mangle*. Cette observation vient renforcer l'hypothèse d'une activité bactérienne de dégradation des composés solubles du bois.

En effet les structures intervenant dans le transport de la sève élaborée, riche en sucres, sont rassemblées au centre de la palme de la monocotylédone *C. nucifera*, tandis qu'elles sont disposées en cercle, à proximité de la surface de la branche chez la dicotylédone *R. mangle*. Si l'on considère que l'enrichissement du milieu en sulfures est effectivement lié à une activité bactérienne de dégradation des lixiviats des substrats végétaux, dont une partie provient de la sève élaborée, alors il semble logique que le schéma d'apparition des sulfures varie selon la classe monocotylédone ou dicotylédone (Fig. 45).

Une autre différence observable à partir de nos expériences d'immersion est le fait que la production de sulfures soit plus précoce chez *C. nucifera* que chez *R. mangle*. Cette différence pourrait également trouver une explication dans l'hypothèse proposée plus haut. En effet, le bois de palétuvier contient un taux élevé en tannins, libérés environ 3 jours après l'immersion du bois (Cundell *et al.*, 1979). Or celui-ci est un agent antimicrobien. Le « retard » de l'apparition des sulfures chez le palétuvier pourrait s'expliquer par un retardement de l'activité microbienne sous l'influence du tannin libéré.

Les différences notées ci-dessus sont liées à l'espèce végétale considérée. La partie végétale analysée pourrait également influencer le schéma de production des sulfures. Le pétiole de la palme, de nature fibreuse, et les folioles, beaucoup plus proches structurellement de la feuille de palétuvier, aurait pu présenter des profils différents. Le faible nombre de réplicats pour ces mesures ne permet pas de déterminer un schéma de dynamique chimique caractéristique de chacune de ces structures végétales. Cependant ces expériences nous ont permis de démontrer que toutes ces structures végétales subissaient un enrichissement en sulfures, avec des niveaux de sulfures comparables (à poids égal de substrat).

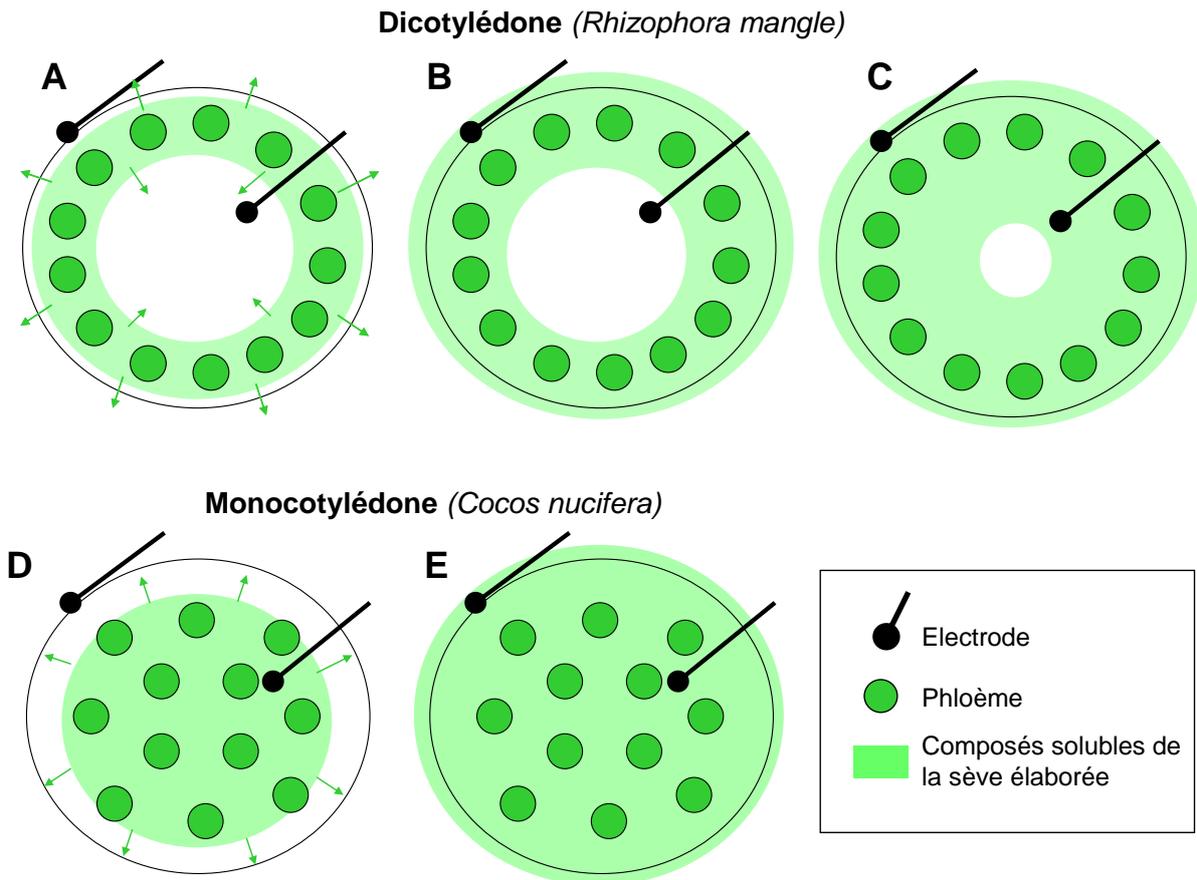


Figure 45 : Représentation schématique de la diffusion de composés solubles provenant de la sève élaborée des substrats végétaux *Rhizophora mangle* et *Cocos nucifera*.

Chez la dicotylédone *R. mangle*, les composés solubles provenant de la sève élaborée sont libérés au niveau des vaisseaux du phloème (A), localisés à la périphérie des branches. Ils diffusent ensuite vers l'intérieur et la surface de la branche, atteignant en premier lieu la surface de la branche (B) puis son centre (C). Chez la monocotylédone *C. nucifera*, les vaisseaux du phloème permettent la libération des composés solubles à l'intérieur de la palme (D), avant leur diffusion vers la surface (E). Si l'enrichissement des substrats végétaux en sulfures est lié à une activité bactérienne de dégradation des composés solubles de la sève élaborée, le schéma de diffusion de ces composés expliquerait l'ordre de détection des sulfures par les électrodes à la surface et à l'intérieur des substrats.

3.4 La dynamique générale des sulfures à la surface des substrats végétaux coulés

Si le schéma proposé ci-dessus est admis, alors la dynamique des sulfures au niveau des substrats végétaux coulés pourrait être interprétée de la manière suivante. Au moment de l'immersion du substrat végétal, les composés solubles sont libérés dans l'eau. Ces composés sont utilisés par des bactéries fermentatrices ou hétérotrophes dont le métabolisme mène à la libération de composés utilisables par les BSR. L'acidification très rapide du milieu pourrait résulter soit de la libération des composés solubles du substrat végétal dans l'eau, soit des produits de leur dégradation. Pendant cette étape les sulfures sont absents au niveau du

substrat végétal (étape I). La population de BSR se développerait sur la base des produits résultant de la dégradation des lixiviats du substrat végétal, entraînant l'enrichissement rapide du milieu en sulfures (II). L'activité maximale des BSR est atteinte pendant l'étape III. Pendant cette étape les sulfures s'accumulent dans le substrat végétal. La diminution des valeurs moyennes de concentration de sulfures à la surface du substrat (IV) résulte soit d'une baisse d'activité des BSR ou alors de l'utilisation du développement d'une communauté de bactéries sulfo-oxydantes qui utilisent les sulfures en excès. La disparition des sulfures (V) résulterait de l'arrêt de l'activité bactérienne suite à l'épuisement des lixiviats.

Le stade III n'est pas observable chez *C. nucifera* alors que les concentrations de sulfures à l'intérieur du substrat sont aussi importantes que celles observées chez *R. mangle*. La diffusion vers la surface du substrat des formes libres des sulfures est certainement limitée par la complexation des sulfures, ou alors les formes libres sont utilisées par des bactéries sulfo-oxydantes avant leur diffusion vers la surface. Chez *R. mangle* la production de sulfures ayant lieu plus près de la surface du substrat, cette diffusion est plus facile.

Les fluctuations rapides et la tendance plus lente journalière, décrites précédemment sur le bois naturel (voir II - Chap. 1), ont été observées sur les substrats immergés en mangrove. Les fluctuations journalières de pH et de sulfures en surface sont parfaitement semblables à celles décrites lors de l'étude des bois coulés naturels (voir II - Chap. 1). Elles reflètent l'influence tidale. L'absence de ces fluctuations lorsque les expériences sont réalisées en laboratoire prouve bien qu'elles sont liées à un processus environnemental naturel.

Une des principales informations obtenues à partir de cette étude est l'importance des concentrations de sulfures atteintes au niveau des substrats végétaux. Or ces sulfures représentent d'une part une source d'énergie pour les organismes sulfo-oxydants tels que les ciliés étudiés en partie II – Chap.1, et d'autre part un frein au développement de la plupart des organismes, pour lesquels ils sont toxiques. Les niveaux de sulfures atteints et la dynamique temporelle des sulfures au niveau du bois représentent certainement des facteurs influençant fortement la colonisation des substrats végétaux en milieu marin.

CHAPITRE 2

ETUDE DE LA DYNAMIQUE DE COLONISATION DES SUBSTRATS VEGETAUX EXPERIMENTALEMENT IMMERGES

1 Stratégie expérimentale

En parallèle aux expériences de suivi chimique de substrats végétaux expérimentalement immergés, trois types de dispositifs ont été également immergés sur le site de la Manche-à-Eau, afin de réaliser un suivi biologique. Des prélèvements manuels de substrats végétaux contenus dans ces dispositifs ont été effectués après différentes durées d'immersion afin d'observer la faune associée et de déterminer leur dynamique de colonisation du substrat végétal.

1.1 Dispositif 1

Le premier dispositif utilisé au cours de cette étude est un ensemble de casiers composés d'une structure métallique de dimensions 1 x 0.5 x 0.5 m, recouverte d'un grillage plastifié (Fig. 46).



Figure 46 : Photo d'un casier utilisé pour les expériences d'immersion de substrats végétaux.

Ces casiers ont été remplis de substrats végétaux similaires à ceux du dispositif 1 des mesures chimiques (voir III – Chap. 1) : des bouts de branches de *Rhizophora mangle* (prélevées sur le site de la Manche-à-Eau) ou des bouts de palmes de *Cocos nucifera*, d'environ 30 cm de longueur chacun. Les casiers étaient préparés le jour du prélèvement des substrats végétaux et immergés au plus tard le lendemain, à 50 cm au-dessus du sédiment. Chaque casier préparé ne contenait qu'un seul des deux types de substrat végétal.

Les prélèvements ont été effectués pendant 7 mois à des intervalles maximum d'un mois. En plus de ces suivis, des immersions supplémentaires de plus courtes durées ont été réalisées afin d'affiner le suivi biologique et l'échantillonnage pour le traitement de certains organismes.

Lors du suivi biologique, les organismes colonisant les échantillons prélevés dans les dispositifs, ont été observés à la loupe binoculaire, et identifiés. L'évolution de l'abondance de groupes d'organismes a été estimée en déterminant 3 niveaux d'abondance basés sur l'observation du substrat (Fig. 47).

1.2 Dispositif 2

Le deuxième dispositif est similaire au dispositif 2 des suivis chimiques : des paniers grillagés contenant des paquets de pétioles ou folioles de *C. nucifera* calibrés à 100 g chacun (voir III - Chap. 1). Les conditions d'immersion sont également similaires. Un panier contenant des folioles, et un contenant des pétioles ont été récupérés à 15, 30, 60 et 100 jours d'immersion. L'ensemble de la faune associée au support végétal a été récupérée puis pesée, afin d'estimer la biomasse associée.

1.3 Dispositif 3

Un panier contenant des cubes de calcaire de 2 cm de côté a également été immergé sur le même site que les deux dispositifs précédents, environ 10 cm au-dessus du sédiment. Afin de suivre la colonisation de ce substrat inorganique, des cubes de calcaire ont été prélevés manuellement après 20, 80, 120 et 160 jours d'immersion.

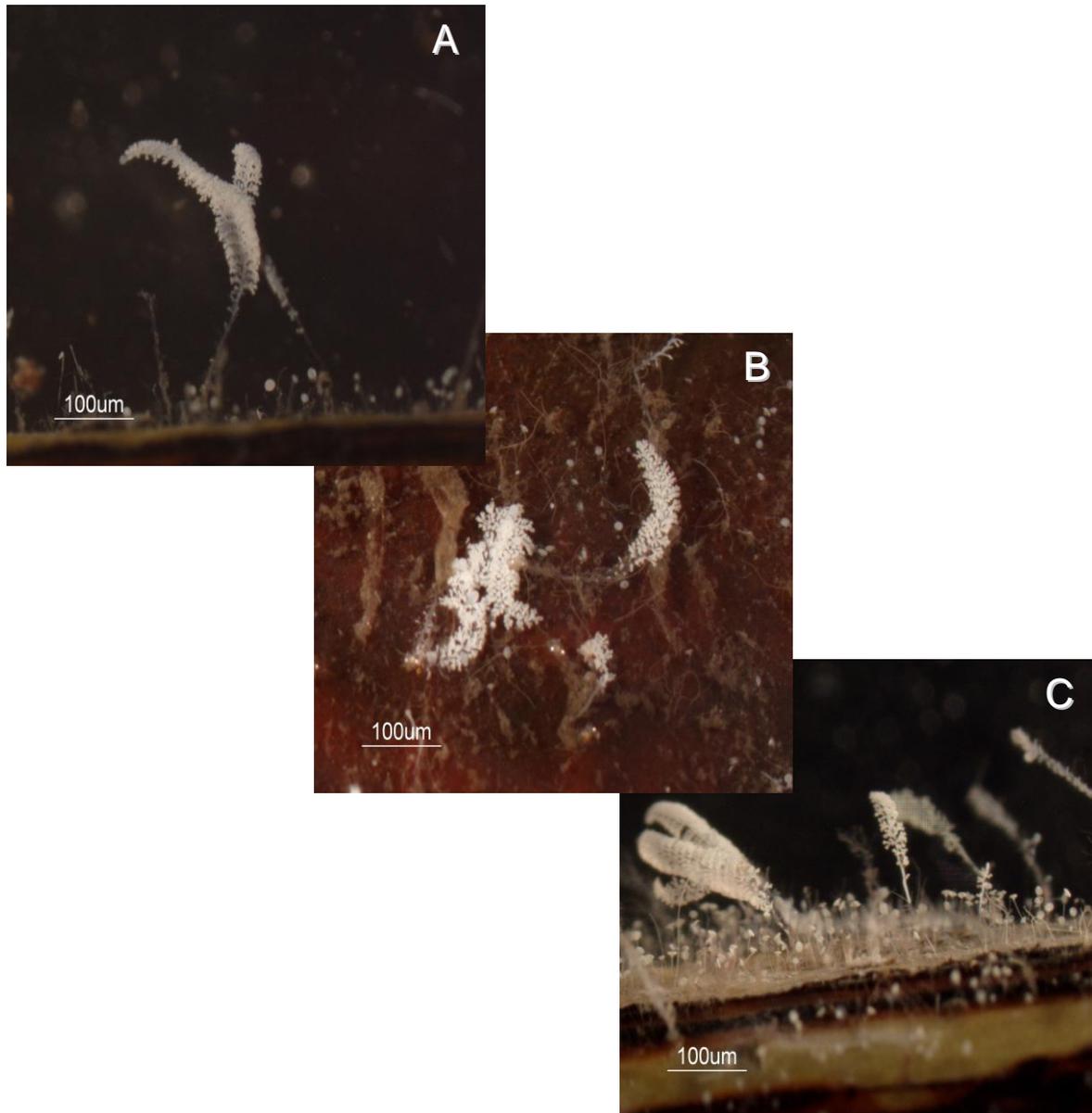


Figure 47 : Exemple de détermination des niveaux d'abondance des groupes d'organismes, ici l'abondance des protistes ciliés *Zoothamnium niveum* et *Pseudovorticella* sp. A : Premier stade d'abondance correspondant à des observations de quelques organismes épars. B : Des groupes d'organismes observables sur plusieurs zones du substrat végétal sont caractéristiques du deuxième stade d'abondance. C : Le troisième stade correspond à une forte représentation des organismes, avec des zones de recouvrement du substrat végétal importantes.

2 Résultats

2.1 La faune colonisant *Cocos nucifera* et *Rhizophora mangle*

Le suivi biologique réalisé sur les substrats végétaux immergés expérimentalement en mangrove révèle la diversité des organismes associés aux substrats végétaux coulés (Tab. 10). Des organismes appartenant à la macrofaune, la méiofaune mais également la microfaune ont été observés.

Phyla	Taxons		Familles	Espèces
ANNELIDA	Polychaeta errantia		Amphinomidae	
			Eunicidae	
			Hesionidae	
			Maldanidae	
			Nereidae	
			Phyllodocidae	
			Syllidae	
	Polychaeta sedentaria		Ampharetidae	
			Cirratulidae	
			Flabelligeridae	
			Sabellidae	
			Serpulidae	
			Spionidae	
			Terebellidae	
ARTHROPODA Crustacea	Malacostraca	Amphipoda		
		Decapoda	Alpheidae	
			Majidae	<i>Mithrax sculptus</i>
			Palamonidae	
		Portunidae	<i>Callinectes</i> sp.	
	Maxillopoda	Isopoda		
		Cirripedia	Balanidae	
		Copepoda		
Ostracoda				
CHORDATA Tunicata	Ascidiacea	Aplousobranchia	Clavelinidae	<i>Clavelina</i> sp.
		Phlebobranchia	Diazonidae	<i>Rhopalaea abdominalis</i>
			Perophoridae	<i>Ecteinascidia turbinata</i>

Tableau 10 : Liste des organismes ayant colonisé les substrats végétaux *Rhizophora mangle* et *Cocos nucifera* durant les expériences d'immersion en mangrove.

Phyla	Taxons		Familles	Espèces
CHORDATA Vertebrata	Teleostei	Perciformes	Bleniidae	<i>Lepidoblennius dispar</i>
			Gobiidae	<i>Lophogobius cyprinoides</i>
CILIOPHORA	Oligohymenophora (Peritrichia)	Sessilida	Vorticellidae	<i>Pseudovorticella</i> sp.
			Zoothamniidae	<i>Zoothamnium niveum</i>
	Heterotrichea	Heterotrichia	Folliculinidae	
			Stentoridae	<i>Stentor</i> sp.
CNIDARIA	Anthozoa	Actinaria	Actinariidae	<i>Viatrix globulifera</i>
ECTOPROCTA	Gymnolaemata	Cheilostomata	Bugulidae	<i>Bugula</i> sp.
		Ctenostoma	Vesiculariidae	<i>Zoobotryon</i> sp.
ENTOPROCTA	Solitaria	Loxosomatida	Loxosomatidae	
	Coloniales	Stolonata	Barentsiidae	
			Pedicellinidae	
MOLLUSCA	Bivalvia	Limoida	Limidae	
		Myoida	Teredinidae	
		Mytiloida	Mytilidae	<i>Brachydontes</i> sp.
		Ostreoida	Ostreidae	<i>Crassostrea rhizophorae</i>
		Veneroida	Tellinidae	
			Veneridae	<i>Anomalocardia</i> sp.
	Gastropoda	Basommatophora	Planorbidae	<i>Planorbis</i> sp.
		Cephalaspidea	Hydatinidae	
		Neogastropoda	Muricidae	<i>Murex brevifrons</i>
		Neotaenioglossa	Caecidae	<i>Caecum</i> sp.
NEMATODA	Adenophorea	Desmodorida	Desmodoridae Stilbonematinae	<i>Eubostrichus diana</i>
		Enoplida	Oncholaimidae	
		Monhysterida	Linhomoeidae	<i>Terchellingia</i> sp.
PLATYHELMINTHES	Turbellaria	Polycladida	Pseudoceritidae	<i>Pseudoceros crozieri</i>
				<i>Pseudoceros texarus</i>
PROTEOBACTERIA	γ -proteobacteria	Thiotrichales	Thiotrichaceae	<i>Beggiatoa</i> sp.

Tableau 10 (suite) : Liste des organismes ayant colonisé les substrats végétaux *Rhizophora mangle* et *Cocos nucifera* durant les expériences d'immersion en mangrove. Ce tableau intègre les organismes collectés sur les dispositifs 1 et 2. Les ciliés *Zoothamnium niveum* et *Pseudovorticella* sp., ainsi que les bactéries filamenteuses *Beggiatoa* sp. ont été identifiés sur la base d'analyses phylogénétiques réalisées par F. Muller. Les nématodes ont été identifiés par L. Maurin et les poissons par J.-L. Bouchereau.

Le développement d'un biofilm bactérien à la surface des substrats végétaux s'est traduit par une coloration blanche de zones plus ou moins étendues du substrat, dès les premiers jours d'immersion. La nature des bactéries formant ce biofilm n'a pas été déterminée. Seules des bactéries filamenteuses blanches ont été identifiées sur la base d'analyses phylogénétiques. Il s'agit de γ -Protéobactéries appartenant au genre *Beggiatoa* (F. Muller, communication personnelle).

Parmi la macrofaune et la méiofaune, de nombreux phyla sont représentés, des protistes ciliés jusqu'aux vertébrés avec les poissons. L'association entre ces organismes et le substrat végétal s'effectue selon diverses modalités, en fonction de l'habitat utilisé par ces organismes. En effet les substrats végétaux choisis offrent divers habitats à la faune colonisatrice. Les palmes de *C. nucifera* offrent la surface lisse du pétiole et des folioles, mais également l'espace libre entre les fibres du pétiole lorsque celles-ci se désolidarisent les unes des autres, au cours du processus de décomposition du substrat végétal. Les branches de *R. mangle* offrent la surface lisse des feuilles, les fissures et crevasses de l'écorce des branches, l'espace entre l'écorce et le bois proprement dit (lorsqu'au cours de sa dégradation l'écorce se détache du reste de la branche), et la cavité centrale de la branche.

La majorité de la faune colonisatrice est composée d'organismes sessiles. Certains se fixent à la surface des substrats végétaux sans distinction entre *C. nucifera* et *R. mangle*, ou entre les branches, les pétioles et les folioles. C'est par exemple le cas des crustacés Balanidae. D'autres organismes sessiles présentent des habitats préférentiels à la surface des substrats végétaux. Le cilié oligohyménophore *Zoothamnium niveum* semble s'installer sur l'écorce de palétuvier de préférence à proximité de fissures et craquelures, et sur les palmes de cocotier, également près de fissures de la palme, ou à la naissance des folioles (Fig. 48a). Ils sont également observés sur les fibres du pétiole de *C. nucifera*, lorsqu'elles sont en contact avec le milieu extérieur (Fig. 48b).

