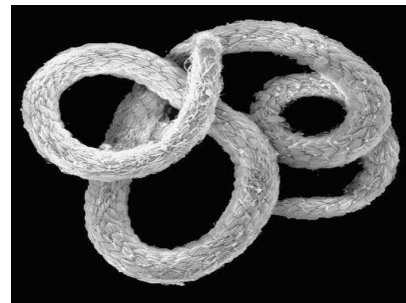


Ecologie des nématodes marins libres et symbiotiques en milieu tropical.
Développement de la microspectrométrie Raman comme outil
de caractérisation des organismes thiotrophiques.

Leslie MAURIN



Thèse dirigée par :

Olivier Gros

Soutenue à Pointe-à-Pitre le 28 septembre 2009, devant le jury composé de :

Horst Felbeck,	Pr, Université de Californie, Scripps Institution of Oceanography	Rapporteur
Olivier Gros	Pr, Université des Antilles et de la Guyane, UMR 7138 SAE	Examineur
Hervé Le Guyader	Pr, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7138 SAE	Examineur
Jean-Louis Mansot	Pr, Université des Antilles et de la Guyane, GTSI	Examineur
Ann Vanreusel	Pr, Université de Ghent, Marine Biology Research Group	Rapporteur

UNIVERSITE DES ANTILLES ET DE LA GUYANE

Faculté des Sciences Exactes et Naturelles

THESE

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université des Antilles et de la Guyane
Spécialité : Biologie marine

Présentée par :

Leslie Maurin

ECOLOGIE DES NEMATODES MARINS LIBRES ET SYMBIOTIQUES EN MILIEU TROPICAL.
DEVELOPPEMENT DE LA MICROSPECTROMETRIE RAMAN COMME OUTIL
DE CARACTERISATION DES ORGANISMES THIOTROPHIQUES.

Soutenue à Pointe-à-Pitre le 28 septembre 2009, devant le jury composé de :

Horst Felbeck	Pr, Université de Californie, San Diego, Scripps Institution of Oceanography	Rapporteur
Olivier Gros	Pr, Université des Antilles et de la Guyane, UMR 7138 SAE	Directeur de thèse
Hervé LeGuyader	Pr, Université Pierre et Marie Curie, UMR 7138 SAE	Examineur
Jean-Louis Mansot	Pr, Université des Antilles et de la Guyane, GTSI	Examineur
Ann Vanreusel	Pr, Université de Ghent, Marine Biology Research Group	Rapporteur

UMR 7138 CNRS IRD MNHN UPMC

Systematique-Adaptation-Evolution

Équipe symbiose

REMERCIEMENTS

Je ne pourrais remercier les personnes ayant contribué de près ou de loin à cette thèse sans donner un bref aperçu de la manière dont je suis arrivée jusqu'ici.

Mon histoire commence avec les années universitaires et plus précisément par mon DUT que j'ai réalisé en Corse. Merci à mes enseignants de l'IUT de Corte de m'avoir fortement incité à continuer mes études et à intégrer l'Université de Luminy à Marseille afin de réaliser une licence de biologie des organismes marins. Merci à Mme Botha qui nous racontait avec beaucoup de passion la vie des organismes marins gélatineux et qui m'a permis de continuer mes études au Québec en m'aidant à intégrer le système CREPUQ. Ma maîtrise d'Océanographie à Rimouski a été magique et malgré le froid, cette année m'a conforté dans l'idée que j'aimais la recherche et le milieu marin. Cependant, le froid restant froid j'ai préféré partir réchauffer mes idées sous les tropiques et me voilà posant mes valises en Guadeloupe pour réaliser mon DEA.

Merci mille fois à Liliane Frenkiel pour son soutien dans ma recherche de stage et ses conseils miraculeux qui m'ont permis de rencontrer Olivier Gros et de réaliser ainsi un petit bout de chemin avec un directeur de recherches merveilleux. Car ce n'est pas tout d'être innovateur et débrouillard en recherche, il faut aussi beaucoup de sang froid et de ténacité pour ne pas basculer dans la facilité universitaire et utiliser ses étudiants comme de la main d'œuvre. Un grand merci pour tout le courage et le savoir que tu as su me transmettre. Merci aussi d'avoir accepté sans sourcillements mes choix personnels que ce soit au niveau professionnel et au niveau de ma vie privée. J'espère n'avoir pas trop abusé de ta patience et de ta bonne humeur.

Tout cela me ramène auprès de ma famille et plus particulièrement à mes parents, Thierry et Lydia, qui m'ont soutenu, encouragé et suivi dans tous mes choix. Ils n'ont pas hésité une seule fois et ont assuré mon bonheur et la concrétisation de nombreux rêves. Pour tout cela je les remercie du fond du coeur.

Arrive enfin le moment de tourner cette page d'étudiante universitaire... et cela grâce aux membres de mon jury, le Pr Horst Felbeck, le Pr Ann Vanreusel, le Pr Hervé Le Guyader et le Pr Jean-louis Mansot. Merci d'avoir accepté de juger mon travail. C'est un immense honneur de vous recevoir et de vous exposer mes trois années d'études au sein de l'équipe symbiose de l'UMR 7138 SAE basée à L'UAG.

Ce travail n'aurait pu aboutir sans le soutien de mes copines de labo : Mélina, Sophie, Gaëlle, Amandine (la reine de l'informatique) et Nathalie. Merci aussi à l'équipe technique,

Robert et Sébastien. Un grand merci aux physiciens : David, Karl, et Yves ainsi qu'à Virginie (la reine de l'orthographe).

Voilà, l'histoire de mes remerciements touche à sa fin mais elle ne pourrait être bouclée si je n'adressais pas mes plus intenses pensées aux deux personnes qui comblent mon cœur chaque jour. Merci à Julien qui a su m'encourager et m'épauler dans les moments difficiles. Merci pour son infini patience et son écoute. Il a été la clé dans l'aboutissement de ma thèse. Enfin, je souhaite dédier mon travail à ma fille Lola qui a su trouver, malgré son jeune âge, la patience et la sagesse de m'attendre à la crèche pendant mes longues journées au laboratoire. Merci de m'avoir procuré autant de sourires et de câlins dont j'avais particulièrement besoin pendant ma dernière année de thèse.

A mes parents,
A Julien et Lola

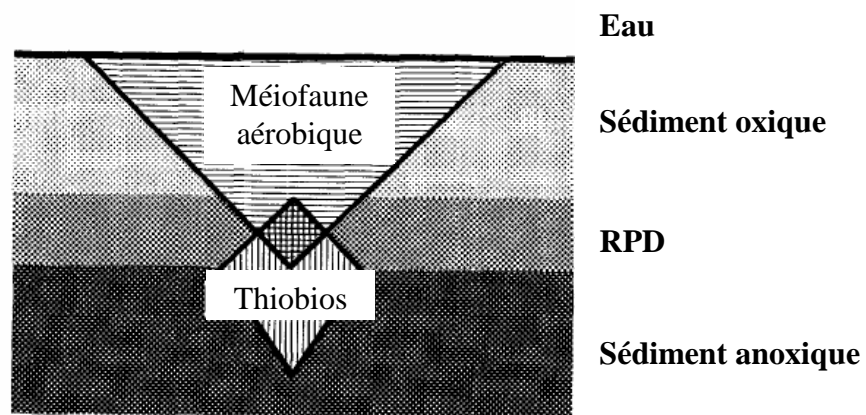
LISTE DES ABBREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique		
ATP: Adénosine Triphosphate		
APS: Adénosine 5'-phosphosulfate		
ATEM: analytical transmission electron microscopy		
BSA: Bovin Serum Albumine		
Card-FISH: Fluorescence <i>in situ</i> hybridization with Catalyzed Reporter Deposition		
CCD: Charged-Coupled Device		
CTAB: bromure d'hexadécyltriméthylammonium		
cTEM: conventional transmission electron microscopy		
DAPI: 4'6-Diamino-2-Phenylindole Dihydrochloride		
EELS: Electron Energy Loss Spectroscopy		
EDTA: acide éthylène diamine tétra acétique		
EDX: Energy-Dispersive X-Ray		
EFTEM: Energy-Filtered Transmission Electron Microscopy		
FISH: Fluorescence <i>in situ</i> Hybridization		
FITC: Fluorescein IsoThioCyanate		
HCl: Chlorure d'hydrogène ou acide chlorhydrique		
HPLC: High-Performance Liquid Chromatography		
HRP: Horseradish Peroxidase		
MEB: Microscopie Electronique à Balayage		
MET: Microscopie Electronique à Transmission		
OSG: Organe Sensoriel Glandulaire		
PBS: Phosphate Buffered Saline		
PCR: Polymerase Chain Reaction		
RPD: Redox Potential Discontinuity		
RubisCO: Ribulose 1-5 bisphosphate Carboxylase/Oxygenase		
TAE: Tampon Tris Base – acide acétique - EDTA		
Pb: Paire de base	L : litres	
ml: millilitres	mg: milligrammes	min: minutes
µl: microlitres	u: unités	h: hauteur
mM: millimolaires	u.a.: unité arbitraire	Lg: longueur
pmoles: picomoles	°C: degrés Celsius	l: largeur

GLOSSAIRE

- ❖ **Amphide** : Organe sensoriel positionné de part et d'autre de la partie céphalique du nématode. Ces deux invaginations cuticulaires sont des caractères taxonomiques.
- ❖ **Aposymbiotique** : Se dit d'un individu hôte dépourvu de tout symbiote.
- ❖ **Autotrophe** : Qualifie un organisme capable de synthétiser de la matière organique à partir de matière minérale (éléments minéraux simples: Oxygène, Hydrogène, Carbone, azote et sels minéraux divers), en utilisant, soit l'énergie lumineuse (organisme photoautotrophe, photosynthétique), soit l'énergie chimique (organisme chimioautotrophe, chimiosynthétique).
- ❖ **Chimioautotrophe** : Ce terme est utilisé comme synonyme de chimiolithoautotrophe. Il s'agit d'un organisme qui utilise une substance chimique inorganique comme source d'énergie et le dioxyde de carbone (CO_2) comme source de Carbone. Cependant, quelques organismes chimioautotrophes utilisent un composé organique comme source d'électrons et sont appelés chimioorganoautotrophes.
- ❖ **Chimiolithoautotrophe** : Se dit des organismes qui utilisent un composé chimique (chimio-) comme source d'énergie, un composé inorganique (litho-), tel que le soufre ou l'azote, comme donneur d'électrons et une source de carbone inorganique (autotrophe), habituellement le CO_2 , pour synthétiser du carbone organique.
- ❖ **Chimiosynthèse** : Désigne la production de matière organique à partir de molécules minérales grâce à l'énergie chimique fournie par oxydation. Les organismes chimiosynthétiques utilisent des composés inorganiques comme source d'énergie (tel que le soufre ou le méthane) pour transformer par oxydation les molécules de carbone (dioxyde de carbone ou méthane) en matière organique. L'ensemble des micro-organismes chimiosynthétiques libres et symbiotiques sont des producteurs primaires et sont à la base de la chaîne alimentaire dans de nombreux habitats tels que les sources hydrothermales, les suintements froids, sédiments vaseux côtiers, les marges continentales, les carcasses et les bois coulés.

- ❖ **Ectosymbiotes** : Symbiote vivant posé à la surface de son hôte.
- ❖ **Endosymbiotes** : Symbiote vivant logé à l'intérieur de son hôte soit à l'intérieur de cavités internes (extracellulaires) soit entre les cellules d'un même tissu (intercellulaire) soit à l'intérieur même des cellules (intracellulaire).
- ❖ **Espèce thiotiotique** : Organisme appartenant au thiobios (Reise & Ax, 1980).



- ❖ **Gubernaculum** : Structure qui sert de guide aux spicules pendant la copulation des nématodes.
- ❖ **Hétérotrophe** : Se dit des organismes qui utilisent une source de carbone organique. C'est-à-dire que ces organismes assurent leur subsistance en assimilant des substances organiques et sont incapables de produire ces substances à partir de matière minérale. S'oppose à autotrophe.
- ❖ **Méiobenthos** : Organisme de la méiofaune vivant à proximité ou dans le sédiment marin (ou aquatique).
- ❖ **Méiofaune** : Ensemble des invertébrés de petite taille (comprise entre 0,5µm et 1mm), vivant dans le sédiment. Ils se caractérisent par le fait que leurs déplacements s'opèrent entre les particules du sédiment, sans le remuer. La méiofaune ne constitue pas un rang taxonomique mais plutôt un ensemble d'organismes benthiques.

- ❖ **Nombre d'onde** : En spectroscopie, le nombre d'onde $\tilde{\nu}$ (également noté σ) est le nombre d'oscillations de l'onde par unité de longueur, il est ainsi défini comme : $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ où λ est la longueur d'onde mesurée en cm. L'unité du nombre d'onde est donc le cm^{-1} .
- ❖ **Photoautotrophe** : Se dit des organismes qui utilisent la lumière comme source d'énergie et le CO_2 comme source de carbone.
- ❖ **Pockmarks** : Cratère formé par l'expulsion rapide de gaz et de liquide à travers le sédiment.
- ❖ **RPD (Redox Potential Discontinuity) ou discontinuité de potentiel redox** : Couche de sédiment correspondant au changement rapide de potentiel redox et marquant une barrière chimique d'enfouissement pour de nombreux organismes (Gray, 1981).
- ❖ **Thioautotrophe** : Se dit des organismes qui utilisent des composés soufrés réduits. Si les organismes utilisent le sulfure comme donneur d'électrons alors ils sont appelés sulfo-oxydants.
- ❖ **Thiobios** : Le thiobios représente une communauté d'organismes caractéristique des biotopes où le sulfure d'hydrogène et les autres substances réduites sont des écofacteurs dominants (Giere, 2009).
- ❖ **Transect** : Méthode d'échantillonnage ou d'analyse permettant un suivi linéaire et continu d'un ou plusieurs paramètres sur une distance donnée.

SOMMAIRE

1 INTRODUCTION	1
1.1 LES SYMBIOSES CHIMIOAUTOTROPHES EN MILIEU MARIN	1
1.2 DIVERSITE DES HOTES ET DE LEUR HABITAT	4
1.3 ETUDE DES SYMBIOSES CHIMIOAUTOTROPHES SULFO-OXYDANTES	8
1.4 LES NEMATODES EN MILIEU MARIN	17
1.5 LES SEDIMENTS MARINS TROPICAUX DE FAIBLE PROFONDEUR	23
2 MATERIEL ET METHODES	27
2.1 SITES D'ETUDES ET ECHANTILLONNAGE BIOLOGIQUE	27
a. Sites d'études	27
b. Echantillonnage en Herbier à <i>Thalassia testudinum</i>	29
c. Echantillonnage en mangrove	30
2.2 IDENTIFICATION MORPHOLOGIQUE DES NEMATODES	32
a. Préparation des nématodes pour l'étude taxonomique	32
b. Détermination spécifique des nématodes	32
2.3 DESCRIPTION ULTRASTRUCTURALE DES NEMATODES SYMBIOTIQUES	35
a. Microscopie électronique à balayage (MEB)	35
b. Microscopie électronique à transmission (MET)	35
c. Coloration histologique	36
2.4 CARACTERISATION ANALYTIQUE DES SYMBIOTES	37
a. Spectroscopie des pertes d'énergie d'électrons (EELS)	37
b. Microspectrométrie Raman	37
2.5 ETUDE MOLECULAIRE DE L'ASSOCIATION SYMBIOTIQUE	42
a. Hybridations moléculaires in situ (FISH et Card-FISH)	42
b. Analyses des séquences de gène d'ARNr 18S et 16S	45
2.6 ETUDE DE LA NEMATOFaUNE DE MANGROVE PAR CALCUL D'INDICES ECOLOGIQUES	49
a. Définition des indices statistiques utilisés	49
b. Application	50
2.7 ANALYSE DES FACTEURS ABIOTIQUES	51
a. Protocole expérimental	51
b. Acquisition et traitement des données	53
3 RESULTATS	55
3.1 CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES NEMATODES SYMBIOTIQUES DE L'HERBIER A <i>THALASSIA TESTUDINUM</i>	55
a. Caractérisation morphologique des nématodes hôtes	55
b. Caractérisation morphologique des symbiotes	61
3.2 CARACTERISATION ANALYTIQUE DE LA SYMBIOSE BACTERIENNE	68
a. Détection et localisation du soufre par microspectrométrie Raman	68
b. Raman et EELS sur un nématode inclus en résine LR White	74
c. Analyse Raman sur un bivalve endosymbiotique	76
3.3 CARACTERISATION MOLECULAIRE	78
a. Caractérisation des bactéries symbiotiques	78
b. Identification moléculaire des nématodes hôtes et de leurs symbiotes	80
3.4 ECOLOGIE DE LA MEIOFAUNE DANS LES ECOSYSTEMES ETUDIES	81
a. Analyse physico-chimique de l'herbier à <i>Thalassia testudinum</i>	81
b. Analyse physico-chimique du sédiment de mangrove	82
c. Répartition de la nématofaune dans le sédiment de mangrove	86
d. Identification de la nématofaune de mangrove : Taxonomie et groupe trophique	89
e. Interprétation statistique de la dynamique de la nématofaune de mangrove	93
3.5 DETECTION PAR MICROSPLECTROMETRIE RAMAN DES ORGANISMES THIOTROPHIQUES DE MANGROVE	100
a. Sélection et description des témoins positifs et négatifs	100
b. Screening des organismes associés à des bactéries thioautotrophiques	103
c. Screening des organismes libres thioautotrophes	107
4 DISCUSSION	109
4.1 DIVERSITE ET ECOLOGIE DES NEMATODES THIOBIOTIQUES DE L'HERBIER A <i>THALASSIA TESTUDINUM</i>	109
4.2 DIVERSITE ET ECOLOGIE DE LA NEMATOFaUNE DE MANGROVE	119
4.3 UTILISATION DE LA MICROSPLECTROMETRIE RAMAN COMME OUTIL DE DETECTION DES ORGANISMES THIOTROPHIQUES	123
5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	127
BIBLIOGRAPHIE	129

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de la sulfo-oxydation.....	2
Figure 2 : Réaction d'oxydation du soufre (modifié d'après Suzuki, 1999 et Jannasch & Wirsén, 1985). ...	9
Figure 3 : Arbre phylogénétique des différents types de micro-organismes dont le métabolisme est lié au soufre (Sievert <i>et al.</i> , 2007).....	15
Figure 4 : Arbre phylogénétique des protéobactéries basé sur les séquences 16S de l'ARNr (Distel & Cavanaugh, 1994).	15
Figure 5 : Systématique de l'embranchement des Nématodes (D'après Abebe <i>et al.</i> , 2006).	20
Figure 6 : Reconstitution phylogénétique basée sur les séquences d'ARNr 18S des nématodes et d'ARNr 16S de leurs symbiotes (Musat <i>et al.</i> , 2007).	21
Figure 7 : Analyse comparative des données moléculaires et morphologiques de 13 nématodes de la classe des Adenophorea (Kampfer <i>et al.</i> , 1998).	22
Figure 8 : Représentation des îles de la Guadeloupe.....	27
Figure 9 : Localisation des sites d'études.	29
Figure 10: Représentation schématique des sites de prélèvements de sédiment en mangrove.....	31
Figure 11: Anatomie générale des nématodes et caractères morphologiques sélectionnés pour l'identification des nématodes d'herbier et de mangrove (modifié d'après Platt & Warwick, 1988).	33
Figure 12 : Processus de diffusion de la lumière par la matière (modifié d'après Himmel, 2005).....	38
Figure 13 : Dispositif du système d'acquisition des spectres images, de stockage et de traitement des données (modifié d'après Himmel, 2005).	39
Figure 14 : Micro-capteur autonome.	51
Figure 15 : Prélèvement d'eau interstitielle dans une carotte de sédiment d'herbier.....	51
Figure 16: Descriptif de la potence hors de l'eau avec un agrandissement de la zone de fixation des capteurs.	52
Figure 17 : Dispositif de mesures physico-chimiques installé en mangrove.....	53
Figure 18: Représentation schématique de l'analyse des facteurs abiotiques <i>in situ</i> en mangrove.	54
Figure 19: Observation au MEB de l'allure générale des nématodes possédant des ectosymbiotes des genres <i>Robbea</i> et <i>Stilbonema</i> et colonisant l'herbier à <i>T. testudinum</i>	60
Figure 20: Disposition du manteau bactérien chez <i>Adelphos rolandi</i> , <i>Eubostrichus hopperi</i> et <i>E. topiarus</i> . ..	61
Figure 21 : Observation au MEB des différents manteaux bactériens recouvrant les nématodes symbiotiques colonisant l'herbier à <i>T. testudinum</i>	62
Figure 22 : Agrandissement au MEB des manteaux bactériens recouvrant les nématodes <i>Stilbonema</i> sp. et <i>Robbea</i> sp.1.....	64
Figure 23: Observation au MET de coupes de nématodes symbiotiques inclus en résine LR White.	65
Figure 24 : Observation au MET de coupes transversales du nématode <i>E. diana</i> e inclus en résine LR White.....	66
Figure 25 : Analyse par microspectrométrie Raman d'un nématode symbiotique <i>Eubostrichus hopperi</i> et d'un nématode non symbiotique collectés dans le sédiment d'herbier à <i>T. testudinum</i>	69
Figure 26 : Caractérisation et localisation du soufre par microspectrométrie Raman sur le nématode symbiotique <i>E. diana</i> e.	70
Figure 27 : Localisation théorique du soufre à partir d'une représentation virtuelle du nématode symbiotique.	72
Figure 28: Spectres Raman obtenus sur le corps du nématode <i>E. diana</i> e entouré de son manteau bactérien et dans une zone où ce même manteau bactérien a été complètement enlevé.	73
Figure 29 : Analyse du soufre par microspectrométrie Raman et EELS sur un nématode symbiotique <i>E. diana</i> e inclus en résine LR White.	75
Figure 30 Détection du soufre par microspectrométrie Raman sur la branchie d'un bivalve symbiotique <i>C. orbicularis</i>	76
Figure 31 : Hybridations moléculaires en FISH et Card-FISH sur le nématode <i>E. hopperi</i>	79
Figure 32 : Carotte ouverte de sédiment d'herbier à <i>T. testudinum</i>	81
Figure 33 : Mesures de la concentration en H ₂ S total dans le sédiment de la lagune de la manche-à-eau en mangrove, à 1m50 de profondeur, avant l'immersion du casier de bois sur le sédiment.....	82
Figure 34 : Mesures à 15 jours d'intervalle pendant 1 mois ½ de la concentration en H ₂ S total au niveau du casier de bois et à distance de celui-ci (1m et 2m) en fonction de la profondeur dans le sédiment.	85
Figure 35 : Quantification et distribution de la nématofaune en fonction du temps d'immersion du casier de bois.	87
Figure 36 : Quantification et distribution du nématode <i>Eubostrichus diana</i> e en fonction du temps d'immersion du casier de bois.	88

Figure 37 : Observation au MEB du nématode <i>Croconema otti</i>	90
Figure 38 : Comparaison au microscope photonique de deux espèces de nématodes portant leurs œufs à l'extérieur.....	90
Figure 39 : Graphique représentatif des abondances 2008 des groupes trophiques de nématodes prélevés à 15 et 1 mois d'immersion du casier de bois et dans le sédiment de la lagune.....	95
Figure 40 : Graphique représentatif des abondances 2009 des groupes trophiques de nématodes prélevés à 15 et 1 mois d'immersion du casier de bois et dans le sédiment de la lagune.....	98
Figure 41 : Analyse du nématode <i>Eubostrichus diana</i> e.....	101
Figure 42 : Analyse du cilié <i>Zoothamnium niveum</i>	102
Figure 43 : Analyse d'un nématode libre (sans manteau bactérien ni cellules de stockage du soufre).	104
Figure 44: Analyse d'un hydrozoaire non identifié.....	105
Figure 45 : Analyse du cilié <i>Pseudovorticella</i> sp.	106
Figure 46 : Analyse d'une bactérie libre filamenteuse.	107

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Récapitulatif des symbioses chimiosynthétiques en milieu peu profond (moins de 200 m de profondeur).	7
Tableau 2 : Valeurs isotopiques de carbone chez plusieurs organismes marins.	11
Tableau 3 : Valeurs isotopiques d'azote chez plusieurs organismes marins.....	11
Tableau 4 : Récapitulatif des différentes adaptations au soufre retrouvées chez les nématodes.	18
Tableau 5 : Conditions d'acquisition des spectres images utilisés.	41
Tableau 6 : Récapitulatif des caractères morphologiques permettant l'identification au genre des nématodes.....	56
Tableau 7 : Récapitulatif des tailles (diamètre et longueur) des nématodes adultes avec ou sans manteau bactérien.	56
Tableau 8 : Récapitulatif des caractères morphologiques propres à chacune des espèces du genre <i>Adelphos</i> et <i>Eubostriehus</i> collectées dans le sédiment d'herbier à <i>T. testudinum</i>	58
Tableau 9 : Récapitulatif de la taille, de la morphologie et de la disposition des symbiotes sur les nématodes hôtes d'herbier.	67
Tableau 10 : Récapitulatif des données d'intensité Raman maximum (I_M) et minimum (I_m) ainsi que la variation d'intensité (Δ) en fonction des profils étudiés.	73
Tableau 11 : Récapitulatif des valeurs de concentration en H_2S total obtenues après 15 jours d'immersion du casier de bois sur 10cm de profondeur et jusqu'à 2m d'éloignement.....	83
Tableau 12 : Récapitulatif des valeurs de concentration en H_2S total obtenues après 1 mois d'immersion du casier de bois sur 10cm de profondeur et jusqu'à 2m d'éloignement.....	83
Tableau 13 : Récapitulatif des valeurs de concentration en H_2S total obtenues après 1 mois $\frac{1}{2}$ d'immersion du casier de bois sur 10cm de profondeur et jusqu'à 2m d'éloignement.....	84
Tableau 14 : Récapitulatif des 24 morphotypes collectés et identifiés dans le sédiment de mangrove. Les groupes trophiques sont identifiés à partir clés de détermination de Moens & Vincx (1997) et de Jensen (1987).....	92
Tableau 15 : Indices de diversité spécifique et d'équitabilité calculés sur l'effectif des espèces collectées en mangrove (2008).	93
Tableau 16 : Abondance relative des espèces de nématodes aux différents sites de prélèvement (2008). ...	94
Tableau 17 : Abondance relative des groupes trophiques de nématodes aux différents sites de prélèvement (2008). Le nombre entre parenthèse indique le nombre d'espèces par groupe trophique.	95
Tableau 18 : Indices de diversité spécifique et d'équitabilité calculés sur l'effectif des espèces collectés en mangrove (2009).	96
Tableau 19 : Abondance relative des différentes espèces de nématodes recensées aux sites de prélèvement (2009).	97
Tableau 20 : Abondance relative des groupes trophiques de nématodes au différents sites de prélèvement (2009). Le nombre entre parenthèse indique le nombre d'espèces par groupe trophique.	98

1 INTRODUCTION

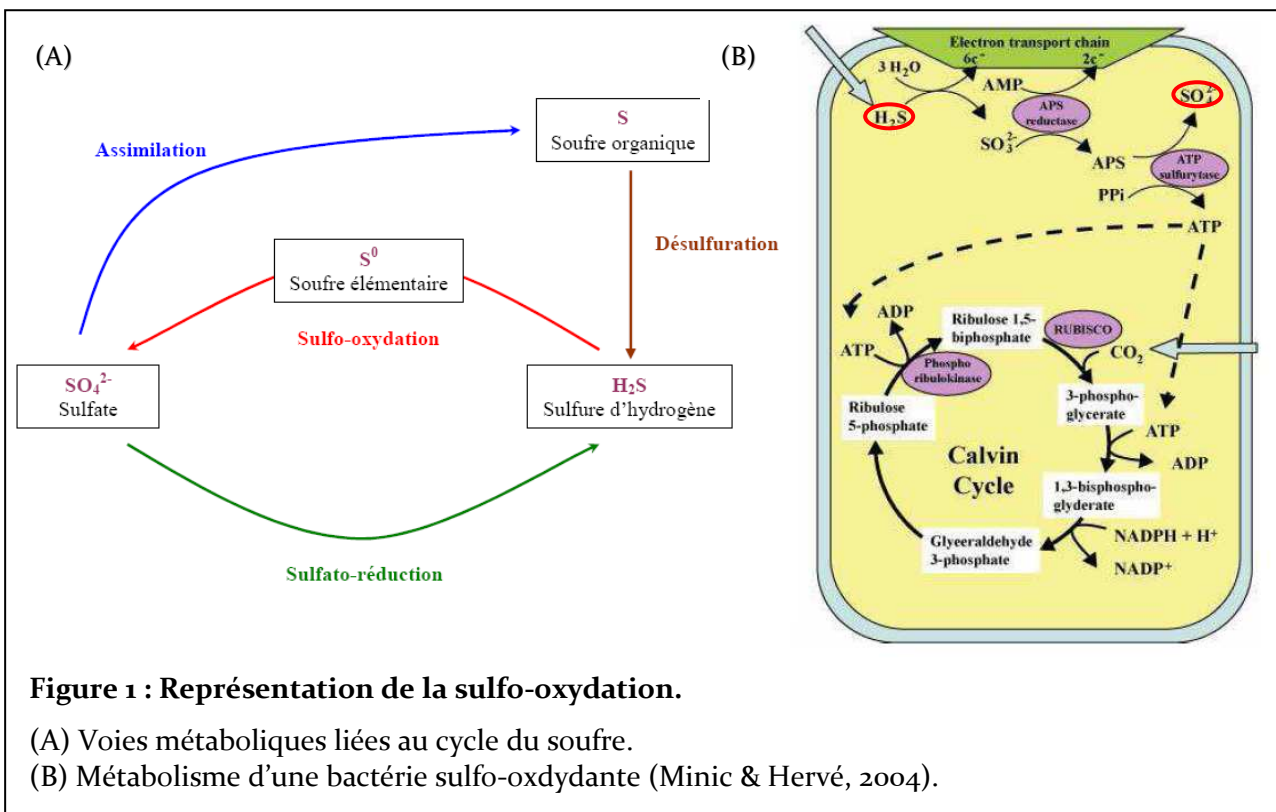
1.1 *Les symbioses chimioautotrophes en milieu marin*

Le milieu marin abrite de nombreux écosystèmes aussi bien en milieu littoral avec les plages de sable, les mangroves, les herbiers, les récifs coralliens, etc. qu'en milieu profond avec les sources hydrothermales, les suintements froids ou encore les sédiments soufrés réduits. Les environnements de grande profondeur sont soumis à des conditions physico-chimiques extrêmes (haute température, faible taux d'oxygène, concentrations importantes en méthane et sulfures, etc.) et sont considérés comme hostiles. La découverte de vastes communautés d'invertébrés dans ces milieux, et particulièrement au niveau des sources hydrothermales, a stimulé de nombreuses études, afin de mieux comprendre comment de tels biotopes avaient pu se développer dans des conditions aussi particulières (Corliss *et al.*, 1979 ; Tunnicliffe *et al.*, 2003 ; Minic *et al.*, 2006). Plusieurs classes zoologiques ont été recensées appartenant aux embranchements des Annélides, Mollusques et Arthropodes (Grassle, 1985 ; 1986 ; Takai & Fujiwara, 2002). Afin de survivre dans de tels habitats, la majorité des invertébrés se sont associés à des micro-organismes capables d'utiliser comme source d'énergie ces composés présents en excès (sulfures, méthane). Basées sur un échange nutritionnel obligatoire, ces associations entre animaux et micro-organismes ont permis la mise en place d'un écosystème diversifié dans ces environnements. De nombreuses adaptations morphologiques et physiologiques ont été observées, notamment chez les Annélides (Siboglinidae) *Riftia pachyptila* colonisant par de denses populations l'environnement proche des sources hydrothermales (Corliss *et al.*, 1979 ; Spiess *et al.*, 1980). Grâce à la microscopie électronique, il a été démontré la présence de bactéries dans des tissus spécialisés chez ces vers géants ainsi que chez d'autres invertébrés (Gastéropodes et Bivalves) (Cavanaugh *et al.*, 1981 ; Cavanaugh, 1983 ; Stein *et al.*, 1988). Chez certains Annélides et Arthropodes, l'association bactérienne a été observée à la surface de leur tégument (Gaill *et al.*, 1987 ; Zbinden *et al.*, 2004).

Grâce aux études histologiques et à l'analyse des activités enzymatiques, les Annélides Siboglinidae ont été les premiers animaux connus à développer une relation symbiotique obligatoire avec des bactéries (Felbeck, 1981). De plus, à l'aide de la phylogénie, il a été mis en évidence que ces bactéries étaient **chimiolithoautotrophes** sulfo-oxydantes (Distel *et al.*, 1988). Ces bactéries, source de la production primaire, tirent leur énergie de l'oxydation du soufre (Felbeck *et al.*, 1981 ; Distel *et al.*, 1988). Le terme « soufre » est utilisé dans ce

I. Introduction

manuscrit pour décrire les trois formes chimiques qui existent dans l'eau : H_2S , HS^- et S^{2-} et qui changent en fonction du pH de l'environnement (Millero *et al.*, 1988). Il existe différentes voies métaboliques liées au cycle du soufre. Lors de la sulfo-oxydation bactérienne, les composés soufrés sont oxydés en soufre élémentaire (S^0) par les bactéries et s'accumulent alors dans les cellules sous forme de granules. Lorsque le soufre exogène est épuisé, ces granules sont secondairement oxydés en sulfate (Fig. 1A-B). Leurs hôtes bénéficient alors d'un apport de molécules carbonées et permettent en contre partie aux micro-organismes de se développer dans un environnement favorable (Cavanaugh, 1985 ; Douglas, 1994). Dans la figure 1B, le métabolisme d'une bactérie sulfo-oxydante est représenté. Le sulfure d'hydrogène (H_2S) diffuse dans la cellule et est oxydé en sulfate par l'action des enzymes APS réductase et ATP sulfurylase. Lors de ce processus, la molécule d'ATP gagnée va servir à la fixation du carbone inorganique (CO_2) dans le cycle de Calvin.



Le sulfure d'hydrogène, du fait de son pouvoir réducteur et de sa capacité à réagir avec de nombreux composants cellulaires (groupes sulfhydriles des protéines, cations, etc.), est considéré comme un composé toxique pour les organismes aérobies. Il inhibe la respiration aérobie en interférant avec la respiration cellulaire et le transport d'oxygène par le sang

(Reiffenstein *et al.*, 1992 ; Grieshaber & Völke, 1998). Dans les mitochondries, le soufre inhibe la cytochrome c oxydase, enzyme intervenant dans la chaîne respiratoire, jusqu'à stopper la production d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) par la chaîne de transport d'électrons. Le soufre peut aussi limiter l'activité des hémoglobines dans le sang, réduisant ainsi leur capacité à transporter l'oxygène, et, à forte concentration, rendant celles-ci non fonctionnelles. Une étude a aussi démontré que le soufre est capable d'inhiber la contraction musculaire indépendamment de ses effets sur le métabolisme aérobie (Julian *et al.*, 1998). Afin d'esquiver les effets toxiques du soufre, plusieurs options s'offrent aux organismes : fuir le soufre en se déplaçant, passer en métabolisme anaérobie, exclure le soufre à partir de tissus spécialisés ou oxyder le soufre sous une forme non toxique (McMullin *et al.*, 2000).

La présence et le métabolisme des bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes sont un moyen de détoxification de l'organisme hôte par la respiration du H₂S, oxydé en sulfate qui n'est pas toxique (Fig. 1B). Chez le ver tubicole *R. pachyptila*, par exemple, les symbiotes sont ravitaillés en carbone inorganique, oxygène, sulfures et nitrates par un système circulatoire très développé (Arp & Childress, 1981). La consommation de ces substances se fait dans une zone très vascularisée, la plume, qui est la seule partie du ver à être en contact avec l'eau environnante de la source hydrothermale. Le sang de *R. pachyptila* contient des hémoglobines extracellulaires spécialisées qui ont une grande affinité pour lier et transporter le soufre et l'oxygène jusqu'au trophosome où les symbiotes sont localisés (Childress *et al.*, 1984 ; Goffredi *et al.*, 1997). Les sulfures sont alors oxydés par les bactéries symbiotiques, libérant l'énergie nécessaire à la fixation autotrophe du carbone inorganique par l'intermédiaire de la RubisCO (Ribulose 1-5 bisphosphate Carboxylase/Oxygenase), enzyme qui catalyse cette étape dans le cycle de Calvin-Benson (Arp & Childress, 1983 ; Arp *et al.*, 1987).

Avant la découverte de *R. pachyptila*, seules les symbioses **phototrophiques** comme celles des constructions coralliennes (Rowan & Knowlton, 1995) et **hétérotrophiques** comme celles du rumen des vaches (Hungate, 1975) étaient connues. Depuis, d'autres micro-organismes **chimioautotrophes** (non sulfo-oxydants ni sulfato-réducteurs) ont été décrits et utilisent le méthane (CH₄) comme source d'énergie et de carbone. Ils sont dits méthanotrophes (Distel & Cavanaugh, 1994 ; Distel *et al.*, 1995 ; Bright & Giere, 2005).

1.2 Diversité des hôtes et de leur habitat

La découverte de ces symbioses **chimiosynthétiques** en milieu profond a suscité de nombreuses recherches dans d'autres habitats, tels que les sédiments côtiers soufrés réduits plus facilement accessibles. Des milieux tels que les carcasses de baleines et les bois coulés ont aussi été récemment considérés comme pouvant être susceptibles d'abriter de nouvelles symbioses (Dubilier *et al.*, 2008). De plus, ces découvertes ont suscité l'étude de nombreux organismes, afin de déceler de potentielles associations symbiotiques avec des micro-organismes.

La diversité morphologique des associations chimiosynthétiques est variable en fonction du niveau d'intégration des micro-organismes chez leur hôte :

- Les **ectosymbiotes** peuvent être attachés à des parties spécifiques de l'animal hôte, ainsi les Arthropodes Décapodes du genre *Rimicaris* présentent des micro-organismes au niveau de leurs appendices buccaux et de leurs branchies (Zbinden *et al.*, 2004 ; 2008). D'autres recouvrent entièrement le corps de leur hôte tel que chez les nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae (Ott *et al.*, 2004). Dans ce cas, il a été suggéré que les bactéries jouaient un rôle de protection contre les agressions environnementales en permettant la détoxification de l'environnement immédiat du nématode (Ott *et al.*, 1995 ; Hentschel *et al.*, 1999). L'hôte pourrait directement s'alimenter sur les micro-organismes ectosymbiotiques qui le recouvrent (Polz *et al.*, 1992 ; Hoschitz *et al.*, 2001).

- Les **endosymbiotes** sont incorporés dans les cellules de l'hôte (intracellulaire) tel que chez de nombreux bivalves (Cavanaugh *et al.*, 2006) et Polychètes Siboglinidae (Lösekann *et al.*, 2008) ou dans une cavité interne (extracellulaire) où les micro-organismes participent à la simplification de l'appareil digestif. Cette adaptation morphologique est observée chez les nématodes des genres *Astomonema* (Ott *et al.*, 1982 ; Vidakovic & Boucher, 1987 ; Giere *et al.*, 1995), *Parastomonema* (Kito, 1989) et *Rhaptothyreus* (Hope & Murphy, 1969) et peut aller jusqu'à la disparition complète du système digestif comme chez les Oligochètes *Inanidrilus* et *Olavius* (Dubilier & Giere, 1995 ; Giere, 1996 ; Musat *et al.*, 2007). L'hôte utilise ainsi les produits dérivés du métabolisme bactérien ou encore digère une partie de ses symbiotes (Fisher, 1990).

Les organismes hôtes acquièrent leurs symbiotes de différentes manières. La différence de transmission a un effet majeur sur la diversité des symbiotes, mais aussi sur leur phylogénie et leur évolution. Plusieurs stratégies sont distinguées :

- la transmission verticale où les symbiotes passent d'une génération à une autre par l'intermédiaire des gamètes (principalement les ovocytes). Il s'agit d'une transmission directe des parents à l'œuf ou l'embryon (Buchner, 1965).

- la transmission horizontale où les symbiotes sont transmis d'un individu symbiotique à un individu **aposymbiotique** sans aucun lien avec la reproduction de l'organisme hôte (Soldo *et al.*, 1974).

- la transmission environnementale où l'hôte est infesté au cours de son développement par des symbiotes libres présents dans le milieu environnant (Bauer, 1981).

Les études menées sur les endosymbioses chimioautotrophes chez les organismes marins ont mis en évidence deux types de transmission : une transmission verticale a été décrite chez plusieurs membres de la famille des Vesicomidae et Solemyidae (Cary & Giovannoni, 1993 ; Krueger *et al.*, 1996) et une transmission environnementale a été relatée chez les espèces d'Annélides (Siboglinidae) *Riftia pachyptila* et *Ridgea piscesae* (Cary *et al.*, 1993), mais aussi chez le bivalve de la famille des Lucinidae *Codakia orbicularis* (Gros *et al.*, 1996) colonisant les herbiers de faible profondeur. Concernant les Oligochètes *Inanidrilus* et *Olavius*, les caractères morphologiques et génétiques montrent une transmission verticale des symbiotes dominants (Woyke *et al.*, 2006 ; Plague *et al.*, 2008), mais les symbiotes minoritaires peuvent être acquis environnementalement pendant la période où les oeufs sont déposés sur le sédiment (Giere & Langheld, 1987). Concernant les ectosymbioses chimioautotrophes, comme chez les nématodes ectosymbiotiques de la sous-famille des Stilbonematinae, il a été suggéré que les symbiotes étaient acquis à partir du milieu environnant. Les nématodes sont capables de rétablir leur manteau bactérien à chaque mue de croissance. Ce phénomène de synthèse d'une nouvelle cuticule se produit plusieurs fois au cours du développement du nématode et suggère donc la mise en place d'une reconnaissance hôte-symbiote dans l'environnement par un mécanisme spécifique basé sur des interactions lectines-sucre entre la bactérie symbiotique et la cuticule du nématode (Nussbaumer *et al.*, 2004 ; Ott *et al.*, 2004). Il a été aussi démontré un mécanisme de recrutement des bactéries dans l'environnement par émission d'une lectine Mermaid Ca^{2+} dépendante qui permettrait de lier les symbiotes et le nématode et les symbiotes entre eux (Bulgheresi *et al.*, 2006). De plus, il a été mis en évidence, par hybridation moléculaire à partir d'amorces spécifiques, la présence de bactéries libres dans le sable et l'eau, qui correspondent aux symbiotes de deux espèces de nématodes du genre *Robbea* (Bayer *et al.*, 2009). Cette observation valide la présence de symbiotes libres dans l'environnement.

Les biotopes riches en composés soufrés réduits sont largement répandus en milieu marin. La distribution géographique des symbioses chimiosynthétiques est autant diversifiée que les phylums des hôtes concernés : Par exemple, le cilié *Zoothamnium niveum* est récolté en mangrove de la Mer Rouge, de la Mer des Caraïbes et dans le golfe du Mexique (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996ab ; Ott *et al.*, 1998), le crustacé *R. exoculata* est retrouvé densément autour des sources hydrothermales de la dorsale médio-atlantique (Polz & Cavanaugh, 1995) et les nématodes ainsi que les oligochètes symbiotiques sont distribués en patches dans tous les sédiments sableux peu profonds (Dubilier, 1986 ; Ott, 1995).

Il a été alors observé en milieu côtier des symbioses entre des bactéries sulfoxydantes (Ott, 1995), sulfato-réductrices (Dubilier *et al.*, 2001), méthanotrophes (Fisher, 1990) et de nombreux Métazoaires, tels que les Protozoaires, les Annélides, les Mollusques, les Echinodermes et les Nématodes (Giere, 1992 ; 1996 ; Dubilier *et al.*, 2008). Dans la majorité des cas, il s'agit de bactéries endosymbiotiques. Cependant les ciliés du genre *Kentrophoros* (Fenchel & Finlay, 1989), le cilié Péritriche *Zoothamnium niveum* (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996ab ; Ott *et al.*, 1998), l'échinoderme *Echinocardium cordatum* (Temara *et al.*, 1993), l'annélide *Tubificoides* (Bright & Giere, 2005) ainsi que les nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae (Ott & Novak, 1989 ; Ott *et al.*, 1991 ; Polz *et al.*, 1992 ; Ott *et al.*, 2004) possèdent des bactéries ectosymbiotiques (Tab. 1).

PHYLUM	SOUS-GROUPE	HOTE	LOCALISATION DU SYMBIOTE	NATURE	REFERENCE
Ciliophora	Oligohymenophora Peritrichida	<i>Zoothamnium</i>	Epibiotique	Sulfo-oxydant	Bauer-Nebelsick <i>et al.</i> , 1996ab Rinke <i>et al.</i> , 2006
Ciliophora	Karyorelictea Kentrophoridae	<i>Kentrophoros</i>	Epibiotique Endobiotique (cytoplasme)	inconnu	Fenchel & Finley, 1989
Plathelminthes	Catenulida Retronectidae	<i>Paracatenula</i>	Intracellulaire (trophosome)	Sulfo-oxydant	Ott <i>et al.</i> , 1982
Nematoda	Desmodorida Stilbonematinae	<i>Eubostrichus</i> <i>Catanema</i> <i>Laxus</i> <i>Robbea</i> <i>Leptonemella</i> <i>Stilbonema</i> <i>Squanema</i>	Epibiotique	chimioautotrophe	Ott <i>et al.</i> , 2004 Nussbaumer <i>et al.</i> , 2004
Nematoda	Monhysterida Siphonolaimidae	<i>Astomonema</i>	Endobiotique (lumen de l'intestin)	Sulfo-oxydant	Ott <i>et al.</i> , 2004 Musat <i>et al.</i> , 2007
Annelida	Clitellata Phallodrilinae	<i>Inanidrilus</i> <i>Olavius</i>	Extracellulaire (sous la cuticule)	Sulfo-oxydant et sulfato-réducteur	Ruehland <i>et al.</i> , 2008 Blazejak <i>et al.</i> , 2005 Dubilier <i>et al.</i> , 2006 Woyke <i>et al.</i> , 2006
Annelida	Clitellata Tubificinae	<i>Tubificoides</i>	Epibiotique	Sulfo-oxydant	Bright & Giere, 2005

Tableau 1 : Récapitulatif des symbioses chimiosynthétiques en milieu peu profond (moins de 200 m de profondeur).