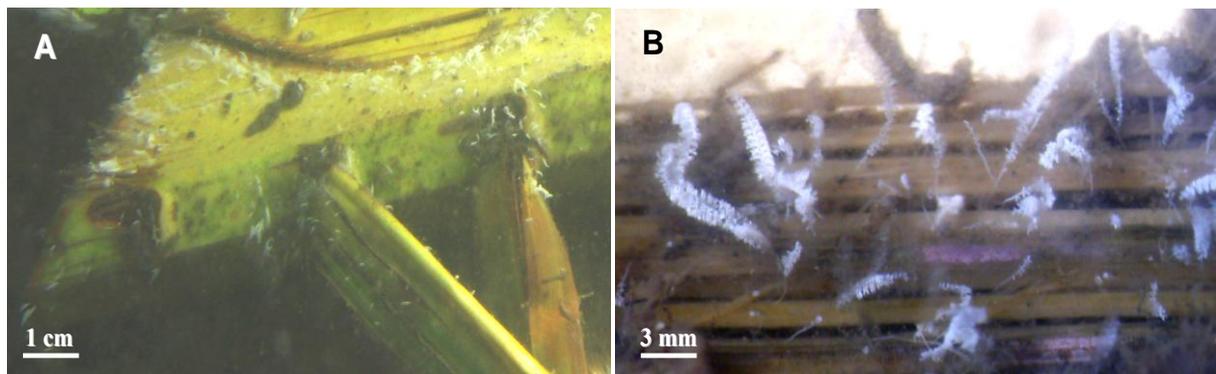


Figure 48 : Photos du cilié *Zoothamnium niveum* fixé à la surface d'une palme de *Cocos nucifera* (A) et sur ses fibres en contact avec l'eau de mangrove (B).

Les organismes qui ne sont pas fixés au substrat végétal, mais qui vivent et se déplacent à proximité de celui-ci, peuvent tout de même présenter un lien étroit avec le substrat. C'est le cas des nématodes qui utilisent des micro-habitats spécifiques de la surface

des substrats végétaux. Ils se logent principalement dans les crevasses et fissures de l'écorce de *R. mangle*, ou dans les fines coupures de l'épiderme de la palme de *C. nucifera*.

Les habitats « internes » du substrat sont disponibles à des niveaux avancés de dégradation du substrat végétal, à partir du 3^{ème} mois d'immersion. Les fibres internes des palmes de *C. nucifera* et l'espace sous l'écorce de *R. mangle* sont colonisés principalement par des annélides polychètes. La cavité centrale des branches de palétuvier peut être couverte de bactéries sulfo-oxydantes *Beggiatoa* sp. (Fig. 49) et elle abrite parfois de petits crabes Majidae.

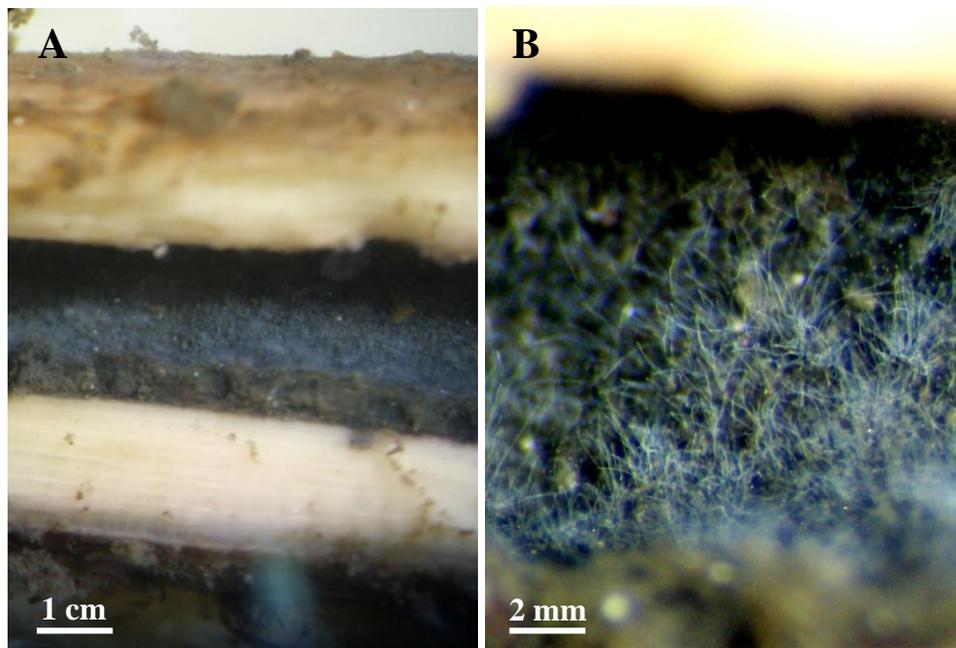


Figure 49 : Photo de la cavité centrale d'une branche de *Rhizophora mangle* colonisée par des bactéries *Beggiatoa* sp. A : Aspect blanc conféré à la cavité de la branche colonisée par les bactéries. B : Gros plan sur les filaments bactériens.

Les poissons associés aux substrats végétaux coulés ne pouvaient être collectés lors des prélèvements manuels. C'est lors de remontée de casiers entiers protégés par un filet, que les téléostéens *Lepidoblennius dispar* et *Lophogobius cyprinoides* ont été collectés. Cependant cette opération de collecte n'ayant pas été réalisée de manière régulière, le suivi de colonisation des poissons n'est pas présenté.

2.2 Les mesures de biomasse

La biomasse associée aux substrats végétaux des dispositifs 2 augmente régulièrement du 15^{ème} au 100^{ème} jour d'immersion (Tab. 11). Elle est toujours plus importante sur les

folioles que sur les pétioles de *C. nucifera*. Après 100 jours d'immersion la biomasse associée aux folioles est 12 fois supérieure à celle associée au pétiole. La faune est nettement dominée par les Balanidae à 15 jours d'immersion, puis par les Sabellidae à 60 jours. Après un mois d'immersion la faune associée aux folioles atteint un poids supérieur à celui du substrat auquel elle est associée.

Support végétal	Temps d'immersion (j)	Poids frais de la faune associée (g)
Pétioles de <i>C. nucifera</i>	15	1,7
	30	8,9
	60	14,1
	100	14,5
Folioles de <i>C. nucifera</i>	15	16,1
	30	29,4
	60	147,1
	100	184,9

Tableau 11 : Mesures de poids frais de la faune associée aux substrats végétaux de 100 g prélevés sur *Cocos nucifera*, après différentes durées d'immersion.

2.3 La dynamique de colonisation de *Cocos nucifera* et *Rhizophora mangle*

Des organismes s'installent à la surface des substrats en seulement 4 jours d'immersion : des ciliés hétérotriches sur les deux types de substrats, et un gastéropode durant une expérience d'immersion de *R. mangle*. Après 7 jours la faune associée au substrat végétal se diversifie considérablement. On peut observer sur les deux types de substrats, des ciliés péritriches et hétérotriches, des annélides polychètes, des crustacés, des ectoproctes et des nématodes. Les ascidies apparaissent après 10 jours et les plathelminthes après 15 jours. De nouveaux organismes continuent de coloniser le substrat jusqu'à 2 mois chez *C. nucifera* et 3 mois chez *R. mangle*. Après ces 2 à 3 mois la composition de la faune change peu. Ce sont les abondances des groupes d'organismes qui varient. Chaque groupe d'organismes respecte sa propre dynamique de colonisation, variable en fonction du substrat végétal considéré (Tabs. 12 - 13).

Substrat végétal et temps d'immersion Organismes collectés (jours)		<i>Cocos nucifera</i>											
		4	7	10	15	20	30	60	90	120	150	180	210
ANNELIDA	Polychaeta errantia				x	x	x	xx	xxx	xxx			
	Polychaeta sedentaria		x	x	xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	x	xx	x
ARTHROPODA Crustacea	Malacostraca		x	x	x	x	xx	xx	xx	x	x	x	x
	Maxillopoda			x	xxx	xxx	xxx	xxx	xxx	x		x	x
	Ostracoda		x					x					
CHORDATA Tunicata	Ascidiacea						xx	xx	xx	xx			
CILIOPHORA	Oligohymenophora		x	xx	xxx	xxx	xx	xx	xx	x	x	x	x
	Heterotrichia	x	x	xx	xx	xx	xx	x	x	x			x
CNIDARIA	Anthozoa							x					x
ECTOPROCTA	Gymnolaemata		x	x		x	x	x	x	x			x
ENTOPROCTA								xx	xx	xx	xxx	x	xx
MOLLUSCA	Bivalvia							x	x	xx	x	x	x
	Gastropoda					x	x	x	x	x			
NEMATODA				x	x			x	x	x	x		x
PLATYHELMINTHES						x		xxx	xx	x	x		

Tableau 12 : Colonisation de *Cocos nucifera* : évolution de l'abondance des groupes d'organismes en fonction de la durée de l'immersion du substrat.

Trois niveaux d'abondance ont été déterminés (voir Fig. 37) et représentés dans le tableau par des croix :

x = niveau 1 = peu d'organismes observés

xx = niveau 2 = organismes modérément représentés

xxx = niveau 3 = de nombreux représentants sont observés.

Substrat végétal et temps d'immersion Organismes collectés (jours)		<i>Rhizophora mangle</i>											
		4	7	10	15	20	30	60	90	120	150	180	210
ANNELIDA	Polychaeta errantia						x	xxx	xx	x	x	x	x
	Polychaeta sedentaria			x	x	x	x	xx	xx	xx	xx	xx	xx
ARTHROPODA Crustacea	Malacostraca		x	x	x	x	x	xxx	xx	xxx	xxx	x	xx
	Maxillopoda		x	x	x	x	x	xxx	xx	xx	x	x	
	Ostracoda		x				x					x	
CHORDATA Tunicata	Ascidiacea			x					xxx	xx	xx	x	x
CILIOPHORA	Oligohymenophora		xx	xxx	xxx	xxx	xxx	xx	xx	xx	x	x	
	Heterotrichia	xx	x	x	xx	x	x				x		
CNIDARIA	Anthozoa							x			x	x	x
ECTOPROCTA	Gymnolaemata				x	x		x	x	x	xx		
ENTOPROCTA							xx						
MOLLUSCA	Bivalvia								xxx	xx	xx	xx	xx
	Gastropoda	x			x			x			x		
NEMATODA				x	x	x	x			x	x	x	x
PLATYHELMINTHES								x			x		

Tableau 13 : Colonisation de *Rhizophora mangle* : évolution de l'abondance des groupes d'organismes en fonction de la durée de l'immersion du substrat.

Trois niveaux d'abondance ont été déterminés (voir Fig. 37) et représentés dans le tableau par des croix :

x = niveau 1 = peu d'organismes observés

xx = niveau 2 = organismes modérément représentés

xxx = niveau 3 = de nombreux représentants sont observés.

Les premiers organismes à coloniser le substrat végétal sont les ciliés hétérotriches appartenant aux familles des Folliculinidae et des Stentoridae. Les deux familles sont présentes dès le 4^{ème} jour d’immersion sur le palétuvier, tandis que les Stentoridae ne rejoignent les Folliculinidae qu’au 7^{ème} jour sur *C. nucifera*. Cette population de ciliés est maintenue pendant 4 mois de manière continue sur *C. nucifera*, tandis qu’elle n’est plus observable sur *R. mangle* après un mois d’immersion mais réapparaissent au 5^{ème} mois.

D’autres ciliés apparaissent après le 7^{ème} jour d’immersion : les ciliés oligohyménoptères *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp. (voir II – Chap. 2). Ils sont le plus souvent accompagnés de bactéries *Beggiatoa* sp. (Fig. 50). Leur abondance augmente jusqu’au 20^{ème} jour d’immersion de *C. nucifera* et le 30^{ème} sur *R. mangle* avant de revenir au niveau 1 d’abondance après 4 à 5 mois d’immersion.

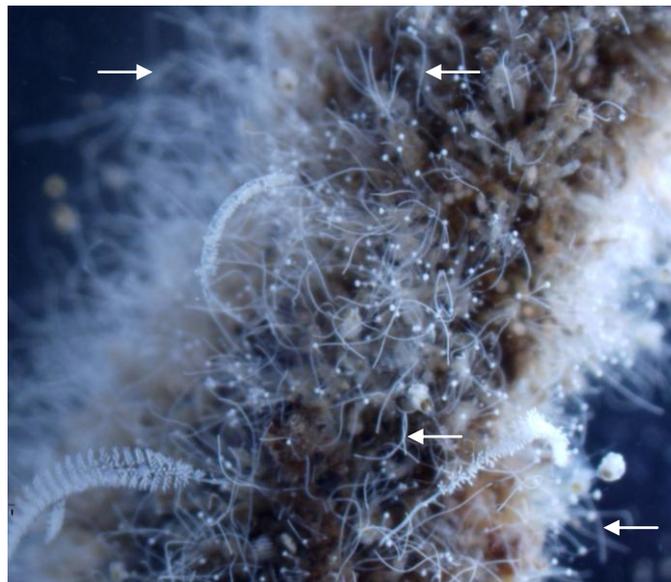


Figure 50 : Photo d’une brindille de *Rhizophora mangle* recouverte de ciliés oligohyménoptères et de protéobactéries filamenteuses *Beggiatoa* sp. (flèches).

Les annélides polychètes sédentaires font leur apparition à 7 jours chez *C. nucifera* et 10 jours chez *R. mangle*, puis les polychètes errantes à 15 jours chez *C. nucifera* et 30 chez *R. mangle*. Leur nombre augmente considérablement à 2 mois d’immersion, avec deux familles majoritaires : les Sabellidae et les Serpulidae. Le 3^{ème} mois est celui de leur diversification : de nombreuses familles sont, à partir de ce moment, représentées à la surface et dans les micro-habitats « internes » du substrat, décrits plus haut.

Parmi les crustacés, les représentants les plus abondants sont les Balanidae. De plus ils colonisent en plus grand nombre *C. nucifera* que *R. mangle*. Les isopodes également ont une préférence pour *C. nucifera* sur lequel ils sont observés à 2 mois d'immersion. Ils ne colonisent pas *R. mangle* pendant la durée du suivi réalisé.

Les bivalves apparaissent après 2 mois d'immersion de *C. nucifera*. Ils sont composés de représentants des familles Limidae, Ostreidae, Tellinidae et Veneridae. Seul un représentant des Mytilidae est observé au bout de six mois d'immersion : *Brachydontes* sp. Chez *R. mangle* les bivalves apparaissent uniquement au bout de 6 mois d'immersion et sont composés uniquement de Mytilidae *Brachydontes* sp. et de Teredinidae.

Les ascidies, ectoproctes, gastéropodes, nématodes et plathelminthes ne semblent pas suivre de colonisation régulière.

2.4 La dynamique de colonisation des cubes de calcaire

Les cubes de calcaire prélevés dans les paniers (dispositif 3) ont été colonisés par une grande diversité d'organismes. Après 20 jours d'immersion des paniers, la surface des cubes est considérablement colonisée (Fig. 51).

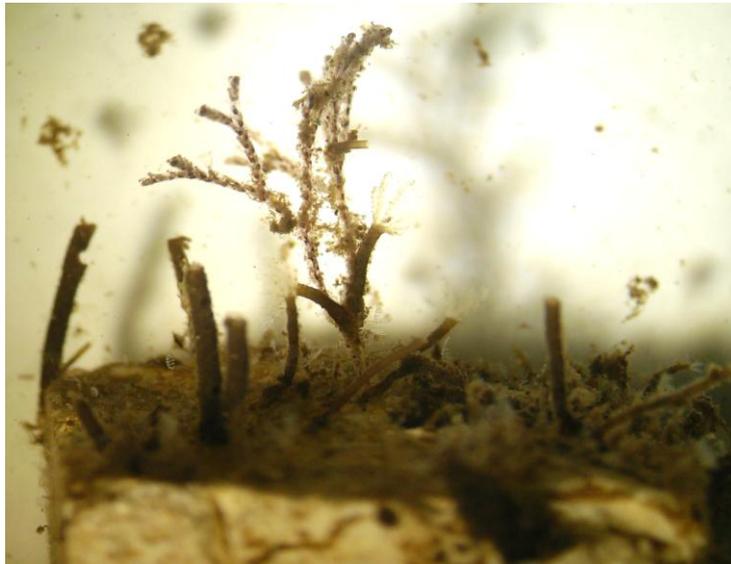


Figure 51 : Photo de la surface d'un cube de calcaire collecté après 20 jours d'immersion en mangrove sur le site de la Manche-à-Eau.

La plupart des organismes observés à la surface de *C. nucifera* et *R. mangle*, le sont également sur les cubes de calcaire (Tab. 14). Seuls les ostracodes, les plathelminthes et les mollusques gastéropodes n'ont jamais été observés sur ce substrat minéral. Cependant le passage de mollusques gastéropodes a été révélé par la présence de leurs pontes.

Des ciliés oligohyménophores sont observés à la surface du substrat calcaire à 20 jours d'immersion. Il s'agit d'autres ciliés que *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp. Ces deux espèces symbiotiques ne sont observables à 120 jours d'immersion, représentées par quelques individus.

Substrat végétal et temps d'immersion (jours)		cubes de calcaire			
		20	80	120	160
Organismes collectés					
ANNELIDA	Polychaeta errantia			x	
	Polychaeta sedentaria	xxx	xxx	xx	xx
ARTHROPODA Crustacea	Malacostraca	x	x	xx	x
	Maxillopoda	x	xx	x	x
	Ostracoda				
CHORDATA Tunicata	Ascidiacea		x	x	
CILIOPHORA	Oligohymenophora	x	x	x	x
	<i>Z. niveum</i> + <i>Pseudovorticella</i> sp.			x	
	Heterotrichia	x	xx	xxx	xxx
CNIDARIA	Anthozoa		x		
ECTOPROCTA	Gymnolaemata	x	x	x	
ENTOPROCTA		x	xx	xx	xxx
MOLLUSCA	Bivalvia				x
	Gastropoda				
NEMATODA		x	x	x	
PLATYHELMINTHES					

Tableau 14 : Colonisation des cubes de calcaire : évolution de l'abondance des groupes d'organismes en fonction de la durée de l'immersion du substrat. Trois niveaux d'abondance ont été déterminés (voir Fig. 47) et représentés dans le tableau par des croix : x = niveau 1 = peu d'organismes observés ; xx = niveau 2 = organismes modérément représentés ; xxx = niveau 3 = de nombreux représentants sont observés.

3 Discussion

3.1 Les organismes colonisant les substrats végétaux en mangrove

Les organismes capables de coloniser les substrats végétaux coulés en mangrove sont nombreux et diversifiés. Cette diversité, ainsi que l'abondance des différents groupes d'organismes identifiés varient avec la durée d'immersion du substrat, c'est-à-dire au cours de son processus de dégradation. Ce dernier est à l'origine de la formation de nombreux habitats au niveau du substrat, tels que l'espace entre les fibres de *C. nucifera* ou sous l'écorce de *R. mangle*.

La biomasse associée au substrat végétal coulé augmente progressivement avec le temps. Bien que certains organismes présentent des préférences pour certains supports, la différence de biomasse entre le pétiole et les folioles de la palme provient plus probablement de l'importante différence de surface disponible pour l'installation des organismes. A partir de deux mois d'immersion la biomasse associée aux 100 g de folioles, dépasse le poids du substrat lui-même. Nos observations à plus long terme permettent de dire que la biomasse diminue à nouveau à partir de 6 mois d'immersion.

3.2 Les organismes colonisant le substrat inorganique

L'expérience réalisée avec les cubes de calcaire révèle que de nombreux organismes que l'on retrouve sur les substrats végétaux peuvent coloniser d'autres types de substrats, tels un substrat inorganique. L'objectif principal de cette expérience était de permettre d'identifier les organismes colonisant le substrat végétal simplement pour le fait qu'il soit un substrat dur, et non pour la présence de sulfures. Cependant la présence de *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp., organismes associés à des bactéries sulfo-oxydantes, informe sur la présence de sulfures au niveau de ce substrat également. Le dispositif, peu surélevé par rapport au sédiment soufré, a probablement été contaminé par ce dernier. Les sulfures étant rapidement oxydés au contact de l'eau, la contamination s'est certainement effectuée par mise en suspension de sédiment qui s'est ensuite retrouvé en contact avec le dispositif immergé.

Cette expérience ne reste cependant pas dépourvue d'intérêt puisqu'elle informe sur cette possibilité de contamination par les sédiments. Notons que les ciliés sulfo-oxydants ne sont détectables qu'au prélèvement effectué à 120 jours d'immersion du substrat, et non au

prélèvement suivant. Cela indique que le phénomène de contamination ne dure qu'un instant et ne permet pas le maintien de la population au-delà d'un mois.

3.3 Pourquoi les organismes colonisent-ils les substrats végétaux coulés en mangrove ?

Wolff (1979) a identifié plusieurs utilisations des substrats végétaux en milieu profond : un substrat dur pour la fixation d'organismes sessiles, un abri, une source de nourriture, ou un habitat soufré réduit. La détermination de l'utilisation que fait chaque organisme du substrat végétal en mangrove peut passer par l'analyse de l'ensemble des environnements fréquentés par ces organismes dans la mangrove. Cependant en mangrove d'autres substrats durs sont disponibles, tels que les racines de palétuviers, et d'autres habitats soufrés réduits également, tels que le sédiment de mangrove.

Quatre types d'organismes ont été déterminés à partir des environnements qu'ils utilisent en mangrove : (1) les organismes spécifiques des débris végétaux en décomposition ; (2) les organismes des environnements soufrés réduits qui colonisent les débris végétaux coulés et le sédiment de mangrove, c'est-à-dire des environnements réduits, sans préférence pour une nature de substrat (dur ou meuble) ; (3) les organismes spécifiques des substrats durs qui colonisent les débris végétaux coulés et les racines de palétuvier, peu importe qu'ils soient soufrés réduits ou pas ; (4) les organismes ubiquistes qui sont observés sur les racines de palétuvier, dans le sédiment et sur les débris végétaux coulés. Ils sont capables de coloniser les substrats durs ou meubles et les environnements soufrés réduits ou pas.

- Les organismes spécifiques des débris végétaux coulés

Les ciliés oligohyménophores *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp. sont des organismes spécifiques des débris végétaux coulés en mangrove. Leur présence sur les cubes de calcaire au moment de leur probable contamination par les sédiments, confirme que ces organismes sessiles sulfo-oxydants nécessitent la combinaison à la fois du substrat dur pour leur fixation et des sulfures pour leurs symbiotes.