Dans les sédiments côtiers, les fluctuations spatiales d'oxygène et de sulfure d'hydrogène créent une zone de discontinuité appelée RPD (Redox Potential Discontinuity) où le potentiel d'oxydoréduction s'inverse et où l'on passe d'un sédiment oxydé (clair) à un sédiment réduit (sombre). La décomposition de la matière organique, via la réduction des sulfates, peut produire une importante concentration de sulfures dans les pores interstitiels du sédiment (Jørgensen, 1977). Ainsi, les organismes hôtes utilisent différentes stratégies pour fournir à leurs symbiotes les composés nécessaires au bon fonctionnement de leur métabolisme. Chez les bivalves symbiotiques et plus particulièrement chez *Codakia orbicularis* (Linné, 1758), les sulfures et l'oxygène sont captés par le pied de l'animal. Ils sont

ensuite transportés par l'hémolymphe jusqu'aux branchies contenant les bactéries symbiotiques (Duplessis *et al.*, 2004). Concernant les Oligochètes du genre *Inanidrilus* et *Olavius*, leur cuticule est perméable à la plupart des molécules. Les endosymbiotes extracellulaires ont donc accès aux substances contenues dans l'eau interstitielle du sédiment où les annélides vivent. Une autre stratégie est utilisée par les nématodes possédant des bactéries ecto- ou endosymbiotiques. Ils se déplacent le long de la chémocline à l'interface de la zone oxique/anoxique où se trouvent à la fois les composés soufrés réduits et l'oxygène (Ott & Novak, 1989). Grâce à leur petite taille, les nématodes peuvent migrer, comme tous les organismes de la **méiofaune**, dans les pores du sédiment sans altérer sa structure et peuvent alors suivre les changements du gradient chimique au niveau du substrat (Ott & Novak, 1989 ; Schiemer *et al.*, 1990 ; Ott *et al.*, 1991). Les nématodes ne possèdent pas un système vasculaire développé et l'hémoglobine sanguine ne permet donc pas la fixation des composés nécessaires au métabolisme bactérien. Le transport de l'oxygène et du soufre jusqu'aux endosymbiotes des nématodes du genre *Astomonema* se fait donc principalement par diffusion. L'énergie, obtenue par oxydation des composés soufrés réduits (sulfures, thiosulfates, etc.) avec l'oxygène ou le nitrate comme accepteur d'électrons, est utilisée par les symbiotes pour fixer le CO₂ et produire des composés organiques (Nussbaumer *et al.*, 2004 ; Ott *et al.*, 2004 ; Musat *et al.*, 2007). La nutrition de l'hôte se fait soit par transfert de ces composés organiques depuis le symbiote soit par ingestion directe des symbiotes chez les nématodes à bactéries ectosymbiotiques (Ott *et al.*, 1991 ; Musat *et al.*, 2007).

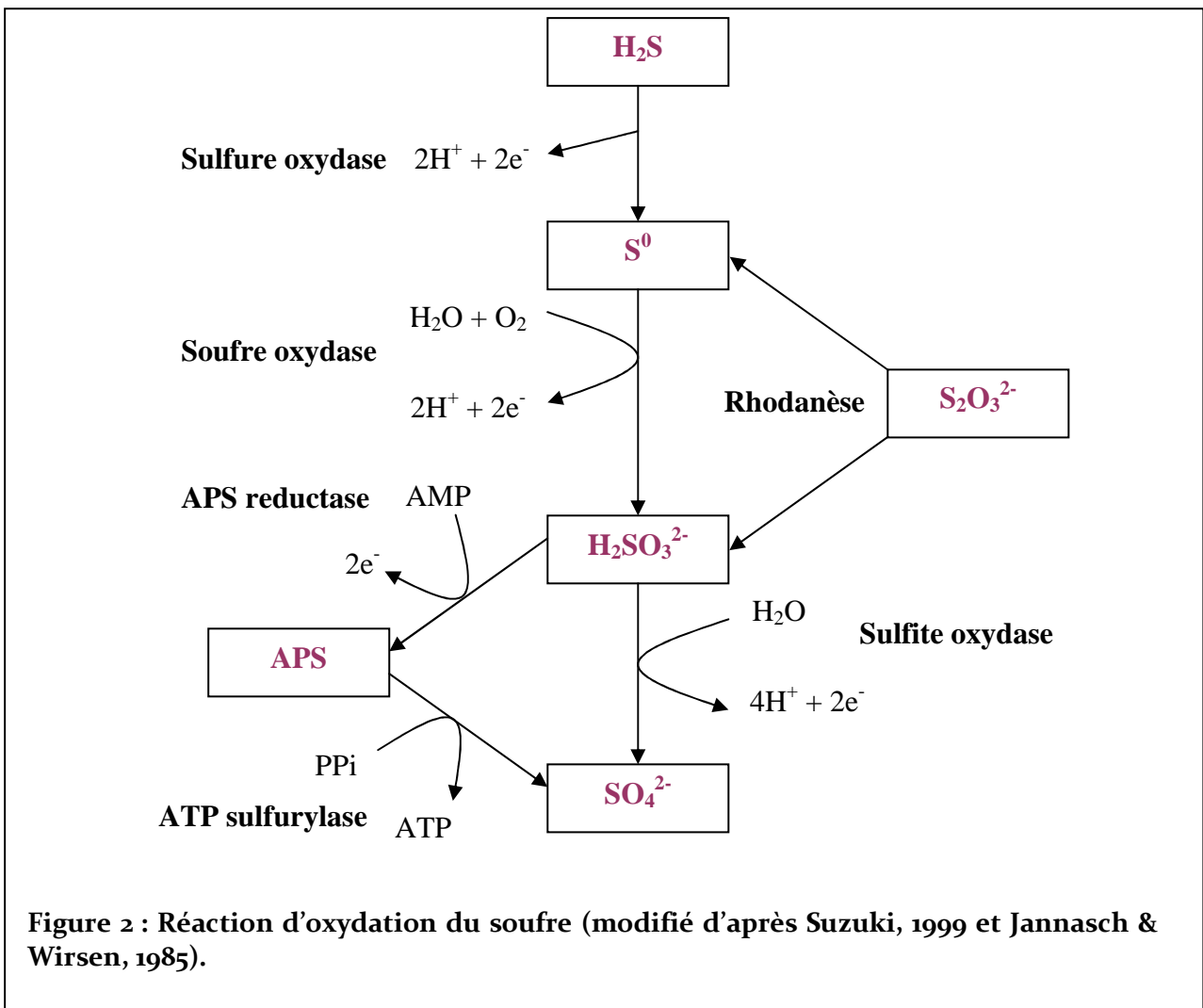
1.3 Etude des symbioses chimioautotrophes sulfo-oxydantes

Afin de caractériser une symbiose bactérienne chimioautotrophe, il est important de mettre en évidence l'existence de bactéries associées intimement à un hôte déterminé et de détecter la présence d'activités enzymatiques spécifiques de l'autotrophie (Fisher, 1990).

Les échanges métaboliques entre les symbiotes thioautotrophes et leur hôte sont déduits à partir de l'analyse :

- des activités enzymatiques ;
- des mesures d'isotopes stables ;
- de l'ultrastructure des organismes associés (microscopie électronique) ;
- de la mesure du métabolisme respiratoire des symbiotes.

L'étude de l'autotrophie chez les bactéries symbiotiques consiste à détecter les activités enzymatiques de la RubisCO (Fig. 1B) et les enzymes impliquées dans le processus d'oxydation des sulfures (sulfo-oxydation) telles que l'APS réductase et l'ATP sulfurylase (Fig. 2). La RubisCO est inexistante dans le règne animal, car elle permet la fixation autotrophe du carbone chez les micro-organismes et les végétaux. La détection de son activité chez des animaux est forcément liée à la présence de bactéries symbiotiques. De plus, l'APS réductase est considérée comme une enzyme caractéristique de l'oxydation des sulfures par les procaryotes (Cavanaugh, 1985).



Suite à la recherche de ces activités enzymatiques chez les Stilbonematinae (Nématodes), il a été détecté la présence de la RubisCO et de certaines enzymes telles que l'ATP sulfurylase et la sulfite-oxydase qui sont impliquées dans la production d'énergie à partir des composés soufrés, mais aussi de la nitrate réductase qui peut être considérée comme

une enzyme assimilatrice et qui a un rôle dans la respiration des symbiotes (Hentschel *et al.*, 1999). Cependant, ni l'APS réductase ni la rhodanèse n'ont été détectées (Polz *et al.*, 1992). Bien que ces deux dernières enzymes soient retrouvées chez d'autres organismes associés à des symbiotes sulfo-oxydants (Felbeck *et al.*, 1981), elles ne sont pas détectées chez l'Oligochète *Phalodrilus leucodermatus* (Felbeck *et al.*, 1983b) qui est associé à des bactéries endosymbiotiques chimioautotrophes.

Dans des écosystèmes complexes tels que les environnements chimiosynthétiques, il est souvent difficile d'identifier la source de carbone organique ou de suivre son flux à travers les différents niveaux trophiques. Par comparaison entre les ratios des isotopes stables de carbone du milieu ambiant (dioxyde de carbone ou bicarbonate) et celui des tissus des organismes, il est possible de connaître les interactions trophiques entre les organismes d'un même environnement (Williams *et al.*, 1981 ; Riera *et al.*, 1999). Afin de déterminer la contribution des bactéries symbiotiques chimioautotrophes dans la nutrition de leur hôte, les rapports isotopiques $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ($\delta^{13}\text{C}$) et $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ($\delta^{15}\text{N}$) sont analysés. Sachant que la valeur du $\delta^{13}\text{C}$ du consommateur est similaire à celle de sa nourriture, ce marqueur isotopique est un bon indicateur de la source de carbone. Le marqueur isotopique de l'azote est utilisé comme indicateur du niveau trophique. La valeur du $\delta^{15}\text{N}$ du consommateur est systématiquement plus élevée que celle de sa nourriture (Peterson & Fry, 1987). Les valeurs les plus hautes sont retrouvées chez les carnivores en milieu marin, et les plus basses chez les herbivores et détritivores mangeurs de phytoplancton et de bactéries (Fry, 1988 ; Yoshii *et al.*, 1999). Le $\delta^{34}\text{S}$ est un autre rapport isotopique $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ qui peut être utilisé dans l'analyse du transfert de matière entre le consommateur et sa nourriture. Comme l'isotope du carbone, l'animal a une composition isotopique en soufre similaire à celle de son alimentation, faisant du $\delta^{34}\text{S}$ un bon indicateur pour les consommateurs qui s'alimentent principalement sur les bactéries et les plantes (Peterson & Fry, 1987 ; Peterson, 1999).

Les bactéries chimioautotrophes semblent fixer préférentiellement le $^{12}\text{CO}_2$ à un niveau plus élevé que ne le font les photoautotrophes (Rau & Hedges, 1979 ; Rau, 1981 ; Paull *et al.*, 1985 ; Ruby *et al.*, 1987) produisant ainsi une biomasse dont le $\delta^{13}\text{C}$ est le plus faible (Tab. 2). Ainsi, certains tissus d'invertébrés hydrothermaux ont présenté un faible $\delta^{13}\text{C}$ suggérant que la chimiosynthèse, plutôt que la photosynthèse, était la source majeure de carbone chez les communautés hydrothermales et les invertébrés symbiotiques de ces milieux (Rau & Hedges, 1979 ; Williams *et al.*, 1981).

Organismes	$\delta^{13}\text{C}$	Références
Organismes dont la source de carbone est d'origine photosynthétique	-12‰ à -23‰	Rau, 1981
Organismes associés à des bactéries chimiosynthétiques sulfo-oxydantes	-24‰ à -39‰	Paull <i>et al.</i> , 1985; Brooks <i>et al.</i> , 1987; Stewart <i>et al.</i> , 2005
Organismes associés à des bactéries méthanotrophes	< à -40‰	Brooks <i>et al.</i> , 1987
Annélides (Siboglinidae) avec symbiotes	-45,3‰ à -45,9‰	Southward <i>et al.</i> , 1981
Bivalves avec symbiotes	-23‰ à -33,9‰	Rau, 1981; Rau & Hedges, 1979; Spiro <i>et al.</i> , 1986
Diverses Thiobactéries	-24,6‰ à -25,1‰	Ruby <i>et al.</i> , 1987
Stilbonematinae avec symbiotes	-24,9‰ à -27,5‰	Ott <i>et al.</i> , 1991

Tableau 2 : Valeurs isotopiques de carbone chez plusieurs organismes marins.

De plus, la valeur faible du marqueur isotopique de l'azote montre que les organismes symbiotiques sont des consommateurs primaires utilisant leurs bactéries pour s'alimenter (Van Dover & Fry, 1989) (Tab. 3).

Organismes	$\delta^{15}\text{N}$	Références
Organismes marins libres (non symbiotiques)	+7‰ à +15‰	Mullin <i>et al.</i> , 1984
Consommateurs primaires	< à +7‰	Van Dover & Fry, 1989
Organismes associés à des bactéries intracellulaires sulfo-oxydantes	-13‰ à +7‰	Van Dover & Fry, 1989; Fisher, 1990; Childress & Fisher, 1992

Tableau 3 : Valeurs isotopiques d'azote chez plusieurs organismes marins.

Concernant le $\delta^{34}\text{S}$, les animaux consommateurs d'algues ont un rapport isotopique compris entre +13‰ et +20‰, alors que les organismes symbiotiques chimioautotrophes des sources hydrothermales ont des valeurs qui s'échelonnent entre -5‰ et +5‰. Ces faibles valeurs, proches de celles du soufre environnant, suggèrent que les animaux colonisant ces

milieux extrêmes riches en composés soufrés, utilisent les bactéries symbiotiques comme intermédiaire pour transférer le soufre environnant jusqu'à l'animal (Fry *et al.*, 1983).

Chez les nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae, les mesures des isotopes stables de carbone $\delta^{13}\text{C}$ montrent de faibles valeurs comprises entre -24,9‰ et -27,5‰ (Ott *et al.*, 1991) qui sont similaires aux valeurs connues pour les tissus d'invertébrés contenant des bactéries endosymbiotiques chimioautotrophes, tels que les Bivalves et les Annélides (Rau, 1981 ; Williams *et al.*, 1981) mais aussi les Thiobactéries libres sulfo-oxydantes (Ruby *et al.*, 1987) (Tab. 2). Par comparaison, un nématode non symbiotique vivant dans le même habitat que les Stilbonematinae, a un $\delta^{13}\text{C}$ égal à -10,2‰ (Ott *et al.*, 1991). Cependant, aucune valeur n'est disponible concernant les marqueurs isotopiques de l'azote et du soufre.

Des études par microscopie électronique à balayage et à transmission permettent de localiser les bactéries symbiotiques par rapport à leur hôte (ectosymbiotes ou endosymbiotes) mais aussi de mettre en évidence la nature de la paroi des symbiotes qui sont tous à ce jour décrits comme possédant une double membrane caractéristique des bactéries Gram négatif (Cavanaugh, 1983) et de déterminer les types d'inclusion dans le cytosol bactérien. Le premier type d'inclusion correspond aux polyhydroxyalkanoates (PHAs), qui sont une forme d'emménagement de réserves métaboliques (Shively, 1974 ; Fuller, 1999 ; Lechaire *et al.*, 2002). Elles servent de sources de carbone et d'énergie pour plusieurs synthèses métaboliques et participent à la croissance des bactéries. Le deuxième type de granules correspond aux vésicules périplasmiques riches en sulfures. Elles sont retrouvées chez les bactéries thioautotrophes et constituent des réserves inorganiques d'énergie qui permettent aux bactéries symbiotiques de fonctionner même en l'absence temporaire de sulfures dans le milieu environnant (Vetter, 1985).

Le dépistage du soufre et plus particulièrement des vésicules périplasmiques riches en sulfures contenues dans les bactéries, est un bon indicateur de symbiose bactérienne thioautotrophique (Vetter, 1985). Cependant, cet élément se dissout dans les solvants comme l'éthanol utilisé lors de la déshydratation des tissus avant leur inclusion en paraffine ou en résine (Truchet *et al.*, 1998 ; Pasteris *et al.*, 2001). Seuls des grains vides sont alors observés par microscopie électronique à transmission (MET). Afin d'analyser ces vésicules intactes, la seule technique à ce jour qui a permis de faire de l'imagerie sur coupe et une microanalyse par dispersion d'énergie (EDX) est la cryofixation-EFTEM (Lechaire *et al.*, 2006 ; 2008). Avant cette méthode de fixation, d'autres techniques (combustion, séchage ou purification) avaient permis d'étudier le soufre contenu dans les bactéries par extraction complète du composé (à partir des bactéries ou d'une fraction de tissu) qui était ensuite analysé en EDX (Lawry *et al.*,

1981 ; Vetter, 1985 ; Liberge *et al.*, 2001). Des moyens uniquement analytiques (sans imagerie), tel que le dosage par chromatographie sur colonne HPLC (Polz *et al.*, 1992 ; Caro *et al.*, 2007) et la microspectrométrie Raman (Pasteris *et al.*, 2001), ont aussi été utilisés pour détecter et identifier le soufre contenu dans des symbiotes extraits de leur hôte ou dans des bactéries libres. Il a été mis en évidence la présence de soufre élémentaire dit alpha qui est la forme la plus stable dans les conditions usuelles. Les cristaux de soufre de maille orthorhombique sont constitués à chaque nœud d'une molécule de soufre S₈.

La microspectrométrie Raman a émergé au début du 20^{ème} siècle comme une technique puissante permettant d'obtenir des détails et des informations spécifiques au niveau moléculaire, que les autres méthodes spectroscopiques ne pouvaient fournir que dans des domaines restreints (Schmitt & Popp, 2006). Les principaux avantages de cette technique sont sa grande spécificité et sa facilité d'utilisation et d'adaptation aux différents domaines de recherche. La spectrométrie Raman est une technique non destructrice et requiert un minimum ou aucune préparation des échantillons. Des échantillons solides, liquides et gazeux peuvent être étudiés et aussi bien les spécimens transparents que non transparents ayant des textures différentes de surface. La spectrométrie Raman peut être appliquée à tous les échantillons accessibles optiquement et où aucun pré-traitement de l'échantillon n'est nécessaire. Cette méthode s'est révélée être un outil très intéressant par sa rapidité d'acquisition du résultat (quelques secondes) sur des échantillons biologiques n'ayant subi aucune préparation préalable. De plus, un spectromètre Raman a été adapté (White *et al.*, 2005) et utilisé *in situ* en milieu profond sur des roches pour déterminer leur composition minérale, mais aussi sur des mattes bactériennes se développant en bordure de sources hydrothermales et de suintements froids (White *et al.*, 2006).

Les bactéries marines et plus particulièrement les symbiotes sont difficilement cultivables en laboratoire ce qui, par conséquent, limite la quantité de matériel biologique disponible. Les bactéries symbiotiques sont donc étudiées directement sur leur hôte par microscopie électronique, hybridation moléculaire (FISH et Card-FISH) et biologie moléculaire (phylogénie). Grâce au développement de ces techniques et à l'utilisation en routine de la PCR, la diversité des symbiotes a pu être mise en évidence (Dubilier *et al.*, 2008). Le développement des techniques de séquençage, a permis d'obtenir un grand nombre de séquences à partir de bactéries libres et de micro-organismes symbiotiques (Distel *et al.*, 1991 ; Distel & Cavanaugh, 1994 ; Polz *et al.*, 1994). Les séquences des endosymbiotes sulfuroxydants de *Riftia pachyptila*, *Calymptogena magnifica*, *Bathymodiolus thermophilus* et de

quelques autres bivalves (Stahl *et al.*, 1984 ; Distel *et al.*, 1988) ont tout d'abord été obtenues à partir de l'analyse de l'ADNr 16S, région codant pour l'ARNr 16S. Récemment, le génome du symbiote de *Riftia pachyptila* a pu être analysé par approche métagénomique (Markert *et al.*, 2007 ; Robidart *et al.*, 2008). Le protéome du symbiote de *R. pachyptila* est le premier protéome chimiosynthétique décrit à ce jour.

Il a été observé que la plupart des symbiotes sulfo-oxydants appartiennent au groupe des γ -protéobactéries (Woese, 1987 ; Dubilier *et al.*, 2008). L'arbre phylogénétique des micro-organismes, dont le métabolisme est lié au soufre, montre que les symbiotes d'invertébrés marins sont regroupés dans un même groupe (Fig. 3) et que celui-ci comprend les symbiotes chimioautotrophes et les méthanotrophes (Fig. 4).

I. Introduction



■ Phototrophic sulfur-oxidizers
 ■ Chemolithotrophic sulfur-oxidizers
 □ Sulfur reducers
 ■ Sulfate reducers
 ■ Organic sulfur utilizers

Figure 3 : Arbre phylogénétique des différents types de micro-organismes dont le métabolisme est lié au soufre (Sievert *et al.*, 2007).

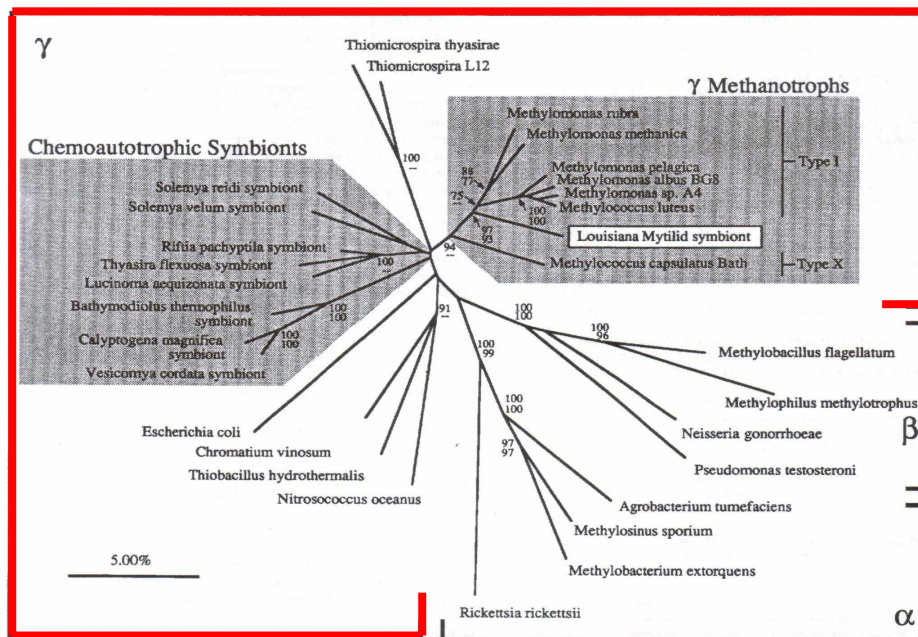


Figure 4 : Arbre phylogénétique des protéobactéries basé sur les séquences 16S de l'ARNr (Distel & Cavanaugh, 1994).

A partir d'observations morphologiques et de dosages enzymatiques, il a été démontré une coexistence de types bactériens chez un même organisme hôte. Les premiers hôtes décrits, possédant plus d'un endosymbiote, ont été les mollusques du genre *Bathymodiolus* (Fisher *et al.*, 1993 ; Cavanaugh *et al.*, 2006). L'analyse des séquences d'ARNr 16S et les hybridations moléculaires ont démontré que des symbiotes sulfo-oxydants et méthanotrophes sont retrouvés dans les mêmes cellules au niveau de la branchie du bivalve (Fisher, 1990 ; Fisher *et al.*, 1993 ; Distel *et al.*, 1995 ; Duperron *et al.*, 2006). Par la suite, une co-existence de plusieurs symbiotes a aussi été observée chez les Oligochètes possédant des bactéries endosymbiotiques dont les symbiotes appartiennent aux γ -protéobactéries sulfo-oxydantes, aux δ -protéobactéries sulfato-reductrices et aux α -protéobactéries (Blazejak *et al.*, 2006 ; Dubilier *et al.*, 2008 ; Ruehland *et al.*, 2008). De même, chez les nématodes symbiotiques, plusieurs associations ont été recensées avec des Cytophaga et des bactéries du groupe α -, γ -, et δ - Protéobactéries (Polz *et al.*, 1999 ; Vanura, 2001).

L'étude des gènes de fonction et plus particulièrement celui de l'APS reductase (Apr) est un moyen de valider l'appartenance des symbiotes étudiés aux bactéries sulfo-oxydantes. La phylogénie permet de lier les organismes entre eux, mais ne détermine pas avec certitude leur métabolisme. La détection du gène codant pour l'APS réductase, enzyme impliquée dans le mécanisme de la sulfo-oxydation, confirme avec exactitude que les bactéries réalisent l'oxydation du soufre (Cavanaugh, 1985 ; Meyer & Kuever, 2007ab). La recherche des gènes de fonction est de plus en plus utilisée en complémentarité de la phylogénie des symbiotes, comme dans l'étude des bactéries endosymbiotiques retrouvées chez les Mytilidae colonisant les bois coulés (Duperron *et al.*, 2008).

1.4 Les nématodes en milieu marin

Les Nématodes sont considérés comme le plus important taxon des Métazoaires. Ils représentent 80% de l'ensemble des Métazoaires en terme de densité (Heip *et al.*, 1985). Ils exploitent de nombreuses niches écologiques aussi bien terrestres que marines (Heip *et al.*, 1985 ; Mitreva *et al.*, 2005). Le phylum des nématodes comprend des détritivores libres, terrestres et marins, des prédateurs de la méiofaune, des herbivores et des parasites de plantes et d'animaux (Parkinson *et al.*, 2004 ; Mitreva *et al.*, 2005). Ils peuvent être trouvés en grand nombre avec une diversité élevée (Heip *et al.*, 1985).

Dans l'environnement marin, les Nématodes libres constituent aussi le taxon dominant de la méiofaune : 60% à 90% de la faune totale (Coull, 1999). Ils appartiennent au **méiobenthos** et ont exploité tous les types de sédiments, que ce soit en milieu littoral, colonisant les sédiments meubles, les fonds vaseux ainsi que les plages sablonneuses (à sables fins ou grossiers), en milieu intertidal ou subtidal ou encore en milieu profond (Ott *et al.*, 1982 ; 2004 ; Ott & Novak, 1989 ; Vanreusel *et al.*, 1997 ; Decraemer & Goubault, 1997 ; Riemann *et al.*, 2003 ; Debenham *et al.*, 2004).

La plupart des nématodes n'ont pas besoin d'un apport constant d'oxygène et ont une haute tolérance pour les conditions anoxiques. Certains, colonisent les couches de sédiment anoxique, où le soufre est accumulé par action bactérienne forme une zone de discontinuité de potentiel (RPD) (Jørgensen & Fenchel, 1974 ; Ott & Novak, 1989 ; Giere, 1992). Parmi les espèces de nématodes qui bénéficient de l'exploitation du soufre et des avantages offerts par cette niche écologique (faible prédation et diminution de la compétition interspécifique), sont retrouvées celles qui se sont associées à des micro-organismes chimiosynthétiques sulfo-oxydants (ecto- ou endosymbiotiques). D'autres nématodes du genre *Oncholaimus*, colonisant les sédiments aux alentours des sources hydrothermales, ont développé des cellules de stockage du soufre sous leur cuticule dans les tissus épidermiques. Ces structures apparaissent quand les nématodes sont exposés à des conditions sulfidiques importantes (Thiermann *et al.*, 2000) (Tab. 4).

nématodes	adaptations	Localisations	Références
<i>Oncholaimus campylocercoides</i>	Inclusions de soufre	Sédiment autour des sources hydrothermales	Thiermann <i>et al.</i> , 1994, Thiermann <i>et al.</i> , 1997, Thiermann <i>et al.</i> , 2000
		Sédiment peu profond	Mahmoudi <i>et al.</i> , 2005; Hedfi <i>et al.</i> , 2007; Beyrem <i>et al.</i> , 2007
<i>Astomonema</i> et <i>Parastomonema</i>	Endobiontes	Sédiment peu profond	Ott <i>et al.</i> , 1982; Dando <i>et al.</i> , 1991; Austen <i>et al.</i> , 1993; Kito & Aryuthaka, 2006 ; Vidakovic & Boucher, 1987
<i>Rhaphothyreus</i>	Endobiontes	Sédiment profond	Riemann, 1993; Miljutin <i>et al.</i> , 2006
Stilbonematinae	Ectobiontes	Sédiment peu profond sablonneux	Ott & Novak, 1989 ; Ott <i>et al.</i> , 1991; Ott, 1995 ; Ott, 1997; Polz <i>et al.</i> , 1992 ; Hoschitz <i>et al.</i> , 1999; Bayer <i>et al.</i> , 2009
		Sédiment vaseux	Boucher & Gourbault, 1990; Muthumbi <i>et al.</i> , 1995

Tableau 4 : Récapitulatif des différentes adaptations au soufre retrouvées chez les nématodes.

Les nématodes marins peuvent être classés selon quatre types trophiques formant deux groupes (Wieser, 1953) : Le groupe 1 contient les espèces de nématodes ne possédant pas d'armature buccale et le groupe 2 les espèces de nématodes présentant une armature buccale. Les types trophiques 1A et 1B correspondent aux détritivores qui avalent leur nourriture entière. Ils ne présentent pas de cavité buccale distincte et s'alimentent sur de très petites particules qu'ils aspirent par simple succion de l'œsophage. Les espèces de type 1A sont sélectives de leur nourriture (principalement des bactéries) alors que les espèces de type 1B ne sont pas sélectives et s'alimentent sur les débris organiques. Le type trophique 2A correspond aux suceurs d'épistrates (herbivores). Ils percent les membranes cellulaires de leur nourriture, afin d'en sucer le contenu. Ils présentent une cavité buccale conique avec ou sans denticules et peuvent s'alimenter sur des particules plus grosses tels que les diatomées, les algues unicellulaires et les protozoaires. Les espèces du type 2B présentent une cavité buccale fortement armée qui leur permet de s'alimenter sur de nombreux organismes dont les

bactéries, les diatomées et les algues unicellulaires, mais aussi sur des nématodes et autres métazoaires. Ils sont assimilés aux espèces carnivores (prédateurs) ou omnivores.

Un autre mode d'alimentation chez les nématodes a été décrit par Jensen (1987) et permet la consommation de matière organique dissoute par diffusion transépidermique. Ce moyen permet un ravitaillement supplémentaire en nourriture pour les **espèces thiobiotiques** (généralement détritivores) dont les nématodes symbiotiques. Ce même auteur omet la séparation des groupes trophiques entre les détritivores sélectifs et non sélectifs. Par contre, Moens & Vincx (1997) ont ajouté des informations complémentaires à cette classification suite à l'observation des nématodes colonisant les estuaires. Six types trophiques ont été décrits :

- les prédateurs facultatifs qui consomment des bactéries, des ciliés, des détritits et des nématodes ;
- les prédateurs qui s'alimentent sur des nématodes et des oligochètes ;
- les microvores qui consomment des bactéries ;
- les consommateurs de ciliés qui s'alimentent aussi sur des bactéries ;
- les détritivores qui consomment des bactéries, des ciliés, des cyanophycées, des microalgues et des diatomées ;
- et les herbivores qui s'alimentent sur des bactéries, des microalgues, des cyanophycées et des diatomées.

Les nématodes marins impliqués dans une relation symbiotique appartiennent à la classe des Chromadorea de l'embranchement des Nématodes (Meldal *et al.*, 2007) (Fig. 5). Deux types de nématodes marins sont connus pour développer des symbioses bactériennes : Les Stilbonematinae qui ont un tube digestif fonctionnel et des micro-organismes ectosymbiotiques et les Siphonolaimidae qui n'ont pas de bouche ainsi qu'un tube digestif réduit et possèdent des micro-organismes endosymbiotiques. Ces groupes hôtes sont phylogénétiquement distincts (De Ley & Blaxter, 2002) et appartiennent respectivement à l'ordre des Desmodorida et à l'ordre des Monhysterida (Fig. 5). Ces nématodes sont retrouvés dans les mêmes habitats et colonisent préférentiellement les sédiments soufrés réduits de faible profondeur.

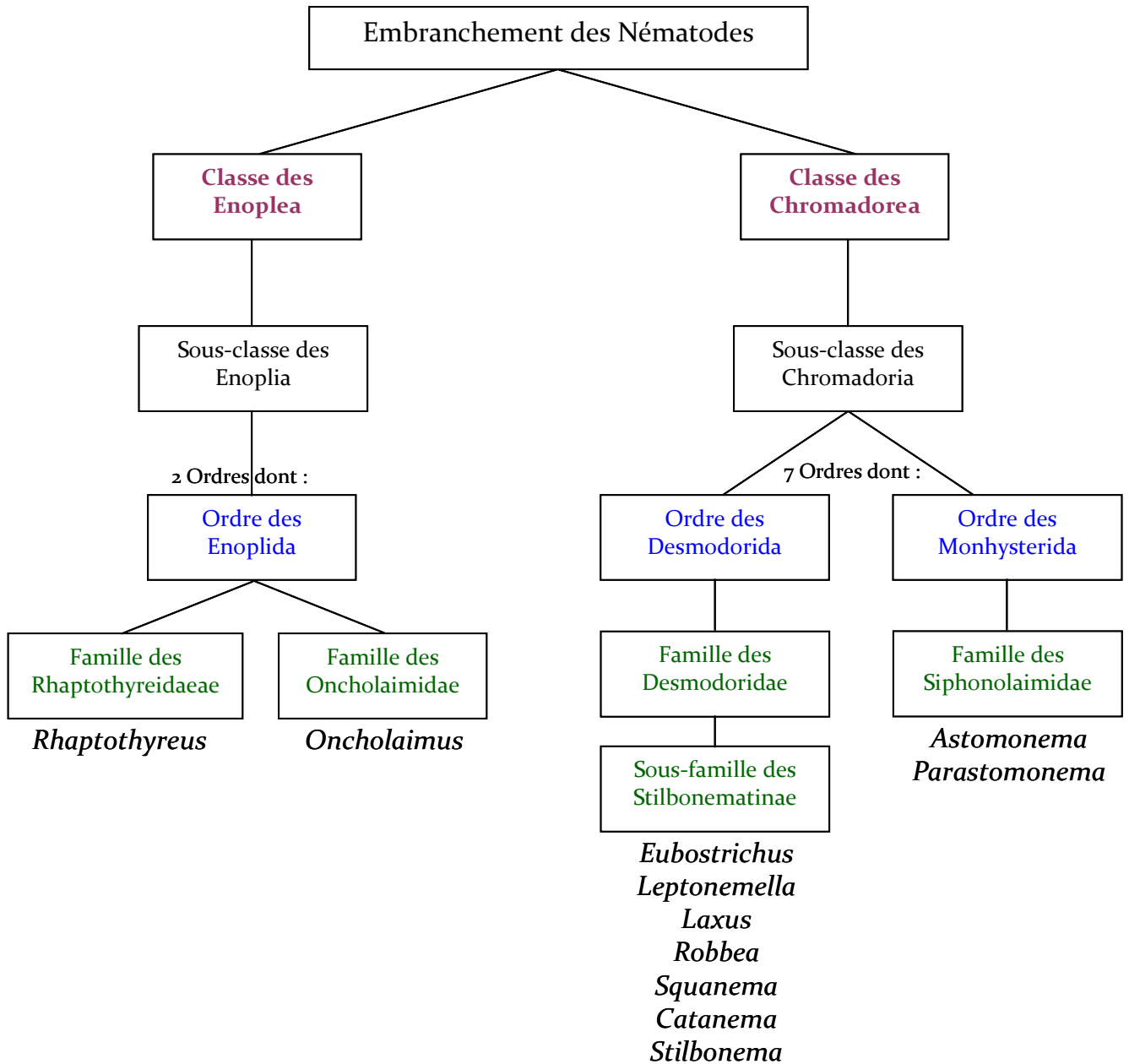


Figure 5 : Systématique de l’embranchement des Nématodes (D’après Abebe *et al.*, 2006).

Les nématodes de la famille des Siphonolaimidae sont représentés principalement par le genre *Astomonema* (Ott *et al.*, 1982). Ils colonisent de nombreux habitats littoraux (sables de plage, etc...) mais sont aussi collectés dans les sédiments vaseux de grande profondeur et au niveau des **pockmarks** riches en méthane (Dando *et al.*, 1991). Les analyses phylogénétiques de ce nématode hôte basées sur le gène de l’ARNr 18S ont démontré que l’espèce *Astomonema* sp. était plus proche des nématodes non-symbiotiques de la famille des Linhomoeidae (Chromadoria, Monhysterida) et Axonolaimidae (Chromadoria,

I. Introduction

Araeolaemidae) plutôt que de ceux appartenant à la sous-famille des Stilbonematinae (Fig. 6A). Cependant, les analyses phylogénétiques des symbiotes de *Astomonema* sp. utilisant des comparaisons de séquences de gènes de l'ARNr 16S ont révélé qu'ils étaient proches des ectosymbiotes de la sous-famille des Stilbonematinae aussi bien que des endosymbiotes sulfuroxydants des oligochètes marins (Musat *et al.*, 2007) (Fig. 6B).

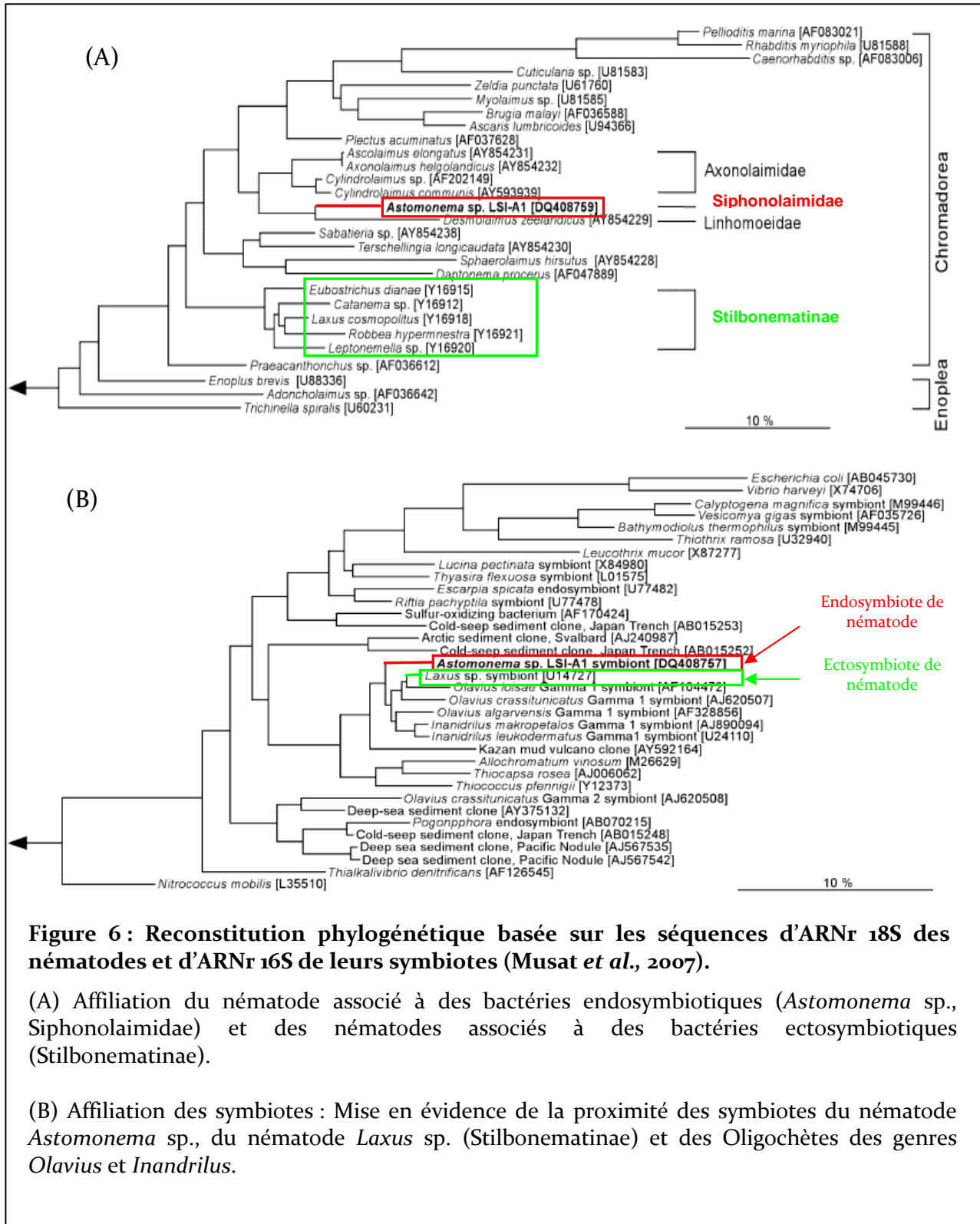
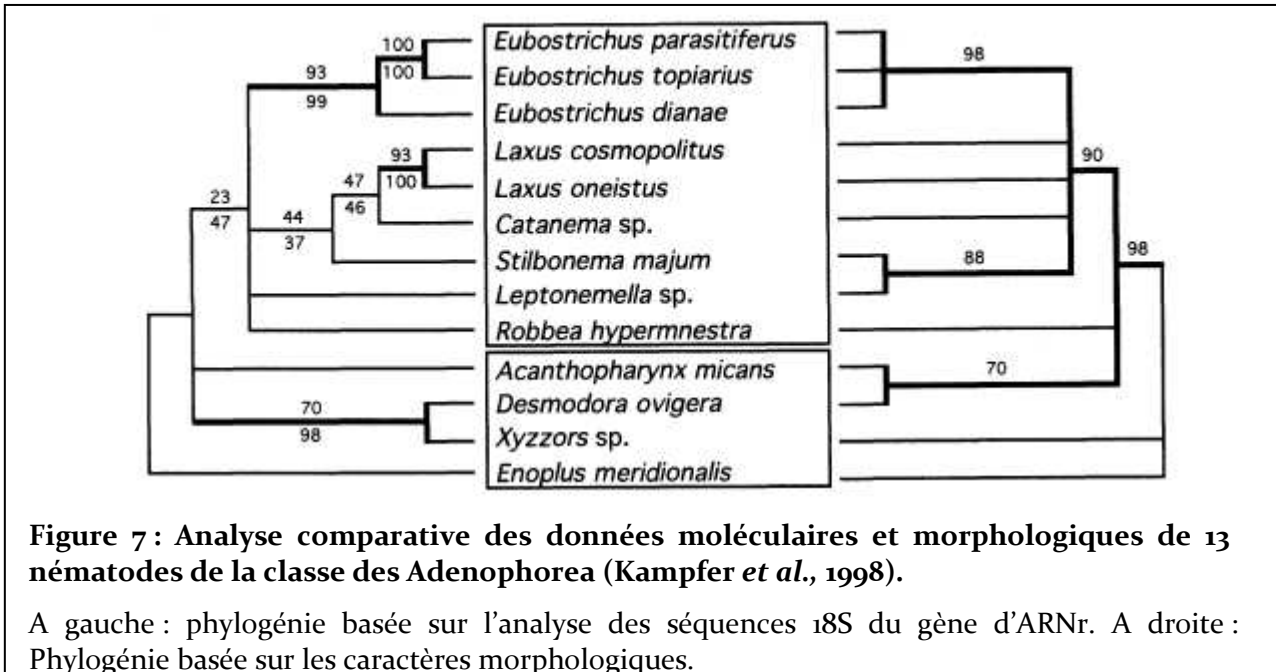


Figure 6 : Reconstitution phylogénétique basée sur les séquences d'ARNr 18S des nématodes et d'ARNr 16S de leurs symbiotes (Musat *et al.*, 2007).

(A) Affiliation du nématode associé à des bactéries endosymbiotiques (*Astomonema* sp., Siphonolaimidae) et des nématodes associés à des bactéries ectosymbiotiques (Stilbonematinae).

(B) Affiliation des symbiotes : Mise en évidence de la proximité des symbiotes du nématode *Astomonema* sp., du nématode *Laxus* sp. (Stilbonematinae) et des Oligochètes des genres *Olavius* et *Inandrilus*.

Les nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae (Desmodorida) sont regroupés en 7 genres : *Catanema* Cobb 1920, *Eubostrichus* Greef 1869, *Laxus* Cobb 1894, *Leptonemella* Cobb 1920, *Robbea* Gerlach 1956, *Squanema* Gerlach 1963 et *Stilbonema* Cobb 1920. Ils forment un groupe monophylétique selon les données morphologiques et moléculaires (Kampfer *et al.*, 1998 ; Riemann *et al.*, 2003 ; Ott *et al.*, 2004) (Fig. 7).



Ils colonisent préférentiellement les sédiments soufrés réduits des plages sablonneuses en milieu tropical (herbier à *Thalassia testudinum*) et vivent à quelques centimètres sous la surface du sédiment en fonction de la RPD. Ils sont étudiés principalement aux Bermudes et à Belize (Ott & Novak, 1989 ; Schiemer *et al.*, 1990 ; Ott *et al.*, 1991 ; 1995) mais aussi dans les sédiments sableux de Floride (Ott *et al.*, 1982), en mer Adriatique (Ott, 1995), dans la mer du Nord (Warwick, 1971 ; Vanreusel, 1991) et dans la mer Baltique (Jensen, 1987). Ils ont été aussi observés dans les suintements peu profonds de Crête (Thiermann *et al.*, 1994) et en Nouvelle-Zélande (Kamenev *et al.*, 1993). Deux caractères les distinguent des autres familles de nématodes :

- la structure complexe de l'Organe Sensoriel Glandulaire (OSG) qui permet la sécrétion du mucus au niveau cuticulaire. Ces organes situés sous la cuticule des nématodes sont formés chez les Stilbonematinae de 3 à 4 cellules. Chez les nématodes des genres *Spiriniinae* (Desmodoridae) et *Desmodorinae* (Desmodoridae, Desmodorina), proches phylogénétiquement des Stilbonematinae mais non symbiotiques, les OSG sont formés uniquement de deux cellules (Nebelsick *et al.*, 1992 ; Bauer-Nebelsick *et al.*, 1995).

- l'association obligatoire avec des bactéries symbiotiques formant un manteau bactérien sur la cuticule du nématode. Ces ectosymbiotes sont spécifiques du genre et plus souvent de l'espèce du nématode hôte (Ott & Novak, 1989).