Les Teredinidae sont également spécifiquement associés aux substrats végétaux coulés en mangrove, mais leur présence sur ces substrats ne s'explique pas par la nécessité d'un environnement soufré réduit. Les substrats végétaux ont une double fonction pour ces organismes. Ils leur servent à la fois d'habitat et de nourriture. En effet les bivalves foreurs de la famille des Teredinidae se logent à l'intérieur du bois dont ils se nourrissent à l'aide de

bactéries symbiotiques localisées au niveau de leur branchies (Waterbury *et al.*, 1983 ; Nishimoto *et al.*, 2009). Tous les substrats végétaux ne semblent pas adaptés à l'installation des Teredinidae. On ne les retrouve pas au niveau des racines de palétuvier vivantes immergées, ni au niveau des palmes de *C. nucifera*, substrat dont la consistance est inadaptée au creusage des loges par les foreurs.

- Les organismes des environnements soufrés réduits

Les nématodes dominent la méiofaune de mangrove (Kathiresan et Bingham, 2001). La plupart d'entre eux sont tolérants aux sulfures tandis que d'autres, vivant en symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes dépendent des sulfures pour le développement de leur symbiotes (Hentschel *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 2004a). C'est le cas d'un des nématodes colonisant les débris végétaux, facilement reconnaissable à l'aspect de son manteau bactérien : *Eubostrichus diana* (Ott *et al.*, 2004b). Ce nématode trouve les conditions favorables au développement de ses symbiotes sulfo-oxydants sur le substrat végétal. Il y trouve également une source de nourriture et un abri, tout comme les nématodes non symbiotiques. En effet la plupart des nématodes étaient logés dans de petites fissures du substrat végétal, ou abrités sous des ascidies. Au sein des nématodes les régimes alimentaires sont très variés. Les nématodes de la famille des Oncholaimidae sont des carnivores, et les *Terschellingia* de la famille des Linhomoeidae, des détritivores. Le substrat végétal en décomposition et l'ensemble des organismes le colonisant peuvent donc représenter une source de nourriture abondante pour ces nématodes.

Les copépodes sont également abondants dans le sédiment de mangrove. Ils sont aussi observés sur les feuilles de palétuvier en décomposition dans la litière (Torres-Pratz et Schizas, 2007). Certains sont même capables de se nourrir de cette litière (Nagelkerken, 2008), des bactéries associées et des flocons résultants de la lixiviation des feuilles de palétuvier en décomposition (Camilleri et Ribí, 1986). Les copépodes observés sur les débris végétaux coulés peuvent donc trouver d'importantes quantités de matière organique en décomposition, de bactéries, et éventuellement de flocons formés à partir des lixiviats des débris végétaux. Les copépodes se nourrissant de protistes trouvent également de quoi se nourrir sur le substrat végétal, puisque de nombreux protistes colonisent ce substrat. Le substrat végétal semble être utilisé par les copépodes principalement comme source de nourriture. Cependant il joue très probablement également le rôle d'abri, comme le proposait Wolff (1979) pour les copépodes observés autour des débris végétaux coulés en milieu profond.

Les ostracodes de la mangrove de Guadeloupe vivent dans le sédiment soufré réduit (Renaud-Mornant et Gourbault, 1984) et sont occasionnellement observés à la surface des débris végétaux en décomposition. L'existence d'ostracodes associés aux bois coulés a été décrite en milieu profond (Maddocks and Steineck, 1987), révélant la diversité d'espèces, dont certaines sont considérées comme endémiques aux bois coulés des profondeurs. Les nombreuses opportunités alimentaires dont ils peuvent profiter au niveau du bois y sont également énoncées. La présence d'ostracodes associés aux débris végétaux coulés en mangrove est certainement liée à l'aspect alimentaire.

Les protéobactéries du genre *Beggiatoa* sont connues pour réaliser l'oxydation des sulfures (Schmidt *et al.*, 1987 ; Nelson et Hagen, 1995). Elles vivent à la surface des sédiments réduits. Leur présence sur les débris végétaux coulés est indicatrice de la présence d'émissions de sulfures.

- Les organismes des substrats durs

Ce groupe rassemble principalement des organismes sessiles (ascidies, certains bivalves, cirripèdes, cnidaires, ectoproctes, entoproctes et ciliés hétérotriches) et un groupe d'organismes libres (les isopodes). Les organismes sessiles sont contraints de trouver un substrat dur permettant leur fixation. Les ascidies, bivalves, cirripèdes, cnidaires et ectoproctes semblent utiliser les substrats végétaux coulés principalement pour leur fixation. Les ascidies, bivalves, cirripèdes, cnidaires et ectoproctes sont capables de vivre sur les racines de palétuvier dans la mangrove de Guadeloupe (Toffart, 1983) mais également sur divers débris végétaux représentant des îlots dans le sédiment meuble de mangrove (Kathiresan and Bingham, 2001). Les bivalves Limidae, Mytilidae et Ostreidae sont fixés par leur byssus au substrat dur que représentent les racines de palétuvier ou les débris végétaux coulés. Les bivalves Veneridae sont principalement fousseur, mais parfois nicheurs. Sur les débris végétaux coulés ils étaient logés dans des fissures. Ces organismes suspensivores trouvent de quoi se nourrir autour du bois. La collecte sur les débris provenant de *C. nucifera*, d'un bivalve de la famille des Tellinidae, organismes strictement fousseurs, reste inexplicée.

Aucun signalement de cilié hétérotriche ou d'entoprocte sur les racines de palétuvier n'est disponible dans la littérature, mais leur présence sur les cubes de calcaire et les données disponibles laissent penser qu'ils sont capables de coloniser une grande variété de substrats durs. Les entoproctes sont des organismes encroûtants. Plusieurs études ont utilisé cette propriété pour réaliser la collecte d'individus sur divers substrats : des bouts de bois (Canning

et Carlton, 2000) ou encore du verre (Iseto, 2002)... Ils sont également des épibiontes d'organismes tels que des annélides polychètes (Nielsen, 1996) ou des ascidies.

Les ciliés hétérotriches des familles Stentoridae et Folliculinidae sont connus pour coloniser divers substrats durs. Les Folliculinidae par exemple peuvent coloniser des coquilles (Andrews, 1952 ; Matthews, 1953), des rochers (Prime-Habidja and Matonickin, 2005), des algues (Andrews, 1944 a et b), des macrophytes aquatiques (Andrews 1950) ou des ascidies (Andrews, 1948 ; Matthews, 1953). Ils sont considérés comme des organismes pionniers (Prime-Habidja and Matonickin, 2005). Ils colonisent les emplacements où la compétition est limitée (Aladro-Lubel, 1999).

Les isopodes sont des organismes mobiles colonisant les racines de palétuvier (Toffart, 1983) et les débris végétaux coulés dans la mangrove en Guadeloupe. Au cours de nos expériences d'immersion de substrats végétaux les isopodes n'ont été observés que sur le cocotier. Ils étaient placés sous les palmes. Aucun isopode n'a été observé logé à l'intérieur du substrat. Ils semblent trouver un refuge sous les palmes de cocotier, certainement plus adéquates que les branches de palétuvier. Cette utilisation du substrat végétal comme refuge par les isopodes avait été proposée par Wolff (1979).

- Les organismes ubiquistes

Il s'agit des amphipodes, bivalves, décapodes, gastéropodes, plathelminthes et polychètes. Ces organismes sont capables de coloniser divers types d'environnements et semblent utiliser le substrat végétal principalement comme une source de nourriture. La plupart des prédateurs intègrent ce groupe. Ils viennent se nourrir d'organismes colonisant le substrat végétal. C'est le cas du turbellarié *Pseudoceros crozieri* qui se nourrit exclusivement des colonies d'*Eicteinascidia* que l'on retrouve aussi bien sur les racines de palétuvier que sur les débris végétaux coulés. D'autres fonctions du substrat végétal ne sont pas exclues. Le gastéropode Muricidae *Murex brevifrons* se nourrit de bivalves sur les débris végétaux coulés mais s'en sert également pour attacher ses pontes. Les polychètes, en plus de se nourrir sur les débris végétaux coulés pour certaines, s'y abritent également. Elles sont capables de coloniser les surfaces lisses, les fissures, crevasses, et les habitats « internes » du substrat végétal. Nos observations confirment celles de Wolff (1979) qui proposait que les annélides polychètes errantes seraient les organismes utilisant au mieux le substrat végétal comme abri. Les gobies et les crabes du genre *Callinectes* sont plus abondants lorsque des débris de bois sont disponibles dans le milieu dans lequel ils vivent (Everett et Ruiz, 1993). Ils utilisent le bois comme refuge, comme le confirment nos observations *in situ*.

Toutes ces utilisations du substrat végétal sont rappelées dans le tableau 15.

				Utilisation des substrats végétaux coulés en mangrove			
				substrat	abri	nourriture	sulfures
Organismes spécifiques des substrats végétaux coulés	CILIOPHORA	Oligohymenophora		x			x
	MOLLUSCA	Bivalvia	Myoida		x	xx	
Organismes des environnements soufrés réduits	ARTHROPODA Crustacea	Maxillopoda	Copepoda			xx	
		Ostracoda				xx	
	NEMATODA				x	xx	x
	PROTEOBACTERIA	Thiotrichales					x
Organismes des substrats durs	ARTHROPODA Crustacea	Malacostraca	Amphipoda		x	x	
			Isopoda		x		
		Maxillopoda	Cirripedia	x			
	CHORDATA Tunicata	Ascidiacea		x			
	CILIOPHORA	Heterotrichea		x		x	
	CNIDARIA	Anthozoa	Actinaria	x			
	ECTOPROCTA	Gymnolaemata		x			
	ENTOPROCTA			x			
MOLLUSCA	Bivavia (autres que foreurs)		x		x		
Organismes ubiquistes	ANNELIDA	Polychaeta errantia			x	xx	
		Polychaeta sedentaria		x		x	
	ARTHROPODA Crustacea	Malacostraca	Décapoda			xx	
	CHORDATA Vertebrata	Teleostei	Perciforme		x		
	MOLLUSCA	Gastropoda		x		x	
	PLATYHELMINTHES	Turbellaria				x	

Tableau 15 : Propositions d'utilisation des substrats végétaux coulés par les organismes qui le colonisent. Dans la colonne nourriture, une croix indique la capacité à se nourrir sur les débris végétaux et les deux croix indiquent la capacité à se nourrir des débris végétaux.

Tous les organismes trouvent un intérêt à coloniser le substrat végétal. Mais leur présence sur ce substrat en décomposition implique leur exposition à d'importantes concentrations en sulfures (voir chapitre précédent), or ceux-ci sont toxiques. Cette exposition concerne tout particulièrement les organismes sessiles et ceux qui vivent en contact étroit avec

le substrat. Ils présentent certainement des systèmes d'adaptation leur permettant d'y résister. Parmi ces adaptations l'oxydation des sulfures est la plus répandue. Sur le substrat végétal, certains organismes ont développé cette adaptation : *Beggiatoa* sp., les symbiotes d'*Eubostrichus diana*, de *Pseudovorticella* sp. et de *Zoothamnium niveum*. D'autres organismes colonisant les substrats végétaux sont probablement également capables de se protéger des sulfures par ce procédé. L'étude suivante a pour objectif de déterminer s'il existe d'autres organismes colonisant les substrats végétaux coulés, qui utilisent la symbiose comme adaptation à leur environnement.

CHAPITRE 3

RECHERCHE DE SYMBIOSES SULFO-OXYDANTES CHEZ LES ORGANISMES COLONISANT LES SUBSTRATS VEGETAUX EXPERIMENTALEMENT IMMERGES

1 Matériels et méthodes

Les éventuelles symbioses bactériennes de nature sulfo-oxydante, ont été recherchées chez les organismes associés aux substrats végétaux coulés, à l'aide des observations à la microscopie électronique (MEB et MET) et d'hybridations *in situ* de sondes oligonucléotidiques (Tab. 16).

Organismes		MEB	MET	Hybridations <i>in situ</i>
ANNELIDA	Polychaeta errantia	x		x
	Polychaeta sedentaria	x		x
ARTHROPODA Crustacea	Malacostraca	Amphipoda	x	x
		Décapoda	x	
		Isopoda		
	Maxillopoda	Cirripedia		
		Copepoda		
	Ostracoda			
CHORDATA Tunicata	Ascidiacea	x		x
CILIOPHORA	Oligohymenophora	x	x	x
	Heterotrichea	x		
CNIDARIA	Anthozoa	x		
	Actinaria			
ECTOPROCTA	Gymnolaemata	x		
ENTOPROCTA		x	x	x
MOLLUSCA	Bivalvia			x
	Gastropoda	x		
NEMATODA		x		x
PLATYHELMINTHES	Turbellaria	x		x

Tableau 16 : Récapitulatif des analyses effectuées sur les groupes d'organismes ayant colonisé les substrats végétaux expérimentalement immergés sur le site de la Manche-à-Eau.

1.1 Microscopie électronique

Pour la MEB les échantillons ont été traités comme indiqué en partie II – Chap. 2. Pour les observations au microscope électronique à transmission les échantillons ont été traités selon deux protocoles. Certains échantillons ont été inclus en résine LRWhite, avant la réalisation de coupes fines, comme décrit en partie II – Chap. 2, tandis que les autres ont été préparés pour une inclusion en résine Epon Araldite. Dans ce cas, les échantillons ont été préfixés pendant au moins 2 heures à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde 2% dans du tampon cacodylate 0,1 M pH 7,2 dont l'osmolarité a été réglée à 900 mOsm. Ils ont ensuite été fixés dans une solution de tétraoxyde d'osmium 1 % dans le même tampon pendant 45 min à température ambiante, puis rincés à l'eau distillée. Une post-fixation dans de l'acétate d'uranyle aqueux à 2 % pendant une heure précède l'inclusion dans de la résine Epon-Araldite. La coupe des blocs et la réalisation du contraste à base d'acétate de cuivre sont décrits en partie II – Chap. 2. L'observation a été réalisée avec un microscope électronique à transmission Leo 912 à une tension d'accélération de 120 kV.

1.2 Techniques d'hybridations *in situ*

Tous les échantillons sur lesquels les techniques d'hybridations devaient être appliquées, ont été fixés pendant 1 à 3 heures à 4 °C dans une solution de PFA 4 % dans de l'eau de mer, rincés trois fois à l'eau de mer, puis déshydratés à l'éthanol. Ensuite différents protocoles ont été adoptés, en fonction de la taille des organismes, de l'objectif de la manipulation et de l'efficacité des techniques appliquées. Dans certains cas une coloration DAPI était combinée aux hybridations, par ajout de DAPI (Diamidino-4',6-phénylindol-2-dichlorhydrate) au moment du montage des lamelles afin de colorer l'ADN. Dans tous les cas de figure les observations ont été réalisées avec un microscope à épifluorescence epi 80i (Nikon, France).

1- Les échantillons les plus gros ont été déshydratés jusqu'à l'éthanol 100° puis inclus dans des blocs de paraffine. Des coupes de tissus de 4 µm d'épaisseur ont été réalisées au microtome puis collées sur des lames Superfrost. Ces lames ont ensuite été traitées par la technique du FISH, technique d'hybridation rapide et adaptée aux coupes semi-fines. Pour cela les lames ont été déparaffinées au toluène, les tissus réhydratés par des bains d'éthanol à concentration décroissante, puis d'eau distillée. Les bains successifs de HCl (0,2 M à température ambiante), de tampon Tris-HCl (20 mM à température ambiante), puis de

Protéinase K (0,5 µg/mL à 37 °C) permettent de perméabiliser les membranes avant le dépôt des amorces (3 ng/µl de tampon d'hybridation à 20 % de formamide) sur les lames. L'hybridation s'effectue en chambre d'incubation à 46 °C pendant 3 heures. A la fin de l'incubation les amorces non hybridées sont éliminées dans un tampon de lavages (20 % de formamide, 48 °C, 15 minutes). Une goutte de milieu de montage fluorescent est déposée sur chaque lame avant la pose des lamelles pour l'observation au microscope à épifluorescence epi 80i (Nikon, France). Les fluorochromes sont excités à une longueur d'onde de 550 nm et émettent à 570 nm. Cinq sondes oligonucléotidiques différentes ont été utilisées afin de détecter la présence de bactéries et de déterminer le groupe auquel elles appartenaient : EUB 338, amorce universelle ciblant la plupart des eubactéries, ALF968, BET42a, DSS658 et GAM42a, amorces spécifiques permettant de déterminer le groupe auquel appartiennent les bactéries, et NON338 servant de contrôle négatif (Sekar *et al.*, 2004) [Tab. 17]. Le fluorochrome utilisé est la cyanine (Cy3).

amorce	séquence	cible
EUB338	5'-GCTGCCTCCCGTAGGAGT-3'	eubactéries
ALF968	5'-GGTAAGGTTCTGCGCGTT-3'	α-Protéobactéries
BET42a	5'-GCCTTCCCACCTTCGTTT-3'	β-Protéobactéries
DSS658	5'-TCCAATTCCCTCTCCCAT-3'	δ-Protéobactéries
GAM42a	5'-GCCTTCCCACATCGTTT-3'	γ-protéobactéries
NON338	5'-ACTCCTACGGGAGGCAGC-3'	contrôle négatif

Tableau 17 : Liste des séquences oligonucléotidiques utilisées pour les hybridations *in situ*.

2- Les organismes de plus petite taille, ont été inclus de préférence dans de la résine LRWhite selon le protocole de Gros et Maurin (2008) et la technique du CARD-FISH a été appliquée plutôt que le FISH, comme décrit en partie II – Chap. 2.

3- Pour certains organismes chez lesquels l'ectosymbiose étaient suspectée mais pour lesquels les observations en MEB n'étaient pas concluantes (décollement des bactéries au cours de la préparation de l'échantillon), les hybridations ont été réalisées sans inclusion et coupes préalables. L'organisme entier a été traité selon les techniques de FISH ou de CARD-FISH décrits plus haut et en partie II – Chap. 2. Dans ce cas d'hybridations, l'amorce universelle eubactérienne EUB 338 a été utilisée.

2 Résultats

Sur l'ensemble des observations réalisées, la présence de bactéries à la surface de nombreux organismes a été notée. Dans la majorité des cas, le nombre limité des bactéries et l'absence d'organisation de celles-ci ont permis de conclure rapidement à une colonisation non spécifique des organismes.

Des associations bactériennes organisées ont été détectées chez 4 représentants des ciliés oligohyménophores, deux des entoproctes et un des nématodes Desmodoridae Stilbonematinae. Parmi les ciliés oligohyménophores on retrouve *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp., pour lesquels l'association bactérienne a été décrite en partie II – Chap. 2, mais aussi deux autres espèces, non identifiées. Chez les entoproctes, un représentant de la famille des Loxosomatidae, un de la famille des Pedicellinidae et deux autres espèces non identifiées présentent une association bactérienne. Le nématode Stilbonematinae observé sur les débris végétaux est *Eubostrichus diana*.

2.1 Les protistes ciliés

Les observations en MEB ont permis de mettre en évidence une association bactérienne chez deux protistes ciliés autres que *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp. dont les associations symbiotiques sont déjà abordées en II – Chap. 2. Ces protistes n'ont pas été identifiés.

Le premier d'entre eux possède une branche centrale à partir de laquelle se développent en position alternée des branches secondaires, portant des zoïdes, eux-mêmes placés en position alternée sur ces branches. (Fig. 52a). La colonie observée est semi-rétractée : certains zoïdes sont rétractés, mais la branche centrale ne l'est pas. Les zoïdes, de forme allongée, font en moyenne 50 μm de long (Fig. 52b). Il semble qu'il existe une progression de la longueur des zoïdes de l'extrémité distale vers l'extrémité proximale des branches secondaires. Les zoïdes deviennent plus petits quand on s'éloigne de la partie proximale de la branche secondaire (Fig. 52a). Les bactéries associées recouvrent l'ensemble des branches et des zoïdes du cilié. Le disque adhésif n'étant pas observable sur l'échantillon, il n'a pas été possible de déterminer si celui-ci était également couvert de bactéries. Les bactéries sont agencées en une couche simple de cellules fixées sur leur longueur, positionnées de manière organisée les unes par rapport aux autres. Elles sont en forme de bâtonnets d'environ 2 μm de long (Fig. 52b) quelque soit la zone observée.

Le deuxième protiste est également un cilié colonial puisqu'il présente plusieurs zoïdes, portés par un long pédoncule d'environ 350 μm (Fig. 52c). Les zoïdes sont ovoïdes, d'environ 70 μm de large (Fig. 52d). Ils sont totalement recouverts de bactéries en bâtonnet d'environ 2 μm de long. Le pédoncule est dépourvu de bactéries dans sa partie basale non repliée, placée sous les zoïdes, tandis qu'il en est recouvert dans sa partie repliée, au-dessus des zoïdes. L'agencement des bactéries est tout à fait particulier. Ces dernières recouvrent le pédoncule de manière uniforme en une couche unique de cellules bien organisées entre elles, tandis que sur les zoïdes elles respectent un agencement très strict en lignes superposées, formant des stries à la surface des zoïdes, en zigzag (Fig. 52e).

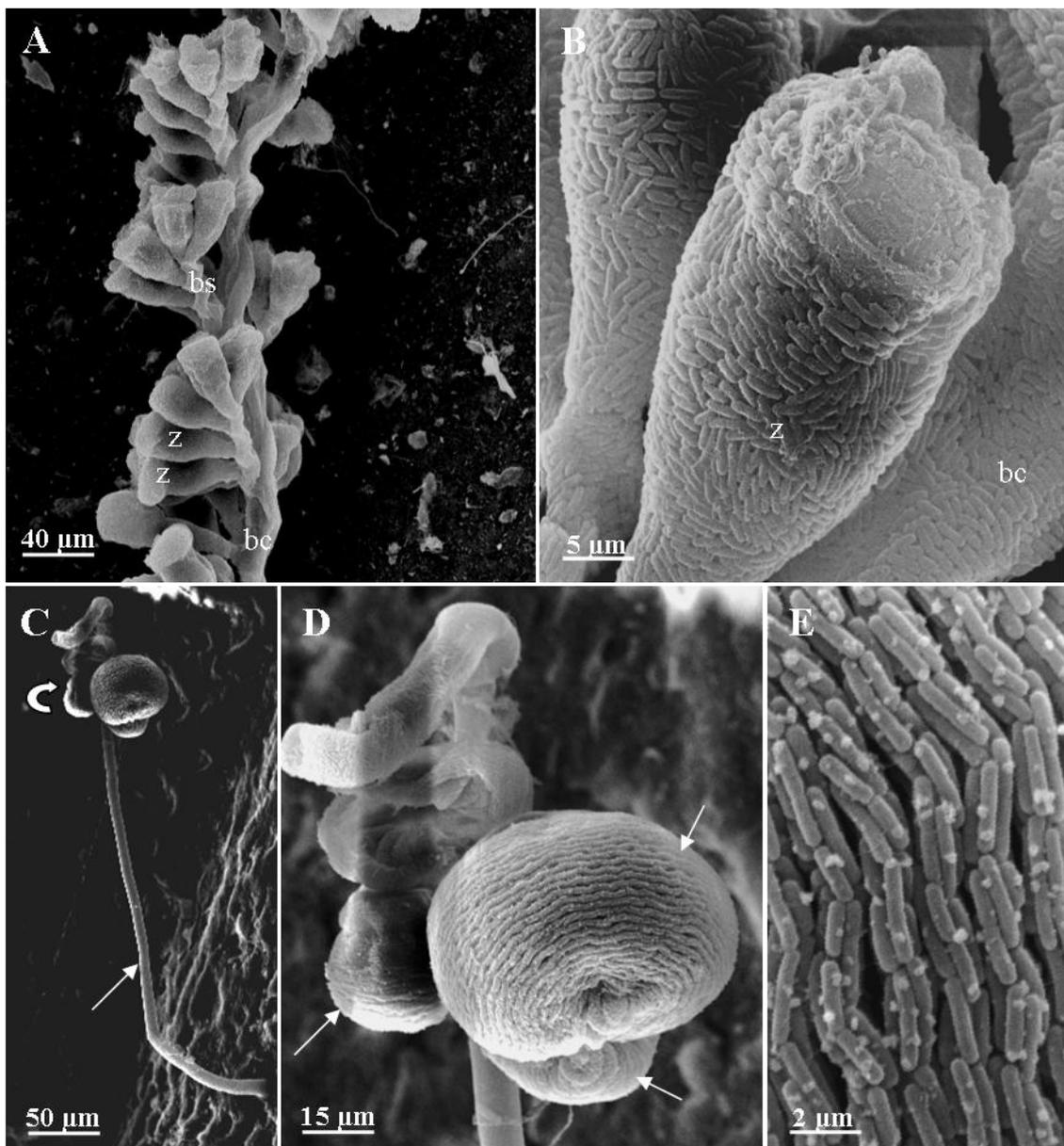


Figure 52 (page précédente) : Micrographies électroniques à balayage de deux ciliés coloniaux vivant en association avec des bactéries. A : Le premier cilié comporte une branche centrale (bc) donnant des branches secondaires (bs) qui portent les zoïdes (z). B : Les zoïdes et les branches sont totalement recouverts de bactéries. C : Le deuxième cilié comporte un pédoncule dont la partie fixée au substrat végétal est étendue (flèche droite), tandis que l'autre partie est repliée sur elle-même (flèche incurvée). D : L'ensemble des zoïdes (flèches) est recouverts de bactéries. E : Elles sont empilées sur plusieurs couches et forment des stries.

2.2 Les entoproctes

Les entoproctes sont des organismes aquatiques qui ont longtemps été considérés comme faisant partie des bryozoaires. Maintenant ils forment un embranchement à part, également appelé l'embranchement des kamptozoaires. Les entoproctes peuvent être solitaires ou coloniaux. Chaque individu est composé de trois parties (Fig. 53) : le calice, à l'intérieur duquel on retrouve la bouche et l'anus, une couronne de tentacules surmontant le calice, et un pédoncule portant l'ensemble du calice et des tentacules, relié à la base au substrat de fixation. Dans le cas des entoproctes coloniaux, un stolon rampant sur le substrat relie entre eux les pédoncules des individus d'une même colonie.

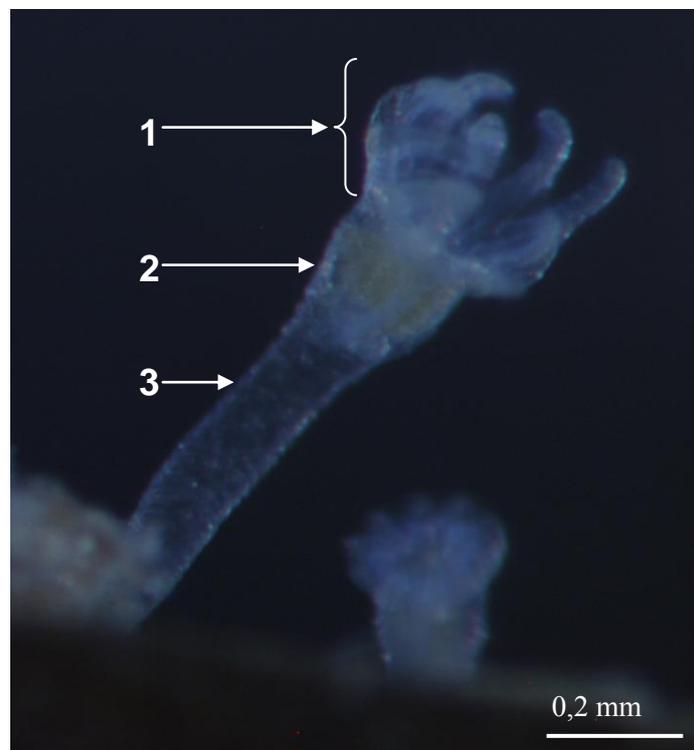


Figure 53 : Structure d'un entoprocte. ;
1 : couronne de tentacules ; 2 : calice ; 3 : pédoncule.

2.2.1 Le *Loxosomatidae*

La famille des *Loxosomatidae* rassemble des individus solitaires. Les observations en MEB d'un entoprocte de la famille des *Loxosomatidae* ont révélé la présence de bactéries à la surface de ses tentacules (Fig. 54a). Leur double membrane observable en MET renseigne sur le fait que ces bactéries sont de type Gram-négatif (Fig. 54b). Leur cytoplasme présente des zones claires aux électrons, similaires à des grains de sulfures. Les bactéries semblent fixées à la surface de l'entoprocte par une extrémité, et non sur leur longueur, comme cela est le cas pour les associations bactériennes observées chez les organismes précédents. Observé en coupe, le système de fixation des bactéries prend l'aspect d'un réseau de fibres partant d'une extrémité de la bactérie et rejoignant la surface de l'entoprocte.

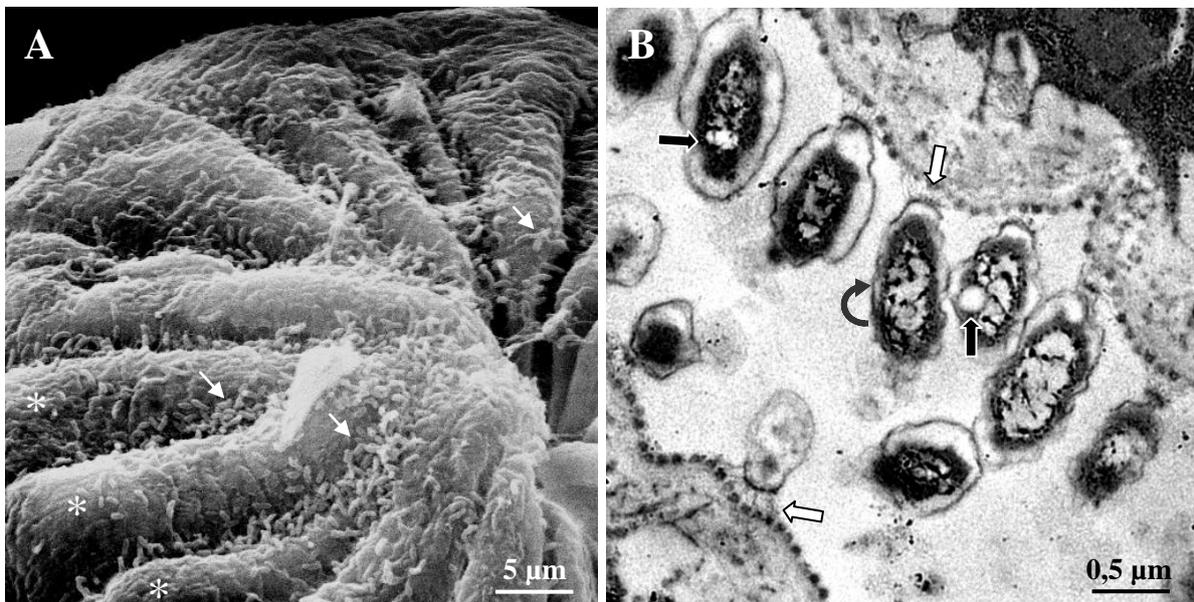


Figure 54 : Micrographies de l'entoprocte de la famille des *Loxosomatidae*. A : Des bactéries (flèches) sont observables sur les tentacules (astérisques) de l'organisme en MEB. B : La micrographie de MET permet d'observer la double membrane des bactéries (flèche noire incurvée), leur système de fixation à l'organisme (flèches blanches) et des structures claires aux électrons similaires à des grains de sulfures (flèches rectilignes noires) dans le cytoplasme des bactéries.

2.2.2 Le *Pedicellinidae*

Les entoproctes de la famille des *Pedicellinidae* sont coloniaux, caractérisés par l'absence de segmentation de leur pédoncule. Des hybridations moléculaires ont été réalisées à l'aide de la technique du CARD-FISH appliquée sur un individu entier, avec l'amorce

oligonucléotidique EUB 338, combinées à une coloration au DAPI. La fluorescence bleue obtenue avec le DAPI (Fig. 55a) informe sur la présence d'ADN. L'hybridation obtenue avec l'amorce EUB 338, spécifique des eubactéries, indique la présence de ces dernières, en grand nombre, à la surface de l'entoprocte (Fig. 55b). La combinaison de la coloration au DAPI et de la technique d'hybridation moléculaire permet d'éliminer les suspicions d'auto-fluorescence. Les deux fluorescences obtenues étant comparables, l'hybridation positive est validée. Les bactéries, de forme coccoïde, sont détectées sur toute la surface de l'organisme.

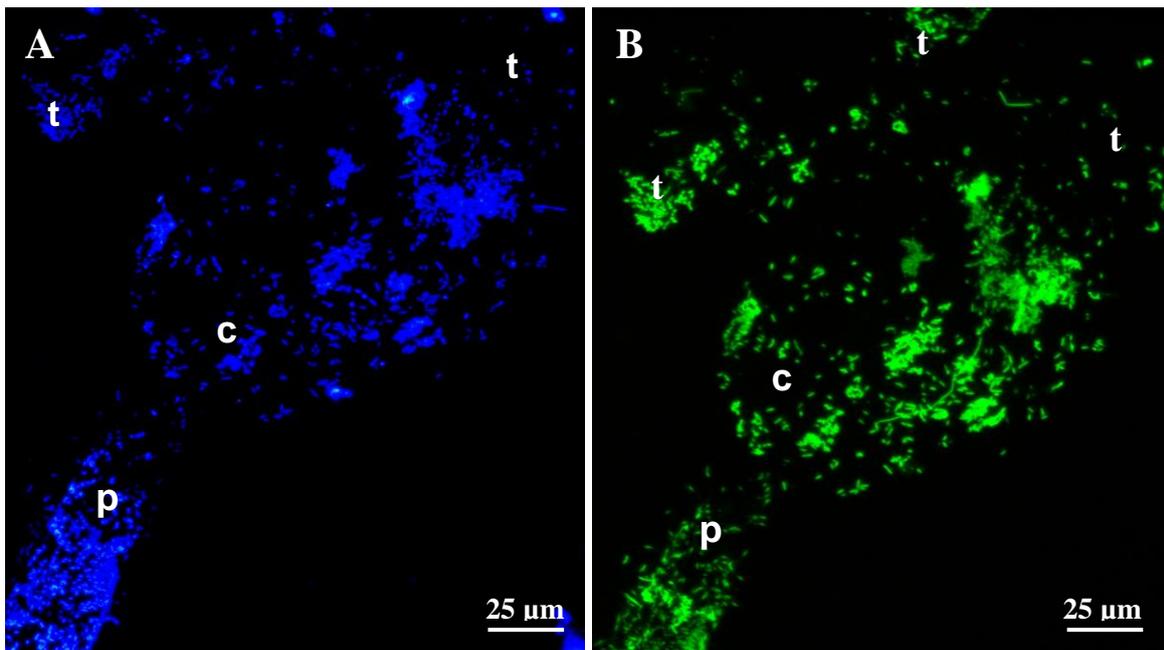


Figure 55 : Micrographies de l'entoprocte de la famille des Pedicellinidae obtenues au microscope à épifluorescence. Les micrographies montrent l'empreinte laissée par l'entoprocte sur la lame après la réalisation d'hybridations moléculaires sur des organismes entiers. A : La coloration bleue obtenue avec le DAPI informe de la présence d'ADN au niveau de l'empreinte. B : La fluorescence verte obtenue avec l'amorce EUB 338 marquée au FITC prouve qu'il s'agit d'eubactéries. L'empreinte laissée par l'entoprocte correspond donc à un manteau bactérien qui recouvrait l'ensemble de ses tentacules (t), son calice (c), ainsi que son pédoncule (p).

2.2.3 Les entoproctes non identifiés

Une troisième association bactérienne a été observée en MEB sur un entoprocte non identifié. Comme dans le précédent cas d'association bactérienne présenté, les bactéries couvrent à la fois le lophophore (Fig. 56a) et le pédoncule (Fig. 56b) de l'entoprocte. Les bactéries, en forme de bâtonnet sont fixées à l'organisme par une extrémité. Elles mesurent environ 3 µm.

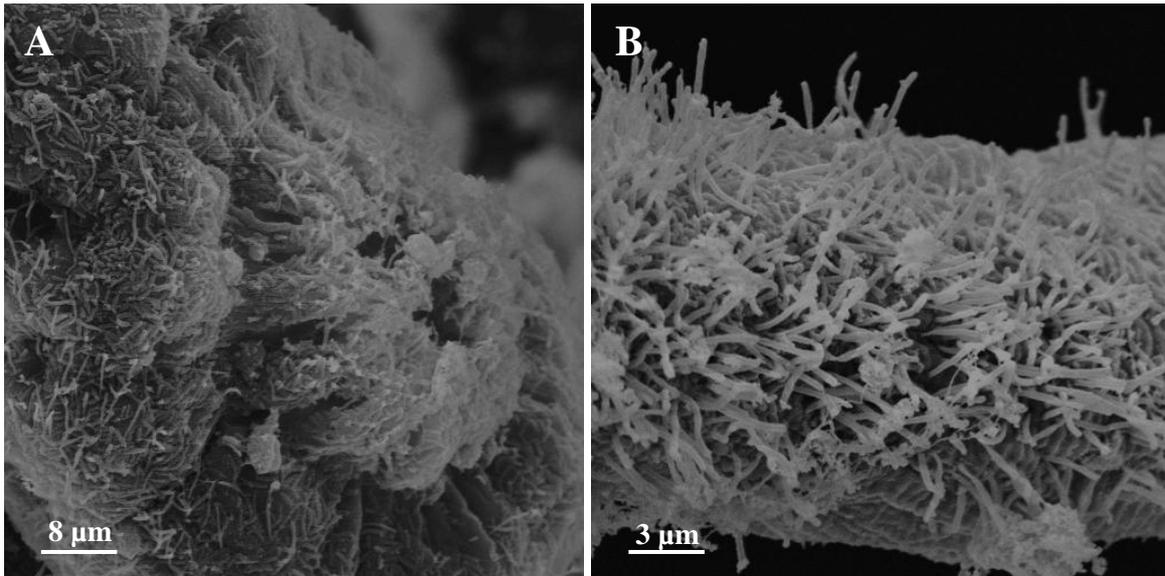
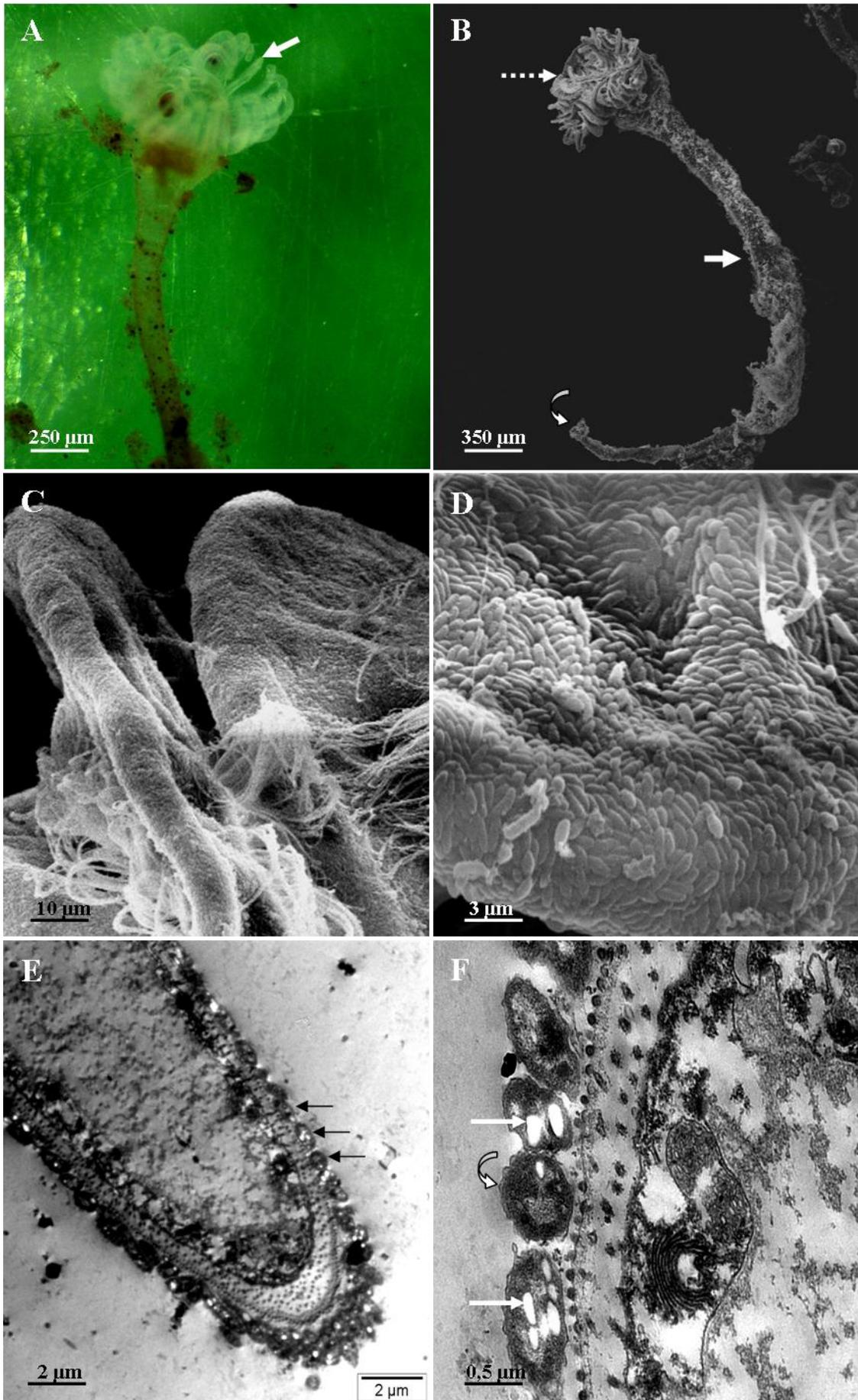


Figure 56 : Micrographies électroniques à balayage d'un entoprocte symbiotique non identifié. Le lophophore (A) et le pédoncule (B) sont couverts d'un dense manteau de bactéries en bâtonnet.

Un quatrième entoprocte, d'environ 2,5 mm de long (Fig. 57a-b), présentait une légère coloration blanche au niveau de ses tentacules lors des observations à la loupe binoculaire (Fig. 57a). Les observations en MEB ont mis en évidence la présence d'un manteau bactérien couvrant uniquement les tentacules de cet organisme (Fig. 57c). Les bactéries, de forme coccoïde, sont agencées de manière très ordonnée, recouvrant totalement la surface des tentacules de l'entoprocte (Fig. 57d). Cet agencement très ordonné des bactéries est confirmé par les observations des coupes des tentacules en MET. Les bactéries sont accolées les unes aux autres sur toute la surface des tentacules, (Fig. 57e). Elles possèdent une double membrane indiquant qu'elles sont de type Gram-négatif. Leur cytoplasme présente des zones claires aux électrons similaires à des granules de soufre (Fig. 57f).

Figure 57 (page suivante) : Observation d'un entoprocte symbiotique non identifié. A : L'observation de l'organisme à la loupe binoculaire révèle la couleur blanche des tentacules (flèche). B : L'entoprocte de très grande taille possède un disque adhésif (flèche incurvée) lui permettant de se fixer au substrat végétal, et un long et épais pédoncule (flèche droite) recouvert de débris variés, portant le lophophore avec de longs tentacules (flèche en pointillés). C : Les tentacules sont entièrement recouverts de bactéries. D : Ces bactéries coccoïdes forment manteau uniforme recouvrant véritablement toute la surface des tentacules. E : La MET confirme l'accolement très strict des bactéries (flèches) autour des tentacules. F : Leur double membrane (flèche incurvée) indique qu'elles sont de type Gram-négatif. Des zones du cytoplasme claires aux électrons (flèches droites) sont similaires à des granules de soufre.



3 Discussion

3.1 Diversité des associations bactériennes observées

Les recherches de symbioses au sein de la faune colonisant les substrats végétaux expérimentalement immergés ont conduit à la détection d'associations bactériennes chez neuf organismes différents. Il s'agit de ciliés oligohyménophores, d'entoproctes, et de nématodes.

Aucune association endosymbiotique n'a été détectée par les techniques d'hybridations moléculaires. Bien qu'étant toutes des ectosymbioses, les associations bactériennes observées chez les organismes des substrats végétaux coulés présentent une grande diversité de profils. Les bactéries observées sont de formes variées, et présentent des agencements très différents d'une espèce hôte à l'autre.

Le premier cilié oligohyménophore est morphologiquement proche de *Z. niveum* si l'on se base sur l'agencement de ses branches secondaires et de ses zoïdes. Cependant l'évolution de la longueur des zoïdes sur les branches secondaires, ainsi que l'absence de polymorphisme chez les bactéries qui lui sont associées, sont des éléments permettant de le distinguer de *Z. niveum*.

Les ciliés oligohyménophores chez qui les manteaux bactériens ont été observés n'ont pas été échantillonnés volontairement. Ils étaient fixés à des bouts de substrats végétaux prélevés pour l'observation d'autres organismes. Malgré les nombreuses tentatives d'identification à la loupe binoculaire, il n'a pas été possible de collecter à nouveau ces organismes afin de les analyser sur la base d'autres techniques que la MEB. Il en est de même pour le premier entoprocte non identifié.

Dans le cas des entoproctes, la collecte de nouveaux individus d'un morphotype donné était d'autant moins évidente que leur aspect change considérablement entre l'observation à la loupe binoculaire et l'observation en MEB, du fait de la contraction des tentacules lors de la préparation pour les observations en MEB.