Ces nématodes ont été décrits pour la première fois par Greef en 1869 qui considérait que le manteau bactérien ectosymbiotique était une ornementation cuticulaire. Plus tard, ces symbiotes étaient assimilés à des spores fongiques ou à des algues bleues (cyanobactéries) (Ott *et al.*, 2004). La description d'une éventuelle association entre des micro-organismes et les nématodes, a été suggérée pour la première fois par Powell *et al.*, (1979) qui a observé une accumulation de soufre par autoradiographie dans le manteau bactérien du nématode *Eubostrichus* sp. après incubation dans du Na₂³⁵S radioactif. Plusieurs expériences ont ensuite permis de supposer que ces bactéries symbiotiques étaient chimiosynthétiques sulfuroxydantes :

(1) l'étude du métabolisme bactérien et la mise en évidence de sa contribution dans l'association avec les nématodes (Schiemer *et al.*, 1990) ;

(2) La présence d'enzyme spécifique de l'autotrophie, la RubisCO et la détection d'ATP sulfurylase et de sulfite oxydase (Polz *et al.*, 1992) ;

(3) les faibles valeurs de l'isotope stable de carbone $\delta^{13}\text{C}$ (Ott *et al.*, 1991) qui sont typiques des micro-organismes libres et symbiotiques thioautotrophes (Rau, 1981 ; Spiro *et al.*, 1986) ;

(4) L'analyse des séquences d'ADNr 16S qui place les symbiotes de *Laxus* sp. dans le groupe des γ - Protéobactéries (Polz *et al.*, 1994).

1.5 Les sédiments marins tropicaux de faible profondeur

En milieu tropical, trois écosystèmes jouent un rôle prépondérant dans le domaine maritime : la barrière de corail, l'herbier à *Thalassia testudinum* et la mangrove. Parmi ces trois milieux retrouvés en Guadeloupe, les nématodes marins colonisent préférentiellement les sédiments sablo-calcaires où se développent les herbiers et les sédiments vaseux de mangrove.

Les études méiofaunistiques menées en Guadeloupe au début des années 80, ont permis de recenser six principaux taxons (Nématodes, Copépodes, Tardigrades, Halacariens marins, Polychètes et Turbellariés) représentatifs de la méiofaune sur le pourtour de la Guadeloupe (Renaud-Mornant & Gourbault, 1981 ; 1984 ; Gourbault *et al.*, 1998). Le pourcentage de ces principaux taxons représentés varie fortement selon le lieu et les

caractéristiques sédimentaires du milieu ; il montre par exemple, une nette corrélation avec la granulométrie et le taux de carbonate de calcium CaCO_3 du sédiment (lié à l'érosion des récifs coralliens). La composition au niveau générique des peuplements de nématodes est nettement plus variable dans les sites de mode battu que dans ceux de mode calme. La granulométrie influe de façon significative sur la composition générique des assemblages de nématodes, mais pas sur les mesures de diversité spécifique (Boucher & Gourbault, 1990 ; Gourbault *et al.*, 1998). Chez les nématodes, 122 espèces ont été collectées appartenant à 112 genres (Gourbault *et al.*, 1998). Il a aussi été remarqué que la famille des Desmodoridae était la plus abondante et la plus diversifiée au niveau des stations étudiées, tous milieux confondus (Boucher & Gourbault, 1990). De nouveaux genres de nématodes marins en Guadeloupe, appartenant à différentes familles ont alors été décrits suite à ces études méiofaunistiques. Ces nématodes appartiennent aux familles des Xyalidae (Gourbault, 1982), Draconematidae (Decraemer & Gourbault, 1986), Epsilonematidae (Gourbault & Decraemer, 1986 ; 1987 ; 1988 ; Decraemer & Gourbault, 1987 ; 1990ab), Desmoscolecini (Decraemer & Gourbault, 1986) et Lauratonematidae (Gourbault & Decraemer, 1986). Dans les sédiments sablo-calcaires du sud de la Grande-Terre, des familles de nématodes dominantes ont été identifiées, représentant plus de 80% des individus collectés dans ces milieux et appartenant aux Desmodoridae, Xyalidae, Cyatholaimidae et Linhomeidae (Boucher & Gourbault, 1990). Certaines espèces étaient aussi prélevées majoritairement dont *Neonyx* sp., *Daptonema miamiensis*, *Spirinia parasitifera*, *Metalinhomeus* sp.1, *Terschellingia* sp.2, *Leptogastrella* sp., *Marylinnia* sp.1 et *Marylinnia* sp.2 (Boucher & Gourbault, 1990). Dans cet environnement, un bivalve de la famille des Lucinidae a été décrit comme vivant en symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes (Gros *et al.*, 1996). Ces bactéries contenues dans la branchie du bivalve permettraient la détoxification du milieu et joueraient un rôle nutritionnel lors de carence alimentaire de l'animal hôte (Felbeck *et al.*, 1983a ; Diouris *et al.*, 1989).

Un autre écosystème caractéristique du milieu tropical retrouvé en Guadeloupe est la forêt de mangrove. Elle est caractérisée par une espèce dominante d'arbres : les palétuviers rouges (*Rhizophora mangle*). Cette forêt représente un écosystème original entre le milieu terrestre et le milieu marin. En Guadeloupe, la marée étant faible [le marnage dans la Baie de Pointe-à-Pitre ne dépasse guère 50cm à 60cm en période de vive-eau (Assor, 1988)], les lagunes de mangrove et la forêt bordant ces lagunes sont en permanence inondées. Dans l'eau de mer environnante, sont retrouvées de nombreuses feuilles et branchages en décomposition, conséquence de l'action de communautés bactériennes et fongiques (Ashton *et al.*, 1999 ; Torres-Pratts & Schizas, 2007). Cet apport de matière organique en continu par les palétuviers

constitue un support pour de nombreux invertébrés sessiles et vagiles et forme un sédiment vaseux silto-argileux carbonaté (Assor, 1988). Les communautés formant la méiofaune de mangrove sont composés d'annélides (principalement des Oligochètes), de crustacés et de nématodes. Ces derniers représentent la majorité de la méiofaune du sédiment et des bois coulés de mangrove et jouent un rôle important dans la minéralisation de la matière organique (Alongi, 1990 ; Gee & Somerfield, 1997 ; Zhou, 2001). De plus, les bois coulés ont été récemment décrits comme environnement favorable au développement de symbioses sulfuroxydantes grâce à la production de sulfures par la décomposition de cette matière organique (Laurent *et al.*, 2009). L'étude des communautés de la méiofaune de mangrove a mené à la description de plusieurs nouvelles espèces de nématodes dont *Parapinnanema ritae* et *P. rhipsoides* en Guadeloupe (Gourbault & Vincx, 1994). Dans les différentes zones de mangrove, les variations du contenu en vase du sédiment sont liées au type d'alimentation des nématodes (Schrijvers & Vincx, 1997). Au niveau des racines de palétuviers et de la litière de feuilles, les mangeurs d'épistrates (herbivores) sont majoritaires (Nicholas *et al.*, 1991 ; Chinnadurai & Fernando, 2007). Leur présence coïncide avec l'augmentation des microalgues benthiques et des phytodétritus (Alongi, 1990). Dans les mangroves australiennes et plus précisément dans la partie médiane des lagunes, sont retrouvés principalement des nématodes détritivores, alors que les omnivores et prédateurs prévalent dans les zones les plus éloignées (Alongi, 1987 ; Nicholas *et al.*, 1991 ; Nicholas, 2001). Environ 85% de ces animaux restent dans la couche supérieure du sédiment vaseux et seulement quelques espèces sont capables de pénétrer plus profondément dans la couche anoxique du sédiment (en dessous de 10cm de profondeur). Les abondances sont affectées par la marée et les populations varient en fonction du contenu alimentaire et organique du sédiment ainsi que de sa granulométrie (Hodda, 1990). Tietjen & Alongi (1990) mettent en évidence la corrélation significative entre la biomasse formée par la litière d'*Avicennia marina* (espèce de palétuvier formant la forêt de mangrove tempérée), l'abondance bactérienne et l'abondance des nématodes. La relation disparaît dans le temps avec le vieillissement des détritits. En Guadeloupe, la forêt de mangrove est humide et est bordée de *Rhizophora mangle* (Palétuvier rouge). Dans cet écosystème, ont été recensées des familles dominantes de nématodes, représentant plus de 80% des individus collectés dans ces milieux et appartenant aux des Desmodoridae, des Linhomeidae, des Ethmolaimidae ainsi que quelques nématodes de la famille des Xyalidae et Oncholaimidae (Boucher & Gourbault, 1990). Certaines espèces étaient aussi prélevées majoritairement dont *Neonyx* sp., *Daptonema miamiensis*, *Gomphonema* sp., *Metalinhomeus* sp.1, *Terschellingia*

longicaudata, *Croconema* sp., *Eubostrichus* sp. et *Pseudolelloides* sp. (Boucher & Goubault, 1990).

A partir de ces observations méiofaunistiques et plus précisément de celles de la nématofaune peuplant les sédiments côtiers soufrés réduits en milieu tropical, nous avons étudié tout d'abord la diversité des nématodes symbiotiques de la sous-famille des Stilbonematinae dans l'herbier à *Thalassia testudium* et la mangrove de Guadeloupe. L'objectif de cette première partie d'étude était d'identifier les espèces de nématodes symbiotiques et de décrire la forme et la structure du manteau bactérien qui les recouvre. Des techniques moléculaires de séquençage et d'hybridation *in situ* (FISH et Card-FISH) ont été utilisées, afin de mieux caractériser cette symbiose bactérienne. Une grande partie de ce travail a ensuite été de développer une technique permettant la localisation du soufre élémentaire à partir d'organismes entiers sans leur créer de dommages afin de confirmer la nature sulfo-oxydante des bactéries associées aux Stilbonematinae. La microspectrométrie Raman s'est révélée être un outil parfaitement adapté à ce contexte et a donc permis de réaliser un « screening » rapide de la méiofaune colonisant les bois coulés en mangrove, afin de déceler d'éventuels organismes thiotrophes (libres ou symbiotiques). Les bivalves *Codakia orbicularis* et *Lucina pectinanta* vivent associés à des endosymbiotes sulfo-oxydants et colonisent respectivement l'herbier à *Thalassia testudinum* et la mangrove. Ils ont été analysés de la même manière que la nématofaune de ces écosystèmes afin de constituer des témoins. Enfin, l'écologie de la nématofaune de mangrove a été étudiée. Ce dernier objectif est inspiré de l'analyse de l'impact de la dégradation d'une carcasse de baleine sur la répartition de la nématofaune et de la macrofaune environnante (Debenham *et al.*, 2004). Il a récemment été montré des émissions de sulfures lors de la dégradation des carcasses de baleines (Treude *et al.*, 2009) ainsi que lors de celle des bois coulés en mangrove (Laurent *et al.*, 2009). Une expérimentation a donc été menée afin de déterminer l'impact des émissions de sulfures par la dégradation des bois coulés sur la répartition de la nématofaune dans le sédiment de mangrove.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Sites d'études et échantillonnage biologique

a. Sites d'études

La Guadeloupe est une île tropicale située sur l'arc antillais à $16^{\circ}15'$ de latitude Nord et à $61^{\circ}35'$ de longitude Ouest. Elle est formée de deux îles l'une calcaire Grande-Terre à l'Est et l'autre volcanique Basse-Terre à l'Ouest séparées par un bras de mer étroit, la Rivière Salée. Elle est bordée d'un côté par l'Océan Atlantique et de l'autre par la Mer des Caraïbes (Fig. 8).

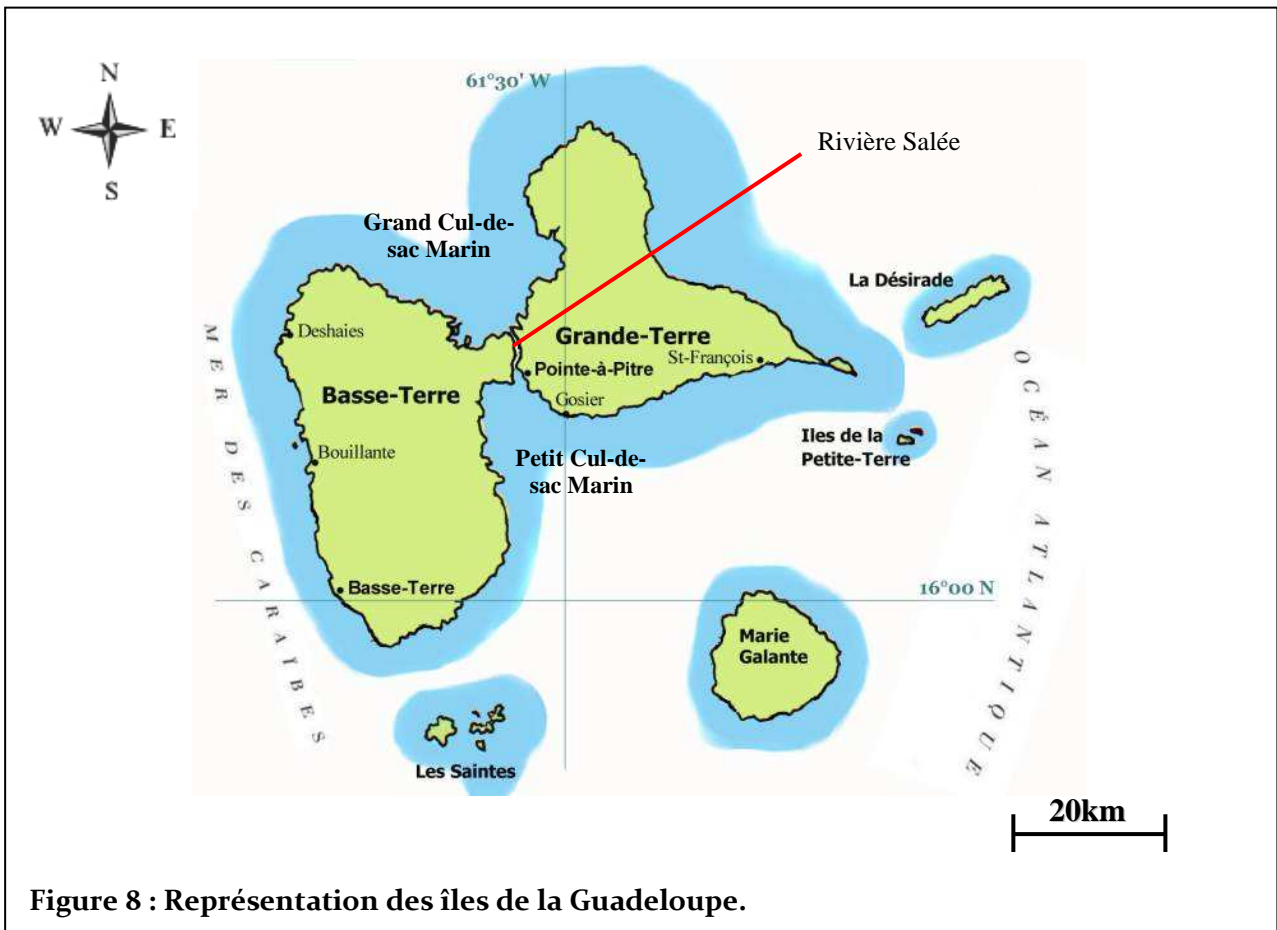


Figure 8 : Représentation des îles de la Guadeloupe.

Les biotopes sédimentaires littoraux doivent leur origine à la désagrégation des formations préalablement édifiées, soit par l'activité volcanique soit par les récifs coralliens (Calhoun & Field, 2008). En raison du contact de deux îles d'origine totalement différente, on rencontre en Guadeloupe une large variété de sédiments littoraux allant des sables noirs et fins constitués en quasi-totalité de minéraux volcaniques, jusqu'aux sables blancs et grossiers entièrement organogènes, en passant par des sédiments mixtes à différentes proportions d'éléments siliceux et carbonatés.

Le premier site d'étude retenu est l'herbier à phanérogames marines de l'îlet cochon (Fig. 9A-B) situé dans le Petit Cul-de-sac Marin de Guadeloupe. Cet herbier constitué principalement de *Thalassia testudinum* de la famille des Hydrocharitaceae (Fig. 9C) est un écosystème à part entière qui se développe entre le littoral et la barrière corallienne sur un sédiment sablo-calcaire. Ces sables proviennent de la désagrégation du socle récifal ancien ou de l'érosion par les vagues de récifs actuels établis de façon discontinue sur les côtes Sud de la Guadeloupe. L'échantillonnage a été effectué à l'aide d'un carottier de 15cm de diamètre sur une profondeur d'environ 30cm. Les prélèvements ont été transportés dans un bac d'eau de mer jusqu'au laboratoire où ils ont été tamisés puis triés.

Le deuxième site d'étude est la mangrove et plus précisément la lagune de la manche à eau située à proximité de l'embouchure de la Rivière Salée dans le Grand Cul-de-sac Marin de Guadeloupe (Fig. 9A-D). La forêt de mangrove est constituée principalement de palétuviers (*Rhizophora mangle*). Elle représente un écosystème charnière entre la terre et l'environnement marin. La décomposition dans l'eau de grandes quantités de feuilles et de branchages produit un sédiment vaseux riche en matière organique. L'échantillonnage de la nématofaune s'est effectué sur les branchages et feuillages coulés naturellement (Fig. 9E) ainsi que sur des branches de palétuviers et de cocotiers coulés expérimentalement dans un casier d'environ 250dm³ (h : 0,5m ; Lg : 1m ; l : 0,5m) de contenance. Ce casier a été déposé à 1m50 de profondeur sur le sédiment de mangrove et un échantillonnage de la nématofaune a été effectué sur un **transect** allant du casier à 5m de distance de celui-ci.

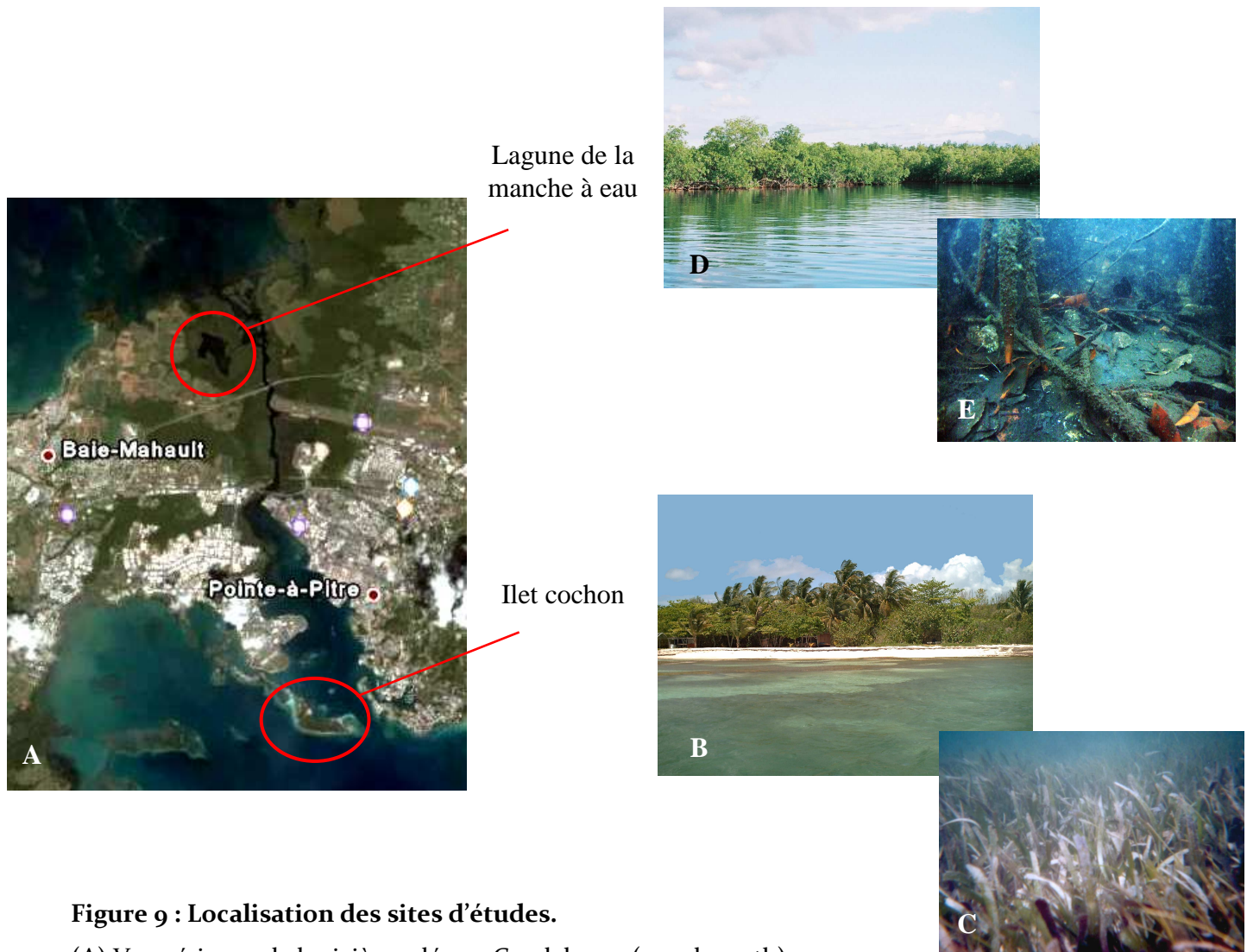


Figure 9 : Localisation des sites d'études.

(A) Vue aérienne de la rivière salée en Guadeloupe (google earth).

(B) Plage de l'îlet cochon et herbier à *Thalassia testudinum* où les prélèvements de sédiment ont été réalisés.

(C) Photo sous-marine de l'herbier à *T. testudinum*.

(D) Photo de la forêt de mangrove bordant la lagune de la manche à eau.

(E) Photo sous-marine du sédiment de mangrove prise au niveau des racines de palétuvier rouge (*Rhizophora mangle*).

b. Echantillonnage en Herbier à *Thalassia testudinum*

Les carottes prélevées ont été triées sur un tamis de 2mm d'arrête, afin d'éliminer les fractions les plus grossières contenues dans le sédiment [débris végétaux, coquilles...].

Suite au tamisage complet des carottes dans des bacs de 10 litres, de l'eau de mer filtrée à 5µm a été rajoutée et l'ensemble a été placé sous bulleur, afin d'oxygéner le sédiment.

Une fraction de sédiment a ensuite été prélevée dans un cristalliseur avec de l'eau de mer et les nématodes ont été extraits manuellement à l'aide d'une pipette sous loupe binoculaire (Nikon SMZ 800).

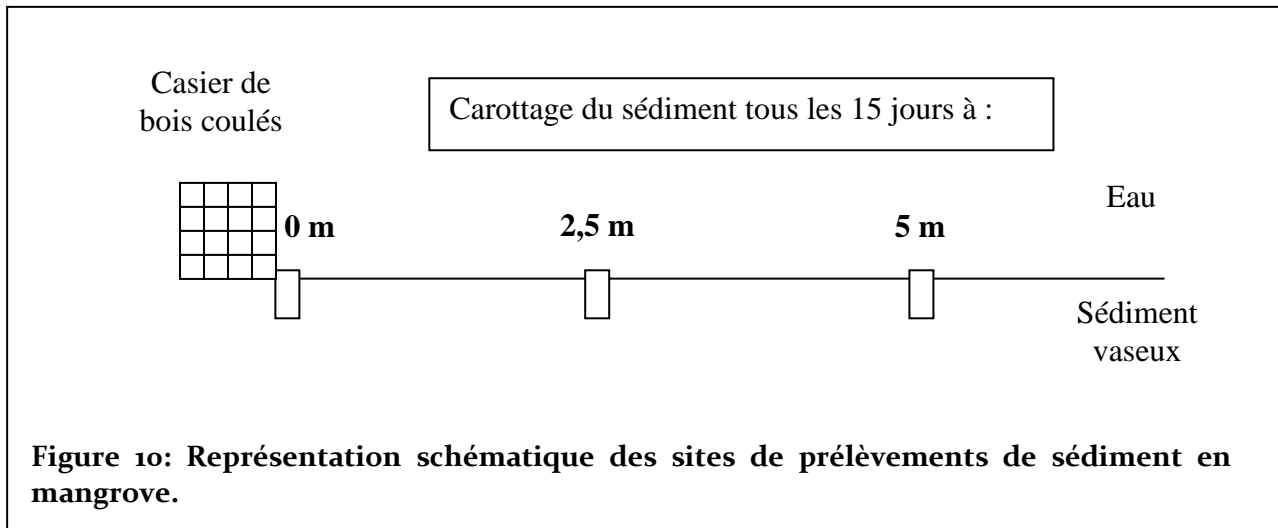
Les nématodes ont été regroupés selon les différents morphotypes recensés puis placés dans des capsules beem (taille 00) dont le culot a été découpé et remplacé par un bouchon troué contenant un morceau de tamis de 26 μ m d'arrête. Ce système de stockage permet de déplacer les organismes dans différentes solutions sans avoir à les manipuler individuellement au risque de les abîmer. Les échantillons sont conservés en eau de mer filtrée avant d'être analysés. Chacun des morphotypes observés a été pris en photographie entre lame et lamelle sur des individus vivants grâce à un microscope Nikon éclipse 80i doté d'une caméra LCD Nikon DXM 1200F reliée à un ordinateur équipé du logiciel de capture d'images ACT-1 de Nikon version 2.

Le bivalve *Codakia orbicularis* a été prélevé manuellement dans l'herbier à *Thalassia testudinum*. La branchie a été disséquée puis congelée avant d'être décongelée et maintenue en eau de mer pour son analyse en microspectrométrie Raman.

c. Echantillonnage en mangrove

Un tri des différents organismes colonisant les morceaux de bois prélevés (bois coulés expérimentalement et bois coulés naturellement) a été effectué à la loupe binoculaire (Nikon SMZ 800). Les organismes récupérés ont été placés dans des salières d'eau de mer avant d'être analysés. Le bivalve *Lucina pectinata* a été prélevé manuellement dans le sédiment de mangrove. La branchie a été disséquée puis congelée avant d'être décongelée et maintenue en eau de mer pour son analyse en microspectrométrie Raman.

Le casier de bois immergé sur le sédiment de mangrove est constitué de palmes de cocotier (monocotylédone) et de branchages de palétuvier (dicotylédone). Ces feuillages sont représentatifs du milieu tropical côtier, sont aussi retrouvés en grande profondeur par chalutage (Pailleret *et al.*, 2007ab). Afin de réaliser un suivi de l'impact du casier de bois sur la nématofaune, des prélèvements de sédiment, ont été effectués tous les 15 jours pendant 4 mois lors d'une première campagne d'échantillonnage menée en 2008 (de mars à juin). L'expérimentation a été effectuée à nouveau en 2009 (de janvier à février) pendant 1 mois ½ en immergeant un nouveau casier de bois sur le sédiment de mangrove. A l'aide d'un carottier de 10cm de diamètre sur environ 20cm de profondeur le sédiment vaseux a été prélevé au niveau du casier, à 2,5m puis à 5m (Fig. 10).



Afin d'évaluer la densité des nématodes à distance du casier, il est nécessaire de séparer les animaux du sédiment. L'extraction des nématodes d'un sédiment vaseux ou contenant une grande quantité de débris organiques est effectuée à partir d'une série de centrifugations dans une solution de silice colloïdale (Ludox TM50) (Heip *et al.*, 1985). L'ajustement de la densité du Ludox à celle des nématodes : 1,13 (Rzeznik-Orignac, 2004)) permet une suspension des nématodes dans la phase liquide et la précipitation du sédiment plus dense.

Environ 30ml de sédiment ont été placés dans un tube falcon de 50ml. Après 1heure de sédimentation lente à température ambiante, l'eau de mer en excès est éliminée et 20ml de formol 4% neutralisé est ajouté dans le tube. Les échantillons sont conservés à 4°C.

L'extraction des nématodes se déroule selon les étapes suivantes :

- Après avoir retiré le formol, le sédiment est lavé par ajout de 20ml d'eau distillée. Le tout est agité manuellement puis centrifugé 1 min à 2000g. (3 fois).
- A la fin du 3^{ème} bain de rinçage, l'eau distillée est remplacée par 15ml de Ludox préalablement ajusté à la densité de 1,13.
- Le tout est homogénéisé puis centrifugé 10min à 3000g.
- Le surnageant est ainsi récupéré dans un bécher, puis les nématodes sont prélevés à la pipette sous loupe binoculaire.
- Les nématodes sont placés dans une salière contenant de l'eau distillée et sont rapidement transférés dans du formol 4% pour l'étude taxonomique, afin d'éviter la déformation du nématode par choc osmotique.

2.2 Identification morphologique des nématodes

a. Préparation des nématodes pour l'étude taxonomique

Les nématodes extraits manuellement de l'herbier ou ceux récoltés en mangrove par centrifugation au ludox, et conservés dans une solution de formol 4% neutralisé sont ensuite transférés progressivement du formol au glycérol par une série de dilutions eau/éthanol/glycérol (réactifs de Seinhorst (1959)). La préparation au travers de ces mélanges réactifs vise à faire passer les nématodes dans la glycérine pure pour les conserver et rendre visible les détails de leur anatomie en évitant leur déformation corporelle.

- Les nématodes sont placés à l'aide d'une aiguille dans une salière contenant 5ml du réactif de Seinhorst 1 (eau distillée : 79% ; glycérol : 1% ; éthanol 95° : 20%) ;
- Les salières sont ensuite placées 48 heures dans une boîte hermétique contenant de l'éthanol 95° ;
- Après ce délai, les nématodes sont transférés à l'aide d'une aiguille dans une salière contenant du réactif de Seinhorst 2 (glycérol : 5% ; éthanol 95° : 95%) et soumis à évaporation lente à température ambiante pendant 72 heures ;
- Une fois le glycérol anhydre, les nématodes sont montés entre lames et lamelles dans du glycérol pur à raison de 10 spécimens par lames.

b. Détermination spécifique des nématodes

L'identification d'une espèce s'appuie sur l'observation:

- des caractères morphologiques externes : la structure de la cuticule, la forme de l'amphide et de la capsule buccale, le nombre de soies sensorielles et la forme de la queue ;
- des caractères internes : la cavité buccale, le tube digestif, les organes sensoriels et le système reproducteur (principalement la forme du spicule chez le mâle).

La détermination a été réalisée à l'aide d'un microscope équipé d'un objectif à immersion x100. Les caractères morphologiques et leur typologie sont regroupés dans le schéma suivant (Fig. 11). Les nématodes symbiotiques prélevés en herbier et en mangrove ont été identifiés en collaboration avec J. Rzeznik-Originac du Museum National d'Histoire Naturelle (MNHN) à partir des clés picturales de Platt & Warwick (1988), de Vincx (1986), de Urbancik *et al.* (1996ab).

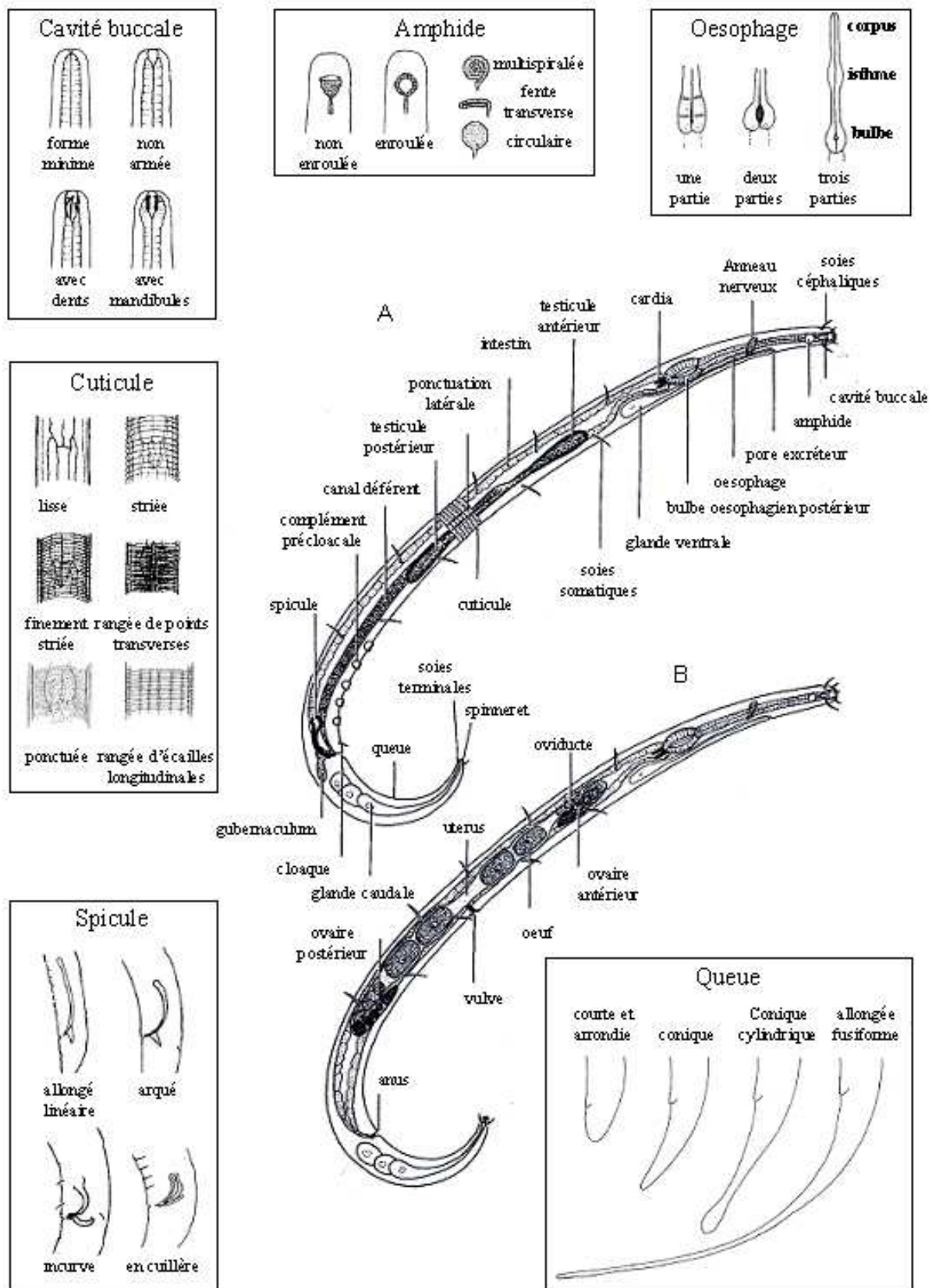


Figure 11: Anatomie générale des nématodes et caractères morphologiques sélectionnés pour l'identification des nématodes d'herbier et de mangrove (modifié d'après Platt & Warwick, 1988).

(A) Allure générale d'un nématode marin mâle en vue latérale. (B) Allure générale d'un nématode marin femelle en vue latérale.

En mangrove, la nématofaune a été étudiée à partir des prélèvements effectués en 2008 et 2009. Un prélèvement témoin dans le sédiment de la lagune de mangrove a été réalisé uniquement en 2009. Les organismes prélevés aux différentes stations ont été regroupés par morphotypes. Les identifications et l'étude des groupes trophiques de la nématofaune ont été réalisées en collaboration avec M. Vincx et T. Campinas Bezerra de l'Université de Ghent (Belgique) à l'aide des clés d'identification illustrées et des bases de données disponibles (Platt & Warwick, 1988 ; Vandepitte *et al.*, 2008) ainsi que des clés d'identification électroniques spécialement désignées pour les nématodes (Tarjan & Keppner, 1999 ; Deprez, 2006) site Nemys (Université de Gent). Deux dénominations des groupes trophiques ont été utilisées, l'une établit par Jensen (1987) et l'autre par Moens & Vincx (1997).

2.3 Description ultrastructurale des nématodes symbiotiques

a. Microscopie électronique à balayage (MEB)

- Fixation et déshydratation

Les nématodes ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2% tamponnée dans du cacodylate à 900 milliOsmoles pH 7,2 pendant 3 heures à 4°C, puis lavés 3 fois 10min en tampon cacodylate (900 milliOsmoles) à pH 7,2 avant d'être déshydratés par des bains successifs de 10min chacun d'acétone 30%, 50%, 70%, 95%, et 3 fois 100%.

- Observation

L'acétone est substitué par du CO₂ liquide avant que les échantillons soient desséchés à l'aide d'un point critique (Biorad, Polaron critical Point drier). Les échantillons sont ensuite fixés sur des supports en aluminium puis métallisés à l'or (Sputter Coater SC500, Biorad) afin de les rendre conducteurs. Ils sont observés à l'aide d'un microscope à balayage Hitachi S-2500 sous une tension d'accélération de 20kV.

b. Microscopie électronique à transmission (MET)

- Fixation et déshydratation

Les nématodes sont fixés 1 à 3 heures dans une solution de paraformaldéhyde 4% tamponnée dans une solution de cacodylate (900 milliOsmoles) à pH 7,2 ou tamponnée en eau de mer filtrée (0,22µm). Les animaux sont ensuite lavés 3 fois pendant 10min chacun à température ambiante dans du tampon cacodylate (900 milliOsmoles ; pH 7,2) ou dans de l'eau de mer filtrée en fonction de la solution de fixation utilisée puis déshydratés dans des bains successifs d'éthanol 30%, 50%, 70%, 95%, et 3 fois 100%.

- Substitution et inclusion

- Inclusion en paraffine

Les échantillons, une fois déshydratés, sont placés dans 3 bains successifs de xylène pendant 10min. Ces bains ont permis de substituer l'alcool, afin de permettre l'inclusion en paraffine. Les paniers contenant les nématodes sont ensuite placés dans une étuve maintenue à

65°C dans 3 bains successifs de paraffine liquide. Ensuite, les nématodes sont inclus en paraffine dans des moules en plastique souple pour faciliter le démoulage du bloc. Cette étape permet d'orienter les individus dans le bloc à l'aide d'une loupe binoculaire. Ce bloc est alors placé dans un nouveau bloc de paraffine plus gros coulé entre des barres de Leukart, afin de permettre sa découpe au microtome Leitz 1516. Des coupes de 5µm d'épaisseur sont réalisées et placées sur des lames préalablement silanisées.

Inclusion en résine LRWhite

Chacun des échantillons déshydratés à l'alcool est passé dans 4 bains successifs de 2 heures dans de la résine hydrophile LRWhite pure (Biovalley Inc.). Les échantillons sont alors transférés une nuit complète dans de la résine pure puis inclus dans des capsules beam 00 ou dans des moules en polyéthylène avec de la résine neuve. Les moules permettent une inclusion à plat et l'orientation des échantillons dans la résine sous la loupe binoculaire contrairement aux capsules Beem où les organismes sédimentent librement. Cette résine ne polymérise qu'en absence totale d'oxygène, les tubes sont donc placés dans une boîte à gants sous atmosphère contrôlée saturée en argon ($O_2 = 0,4$ ppm; $H_2O = 5,3$ ppm) et incubés à 50°C pendant 48 heures. Des coupes semi-fines (1µm) ou fines (60nm) sont réalisées sur les blocs de résine à l'aide d'un ultra-microtome Ultracut E (Reichert) et placées sur des lames silanisées.

○ Observation

Les coupes fines sont contrastées 30min dans de l'acétate d'uranyl à 2% en solution aqueuse puis 10min en citrate de plomb. Elles sont ensuite examinées avec le microscope LEO 912 TEM (Philips 201) actionné à 75kV.

Remarque : Les coupes semi-fines sont utilisées pour les expériences d'hybridations moléculaires et la coloration histologique.

c. Coloration histologique

Sur les coupes semi-fines obtenues à partir des blocs d'inclusion en résine LRWhite (voir § MET), une coloration histologique au bleu de toluidine à 0,5% dans du tampon borax à 1% est réalisée.

2.4 Caractérisation analytique des symbiotes

a. Spectroscopie des pertes d'énergie d'électrons (EELS)

- Principe et mécanisme

Lorsqu'un faisceau d'électrons traverse un échantillon il interagit avec celui-ci de deux manières : soit l'interaction est élastique, c'est-à-dire sans perte d'énergie, soit elle est inélastique, c'est-à-dire avec perte d'énergie pour les électrons incidents. Lorsqu'un électron interagit de manière inélastique, l'atome avec lequel a eu lieu l'échange absorbe une certaine quantité de cette énergie et donc passe à un état excité, quant à l'électron il perd cette énergie, cette diminution correspond aux états d'excitation des atomes du matériau traversé, elle est donc caractéristique et permet une identification des éléments composant l'échantillon.

La spectrométrie de pertes d'énergie d'électrons associée à la microscopie électronique en transmission est basée sur une analyse de la distribution en énergie des électrons qui ont interagi inélastiquement à la traversée de l'échantillon.

- Application

Lors de l'analyse des coupes fines en MET, des spectres EELS ont été acquis sur les vésicules des bactéries symbiotiques associées aux nématodes. Le microscope à transmission LEO 912 est équipé d'un spectromètre sur colonne [magnetic omega-type electron energy-loss filter (Egerton, 1986 ; Crozier, 1995)]. Les spectres de perte d'énergie sont enregistrés avec une camera [cooled slow-scan CCD (charged-coupled device)] en mode 14bit. Le filtre Omega a été ajusté pour obtenir une énergie de résolution de 1,5eV.

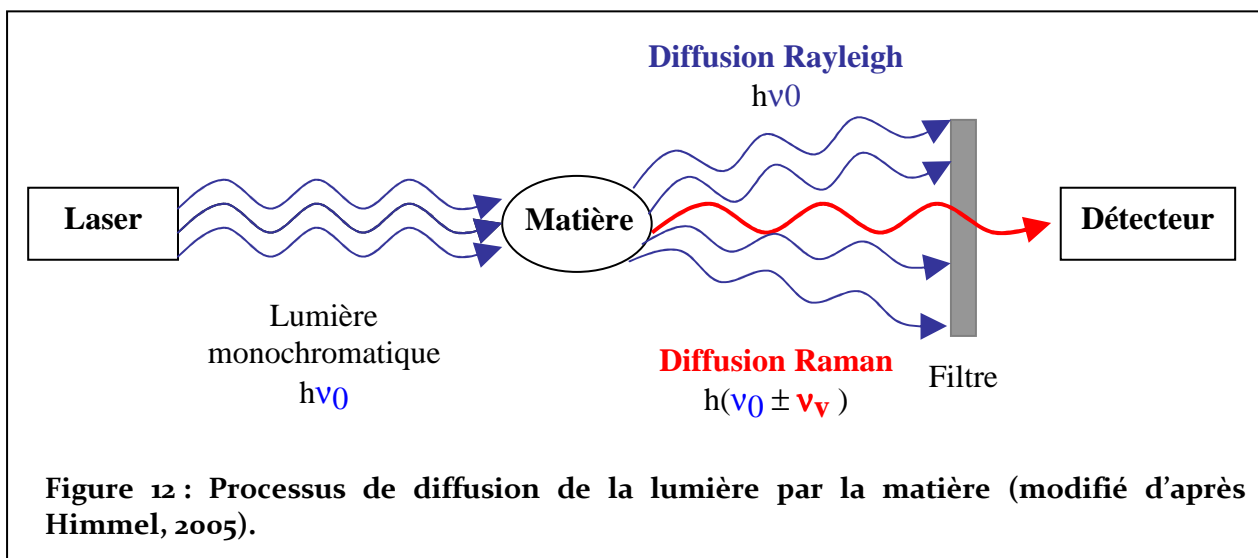
b. Microspectrométrie Raman

- Principe

La spectrométrie Raman est basée sur le processus inélastique de l'interaction de la lumière avec la matière. En éclairant un échantillon au moyen d'un rayonnement monochromatique (faisceau laser), la quasi-totalité des photons constituant le faisceau lumineux est réémise sans interaction avec la matière. Cependant, une petite quantité de ces photons rentre en interaction avec la matière et est diffusée dans toutes les directions de

l'espace. Dans cette fraction de particules d'énergie lumineuse, la majorité des photons sont émis à la même fréquence que le rayonnement incident et constituent la diffusion Rayleigh.

Pour seulement une infime partie (moins de $1/1000000^{\text{ème}}$) de ces photons diffusés, un changement de fréquence résultant d'un échange d'énergie entre les photons et la matière est observé lequel constitue la diffusion Raman. La diffusion Raman est très faible comparée à la diffusion Rayleigh et à la diffusion de fluorescence. Elle s'est avérée difficilement utilisable jusqu'au développement de sources laser puissantes et de filtres holographiques très sélectifs (filtre Notch) permettant de supprimer le fort signal de diffusion Rayleigh. (Fig. 12)



- Mécanisme

Le mode d'acquisition d'une image spectroscopique consiste en l'acquisition de spectres Raman point par point. Cette technique nous permet d'avoir le suivi d'un élément en 3 dimensions (x, y, z). Chacun des éléments de l'image de coordonnées (x, y) sera appelé Spixel (pixel spectroscopique). Selon l'information recherchée, les spectres images seront analysés et traités afin d'obtenir une distribution de l'élément recherché (dans notre étude, le soufre élémentaire S₈) (Fig. 13).