3.2 Nature des associations bactériennes observées

La nature de l'association bactérienne est connue pour *Z. niveum*, *Pseudovorticella* sp. et le nématode *E. diana*. Il s'agit d'associations symbiotiques, basées sur l'oxydation des sulfures. Les analyses phylogénétiques des bactéries associées à *Z. niveum* (Rinke *et al.*, 2006) et à *Pseudovorticella* sp. (voir II – Chap. 2) le confirment. Le nématode *E. diana*, vit

comme tous les nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae, en ectosymbiose avec des γ -protéobactéries sulfo-oxydantes proches des endosymbiotes des bivalves des eaux peu profondes, et des vestimentifères. Ces symbiotes interviennent dans la protection de l'hôte face aux sulfures et leur confèrent une couleur blanche (Ott *et al.*, 2004a) due à la présence de granules de soufre élémentaire. Le soufre élémentaire contenu dans ces granules a été détecté chez les symbiotes associés à des individus d'*E. diana*e collecté sur des débris végétaux en mangrove (Maurin *et al.*, 2008).

Tous les éléments nécessaires à déterminer la nature des associations bactériennes observés chez les autres organismes associés aux débris végétaux coulés ne sont pas réunis. Cependant de nombreux éléments sont favorables à l'hypothèse que ces associations bactériennes pourraient également correspondre à des symbioses sulfo-oxydantes.

L'abondance des bactéries associées aux organismes et leur schéma d'agencement très organisé sont deux éléments favorables à l'hypothèse qu'il s'agit bien d'ectosymbiose et non d'un fouling par les bactéries. A cela s'ajoute, pour les organismes ayant été observés à plusieurs reprises, la régularité de l'association.

La nature sulfo-oxydante des bactéries, est soutenue par les observations en MET de granules similaires à des granules de soufre dans le cytoplasme de bactéries associées à deux des entoproctes. De plus chez le deuxième entoprocte non identifié, la couleur blanche observable à la loupe binoculaire est limitée aux tentacules, c'est-à-dire à la partie de l'organisme où sont localisées les bactéries. Il est probable que cette couleur blanche soit conférée à l'entoprocte par les bactéries, du fait de la présence de soufre dans les granules du cytoplasme.

A ces éléments vient s'ajouter la présence de sulfures au niveau du substrat végétal (voir III – Chap.1). En effet la condition indispensable au développement d'organismes sulfo-oxydants est la présence de sulfures. Cette condition est respectée dans les habitats des organismes présentés.

Bien que des analyses complémentaires soient nécessaires pour tirer des conclusions définitives quant à la nature de ces associations bactériennes, de nombreux éléments laissent penser qu'il pourrait s'agir de symbioses sulfo-oxydantes.

CHAPITRE 4

ANALYSE COMBINEE DES DONNEES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES CONCERNANT LES SUBSTRATS VEGETAUX EXPERIMENTALEMENT IMMERGES

1 L'installation des organismes sur les substrats végétaux

Selon Wahl (1989), le schéma général de développement des communautés marines sur les substrats durs respecte plusieurs étapes dont la succession est généralement expliquée par les effets de causalité. La première étape correspond à un processus physique spontané d'adsorption de composés chimiques dissous à la surface du substrat quelques secondes après son immersion. Elle est suivie de la colonisation bactérienne environ 1 h après, par adsorption puis attachement des bactéries. C'est la seconde étape. Elle est favorisée par la présence de macromolécules à la surface du substrat résultant du conditionnement biochimique précédent. La troisième étape correspond à l'apparition des eucaryotes unicellulaires après quelques jours d'immersion du substrat. Il s'agit généralement de Protistes sessiles filtreurs ou prédateurs mobiles, se nourrissant sur les bactéries attachées à la surface du substrat. Cette étape est suivie de l'installation des eucaryotes pluricellulaires, prédateurs des eucaryotes unicellulaires précédemment installés.

L'immersion expérimentale de substrats végétaux au cours de notre étude, a reproduit le processus naturel de perturbation d'un environnement marin, correspondant à l'apparition d'un nouveau substrat dur. Les substrats végétaux ont très certainement subi les étapes d'installation des communautés d'organismes présentées plus haut. L'installation des bactéries sur le bois dès les premières heures d'immersion n'a pas été vérifiée directement au cours de nos expériences. Cependant la phase d'acidification détectée par les capteurs *in situ* au niveau des substrats végétaux, supposée refléter la présence de communautés bactériennes, se déroule dès les premières heures d'immersion du substrat.

L'installation des eucaryotes unicellulaires tels que les ciliés, est bien détectée au bout de quelques jours d'immersion, avant l'installation des eucaryotes pluricellulaires qui constitueront l'essentiel de la communauté d'organismes associée aux substrats végétaux immergés.

Après les phases d'installation des organismes, le processus de colonisation des substrats durs est généralement soumis aux mécanismes des successions faunistiques classiques : la facilitation, l'inhibition et la tolérance (Connell et Slatyer, 1977), résultant des interactions entre les espèces.

En ce qui concerne les substrats végétaux immergés, ces modèles ne sont probablement pas directement applicables, du fait de la présence des sulfures dans l'environnement. En effet les sulfures sont toxiques pour la plupart des organismes (Bagarinao, 1992), et présentent une forte variabilité au niveau des substrats végétaux selon nos enregistrements *in situ*. Ils représentent aussi une source d'énergie pour des micro-organismes chimiosynthétiques. Le processus de colonisation des substrats végétaux immergés est probablement plus fortement impacté par la présence de sulfures que par les effets de facilitation, inhibition et tolérance entre les organismes installés.

2 L'influence des teneurs en sulfures sur l'abondance des organismes colonisant les substrats végétaux coulés

Les résultats des expériences d'immersion de substrats végétaux ont mis en évidence la rapidité de l'établissement d'un milieu riche en sulfures (quelques jours après l'immersion), et de l'installation d'organismes variés. Ces organismes sont donc très rapidement exposés à des conditions fortement toxiques.

En cas de perturbation d'un milieu donné par un élément contaminant, les réactions des organismes varient selon leur capacité à détecter cet élément, et à réagir. Les réactions possibles sont l'évitement ou le comportement adaptatif. Elles modulent l'exposition au contaminant, et par conséquent ses effets sur la survie des organismes pouvant aller jusqu'à la diminution de la longévité de ces derniers (Amiard-Triquet et Amiard, 2008). Les modifications chimiques observables au niveau des habitats des eucaryotes influencent donc l'abondance de ces derniers, en fonction de leur réaction face à la perturbation de leur milieu. Ainsi les variations d'abondance d'organismes associés à un milieu donné informent sur l'influence d'un contaminant sur ces organismes.

Dans le cas des substrats végétaux immergés, le rapprochement des données obtenues par les suivis chimique et biologique de *R. mangle*, réalisés simultanément, peut aider à estimer l'influence des teneurs en sulfures sur les organismes colonisant le substrat végétal (Fig. 58).

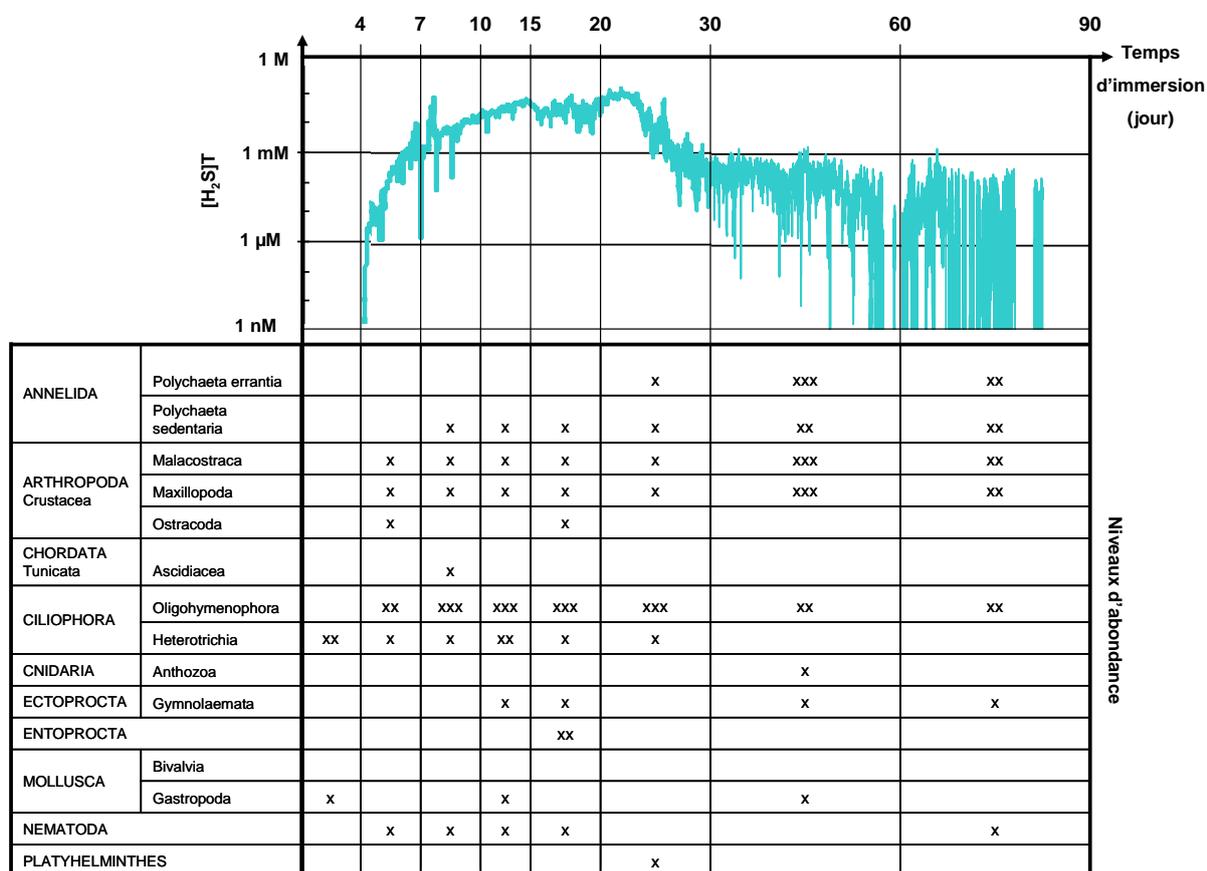


Figure 58 : Mise en parallèle de l'évolution des niveaux d'abondance des organismes colonisant *Rhizophora mangle* et des teneurs en sulfures enregistrées simultanément à sa surface.

Certains organismes ont une présence occasionnelle ou irrégulière à la surface du substrat, comme les plathelminthes, ascidies, ostracodes, ectoproctes, gastéropodes, nématodes... On peut supposer que ces organismes tolèrent mal les teneurs en sulfures observables au niveau du substrat. Cependant d'autres facteurs interviennent également dans la structuration de la communauté, tels que le recrutement des organismes et la réponse des proies et prédateurs de chaque organisme à la toxicité des sulfures. Pour ces groupes d'organismes il est difficile d'établir une relation entre leurs profils d'abondance et les teneurs en sulfures.

Par contre pour les organismes observés régulièrement à la surface des substrats végétaux cela est plus marqué. Dans le cas des annélides polychètes par exemple, présentes à la surface du substrat végétal dès le 10^{ème} jour d'immersion et maintenues tout au long du suivi, la tolérance aux sulfures est probable. Cependant on peut remarquer que leur densité est faible lorsque les hauts niveaux de sulfures sont constants, tandis qu'à partir du moment où les fluctuations importantes apparaissent, elle augmente. Les crustacés maxillopodes et malacostracés présentent le même profil. Les teneurs élevées en sulfures sont probablement tolérées par certains de ces polychètes et crustacés tandis que d'autres ne sont capables de coloniser le substrat végétal qu'à partir du moment où les teneurs en sulfures diminuent en intensité et fluctuent, ce qui suggère des apports intermittents d'oxygène.

Il a été démontré que face à la toxicité des sulfures, certains organismes ont développé des adaptations leur permettant de résister à des expositions plus ou moins longues (Powell *et al.*, 1979 ; Grieshaber et Völkel, 1998). Les organismes colonisant la surface des substrats végétaux, notamment ceux que l'on retrouve également dans le sédiment réduit de mangrove, ont probablement développé des adaptations de ce type, expliquant qu'ils persistent à la surface du substrat végétal lorsque les conditions qui y sont observables sont considérées comme toxiques pour la plupart des organismes.

Les seuls organismes présentant des abondances élevées au moment où les concentrations en sulfures sont également élevées, sont les ciliés oligohyménophores et hétérotriches. La colonisation rapide des substrats végétaux coulés par les ciliés hétérotriches implique qu'ils se retrouvent immédiatement confrontés à des teneurs en sulfures élevées. Cependant l'évolution de leur densité semble révéler un effet positif des teneurs en sulfures. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces observations. Premièrement, les ciliés péritriches pourraient se nourrir de bactéries se développant autour du substrat végétal, notamment celles dont l'abondance est supposée être corrélée aux concentrations en sulfures. Deuxièmement, une symbiose sulfo-oxydante pourrait expliquer la corrélation entre les teneurs en sulfures et l'abondance de ces organismes. L'éventualité d'une endosymbiose ne peut être écartée puisque les observations en coupes de ces organismes n'ont pas été réalisées.

3 Le cas des organismes sulfo-oxydants

La relation la plus évidente entre l'enrichissement en sulfures et les profils de colonisation des organismes, concerne certainement la relation de dépendance aux sulfures

des organismes sulfo-oxydants. L'association de certains eucaryotes avec des bactéries sulfo-oxydantes peut être considérée comme une adaptation aux conditions environnementales. La formation d'un manteau bactérien couvrant la surface du corps de l'hôte permet de protéger ce dernier d'une exposition à la toxicité des sulfures. Dans le cas des associations symbiotiques obligatoires, les sulfures ne sont pas simplement tolérés, mais deviennent une condition nécessaire au développement de l'organisme, comme chez *Zoothamnium niveum* (Rinke *et al.*, 2006). Les profils de colonisation des organismes symbiotiques supposés associés à des symbiotes sulfo-oxydants observés au cours de cette étude sont variables (Fig. 59).

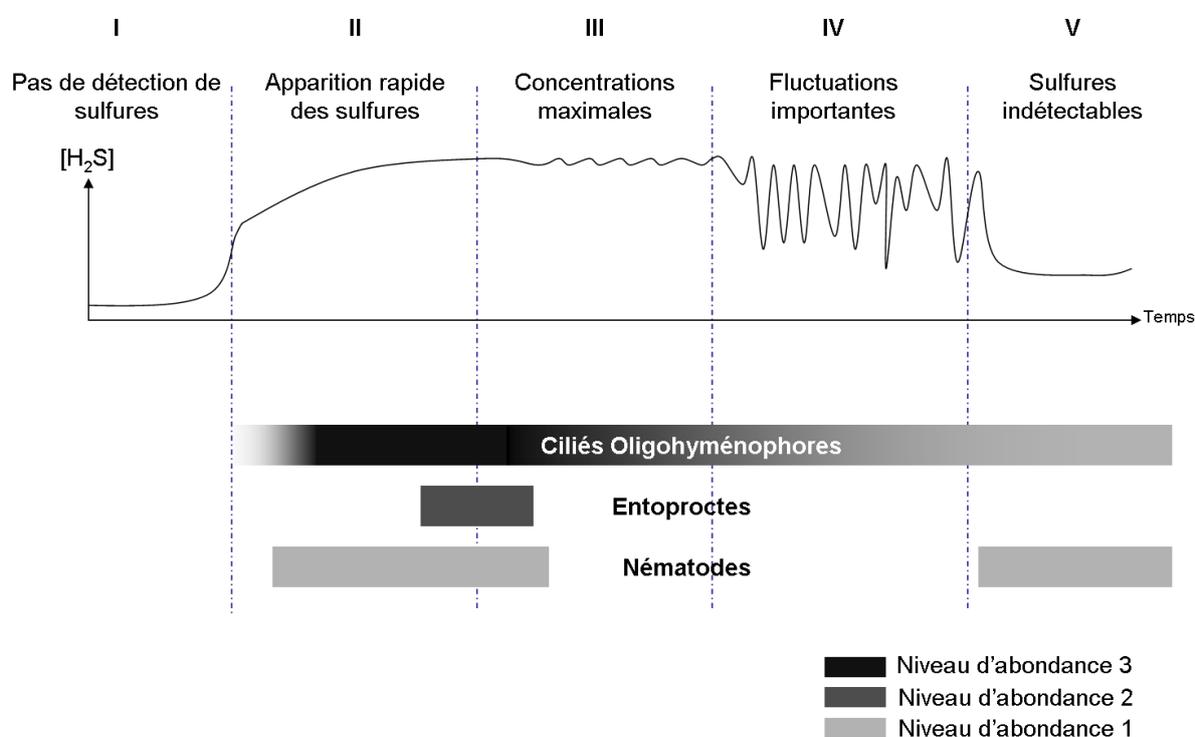


Figure 59: Représentation schématique de l'évolution des niveaux d'abondance des organismes (déterminés en Fig. 47) colonisant *Rhizophora mangle* en parallèle à l'évolution des teneurs en sulfures enregistrées simultanément à la surface du bois.

La dynamique de colonisation des substrats végétaux coulés par les ciliés oligohyménophores symbiotiques *Pseudovorticella* sp. et *Z. niveum* est corrélée aux teneurs en sulfures enregistrées à la surface du substrat. Ils apparaissent seulement quelques jours après le début des émissions et les variations de leur abondance suivent celles des niveaux de sulfures. L'abondance de ces ciliés augmente pendant le premier mois d'immersion du

substrat végétal, alors que les concentrations en sulfures sont croissantes, puis retombent à un niveau moyen, lorsque les émissions de sulfures entrent dans une période fortement fluctuante. Il existe une relation étroite entre les teneurs en sulfures et l'abondance de ces organismes. Ce résultat est en accord avec leur dépendance aux sulfures pour l'approvisionnement de leurs symbiotes sulfo-oxydants (voir Chap. 3).

L'étude des ciliés symbiotiques présente un intérêt particulier dans l'approche de la relation entre les émissions de sulfures et la colonisation du substrat végétal par les organismes symbiotiques. En effet leur évolution reflète de manière assez cohérente celle des niveaux de sulfures dans leur habitat, et cela avec un décalage temporel limité. Les colonies de *Z. niveum* atteignent leur taille maximale en seulement 4 jours, et peuvent vivre environ 7 jours (Ott et Bright, 2004). L'apparition des sulfures est rapidement suivie de l'installation des colonies de ciliés (en 3 jours) et le maintien des émissions de sulfures est indiqué par le maintien des colonies de *Z. niveum*. La persistance des populations au-delà de 7 jours (durée de vie d'une colonie) signifie qu'il y a un renouvellement constant des colonies, par installation des cellules de dispersion sur le même site, tant que les conditions y sont favorables. La disparition des sulfures entraîne celle des ciliés dans les 7 jours suivants. En plus de l'indication présence/absence de *Z. niveum* informant sur la présence/absence de sulfures, l'abondance de *Z. niveum* reflète les niveaux de concentrations en sulfures. Cet organisme est donc un excellent marqueur des émissions de sulfures.

Peu de données sont disponibles sur le cycle de vie des Vorticellidae symbiotiques, cependant la similarité des profils de colonisation entre *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp. suggère que ce dernier peut également être considéré comme indicateur des émissions de sulfures.

Le nématode *Eubostrichus dianae* est associé à des bactéries sulfo-oxydantes (Polz *et al.*, 1999 ; Himmel *et al.*, 2009). Il dépend alors des sulfures émis dans l'environnement. Sa présence sur les substrats végétaux est également indicatrice de la présence de sulfures. Cependant son profil de colonisation ne reflète pas les variations chimiques au niveau des substrats végétaux coulés puisqu'il est capable de se déplacer et que son habitat n'est pas limité à ces substrats.

Si l'on s'intéresse au profil d'abondance des entoproctes, parmi lesquels des associations symbiotiques ont été observées, le lien entre les niveaux d'abondance et les teneurs en sulfures n'est pas aussi marqué. Pourtant les symbioses bactériennes observées chez ces organismes sont probablement de nature sulfo-oxydante. Pour mieux comprendre le

profil de colonisation des substrats végétaux par les entoproctes, les modalités de fonctionnement de leur symbiose restent à explorer.

Les suivis chimiques et biologiques de *C. nucifera* n'ayant pas été réalisés en même temps, le travail de comparaison entre les détections de sulfures au niveau du substrat végétal et la colonisation reste à établir, bien que les résultats obtenus pour chacun des suivis soient révélateurs d'un profil général. Un élément important ressort cependant de la comparaison entre *R. mangle* et de *C. nucifera* : la colonisation du substrat débute plus tôt chez *C. nucifera*, notamment la colonisation par les ciliés symbiotiques alors que les sulfures y apparaissent également plus tôt. Des émissions précoces de sulfures en surface entraînent bien une colonisation plus rapide par les organismes chimiosynthétiques.

La fin du stade d'enrichissement en sulfures n'est pour le moment pas déterminée pour les substrats végétaux coulés. En effet des mesures chimiques *in situ* réalisées sur des substrats végétaux immergés pendant plus de 10 mois ont révélé que des sulfures étaient encore détectables à la surface et à l'intérieur du substrat, et permettaient le développement de colonies de *Z. niveum*. L'étape de diminution des émissions de sulfures notée comme stade V dans cette étude correspond probablement à un arrêt momentané des émissions du fait de l'hétérogénéité de la dégradation du substrat végétal. Des périodes d'émissions de sulfures, résultant de la dégradation de différents composants des substrats végétaux se succèdent probablement dans le temps. Les lixiviats des substrats végétaux seraient les premiers à engendrer des émissions de sulfures, en seulement quelques jours après l'immersion du substrat. Cependant ce phénomène de lixiviation dure environ deux mois (Aké-Castillo *et al.*, 2006) et ne permet pas le maintien de la production de sulfures à long terme. Après plusieurs mois d'immersion il est probable que ce soit la dégradation de la cellulose qui mène à de nouvelles émissions de sulfures, susceptibles de durer plus longtemps.

4 La colonisation des substrats organiques coulés en milieux profonds et côtiers

Les données disponibles sur la colonisation des bois coulés en milieu profond diffèrent des éléments apportés par notre étude. Les foreurs ont été les premières espèces identifiées comme des opportunistes des bois coulés des profondeurs (Turner, 1973) et ont été considérés comme un élément essentiel à la base des réseaux trophiques se développant autour des bois

coulés. Le caractère opportuniste des foreurs n'est pas vérifié en mangrove selon nos résultats. En effet ils ne colonisent pas *C. nucifera* durant les 7 mois de suivis de cette étude et n'apparaissent qu'au bout de trois mois d'immersion de *R. mangle* (cas des Teredinidae).