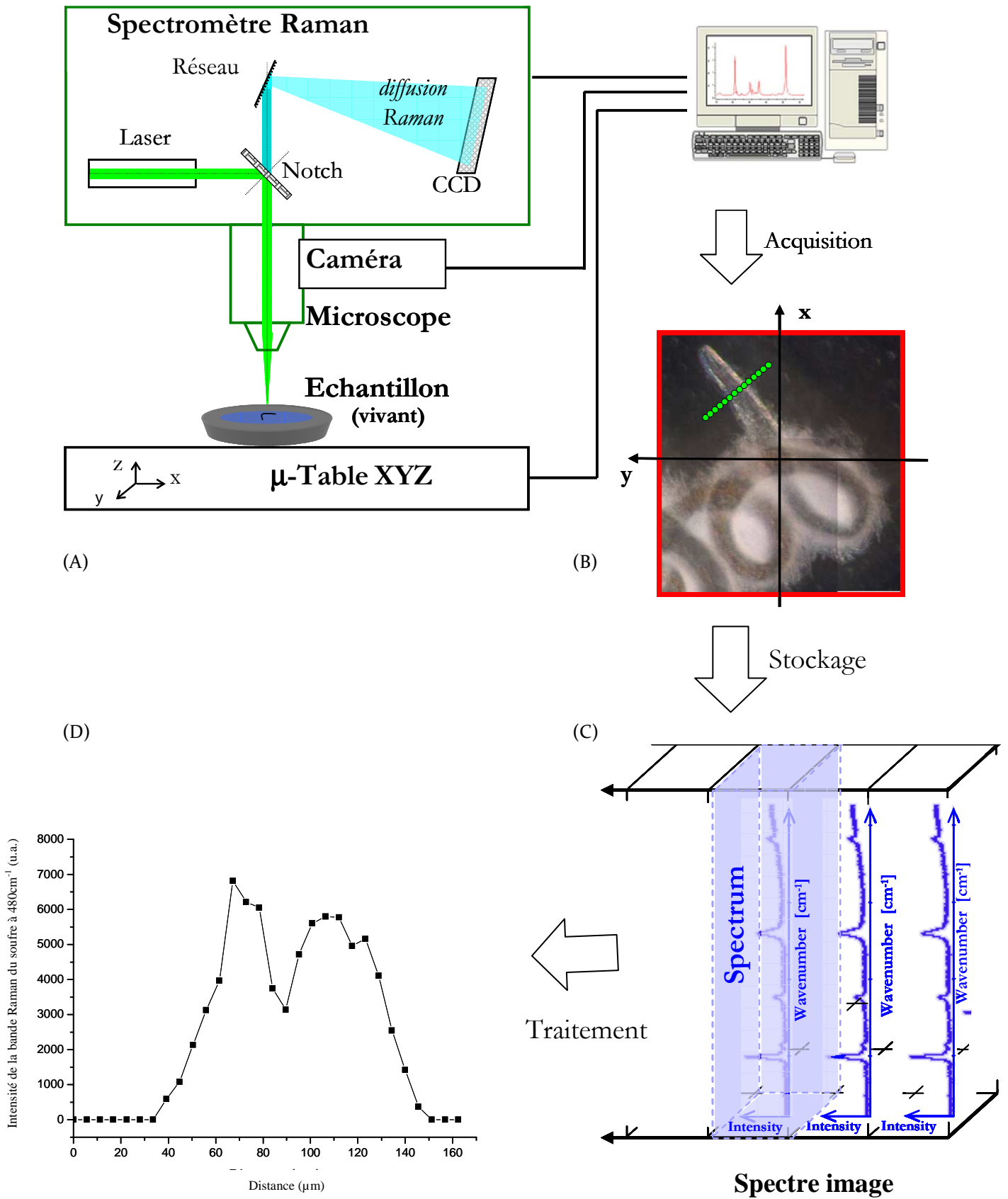


Figure 13 : Dispositif du système d’acquisition des spectres images, de stockage et de traitement des données (modifié d’après Himmel, 2005).

- (A) Microscope optique couplé au spectromètre Raman permettant de choisir la position du laser sur l'échantillon. Le contrôle et l'acquisition des données sont informatisés.
- (B) Image en microscopie optique du contact entre la sonde raman et le nématode. Les points représentent les différents points d'analyse permettant la constitution du spectre image.
- (C) Représentation d'un spectre image dans laquelle chaque élément appelé Spixel est un spectre du point de coordonnée (x,y).
- (D) Distribution de l'intensité d'une bande Raman caractéristique du soufre, en fonction de la distance d'analyse, extrait par traitement approprié du spectre image.
-

○ Application

Les organismes ont été analysés soit à partir d'individus :

- vivants et déposés sur du ruban adhésif ou dans une lame creuse contenant de l'eau de mer filtrée (0,22 μ m) ;
- fixés en glutaraldéhyde 2% en eau de mer filtrée (0,22 μ m) pendant 1heure maximum à température ambiante et lavés 3 fois en eau de mer avant l'analyse ;
- congelés puis maintenus en eau de mer filtrée (0,22 μ m) après décongélation.

Les spectres Raman ont été acquis à l'aide d'un Spectromètre HR800 HORIBA (Jobin Yvon Microspectrometer) associé à un microscope optique confocal. Un rayonnement monochromatique de longueur d'onde égal à 532nm a été émis à 50mW par un laser NdYAG solid (Spectra-Physics Millennia Pro 5 sJS). L'objectif 10x du microscope a été utilisé afin de faire la mise au point sur l'échantillon et de cibler le point d'analyse du laser dont la sonde a un diamètre de 10 μ m. La puissance du laser a été fixée de 20mW à 40mW et le temps d'acquisition a été de 5s à 30s maximum en fonction des analyses. Un réseau de 300 tr/mm et de 600 tr/mm a été utilisé permettant d'enregistrer chaque acquisition spectrale dans une gamme de nombre d'ondes allant de 0 cm^{-1} à 1720 cm^{-1} . La fente d'entrée du spectromètre était de 500 μ m permettant une résolution de 1,5 cm^{-1} . Le diamètre du trou confocal était de 500 μ m permettant d'obtenir une longueur de sonde de 400 μ m bien adaptée au diamètre de l'échantillon analysé. Lors de l'analyse, l'échantillon a été maintenu en eau de mer filtrée (0,22 μ m) afin d'éviter la surchauffe de l'animal par l'énergie lumineuse produite par le laser. Les spectres images sont acquis avec un pas selon x et y de 5,6 μ m (Tab. 5).

Longueur d'onde de l'excitatrice	532nm
Puissance utilisée	20mV
Temps d'acquisition maximum	30s
Pas d'acquisition des spectres images	5,6 μ m

Tableau 5 : Conditions d'acquisition des spectres images utilisés.

Des spectres « témoins positifs » ont été enregistrés sur des cristaux de soufre pur. Des spectres « témoins négatifs » ont été acquis dans l'eau de mer dans laquelle les organismes sont maintenus pendant l'analyse.

2.5 Etude moléculaire de l'association symbiotique

a. Hybridations moléculaires *in situ* (FISH et Card-FISH)

- Caractérisation des symbiotes

FISH : Fluorescence *in situ* hybridization

Cette technique permet de détecter des séquences d'ARN ribosomal 16S ou 18S par hybridation de sondes nucléotidiques spécifiques marquées par un fluorochrome. L'ARNr 16S ou 18S ainsi marqué émet un signal détectable par microscopie à fluorescence.

Les hybridations moléculaires ont été réalisées sur des coupes de 5 μ m d'épaisseur à partir des nématodes inclus en paraffine.

Les échantillons ont été traités selon le protocole du FISH proposé par Amann *et al.*, (2001). Cette manipulation consiste, tout d'abord, à supprimer la paraffine hydrophobe en la faisant fondre sur une plaque chauffante puis en plaçant les lames dans 3 bains successifs de toluène. Les échantillons sont ensuite réhydratés par une série décroissante d'éthanol puis sont rincés dans l'eau distillée. L'étape suivante consiste à perméabiliser les membranes des échantillons par traitement chimique à l'aide de bains successifs d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,2M pendant 12min à température ambiante. Ces mêmes échantillons sont ensuite rincés 10min dans un bain de tampon Tris-HCl 20mM. Les lames sont ensuite placées dans un bain de Tris-HCl (20mM) + Protéinase K à 0,5 μ g/mL à 37°C (à l'étuve) pendant 5min puis rincées dans le tampon Tris-HCl (20mM) pendant 10min.

Après avoir rincé les échantillons à l'eau distillée, les lames sont séchées à l'air libre. Les sondes (50ng/ μ L) marquées par le fluorochrome sont mélangées au tampon d'hybridation à 1 :15 (Annexe 1) et sont ensuite hybridées sur le brin d'ARNr (30 μ l par coupe) pendant 3 heures à 46°C (à l'étuve) en chambre humide. Les sondes sont lavées à l'aide d'un tampon de lavage (20% Formamide – Annexe 1) à 48°C (au bain-marie) dans un premier bain pendant quelques secondes puis dans un second pendant 15min. Les lames sont rincées à l'eau distillée puis séchées à l'air libre. Le marquage est détecté par microscopie à fluorescence après avoir monté les coupes entre lames et lamelles.

Lors de l'hybridation, le fluorochrome utilisé est la Cyanine3. Excité à λ_{max} 550nm, il émet une fluorescence orange à λ_{max} 570nm. Deux sondes ont été testées sur l'ARNr des symbiotes bactériens : la sonde universelle des eubactéries (EUB338) et la sonde spécifique

des γ -protéobactéries (GAM42a). La sonde NON 338 a été utilisée comme témoin négatif d'hybridation.

Sondes	Spécificité	Séquences (5' → 3')	Position	Références
EUB338	Eubactéries	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	338-355	Amann <i>et al.</i> , 1990
GAM42a	γ -protéobactéries	GCC TTC CCA CAT CGT TT	1027-1043	Manz <i>et al.</i> , 1992
NON338	Témoin négatif	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	338-355	Giovannoni <i>et al.</i> , 1988

Card-FISH: Fluorescence *in situ* hybridization with Catalyzed Reporter Deposition

Cette technique permet de détecter l'ARNr 16S des bactéries avec une sonde spécifique marquée par une horseradish peroxidase (HRP) sur laquelle plusieurs fluorochromes vont pouvoir se fixer.

Les hybridations moléculaires ont été effectuées sur des coupes semi-fines (1 μ m) obtenues à partir des blocs d'inclusion en résine LRWhite (§ 2.3b).

Les échantillons ont été traités selon le protocole de Pernthaler *et al.* (2002). L'inclusion en résine ne nécessite pas de pré-traitement des échantillons. La manipulation débute directement par l'étape de perméabilisation des membranes des échantillons par un traitement chimique identique à celui utilisé en FISH. Après le premier séchage à l'air libre, les peroxydases endogènes sont inactivées par des bains successifs à température ambiante de HCl 0,01M pendant 10min et de PBS (Phosphate Buffered Saline) 1X pendant 1min. Une digestion enzymatique est ensuite réalisée en chambre humide à l'aide de lysozyme (10mg/mL) dans du tampon TE (Tris-HCl 1M +EDTA 0,5M) pendant 1 heure à température ambiante. L'excédent est éliminé puis les sondes (0,5ng/ μ L) marquées par la HRP sont mélangées au tampon d'hybridation (Annexe 2) à 1 : 150 et sont ensuite hybridées sur le brin d'ARNr pendant 2 à 3 heures à 46°C (à l'étuve) en chambre humide. Les sondes non liées sont lavées à l'aide d'un tampon de lavage (50% Formamide – Annexe 2) pendant 10min à 48°C (au bain-marie) puis 15min dans du PBS 1X à température ambiante. Le signal de la HRP est alors amplifié à l'aide d'un fluorochrome le Tyramide-FITC. Un mix d'amplification, constitué de 1000 μ l de tampon d'amplification (Annexe 2) + 10 μ l de H₂O₂ dilué (1 μ l de H₂O₂ pur + 199 μ l de PBS 1X) + 2 μ l de FITC, est déposé sur les lames qui sont placées en chambre humide à 37°C (à l'étuve) pendant 15min. Les lames sont ensuite lavées dans une solution de PBS 1X pendant 10min à température ambiante puis elles sont transférées 1min dans de l'eau distillée et passée rapidement en éthanol 95%. Le marquage est détecté par microscopie à fluorescence.

Le fluorochrome utilisé (Tyramide-FITC) excité à λ_{\max} 494nm, émet une fluorescence verte à λ_{\max} 518nm. Une sonde a été testée sur l'ARNr des symbiotes bactériens : la sonde universelle des eubactéries (HRP-EUB338).

Remarque : Un mélange Dakocytomation-DAPI (3 :1) est utilisé comme milieu de montage entre lame et lamelle afin d'augmenter les contrastes de la fluorescence. Le DAPI permet de mettre en évidence l'ADN eucaryote des nématodes mais aussi celui des bactéries, ce qui est une étape préalable dans l'observation des symbioses extracellulaires et endocellulaires. Ces observations au DAPI permettent de confirmer ou infirmer la présence d'une autofluorescence des individus observés et de la conservation des ribosomes lors de la manipulation à chaud des coupes.

○ Identification moléculaire des nématodes hôtes

Des amorces spécifiques 18S ont été dessinées par T. Brissac (UMR 7138) à partir des séquences GenBank de Kampfer *et al.* (1998) pour les nématodes du genre *Stilbonema* et Bayer *et al.* (2009) pour les nématodes du genre *Robbea*.

Sondes	Locus GenBank	Séquences (5' → 3')	Position
18S <i>Robbea</i> sp.1 spécifique	EU768870 (1769pb)	CCG GTC TGT ATG ATG TAC ATG	665-685
18S <i>Robbea</i> sp.2 spécifique	EU768871 (1745pb)	CTC GGT CCG TCT CGA GGA CGT GCA CC	664-689
18S <i>Robbea</i> sp.3 spécifique	EU784735 (1773pb)	AAA GAT TCA CCC ACT GGT CTG G	697-718
18S <i>Stilbonema</i> <i>majum</i> spécifique	Y16922 (1824pb)	TCA GTT TCG GCC GTT CGG A	1702-1720

L'hybridation en FISH s'est déroulée selon le même protocole FISH décrit précédemment, mais sur des coupes de nématodes inclus en résine LRWhite (pas de traitement préalable des lames).

b. Analyses des séquences de gène d'ARNr 18S et 16S

- Techniques d'extractions d'ADN total

ADN eucaryotique

L'extraction a été effectuée à l'aide du Kit DNeasy – Animal blood and tissues (QIAGEN). Annexe 3

Environ 10 nématodes stockés préalablement en eau de mer filtrée (0,22 μ m) à -80°C sont placés dans un tube eppendorf (1,5ml) contenant 180 μ l de tampon ATL à l'aide d'une aiguille. Après ajout de 20 μ l de Proteinase K (600MAU/ml), le tube est mis à incuber à 56°C pendant une nuit. Ensuite un mélange contenant 200 μ l de tampon AL et 200 μ l d'éthanol absolu est ajouté dans le tube. Après avoir vortexé l'ensemble, le mélange est filtré sur une colonne (DNeasy Mini spin column) et centrifugé 1min à 6000g. La solution récupérée est éliminée et 500 μ l de tampon AW1 sont filtrés puis centrifugés 1min à 6000g. 50 μ l de tampon AW2 sont ensuite filtrés et centrifugés 3min à 20000g. L'ADN collecté sur le filtre est ensuite élué par ajout de 100 μ l de tampon AE et centrifugé 1min à 6000g. Cette dernière étape est répétée 2 fois.

ADN procaryotique

De nombreux protocoles ont été testés afin d'extraire l'ADNr 16S des bactéries associée aux nématodes. Chaque essai a été effectué sur une quantité d'environ 10 nématodes afin de d'identifier phylogénétiquement les symbiotes des nématodes prélevés.

Les techniques testées sont :

➤ **Extraction au phénol/chloroforme** : les nématodes sont placés dans 200 μ l de tampon de lyse (NaCl 100mM, Tris-HCl 100mM, EDTA 50mM) à pH 8. 50 μ l de tampon TES (SDS à 2% dans du tampon Tris-EDTA (TE) pH 8) sont ajoutés et l'ensemble est placé 15min sur un lit de glace. 100 μ l de protéinase K (200 μ g/ml) mélangés à du tampon TE pH 8 sont ajoutés et le mélange est placé à 37°C au bain-marie pour la nuit. 600 μ l d'une solution de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1) sont ajoutés et après un mélange léger par inversion de phase, la solution émulsionnée est centrifugée 1min à 10000g. La phase aqueuse supérieure est récupérée et la centrifugation est renouvelée 2 fois après ajout d'une solution de chloroforme-alcool isoamylique (24 :1). 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3M est ajouté

au volume de la dernière phase aqueuse récupérée. Après homogénéisation, 2 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C) sont ajoutés et l'ADN est laissé à précipiter une nuit à -20°C. Le mélange est ensuite centrifugé 10min à 10000g à 4°C. Le culot est rincé avec l'éthanol 70% froid et centrifugé dans les mêmes conditions. Le culot est alors soumis à évaporation à l'étuve à 50°C. L'ADN est remis en suspension dans 100µl d'eau stérile et placé une nuit à 55°C pour permettre la dissolution complète de celui-ci.

➤ **Extraction E.Z.N.A. Bacterial DNA kit** (Omega Bio-Tek). (Annexe 4): les nématodes sont transférés dans 100µl de tampon TE avec 100µl de lysozyme (100mg/ml). Ils sont incubés 20min à 30°C puis centrifugés 5min à 4000g à température ambiante. Les nématodes sont ensuite re-suspendus dans 200µl de tampon BTL. 25µl de protéinase K sont ajoutés et le tout est vortexé. Après incubation au bain-marie à 55°C pendant 1 heure, 220µl de tampon BDL sont ajoutés puis incubés à 70°C (à l'étuve) pendant 10min. 200µl d'éthanol absolu sont ajoutés et le tout est vortexé. Le volume total est ensuite filtré sur une colonne (HiBind DNA spin-column) et centrifugé 1min à 8000g. La solution récupérée est éliminée et 750µl de tampon DNA Wash Buffer dilués avec de l'éthanol sont filtrés puis centrifugés 1min à 8000g. Cette étape est répétée 2 fois. Après avoir éliminée la solution, le filtre est à nouveau centrifugé 2min à 10000g. L'ADN est ensuite collecté par élution du filtre grâce à l'ajout de 100µl d'eau stérile préchauffée à 70°C et centrifugé 1min à 8000g. Cette dernière étape est répétée 2 fois.

➤ **Extraction rapide « O'NEILL »** adapté du protocole proposé par O'Neill *et al.* (1992). Les nématodes stockés à -80°C sont mélangés à 50µl de solution STE (NaCl 100mM, Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM) ajustés à pH 8 contenant 3µl de protéinase K (10mg/ml). Le mélange est ensuite placé 4 heures ou une nuit complète au bain-marie à 55°C puis 10min à 100°C pour inactiver l'action de la protéinase K. Le tout est centrifugé 2min à 20000g à 4°C. 20µl du surnageant sont transférés dans un eppendorf stérile avant d'être utilisés pour la PCR.

➤ **Extraction au CTAB** modifiée d'après Murray & Thompson (1980). Dans un eppendorf (1,5ml) sont transférés les nématodes et 600µl de CTAB préalablement chauffés à 60°C. 2µl de β-mercapto-éthanol sont ajoutés puis 4µl de protéinase K (15mg/ml). Le mélange est incubé la nuit complète au bain-marie à 60°C. 4µl de protéinase K sont à nouveau ajoutés, le mélange est vortexé et incubé encore 1heure à 60°C. Ensuite l'eppendorf est placé 10min sur un lit de glace. La suite du protocole est identique à celui de l'extraction au phénol-

chloroforme à partir de l'ajout des 600µl de phénol- chloroforme-alcool isoamylique (25 :24 :1).

- Amplification par « Polymerase Chain Reaction » (PCR)

L'ADNr 18S et 16S sont amplifiés par PCR (Saiki *et al.*, 1988) dans 20µl par échantillon d'une solution de réaction. Le mix d'amplification est constitué de :

Solutions	Concentrations	Volumes (µl)
Tampon de réaction	10X	1,5
MgCl ₂	20mM	1
dNTPs	2,5mM	2
BSA	20mg/ml	0,5
Amorce Forward	10pmoles/µl	1,5
Amorce Reverse	10pmoles/µl	1,5
Taq Polymerase	5u/µl	0,3
Eau distillée		11,7
Total mix		20

Les amorces utilisées pour l'amplification de l'ADNr 16S des symbiotes sont : 27f et 1492r et pour l'amplification de l'ADNr 18S des nématodes: 1f et BIR.

Amorces	Spécificité	Séquence (5' → 3')	Position
27f	ADNr 16S	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	27-46
1492r	ADNr 16S	TAC GGH TAC CTT GTT ACG ACT T	1471-1492
1f	ADNr 18S	CCG CAG CTA GGA ATA ATG GAA T	1-22
(1320) BIR	ADNr 18S	GAG TCT CGT TCG TTA TCG GA	1301-1320

A cette solution d'amplification sont ajoutés 5µl d'ADN extrait comme décrit précédemment. Le tout est amplifié à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp PCR system 2700 dans les conditions suivantes :

Etapes	Températures (°C)	Temps (min)
Dénaturation initiale	94	10
Dénaturation	94	1
Appariement des amorces	44	1
Elongation	72	2
Elongation finale	72	10
Conservation	4	∞

} 35 cycles

Les produits PCR obtenus sont conservés à 4°C avant d'être utilisés pour l'électrophorèse sur gel d'agarose.

Des témoins positifs sont obtenus à partir d'une extraction d'ADN eucaryotique (Kit DNeasy – Animal blood and tissues) d'une partie du manteau de *Codakia orbicularis* et d'une extraction d'ADN procaryotique (phénol/chloroforme) d'un morceau de branchie disséqué de ce même bivalve. Le témoin négatif utilisé est de l'eau distillée.

○ Migration par électrophorèse sur gel d'agarose

Un gel d'agarose à 1% dans du tampon TAE (Tris 4,84g/l ; Acide acétique glacial 1,15ml/l ; EDTA 0,372g/l) est coulé dans l'électrophorèse. Chacun des produits PCR (12µl) sont mis à migrer (100V) sur le gel avec 3µl de Bleu-Orange 6X Loading Dye (Annexe 5), la cuve à électrophorèse étant remplie de tampon TAE 1X. Le marqueur de quantification utilisé est le Smart Ladder de 200 à 10000pb (Eurogentec) dont 5µl sont déposés sur le gel de migration. Après la migration le gel est déposé dans une solution de TAE + Bet (Bromure d'éthidium) pendant 30min. Le gel est ensuite révélé sous rayons ultraviolets à l'aide du lecteur Gel Doc XR+ system (BIO-RAD) équipé d'une caméra CDD reliée à un ordinateur. L'acquisition des images est obtenue par le logiciel « Quantity one » et la quantité d'ADN est estimée visuellement en comparaison avec le marqueur.

2.6 Etude de la nématofaune de mangrove par calcul d'indices écologiques

La dynamique de la nématofaune dans le sédiment de mangrove a été analysée afin de mettre en évidence une stabilité ou, au contraire, une évolution de la communauté en fonction des émissions de sulfures produites lors de la dégradation des bois coulés. Grâce aux indices statistiques écologiques, nous pourrions constater si la répartition de la nématofaune se traduit par des remaniements quantitatifs (abondances d'espèces et de groupes trophiques) ou par des changements dans la biodiversité (apparition ou/et disparition d'espèces ou de groupes fonctionnels). Cette étude sera effectuée pour les prélèvements effectués en 2008 (mars-avril) et 2009 (janvier-février). Les résultats seront comparés afin de mettre en évidence une dynamique des peuplements dans le sédiment de mangrove ou de constater certaines variations écologiques dans le temps.

a. Définition des indices statistiques utilisés

- Indice d'abondance (A)

Cet indice correspond à la quantité relative au nombre d'individus d'une espèce donnée par unité de surface ou de volume par rapport à leur nombre total.

$$A = N_i / N$$

N_i : nombre d'individus d'une espèce donnée, i allant de 1 à S (nombre total d'espèces).

N : nombre total d'individus.

- Richesse spécifique

La richesse spécifique totale correspond au nombre total d'espèces présentes dans un biotope ou une station donnée.

- Indice de diversité

Indice de Shannon-Weaver (H')

$$H' = - \sum ((N_i / N) * \log_2(N_i / N))$$

H' est minimal (=0) si tous les individus du peuplement appartiennent à une seule et même espèce, H' est également minimal si dans un peuplement chaque espèce est représentée par un seul individu, excepté une espèce qui est représentée par tous les autres individus du peuplement. L'indice est maximal quand tous les individus sont répartis d'une façon égale sur toutes les espèces (Frontier, 1983).

Indice de Piélou (J)

L'indice de Shannon est souvent accompagné de l'indice d'équitabilité J de Piélou, appelé également indice d'équirépartition (Blondel, 1979), qui représente le rapport de H' à l'indice maximal théorique dans le peuplement (Hmax).

$$J = H' / \log_2 S$$

Cet indice peut varier de 0 à 1, il est maximal quand les espèces ont des abondances identiques dans le peuplement et il est minimal quand une seule espèce domine tout le peuplement. Insensible à la richesse spécifique, il est très utile pour comparer les dominances potentielles entre stations ou entre dates d'échantillonnage.

b. Application

La nématofaune du sédiment de mangrove a été prélevée au niveau du casier de bois, à 2,5m puis à 5m de distance de celui-ci (§ 2.1c) lors d'une première campagne d'échantillonnage en 2008 (mars-avril) puis une seconde fois en 2009 (janvier-février). Un échantillon de sédiment témoin a été prélevé dans la lagune afin de déterminer la nématofaune de base rencontrée dans ce milieu. Suite à l'extraction des nématodes par série de centrifugations au ludox, les nématodes sont montés entre lames et lamelles dans du glycérol pur. L'observation de l'ensemble des nématodes a permis de recenser les morphotypes les plus fréquemment rencontrés et de les identifier (Vincx & Bezerra-Campinas – Université de Ghent) jusqu'au genre pour la plupart. La détermination de leur groupe trophique a aussi été effectuée et classée selon deux catégories établies par Jensen (1987) et Moens & Vincx (1997). A partir du recensement du nombre d'individus par morphotype et par groupe trophique, les indices statistiques écologiques ont pu être calculés.

2.7 Analyse des facteurs abiotiques

Afin d'analyser les facteurs abiotiques des milieux d'études, des enregistreurs autonomes SPHT (MICREL) ont été utilisés (Fig. 14). Ils permettent de mesurer *in situ* et en continu le pH et le potentiel sulfidique. Après traitement des données (effectué par N. LeBris – IFREMER Brest) la concentration en hydrogène sulfureux [H₂S] est obtenue et permet un suivi de ce composé dans le sédiment.

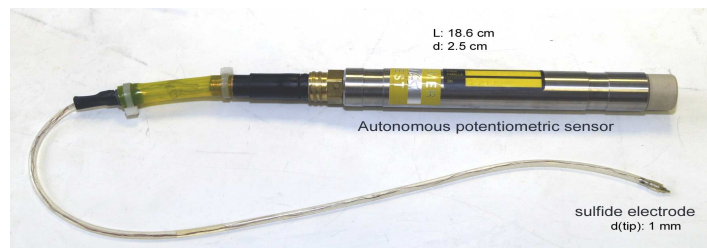


Figure 14 : Micro-capteur autonome.

a. Protocole expérimental

- Sédiment sablo-calcaire de l'herbier à *Thalassia testudinum*

Une carotte de 15cm de diamètre sur 25cm de profondeur a été prélevée. Les capteurs n'ont pas pu être placés directement sur la carotte en raison d'un sédiment trop compact et riche en débris durs (coquilles, etc.) qui risquaient d'abîmer les sondes en verre. L'eau interstitielle du sédiment a donc été récupérée à l'aide d'une seringue à différentes profondeurs : 2cm, 5cm puis 10cm (Fig. 15). Les capteurs ont ensuite été immergés dans l'eau prélevée afin d'acquérir les données.



Figure 15 : Prélèvement d'eau interstitielle dans une carotte de sédiment d'herbier.

- Sédiment vaseux de mangrove

Un casier de bois est immergé à 1,5m de profondeur sur le sédiment vaseux de mangrove. Le sédiment de mangrove beaucoup plus souple et vaseux a permis l'acquisition *in situ* des paramètres abiotiques. Cependant, il a fallu trouver un moyen de ne pas perturber le sédiment lors du déplacement des sondes afin d'avoir un profil exact de la répartition des sulfures dans le sédiment en fonction de l'éloignement du casier et de la profondeur. Une potence manuelle a donc été fabriquée à partir d'un simple schéma (Annexe 6) afin de pouvoir déplacer les capteurs horizontalement et verticalement en limitant au maximum les perturbations.

Utilisées dans de l'eau de mangrove salée, les parties immergées devaient être inoxydables et les poulies permettant le déplacement des capteurs devaient être accessibles à partir du bateau (Figs. 16 & 17).

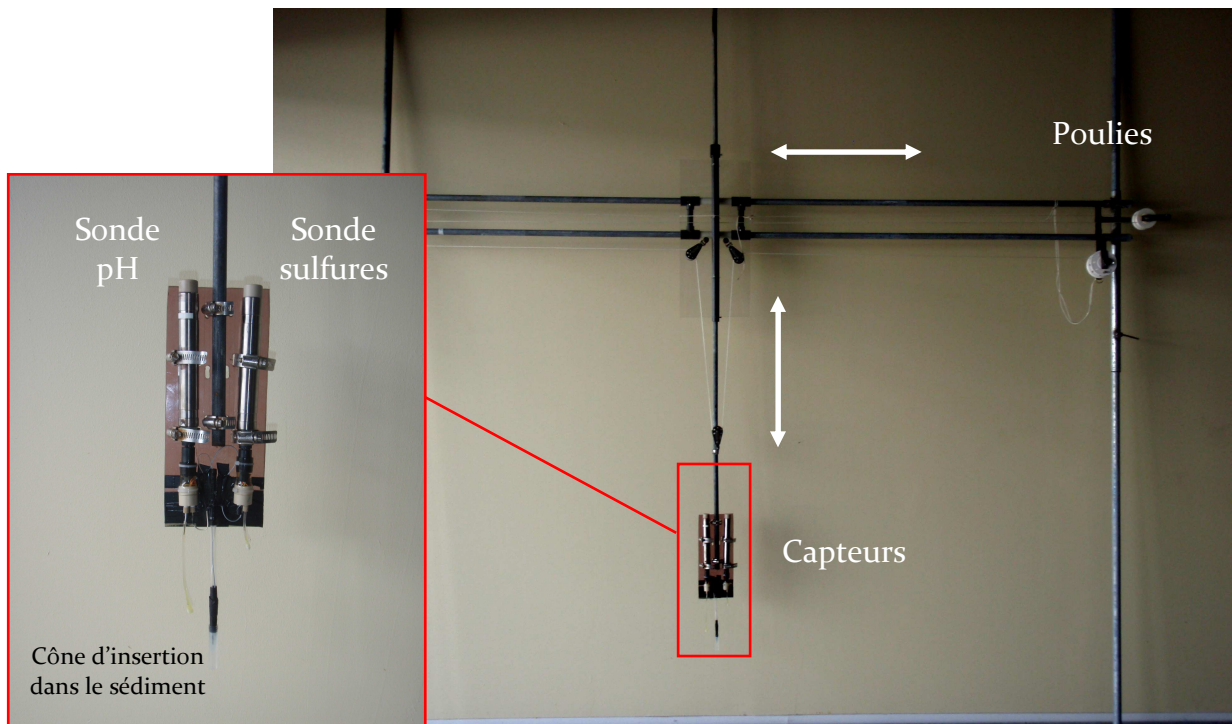


Figure 16: Descriptif de la potence hors de l'eau avec un agrandissement de la zone de fixation des capteurs.

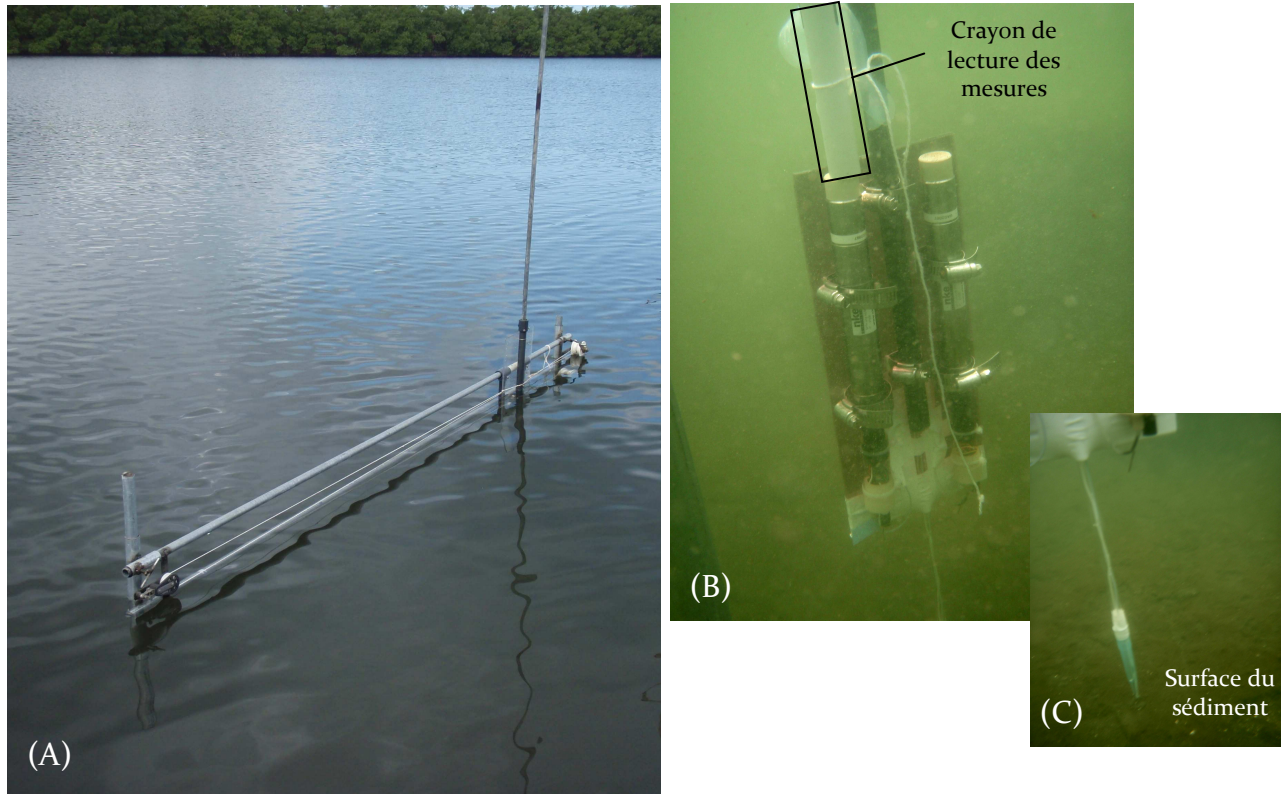


Figure 17 : Dispositif de mesures physico-chimiques installé en mangrove.

(A) Potence immergée en mangrove. Les poulies de déplacement des sondes sont accessibles hors de l'eau.

(B) Capteurs immergés sur le support de la potence et positionnement *in situ* du crayon de lecture des mesures pour l'acquisition en temps réel des données.

(C) Approche des sondes en surface du sédiment.

b. Acquisition et traitement des données

L'acquisition des données a été effectuée au niveau du casier, à 1m, 2m puis à 5m et tous les 15 jours pendant 1 mois $\frac{1}{2}$. Une analyse en profondeur dans le sédiment a aussi été menée, en surface du sédiment, à 1 cm, 2cm, 5cm puis 10cm (Fig. 18). Le choix de limiter l'analyse en profondeur à 10cm est soutenu par le fait que les nématodes et la méiofaune en général ne s'enfoncent pas plus profondément dans le sédiment, les conditions étant trop anoxiques (Nicholas *et al.*, 1991 ; Nicholas, 2001). De plus, il a été jugé que la quantité de bois dans le casier ne pourrait émettre des sulfures lors de sa dégradation et avoir une influence sur la nématofaune que sur une distance de 5m, sachant qu'une carcasse de baleine a un impact sur 30m de distance (Debenham *et al.*, 2004). Cette expérimentation a été menée en parallèle des prélèvements de sédiment de 2008 pour l'analyse de la répartition de la

nématofaune (§échantillonnage en mangrove) afin de mettre en évidence l'impact des émissions de sulfures dans le sédiment par la dégradation du bois coulé sur la répartition de la nématofaune.

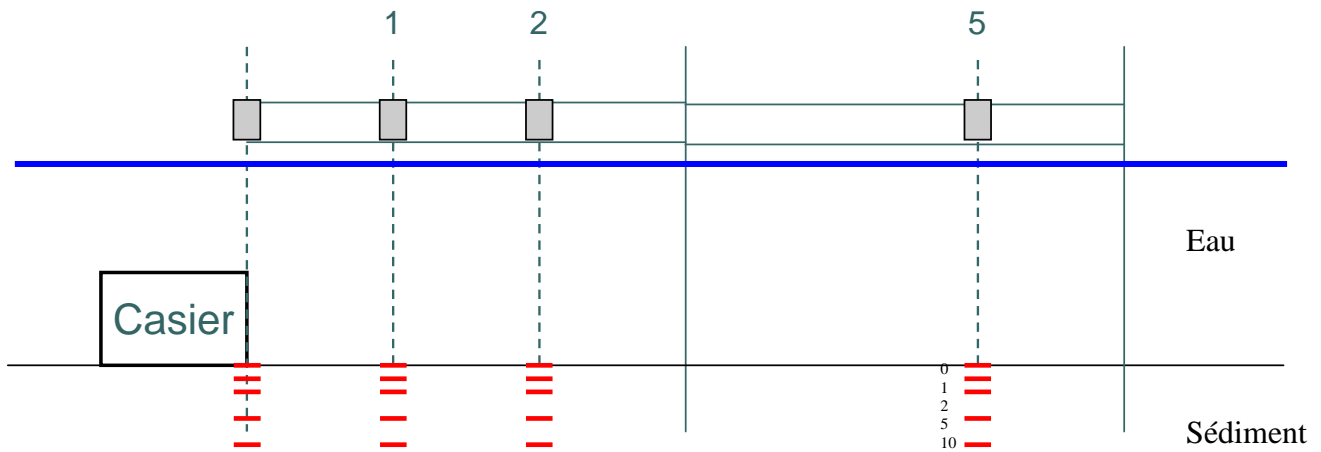


Figure 18: Représentation schématique de l'analyse des facteurs abiotiques *in situ* en mangrove.

Les mesures sont effectuées au niveau du casier, à 1m, 2m et 5m de distance sur une profondeur allant de la surface du sédiment jusqu'à 10cm.

L'utilisation de ces capteurs nécessite une calibration avant et après chaque manipulation afin de vérifier qu'il n'y ait pas eu de dérives lors de l'acquisition des données. La vérification informatique des données se fait à l'aide du logiciel Winnemo.

- Calibration de la sonde pH : cinq solutions de Tris-eau de mer (filtrée 0,22 μ m) sont préparées à différents pH. Les électrodes de la sonde pH sont plongées dans chacune des solutions pendant 2min. Les variations de pH et leur stabilité dans le temps sont vérifiées sur l'ordinateur.
- Calibration de la sonde sulfure : les électrodes de la sonde sulfure sont plongées dans un bêcher contenant de l'eau de mer filtrée (0,22 μ m) ajustée à pH7. Sous agitateur, 2ml d'une solution de Na₂S sont ajoutés toutes les 5min (5fois) et après chaque ajout le pH est mesuré. Les variations de sulfures et leur stabilité dans le temps sont vérifiées sur l'ordinateur.

Les données sont collectées à l'aide d'un crayon électronique étanche (Fig. 17B) relié à un ordinateur qui se positionne sur le capteur. Une fois les informations récoltées et enregistrées, elles sont transmises à N. LeBris (IFREMER) afin d'être traitées.

3 RESULTATS

3.1 *Caractérisation morphologique des nématodes symbiotiques de l'herbier à Thalassia testudinum*

a. Caractérisation morphologique des nématodes hôtes

Les nématodes associés à des ectosymbiotes sont faiblement représentés dans le sédiment d'herbier. Ils constituent environ 10% de la nématofaune total d'herbier sachant que dans 100g de sédiment humide, correspondant à 3 tris manuels sous loupe binoculaire, sont récoltés environ 30 individus de la nématofaune total dont 3 individus symbiotiques. De plus, il a été observé que la quantité de chaque espèce varie dans le temps avec des périodes où certaines espèces sont bien représentées, alors qu'elles peuvent devenir rares dans le sédiment et même disparaître totalement à d'autres moments. Le nématode *Eubostrichus hopperi* est le seul à avoir été collecté à chaque échantillonnage.

A partir des lames de glycérol, huit nématodes appartenant à 3 genres différents (*Eubostrichus*, *Robbea* et *Stilbonema*) de la sous-famille des Stilbonematinae et possédant un manteau bactérien ont été identifiés. Les caractères permettant l'identification des nématodes sont récapitulés dans le tableau suivant (Tab. 6). Le nématode *Adelphos rolandi* (Ott, 1997) a été décrit comme représentant d'un huitième genre des Stilbonematinae. Récemment positionné comme genre à part entière par Bayer *et al.* (2009), il a été volontairement assimilé au genre *Eubostrichus* dans notre étude, après observation des différents caractères morphologique formant ce dernier genre.

Les nématodes du genre *Adelphos*, *Eubostrichus* et *Robbea* possèdent un pharynx triparti : corpus, isthme, bulbe et un spicule arqué. Par contre, les nématodes du genre *Stilbonema* possèdent un pharynx formé d'une seule partie et un spicule incurvé. Seul les nématodes du genre *Robbea* possèdent une cuticule striée transversalement. Les autres genres de nématodes ont une cuticule finement striée. Les queues de l'ensemble de ces nématodes sont similaires (hémisphériques légèrement effilée) ainsi que les cavités buccales qui sont caractéristiques du groupe trophique des détritivores. Seul l'amphide est différent chez les

trois genres étudiés : chez les nématodes du genre *Eubostrichus*, l'amphide est unispiralée alors qu'elle est multispiralée chez les nématodes du genre *Robbea* et non enroulée chez les nématodes du genre *Stilbonema*.

Genres	Typologies					
	Cavité buccale	Amphide	Pharynx	Cuticule	Spicule	Queue
<i>Adelphos</i> et <i>Eubostrichus</i>	Sans armature	Unispirale	3 parties	Finement annelée	Arqué	Hémisphérique
<i>Robbea</i>	Sans armature	Multispirale	3 parties	striée transversalement	Arqué	Hémisphérique
<i>Stilbonema</i>	Sans armature	Non enroulée	1 partie	Fortement annelée	Incurvé	Hémisphérique

Tableau 6 : Récapitulatif des caractères morphologiques permettant l'identification au genre des nématodes.

Certains caractères morphologiques étaient plus facilement exploitables à partir d'observations au microscope électronique à balayage. De plus, les mesures de tailles (diamètre et longueur) sont une donnée supplémentaire dans l'identification des nématodes adultes (Tab. 7). Par exemple, le nématode *Eubostrichus diana* est facilement repérable par son diamètre (avec son manteau bactérien) plus important que chez les autres nématodes. Peu de différences sont observées au niveau des tailles des nématodes du genre *Eubostrichus* et *Robbea*. En revanche, le nématode *Stilbonema* sp. peut être distingué des genres précités par son épaisseur.

Nématodes	Diamètre avec manteau bactérien (µm)	Diamètre sans manteau bactérien (µm)	Longueur max. (mm)
<i>Eubostrichus topiarus</i>	50	25-30	5
<i>Eubostrichus hopperi</i>	30	15-20	2
<i>Adelphos rolandi</i>	50	30	5
<i>Eubostrichus diana</i>	100-150	50	3
<i>Robbea</i> sp.	35-45	30	5
<i>Stilbonema</i> sp.	80	50-60	3

Tableau 7 : Récapitulatif des tailles (diamètre et longueur) des nématodes adultes avec ou sans manteau bactérien.

- Description des nématodes du genre *Eubostrichus*

La différenciation morphologique entre les espèces du genre *Eubostrichus* est basée sur, la disposition et le nombre des soies sensorielles de la partie postérieure du nématode, la présence de soies sur le corps du nématode, la forme de l'amphide et la forme du **gubernaculum** (Tab. 8). Ces caractéristiques morphologiques ont été appliquées pour l'identification de *Adelphos rolandi*, *Eubostrichus hopperi* et *E. topiarus*, le nématode *E. diana* étant reconnaissable principalement par son manteau bactérien.

Eubostrichus topiarus possède une petite amphide unispiralée et bien marquée. Son extrémité caudale présente deux paires de soies subventrales et une paire fine sur sa partie terminale. Le gubernaculum est large et en forme de cuillère. Toutes les soies somatiques sont l'embouchure d'un Organe Sensoriel Glandulaire (OSG). Ces OSG sont très denses et facilement repérables, en particulier chez la femelle.

Eubostrichus hopperi possède une amphide large et unispiralée mais peu marquée sur le pourtour extérieur. Son extrémité caudale présente trois paires de soies subventrales et une paire fine sur sa partie terminale. Le gubernaculum est fin et incurvé.

Adelphos rolandi possède une amphide large et unispiralée. Son extrémité caudale présente de nombreuses soies subventrales jusque sur sa partie terminale. Le gubernaculum est très fin et sigmoïde. De larges soies ventrales sont observables sur la partie médiane du corps du nématode.



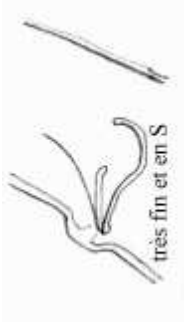



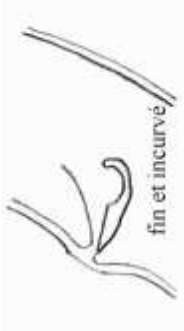

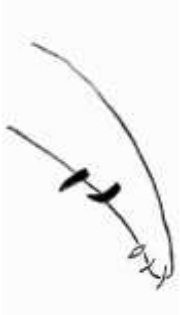


	Amphides	Queues	Gubernaculum	Autres caractères
<i>Adelphos rolandi</i>				
<i>Eubostrichus hopperi</i>				
<i>Eubostrichus topiarus</i>				

Tableau 8 : Récapitulatif des caractères morphologiques propres à chacune des espèces du genre *Adelphos* et *Eubostrichus* collectées dans le sédiment d'herbier à *T. testudinum*.

Détail des amphides, de la partie postérieure, du gubernaculum et des autres caractères permettant l'identification des espèces.

○ Description des nématodes du genre *Robbea*

La différenciation des espèces du genre *Robbea* a été effectuée à partir de l'observation du manteau bactérien (§ 3.1b) puis par l'hybridation d'amorces ADNr 18S spécifiques disponible sur GenBank (§ 3.3b). *Robbea* sp.3 présente une capsule céphalique bien marquée contrairement à celle de *Robbea* sp.1 et *Robbea* sp.2 qui est peu distinguable (Fig. 19A-B-C). Le manteau bactérien commence après la partie céphalique du nématode *Robbea* sp.3. alors qu'il recouvre totalement les nématode *Robbea* sp.1 et *Robbea* sp.2. Grâce aux observations de l'allure générale des nématodes en MEB, la présence de mucus sécrété par le nématode au niveau de leur partie céphalique a pu être mis en évidence (Fig. 19B-C-D).

○ Description des nématodes du genre *Stilbonema*

Concernant les nématodes du genre *Stilbonema*, l'identification jusqu'à l'espèce n'a pas pu être établie en raison du manque de descriptions morphologiques sur les différentes espèces de ce genre. Des sécrétions céphaliques ont aussi été observées en MEB (Fig. 19D).