La consistance des palmes de *C. nucifera*, inadaptée à l'installation de foreurs explique l'absence de ces derniers sur ce substrat. La colonisation tardive de *R. mangle* par les foreurs pourrait s'expliquer par l'absence de larves dans le milieu. Pour que les substrats végétaux soient colonisés il faut qu'un pool de larves soit disponible. Turner (1973) proposait que le cycle de reproduction des foreurs dépendants des substrats végétaux, pourrait être concordant avec les périodes d'apport des substrats, correspondant à la saison des pluies dans les régions tropicales. Or la saison des pluies en Guadeloupe a débuté au 3^{ème} mois de l'expérience d'immersion longue du palétuvier. Dans le cas de *C. nucifera* comme de *R. mangle*, l'absence de foreurs n'a pas été un frein au développement d'une faune abondante et diversifiée.

Distel *et al.* (2000) avançaient que la résistance du bois aux détritivores était indispensable à l'installation des organismes chimioautotrophes. Nos résultats montrent que le temps nécessaire à l'installation des organismes chimioautotrophes des bois coulés en mangrove est très court (quelques jours). La longévité du bois ne semble pas être un critère indispensable à leur installation. En effet le schéma d'installation des ciliés tels que *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp. ne peut pas être similaire à celui de bivalves Mytilidae. Il est difficile de comparer les processus de colonisation d'organismes ayant une biologie différente puisque venant de milieux très différents.

Des différences de colonisation de substrats osseux en mangrove et en milieu profond sont également observables. Quatre stades écologiques successifs caractérisant la colonisation des carcasses de baleines coulées ont été déterminés par Smith et Baco (2003) :

- le stade nécrophage durant lequel les tissus mous sont éliminés principalement par des myxines et des requins. La durée de ce stade varie de quelques mois à quelques années en fonction de la taille de la carcasse.
- le stade opportuniste pendant lequel la faune est dominée par du macrobenthos hétérotrophe. Cette faune colonise à la fois les os de la carcasse et le sédiment alentour enrichi en matière organique. Ce stade peut durer plusieurs années.
- le stade d'enrichissement en sulfures caractérisé par la décomposition microbienne anaérobie des lipides des os de baleines, menant aux émissions de sulfures (Deming *et al.*, 1997). Durant ce stade des organismes chimioautotrophes sulfo-oxydants ou des organismes d'autres types trophiques tolérant les sulfures se développent autour des

carcasses. Pendant ce stade, pouvant durer plus de 15 ans, la communauté d'organisme est très abondante, de diversité spécifique élevée, et d'organisation trophique complexe.

- le stade récif succéderait au stade d'enrichissement en sulfures avec le développement de filtreurs suspensivores. Ceux-ci apparaissent parfois avant la fin du stade précédent.

Selon Smith et Baco (2003) la taille des carcasses de baleines coulées influence leur colonisation, les carcasses plus petites, pour lesquelles les tissus mous sont rapidement éliminés durant le stade nécrophage, ne connaissant pas les stades écologiques suivants.

Or des immersions récentes de substrats osseux débarrassés de leur chair, réalisées en mangrove sur le site de la Manche-à-eau, ont permis d'enregistrer des émissions de sulfures au bout de quelques jours d'immersion. Ces émissions résultent probablement de la dégradation biologique d'acides gras volatiles (Fourquez, 2009). Cette expérience révèle l'existence d'une phase précoce d'émissions de sulfures au niveau des substrats osseux, et remet en cause la nécessité de résistance du substrat aux organismes nécrophages, comme proposé par Smith et Baco (2003).

Les différences observées dans le schéma de colonisation des substrats organiques coulés en milieu profond et en mangrove sont probablement en partie liées à la profondeur, comme cela a été proposé pour les sites hydrothermaux (Tarasov *et al.*, 2005). Cependant les divergences peuvent également s'expliquer par les périodes et fréquences d'observation.

Si l'on admet que des phases d'émissions de sulfures se succèdent au cours du processus de dégradation des substrats végétaux ou osseux, il est possible que les études précédentes, réalisées après plusieurs mois ou plusieurs années d'immersion, décrivent une faune et une succession faunistique correspondant à une période d'enrichissement en sulfures différente de celle mise en évidence par notre étude.

CONCLUSIONS GENERALES
ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de cette étude était d'apporter des éléments de compréhension sur le fonctionnement général des communautés associées aux bois coulés. L'étude impliquait alors d'une part l'analyse des conditions d'enrichissement en sulfures, supposées déterminantes dans le fonctionnement de ces communautés, et d'autre part l'analyse de la colonisation de substrats végétaux, notamment par des organismes sulfo-oxydants afin de mieux apprécier le lien entre ces deux processus.

Les suivis chimiques *in situ* réalisés à l'aide de capteurs autonomes ont permis d'appréhender la dynamique de l'enrichissement en sulfures à la surface des substrats végétaux coulés. Les teneurs enregistrées dépassent les concentrations observées dans d'autres environnements réduits. Un processus d'accumulation de polysulfures à l'intérieur du substrat végétal est probablement en partie responsable de ces teneurs exceptionnelles.

Les émissions de sulfures varient d'une micro-zone du substrat végétal à une autre, et sont limitées à une interface de quelques millimètres au maximum à la surface du substrat. Au-delà de cette couche limite anoxique, les sulfures subissent une oxydation chimique spontanée. Les teneurs en sulfures enregistrées sont par ailleurs fortement fluctuantes et reflètent au cours des expériences un même schéma global d'évolution temporelle. Parmi les étapes identifiées, celle du maintien de teneurs élevées de sulfures à la surface du substrat végétal peut durer plusieurs semaines. Elle est suivie de fortes fluctuations qui pourraient annoncer l'arrêt de la diffusion de sulfures à la surface du substrat.

Les sulfures sont détectés au bout de quelques jours seulement à la surface et à l'intérieur du substrat. La révélation de la rapidité des émissions a conduit à exclure la dégradation de la cellulose comme origine potentielle de ces émissions précoces de sulfures, la cellulose étant un composé difficilement dégradable. Les composés solubles du substrat végétal, probablement des constituants de la sève élaborée, sont un support plus adapté au développement rapide de l'activité des BSR.

Le suivi de colonisation a permis de révéler la grande diversité des organismes associés aux débris végétaux coulés en mangrove. Les organismes sont observés majoritairement à la surface des débris mais peuvent également trouver refuge dans des habitats à l'intérieur du substrat. Leurs utilisations du substrat végétal sont variées : un support de fixation, un refuge, une zone ou une source d'alimentation, mais également un environnement réduit favorable à une production primaire chimioautotrophe.

En effet, parmi les organismes colonisant les substrats végétaux coulés, certains vivent en symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes. C'est le cas d'*Eubostrichus diana* et de *Zoothamnium niveum* pour lesquels la nature sulfo-oxydante des symbiotes avait été démontrée par d'autres études. Au cours de cette étude, la nature sulfo-oxydante des symbiotes de *Pseudovorticella* sp. a également été vérifiée sur la base d'analyses phylogénétiques de l'ADNr 16S et du gène codant pour l'APS reductase / oxydase, et par hybridations moléculaires. Ce cilié est un nouvel organisme symbiotique sulfo-oxydant associé aux substrats végétaux coulés. D'autres ciliés non identifiés, ainsi que des entoproctes colonisant les substrats végétaux coulés vivent en association avec des bactéries, dont la nature sulfo-oxydante, bien que fortement suspectée, reste à vérifier sur la base d'analyses phylogénétiques similaires à celles réalisées pour les symbiotes de *Pseudovorticella* sp.

L'analyse combinée de données chimiques et biologiques sur les substrats végétaux coulés, réalisée pour la première fois au cours de cette étude, a permis de démontrer la corrélation nette entre l'abondance de certains organismes et l'importance des teneurs en sulfures. Parmi les symbioses sulfo-oxydantes des substrats végétaux coulés, celles de *Pseudovorticella* sp. et *Z. niveum* peuvent être considérées comme des symbioses indicatrices de l'évolution des teneurs en sulfures. Les caractéristiques écologiques de ces organismes en font de bons marqueurs de la dynamique des sulfures à la surface des débris végétaux coulés.

Cette étude a également permis de vérifier la capacité de débris provenant de structures végétales différentes (branches, folioles, pétioles), à soutenir la production de sulfures au cours de leur dégradation, avec cependant des différences remarquables entre le schéma spatial et temporel de diffusion des sulfures chez les monocotylédones et les dicotylédones. La nature du substrat végétal influence donc la dynamique des sulfures. Elle détermine également la composition et la dynamique de colonisation de la faune associée aux substrats végétaux coulés.

L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette étude permet une meilleure compréhension du fonctionnement global des écosystèmes caractéristiques des bois coulés quelque soit leur profondeur. Elle confirme la capacité des substrats végétaux coulés à soutenir le développement d'une faune chimiosynthétique sulfo-oxydante utilisant les sulfures émis au cours de la dégradation des composés du substrat végétal. Le lien fort entre la chimie des substrats végétaux coulés et leur colonisation est révélé par les profils de colonisation du substrat par les organismes sulfo-oxydants.

Certains aspects de ces travaux restent cependant à approfondir.

Il s'agit en premier lieu d'identifier plus précisément les organismes associés aux substrats végétaux coulés en mangrove. La méiofaune de mangrove est assez mal connue, cependant l'estimation de la similarité de la faune colonisatrice des substrats végétaux coulés en milieu peu profond comme la mangrove et en milieu profond impose une identification plus précise des organismes. Elle permettrait probablement de déterminer l'endémisme de certains organismes aux débris végétaux coulés, comme cela a été fait pour une partie de la faune associée aux bois coulés en milieu profond.

Un autre point à éclaircir est l'utilisation du substrat végétal par les organismes. Certains éléments ont été avancés à partir des données collectées lors du suivi biologique. Cependant une manière de valider notamment le rôle des débris végétaux coulés comme zone de nutrition serait de retracer les relations trophiques entre les organismes le colonisant. Les techniques de traçage isotopique de carbone et d'azote semblent le meilleur moyen d'aborder cette problématique.

Les techniques isotopiques pourraient également être utilisées pour déterminer, au sein des symbioses détectées sur les débris végétaux coulés, les échanges trophiques entre les organismes hôtes et leurs symbiotes. Les associations observées sur les débris végétaux coulés sont toutes de nature ectosymbiotique. Le rôle des interactions entre les hôtes et leurs symbiotes reste à établir. S'agit-il uniquement d'un système de protection face à la toxicité des sulfures ou existe-t-il des échanges trophiques comme cela a été suggéré pour *Z. niveum* ? Les techniques isotopiques peuvent être combinées avec un séquençage de l'ADNr 16S des symbiotes bactériens afin de vérifier la nature sulfo-oxydante des bactéries.

De nouveaux questionnements à propos des bois coulés découlent également des résultats obtenus au cours de cette étude.

Le premier point concerne l'origine des émissions de sulfures. De nombreux éléments sont favorables à l'hypothèse selon laquelle le procédé de dégradation bactérienne des composés solubles du substrat végétal, serait à l'origine des émissions de sulfures. L'identification de ces composés solubles permettrait probablement d'apprécier les capacités des substrats végétaux coulés, à soutenir plus ou moins longtemps, selon leur composition, le développement d'une population de bactéries sulfato-réductrices à l'origine des émissions de sulfures.

Le deuxième point concerne la dynamique de production de sulfures à long terme. Si les émissions précoces dévoilées par les analyses résultent de la dégradation des lixiviats du substrat végétal, la dégradation bactérienne de la cellulose peut également mener à la production de sulfures. Plusieurs stades d'enrichissement en sulfures se succèdent-ils au cours de la dégradation de différents composés des substrats végétaux ?

Afin de répondre à cette question des immersions expérimentales plus longues sont prévues en mangrove, avec pour objectif de réaliser un suivi chimique continu des émissions de sulfures. En parallèle à cette expérimentation une approche biochimique du processus de dégradation du bois permettrait de préciser la nature de la fraction organique dont la dégradation microbienne est à l'origine des émissions de sulfures. Le suivi de l'évolution du Carbone Organique Total et des taux de cellulose, hémicellulose et lignine d'échantillons de substrats végétaux prélevés à différents temps d'immersion, permettrait de déterminer quelle fraction des substrats végétaux intervient dans les émissions de sulfures et dans quelle proportion. Ces analyses, dont la faisabilité a été vérifiée au cours des travaux de thèse, sont prévues dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire COVACHIMM (Chimie des Matériaux – Connaissance et Valorisation) de l'Université des Antilles et de la Guyane.

Un autre point de questionnement relève de l'extrapolation des résultats aux substrats végétaux coulés en milieu profond. La mangrove s'est avérée être un terrain expérimental parfaitement adapté à l'étude des substrats végétaux, ayant permis d'accéder à des processus difficilement caractérisables en milieu profond. Les études en milieu littoral de manière plus générale, permettent plus facilement qu'en milieu profond, de développer des outils de mesure *in situ* et de réaliser des collectes plus complètes des organismes colonisant les substrats végétaux coulés, parmi lesquels des organismes de la méiofaune, comme les ciliés ou entoproctes symbiotiques, qui n'ont jamais été signalés sur des substrats végétaux coulés profonds. Ces organismes sont-ils inadaptés aux milieux profonds ou leur absence est-elle due au lessivage des substrats récupérés par chalutage en zone profonde ? L'observation d'entoproctes de la famille des Loxosomatidae sur des substrats végétaux coulés à 1800 m de profondeur (Wolff, 1979) et la découverte de ciliés hétérotriches de la famille des Folliculinidae vivant en symbiose avec des bactéries probablement sulfo-oxydantes à proximité de sources hydrothermales (Kouris *et al.* 2007), laissent penser que de tels organismes pourraient être capables de coloniser les milieux profonds.

Mais l'extrapolation aux substrats végétaux coulés en milieu profond reste délicate. La faune colonisatrice et les processus biologiques et chimiques ne sont pas nécessairement les mêmes en milieu littoral qu'en milieu profond. Les études dans ces deux types de milieux doivent donc être menées en complémentarité afin de déterminer dans quelles mesures l'extrapolation d'un cas à un autre est possible.

Pour cela, des immersions expérimentales de substrats végétaux en milieu profond sont prévues. Les conditions de ces immersions devront être les plus proches possible de ce qui a été réalisé en mangrove. Les mêmes instruments de mesures chimiques *in situ* seront utilisés, sur les mêmes substrats végétaux, dans des casiers plus adaptés à l'immersion profonde. Pour la réalisation de ces immersions, une stratégie expérimentale simple, permettant la remontée régulière des casiers a été définie : il s'agit du couplage des casiers expérimentaux à des DCP, Dispositifs de Concentration de Poissons. Ces dispositifs utilisés par les professionnels de la pêche autour de la Guadeloupe, sont constitués d'éléments inertes (attirant les poissons pélagiques) maintenus entre deux eaux, d'une part par un système de bouées visibles de la surface, et d'autre part par un système d'ancrage au fond, le tout relié par une corde. Les casiers contenant les substrats végétaux devraient être immergés avec les ancres du DCP et remontés à intervalles de temps réguliers avec l'aide des pêcheurs. La comparaison des données obtenues à partir des suivis chimiques et biologiques en mangrove et en milieu profond permettra d'évaluer les similitudes des processus chimiques et biologiques observés dans les deux types de milieux et ainsi de déterminer dans quelles mesures l'extrapolation d'un milieu à un autre est possible.

Ces approches dans différents milieux sont d'un intérêt particulier pour les substrats végétaux coulés puisqu'ils correspondent au seul environnement chimiosynthétique connu, présent à toutes les profondeurs et dans toutes les zones géographiques.

La part d'intervention des débris végétaux coulés dans le transport d'organismes à faible capacité de dispersion et dans la colonisation des sites chimiosynthétiques tels que les sources hydrothermales, suintements froids et carcasses de baleines pourra être mieux appréhendée à partir du moment où le fonctionnement général de l'écosystème aura été déterminé.

BIBLIOGRAPHIE

A

- Aké-Castillo J.A., Vázquez G., and López-Portillo J.** (2006). Litterfall and decomposition of *Rhizophora mangle* L. in a coastal lagoon in the southern Gulf of Mexico. *Hydrobiologia* 559 (1) : 101-111.
- Aladro-Lubel M.A., and Martínez-Murillo M.E.** (1999). Epibiotic protozoa (Ciliophora) on a community of *Thalassia testudinum* banks ex konig in a coral reef in Veracruz, Mexico. *Aquatic Botany* 65 (1-4) : 239-254.
- Amiard-Triquet C., and Amiard J.-C.** (2008). L'écotoxicologie du comportement. *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques.*: 211-231. Editions Tech & Doc. Lavoisier.
- Andrews E.A.** (1944a). A Folliculinid from Africa and California. *Transactions of the American Microscopical Society* 63 (2) : 136-143.
- Andrews E.A.** (1944b). A Folliculinid from the hawaiian islands. *Transactions of the American Microscopical Society* 63 (4) : 321-325.
- Andrews E.A.** (1948). Folliculinids and Stentors in british Columbia. *Transactions of the American Microscopical Society* 67 (1) : 61-65.
- Andrews E.A.** (1950). Folliculinids in Australia. *Transactions of the American Microscopical Society* 69 (4) : 413-421.
- Andrews E.A.** (1952). *Metafolliculina producta* (Wright) on both sides of the Atlantic. *Transactions of the American Microscopical Society* 71 (2) : 129-134.
- Arvidson R.S., Morse J.W., and Joye S.B.** (2004). The sulfur biogeochemistry of chemosynthetic cold seep communities, Gulf of Mexico, USA. *Marine Chemistry* 87 (3-4) : 97-119.

B

- Bagarinao T.** (1992). Sulfide as an environmental factor and toxicant: Tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquatic Toxicology* 24 (1-2) : 21-62.
- Baker A.N., Rowe F.W.E., and Clark H.E.S.** (1986). A new class of Echinodermata from New Zealand. *Nature* 321 (6073) : 862-864.
- Barnard J.L.** (1961). Gammaridean amphipoda from depths of 400 to 6000 meters. *Galathea Report* 5 : 23-128.

- Bauer W.D. (1981).** Infection of legumes by rhizobia. *Annual Review of plant Physiology*. 32: 407-449.
- Bauer-Nebelsick M., Bardele C.F., and Ott J.A. (1996a).** Electron microscopic studies on *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *European Journal of Protistology* 32 (2) : 202-215.
- Bauer-Nebelsick M., Bardele C.F., and Ott J.A. (1996b).** Redescription of *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg, 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *European Journal of Protistology* 32 (1) : 18-30.
- Benner R., and Hodson R.E. (1985).** Microbial degradation of the leachable and lignocellulosic components of leaves and wood from *Rhizophora mangle* in a tropical mangrove swamp. *Marine Ecology Progress Series* 23 : 221-230.
- Bennett B.A., Smith C.R., Glaser B., and Maybaum H.L. (1994).** Faunal community structure of a chemoautotrophic assemblage on whale bones in the deep northeast Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* 108(3): 205-224.
- Berg C.J., and Atalo P. (1984).** Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture. *Aquaculture* 39 : 165-179.
- Blazejack A., Erséus C., Amann R., and Dubilier N. (2005).** Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (Oligochaeta) from the Peru margin. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (3) : 1553-1561.
- Blazejack A., Kuever J., Erséus C., Amann R., and Dubilier N. (2006).** Phylogeny of 16S rRNA, Ribulose 1,5-biphosphate Carboxylase/Oxygenase and Adenosine 5'-phosphosulfate genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (Oligochaeta) from Bermuda and the Bahamas. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (8) : 5527-5536.
- Boetius A. (2005).** Lost city life. *Science* 307 (5714) : 1420-1422.
- Boetius A., Ravensschlag K., Schubert C.J., Rickert D., Widdel F., Gleseke A., Amann R., Jørgensen B.B., Witte U., and Pfannkuche O. (2000).** A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation methane. *Nature* 407 (6804) : 623-626.
- Borum J., Pedersen O., Greve T.M., Frankovich T.A., Zieman J.C., Fourqurean J.W., and Madden C.J. (2005).** The potential role of plant oxygen and sulphide dynamics in die-off events of the tropical seagrass, *Thalassia testudinum*. *Journal of Ecology* 93 (1) : 148-158.
- Bouvier T., and Del Giorgio P.A. (2003).** Factors influencing the detection of bacterial cells using Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH): A quantitative review of published reports. *FEMS Microbiology Ecology* 44 (1) : 3-15.

- Brandt A., De Broyer C., Gooday A.J., Hilbig B., and Thomson M.R.A.** (2004). Introduction to ANDEEP (ANtarctic benthic DEEP-sea biodiversity: Colonization history and recent community patterns) - A tribute to Howard L. Sanders. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 51 (14-16) : 1457-1465.
- Bright M., and Giere O.** (2005). Microbial symbiosis in Annelida. *Symbiosis* 38 (1) : 1-45.
- Bright M., Keckeis H., and Fisher C.R.** (2000). An autoradiographic examination of carbon fixation, transfer and utilization in the *Riftia pachyptila* symbiosis. *Marine Biology* 136 (4) : 621-632.
- Bruun A.F.** (1959). General introduction to the reports and list of deep-sea stations. *Galathea Report 1* : 7-48.
- Buchner P.** (1965). Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Wiley J. and Sons, New York.

C

- Camilleri J.C., and Ribi G.** (1986). Leaching of dissolved organic carbon (DOC) from dead leaves, formation of flakes from DOC, and feeding on flakes by crustaceans in mangroves. *Marine Biology* 91 (3) : 337-344.
- Campbell B.J., Stein J.L., and Cary S.C.** (2003). Evidence of chemolithoautotrophy in the bacterial community associated with *Alvinella pompejana*, a hydrothermal vent polychaete. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (9) : 5070-5078.
- Canning M.H., and Carlton J.T.** (2000). Predation on Kamptozoans (entoprocta). *Invertebrate Biology* 119 (4) : 386-387.
- Cary S.C., Cottrell M.T., Stein J.L., Camacho F., and Desbruyères D.** (1997). Molecular identification and localization of filamentous symbiotic bacteria associated with the hydrothermal vent annelid *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (3) : 1124-1130.
- Cavanaugh C.M.** (1983). Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* 302 (5903) : 58-61.
- Cavanaugh C.M.** (1985). Symbioses of chemoautotrophic bacteria and marine invertebrates from hydrothermal vents and reducing sediments. *The Biological Society of Washington* 6 : 373-388.
- Cavanaugh C.M.** (1994). Microbial symbiosis: Patterns of diversity in the marine environment. *American Zoologist* 34 (1) : 79-89.