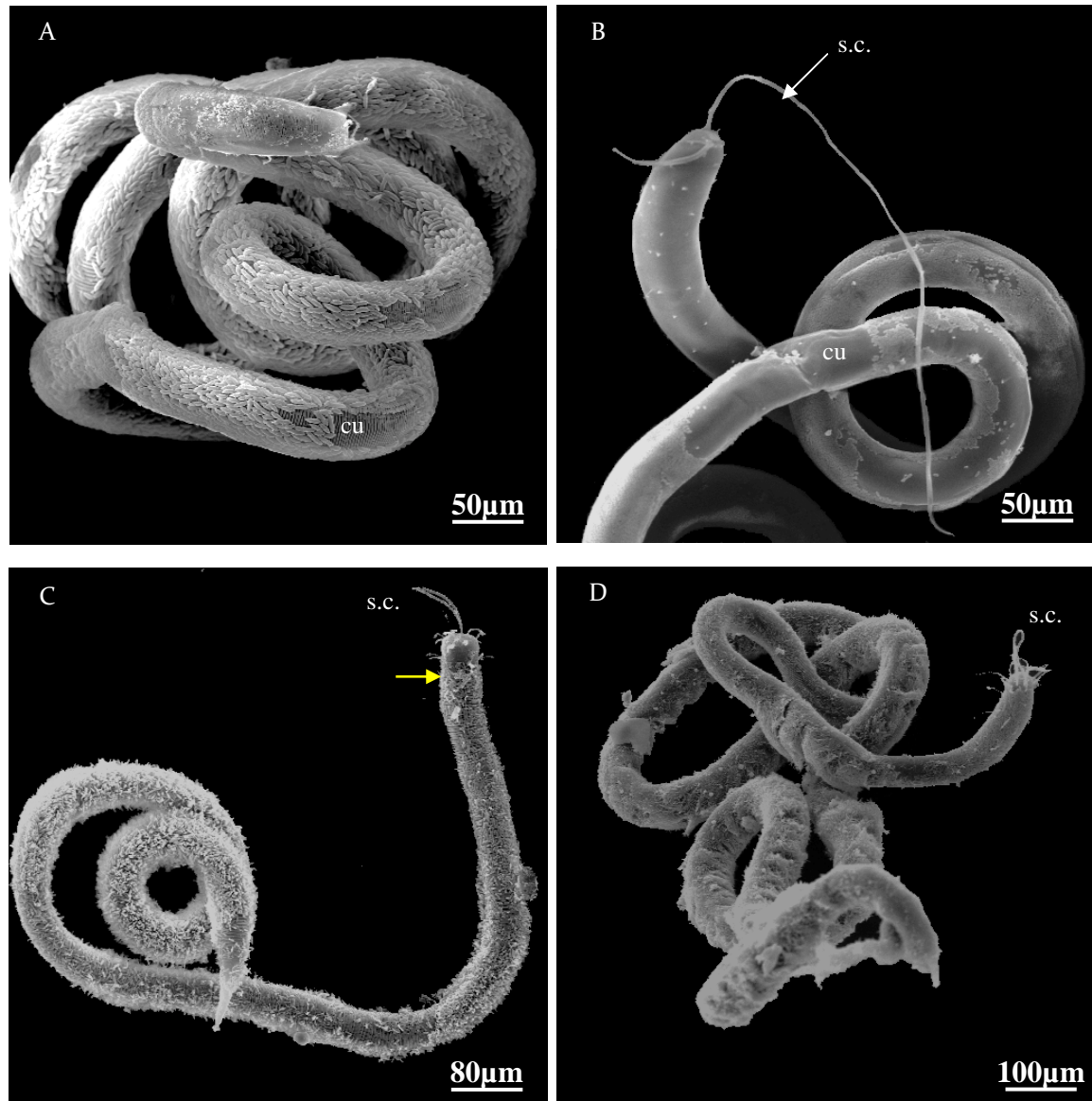


Figure 19: Observation au MEB de l'allure générale des nématodes possédant des ectosymbiotes des genres *Robbea* et *Stilbonema* et colonisant l'herbier à *T. testudinum*.

(A) Le nématode *Robbea* sp.1 est recouvert par son manteau bactérien sur l'ensemble de son corps. Certains endroits sur le corps laissent apparaître la cuticule (cu) du nématode.

(B) *Robbea* sp.2 est recouvert par un manteau bactérien dense. Des patches dépourvus de bactéries laissent entrevoir la cuticule (cu) du nématode. Deux sécrétions céphaliques (s.c.) importantes sont observables sur l'extrémité antérieure du nématode.

(C) Le nématode *Robbea* sp.3. possède un manteau bactérien qui ne recouvre pas la partie céphalique. La flèche jaune marque la limite entre la capsule céphalique et le commencement du manteau bactérien recouvrant le corps du nématode. Des sécrétions (s.c.) sont observables sur la partie antérieure du nématode.

(D) *Stilbonema* sp. est recouvert entièrement par un manteau dense de bactéries. Des sécrétions céphaliques (s.c.) sont aussi observables sur ce nématode.

b. Caractérisation morphologique des symbiotes

La caractérisation morphologique des symbiotes et de leur arrangement sur la cuticule des nématodes hôtes a été réalisée à partir des images obtenues en microscopie électronique à balayage et à transmission. L'observation du manteau est un outil supplémentaire dans l'identification des nématodes puisqu'il est caractéristique du genre comme chez *Eubostrichus* et parfois de l'espèce comme chez *Robbea*.

Adelphos rolandi, *Eubostrichus hopperi* et *E. topiarus* possèdent un manteau bactérien dense disposé tout le long de leur corps en forme d'hélice. Les bactéries sont allongées et incurvées (~ 30µm de long) afin de positionner leurs deux extrémités sur la cuticule du nématode (Fig. 21A). Deux positionnements du manteau bactérien sur le nématode sont observés chez ces espèces. Soit les bactéries forment une spirale linéaire tout le long du corps de l'animal soit elles s'organisent en zig-zag pour créer une sorte de cordage sur le nématode (Berger *et al.*, 1996). Ces deux types de manteau bactérien peuvent être observés chez un même individu (Fig. 20).

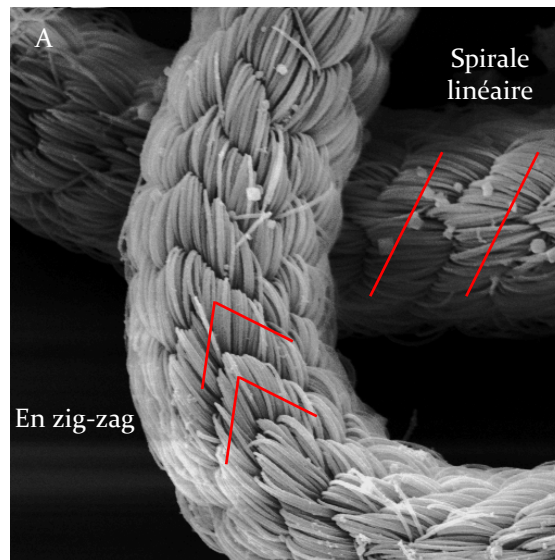


Figure 20: Disposition du manteau bactérien chez *Adelphos rolandi*, *Eubostrichus hopperi* et *E. topiarus*.

Les deux agencements, en zig-zag et en spirale linéaire, sont visualisables sur le même individu.

Le nématode *Eubostrichus diana*e est facilement identifiable grâce à son manteau bactérien. Les symbiotes forment une fourrure tout autour du nématode et recouvrent entièrement son corps. Ils sont de forme filamenteuse (~ 100µm de long) et sont attachés par une seule extrémité sur la cuticule de l'animal (Fig. 21B).

Les symbiotes associés aux nématodes du genre *Robbea* mesurent environ 2µm de long. Chez *Robbea* sp.1, les bactéries ont une forme de boudin et sont disposées en une unique couche sur la cuticule du nématode (Fig. 21C). Chez *Robbea* sp.2, les symbiotes sont de forme hexagonale convexe et sont très ordonnés entre eux. Ils forment une monocouche sur le nématode (Fig. 21D). Chez *Robbea* sp.3, les bactéries sont en forme de bâtonnets aux extrémités arrondies (Fig. 21E) et sont disposées de deux manières désordonnées sur la cuticule du nématode. Soit elles sont perpendiculaires au corps du nématode et reposent par une extrémité sur celui-ci soit elles sont parallèles à la cuticule (Fig. 21F).

Figure 21 : Observation au MEB des différents manteaux bactériens recouvrant les nématodes symbiotiques colonisant l'herbier à *T. testudinum*.

(A) Manteau bactérien des nématodes *Adelphos rolandi*, *Eubostrichus hopperi* et *E. topiarus*. Les ectosymbiotes sont posés par leurs deux extrémités sur la cuticule du nématode et sont ordonnés côte à côte pour former un manteau dense sur tout le nématode.

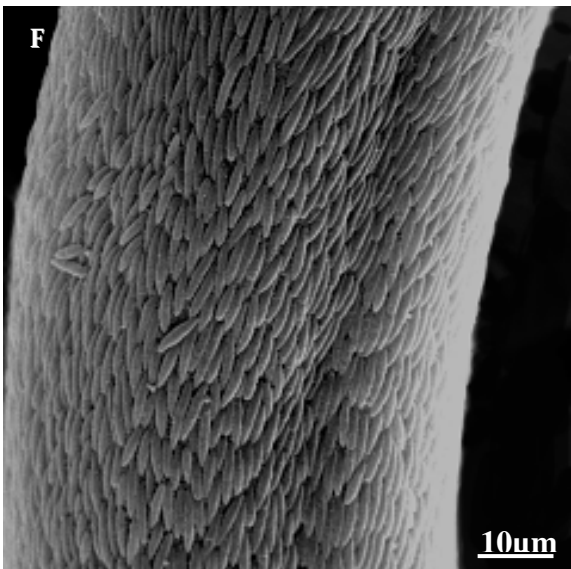
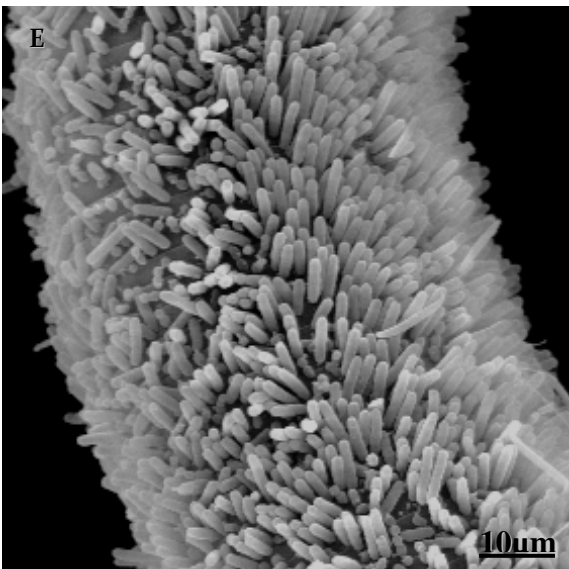
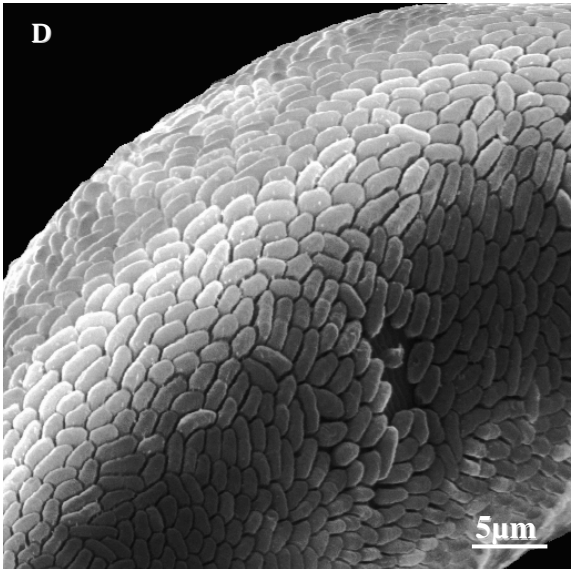
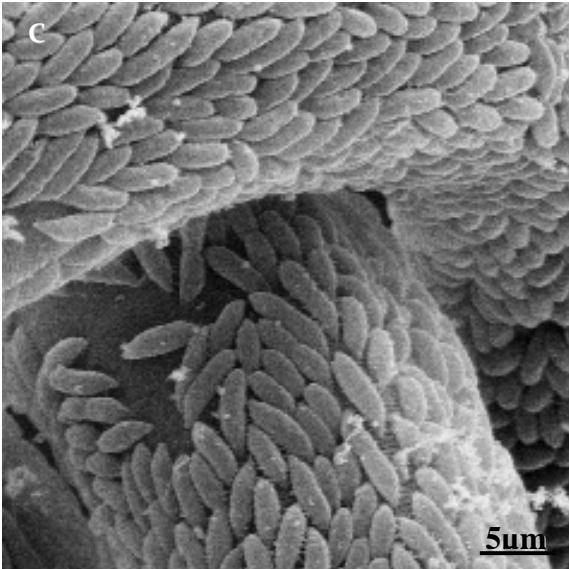
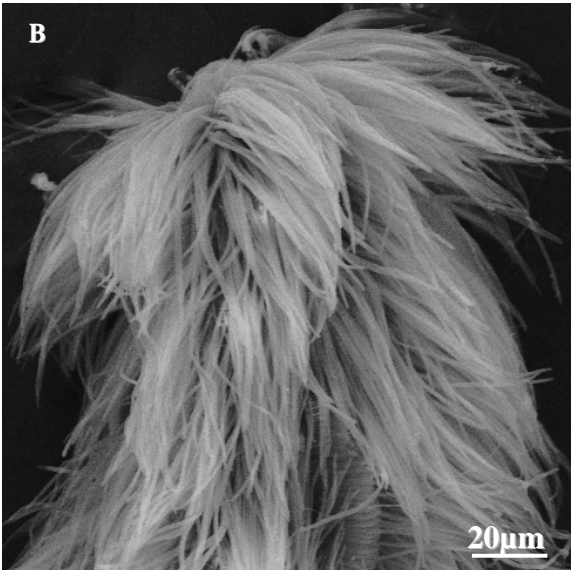
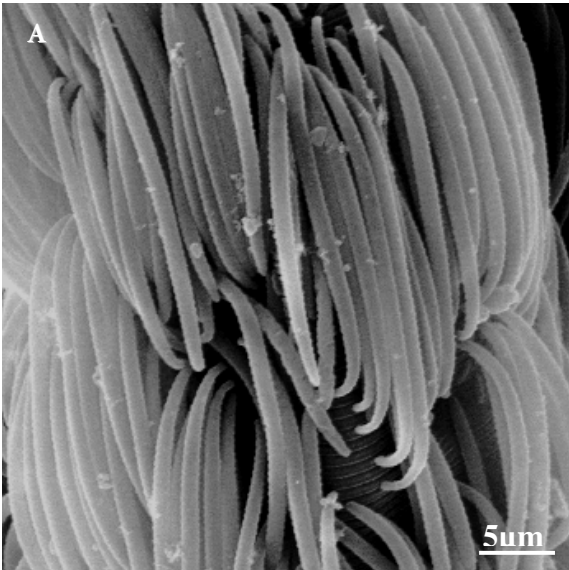
(B) Partie antérieure du nématode *Eubostrichus diana*e recouvert de son manteau bactérien. Les ectosymbiotes filamenteux sont rattachés à la cuticule du nématode par une extrémité. La finesse des bactéries et leur importante quantité forme une sorte de fourrure sur le nématode.

(C) Détail du manteau bactérien de *Robbea* sp.1. Les ectosymbiotes de forme ovale sont disposés horizontalement et en monocouche sur la cuticule du nématode.

(D) Manteau bactérien de *Robbea* sp.2. Les bactéries sont rangées et manière ordonnée sur la cuticule du nématode formant un manteau ajusté en une seule couche.

(E) Le manteau bactérien de *Robbea* sp.3 est constitué de symbiotes polymorphes (cocoïde et en bâtonnet) disposé de manière anarchique sur la cuticule du nématode.

(F) Manteau bactérien de *Stibonema* sp. Les ectosymbiotes fusiformes sont ordonnés parallèlement entre eux et couchés sur la cuticule du nématode.



L'observation du manteau bactérien (forme des symbiotes et organisation générale du manteau bactérien) est un caractère d'identification qui soulève un problème pour le genre *Stilbonema*. Celui-ci présente toutes les caractéristiques morphologiques de ce genre, mais ne possède pas le manteau bactérien qui lui est habituellement attribué. Ce nématode est décrit comme s'associant à des bactéries de formes coccoïdes alors que dans notre étude nous l'avons observé recouvert de bactéries en bâtonnets fusiformes ($\sim 2\mu\text{m}$ de long) (Fig. 21F). L'appartenance à ce genre sera vérifiée par l'hybridation d'amorces spécifiques d'ADNr 18S des *Stilbonema* (§ 3.3b).

Chez *Stilbonema* sp., la figure suivante (Fig. 22A) permet d'observer la cuticule fortement annelée du nématode sur laquelle reposent les symbiotes fusiformes formant un manteau dense sur l'animal. Chez le nématode *Robbea* sp.1, les bactéries ectosymbiotiques sont peu denses sur l'animal et présentent des pilis leur permettant une adhésion entre elles (Fig. 22B).

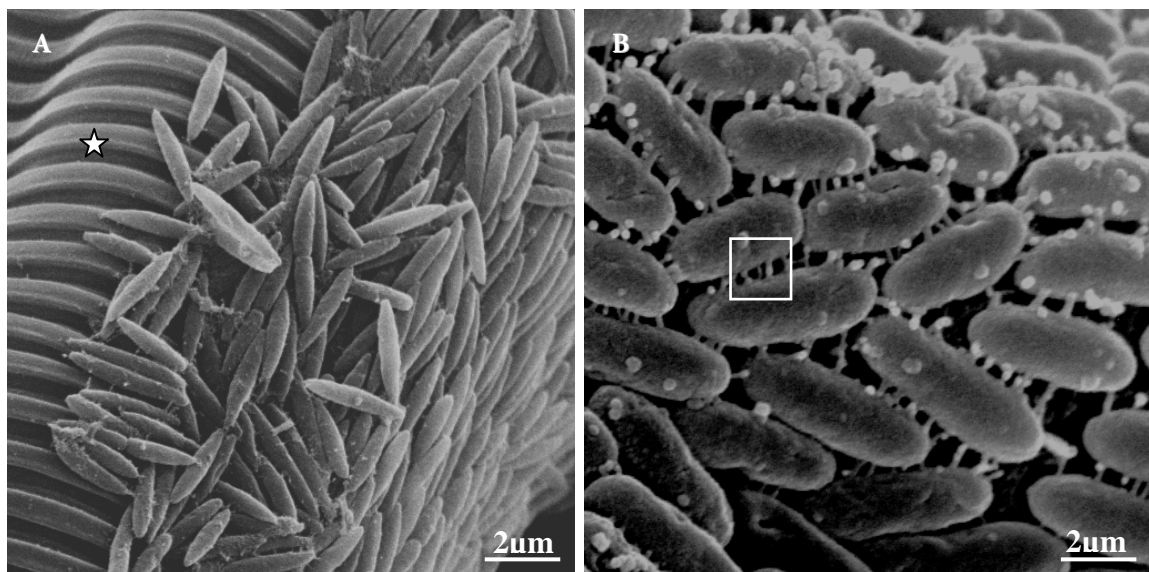


Figure 22 : Agrandissement au MEB des manteaux bactériens recouvrant les nématodes *Stilbonema* sp. et *Robbea* sp.1.

(A) Observation de la cuticule fortement annelée de *Stilbonema* sp. (étoile blanche) et des bactéries fusiformes disposées en multicouches sur le nématode.

(B) Observation des connexions (carré blanc) établies entre les bactéries en forme de boudins et recouvrant par une unique couche le nématode *Robbea* sp.1.

A partir des observations sur coupes de ces nématodes symbiotiques en MET, d'autres informations concernant les hôtes et leurs symbiotes ont pu être collectées. Tout d'abord, ces nématodes possèdent une cuticule épaisse sur laquelle repose les symbiotes plus ou moins ordonnés en fonction de l'espèce étudiée. La figure suivante (Fig. 23A) montre la disposition des bactéries ectosymbiotiques du nématode *E. hopperi* en coupe transversale et longitudinale. Dans ces symbiotes ainsi que dans ceux des autres espèces récoltées, des granules translucides sont observés (Fig. 23B) et pourraient correspondre aux inclusions de soufres précédemment décrites chez les bivalves endosymbiotiques (Lechaire *et al.*, 2002). De plus des figures de divisions sont observables chez les bactéries ectosymbiotiques (Fig. 23B) traduisant une reproduction de celles-ci sur leur hôte.

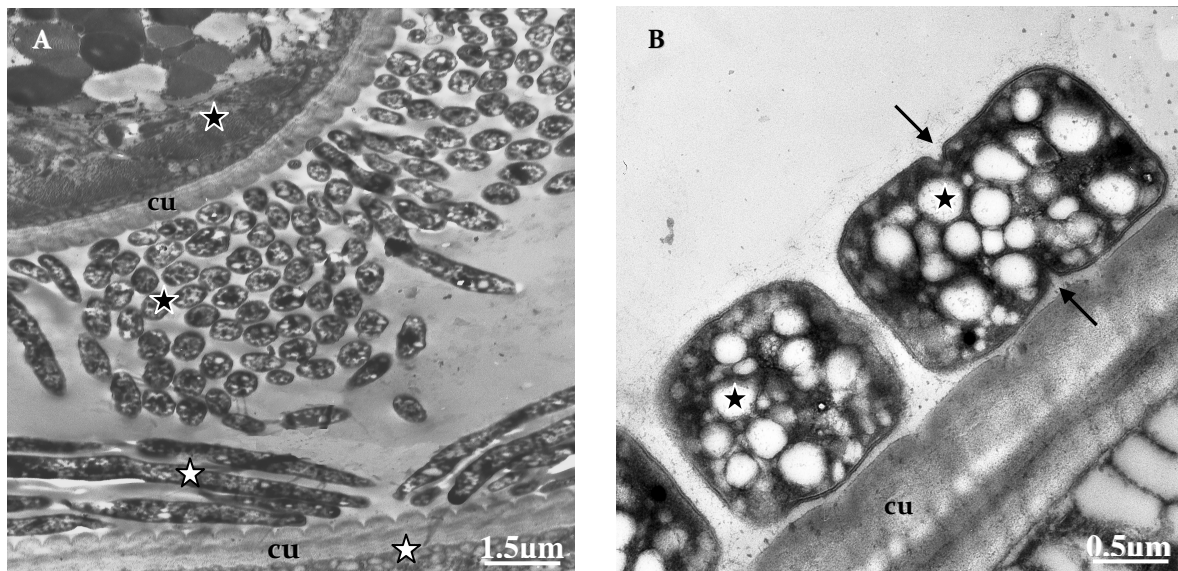


Figure 23: Observation au MET de coupes de nématodes symbiotiques inclus en résine LR White.

(A) Coupe transversale (étoile noire) et longitudinale (étoile blanche) du nématode *Eubostrichus hopperi* recouvert par son manteau bactérien. Les ectosymbiotes sont disposés sur la cuticule (cu) épaisse du nématode.

(B) Coupe transversale des ectosymbiotes de *Robbea* sp.1 disposés de manière ordonnée à la surface de la cuticule (cu) du nématode. De nombreux granules translucides sont présents dans l'espace périplasmique des bactéries (étoile noire). Observation d'une division cellulaire d'un des symbiotes (flèches noires).

Chez le nématode *E. diana*, un second morphotype de bactérie symbiotique a été observé. Ces ectosymbiotes sont retrouvés uniquement à proximité de la cuticule et sont de forme ovale à arrondie. Les bactéries de ce morphotype sont plus petites et ont un pourtour membranaire externe peu net (Fig. 24A). Les observations au MET de ce nématode ont aussi permis de mettre en évidence une structure fine se décollant de la cuticule du nématode et pouvant intervenir dans l'adhésion des bactéries sur le nématode (Fig. 24B).

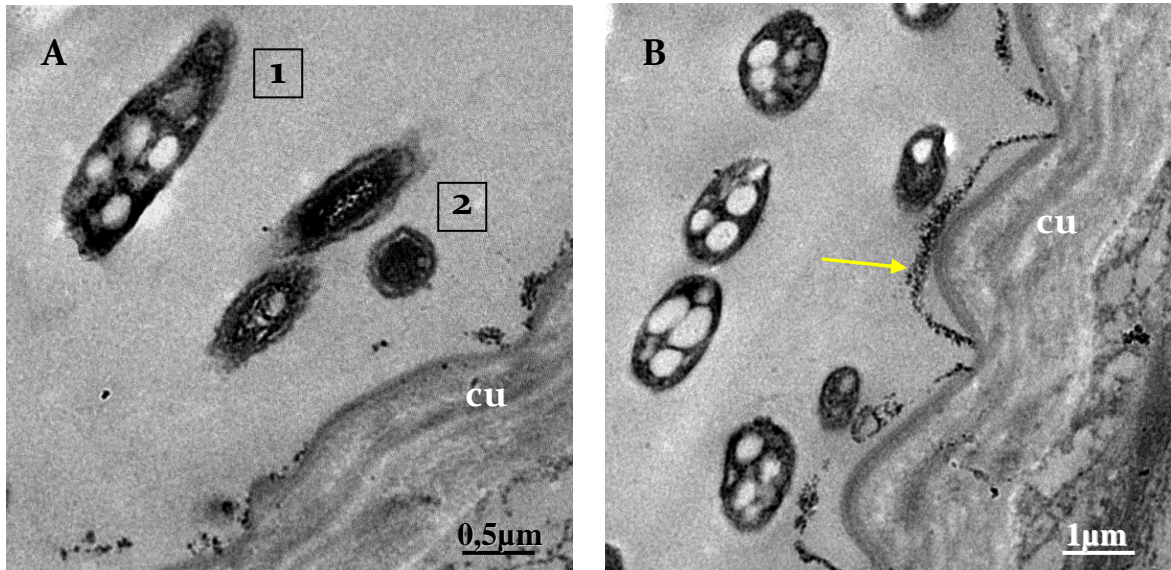


Figure 24 : Observation au MET de coupes transversales du nématode *E. diana* inclus en résine LR White.

(A) Observation de deux morphotypes de bactéries ectosymbiotiques disposées à proximité de la cuticule du nématode (cu). Le morphotype 1 correspond aux bactéries majoritaires formant le manteau bactérien dense sur tout le corps du nématode. Le morphotype 2 est plus discret et se situe sous les bactéries majoritaires.

(B) Observation d'une structure particulière (flèche jaune) formant une couche fine entre les ectosymbiotes et la cuticule (cu) du nématode.

Le descriptif de des micro-organismes ectosymbiotiques, observés sur la cuticule des huit nématodes récoltés en herbier à *T. testudinum*, est récapitulé dans le tableau suivant (Tab. 9) :

Nématodes hôtes	Symbiotes		
	Taille (µm)	morphologie	Disposition
<i>Adelphos rolandi</i>	30	Filament incurvé	bactéries ordonné en hélice ; attaché par les deux extrémités
<i>Eubostrichus hopperi</i>			
<i>Eubostrichus topiarus</i>			
<i>Eubostrichus diana</i>	100 à 120	Filament droit	Manteau dense attaché par une extrémité
<i>Robbea</i> sp.1	5	boudiné	Monocouche posé sur la longueur
<i>Robbea</i> sp.2	2	Hexagone convexe	Monocouche Juxtaposé les uns aux autres
<i>Robbea</i> sp.3	1-3	Polymorphe : cocoïde et bâtonnet	Monocouche arrangée de 2 manières : perpendiculaire et posé sur la longueur
<i>Stibonema</i> sp.	1 à 2	Bâtonnet fusiforme	Multicouche ordonnée

Tableau 9 : Récapitulatif de la taille, de la morphologie et de la disposition des symbiotes sur les nématodes hôtes d'herbier.

3.2 Caractérisation analytique de la symbiose bactérienne

a. Détection et localisation du soufre par microspectrométrie Raman

o Détection du soufre

A partir des nématodes récoltés en herbier, une analyse par microspectrométrie Raman a été réalisée afin de (i) détecter sur les nématodes vivants du soufre confirmant ainsi les études réalisées par Polz *et al.* (1992) par chromatographie, et (ii) définir la nature du soufre présent. Une acquisition a été effectuée sur du soufre élémentaire S_8 . Le spectre Raman de ce soufre est formé de trois pics principaux à 160cm^{-1} , 225cm^{-1} et 480cm^{-1} (Poborchii, 1996) (Fig. 25A).

Une acquisition a aussi été réalisée sur chaque nématode maintenu vivant en eau de mer filtrée (lame creuse ou ruban adhésif) ou décongelé. La sonde est représentée sur la photographie prise au MEB par un point blanc (Fig. 25B-C). Ce soufre élémentaire a été détecté par microspectrométrie Raman chez l'ensemble des nématodes analysés (Fig. 25A) alors qu'il n'a pas été observé chez un nématode non symbiotique collecté dans le même milieu d'étude (Fig. 25A).

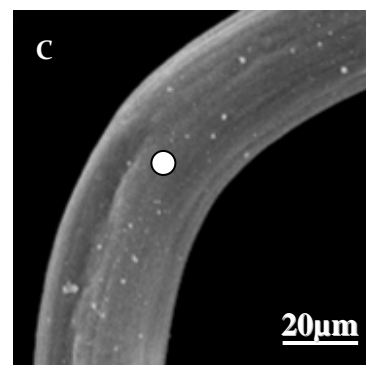
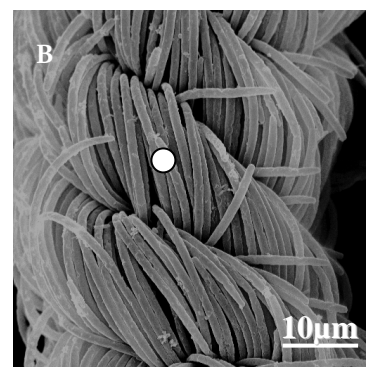
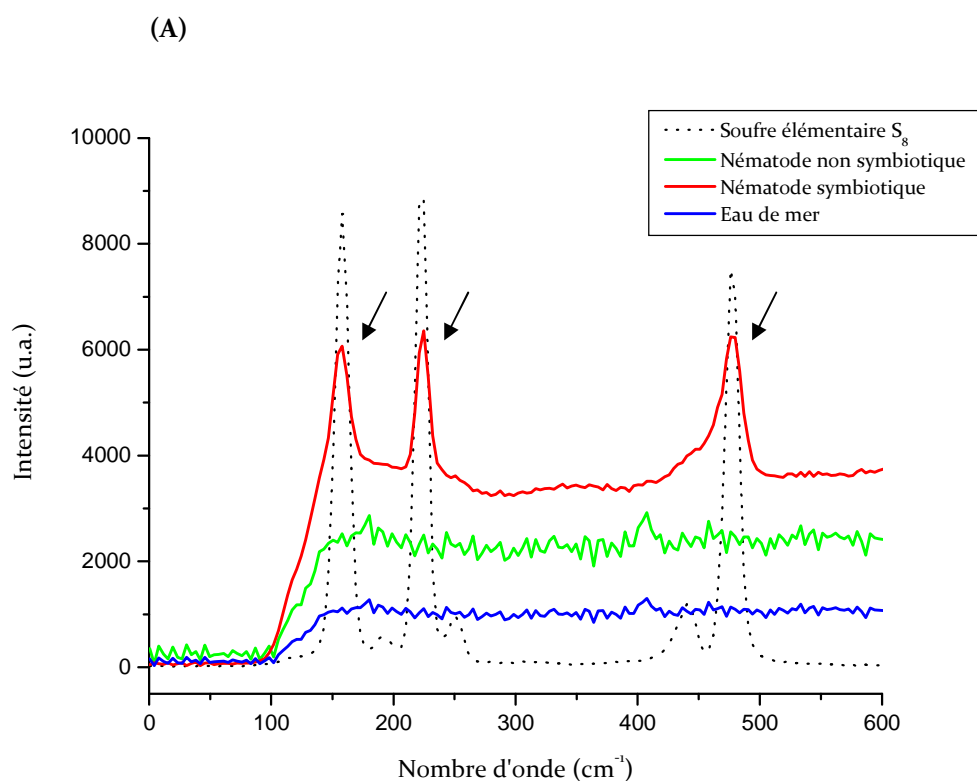


Figure 25 : Analyse par microspectrométrie Raman d'un nématode symbiotique *Eubostrichus hopperi* et d'un nématode non symbiotique collectés dans le sédiment d'herbier à *T. testudinum*.

(A) Spectre Raman acquis sur du soufre élémentaire pur S_8 (témoin positif) présentant 3 principaux pics à 160cm^{-1} , 225cm^{-1} et 480cm^{-1} . L'eau de mer (témoin négatif) étant dépourvue de soufre, le spectre Raman ne présente aucun pic, de même que celui acquis sur le nématode non-symbiotique. Le spectre Raman acquis sur *E. hopperi* révèle la signature Raman caractéristique du soufre S_8 (flèches noires).

(B) Observation au MEB d'une partie du corps du nématode *Eubostrichus hopperi* recouvert par son manteau bactérien disposé en spirale linéaire.

(C) Observation au MEB d'une partie du corps d'un nématode non symbiotique.

Le point blanc en (B) et (C) représente la disposition de la sonde Raman lors de l'acquisition.

- Localisation spatiale du soufre élémentaire

L'analyse a été effectuée sur le nématode *Eubostrichus diana*. Comme décrit précédemment, ce nématode possède un manteau bactérien dense constitué de longs filaments attachés par une extrémité sur la cuticule de l'hôte. Les bactéries ectosymbiotiques ont une longueur de $80\mu\text{m}$ à $100\mu\text{m}$ et un diamètre de $0,5\mu\text{m}$ à $1\mu\text{m}$ et sont disposées de manière ordonnée sur tout le corps du nématode (Fig. 26A-B). Pour cette analyse, le nématode a été préalablement tué en solution de fixation (glutaraldéhyde 2% tamponné dans de l'eau de mer) puis maintenu en eau de mer durant l'analyse.

Afin de localiser le soufre élémentaire sur le nématode, une série de 30 spectres a été enregistrée suivant un transect transversal à travers le nématode. La sonde du laser Raman a un diamètre de $10\mu\text{m}$ et le pas entre deux acquisitions spectrales est de $5,6\mu\text{m}$. Les cercles blancs dessinés sur la photographie prise en MEB représentent la sonde utilisée et son déplacement pour obtenir le profil Raman du nématode (Fig. 26B).

La figure 26C montre une sélection de trois spectres Raman acquis respectivement, dans l'eau de mer dans laquelle est maintenu le nématode durant l'analyse, dans le manteau bactérien et au centre du nématode, c'est-à-dire, à l'endroit où la sonde traverse le corps du nématode (avec son tube digestif) et deux fois le manteau bactérien. Les spectres Raman obtenus sur le manteau bactérien et dans la partie centrale du nématode présentent les trois pics caractéristiques du soufre élémentaire S_8 à 160cm^{-1} , 225cm^{-1} et 480cm^{-1} . Ces pics ne sont pas observés sur le spectre de l'eau de mer (Fig. 26C). Comme décrit par Long (1977), l'intensité de la bande de diffusion Raman caractéristique d'un composé correspond à la quantité de celui-ci dans le volume analysé. Cette donnée permet de localiser le soufre S_8 chez *E. diana*. A partir des variations d'intensité du pic du soufre mesurées à 480cm^{-1} , un diagramme a été créé représentant ces fluctuations de bandes Raman en fonction du

déplacement de la sonde Raman (Fig. 26D). Des diagrammes équivalents ont été obtenus à partir des variations d'intensité des deux autres pics, 160cm^{-1} et 225cm^{-1} . Les points d'intensité zéro (pas de soufre détecté) correspondent à l'analyse hors de l'échantillon, c'est-à-dire, dans l'eau de mer entourant le nématode lors de l'acquisition. Le soufre est détecté sur une longueur de $100\mu\text{m}$ correspondant au diamètre du corps du nématode ($40\mu\text{m}$) entouré par son manteau bactérien (d'une épaisseur d'environ $30\mu\text{m}$). Le profil d'intensité à travers l'échantillon révèle deux maxima séparés par un creux concordant avec le corps du nématode.

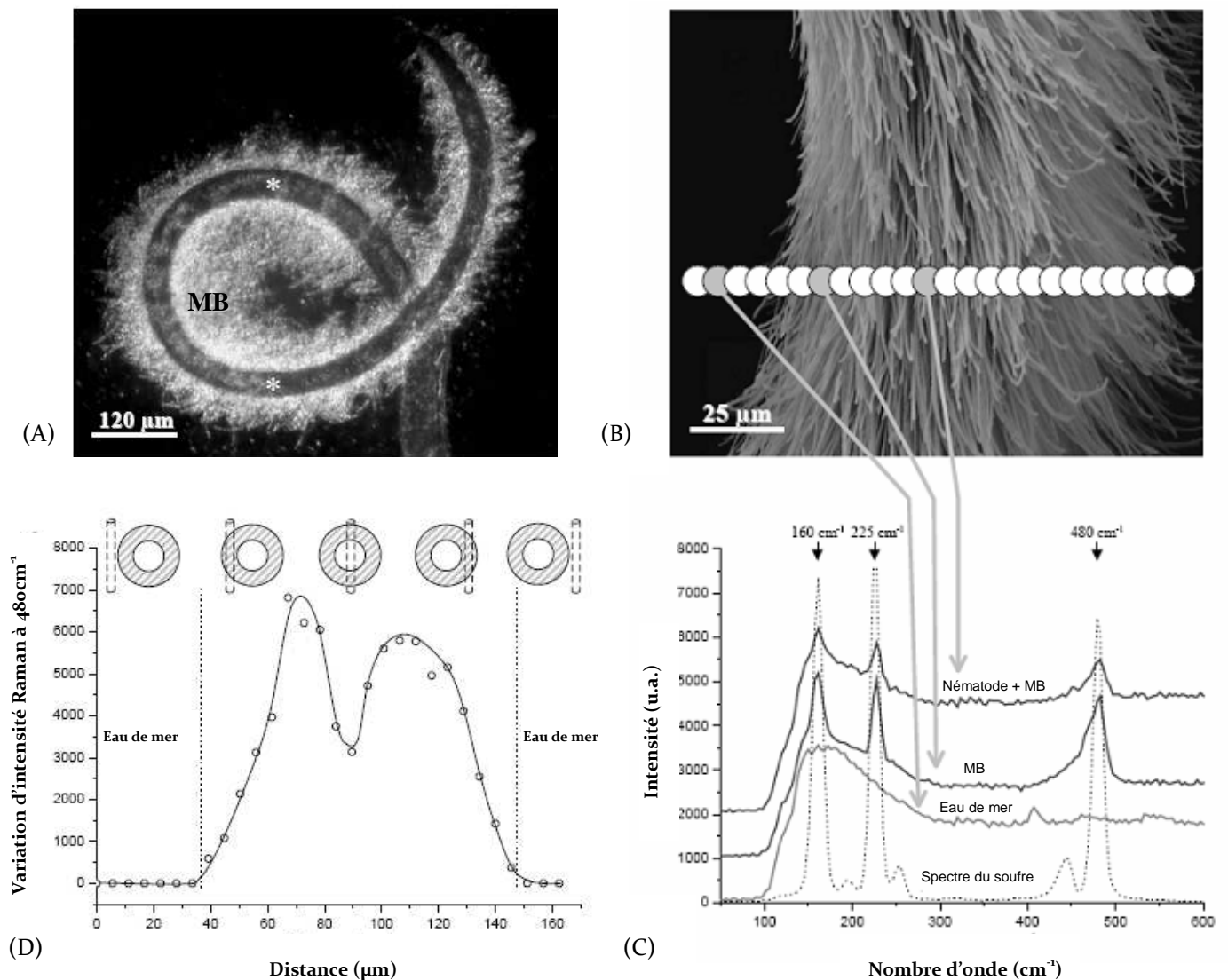


Figure 26 : Caractérisation et localisation du soufre par microspectrométrie Raman sur le nématode symbiotique *E. diana*.

(A) Vue générale du nématode au microscope optique. Le manteau bactérien (MB) apparaît blanc alors que le corps du nématode (indiqué par *) est gris sombre. En raison de l'utilisation d'une lamelle pour l'observation au microscope, le manteau bactérien a été aplati et apparaît plus épais (environ $100\mu\text{m}$ contre $30\mu\text{m}$ habituellement).

(B) Micrograph pris au MEB de la partie médiane du nématode. Observation des longs filaments formant le manteau bactérien entourant le corps entier du nématode. Les cercles blancs indiquent la taille et la position de la sonde Raman utilisée lors du scan.

(C) Sélection de trois spectres Raman extraits des données du profil Raman et mettant en évidence la présence de soufre dans le nématode alors qu'il n'est pas détecté dans l'eau de mer environnante. Le spectre du soufre élémentaire pur (en ligne pointillée) présente trois bandes Raman intenses caractéristiques (flèches) et sert de référence pour les autres spectres.

(D) Variation de l'intensité du soufre à 480cm^{-1} en fonction du déplacement de la sonde Raman lors du scan. La courbe représentative du contenu en soufre dans le volume analysé par la sonde, démontre la présence de soufre chez *E. dianae*. La courbe présente deux maxima séparés par un creux correspondant approximativement au centre du nématode.

Afin d'interpréter ce diagramme, le nématode et son manteau bactérien ont été schématiquement représentés (Fig. 27A). Le corps du nématode est assimilé à un cylindre de $40\mu\text{m}$ de diamètre entouré par un manteau bactérien de $30\mu\text{m}$ d'épaisseur. La sonde Raman est représentée par un cylindre vertical traversant l'échantillon transversalement. Pour simplifier l'analyse théorique, le soufre a été considéré réparti de manière homogène dans l'échantillon à une concentration C_b dans le corps du nématode et C_c dans le manteau bactérien.

L'intensité de diffusion Raman est proportionnelle à l'intensité excitatrice et à la quantité de soufre analysée par la sonde en un point, c'est-à-dire, que l'intensité mesurée ponctuellement correspond au volume d'intersection entre la sonde et l'échantillon multiplié par sa concentration en soufre. Dans le cas d'un échantillon parfaitement transparent, l'intensité du rayonnement incident est considérée constant à travers l'échantillon et la diffusion Raman est alors juste proportionnelle au volume de la sonde multiplié par la concentration en soufre de la zone analysée. Dans le cas contraire, où le rayonnement est absorbé par l'échantillon, les résultats doivent être ajustés selon les phénomènes d'absorption.

Les profils théoriques d'intensité Raman (Fig. 27B) ont été calculés suivant deux cas : $C_b = C_c = 1$ (u.a.) lequel cas suppose que le soufre est contenu de manière uniforme et dans les mêmes proportions dans le corps du nématode et dans son manteau bactérien ; et $C_b = 0$ & $C_c = 1$ (u.a.) lequel cas suppose que le soufre est contenu uniquement dans le manteau bactérien. Les profils théoriques ont été calculés en admettant dans un premier cas que l'échantillon était parfaitement transparent et dans un second qu'il y avait des phénomènes d'absorbances liés au manteau bactérien, au corps du nématode et à ses organes internes tel que le tube digestif. L'absorbance du nématode a été estimée à partir d'expressions mathématiques et de coefficients d'absorption expérimentaux (Annexe 7).

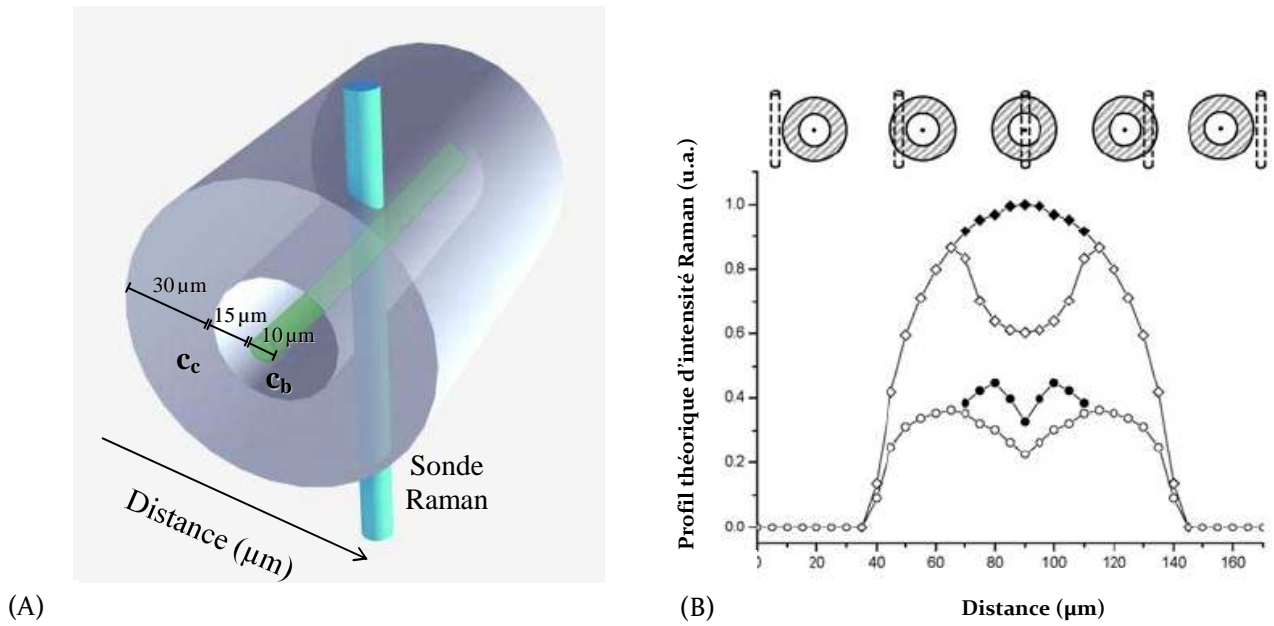


Figure 27 : Localisation théorique du soufre à partir d'une représentation virtuelle du nématode symbiotique.

(A) Représentation schématisée du corps du nématode entouré par son manteau bactérien.
 (B) Profil d'intensité théorique d'une bande de soufre caractéristique déduit du modèle créé en (A). Il a été supposé une relation linéaire entre l'intensité et la quantité de soufre et la distribution homogène du soufre dans les volumes analysés à une concentration Cb dans le corps du nématode et Cc dans le manteau bactérien. Les profils théoriques présentés correspondent à : (●, ◆) Cb = Cc = 1 u.a. et (○, ◇) Cb = 0 & Cc = 1 u.a. pour un échantillon parfaitement transparent (◆, ◇) et pour un échantillon absorbant (●, ○).