- Cavanaugh C.M., Levering P.R., and Maki J.S.** (1987). Symbiosis of methylotropic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* 325 (6102) : 346-348.
- Cavanaugh C.M., Gardiner S.L., Jones M.L., Jannasch H.W., and Waterbury J.B.** (1981). Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: Possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213 (4505) : 340-342.
- Cayré P., et Richer de Forges B.** (2002). Faune mystérieuse des océans profonds. *La Recherche* 355 : 59-61.
- Chauvaud S., Bouchon C., et Manière R.** (2001). Cartographie des biocénoses marines de Guadeloupe à partir de données SPOT (récifs coralliens, phanérogames marines, mangroves). *Oceanologica Acta* 24 : 3-16.
- Childress J.J., and Fisher C.R.** (1992). The biology of hydrothermal vent animals: Physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*. 30 : 337-441.
- Cline J.D., and Richards F.A.** (1969). Oxygenation of hydrogen sulfide in seawater at constant salinity, temperature, and pH. *Environmental Science and Technology* 3 (9) : 838-843.
- Connell J.H., and Slatyer R.O.** (1977). Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *The American Naturalist* 111 (982) : 1119-1144.
- Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., Von Herzen R.P., Ballard R.D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., and Van Andel T.H.** (1979). Submarine thermal springs on the Galápagos rift. *Science* 203 (4385) : 1073.
- Cundell A.M., Brown M.S., Stanford R., and Mitchell R.** (1979). Microbial degradation of *Rhizophora mangle* leaves immersed in the sea. *Estuarine and Coastal Marine Science* 9 (3) : 281-286.

D

- Dahlgren T.G., Glover A.G., Baco A., and Smith C.R.** (2004). Fauna of whale falls: Systematics and ecology of a new polychaete (Annelida: Chrysopetalidae) from the deep Pacific cean. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 51 (12) : 1873-1887.
- Dahlgren T.G., Wiklund H., Källström B., Lundälv T., Smith C.R., and Glover A.G.** (2006). A shallow-water whale-fall experiment in the north Atlantic. *Cahiers De Biologie Marine* 47 (4) : 385-389.

- Dando P.R., Southward A.J., Southward E.C., Terwilliger N.B., and Terwilliger R.C.** (1985). Sulphur-oxidizing bacteria and haemoglobin in gills of the bivalve mollusc *Myrtea spinifera*. Marine Ecology Progress Series 23 : 85-98.
- De Beer D., Sauter E., Niemann H., Kaul N., Foucher J.P., Witte U., Schlüter M., and Boetius A.** (2006). *In situ* fluxes and zonation of microbial activity in surface sediments of the Hakon mosby mud volcano. Limnology and Oceanography 51 (3) : 1315-1331.
- Deming J.W., Reysenbach A.-L., Macko S.A., and Smith C.R.** (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. Microscopy Research and Technique 37 (2) : 162-170.
- Desbruyères D., Gaill F., Laubier L., Prieur D., and Rau G.H.** (1983). Unusual nutrition of the "pompeii worm" *Alvinella pompejana* (polychaetous annelid) from a hydrothermal vent environment: SEM, TEM, ¹³C and ¹⁵N evidence. Marine Biology 75 (2-3) : 201-205.
- Diouris D., Le Pennec M., et Herry A.** (1989). Rôle des bactéries symbiotiques chimioautotrophes dans la nutrition de bivalves marins de milieux réducteurs. Vie Marine 10 : 5-16.
- Distel D.L., and Wood A.P.** (1992). Characterization of the gill symbiont of *Thyasira flexuosa* (Thyasiridae: Bivalvia) by use of polymerase chain reaction and 16S rRNA sequence analysis. Journal of Bacteriology 174 (19) : 6317-6320.
- Distel D.L., and Roberts S.J.** (1997). Bacterial endosymbionts in the gills of the deep-sea wood-boring bivalves *Xylophaga atlantica* and *Xylophaga washingtona*. Biological Bulletin 192 (2) : 253-261.
- Distel D.L., Lee H.K.-W., and Cavanaugh C.M.** (1995). Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 92 (21) : 9598-9602.
- Distel D.L., Baco A.R., Chuang E., Morrill W., Cavanaugh C., and Smith C.R.** (2000). Do mussels take wooden steps to deep-sea vents? Nature 403 (6771) : 725-726.
- Distel D.L., Lane D.J., Olsen G.J., Giovannoni S.J., Pace B., Pace N.R., Stahl D.A., and Felbeck H.** (1988). Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: Analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. Journal of Bacteriology 170 (6) : 2506-2510.
- Dubilier N., Bergin C., and Lott C.** (2008). Symbiotic diversity in marine animals: The art of harnessing chemosynthesis. Nature Reviews Microbiology 6 (10) : 725-740.
- Dubilier N., Giere O., Distel D.L., and Cavanaugh C.M.** (1995). Characterization of chemoautotrophic bacterial symbionts in a gutless marine worm (Oligochaeta, Annelida) by phylogenetic 16S rRNA sequence analysis and *in situ* hybridization. Applied and Environmental Microbiology 61 (6) : 2346-2350.

- Dubilier N., Amann R., Erséus C., Muyzer G., Park S., Giere O., and Cavanaugh C.M.** (1999). Phylogenetic diversity of bacterial endosymbionts in the gutless marine oligochaete *Olavius loisae* (Annelida). *Marine Ecology Progress Series* 178 : 271-280.
- Dubilier N., Mülders C., Ferdelman T., DeBeer D., Pernthaler A., Klein M., Wagner M., Erséus C., Thiermann F., Krieger J., Giere O., and Amann R.** (2001). Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* 411 : 298-302.
- Duperron S.** (2005). Symbioses bactériennes de bivalves mytilidés associés aux sources de fluides en domaine océanique profond : Diversité, rôle nutritionnel et influence de l'environnement. Thèse de doctorat, Université Paris 6 _ Pierre et Marie Curie, 223 p.
- Duperron S., Laurent M.C.Z., Gaill F., and Gros O.** (2008). Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiology Ecology* 63 (3) : 338-349.
- Duperron S., Lorion J., Samadi S., Gros O., and Gaill F.** (2009). Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: Diversity, function and evolution. *Comptes Rendus - Biologies* 332 (2-3) : 298-310.
- Duperron S., Nadalig T., Caprais J.-C., Sibuet M., Fiala-Médioni A., Amann R., and Dubilier N.** (2005). Dual symbiosis in a *Bathymodiolus* sp. mussel from a methane seep on the Gabon continental margin (Southeast Atlantic): 16S rRNA phylogeny and distribution of the symbionts in gills. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (4) : 1694-1700.
- Duperron S., Bergin C., Zielinski F., Blazejak A., Pernthaler A., McKiness Z.P., DeChaine E., Cavanaugh C.M., and 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. *Environmental Microbiology* 8 (8) : 1441-1447.
- Durand P., Gros O., Frenkiel L., and Prieur D.** (1996). Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical Lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5 (1) : 37-42.

E

- Eisen J.A., Smith S.W., and Cavanaugh C.M.** (1992). Phylogenetic relationships of chemoautotrophic bacterial symbionts of *Solemya velum* Say (Mollusca: Bivalvia) determined by 16S rRNA gene sequence analysis. *Journal of Bacteriology* 174 (10) : 3416-3421.

Everett R.A., and Ruiz G.M. (1993). Coarse woody debris as a refuge from predation in aquatic communities - an experimental test. *Oecologia* 93 (4) : 475-486.

F

Felbeck H. (1981). Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera). *Science* 213 (4505) : 336-338.

Felbeck H., Childress J.J., and Somero G.N. (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* 293 (5830) : 291-293.

Felbeck H., Liebezeit G., Dawson R., and Giere O. (1983). CO₂ fixation in tissues of marine oligochaetes (*Phallodrilus leukodermatus* and *P. planus*) containing symbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Marine Biology* 75 (2-3) : 187-191.

Fenchel T.M., and Riedl R.J. (1970). The sulfide system: A new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. *Marine Biology* 7 (3) : 255-268.

Fiala-Médioni A., Alayse A.M., and Cahet G. (1986). Evidence of *in situ* uptake and incorporation of bicarbonate and amino acids by a hydrothermal vent mussel. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96 (2) : 191-198.

Fiala-Médioni A., McKiness Z.P., Dando P., Boulegue J., Mariotti A., Alayse-Danet A.M., Robinson J.J., and Cavanaugh C.M. (2002). Ultrastructural, biochemical, and immunological characterization of two populations of the mytilid mussel *Bathymodiolus azoricus* from the Mid-Atlantic Ridge: Evidence for a dual symbiosis. *Marine Biology* 141 (6) : 1035-1043.

Fisher C.R., and Childress J.J. (1986). Translocation of fixed carbon from symbiotic bacteria to host tissues in the gutless bivalve *Solemya reidi*. *Marine Biology* 93 (1) : 59-68.

Fisher C.R., Brooks J.M., Vodenichar J.S., Zande J.M., Childress J.J., and Burke Jr R.A. (1993). The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Marine Ecology* 14 (4) : 277-289.

Fors Y., Nilsson T., Risberg E.D., Sandström M., and Torssander P. (2008). Sulfur accumulation in pinewood (*Pinus sylvestris*) induced by bacteria in a simulated seabed environment: Implications for marine archaeological wood and fossil fuels. *International Biodeterioration and Biodegradation* 62 (4) : 336-347.

Fourquez M. (2009). Caractérisation chimique et biologique des écosystèmes chimiosynthétiques organiques de type osseux. Mémoire de Master 2, Université des Antilles et de la Guyane. 31 p.

- Frenkiel L., and Moueza M.** (1995). Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae). *Zoomorphology* 115 (1) : 51-61.
- Frenkiel L., Gros O., and Moueža M.** (1996). Gill structure in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae) with reference to hemoglobin in bivalves with symbiotic sulphur-oxidizing bacteria. *Marine Biology* 125 (3) : 511-524.
- Friedrich M.W.** (2002). Phylogenetic analysis reveals multiple lateral transfers of Adenosine-5'-phosphosulfate Reductase genes among sulfate-reducing microorganisms. *Journal of Bacteriology* 184 (1) : 278-289.
- Fujiwara Y., Kawato M., Yamamoto T., Yamanaka T., Sato-Okoshi W., Noda C., Tsuchida S., Komai T., Cubelio S.S., Sasaki T., Jacobsen K., Kubokawa K., Fujikura K., Maruyama T., Furushima Y., Okoshi K., Miyake H., Miyazaki M., Nogi Y., Yatabe A., and Okutani T.** (2007). Three-year investigations into sperm whale-fall ecosystems in Japan. *Marine Ecology* 28 (1) : 219-232.

G

- Gaill F.** (1993). Aspects of life development at deep sea hydrothermal vents. *The FASEB Journal* 7 (6) : 558-565.
- Gaill F., and Hunt S.** (1986). Tubes of deep sea hydrothermal vent worms *Riftia pachyptila* (Vestimentifera) and *Alvinella pompejana* (Annelida). *Marine Ecological Progress Series* 34 : 267-274.
- Gaill F., Desbruyères D., and Prieur D.** (1987). Bacterial communities associated with "Pompei worms" from the east pacific rise hydrothermal vents: SEM, TEM observations. *Microbial Ecology* 13 (2) : 129-139.
- Gallagher E.D., and Keay K.E.** (1998). Organism-sediment-contaminant interactions in Boston Harbor In *Contaminated Sediments in Boston Harbor*, in *MIT Sea Grant Publication 98-1*, K.D. Stolzenbach & E.E. Adams, eds, MIT, Cambridge, pp. 89-132.
- Giere O.** (2006). Ecology and biology of marine Oligochaeta - an inventory rather than another review. *Hydrobiologia* 564 (1) : 103-116.
- Giere O., and Erséus C.** (2002). Taxonomy and new bacterial symbioses of gutless marine Tubificidae (Annelida, Oligochaeta) from the island of Elba (Italy). *Organisms Diversity and Evolution* 2 (4) : 289-297.
- Goffredi S.K., Paull C.K., Fulton-Bennett K., Hurtado L.A., and Vrijenhoek R.C.** (2004). Unusual benthic fauna associated with a whale fall in Monterey canyon, California. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 51 (10) : 1295-1306.

- Grassle J.F., and Morse-Porteous L.S.** (1987). Macrofaunal colonization of disturbed deep-sea environments and the structure of deep-sea benthic communities. *Deep Sea Research Part A, Oceanographic Research Papers* 34 (12) : 1911-1950.
- Grieshaber M.K., and Völke S.** (1998). Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annual Review of Physiology* 60 : 33-53.
- Gros O., and Gaill F.** (2007). Extracellular bacterial association in gills of «wood mussels». *Cahiers De Biologie Marine* 48 (1) : 103-109.
- Gros O., and Maurin L.C.** (2008). Easy flat embedding of oriented samples in hydrophilic resin (LR white) under controlled atmosphere: Application allowing both nucleic acid hybridizations (CARD-FISH) and ultrastructural observations. *Acta Histochemica* 110(5): 427-431.
- Gros O., Liberge M., and Felbeck H.** (2003). Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Marine Biology* 142 (1) : 57-66.
- Gros O., Guibert J., and Gaill F.** (2007). Gill-symbiosis in Mytilidae associated with wood fall environments. *Zoomorphology* 126 (3) : 163-172.
- Guilcher A., et Marec A.** (1978). Le récif-barrière et le lagon du Grand Cul-de-Sac Marin (Guadeloupe, Antilles françaises). *Géomorphologie et sédiments. Oceanologica Acta* 1 (4) : 435-444.

H

- Haddad A., Camacho F., Durand P., and Cary S.C.** (1995). Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (5) : 1679-1687.
- Hargrave B.T., Holmer M., and Newcombe C.P.** (2008). Towards a classification of organic enrichment in marine sediments based on biogeochemical indicators. *Marine Pollution Bulletin* 56 (5) : 810-824.
- Hasegawa K.** (1997). Sunken wood-associated gastropods collected from the Suruga Bay, Pacific side of the central Honshu, Japan, with description of 12 species. *National Science Museum Monographs* 12 : 59-123.
- Hentschel U., Berger E.C., Bright M., Felbeck H., and Ott J.A.** (1999). Metabolism of nitrogen and sulfur in ectosymbiotic bacteria of marine nematodes (Nematoda, Stilbonematinae). *Marine Ecology Progress Series* 183 : 149-158.

Himmel D., Maurin L.C., Gros O., and Mansot J.L. (2009). Raman microspectrometry sulfur detection and characterization in the marine ectosymbiotic nematode *Eubostrichus diana* (Desmodoridae, Stilbonematidae). *Biology of the Cell* 101 (1) : 43-54.

Holt D.M., and Jones E.B. (1983). Bacterial degradation of lignified wood cell walls in anaerobic aquatic habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 46 (3) : 722-727.

Hugues D.J., and Crawford M. (2006). A new record of the vestimentiferan *Lamellibrachia* sp. (Polychaeta: Siboglinidae) from a deep shipwreck in the eastern Mediterranean. *JMBA2-Biodiversity Record*. <http://www/mba.ac.uk/jmba/jmba2biodiversityrecords.php?5198>.

I

Imbert D., Bland F., et Russier F. (1988). Les milieux humides du littoral guadeloupéen. ISBN 2-907637-02-9. Office National des Forêts. France. 61 p.

Iseto T. (2002). *Loxocorone*, a new genus of the family Loxosomatidae (Entoprocta: Solitaria), with descriptions of two new *Loxomitra* (*sensu stricto*) and a new *Loxocorone* from Okinawa, the Ryukyu archipelago, Japan. *Zoological Science* 19 (3) : 359-367.

J

Jannash H.W. and Mottl M.J. (1985). Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science* 229: 717-725.

Jannash H.W. and Wirsen C.O. (1985) The biochemical versatility of chemosynthetic bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *Biological Society of Washington Bulletin*. 6: 325-334.

Janies D., and Mooi R. (1998). *Xyloplax* is an asteroid. In: M.D. Candia Carevali and F. Bonasoro (Eds), *Echinoderm research*. A.A. Belmaka. Rotterdam : 311-316.

Jensen A.S. (1912). Lamellibranchiata. Part I. The Danish Ingolf-Expedition. 2 (5):1- 119.

Johnson J.E. (1988). Electron capture sulfur detector: Reduced sulfur species detection at the femtomole level. *Analytical Chemistry* 60 (8) : 812-816.

Jones M.L. (1981). *Riftia pachyptila* Jones: Observations on the vestimentiferan worm from the Galápagos rift. *Science* 213 (4505) : 333-335.

Jones W.J., Won Y.-J., Maas P.A.Y., Smith P.J., Lutz R.A., and Vrijenhoek R.C. (2005). Evolution of habitat use by deep-sea mussels. *Marine Biology* 148 (4) : 841-851.

K

Karl D.M. (2002). Nutrient dynamics in the deep blue sea. *Trends in Microbiology* 10 (9) : 410-418.

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

Kiel S., and Goedert J.L. (2006a). Deep-sea food bonanzas: Early Cenozoic whale-fall communities resemble wood-fall rather than seep communities. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* 273 (1601) : 2625-2631.

Kiel S., and Goedert J.L. (2006b). A wood-fall association from late Eocene deep-water sediments of Washington State, USA. *Palaios* 21 (6) : 548-556.

Kiel S., and Goedert J.L. (2007). New mollusks associated with biogenic substrates in Cenozoic deep-water sediments of Washington State. *Acta Palaeontologica Polonica* 52 (1) : 41-52.

Kiel S., Amano K., Hikida Y., and Jenkins R.G. (2008). Wood-fall associations from late cretaceous deep-water sediments of Hokkaido, Japan. *Lethaia* 42 (1) : 74-82.

Kim Y.S., and Singh A.P. (2000). Micromorphological characteristics of wood biodegradation in wet environments: A review. *IAWA Journal* 21 (2) : 135-155.

Knudsen J. (1961). The bathyal and abyssal *Xylophaga*. *Galathea Report* 5 : 163-209.

Kouris A., Juniper K.S., Frébourg G., and Gaill F. (2007). Protozoan-bacterial symbiosis in a deep-sea hydrothermal vent folliculinid ciliate (*Folliculinopsis* sp.) from the Juan de Fuca ridge. *Marine Ecology* 28 (1) : 63-71.

Krueger D.M., Dubilier N., and Cavanaugh C.M. (1996). Chemoautotrophic symbiosis in the tropical clam *Solemya occidentalis* (Bivalvia: Protobranchia): Ultrastructural and phylogenetic analysis. *Marine Biology* 126 (1) : 55-64.

L

- Lallier-Vergès E., Perrussel B.P., Disnar J.R., and 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). *Organic Geochemistry* 29 (5-7) : 1663-1686.
- Laubier L.** (1990). Ecosystèmes benthiques profonds et chimiosynthèse bactérienne : Sources hydrothermales et suintements froids. *IFREMER. Actes De Colloques* : 134-160.
- Leal J.H., and Harasewych M.G.** (1999). Deepest Atlantic molluscs: Hadal limpets (Mollusca, Gastropoda, Cocculiniformia) from the northern boundary of the Caribbean plate. *Invertebrate Biology* 118 (2) : 116-136.
- Le Bris N., Sarradin P.M., and Pennec S.** (2001). A new deep-sea probe for *in situ* pH measurement in the environment of hydrothermal vent biological communities. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 48 : 1941-1951.
- Le Bris N., Sarradin P.M., and Caprais J.C.** (2003). Contrasted sulphide chemistries in the environment of 13°N EPR vent fauna. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 50 (6) : 737-747.
- Le Bris N., Sarradin P.M., Birot D., and Alayse-Danet A.M.** (2000). A new chemical analyzer for *in situ* measurement of nitrate and total sulfide over hydrothermal vent biological communities. *Marine Chemistry* 72 : 1-15.
- Le Bris N., Govenar B., Le Gall C., and Fisher C.R.** (2006a). Variability of physico-chemical conditions in 9°50'N EPR diffuse flow vent habitats. *Marine Chemistry* 98 (2-4) : 167-182.
- Le Bris N., Rodier P., Sarradin P.M., and Le Gall C.** (2006b). Is temperature a good proxy for sulfide in hydrothermal vent habitats? *Cahiers De Biologie Marine* 47 (4) : 465-470.
- Le Bris N., Brulport J.-P., Laurent M.C.Z., Lacombe M., Garcon V., Gros O., Comtat M., and Gaill F.** (2008). Autonomous potentiometric sensor for *in situ* sulfide monitoring in marine sulfidic media. *European Geosciences Union General Assembly* (Vienne).
- Le Pennec M., and Hily A.** (1984). Anatomie, structure et ultrastructure de la branchie d'un Mytilidae des sites hydrothermaux du Pacifique Oriental. *Oceanologica Acta* 7 (4) : 517-523.
- Le Pennec M., Beninger P.G., and Herry A.** (1995). Feeding and digestive adaptations of bivalve molluscs to sulphide-rich habitats. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Physiology* 111 (2) : 183-189.

- Lechaire J.-P., Frébourg G., Gaill F., and Gros O.** (2008). *In situ* characterization of sulphur in gill-endosymbionts of the shallow water lucinid *Codakia orbicularis* (Linné, 1758) by high-pressure cryofixation and EFTEM microanalysis. *Marine Biology* 154 (4) : 693-700.
- Leschine S.B.** (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology* 49 : 399-426.
- Lescure J.P.** (1980). Aperçu architectural de la mangrove guadeloupéenne. *Acta Oecologica* 1 (3) : 249-265.
- Loka Bharathi P.A.** (2004). Synergy in sulfur cycle: The biogeochemical significance of sulfate reducing bacteria in syntrophic associations. In N.N. Ramaiah (Ed) *Marine microbiology facets and opportunities*. National Institute of oceanography, India : 39-51.
- Loka Bharathi P.A.** (2008). Sulfur cycle. In S.E. Jorgensen and B.D. Fath. (Eds) *Global ecology Vol 4 of Encyclopedia of Ecology*. Elsevier, Oxford: 3424-3431.
- Lonsdale P.** (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers. *Deep-Sea Research* 24 (9) : 857-863.
- Lorion J., Duperron S., Gros O., Cruaud C., and Samadi S.** (2008). Several deep-sea mussels and their associated symbionts are able to live both on wood and on whale falls. *Proceedings of the Royal Society - Biological Sciences (Series B)* 276 : 177-185.
- Luther III G.W., Glazer B.T., Ma S., Trouwborst R.E., Moore T.S., Metzger E., Kraiyya C., Waite T.J., Druschel G., Sundby B., Taillefert M., Nuzzio D.B., Shank T.M., Lewis B.L., and Brendel P.J.** (2008). Use of voltammetric solid-state (micro)electrodes for studying biogeochemical processes: Laboratory measurements to real time measurements with an *in situ* electrochemical analyzer (ISEA). *Marine Chemistry* 108 (3-4) : 221-235.
- Lutz R.A., and Kennish M.J.** (1993). Ecology of deep-sea hydrothermal vent communities: A review. *Reviews of Geophysics* 31 (3) : 211-242.