L'effet principal des propriétés d'absorption des différentes parties du nématode est l'importante réduction de l'intensité de la diffusion Raman (~50%). La différence entre les deux profils théoriques corrigés est la variation d'intensité (Δ) entre l'intensité Raman maximum I_M et minimum I_m .

$$\Delta = \frac{I_M - I_m}{I_M}$$

	Profil	I_M (u.a.)	I_m (u.a.)	Δ
Théorique non corrigé	$C_b = 0$ & $C_c = 1$ u.a.	0,86	0,60	0,30
Théorique corrigé	$C_b = C_c = 1$ u.a.	0,45	0,33	0,27
	$C_b = 0$ & $C_c = 1$ u.a.	0,36	0,22	0,39
Expérimental	C_b et C_c inconnues	5800	3400	0,41

Tableau 10 : Récapitulatif des données d'intensité Raman maximum (I_M) et minimum (I_m) ainsi que la variation d'intensité (Δ) en fonction des profils étudiés.

Le profil théorique non corrigé correspond à l'analyse Raman effectuée sur un cylindre contenant de la matière active dans sa partie interne uniquement sans correction d'absorption. Le profil théorique corrigé correspond à l'analyse Raman effectuée sur un cylindre contenant (ou pas) de la matière active dans sa partie externe avec correction d'absorption.

La valeur du Δ du profil théorique $C_b = 0$ & $C_c = 1$ u.a. ($\Delta = 0,39$) concorde bien avec la valeur de la variation d'intensité expérimentale obtenue sur l'échantillon ($\Delta = 0,41$) et soutient clairement l'absence de soufre dans le corps du nématode et dans son tube digestif (Tab. 10).

Cette conclusion est confirmée par le spectre Raman acquis sur le nématode au niveau d'une zone où le manteau bactérien avait été accidentellement enlevé pendant la manipulation de l'échantillon. Dans ce cas, le spectre ne montre aucune bande caractéristique du soufre prouvant effectivement que le nématode est intérieurement dépourvu de soufre (Fig. 28).

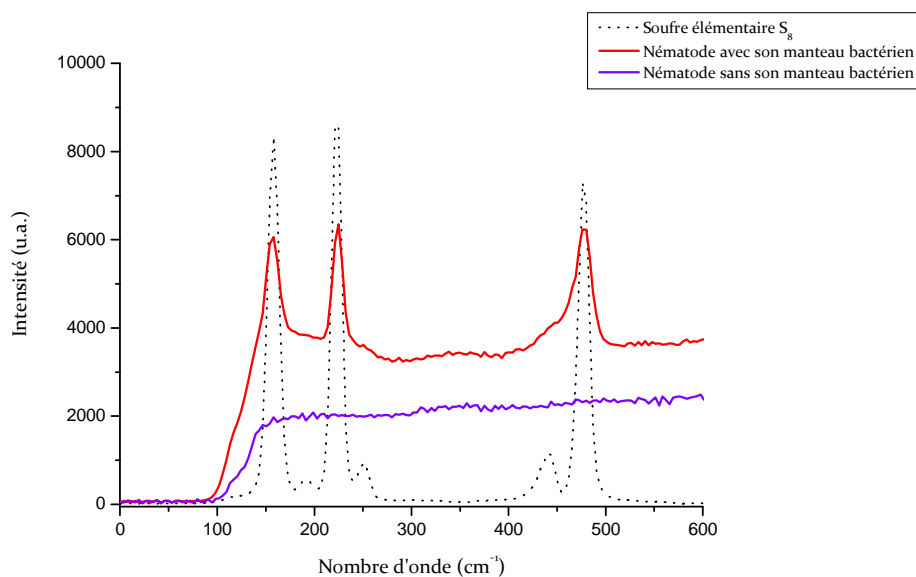


Figure 28: Spectres Raman obtenus sur le corps du nématode *E. diana* entouré de son manteau bactérien et dans une zone où ce même manteau bactérien a été complètement enlevé.

La forme non symétrique du profil expérimental d'intensité Raman (Fig. 26D) peut être attribuée à la distribution irrégulière des bactéries autour du corps du nématode.

Les analyses par microspectrométrie Raman réalisées sur les nématodes symbiotiques vivants colonisant l'herbier à *Thalassia testudinum* et sur le nématode entier *E. diana*e ont permis de détecter le soufre élémentaire S₈ et de localiser ce composé dans le manteau bactérien.

b. Raman et EELS sur un nématode inclus en résine LR White

Afin d'accentuer les avantages de la technique Raman sur du matériel biologique vivant, par rapport à une technique classique analytique en MET (ATEM), la microspectrométrie Raman a été utilisée sur des coupes d'un échantillon fixé, déshydraté puis inclus en résine. L'objectif de cette manipulation étant de démontrer la perte du soufre lors de la préparation des organismes.

Les micrographes optiques et prises au MET (Fig. 29A-B) ont été obtenus à partir de sections de nématodes inclus en résine LR White. Un transect Raman a été réalisé sur une coupe semi-fine du nématode *E. diana*e. Vingt spectres ont été acquis à travers la résine, le manteau bactérien et le corps du nématode (Fig. 29C). L'étude des vingt spectres obtenus pendant le scan souligne le manque des trois pics caractéristiques du soufre élémentaire démontrant ainsi l'absence de S₈ dans l'échantillon.

Le même résultat a été observé sur les échantillons analysés par EELS (Fig. 29D). Sur les coupes fines, aucun soufre n'a été détecté, ni dans le corps du nématode, ni dans le manteau bactérien, ni dans les granules inclus dans chaque symbiote bactérien. Comme prévu, ni l'analyse en EELS, ni celle en microspectrométrie Raman, sur les différentes parties de l'échantillon inclus en résine n'a permis la détection du soufre. Ce résultat confirme clairement que la préparation des organismes pour les analyses en MET (ATEM) est responsable de la perte du soufre.

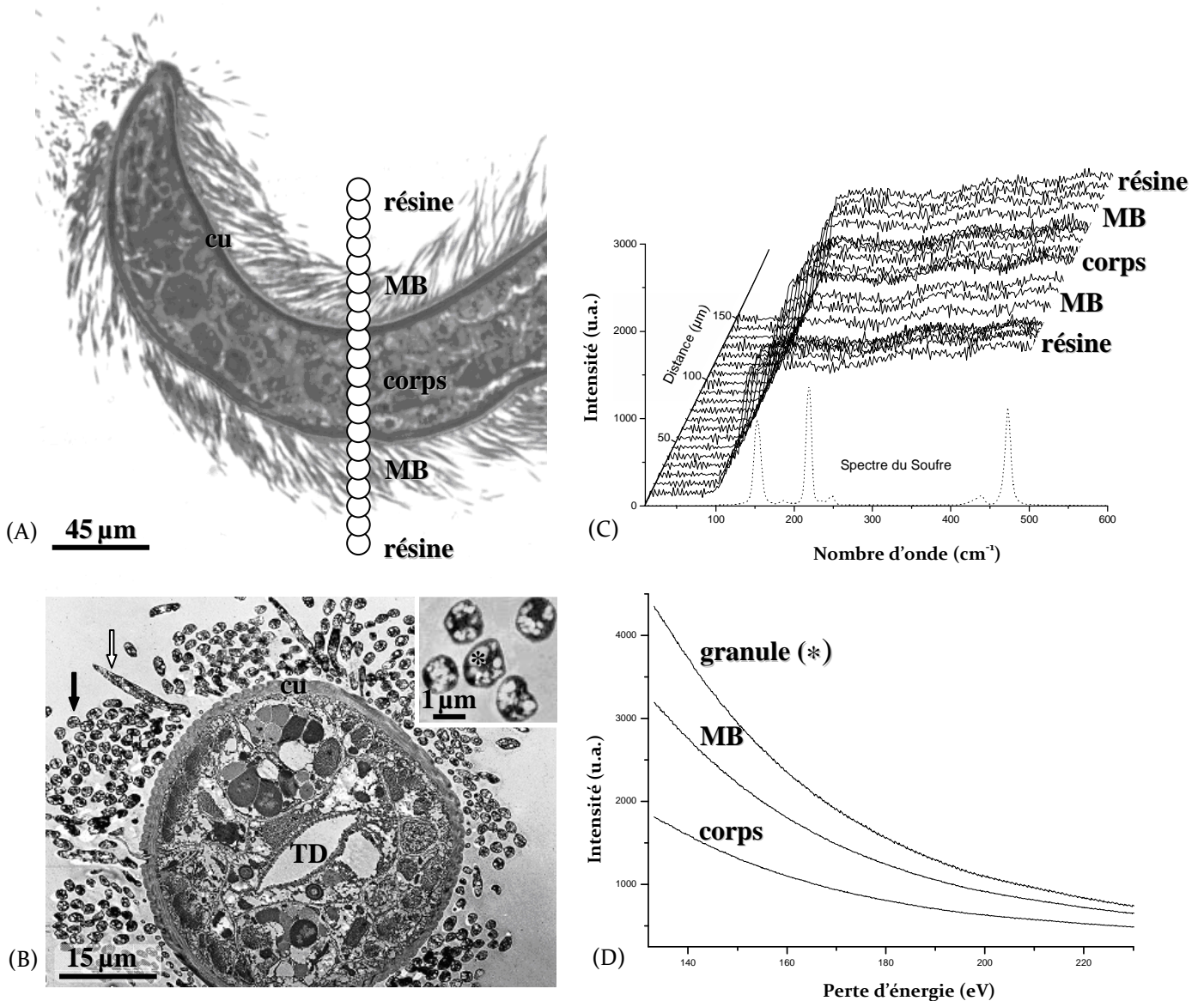


Figure 29 : Analyse du soufre par microspectrométrie Raman et EELS sur un nématode symbiotique *E. dianae* inclus en résine LR White.

(A) Microscopie optique d'une coupe longitudinale semi-fine (0,5μm) du nématode inclus en résine. Les filaments bactériens qui constituent le manteau bactérien (MB) sont situés sur la cuticule (cu) du nématode à l'intérieur duquel sont observés plusieurs organes internes. Le scan Raman est constitué de 20 spectres couvrant une distance de 158μm et représentés par les cercles blancs.

(B) Observation en MET d'une coupe fine (60nm) de *E. dianae* inclus en résine LR White. Présence du tube digestif vide (TD) et de différents organes libres de toutes bactéries dans le corps du nématode. Le manteau bactérien extracellulaire entourant la cuticule (cu) du nématode est composé de coupes transversales (flèche noire) et longitudinales (flèche blanche) de bactéries de la même espèce. [insert : Agrandissement de quelques bactéries en coupes transversales. Présence de granules translucides (*) qui correspondent normalement aux grains de soufre élémentaire (détectés par microspectrométrie Raman sur les organismes vivants)].

(C) Série de spectres Raman acquis à travers l'échantillon inclus en (A). Le spectre en pointillé correspond au soufre élémentaire S₈. Comme pour l'analyse en perte d'énergie, aucun soufre n'est détecté lors du scan Raman dans le nématode inclus en résine.

(D) Spectres de perte d'énergie collectés sur la même coupe fine présentée en (B). Le soufre n'est détecté ni dans le corps du nématode, ni dans son manteau bactérien (MB) ni dans les granules translucides (Ahn & Krivanek, 1983).

c. Analyse Raman sur un bivalve endosymbiotique

Afin de confirmer l'efficacité de la microspectrométrie Raman pour la détection de soufre élémentaire dans les différents types d'organismes sulfo-oxydants, nous avons utilisé cette technique sur un model endosymbiotique.

Le bivalve tropical *Codakia orbicularis* a été choisi pour cette analyse. Il colonise le même environnement soufré réduit que le nématode *E. diana*e (l'herbier à *Thalassia testudinum*) et possède des bactéries thioautotrophiques dans des cellules spécialisées, les bactériocytes, au niveau du tissu branchial (Frenkiel & Moueza, 1995) (Fig. 30A). A partir d'une branchie disséquée sur un animal vivant puis congelée pour conservation, un transect Raman a été réalisé. La figure 30B montre la localisation et le déplacement de la sonde lors de l'analyse pour obtenir le profil d'intensité du soufre dans ce tissu. La figure 30C montre une sélection de deux spectres Raman acquis respectivement dans l'eau de mer dans laquelle est maintenu le bivalve pendant l'analyse et dans le tissu branchial. Le soufre est clairement détecté dans ce tissu, alors qu'aucun des trois pics caractéristiques du soufre élémentaire S_8 à 160cm^{-1} , 225cm^{-1} et 480cm^{-1} n'est observé dans l'eau environnante. Le profil d'intensité du soufre à 225cm^{-1} , caractéristique de la diffusion Raman en fonction du déplacement de la sonde, est représenté en figure 30D. Cette analyse démontre évidemment la présence de soufre dans la branchie de *C. orbicularis*, présence qui a été précédemment étudié et localisé dans le périplasme des endosymbiotes sulfo-oxydants bactériens par Lechaire *et al.* (2008).

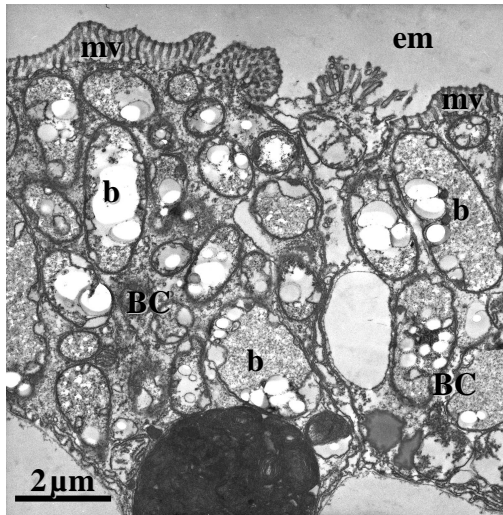
Figure 30 Détection du soufre par microspectrométrie Raman sur la branchie d'un bivalve symbiotique *C. orbicularis*.

(A) Observation au MET (O. Gros) de deux bactériocytes (BC) de la zone latérale d'un filament branchial du bivalve *C. orbicularis* inclus en résine LR White. Ces bactériocytes ont des microvilli (mv) au pôle apical qui leur permettent d'augmenter le contact avec l'eau de mer (em) environnante. Le cytoplasme est remplie de bactéries (b) thioautotrophes qui sont individuellement confinées dans des vacuoles du bactériocyte.

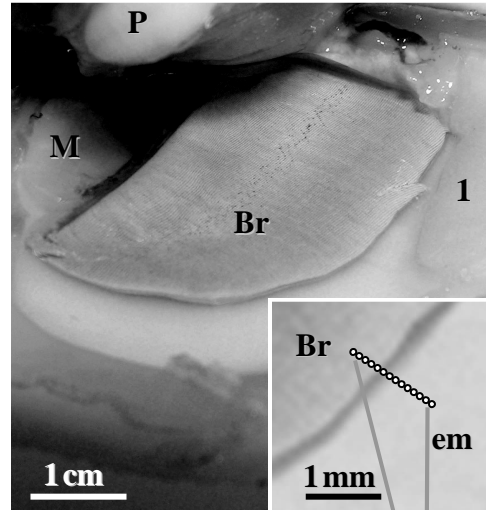
(B) Vue générale d'un individu adulte de *C. orbicularis* fraîchement collecté dans laquelle une valve a été enlevée. Observation de la branchie (Br) du pied (P) et l'animal et de son manteau (M). [insert : Agrandissement d'une partie de la branchie où a été réalisé le scan Raman de 30 points couvrant une distance de $1200\mu\text{m}$ entre la branchie et l'eau de mer et représentés par les ronds blancs.]

(C) Sélection de deux spectres Raman extraits des données du profil Raman et collectés l'un sur la branchie et l'autre dans l'eau de mer. Ces spectres mettent en évidence la présence des trois pics caractéristiques du soufre S_8 dans la branchie alors qu'il n'est pas détecté dans l'eau environnante.

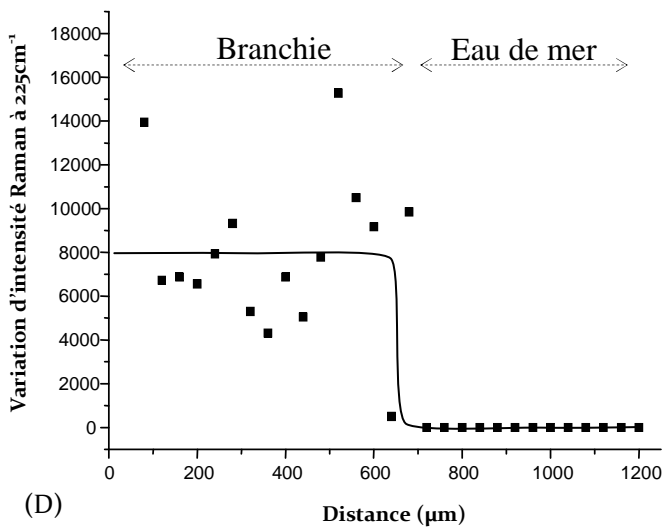
(D) Profil d'intensité Raman à 225 cm^{-1} en fonction du déplacement de la sonde lors du scan. L'intensité maximum caractéristique de la détection du soufre est observée dans la branchie du bivalve alors qu'elle est nulle (pas de soufre) à l'extérieur.



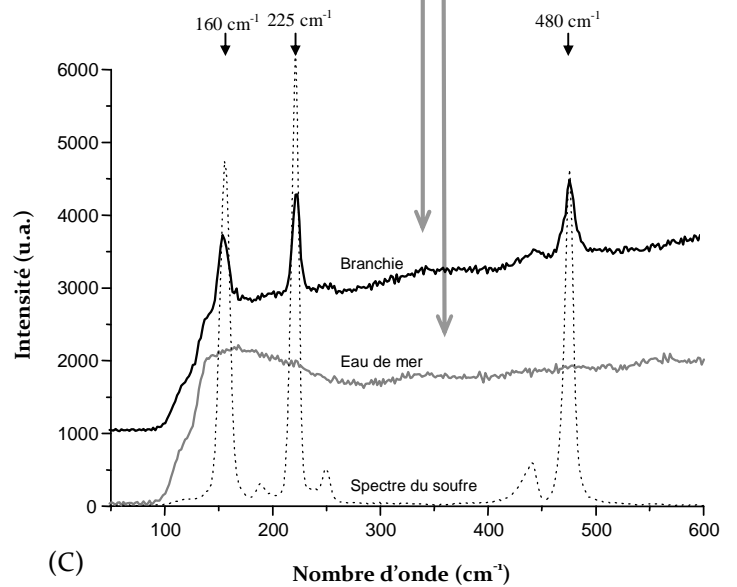
(A)



(B)



(D)



(C)

3.3 Caractérisation moléculaire

a. Caractérisation des bactéries symbiotiques

Quatre nématodes ont été analysés en FISH : *E. hopperi*, *Robbea* sp.1, *Robbea* sp.2 et *Stilbonema* sp.. Des problèmes d'autofluorescence de la cuticule ont été observés sur les coupes des différents morphotypes analysés (Fig. 31D). Cependant, le signal positif ou négatif dû à la présence ou à l'absence des bactéries a pu être clairement distingué. Le DAPI a confirmé ce problème d'autofluorescence de la cuticule mais aussi la présence de noyaux procaryotes sur le pourtour des coupes de nématodes (Fig. 31B). De même, les résultats d'hybridations avec les sondes EUB et NON EUB démontrent la différence entre un signal et une absence de signal malgré l'autofluorescence. Tous les nématodes présentant un manteau bactérien ont émis une fluorescence avec la sonde spécifique des Eubactéries et des Gammaprotéobactéries (Fig. 31E-F). Plusieurs sections de chaque nématode ont été analysées et aucune fluorescence à l'intérieur des individus n'a été mise en évidence au niveau des organes internes tel que le tube digestif.

Le Card-FISH a été utilisé sur des coupes semi-fines (1µm) de nématodes inclus en résine LRWhite. Une coloration histologique au bleu de toluidine avant les hybridations en Card-FISH a permis de sélectionner les coupes et d'observer la répartition du manteau bactérien sur la cuticule des nématodes (Fig. 31A). Cinq nématodes ont été analysés : *E. diana*e, *E. hopperi*, *Robbea* sp.1, *Robbea* sp.2 et *Stilbonema* sp.. Tous ces nématodes excepté *E. diana*e ont émis une fluorescence avec la sonde HRP-EUB338 sur le pourtour de leur cuticule (Fig. 31C), permettant ainsi de confirmer la présence de bactéries extracellulaires appartenant aux Eubactéries. Le Card-FISH a été testé afin d'obtenir un signal plus net qu'en FISH et valider ainsi la positivité de la fluorescence obtenue en FISH.

Les analyses en FISH et CARD-FISH de chacun des nématodes, ont permis de confirmer l'appartenance des bactéries extracellulaires aux Eubactéries et plus particulièrement au groupe des γ - Protéobactéries. Cependant, aucune hybridation n'a fonctionné sur le nématode *E. diana*e.

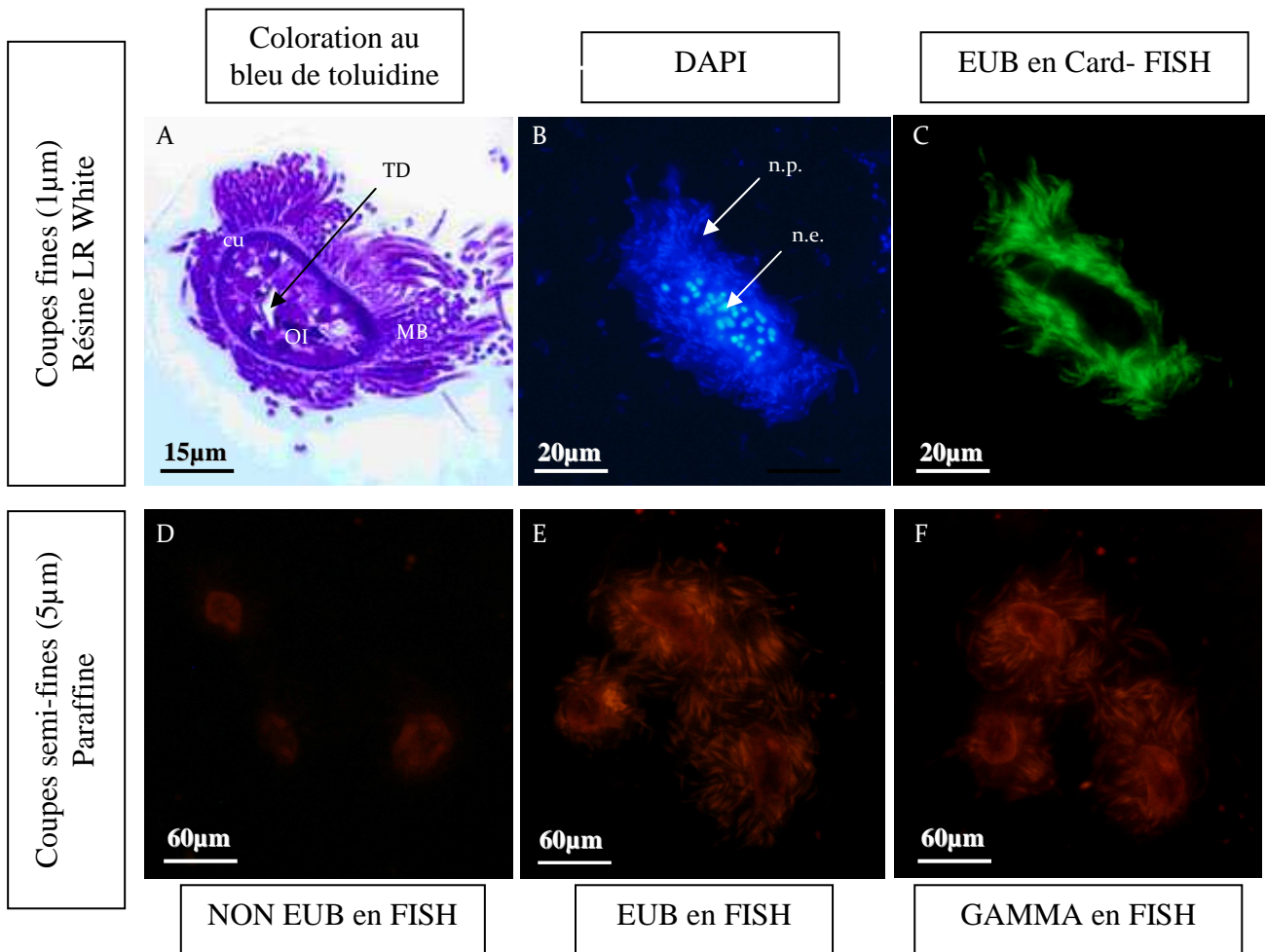


Figure 31: Hybridations moléculaires en FISH et Card-FISH sur le nématode *E. hopperi*.

(A) Coupe histologique colorée au bleu de toluidine. Observation des organes internes (OI) et de la lumière du tube digestif (TD) à l'intérieur de la section du nématode. Présence du manteau bactérien (MB) recouvrant la cuticule (cu) du nématode.

(B) Hybridation du fluorochrome DAPI mettant en évidence les noyaux eucaryotes (n.e.) à l'intérieur du nématode et les noyaux procaryotes (n.p.) à l'extérieur de celui-ci.

(C) Hybridation en Card-FISH de la sonde spécifique des Eubactéries. Positivité de la fluorescence au niveau du manteau bactérien.

(D) Hybridation en FISH de la sonde NON EUB sur une coupe de trois sections de nématode inclus en paraffine. Observation d'une légère autofluorescence de la cuticule du nématode.

(E) Hybridation en FISH de la sonde spécifique des Eubactéries. Autofluorescence de la cuticule et positivité de la fluorescence au niveau du manteau bactérien.

(F) Hybridation en FISH de la sonde spécifique de Gammaprotéobactéries. Autofluorescence de la cuticule et positivité de la fluorescence au niveau du manteau bactérien.

b. Identification moléculaire des nématodes hôtes et de leurs symbiotes

Aucune technique d'extraction d'ADN suivie d'une PCR n'a permis d'obtenir une quantité suffisante d'ADNr 18S et 16S pour réaliser le séquençage. La faible quantité initiale de nématodes collectés dans l'herbier n'était pas suffisante pour amplifier l'ADNr 18S des nématodes hôtes ni l'ADNr 16S de leurs symbiotes.

Les hybridations moléculaires réalisées en FISH, à partir des amorces spécifiques des nématodes du genre *Robbea* et *Stilbonema*, ont validé nos identifications morphologiques, puisque nous avons obtenu une fluorescence sur les organismes testés. Le nématode *E. hopperi* retrouvé en majorité dans le sédiment d'herbier à *T. testudinum* a été utilisé comme témoin négatif. Aucune autofluorescence n'a été détectée sur cet organisme, confirmant la spécificité et la positivité du résultat sur les autres nématodes analysés.

3.4 Ecologie de la méiofaune dans les écosystèmes étudiés

a. Analyse physico-chimique de l'herbier à *Thalassia testudinum*

Les valeurs de concentration en H_2S obtenues dans l'eau interstitielle d'une carotte de sédiment d'herbier ont montré un gradient allant de $10\mu M$ en surface du sédiment à $30\mu M$ plus en profondeur. Ces données mettent en évidence que l'herbier à *T. testudinum* est un environnement faiblement réduit avec une zone oxygène en surface très peu réduite et une zone plus réduite en profondeur. Le prélèvement d'eau interstitielle ne permet pas une localisation précise des concentrations en sulfures obtenues, mais permet d'avoir un aperçu de sa distribution dans le sédiment. La figure 32 montre la carotte de sédiment d'herbier ouverte en deux dans laquelle les mesures ont été réalisées. La couche oxygène de surface, de couleur claire, est très fine et difficilement séparable du reste de la carotte. Rapidement, le sédiment devient sombre et caractéristique d'un milieu réduit pauvre en oxygène.

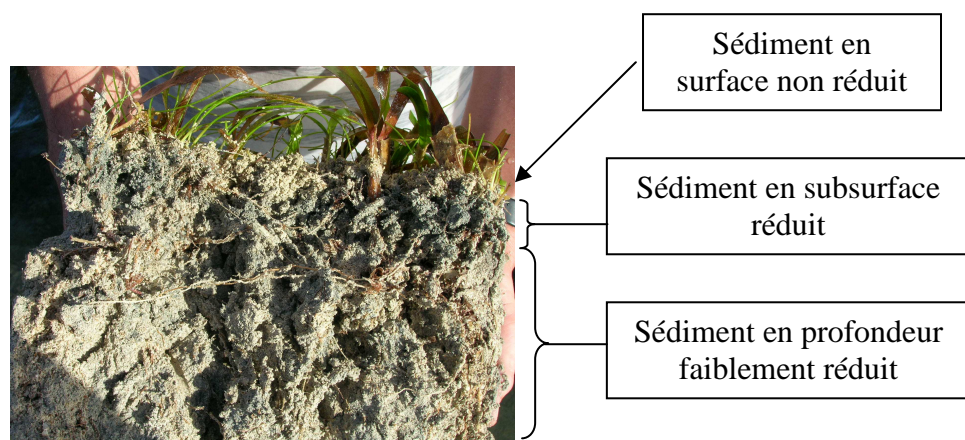


Figure 32 : Carotte ouverte de sédiment d'herbier à *T. testudinum*.

Les phanérogames marines sont disposées sur une couche fine de sédiment de surface (oxygène et non réduite) puis enracinées plus profondément dans un sédiment plus réduit.

b. Analyse physico-chimique du sédiment de mangrove

Cette analyse physico-chimique du sédiment de mangrove a été réalisée en 2008.

Des mesures physico-chimiques témoins ont été réalisées dans le sédiment de la lagune, à distance du casier. Les mesures de concentration de H₂S total à t₀ montrent qu'en surface et jusqu'à 2cm de profondeur les sulfures ne sont pas détectables. Par contre, ils commencent à être décelés à 5cm avec une concentration de 285μM puis à 10cm avec 715μM (Fig. 33). Il y a donc une augmentation de la concentration en sulfures liée à la profondeur dans le sédiment.

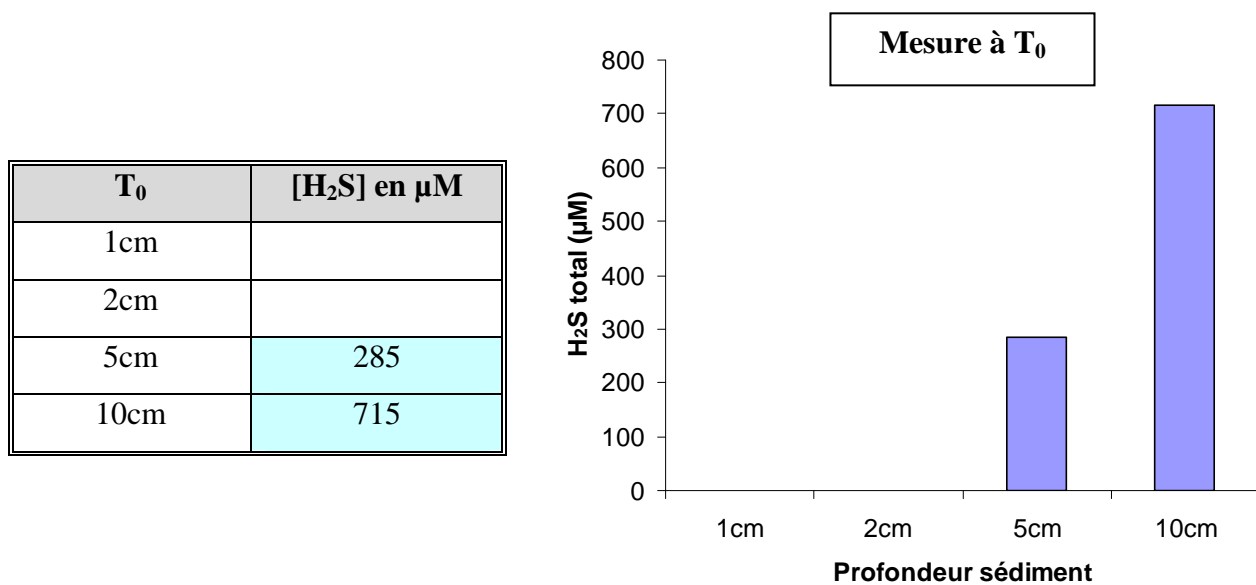


Figure 33 : Mesures de la concentration en H₂S total dans le sédiment de la lagune de la manche-à-eau en mangrove, à 1m50 de profondeur, avant l'immersion du casier de bois sur le sédiment.

Des mesures ont ensuite été effectuées après 15 jours et 1 mois d'immersion du casier sur un transect allant du casier jusqu'à 5m de distance de celui-ci. Les données à 5m de distance du casier n'ont pas pu être exploitées en raison d'une dérive des valeurs enregistrées par les capteurs.

Les mesures réalisées à 15 jours d'immersion du casier (Tab. 11) montrent qu'au niveau du casier les sulfures sont détectés à partir de 2cm de profondeur et que leurs concentrations augmentent avec l'enfoncement dans le sédiment. Les concentrations sont 5 fois à 10 fois plus élevées que le témoin à 5cm et 10cm de profondeur. Ces mesures peuvent laisser supposer un enrichissement du sédiment lié à la dégradation du bois. Il y a donc une augmentation des concentrations en sulfures dans le sédiment par rapport au témoin à t₀

(couleur rose dans le tableau des valeurs) mais cette augmentation bien que présente au niveau du casier est plus importante à 1m et surtout à 2m de celui-ci.

15 jours	[H ₂ S] en μM		
	casier	1m	2m
1cm			10
2cm	100		200
5cm	1000	2000	2000
10cm	1800	3000	10000

Tableau 11 : Récapitulatif des valeurs de concentration en H₂S total obtenues après 15 jours d'immersion du casier de bois sur 10cm de profondeur et jusqu'à 2m d'éloignement.

La couleur rose correspond aux valeurs supérieures à celles du témoin à t₀.

Les mesures à 1 mois d'immersion du casier de bois (Tab. 12) ne montrent presque plus de H₂S au niveau du casier. Seulement 200μM sont détectés à 10cm de profondeur dans le sédiment (couleur verte) alors que à 1m de distance les concentrations sont encore élevées avec près de 5mM de sulfures à 10cm de profondeur (couleur rose). Par contre, à 2m du casier les concentrations redeviennent proches de celles du témoin (couleur bleu).

1 mois	[H ₂ S] en μM		
	casier	1m	2m
1cm			
2cm		200	
5cm		2300	200
10cm	200	4800	600

Tableau 12 : Récapitulatif des valeurs de concentration en H₂S total obtenues après 1 mois d'immersion du casier de bois sur 10cm de profondeur et jusqu'à 2m d'éloignement.

La couleur rose correspond aux valeurs supérieures à celles du témoin à t₀. La couleur verte aux valeurs inférieures et la couleur bleue aux valeurs similaires.

Les mesures après 1 mois ½ d'immersion du bois (Tab. 13) montrent que les concentrations en sulfures sont redevenues proches de celles du témoin au niveau du casier et à 5m de distance de celui-ci. Par contre elles restent élevées à 1m de distance du casier avec des concentrations 2 à 5 fois supérieures à celles du témoin.

1 mois ½	[H ₂ S] en µM		
	casier	1m	2m
1cm			
2cm			200
5cm	100	1400	200
10cm	400	1200	600

Tableau 13 : Récapitulatif des valeurs de concentration en H₂S total obtenues après 1 mois ½ d'immersion du casier de bois sur 10cm de profondeur et jusqu'à 2m d'éloignement.

La couleur rose correspond aux valeurs supérieures à celles du témoin à t₀ et la couleur bleue aux valeurs similaires.

A partir de la figure 34, nous constatons que les mesures réalisées au niveau du casier de bois montrent un enrichissement du sédiment en H₂S à 15 jours d'immersion puis une disparition des sulfures à 1 mois et un retour à 1 mois ½ aux concentrations témoins. A 1m de distance du casier, les concentrations sont plus élevées qu'en conditions normales et en particulier à partir de 5cm de profondeur. A 2m du casier les concentrations en sulfures sont très importantes après 15 jours d'immersion puis redeviennent ensuite normales.

Le H₂S est détecté à partir de 5cm de profondeur pour tous les points d'analyse (excepté à 1 mois au niveau du casier). Au dessus de cette profondeur, aucun profil de distribution des sulfures n'est réellement exploitable et le plus souvent, la concentration est trop faible pour être détectée. De même pour les mesures effectuées à 3 mois d'immersion du casier, la calibration précédent l'analyse n'a pas fonctionné et les mesures obtenues *in situ* n'ont pas pu être exploitées. L'analyse ayant été réalisée une seule fois, aucun écart-type (ou intervalle de confiance) n'est visualisable sur les graphiques. Les mesures d'oxygène dissout menées en parallèle avec des mesures de pH et de concentration en H₂S dans le sédiment montrent sur tous les points analysés (proches et loins du casier) que le sédiment est anoxique dès les premiers millimètres sous la surface.

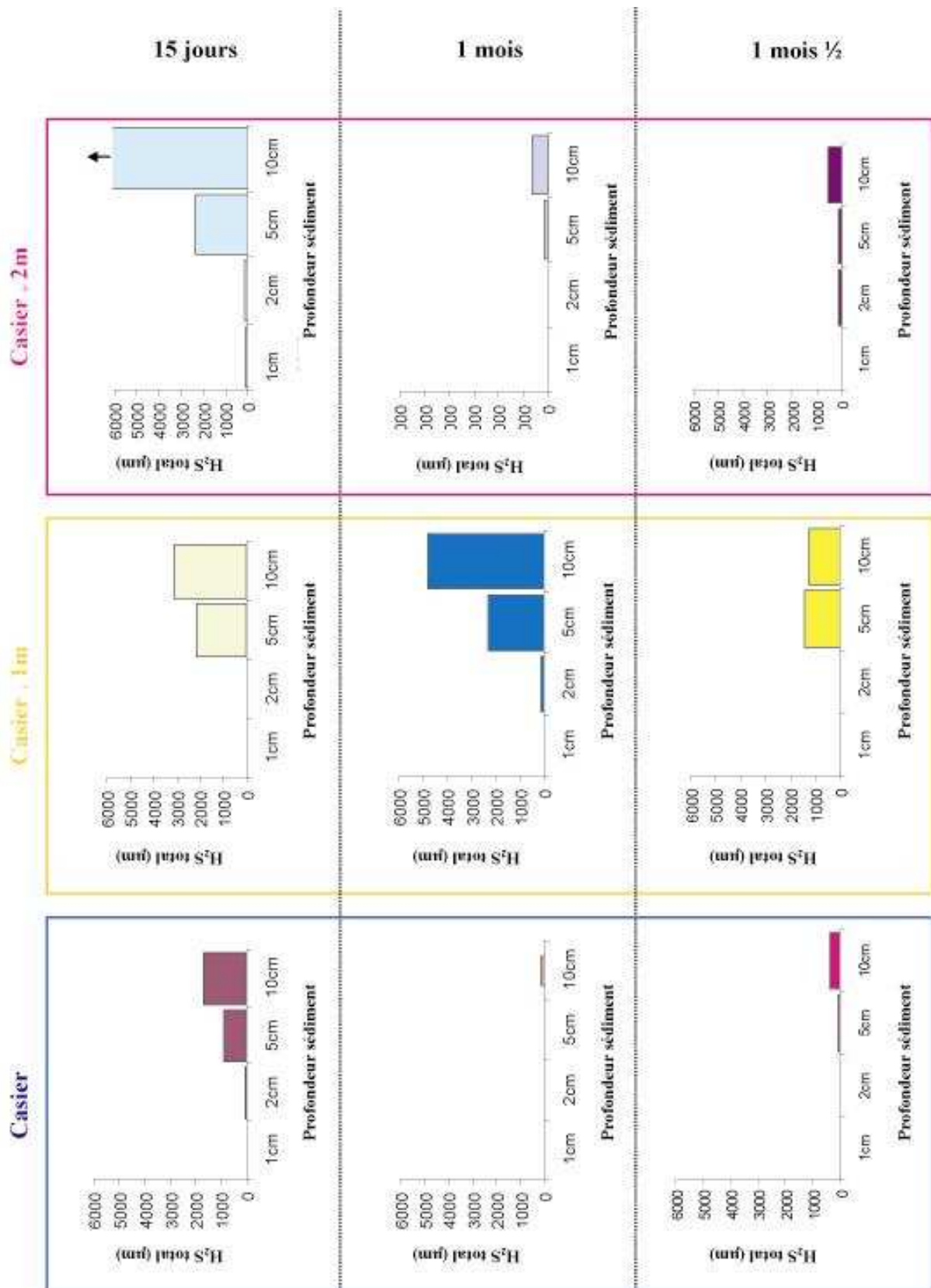


Figure 34 : Mesures à 15 jours d'intervalle pendant 1 mois 1/2 de la concentration en H₂S total au niveau du casier de bois et à distance de celui-ci (1m et 2m) en fonction de la profondeur dans le sédiment.

Suite à ces observations, il paraît difficile de lier l'influence du bois sur la chimie du sédiment. Le sédiment est apparemment trop hétérogène pour obtenir un profil d'émission de sulfures par la dégradation du bois dans le sédiment à distance du casier et en profondeur.

Cependant, une tendance peut être observée si les données à 1 mois au niveau du casier sont erronées, nous pouvons alors constater un enrichissement en sulfures à 15 jours du sédiment. Ces concentrations restent élevées jusqu'à 1m de distance du casier après 1 mois d'immersion puis redeviennent stables à partir de 1 mois ½.

c. Répartition de la nématofaune dans le sédiment de mangrove

Lors de la première analyse en 2008, un unique échantillonnage de la nématofaune a été effectué. Cette étude a été répétée en 2009 et un double échantillonnage a été réalisé afin de valider les précédents résultats et d'obtenir un aperçu général de la répartition de la nématofaune en fonction des émissions de sulfures conséquence de la dégradation du bois dans le temps.

Lors de la première expérimentation en 2008, (Fig. 35A) les nématodes sont retrouvés les quinze premiers jours en majorité à proximité immédiate du casier de bois puis cette majorité se déplace aux alentours des 2m jusqu'à 1 mois ½ d'immersion. Un second pic de forte densité de nématodes est observé à 3 mois à proximité immédiate du casier puis la densité des nématodes redevient normale, c'est-à-dire proche de la densité initiale, à 4 mois. A 5m de distance du casier la quantité de nématodes semble rester stable tout au long de l'expérimentation.

En 2009, l'analyse quantitative de la nématofaune montre un autre profil que celui de 2008 (Fig. 35B-C). Les nématodes sont retrouvés en majorité à 2m du casier pendant les quinze premiers jours d'immersion du casier (ainsi qu'à 5m lors de la seconde analyse), alors qu'aucune variation n'est constatée sous le casier et à 5m. A 1 mois et 1 mois ½ d'expérimentation, l'ensemble de la nématofaune est retourné à son niveau de densité initial.

Suite à ces observations aucun profil de distribution des nématodes en fonction de la distance du casier n'a pu être établi, entre les manipulations de 2008 et celles de 2009. Il a donc été décidé de ne pas continuer les prélèvements à 3 mois et 4 mois.

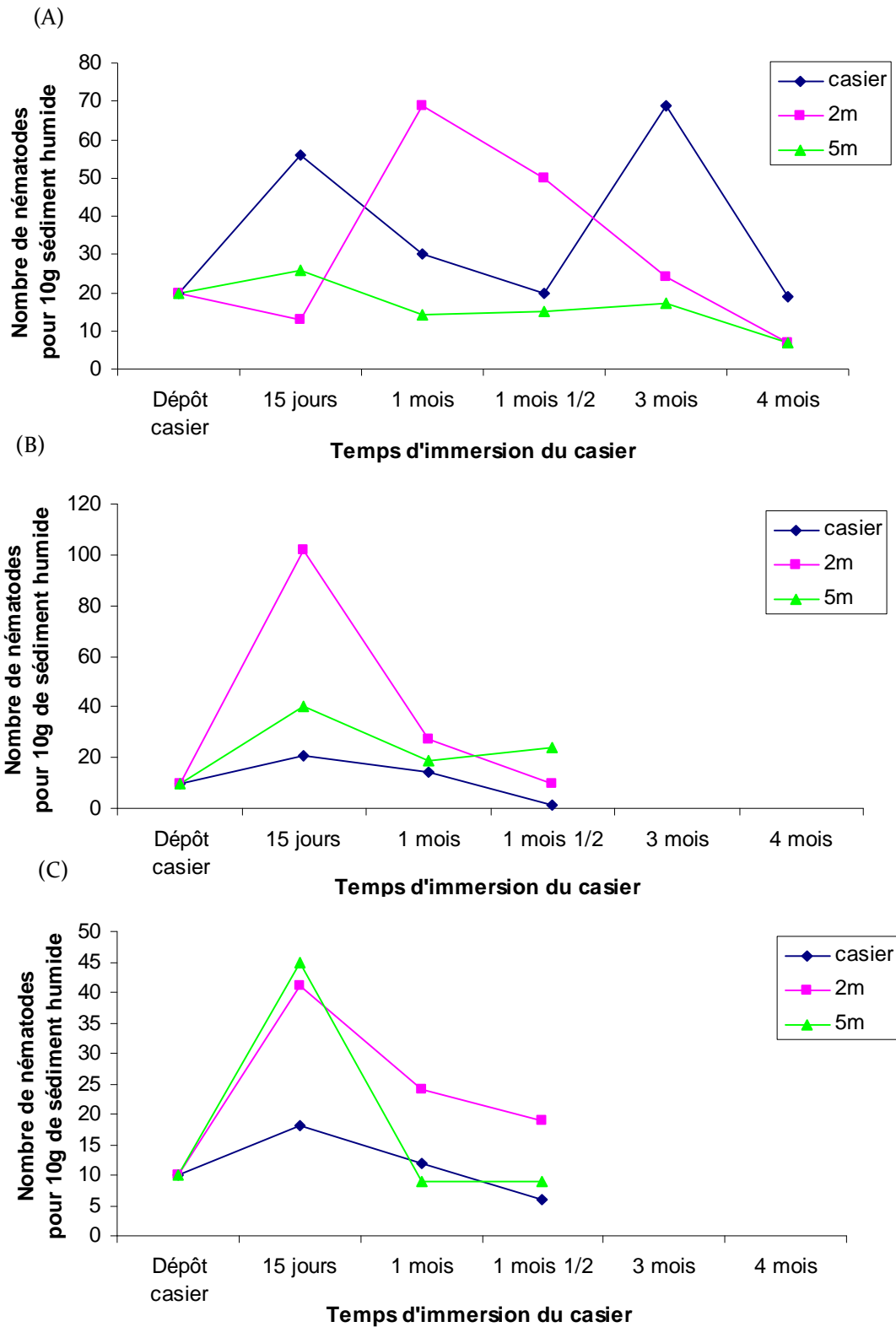


Figure 35 : Quantification et distribution de la nématofaune en fonction du temps d'immersion du casier de bois.