M

- Maddocks R.F., and Steineck P.L.** (1987). Ostracoda from experimental wood-island habitats in the deep sea. *Micropaleontology* 33 (4) : 318-355.
- Mah C.L.** (2006). A new species of *Xyloplax* (Echinodermata: Asteroidea: Concentricycloidea) from the Northeast Pacific: Comparative morphology and a reassessment of phylogeny. *Invertebrate Biology* 125 (2) : 136-153.

- Mandernack K.W., Roy Krouse H., and Skei J.M.** (2003). A stable sulfur and oxygen isotopic investigation of sulfur cycling in an anoxic marine basin, Framvaren fjord, Norway. *Chemical Geology* 195 (1-4) : 181-200.
- Mantran M.** (2007). Etude morphologique, bathymétrique, courantométrique et physico-chimique de la lagune de la Manche-à-Eau en Guadeloupe; relation avec la zonation biologique. Rapport de Master professionnel en sciences et technologies Biodiversité tropicale, Université des Antilles et de la Guyane. 36 p.
- Mantran M., Hamparian R., and Bouchereau J.-L.** (2009). Géomorphologie et hydrologie de la lagune de la Manche-à-Eau (Guadeloupe, Antilles françaises). *Géomorphologie : Relief, Processus, Environnement* 3 : 199-210.
- Markert S., Arndt C., Felbeck H., Becher D., Sievert S.M., Hügler M., Albrecht D., Robidart J., Bench S., Feldman R.A., Hecker M., and Schweder T.** (2007). Physiological proteomics of the uncultured endosymbiont of *Riftia pachyptila*. *Science* 315 (5809) : 247-250.
- Matthews D.C.** (1953). New hawaiian records of folliculinids (Protozoa). *Transactions of the American Microscopical Society* 72 (4) : 344.
- Maurin L.C., Himmel D., Mansot J.L., Laurent M.C.Z., and Gros O.** (2008). Preliminary assumption of sulphur-oxidizing bacterial symbiosis by Raman microspectrometry: An application on mangrove swamp meiofauna of Guadeloupe (F.W.I). *European Geosciences Union General Assembly* (Vienna).
- Millero F.J., Hubinger S., Fernandez M., and Garnett S.** (1987). Oxidation of H₂S in seawater as a function of temperature, pH, and ionic strength. *Environmental Science and Technology* 21 (5) : 439-443.
- Minic Z., Serre V., and Hervé G.** (2006). Adaptation of organisms to extreme conditions of deep-sea hydrothermal vents. *Comptes Rendus - Biologies* 329 (7) : 527-540.
- Moran N.A.** (2007). Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (SUPP1) : 8627-8633.
- Murray J.** (1895) Preliminary reports to Professor Wyville Thomson, F.R.S., Director of the Civilian Scientific Staff, on work done on board the "Challenger". *Proceedings of the royal society of London* 24(1875-1876): 471-544.
- Murray J., and Renard A.F.** (1891). Report on the deep-sea deposits based on the specimens collected during the voyage. *Report on the scientific results of the voyage of H.M.S. Challenger*, London 1-496.
- Musat N., Giere O., Gieseke A., Thiermann F., Amann R., and Dubilier N.** (2007). Molecular and morphological characterization of the association between bacterial endosymbionts and the marine nematode *Astomonema* sp. from the Bahamas: Brief report. *Environmental Microbiology* 9 (5) : 1345-1353.

N

- Nagelkerken I., Blaber S.J.M., Bouillon S., Green P., Haywood M., Kirton L.G., Meynecke J.-O., Pawlik J., Penrose H.M., Sasekumar A., and Somerfield P.J.** (2008). The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic Botany* 89 (2) : 155-185.
- Nelson D.C., and Hagen K.D.** (1995). Physiology and biochemistry of symbiotic and free-living chemoautotrophic sulfur bacteria. *American Zoologist* 35 (2) : 91-101.
- Nelson D.C., Hagen K.D., and Edwards D.B.** (1995). The gill symbiont of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus thermophilus* is a psychrophilic, chemoautotrophic, sulfur bacterium. *Marine Biology* 121 (3) : 487-496.
- Newton I.L.G., Girguis P.R., and Cavanaugh C.M.** (2008). Comparative genomics of vesicomyid clam (Bivalvia: Mollusca) chemosynthetic symbionts. *BMC Genomics* 9. doi:10.1186/1471-2164-9-585.
- Ng P.K.L., and Manuel-Santos M.R.** (2007). Establishment of the Vultocinidae, a new family for an unusual new genus and new species of indo-west pacific crab (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Goneplacoidea), with comments on the taxonomy of the Goneplacidae. *Zootaxa* (1558) : 39-68.
- Nielsen C.** (1996). Three new species of *Loxosoma* (Entoprocta) from Phuket, Thailand, with a review of the genus. *Zoologica Scripta* 25 (1) : 61-75.
- Nishimoto A., Mito S., and Shirayama Y.** (2009). Organic carbon and nitrogen source of sunken wood communities on continental shelves around Japan inferred from stable isotope ratios. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* . 56 : 1683-1688.

O

- Ott J.** (1996). Sulphide ectosymbioses in shallow marine habitats. *Biosystematics and Ecology Series* 11: 369-382.
- Ott J., and Bright M.** (2004). Sessile ciliates with bacterial ectosymbionts from Twin Cays, Belize. *Atoll Research Bulletin* (509-530) : 1-7.
- Ott J.A., Bright M., and Schiemer F.** (1998). The ecology of a novel symbiosis between a marine peritrich ciliate and chemoautotrophic bacteria. *Marine Ecology* 19 (3) : 229-243.

Ott J., Bright M., and Bulgheresi S. (2004a). Marine microbial thiotrophic ectosymbioses. *Oceanography and Marine Biology* 42 : 95-118.

Ott J., Bright M., and Bulgheresi S. (2004b). Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* 36 (2) : 103-126.

P

Pailleret M., Haga T., Petit P., Privé-Gill C., Saedlou N., Gaill F., and Zbinden M. (2007a). Sunken wood from the Vanuatu islands: Identification of wood substrates and preliminary description of associated fauna. *Marine Ecology* 28 (1) : 233-241.

Pailleret M., Saedlou N., Palacios C., Zbinden M., Lebaron P., Gaill F., and Privé-Gill C. (2007b). Identification of natural sunken wood samples. *Comptes Rendus - Palevol* 6 (6-7) : 463-468.

Palacios C., Zbinden M., Pailleret M., Gaill F., and Lebaron P. (2009). Highly similar prokaryotic communities of sunken wood at shallow and deep-sea sites across the oceans. *Microbial Ecology* : 1-16.

Palacios C., Zbinden M., Baco A.R., Treude T., Smith C.R., Gaill F., Lebaron P., and Boetius A. (2006). Microbial ecology of deep-sea sunken wood: Quantitative measurements of bacterial biomass and cellulolytic activities. *Cahiers De Biologie Marine* 47 (4) : 415-420.

Paul C.K., Hecker B., Commeau R., Freeman-Lynde R.P., Neumann C., Corso W.P., Golubic S., Hook J.E., Sikes E., and Curray J. (1984). Biological communities at the Florida escarpment resemble hydrothermal vent taxa. *Science* 226 (4677) : 965-967.

Pernthaler A., Pernthaler J., and Amann R. (2002). Fluorescence *in situ* hybridization and Catalyzed Reporter Deposition for the identification of marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 68 (6) : 3094-3101.

Polz M.F., and Cavanaugh C.M. (1995). Dominance of one bacterial phylotype at a Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (16) : 7232-7236.

Polz M.F., Felbeck H., Novak R., Nebelsick M., and Ott J.A. (1992). Chemoautotrophic, sulfur-oxidizing symbiotic bacteria on marine nematodes: Morphological and biochemical characterization. *Microbial Ecology* 24 (3) : 313-329.

Polz M.F., Distel D.L., Zarda B., Amann R., Felbeck H., Ott J.A., and Cavanaugh C.M. (1994). Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (12) : 4461-4467.

- Powell M.A., and Somero G.N.** (1983). Blood components prevent sulfide poisoning of respiration of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science* 219 (4582) : 297-299.
- Powell E.N., Crenshaw M.A., and Rieger R.M.** (1979). Adaptations to sulfide in the meiofauna of the sulfide system. I. ^{35}S -sulfide accumulation and the presence of a sulfide detoxification system. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 37 (1) : 57-76.
- Prime-Habdija B., and Matonićkin R.** (2005). A new freshwater folliculinid (Ciliophora) from the Karstic region of Croatia. *European Journal of Protistology* 41 (1) : 37-43.

R

- Ramirez-Llodra E., Tyler P.A., and German T.C.** (2003) Biogeography of deep-water chemosynthetic ecosystems (CHESS): exploring the southern oceans. *Gayana* 67(2) : 168-176.
- Rau G.H.** (1981). Hydrothermal vent clam and tube worm $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: Further evidence of nonphotosynthetic food sources. *Science* 213 (4505) : 338-340.
- Reid R.G.B., and Bernard F.R.** (1980). Gutless bivalves. *Science* 208 (4444) : 609-610.
- Renaud-Mornant J., et Gourbault N.** (1984). Premières prospections méiofaunistiques en Guadeloupe II: Communautés des sables littoraux. *Hydrobiologia* 118 : 113-118.
- Reynolds E.S.** (1963). The use of the lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17 : 208-212.
- Rickard D., and Luther III G.W.** (2007). Chemistry of iron sulfides. *Chemical Reviews* 107 (2) : 514-562.
- Rieley G., Van Dover C.L., Hedrick D.B., and Eglinton G.** (1999). Trophic ecology of *Rimicaris exoculata*: A combined lipid abundance/stable isotope approach. *Marine Biology* 133 (3) : 495-499.
- Rinke C., Lee R., Katz S., and Bright M.** (2007). The effects of sulphide on growth and behaviour of the thiotrophic *zoothamnium niveum* symbiosis. *Proceedings of the Royal Society Series B Biological Sciences* 274 (1623) : 2259-2269.
- Rinke C., Schmitz-Esser S., Loy A., Horn M., Wagner M., and Bright M.** (2009). High genetic similarity between two geographically distinct strains of the sulfur-oxidizing symbiont '*Candidatus* Thiobios zoothamnicoli'. *FEMS Microbiology Ecology* 67 (2) : 229-241.

- Rinke C., Schmitz-Esser S., Stoecker K., Nussbaumer A.D., Molnár D.A., Vanura K., Wagner M., Horn M., Ott J.A., and Bright M.** (2006). "*Candidatus* Thiobios zoothamnicoli," an ectosymbiotic bacterium covering the giant marine ciliate *Zoothamnium niveum*. *Applied and Environmental Microbiology* 72 (3) : 2014-2021.
- Riou V., Halary S., Duperron S., Bouillon S., Elskens M., Bettencourt R., Santos R.S., Dehairs F., and Colaço A.** (2008). Influence of chemosynthetic substrates availability on symbiont densities, carbon assimilation and transfer in the dual symbiotic vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. *Biogeosciences Discussions* 5 (3) : 2279-2304.
- Robidart J.C., Bench S.R., Feldman R.A., Novoradovsky A., Podell S.B., Gaasterland T., Allen E.E., and Felbeck H.** (2008). Metabolic versatility of the *Riftia pachyptila* endosymbiont revealed through metagenomics. *Environmental Microbiology* 10 (3) : 727-737.
- Robinson J.J., Stein J.L., and Cavanaugh C.M.** (1998). Cloning and sequencing of a form II ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from the bacterial symbiont of the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Journal of Bacteriology* 180 (6) : 1596-1599.
- Rouse G.W., Goffredi S.K., and Vrijenhoek R.C.** (2004). *Osedax*: Bone-eating marine worms with dwarf males. *Science* 305 (5684) : 668-671.
- Rowe F.W.E., Baker A.N., and Clark H.E.S.** (1988). The morphology, development and taxonomic status of *Xyloplax* Baker, Rowe and Clark (1986) (Echinodermata: Concentricycloidea), with the description of a new species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 233 (1273) : 431-459.
- Ruehland C., Blazejak A., Lott C., Loy A., Erséus C., and Dubilier N.** (2008). Multiple bacterial symbionts in two species of co-occurring gutless oligochaete worms from Mediterranean seagrass sediments. *Environmental Microbiology* 10 (12) : 3404-3416.

S

- Sahling H., Galkin S.V., Salyuk A., Greinert J., Foerstel H., Piepenburg D., and Suess E.** (2003). Depth-related structure and ecological significance of cold-seep communities - A case study from the sea of Okhotsk. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 50 (12) : 1391-1409.
- Samadi S., Quéméré E., Lorion J., Tillier A., vonCosel R., Lopez P., Cruaud C., Couloux A., and Boisselier-Dubayle M.-C.** (2007). Molecular phylogeny in mytilids supports the wooden steps to deep-sea vents hypothesis. *Comptes Rendus - Biologies* 330 (5) : 446-456.

- Sandström M., Jalilehvand F., Persson I., Gelius U., Frank P., and Hall-Roth I.** (2002). Deterioration of the seventeenth-century warship vasa by internal formation of sulphuric acid. *Nature* 415 (6874) : 893-897.
- Sandström M., Jalilehvand F., Damian E., Fors Y., Gelius U., Jones M., and Salomé M.** (2005). Sulfur accumulation in the timbers of king Henry VIII's warship Mary Rose: A pathway in the sulfur cycle of conservation concern. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (40) : 14165-14170.
- Schmidt T.M., Arieli B., Cohen Y., Padan E., and Strohl W.R.** (1987). Sulfur metabolism in *Beggiatoa alba*. *Journal of Bacteriology* 169 (12) : 5466-5472.
- Schönhuber W., Fuchs B., Juretschko S., and Amann R.** (1997) Improved sensitivity of whole cell hybridization by the combination of Horseradish Peroxydase-labeled oligonucleotides and tyramide signal amplification. *Applied and Environmental Microbiology* 63(8) : 3268-3273.
- Sekar R., Fuchs B.M., Amann R., and Pernthaler J.** (2004). Flow sorting of marine bacterioplankton after Fluorescence *in situ* Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (10) : 6210-6219.
- Sélosse M.** (2000). La symbiose : Structures et fonctions, rôle écologique et évolutif. Vuibert, France. 154 p.
- Shively J.M.** (1974). Inclusion bodies of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology* 28 (0) : 167-187.
- Smith D.C., and Douglas A.E.** (1987). The biology of symbiosis. Edward Arnold, Baltimor. 302 p.
- Smith C.R., and Baco A.R.** (2003). Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanography and Marine Biology* 41 : 311-354.
- Soldo A.T., Godoy G.A., and Magalhães S.** (1974). Infectious particle in marine ciliate. *Nature* 249 : 284-286.
- Southwell C.R., and Bultman J.D.** (1971). Marine borer resistance of untreated woods over long periods of immersion in tropical waters. *Biotropica* 3 (1) : 81-107.
- Stein J.L., Cary S.C., Hessler R.R., Ohta S., Vetter R.D., Childress J.J., and Felbeck H.** (1988). Chemoautotrophic symbiosis in a hydrothermal vent gastropod. *Biological Bulletin* 174 (3) : 373-378.
- Suzuki I.** (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Canadian Journal of Microbiology* 45 (2) : 97-105.

- Suzuki Y., Sasaki T., Suzuki M., Tsuchida S., Nealson K.H., and Horikoshi K.** (2005a). Molecular phylogenetic and isotopic evidence of two lineages of chemoautotrophic endosymbionts distinct at the subdivision level harbored in one host-animal type: The genus *Alviniconcha* (Gastropoda: Provannidae). *FEMS Microbiology Letters* 249 (1) : 105-112.
- Suzuki Y., Sasaki T., Suzuki M., Nogi Y., Miwa T., Takai K., Nealson K.H., and Horikoshi K.** (2005b). Novel chemoautotrophic endosymbiosis between a member of the epsilonproteobacteria and the hydrothermal-vent gastropod *Alviniconcha aff. hessleri* (Gastropoda: Provannidae) from the Indian Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* 71 (9) : 5440-5450.
- Suzuki Y., Kojima S., Watanabe H., Suzuki M., Tsuchida S., Nunoura T., Hirayama H., Takai K., Nealson K.H., and Horikoshi K.** (2006). Single host and symbiont lineages of hydrothermal-vent gastropods *Ifremeria nautili* (Provannidae): Biogeography and evolution. *Marine Ecology Progress Series* 315 : 167-175.

T

- Taillefert M., Luther III G.W., and Nuzzio D.B.** (2000). The application of electrochemical tools for *in situ* measurements in aquatic systems. *Electroanalysis* 12 (6) : 401-412.
- Tarasov V.G., Gebruk A.V., Mironov A.N., and Moskalev L.I.** (2005). Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: Two different phenomena? *Chemical Geology* 224 (1-3) : 5-39.
- Toffart J.L.** (1983). Les peuplements des racines de palétuviers en Guadeloupe (Antilles françaises): I- analyse floristique et faunistique; méthodologie et premiers résultats. *Bulletin of Ecology* 14 (4) : 227-239.
- Torres-Pratts H., and Schizas N.V.** (2007). Meiofaunal colonization of decaying leaves of the red mangrove *Rhizophora mangle*, in southwestern Puerto Rico. *Caribbean Journal of Science* 43 (1) : 127-137.
- Tunnicliffe V., Juniper S.K., and Sibuet M.** (2003). Reducing environments of the deep-sea floor. *Ecosystems of the world: the deep-sea*. P. A. Tyler. : 81-110. Elsevier Press.
- Turner R.D.** (1973). Wood-boring bivalves, opportunistic species in the deep sea. *Science* 180 (4093) : 1377-1379.
- Turner R.D.** (1977). Wood, mollusks, and deep-sea food chains. *Bulletin of the American Malacological Union* : 13-19.
- Tyler P.A., German C.R., Ramirez-Llodra E., and Van Dover C.L.** (2003). Understanding the biogeography of chemosynthetic ecosystems. *Oceanologica Acta* 25 (5) : 227-241.

U

- Urakawa H., Dubilier N., Fujiwara Y., Cunningham D.E., Kojima S., and Stahl D.A.** (2005). Hydrothermal vent gastropods from the same family (Provannidae) harbour ϵ - and γ -proteobacterial endosymbionts. *Environmental Microbiology* 7 (5) : 750-754.

V

- Vetter E.W.** (1995). Detritus-based patches of high secondary production in the nearshore benthos. *Marine Ecology Progress Series* 120 (1-3) : 251-262.
- Vetter E.W., and Dayton P.K.** (1998). Macrofaunal communities within and adjacent to a detritus-rich submarine canyon system. *Deep-Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 45 (1-3) : 25-54.
- Vetter E.W., and Dayton P.K.** (1999). Organic enrichment by macrophyte detritus, and abundance patterns of megafaunal populations in submarine canyons. *Marine Ecology Progress Series* 186 : 137-148.
- Voight J.R.** (2005). First report of the enigmatic echinoderm *Xyloplax* from the North Pacific. *Biological Bulletin* 208 (2) : 77-80.
- Voight J.R.** (2007). Experimental deep-sea deployments reveal diverse northeast pacific wood-boring bivalves of Xylophaginae (Myoida: Pholadidae). *Journal of Molluscan Studies* 73 (4) : 377-391.
- Voight J.R.** (2008). Deep-sea wood-boring bivalves of *Xylophaga* (Myoida: Pholadidae) on the continental shelf: A new species described. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 88 (7) : 1459-1464.
- Volkov I.I., and Rozanov A.G.** (2006). Fundamentals of biohydrochemistry of anoxic basins. *Oceanology* 46 (6) : 803-816.
- Vopel K., Pöhn M., Sorgo A., and Otto J.** (2001). Ciliate-generated advective seawater transport supplies chemoautotrophic ectosymbionts. *Marine Ecology Progress Series* 210 : 93-99.
- Vopel K., Reick C.H., Arlt G., Pöhn M., and Ott J.A.** (2002). Flow microenvironment of two marine peritrich ciliates with ectobiotic chemoautotrophic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 29 (1) : 19-28.
- Vopel K., Thistle D., Ott J., Bright M., and Røy H.** (2005). Wave-induced H₂S flux sustains a chemoautotrophic symbiosis. *Limnology and Oceanography* 50 (1) : 128-133.

Vrijenhoek R.C., Duhaime M., and Jones W.J. (2007). Subtype variation among bacterial endosymbionts of tubeworms (Annelida: Siboglinidae) from the Gulf of California. *Biological Bulletin* 212 (3) : 180-184.

W

Wahl M. (1989). Marine epibiosis. I. Fouling and antifouling: Some basic aspects. *Marine Ecology Progress Series* 58 : 175-189.

Warén A. (1996). New and little known Mollusca from Iceland and Scandinavia. Part 3. *Sarsia* 81 (3) : 197-245.

Waterbury J.B., Calloway C.B., and Turner R.D. (1983). A cellulolytic nitrogen-fixing bacterium cultured from the gland of deshayes in shipworms (Bivalvia: Teredinidae). *Science* 221 (4618) : 1401-1403.

Westrich J.T., and Berner R.A. (1984). The role of sedimentary organic matter in bacterial sulfate reduction: The G model tested. *Limnology & Oceanography* 29 (2) : 236-249.

Williams A.B., and Turner R.D. (1986). Squat lobsters (Galatheidae: Munidopsis) associated with mesh-enclosed wood panels submerged in the deep sea. *Journal of Crustacean Biology* 6 (3) : 617-624.

Wirsen C.O. (1976). Decomposition of solid organic materials in the deep sea. *Environmental Science and Technology* 10 (9) : 880-886.

Wolff T. (1979). Macrofaunal utilization of plant remains in the deep sea. *Sarsia* 64 (1-2) : 117-136.

Wolff T. (2005). Composition and endemism of the deep-sea hydrothermal vent fauna. *Cahiers De Biologie Marine* 46 (2) : 97-104.

Won Y.-J., Hallam S.J., O'Mullan G.D., Pan I.L., Buck K.R., and Vrijenhoek R.C. (2003). Environmental acquisition of thiotrophic endosymbionts by deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus*. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (11) : 6785-6792.

Woyke T., Teeling H., Ivanova N.N., Huntemann M., Richter M., Gloeckner F.O., Boffelli D., Anderson I.J., Barry K.W., Shapiro H.J., Szeto E., Kyrpides N.C., Mussmann M., Amann R., Bergin C., Ruehland C., Rubin E.M., and Dubilier N. (2006). Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 443 (7114) : 950-955.

Z

Zbinden M., Shillito B., Le Bris N., de Villardi de Montlaur C., Roussel E., Guyot F., Gail F., and Cambon-Bonavita M.-A. (2008). New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 359 (2) : 131-140.

ANNEXES

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1

Duperron S., Laurent M.C.Z., Gaill F., and Gros O. (2008). Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of mytilidae associated with wood falls. FEMS Microbiology Ecology 63 (3) : 338-349.

Annexe 2

Laurent M.C.Z., Gros O., Brulport J-P., Gaill F. and Le Bris N. (2009) Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. Marine Environmental Research 67 : 83-88.