(A) de février 2008 à juin 2008 ;

(B) de janvier 2009 à mars 2009 - Premier échantillonnage ;

(C) de janvier 2009 à mars 2009 - Deuxième échantillonnage.

Le nématode *E. diana*e a aussi été retrouvé dans le sédiment de mangrove. Il a été recensé uniquement lors de la première étude de la nématofaune en 2008 (Fig. 36). Sachant qu'il est retrouvé habituellement entre 0 et 3 individus dans 10g de sédiment humide en absence du casier de bois, ce nématode symbiotique a été observé en plus grande quantité proche du casier à 15 jours d'immersion puis à 1 mois ½ et 3 mois. A 2m du casier, *E. diana*e est en plus forte densité à 3 mois d'immersion du casier alors qu'à 5m il reste proche de la quantité témoin. Cependant sa faible densité ne permet pas de lier directement sa présence aux émissions de sulfures produites par la dégradation du bois. Il est toutefois observable que sa brusque diminution à 1 mois d'immersion proche du casier correspond à l'absence de sulfures mesurée dans le sédiment.

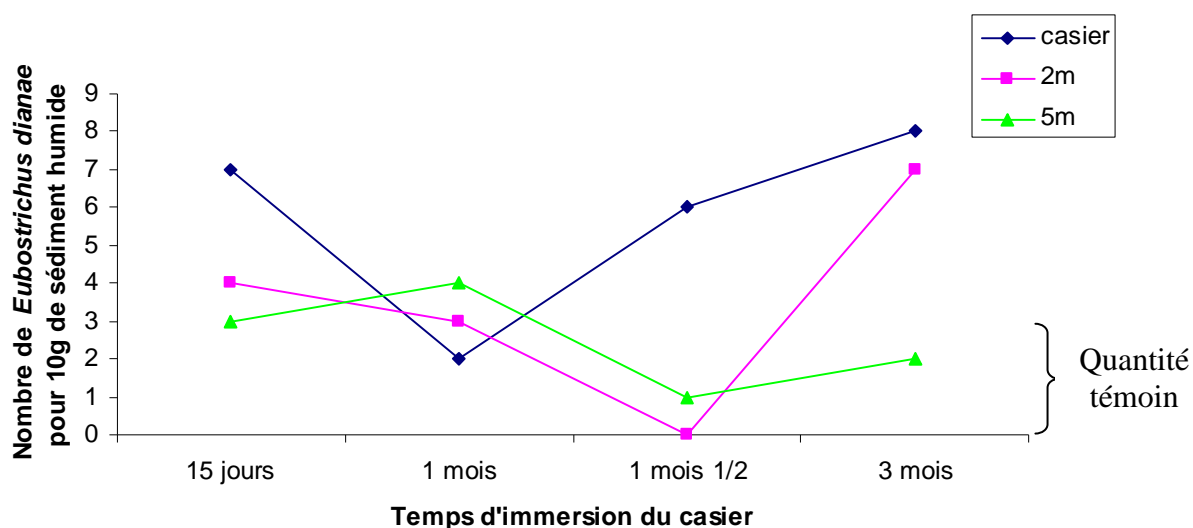


Figure 36 : Quantification et distribution du nématode *Eubostrichus diana*e en fonction du temps d'immersion du casier de bois.

Une observation individuelle des nématodes a ensuite été réalisée afin de déterminer l'appartenance aux différents groupes trophiques de chacun des nématodes et ainsi évaluer leur répartition par rapport au casier de bois.

d. Identification de la nématofaune de mangrove : Taxonomie et groupe trophique

A partir des observations de la distribution des effectifs de nématodes dans le sédiment de mangrove en fonction du temps d'immersion du casier de bois, nous allons identifier les nématodes prélevés sur le transect casier-5m de distance. Cette expérimentation nous permettra d'évaluer l'impact du casier de bois, et plus particulièrement des émissions de sulfures conséquence de la dégradation du bois, sur la répartition trophique de la nématofaune dans le sédiment.

Lors de l'étude de la répartition de la nématofaune dans le sédiment de mangrove de la Manche-à-eau, nous avons essayé d'identifier l'ensemble des nématodes prélevés lors de la campagne d'échantillonnage de 2008 et 2009. Il a été difficile d'identifier jusqu'à l'espèce les nématodes collectés et seuls ceux remarquables par des caractéristiques très particulières ont été facilement nommés comme les nématodes *Croconema* sp. et *Pseudochromadora* sp. (Gourbault & Vincx, 1990). Ces deux nématodes portent leurs œufs sur leur corps dans le milieu environnant.

Le nématode *Croconema otti* est caractérisé par la présence de ses œufs non pas dans l'utérus de l'animal mais attachés à l'extérieur du corps de la femelle (Fig. 37A). Les œufs séparés les uns des autres sont tous au même stade de développement. Ce nématode possède aussi une capsule céphalique bien marquée (Fig. 37A) et une queue conique effilée (Fig. 37B). La cuticule est annelée de la capsule céphalique jusqu'à l'effilement de la queue. Sur la dernière partie conique de la queue (Fig. 37B) sont présents des pores d'ornementation. Au niveau de la partie céphalique, de nombreuses soies courtes sont détectables et caractéristiques de l'espèce comme l'amphide qui est circulaire et bien apparente (Fig. 37C).

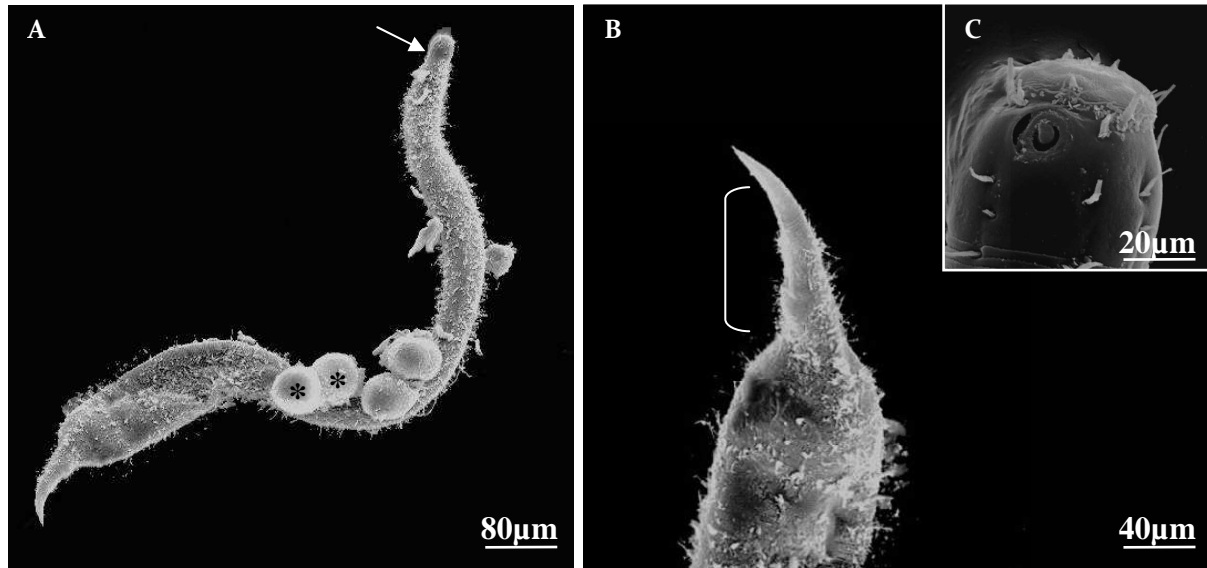


Figure 37 : Observation au MEB du nématode *Croconema otti*.

(A) Allure générale du nématode avec la présence d'une capsule céphalique démarquée par la flèche blanche. Les œufs sont portés à l'extérieur sur le corps de la femelle (*).

(B) Agrandissement de la partie postérieure du nématode mettant en évidence l'effilement de la queue avec une partie conique (accolade blanche) de largeur réduite par rapport au reste du corps.

(C) Agrandissement de la partie céphalique. Observation de l'amphide circulaire et bien marquée et des nombreuses soies céphaliques.

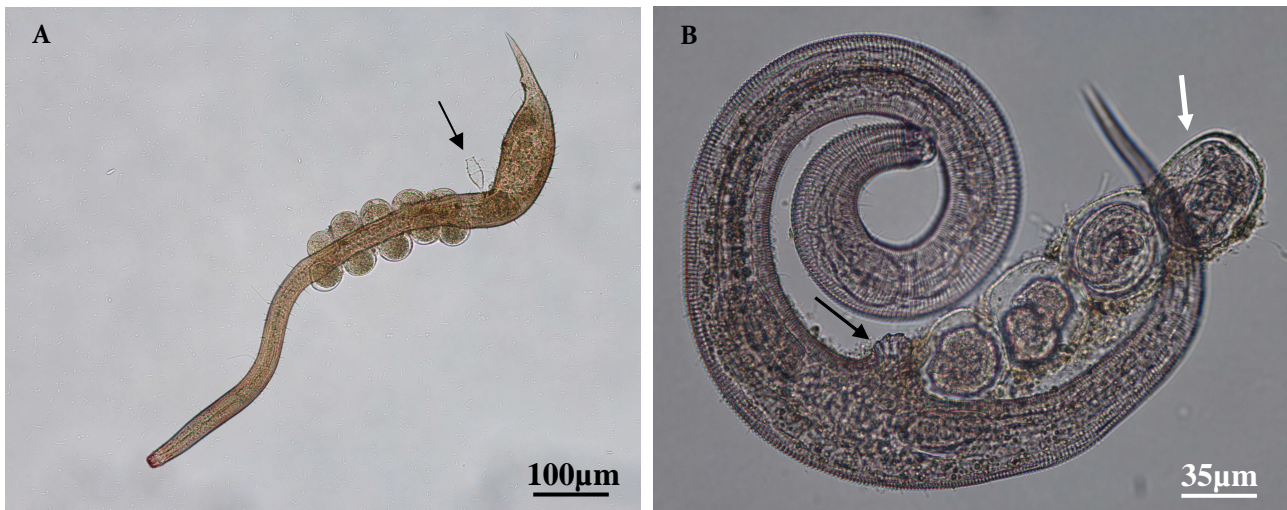


Figure 38 : Comparaison au microscope photonique de deux espèces de nématodes portant leurs œufs à l'extérieur.

(A) Allure générale de *Croconema otti*. Sa partie postérieure est conique puis effilée et porte un *Suctorium* (cilié) (flèche noire). Les œufs sont répartis deux par deux sur la partie latérale du nématode.

(B) Allure générale de *Pseudochromadora incubans*. Sa partie postérieure est effilée. Les embryons sont à des stades de développement différents et sont portés l'un derrière l'autre à partir de la vulve du nématode qui présente un renflement (flèche noire). L'œuf le premier expulsé contient l'embryon le plus développé (flèche blanche).

Des ciliés du genre *Suctorina* (Phyllopharyngea) sont régulièrement retrouvés attachés sur la partie postérieure des nématodes (Fig. 38A).

Le nématode *Pseudochromadora incubans* porte ses œufs au niveau de la région vulvaire avec un renflement à l'accrochage (Fig. 38B). Les embryons sont à un stade de développement différent et l'œuf le plus éloigné contient l'embryon le plus développé. La capsule céphalique est bien marquée et la cuticule fortement annelée. La queue est uniquement effilée et ne présente pas le décrochage conique observé chez *Croconema otti*. Quelques soies céphaliques sont présentes ainsi qu'une petite amphide bien arrondie et marquée.

Les individus collectés, lors de l'échantillonnage de 2008 et 2009, à 15 jours et 1 mois d'immersion du casier de bois sur le sédiment de mangrove, ont été regroupés en plusieurs morphotypes dont 24 ont pu être identifiés (Tab. 14). Parmi ces 24 morphotypes sont représentés les nématodes du genre *Croconema* et *Pseudochromadora* et l'espèce *Eubostrichus diana*, tous précédemment décrits. En raison d'un grand nombre d'individus collectés lors de l'échantillonnage, il a été décidé de limiter la description de la diversité de la nématofaune à 15 jours et 1 mois d'immersion du casier de bois.

Les 24 morphotypes recensés lors de notre étude sont illustrés par microscopie photonique en annexe 8. Les morphotypes 2 et 3 correspondent à la même espèce mais le morphotype 2 n'a pas été collecté dans le sédiment de lagune témoin. Il a donc été décidé de séparer ces deux morphotypes pour l'étude des indices écologiques.

Morphotypes	Identifications taxonomiques	Groupes trophiques (Moens & Vincx, 1997)	Groupes trophiques (Jensen, 1987)
Morphotype 1	<i>Crenopharynx</i>	Détritivore	Détritivore
Morphotype 2 et 3	<i>Gomphonema</i> ♂ et ♀	Herbivore	Herbivore
Morphotype 4	<i>Daptonema</i>	Détritivore	Détritivore
Morphotype 5	<i>Terschellingia brevicauda</i>	Microvore	Détritivore
Morphotype 6	<i>Chromaspirina</i>	Détritivore	Détritivore
Morphotype 7	<i>Oncholaimus</i>	Prédateur facultatif	Prédateur
Morphotype 8	<i>Laimella</i>	Détritivore	Détritivore
Morphotype 9	Chromadoridae	Herbivore	Herbivore
Morphotype 10	<i>Richtersia</i>	Détritivore	Détritivore
Morphotype 11	Chromadoridae	Herbivore	Herbivore
Morphotype 12	<i>Gomphonema</i>	Herbivore	Herbivore
Morphotype 13	<i>Terschellingia</i>	Microvore	Détritivore
Morphotype 14	<i>Thalassironus</i>	Herbivore	Herbivore
Morphotype 15	Oncholaimidae	Prédateur facultatif	Prédateur
Morphotype 16	Desmodoridae	Herbivore	Herbivore
Morphotype 17	<i>Parapinnanema</i>	Détritivore	Détritivore
Morphotype 18	Chromadoridae	Herbivore	Herbivore
Morphotype 19	<i>Pseudochromadora</i>	Herbivore	Herbivore
Morphotype 20	<i>Monhystrella</i>	Détritivore	Détritivore
Morphotype 21	<i>Croconema</i>	Herbivore	Herbivore
Morphotype 22	Sphaerolaimidae	Prédateur	Prédateur
Morphotype 23	<i>Odontophora</i>	Consommateur de ciliés	Herbivore
Morphotype 24	<i>Eubostrichus diana</i>	Détritivore	Détritivore

Tableau 14 : Récapitulatif des 24 morphotypes collectés et identifiés dans le sédiment de mangrove. Les groupes trophiques sont identifiés à partir clés de détermination de Moens & Vincx (1997) et de Jensen (1987).

e. Interprétation statistique de la dynamique de la nématofaune de mangrove

- Echantillonnage de 2008 (mars-avril)

Par effectif d'espèces

Les indices écologiques (Tab. 15) calculés à partir des effectifs de chaque espèce dans le sédiment (Annexe 9) montrent que le peuplement de nématodes dans le sédiment est peu diversifié puisque l'indice de Shannon-Weaver (H') est faible comparé à la richesse spécifique ($\log_2 RS$). L'indice de Pielou met en évidence la présence d'une espèce dominante dans le peuplement puisque les valeurs obtenues sur tous les points d'échantillonnage sont faibles (proches de zéro). Peu de différences sont observées entre les stations (casier, 2,5m et 5m). Le manque d'un prélèvement témoin dans la lagune ne permet pas de conclure quant à l'éventuel impact du casier de bois sur la nématofaune. Le peuplement dominé par une espèce, détecté sur le transect analysé correspond peut-être à une période de reproduction d'une espèce. Dans le tableau 16 des abondances d'espèces, il apparaît clairement que le morphotype 13 correspondant au genre *Terschellingia* est présent en majorité dans tous les sites analysés.

	15 jours			1 mois		
	casier	2,5m	5m	casier	2,5m	5m
Indice de Shannon-Weaver (H')	0,99	0,53	0,84	0,55	0,72	0,39
Richesse Spécifique (RS)	14,00	10,00	6,00	10,00	11,00	9,00
Log₂ RS	3,81	3,32	2,58	3,32	3,46	3,17
Indice d'équitabilité (EN)	0,26	0,16	0,33	0,16	0,21	0,12

Tableau 15 : Indices de diversité spécifique et d'équitabilité calculés sur l'effectif des espèces collectées en mangrove (2008).

Identification	15 jours			1 mois		
	casier	2,5m	5m	casier	2,5m	5m
<i>Crenopharynx</i>	2,9%	2,3%		1,3%	1,6%	
<i>Gomphionema</i> ♂						
<i>Gomphionema</i> ♀	5,0%			5,1%		
<i>Daptonema</i>	2,1%	4,7%	14,3%	5,1%	1,6%	16,0%
<i>Terschellingia</i>	3,6%	4,7%		5,1%	5,7%	4,0%
<i>Chromaspirina</i>			4,8%		3,3%	
<i>Oncholaimus</i>						
<i>Laimella</i>	11,4%	23,3%		31,6%	26,8%	12,0%
Chromadoridae						
<i>Richtersia</i>	0,7%		4,8%			
Chromadoridae						
<i>Gomphionema</i>	2,1%					
<i>Terschellingia</i>	62,1%	41,9%	57,1%	39,2%	51,2%	28,0%
<i>Thalassironus</i>	0,7%			6,3%	2,4%	4,0%
Oncholaimidae	0,7%					
Desmodoridae	0,7%	2,3%				12,0%
<i>Parapinnanema</i>						
Chromadoridae	0,7%					4,0%
<i>Pseudochromadora</i>	2,1%	4,7%		1,3%	0,8%	
<i>Monhystrella</i>						
<i>Croconema</i>		4,7%				4,0%
Sphaerolaimidae		2,3%	4,8%	2,5%	3,3%	
<i>Odontophora</i>					0,8%	
<i>Eubostrichus diana</i>	5,0%	9,3%	14,3%	2,5%	2,4%	16,0%

	Prédateurs/Omnivores (2B)
	Détritivores (1A + 1B)
	Suceurs d'épistrates/Herbivores (2A)
	Sédiment lagune (Témoin)

Tableau 16 : Abondance relative des espèces de nématodes aux différents sites de prélèvement (2008).

Par groupes trophiques

L'étude des groupes trophiques démontre que les détritvires dominent le peuplement de mangrove (Tab. 17). Les prédateurs en minorité sur l'ensemble des prélèvements sont absents à 5m de distance du casier après d'immersion (Fig. 39). De même les herbivores sont absents à 5m du casier après 15 jours d'immersion (Fig. 39). La dominance des détritvires

s'explique par le fait que l'espèce dominante mise en évidence par l'analyse des effectifs est détritivore. En recommençant l'analyse sans prendre en considération ce morphotype, nous constatons de la même façon que le peuplement reste dominé par une espèce (*Laimella* sp.) avec une dominance des détritivores (*Laimella* sp. étant détritivore) (résultats non montrés).

Groupes trophiques (Jensen, 1987)	15 jours			1 mois		
	<i>casier</i>	2,5m	5m	<i>casier</i>	2,5m	5m
Prédateurs (2B)	0,7% (1)	2,3% (1)	4,8% (1)	2,5% (2)	3,3% (4)	0,0% (0)
Détritivores (1A + 1B)	87,9% (123)	86,0% (37)	95,2% (20)	84,8% (67)	92,7% (114)	76,0% (19)
Herbivores (2A)	11,4% (16)	11,6% (5)	0,0% (0)	12,7% (10)	4,1% (5)	24,0% (6)

Tableau 17 : Abondance relative des groupes trophiques de nématodes aux différents sites de prélèvement (2008). Le nombre entre parenthèse indique le nombre d'espèces par groupe trophique.

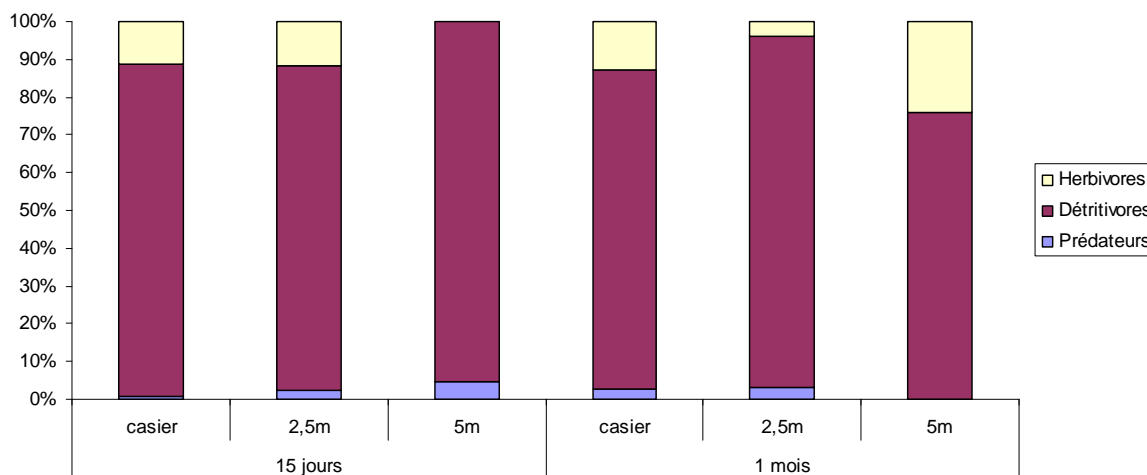


Figure 39 : Graphique représentatif des abondances 2008 des groupes trophiques de nématodes prélevés à 15 et 1 mois d'immersion du casier de bois et dans le sédiment de la lagune.

- Echantillonnage de 2009 (janvier-février)

Par effectif d'espèces

Lors du dénombrement et de l'identification des espèces présentes dans notre échantillonnage, nous avons constaté qu'aucun nématode de l'espèce *Eubostrichus diana* n'était présente. Un prélèvement témoin permet de comparer la nématofaune présente avant et après l'installation du dispositif de bois coulés sur le sédiment de mangrove.

Les indices écologiques (Tab. 19) calculés à partir des effectifs de chaque espèce dans le sédiment (Annexe 9) démontrent que le peuplement de nématodes dans le sédiment est bien diversifié puisque l'indice de Shannon-Weaver (H') est élevé, c'est-à-dire proche de la richesse spécifique ($\log_2 RS$). L'indice de Pielou met en évidence qu'il n'y a pas d'espèce dominante et que l'ensemble des espèces est bien représenté dans le peuplement puisque les valeurs obtenues sur tous les points d'échantillonnage sont élevées (proches de un). Peu de différences sont observées entre les stations (casier, 2,5m et 5m). Cependant, le peuplement est légèrement plus diversifié après 1 mois d'immersion du casier. Le prélèvement témoin réalisé dans la lagune avant l'immersion du casier de bois permet de repérer les espèces initialement présentes dans le sédiment de mangrove (Tab. 20). Il apparaît clairement que certains genres de nématodes comme *Daptonema*, *Gomphonema*, *Laimella* et *Terschellingia* constituent le peuplement de base de cet environnement à cette période puisqu'ils sont collectés dans le sédiment témoin et dans toutes les autres stations après immersion du casier (Tab. 20). Dans le tableau 20 des abondances d'espèces, le genre *Daptonema* est en majorité dans la plupart des sites analysés.

	T0	15 jours			1 mois		
	Sédiment lagune	casier	2,5m	5m	casier	2,5m	5m
Indice de Shannon-Weaver (H')	2,40	2,30	2,98	3,29	2,82	3,53	3,30
Richesse Spécifique (RS)	8	8	14	16	11	17	12
$\log_2 RS$	3	3	3,81	4	3,46	4,09	3,58
Indice d'équitabilité (EN)	0,80	0,77	0,78	0,82	0,82	0,86	0,92

Tableau 18 : Indices de diversité spécifique et d'équitabilité calculés sur l'effectif des espèces collectés en mangrove (2009).

Identification	T0	15 jours			1 mois		
	Sédiment lagune	casier	2,5m	5m	casier	2,5m	5m
<i>Crenopharynx</i>		2,4%	1,1%	0,9%			
<i>Gomphonema</i> ♂		12,2%	3,2%	8,6%		2,3%	5,7%
<i>Gomphonema</i> ♀	8,7%	29,3%	8,5%	23,3%	13,6%	3,4%	2,9%
<i>Daptonema</i>	43,5%	39,0%	23,4%	21,6%	27,3%	23,9%	5,7%
<i>Terschellingia</i>	8,7%	4,9%	2,1%	1,7%	2,3%	2,3%	5,7%
<i>Chromaspirina</i>		2,4%				4,5%	
<i>Oncholaimus</i>	4,3%	7,3%	1,1%	3,4%	15,9%	11,4%	11,4%
<i>Laimella</i>	21,7%	2,4%	29,8%	8,6%	22,7%	11,4%	20,0%
Chromadoridae			2,1%		2,3%		
<i>Richtersia</i>			2,1%				
Chromadoridae			1,1%	0,9%			2,9%
<i>Gomphonema</i>			4,3%	1,7%	2,3%	3,4%	
<i>Terschellingia</i>	4,3%		13,8%	2,6%		1,1%	2,9%
<i>Thalassironus</i>	4,3%		3,2%	3,4%	2,3%	3,4%	
Oncholaimidae			4,3%	4,3%	6,8%	13,6%	5,7%
Desmodoridae				12,1%	2,3%	1,1%	11,4%
<i>Parapinnanema</i>				3,4%		4,5%	8,6%
Chromadoridae	4,3%			2,6%		2,3%	
<i>Pseudochromadora</i>				0,9%			
<i>Monhystrella</i>					2,3%		
<i>Croconema</i>						6,8%	17,1%
Sphaerolaimidae						2,3%	
<i>Odontophora</i>						2,3%	

	Prédateurs/Omnivores (2B)
	Détritivores (1A + 1B)
	Suceurs d'épistrates/Herbivores (2A)
	Sédiment lagune (Témoin)

Tableau 19 : Abondance relative des différentes espèces de nématodes recensées aux sites de prélèvement (2009).

Par groupes trophiques

D'après le tableau 21 et la figure 40, nous remarquons que les détritvires sont majoritaires dans le sédiment de lagune (témoin). A 15 jours d'immersion du casier de bois, les détritvires ainsi que les herbivores sont largement représentés au niveau de celui-ci alors qu'à 2,5m les détritvires sont majoritaires et à 5m les herbivores sont légèrement plus nombreux que les détritvires. A 1 mois d'immersion du casier de bois, nous pouvons constater une augmentation de carnivores sur le transect étudié et une prédominance des détritvires au niveau du casier et à 2,5m alors qu'à 5m les herbivores sont aussi bien

représentés que les détritivores. Le casier de bois semble dans les 15 premiers jours attirer les herbivores. Après 1 mois d’immersion, la présence en plus grand nombre des prédateurs, pourrait être liée à l’attraction d’autres organismes par le casier de bois.

Groupes trophiques (Jensen, 1987)	T0	15 jours			1 mois		
	Sédiment lagune	casier	2,5m	5m	casier	2,5m	5m
Prédateurs (2B)	4,3% (1)	7,3% (3)	5,3% (5)	7,8% (9)	22,7% (10)	27,3% (24)	17,1% (6)
Détritivores (1A + 1B)	78,3% (18)	51,2% (21)	72,4% (68)	38,8% (45)	54,6% (24)	47,7% (42)	42,9% (15)
Herbivores (2A)	17,4% (4)	41,5% (17)	22,3% (21)	53,4% (62)	22,7% (10)	25% (22)	40% (14)

Tableau 20 : Abondance relative des groupes trophiques de nématodes au différents sites de prélèvement (2009). Le nombre entre parenthèse indique le nombre d’espèces par groupe trophique.

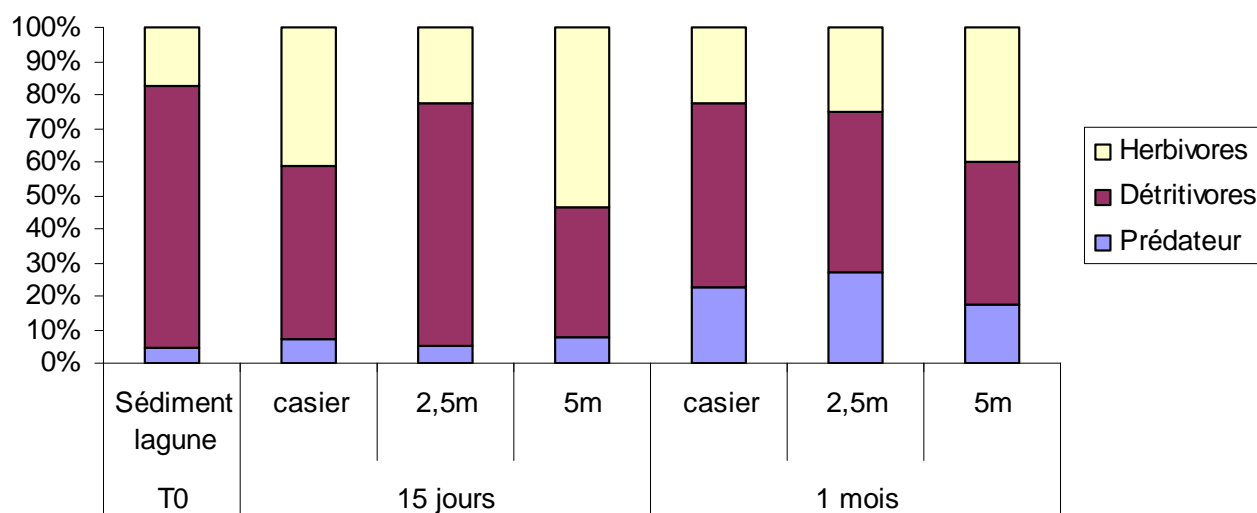


Figure 40 : Graphique représentatif des abondances 2009 des groupes trophiques de nématodes prélevés à 15 et 1 mois d’immersion du casier de bois et dans le sédiment de la lagune.

- Comparaison des deux périodes d'études

Les analyses réalisées en 2008 et en 2009 sont totalement différentes. Elles ne permettent pas d'établir une structure logique du peuplement de nématode dans le sédiment de mangrove et de mettre en évidence l'impact du casier de bois sur la nématofaune. L'analyse chimique du sédiment en 2008 démontre que le sédiment est très hétérogène et qu'il est difficile d'observer une influence du casier de bois sur les concentrations en sulfures dans le sédiment.

Concernant, la nématofaune, en 2008, le peuplement est constitué principalement par une espèce et il est dominé par des détritivores. Les nématodes sont répartis de manière aléatoire sur le transect étudié avec une forte densité de nématodes au niveau du casier après 15 jours d'immersion puis le peuplement devient plus abondant à 2m du casier après 1 mois d'immersion. La quantité de nématode collecté est redevenu proche de celle du témoin après 1 mois ½ d'immersion.

En 2009, la nématofaune est bien diversifiée avec une structure légèrement variable en fonction de la dégradation du casier de bois. Les nématodes sont en plus grande quantité à 2m et 5m du casier après 15 jours d'immersion pour ensuite être en quantité proche de celle du témoin lors des prélèvements suivants. Les détritivores sont majoritaires mais les herbivores sont assez abondants après 15 jours d'immersion du casier de bois alors que les carnivores apparaissent en plus grande quantité à 1 mois ½.

Ces observations mettent en évidence l'importance de réaliser des réplicats de manipulation et des témoins à différentes périodes afin d'éviter d'éventuelles interprétations finalement non fondées. De plus, le casier de bois (25cm³ environ) utilisé ne contenait peut-être pas assez de matériel pour émettre des sulfures en quantité suffisante dans le sédiment pour avoir un impact sur la nématofaune. Comme nous l'avons étudié précédemment, le sédiment de mangrove constitue déjà un milieu extrêmement riche en sulfures (§ 3.4.b).

3.5 *Détection par microspectrométrie Raman des organismes thiotrophiques de mangrove*

Un screening de la méiofaune associée au bois coulés de mangrove a été effectué par microspectrométrie Raman afin de détecter d'éventuelles associations bactériennes thioautotrophiques ou des organismes libres thiotrophes.

a. Sélection et description des témoins positifs et négatifs

Le nématode *E. diana*e a aussi été collecté en mangrove sur les feuilles de palétuvier en décomposition et dans le sédiment. Il a été testé par microspectrométrie Raman en un point du corps de l'animal et a confirmé la présence de soufre élémentaire dans son manteau bactérien. Le spectre Raman obtenu est identique à celui obtenu en figure 29 (§ 3.2) La position de la sonde pendant l'analyse est représentée par un cercle blanc sur la figure 41A. De la même façon que pour l'étude des nématodes symbiotiques en herbier, un test « témoin négatif » ne présentant pas de soufre a été effectué dans l'eau de mer dans laquelle est maintenu l'animal pendant l'analyse. Grâce aux observations en MET (Fig. 41B) et aux précédentes analyses, il est possible de lier la présence des vésicules vides à l'intérieur de l'espace périplasmique des bactéries à la détection de soufre élémentaire chez cet organisme (Fig. 41B). Cette deuxième expérimentation en microspectrométrie Raman sur le nématode *E. diana*e permet de mettre en évidence la répétitivité de la manipulation et l'utilisation simple en routine de cette technique.

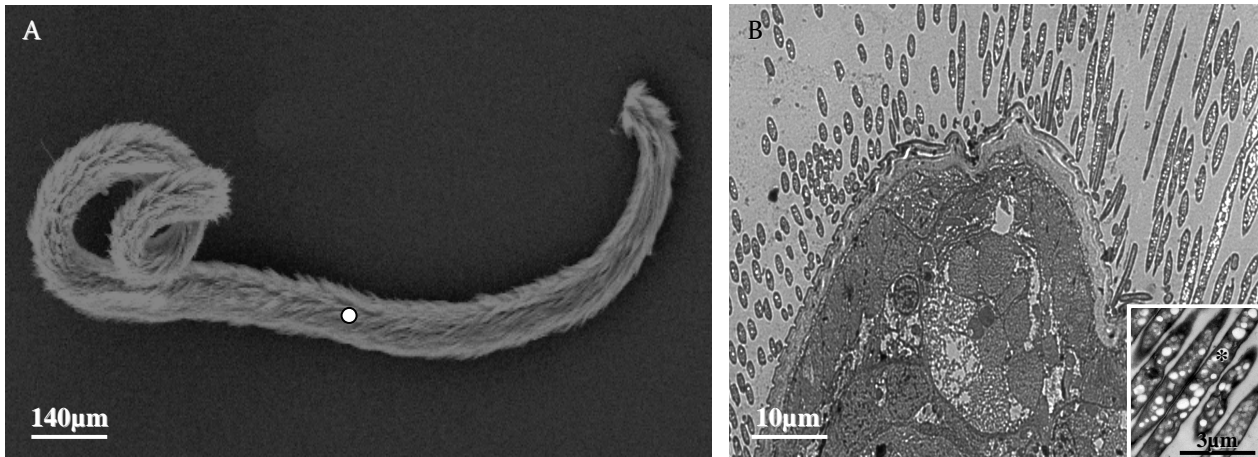


Figure 41 : Analyse du nématode *Eubostrichus diana*

(A) Observation au MEB du nématode entier *E. diana* recouvert par ces symbiotes filamenteux. Le point blanc représente le positionnement de la sonde Raman lors de l'analyse sur le nématode vivant.

(B) Observation au MET d'une section transversale du nématode entouré par son manteau bactérien. [Insert: Agrandissement au MET d'une section longitudinale de bactéries qui contiennent des granules translucides (*)].

Le cilié *Zoothamnium niveum* a été collecté sur les bois coulés en décomposition puis analysé par microspectrométrie Raman. Des spectres ont été acquis sur plusieurs zooïdes constituant le corps de l'animal (Fig. 42B). Pour chacune des acquisitions, les pics caractéristiques du soufre élémentaire S_8 à 160 cm^{-1} , 225 cm^{-1} et 480 cm^{-1} ont été observés (Fig. 42A). Les analyses en MEB ont confirmé la présence de bactéries ectosymbiotiques disposées sur l'ensemble du cilié (Fig. 42C). Ces bactéries observées en MET ont aussi montré la présence de granules vides caractéristiques des vésicules de soufre (Fig. 42C insert) décrites chez les bivalves symbiotiques *C. orbicularis* (Lechaire *et al.*, 2006) et assimilées au soufre S_8 grâce à l'analyse en microspectrométrie Raman réalisée précédemment sur *E. diana*.

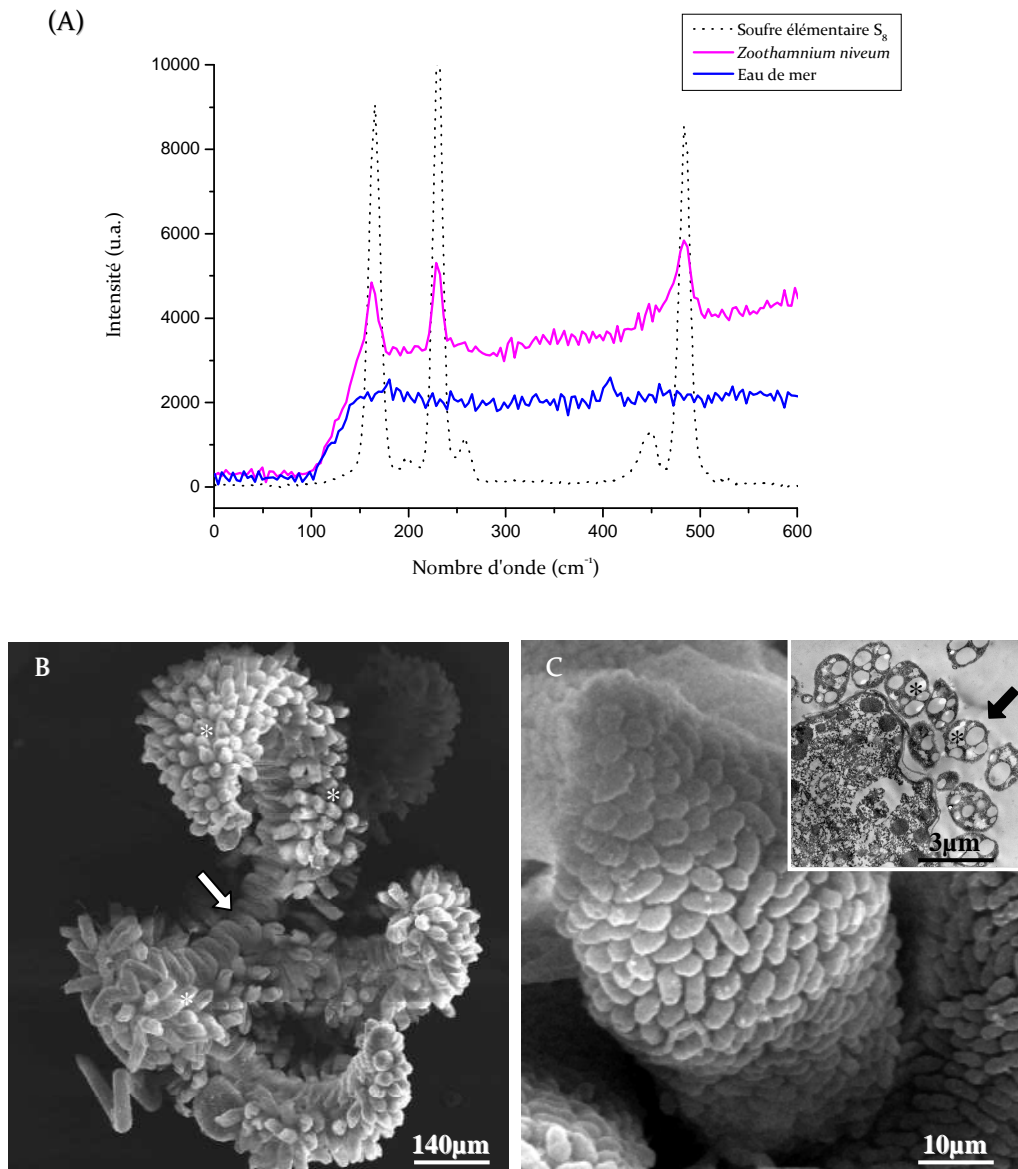


Figure 42 : Analyse du cilié *Zoothamnium niveum*

(A) Spectre Raman du soufre élémentaire S₈ avec ses 3 pics caractéristiques à 160 cm⁻¹, 225 cm⁻¹ et 480 cm⁻¹ et spectre Raman acquis sur les zooïdes du cilié *Z. niveum* préalablement fixé pour l'analyse.

(B) Observation au MEB de *Z. niveum* qui est composé de nombreux zooïdes (étoiles blanches) attachés à un pied central rétractable qui apparaît sinusoïdale quand il est rétracté (flèche blanche).

(C) Agrandissement au MEB d'un zooïde couvert par une unique couche de bactérie. [Insert: Observation au MET d'une coupe transversale de zooïde avec ses bactéries ectosymbiotiques (flèche noire) contenant les inclusions vides de soufre (*)].

Ces résultats confirment la description de ce cilié réalisée par Bauer-Nebelsick *et al.*, (1996ab) le présentant comme un organisme vivant en symbiose obligatoire avec des bactéries sulfo-oxydantes. Nos résultats nous ont aussi permis grâce à l'analyse phylogénétique des symbiotes de *Z. niveum* réalisée par Rinke *et al.*, (2006) d'établir un lien entre la détection du soufre élémentaire dans les bactéries symbiotiques par microspectrométrie Raman et leur nature sulfo-oxydante.

La microspectrométrie Raman a permis de réaliser ensuite un screening sur tous les organismes collectés en mangrove (sur les feuilles et les branchages) afin de détecter le soufre et par extrapolation des organismes thioautotrophes impliqués ou non dans une relation symbiotique. Dans le cas d'un résultat positif au Raman, des analyses en microscopie électronique (MEB et MET) ont été effectuées afin de déterminer si la présence de soufre était lié à (i) des bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes ; (ii) des bactéries libres thioautotrophes ou (iii) des organismes contenant des cellules de stockage du soufre.

b. Screening des organismes associés à des bactéries thioautotrophiques

D'autres organismes ont été collectés sur les bois et dans le sédiment de mangrove. De nombreux Annélides, Copépodes et Nématodes (Fig. 43A) ont ainsi été testés par microspectrométrie Raman. Aucun des organismes appartenant à ces trois groupes (excepté *E. diana*e précédemment décrit) n'a présenté un spectre caractéristique du soufre (Fig. 43B). Ils ont donc été classés dans les organismes n'étant pas associés à des bactéries sulfo-oxydantes et ne possédant pas de cellules de stockage du soufre.

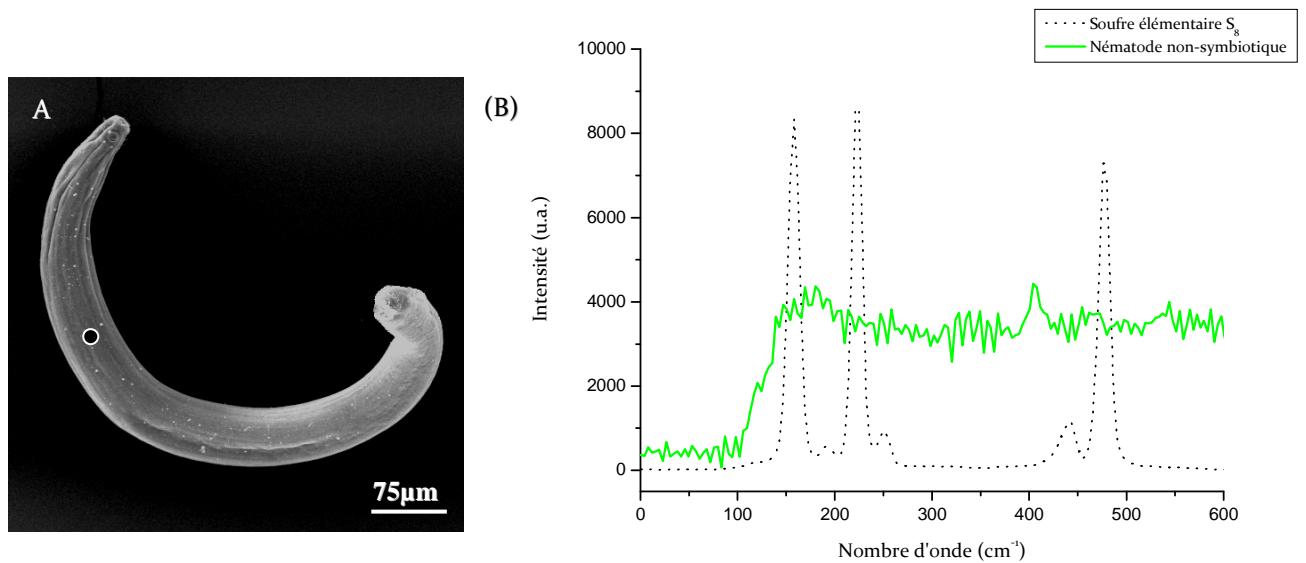


Figure 43 : Analyse d'un nématode libre (sans manteau bactérien ni cellules de stockage du soufre).

(A) Observation au MEB d'un nématode libre sans manteau bactérien colonisant le sédiment de mangrove.

(B) Spectre Raman du soufre élémentaire S₈ et celui du nématode libre analysé dans sa partie centrale (point noir en A).

Sur les feuilles il a été, cependant, récupéré d'autres organismes apparaissant blanchâtres à la loupe binoculaire en lumière incidente. Tout d'abord un hydrozoaire non identifié (Fig. 44A), qui lors de l'analyse en Raman s'est révélé être positif au soufre élémentaire (Fig. 44C). A partir de cette observation le seul animal collecté a pu être inclus et étudié en MET, le Raman ne causant aucun dommage sur l'animal. L'observation d'une coupe fine en microscopie électronique a permis de mettre en évidence la présence de bactéries entourant l'organisme (Fig. 44B) et d'une structure particulière entre l'animal et les ectosymbiotes (Fig. 44B insert). Cette structure ordonnée en feuillets disposés les uns sur les autres pourrait servir d'adhésion des bactéries sur leur hôte. Grâce à l'acquisition rapide d'un spectre Raman sur un organisme vivant et à son efficacité sans créer de dommages sur l'échantillon biologique, plusieurs résultats ont pu être obtenus à partir d'un seul organisme.

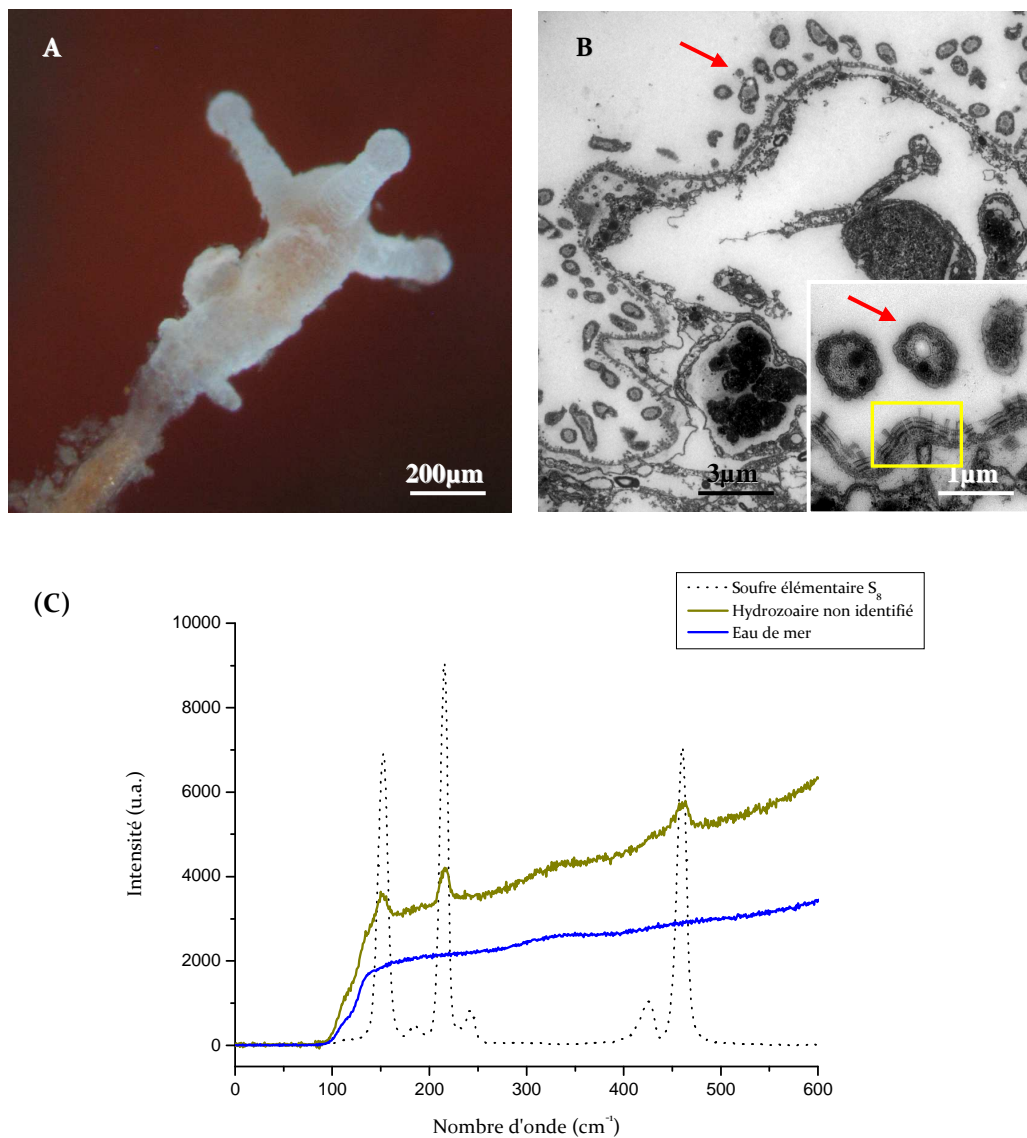


Figure 44: Analyse d'un hydrozoaire non identifié.

(A) Observation au microscope optique d'un hydrozoaire non identifié. En lumière incidente l'organisme apparaît blanchâtre.

(B) Observation au MET d'une section transversale du corps de l'animal. Des bactéries ectosymbiotiques (flèches rouge) sont disposées sur la bordure externe de l'animal. [Insert : Agrandissement de quelques ectosymbiotes contenant des granules vides dans l'espace périplasmique. Une structure particulière et ordonnée est observable sur l'animal (encadré jaune) supposant un dispositif d'accrochage externe entre l'hydrozoaire et les bactéries (flèche rouge).]

(C) Spectre Raman acquis sur cet hydrozoaire. La présence de soufre élémentaire est confirmée dans cet organisme par la présence des 3 pics caractéristiques du S₈ sur le graphique alors qu'il n'est pas détecté dans l'eau de mer environnante.

Un autre cilié du genre *Pseudovorticella* a aussi été prélevé sur les feuilles de mangrove et apparaissait blanc sous lumière incidente. Comme le montre la figure 45A, les bandes Raman caractéristiques du soufre apparaissent. Les observations en MEB et MET ont mis en évidence la présence de bactéries entourant ce cilié et contenant de nombreux grains assimilables au soufre (Fig. 45B-C).

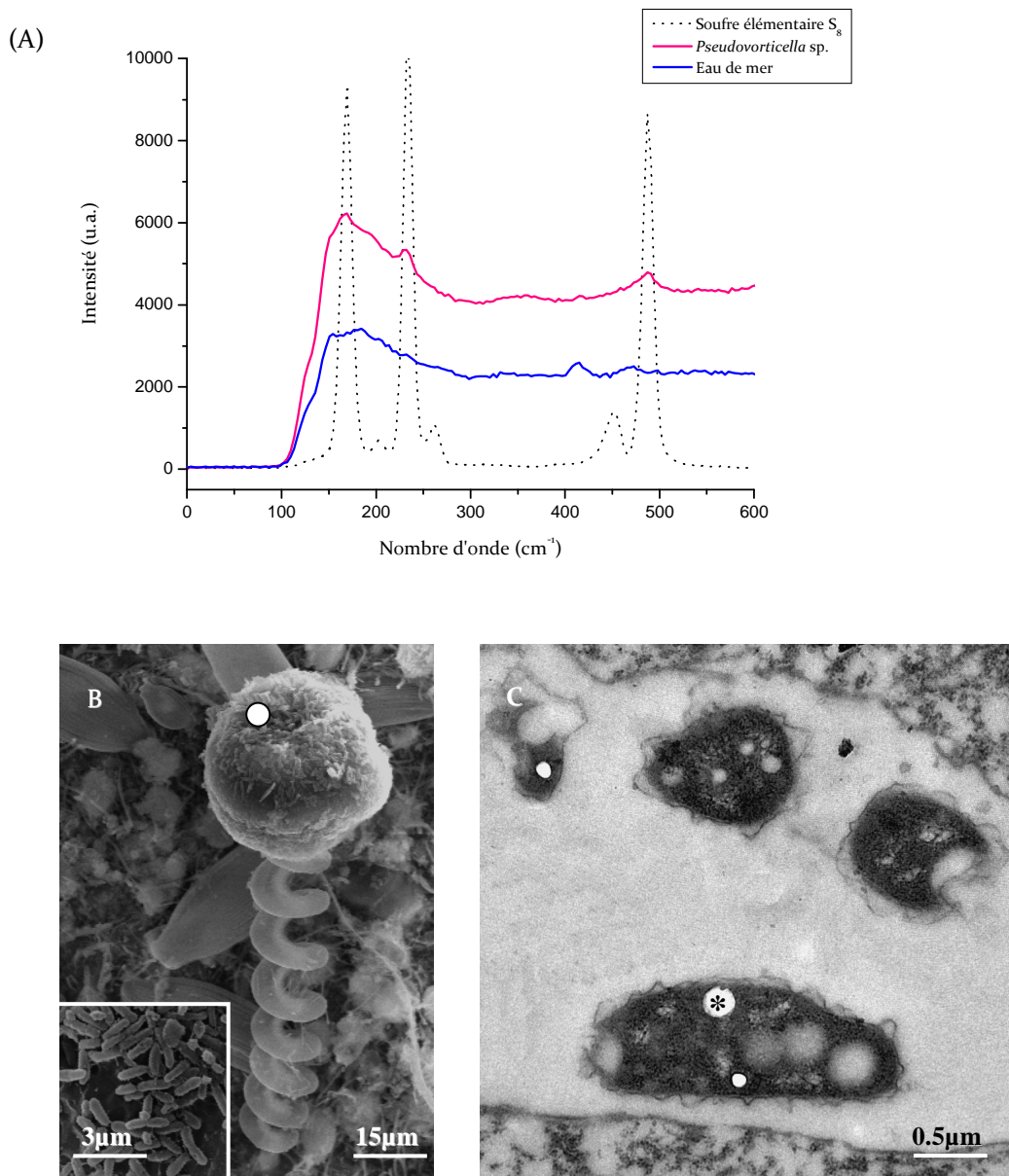


Figure 45 : Analyse du cilié *Pseudovorticella* sp.

(A) Spectre Raman acquis sur un zoïde de *Pseudovorticella* sp. (cercle blanc en B) et présentant la signature du soufre S₈. Une analyse par microspectrométrie Raman a aussi été réalisé sur le pied rétractable du cilié et révèle de la même manière la présence de soufre élémentaire (résultat non montré).

(B) Observation au MEB de *Pseudovorticella* sp.. Un unique zooïde est porté par un pied rétractable, fixé sur une feuille recouverte de débris. [Insert: Agrandissement au MEB du zooïde couvert par une monocouche de bactéries.]

(C) Observation au MET des bactéries sur le zooïde du vorticelle. Présence des granules vides dans l'espace périplasmique des bactéries (*).

Une nouvelle fois, la microspectrométrie Raman se révèle être un outil pratique et rapide pour la détection d'éventuelle symbiose entre invertébrés et bactéries sulfo-oxydantes. De plus, la phylogénie des symbiotes de ces *Pseudovorticella* a été récemment réalisée et place ces symbiotes dans le groupe des bactéries sulfo-oxydantes proches des symbiotes de *Zoothamnium niveum* (F. Muller, comm. Perso.).

c. Screening des organismes libres thioautotrophes

Une matre bactérienne recouvre aussi par endroit les feuilles et branches immergés. Plusieurs sortes de filaments bactériens sont observées (Fig. 46B) et seulement deux morphotypes ont été analysés par microspectrométrie raman. Ces deux types de filaments se sont révélés être positifs lors de la détection du soufre au Raman (Fig. 46A).

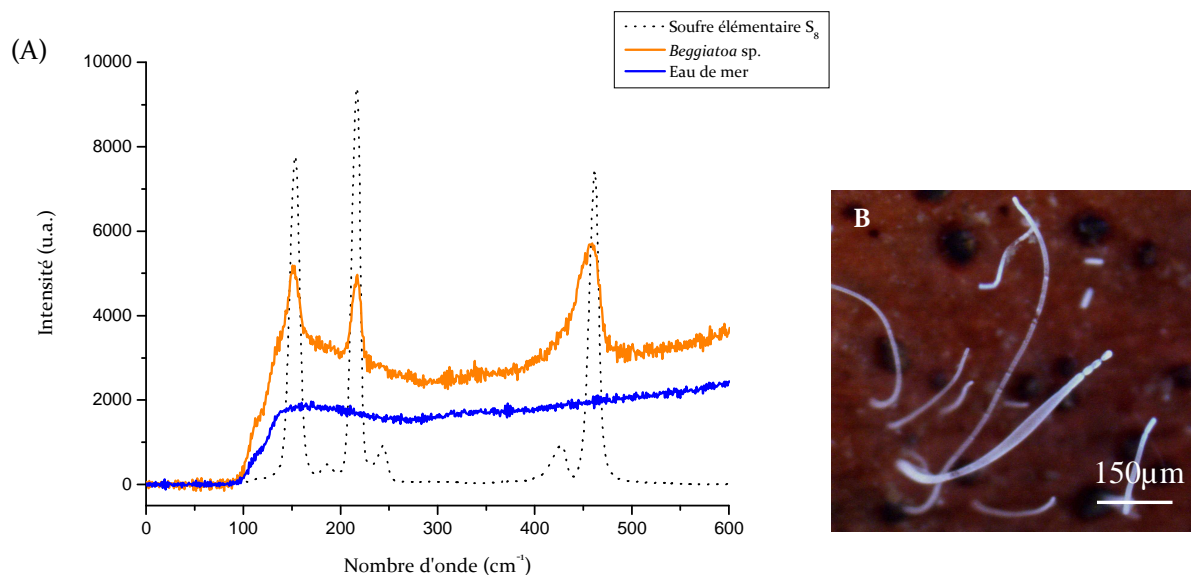


Figure 46 : Analyse d'une bactérie libre filamenteuse.

(A) Spectre Raman enregistré sur une bactérie filamenteuse.

(B) Observation en microscopie photonique d'un morceau de feuilles de mangrove colonisé par des filaments bactériens. Le filament au premier plan est un des filaments analysés en microspectrométrie Raman.

Dans ce cas, cette technique met en évidence rapidement la nature thioautotrophe de bactéries filamenteuses libres. Seule la phylogénie réalisée par F. Muller (comm. Perso.) nous a permis d'identifier clairement ces deux morphotypes. Le premier correspond à des *Beggiatoa* sp. et le second à des Archae.

Aucun nématode possédant des cellules de stockage du soufre comme *Oncholaimus campilocercoïdes* n'a été trouvé dans cet écosystème. Néanmoins, deux bivalves symbiotiques colonisent le sédiment de mangrove : *Lucina pectinata* et *Anodontia alba*. Ces bivalves sont connus pour être associés à des bactéries endosymbiotiques dans leurs branchies (Durand *et al.*, 1996 ; Gros *et al.*, 2003). Comme pour l'analyse en herbier, nous avons testé la microspectrométrie Raman sur *L. pectinata*. Cette analyse démontre évidemment la présence de soufre dans la branchie de ce bivalve qui a été précédemment étudié et localisé dans le périplasme des endosymbiotes sulfo-oxydants bactériens mais aussi dans des organites extracellulaires (Frenkiel *et al.*, 1996). Dans ce cas, la microspectrométrie Raman permet d'obtenir l'indication de la présence du soufre mais ne permet pas de le situer précisément au niveau cellulaire. Seules les techniques d'imagerie à partir de cryo-fixation peuvent être utiles dans ces circonstances.

La microspectrométrie Raman permet d'obtenir facilement et rapidement un screening de détection du soufre à partir d'échantillons biologiques mais cette technique peut aussi être utilisée pour l'étude d'autres composés comme le fer ou le méthane. De plus à partir d'un unique échantillon, il est possible d'acquérir plusieurs résultats puisque le Raman ne cause aucun dommage sur l'animal. Celui-ci peut donc être ensuite fixé pour réaliser des observations en MEB ou bien inclus afin d'obtenir des images en MET. Ce dernier point se révèle être très intéressant pour les organismes qu'il est difficile de prélever à cause de leurs petite taille ou de leur faible quantité dans l'environnement. Mais cette technique ne nous permet pas encore de faire de l'imagerie au niveau cellulaire afin de localiser précisément le soufre.

4 DISCUSSION

Les nématodes marins libres dans le sédiment des herbiers à phanérogames et en mangrove sont, par leur abondance, un maillon important de la chaîne alimentaire. Ils participent à la dégradation de la matière organique, ainsi qu'à la régénération des nutriments dans le milieu et constituent une source de nourriture pour les individus du niveau supérieur de la chaîne alimentaire (Bell *et al.*, 1984).

Il a été observé dans notre étude que ces invertébrés pouvaient être associés ou non à des bactéries dans ces milieux. Nous allons, dans un premier temps, discuter de quel type de symbiotes est associé aux nématodes et quel est le rôle de chacun des partenaires dans l'association symbiotique. Nous verrons ensuite quel mode de transmission des symbiotes à l'hôte a le plus de vraisemblance. En mangrove, nous discuterons de l'écologie de la nématofaune dans les sédiments riches en soufre et l'effet de la litière de feuilles et des bois coulés sur la constitution du peuplement. Enfin, nous aborderons les principaux avantages de la microspectrométrie Raman pour la détection du soufre élémentaire sur des organismes vivants et de la mise en place de son utilisation en routine pour la détection des organismes thiotrophiques, ainsi que ces principales utilisations en biologie et biochimie.

4.1 Diversité et écologie des nématodes thiotrophiques de l'herbier à *Thalassia testudinum*

L'identification des nématodes associés à des bactéries ectosymbiotiques, colonisant l'herbier à *Thalassia testudinum*, a permis de mieux appréhender la diversité des nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae en milieu tropical. Huit nématodes appartenant à trois genres différents ont été recensés, alors que seuls les nématodes du genre *Eubostrichus* avaient été précédemment décrits en Guadeloupe (Boucher & Gourbault, 1990). Au Belize, dans la Mer des Caraïbes, sont retrouvés en milieu sableux des nématodes du genre *Laxus* (Ott *et al.*, 1995), *Catanema*, *Eubostrichus*, *Leptonemella*, *Robbea* et *Stilbonema* (Ott & Novak, 1989 ; Schiemer *et al.*, 1990 ; Ott *et al.*, 1991 ; Polz *et al.*, 1992). Le nématode *Adelphos rolandi* a aussi été prélevé dans cet environnement (Ott, 1997). Le nématode *Robbea* sp.1 a été récemment collecté en Mer Méditerranée, dans l'herbier à *Posidonia oceanica*, et *Robbea* sp.2 ainsi que *Robbea* sp.3 en Mer des Caraïbes, aux îles Cayman, au niveau de la barrière de sable (Bayer *et al.*, 2009). Ces données permettent de confirmer que les nématodes de la famille des Stilbonematinae sont inféodés aux sables littoraux des milieux

IV. Discussion

tempérés et tropicaux et qu'ils colonisent préférentiellement les environnements peu soufrés réduits tels que les herbiers à phanérogames marines.

Concernant le nématode *Adelphos rolandi*, Ott (1997) observe des différences morphologiques avec les autres nématodes du genre *Euboastrichus* telles que le manque d'une large soie subventrale dans la région céphalique et la présence d'une unique rangée de soies postérieures, ainsi que la présence d'une capsule céphalique. Les deux premiers caractères n'étant pas pris en compte lors de nos observations, la présence ou l'absence de ces soies n'a pu être vérifiée. Cependant, aucune capsule céphalique distincte n'a été observée, et le nématode *Adelphos rolandi* a donc été analysé avec les nématodes du genre *Euboastrichus*.

Les observations au microscope photonique et au microscope électronique à balayage montrent la présence d'un manteau bactérien spécifique du genre chez les nématodes *Euboastrichus*, et spécifique de l'espèce chez les nématodes *Robbea* sp.1, *Robbea* sp.2 et *Robbea* sp.3 comme précédemment décrit par Ott *et al.* (2004) et Bayer *et al.* (2009). Pour le dernier morphotype de nématode collecté dans l'herbier à *Thalassia testudinum*, les caractères morphologiques correspondent au genre *Stilbonema*. Le manteau bactérien qui le recouvre habituellement, constitué de bactéries cocoïdes (Ott *et al.*, 1991 ; Polz *et al.*, 1992 ; Ott *et al.*, 2004), n'a jamais été observé avec des bactéries fusiformes. Le fait que le même manteau bactérien soit retrouvé sur plusieurs individus laisse supposer soit : (i) que ce nématode appartient à une autre espèce que celle collectée habituellement ; (ii) que ce nématode s'associe à un autre morphotype de bactéries.

Dans le premier cas, il aurait été intéressant d'utiliser la technique de code-barres moléculaire mise en évidence chez les nématodes par Bhadury *et al.*, (2006), afin de déterminer à quelle espèce appartient le nématode du genre *Stilbonema*. En effet, cette technique correspond à l'identification d'un fragment d'ADN présent chez tous les organismes vivants. La séquence de ce fragment d'ADN est quasiment identique chez des individus qui appartiennent à la même espèce, et permet donc de déterminer l'espèce à laquelle appartient un individu en ne connaissant que la séquence de ce fragment d'ADN. Le fragment choisi est un gène du génome mitochondrial codant la première sous-unité de la cytochrome oxydase (COI), une protéine qui intervient dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Chaque cellule contenant de nombreuses mitochondries, le gène COI est présent en de nombreuses copies, ce qui facilite son séquençage (Schindel & Miller, 2005 ; Elsasser *et al.*, 2009 ; Puillandre *et al.*, 2009). Cependant, cette technique nécessite de la même manière que le séquençage, une assez grande quantité de matériel biologique initial.

IV. Discussion

Chez les nématodes le gène de l'ARNr 18S peut être considéré comme un marqueur efficace pour le « code-barres » (Floyd *et al.*, 2002 ; 2005 ; Bhadury *et al.*, 2008).

Dans le second cas, Les séquences du symbiote de l'espèce *Stilbonema* sp. (Vanura, 2001) et plus particulièrement la séquence du gène fonctionnel de la sulfite réductase dsrAB (dissimilatory sulfite reductase) extraite de l'espèce *Stilbonema majum* par Loy *et al.*, (2009) sont disponibles. Il serait intéressant d'utiliser ces séquences de symbiote des nématodes du genre *Stilbonema* collectés au Belize, afin de réaliser des hybridations moléculaires spécifiques sur le manteau bactérien de l'espèce prélevée en Guadeloupe. Cette manipulation permettrait de déterminer s'il s'agit de la même bactérie ayant une morphologie différente, ou si le symbiote récolté en Guadeloupe est phylogénétiquement différent des symbiotes de *Stilbonema* décrits à ce jour.

Les techniques d'hybridations moléculaires utilisées dans notre étude ont permis dans un premier temps de caractériser les bactéries intervenant dans l'association symbiotique avec les nématodes et dans un second temps d'identifier précisément les nématodes hôtes peu décrits à ce jour. Les résultats obtenus en FISH et Card-FISH ont montré que les symbiotes bactériens appartenaient tous aux Eubactéries, et plus précisément qu'ils étaient affiliés au groupe des γ -protéobactéries. Selon les analyses de séquences du gène de l'ARNr 16S, la majorité des symbiotes marins chimioautotrophes et méthanotrophes connus à ce jour, appartiennent à la subdivision des γ -protéobactéries (Distel & Cavanaugh, 1994 ; Distel *et al.*, 1994 ; Cavanaugh *et al.*, 2006 ; Dubilier *et al.*, 2008). Les analyses réalisées en MET sur *E. diana* mettent en évidence la présence d'un second morphotype de bactéries ectosymbiotiques, mais aucunes hybridations moléculaires, avec les sondes 16S des Eubactéries et des γ -protéobactéries, n'ont fonctionné chez ce nématode. Grâce aux hybridations moléculaires *in situ* il est possible de déterminer et de localiser les symbiotes appartenant à des subdivisions différentes dans un organisme hôte, comme décrit chez l'oligochète sans tube digestif *Olavius algarvensis* (Dubilier *et al.*, 2001). Cet oligochète présente sous sa cuticule deux morphotypes bactériens correspondant à des γ -symbiotes et des δ -symbiotes. Chez les Stilbonematinae, la présence de plusieurs symbiotes bactériens sur leur cuticule a précédemment été décrite (Polz *et al.*, 1999 ; Vanura, 2001). Les hybridations moléculaires obtenues permettent uniquement de confirmer que les bactéries dominantes associées aux nématodes de l'herbier sont des γ -symbiotes. Bien que les symbioses chimioautotrophiques soient habituellement hautement spécifiques, la présence d'un second, voire de plusieurs symbiotes, a été constatée chez divers organismes hôtes (Fisher, 1990 ;

IV. Discussion

Haddad *et al.*, 1995 ; Dubilier *et al.*, 1999 ; 2001 ; Polz *et al.*, 1999 ; Vanura, 2001 ; Duperron *et al.*, 2006). L'hypothèse générale est que les bactéries chimioautotrophes sont les symbiotes principaux. L'importance des symbiotes secondaires est très difficile à évaluer et souvent impossible à déterminer avec les méthodes actuelles. Chez les bivalves et les oligochètes, il semblerait que les symbiotes secondaires aient une certaine contribution au sein de l'association. Les bactéries méthanotrophes joueraient un rôle dans la nutrition de leur hôte bivalve (Cavanaugh *et al.*, 1987 ; Distel & Cavanaugh, 1994 ; Duperron *et al.*, 2006) et les sulfures produits par les bactéries sulfato-réductrices chez *Olavius algarvensis* seraient oxydés à l'intérieur du ver par les bactéries sulfo-oxydantes (Dubilier *et al.*, 2001). Seulement quelques associations ont été décrites, comme des symbioses chimioautotrophiques avec des partenaires multiples de même importance (Haddad *et al.*, 1995 ; Polz *et al.*, 1999 ; Campbell & Cary, 2001). Chez *Alvinella pompejana*, il a été montré par FISH que le manteau de bactéries ectosymbiotiques était constitué de plusieurs phylotypes de ϵ -protéobactéries (Haddad *et al.*, 1995). Ces ectosymbiotes sont trop diversifiés pour qu'il y ait un phylotype plus important que les autres. Ainsi plusieurs symbiotes peuvent jouer un rôle plus ou moins égal dans l'association symbiotique. Campbell & Cary (2001) ont signalé la présence de séquences de spirochètes dans les séquences de clone originel des symbiotes de *A. pompejana*. Concernant le nématode *Eubostrichus diana*, Polz *et al.* (1999) a analysé les communautés microbiennes associées à ce nématode et a trouvé une grande diversité à l'intérieur de cette communauté comprenant des organismes appartenant aux Cytophaga, γ -, δ - et α - Protéobactéries. A l'intérieur de cette communauté, il n'a pas été possible de déterminer le symbiote principal, puisqu'aucun clone ne constitue plus de 20% du clonage total. Pourtant les études ultrastructurales (Ott *et al.*, 1991 ; Polz *et al.*, 1992) et analytiques (Himmel *et al.*, 2009) mettent en évidence la présence d'un symbiote dominant contenant des granules de soufre élémentaire, suggérant que les ectosymbiotes de ce nématodes sont des bactéries sulfo-oxydantes. Malheureusement, aucune hybridation moléculaire (FISH et Card-FISH) n'a été obtenue sur ces symbiotes (Polz *et al.*, 1999 ; Vanura, 2001). Il semblerait nécessaire de réaliser ces hybridations moléculaires prouvant ainsi que les ectosymbiotes sont bien des bactéries représentées par un ou plusieurs morphotypes.

Dans notre étude, aucune fluorescence n'a été détectée dans les cavités internes des nématodes analysés, laissant supposer que les Stilbonematinae ne possèdent pas d'endosymbiotes. De plus, l'absence de bactéries dans le tube digestif des nématodes étudiés ne soutient pas l'analyse isotopique ^{13}C réalisée par Ott *et al.* (1991) qui déclare que les Stilbonematinae s'alimentent sur leur manteau bactérien. Malgré l'analyse de plusieurs

IV. Discussion

coupes à différents endroits sur le corps de chacun des nématodes thiobiotiques collectés en herbier et en mangrove, l'observation d'organes internes comme le tube digestif se limite à une (ou plusieurs) section(s) et ne permet pas une reconstitution de l'ensemble de l'appareil digestif. L'analyse des ovocytes aurait permis de mettre en évidence la présence ou non de bactéries pouvant potentiellement intervenir dans la transmission verticale des symbiotes. Cette transmission verticale des symbiotes a été décrite, à ce jour, uniquement dans le cas d'endosymbioses chimioautotrophes comme chez plusieurs membres de la famille des Vesicomidae et Solemyidae (Cary & Giovannoni, 1993 ; Krueger *et al.*, 1996).

L'étude des gènes fonctionnels d'APS réductase, ainsi que la détection du soufre élémentaire par microspectrométrie Raman, sont deux techniques qui permettent d'assurer la présence d'un métabolisme bactérien sulfo-oxydant. Comme décrit par Duperron *et al.*, (2008), la capacité des bactéries à oxyder le soufre est évaluée par le séquençage du fragment d'ADN codant le gène de l'APS réductase, enzyme impliquée dans le mécanisme de sulfo-oxydation (Suzuki, 1999 ; Jannasch & Wirsén, 1985). Cette analyse a été effectuée sur des bactéries sulfo-oxydantes extracellulaires retrouvées dans les branchies de bivalves de la famille des Mytilidae colonisant des bois coulés en milieu profond, ainsi que sur des bivalves de la famille des Lucinidae des suintements froids de Méditerranée (Duperron *et al.*, 2007). Les études métagénomiques permettent l'analyse des gènes codant les protéines enzymatiques, et plus particulièrement celui de l'APS réductase (Woyke *et al.*, 2006 ; Markert *et al.*, 2007 ; Robidart *et al.*, 2008) De plus, la microspectrométrie Raman confirme la présence de soufre élémentaire dans des bactéries libres ou extraites d'un hôte (Pasteris *et al.*, 2001) et permet de lier le métabolisme de sulfo-oxydation à la détection de soufre élémentaire dans les bactéries. L'étude des gènes fonctionnels de l'APS réductase compléterait les données obtenues sur les Stilbonematinae, puisque ni l'activité enzymatique de l'APS réductase ni celle de la rhodanèse n'ont été détectées chez plusieurs représentants de la sous-famille des Stilbonematinae (Polz *et al.*, 1992).

Malgré les difficultés d'extraction d'ADN sur les symbiotes de ces nématodes, des analyses phylogénétiques permettraient de confirmer que les symbiotes associés aux genres *Eubostrichus*, *Robbea* et *Stilbonema* collectés en herbier sont proches phylogénétiquement des symbiotes de bivalves de ce même environnement. L'analyse phylogénétique menée par Cavanaugh *et al.* (2006) met en évidence que les symbiotes du nématode *Laxus* sp. (collecté au Belize mais pas en Guadeloupe), nématode appartenant aux Stibonematinae (Polz *et al.*,

IV. Discussion

1994), se situe loin des symbiotes de *Codakia orbicularis*, bivalve colonisant l'herbier à *Thalassia testudinum* en Guadeloupe (Durand *et al.*, 1996 ; Gros *et al.*, 1996). Les symbiotes de ce nématode sont plus proches phylogénétiquement des endosymbiotes du nématode *Astomonema* sp. et des endosymbiotes d'annélides (*Inandrilus* et *Olavius*) (Musat *et al.*, 2007). Lors de notre étude, aucune amplification d'ADNr (16S et 18S) n'a été détectée sur gel d'agarose. Ce résultat est sûrement lié à la faible quantité d'organismes récoltés (maximum 10 individus par espèce) dans l'herbier à *T. testudinum*. Le séquençage des gènes codant l'ARNr 16S des symbiotes et l'ARNr 18S des nématodes n'a donc pas pu être réalisé. Dans des études précédentes, 30 à 50 nématodes ont été nécessaires pour obtenir un signal de l'ADNr 18S (Kampfer *et al.*, 1998) et 10 à 500 individus par espèce étudiée ont dû être récoltés afin de cloner et de séquencer les symbiotes de nématodes (Kampfer *et al.*, 1998 ; Vanura 2001 ; Bayer *et al.*, 2009). Ces difficultés d'amplification et de séquençage de l'ADNr 16S des symbiotes de nématodes peuvent aussi être dues aux biais induits lors de la PCR, comme mentionné par Reysenbach *et al.* (1992) et par Polz & Cavanaugh (1998) lors de l'analyse des symbioses entre nématodes et bactéries.

Le manteau bactérien recouvrant les nématodes joue un rôle de protection contre l'hydrogène sulfureux (Powell *et al.*, 1979) contenu dans le sédiment et/ou a un rôle nutritionnel (Ott *et al.*, 2004). Dans l'herbier à *T. testudinum*, d'autres invertébrés tels que les bivalves de la famille des Lucinidae ont été décrits comme possédant des bactéries endosymbiotiques sulfo-oxydantes dans leurs branchies (Frenkiel & Moueza, 1995 ; Gros *et al.*, 1996). Ces endosymbiotes protègent leur hôte des sulfures environnants. Une étude par spectrométrie de masse à ions secondaires à une nano-échelle NanoSIMS (nano-scale secondary ion mass spectrometer) des Stilbonematinae collectés dans cet environnement et ayant été en contact avec des isotopes de l'azote et du soufre, permettrait de mieux comprendre les bénéfices réciproques d'une telle association. La spectrométrie de masse à ions secondaires (SIMS) est une technique de caractérisation chimique de la matière par balayage avec un faisceau d'ions primaires. L'impact des ions primaires provoque une cascade de collisions atomiques causant un déplacement des éléments constitutifs de l'échantillon, émis sous forme d'ions, et séparés selon les critères d'énergie et de masse par un spectromètre. Le NanoSIMS fait partie de la famille des microscopes SIMS dynamiques capable d'imager à haute résolution la distribution d'ions élémentaires dans un échantillon (Pirrotte, 2007). Jusqu'à ce jour, la NanoSIMS a été appliquée avec succès au milieu biologique par l'étude du métabolisme du ^{13}C et ^{15}N dans les cultures de cellules (Kleinfeld *et*

IV. Discussion

al., 2004 ; Peteranderl & Lechene, 2004 ; Behrens *et al.*, 2008) et dans des bactéries à l'intérieur de cellules animales (Lechene *et al.*, 2007), ainsi qu'au niveau des symbioses coralliennes (Meibom *et al.*, 2004 ; Clode *et al.*, 2007). L'imagerie sur coupe des nématodes à l'aide de la SIMS permettrait de localiser les isotopes ingérés et de suivre leur transfert à travers les ectosymbiotes et les nématodes. Ces analyses permettraient de mieux comprendre la relation nématode/bactéries et les échanges trophiques entre ces partenaires. Enfin, la résolution spatiale (moins de 50nm) de la sonde NanoSIMS permet de s'affranchir des difficultés liées à la quantité de matière (Pirrotte, 2007). La possibilité de se limiter à un seul individu permettrait d'aborder directement les processus d'échange trophique au niveau de l'espèce et d'envisager un micro-traçage isotopique du cheminement des composants ingérés ou absorbés par le nématode et ses symbiotes.

Habituellement, une analyse du fractionnement des isotopes stables du carbone et de l'azote (^{13}C et ^{15}N) permet de préciser la contribution d'un organisme dans le réseau trophique, puisque, à chaque niveau d'ingestion, se produit un fractionnement quantifiable du ^{12}C en ^{13}C et du ^{14}N en ^{15}N (Herman *et al.*, 2000). Mais les travaux menés sur les nématodes marins (Ott *et al.*, 1991 ; Riera *et al.*, 1996 ; Moens *et al.*, 2002) se heurtent à deux principales difficultés : (i) un signal isotopique est exploitable uniquement à partir d'une grande quantité de nématodes (toutes espèces confondues) ce qui ne fournit qu'une indication globale de l'ensemble de l'activité trophique du peuplement dans le milieu, (ii) l'obtention d'un nombre suffisant d'individus d'une même espèce n'est possible que dans les situations exceptionnelles de dominance, ou de morphotypes suffisamment caractéristiques pour être détectés à la loupe. Seule une étude réalisée par Ott *et al.* (1991) sur les Stilbonematinae a mise en évidence des faibles valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ correspondant aux valeurs des tissus d'invertébrés contenant des bactéries endosymbiotiques chimioautotrophes, comme décrits chez les bivalves et les annélides (Rau, 1981 ; Williams *et al.*, 1981). Cette technique ne permet pas d'obtenir une information à l'échelle de l'individu ni de suivre les échanges trophiques entre les symbiotes et le nématode hôte.

Grâce aux analyses physico-chimiques du sédiment de l'herbier à *T. testudinum*, il a été observé un gradient de concentration en H_2S compris entre $10\mu\text{M}$ et $30\mu\text{M}$ de la surface à 15cm de profondeur. Ces valeurs sont faibles, comparées à celles relevées dans le sédiment de mangrove : 1mM à 10mM et encore plus par rapport aux concentrations supérieures à 10mM habituellement rencontrées au niveau des sources hydrothermales (Jannasch, 1989). Le sédiment des herbiers constitue donc un milieu faiblement réduit où se distinguent différentes

IV. Discussion

couches de sédiment en fonction de la quantité d'oxygène dissout et de la concentration en hydrogène sulfureux (Fenchel & Riedl, 1970 ; Fenchel & Finlay, 2008). Ceci laisse supposer que les nématodes thiobiotiques associés à des micro-organismes symbiotiques pourraient se déplacer de la zone de surface aréobique jusqu'aux zones plus réduites en soufre et anoxiques afin de se localiser, eux-mêmes et les bactéries, dans un environnement favorable (Ott & Novak, 1989). Cette répartition verticale des nématodes suit le concept de « sulfide system » développé par Fenchel & Reidl en 1970 (Fenchel & Riedl, 1970). De plus, le changement radical de coloration du sédiment, de brun à noir, s'explique selon Reise & Ax (1979) par la présence dans la première couche de surface, des oxydes ferriques hydriques, alors que dans la couche de subsurface sont retrouvées des molécules de FeS. Le sédiment change ensuite de couleur pour tendre vers le gris, du fait de la présence de pyrite FeS₂ (Heip *et al.*, 1985). Le prélèvement d'eau interstitielle ne permet pas une localisation précise des concentrations en sulfures obtenues, mais permet d'avoir un aperçu de sa distribution dans le sédiment. Une expérimentation en laboratoire avec des capteurs autonomes installés en continu dans la carotte de sédiment permettrait un enregistrement des données en temps réel et une localisation plus précise des différentes couches de sédiment. Ainsi, une zonation de la carotte pourrait être établie et une découpe de celle-ci donnerait un aperçu des zones d'évolution des Stilbonematinae par rapport aux autres nématodes, sachant que la nématofaune n'est pas fixe dans le sédiment et qu'elle effectue en permanence des migrations dans les différentes couches. L'étude menée par Reise & Ax (1979) décrit la distribution verticale des principaux taxa retrouvés dans les 5 premiers centimètres du sédiment, ainsi que leur migration dans les terriers et les courants d'irrigation. Dans cette étude, les nématodes semblent répartis dans les premiers millimètres du sédiment (jusqu'à 10mm) puis un second peuplement est observable entre 20 et 30mm de profondeur. Ott & Novak, en 1989, démontrent que les nématodes n'appartenant pas à la sous-famille des Stilbonematinae dominant dans la zone oxiqne du sédiment puis diminuent aux alentours de la couche de discontinuité de potentiel redox (RPD), alors que les Stilbonematinae sont retrouvés en abondance croissante à partir de cette couche. Ott *et al.*, (1991) reprend ces observations et, par expérimentation, constate que les Stilbonematinae se positionnent dans la colonne de sédiment en fonction de la profondeur de la couche de RPD. De plus, le nitrate présent dans le sédiment pouvait servir d'accepteur terminal d'électron (Hentschel *et al.*, 1999 ; Ott *et al.*, 2004). La respiration nitrate est probablement plus importante lors des déplacements dans les couches profondes du sédiment riches en composés soufrés (Hentschel *et al.*, 1999). Cette respiration a aussi été décrite chez les symbiotes chimioautotrophes sulfo-oxydants d'autres invertébrés colonisant les milieux

IV. Discussion

riches en soufre, tels que les bivalves *Lucinoma aequizonata* et *Solemya reidi* (Hentschel *et al.*, 1993 ; Hentschel & Felbeck, 1993 ; Hentschel & Felbeck, 1995) et les annélides *Riftia pachyptila* et *Inandrilus leukodermatus* (Giere *et al.*, 1991 ; Hentschel & Felbeck, 1993).

La description et la caractérisation des Stilbonematinae dans l'herbier à *T. testudinum* complète la liste des organismes symbiotiques dans les environnements peu réduits de faible profondeur. Dans l'herbier à *T. testudinum* en Guadeloupe, seuls les bivalves Lucinidae ont été décrits comme vivant en symbiose avec des bactéries sulfo-oxydantes. La présence de la forme libre des symbiotes dans le sédiment permettant la colonisation des branchies de ces bivalves (Gros *et al.*, 1996) peut laisser penser que les symbiotes de nématodes pourraient aussi être trouvés sous forme libre dans ce milieu. La transmission environnementale des symbiotes a été supposée jusqu'à ce jour chez ces invertébrés, puisque qu'aucune indication ne prouve que les symbiotes puissent être transmis de génération en génération (Polz *et al.*, 1992). De plus, les nématodes muent quatre fois pendant leur développement, remplaçant leur cuticule et le manteau bactérien (Grassé, 1965). Cette dernière observation suppose que les bactéries recolonisent le nématode après chaque mue (Ott, 1996). Récemment, Bayer *et al.* (2009) a mis en évidence la présence de symbiotes libres dans l'environnement de nématode du genre *Robbea*. Alors que les endosymbiotes sulfo-oxydants sont transmis verticalement comme chez les bivalves de la famille des Solemyidae (Cary, 1994 ; Krueger *et al.*, 1996) des Mytilidae (Cary *et al.*, 1993) et des Vesicomylidae (Cary & Giovannoni, 1993), il a été mis en évidence une transmission environnementale chez les bivalves tropicaux de la famille des Lucinidae (Gros *et al.*, 1996 ; Gros, 1997 ; Gros *et al.*, 2003). Chez les l'espèces d'annélides de la famille des Siboglinidae, *Riftia pachyptila* décrite depuis 1981 par Cavanaugh *et al.* (1981) et Felbeck (1981), la transmission environnementale des symbiotes vient d'être mise en évidence (Harmer *et al.*, 2008).

Pour confirmer la présence de symbiotes libres des nématodes, des prélèvements d'eau dans la colonne d'eau et dans le sédiment devraient être effectués, afin d'analyser l'eau filtrée par hybridation moléculaire avec des amorces spécifiques des symbiotes des nématodes collectés en herbier à *T. testudinum*. Il existe peut-être une population de bactéries sulfo-oxydantes capables soit de s'associer avec des organismes tels que les bivalves et les nématodes, soit de vivre librement au sein d'une communauté bactérienne dans le sédiment. De telles considérations ont été discutées par Krueger & Cavanaugh en 1997 pour le bivalve du genre *Solemya* où il a été supposé que des échanges entre les symbiotes de Lucinidae et de Solimidae hôtes pouvaient avoir eu lieu dans le sédiment. Des adaptations spécifiques ont dû

IV. Discussion

être développées pour que l'association ait lieu avec leur hôte respectif, notamment en élaborant un mécanisme de reconnaissance hôte/symbiotes. Nussbaumer *et al.* (2004) ainsi que Bulgheresi *et al.* (2006) ont démontré que les nématodes de la famille des Stilbonematinae produisaient des lectines associées à des sucres, jouant un rôle dans le mécanisme de reconnaissance et d'attachement des symbiotes sur leur hôte. Ce mucus polysaccharidique correspond peut-être à la couche fine observée en MET entre la cuticule du nématode et les ectosymbiotes de l'espèce *E. diana*. De plus, nous pouvons constater que l'association symbiotique est forte et établie entre les nématodes et leur symbiotes, puisque des pilis ont été observés entre les bactéries formant le manteau bactérien de *Robbea* sp.1 et que chaque manteau bactérien a été retrouvé associé à un même genre ou une même espèce de nématode hôte. Ces résultats appuient l'hypothèse d'une possible culture de bactéries dans le terrier des nématodes (Riemann & Schrage, 1978 ; Riemann & Helmke, 2002). Les Stilbonematinae produisant du mucus par leur glande caudale comme de nombreux nématodes libres (Riemann & Schrage, 1978), il n'est pas impossible qu'ils recouvrent leur terrier de mucus leur permettant d'avoir en permanence de quoi régénérer leur symbiotes avec la même population bactérienne. Riemann & Helmke (2002) expliquent que plusieurs organes telles que les glandes caudales, les glandes pharyngales, les glandes ventrales et les petites glandes épidermiques sont susceptibles de produire des sécrétions de mucus. Chez les Stilbonematinae nous avons pu observer par microscopie photonique les OSG chez les nématodes *Eubostrichus*, ainsi que des sécrétions de mucus au niveau de la partie céphalique chez les nématodes *Robbea* et *Stilbonema*. De plus, les auteurs mettent en évidence que le mucus produit par les nématodes permet d'agglutiner de nombreuses particules. Ces particules vont être consommées directement par le nématode ou servir de source de nourriture secondaire contrôlée par les nématodes quand les particules vont se décomposer (Riemann & Helmke, 2002). Les détritivores tels que les Stilbonematinae ainsi que les suceurs d'épistrates peuvent s'alimenter sur des bactéries libres sulfo-oxydantes *Beggiatoa* sp. ou sur des cyanobactéries (Jensen, 1987). Ainsi ces communautés de nématodes peuvent influencer les densités microbiennes en broutant directement les mattes bactériennes, fongiques et les algues unicellulaires. Les nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae pourraient réguler par broutage leur population de symbiotes dans leur terrier. Cette dernière hypothèse serait en accord avec les analyses isotopiques de Ott *et al.* (1991) qui suggèrent que les nématodes s'alimentent sur leurs symbiotes.

4.2 Diversité et écologie de la nématofaune de mangrove

Les expérimentations menées en mangrove pour mieux appréhender l'écologie de la nématofaune dans le sédiment, ont mis en évidence la nécessité de répéter les échantillonnages et de travailler sur une durée assez longue.

Les sédiments de mangrove sont constitués de vase fine, riche en matière organique. Ces sédiments ont une faible porosité et une faible percolation des eaux (Giere, 2009). La plupart des mangroves sont saumâtres et connaissent des variations de salinité en fonction du marnage. En Guadeloupe, la forêt de mangrove est en permanence inondée et donc moins soumise aux variations de salinité qui sont une des causes de la répartition horizontale de la méiofaune dans le sédiment (Alongi, 1987 ; Tietjen & Alongi, 1990 ; Marchand *et al.*, 2004). De plus, la lagune de la Manche-à-eau connaît peu de variations de température (Mantran *et al.*, 2009). Les émissions de sulfures dans le sédiment par la dégradation de la matière organique doivent être l'un des principaux acteurs de la répartition de la méiofaune dans le sédiment.

Les concentrations témoins en H₂S du sédiment de mangrove à une profondeur de 10cm sont inférieures à 1mM. Ces valeurs correspondent à celles détectées par Laurent *et al.*, (2009) dans la même lagune de mangrove en Guadeloupe et sont aussi détectées par Ott *et al.* (1998) dans le sédiment de mangrove à Twin Cays, au Belize avec un maximum de 1,4mM de sulfures. Les valeurs obtenues après l'immersion du casier de bois sur le sédiment de mangrove ont dépassé largement ces concentrations témoins en atteignant 10mM après 15 jours de dégradation des bois coulés.

L'analyse physico-chimique du sédiment de mangrove nécessiterait un réplicat d'expérimentation afin de valider le fait que le sédiment est trop hétérogène et déjà trop riche en sulfures pour subir une variation de concentration en H₂S lors de l'immersion d'un casier de bois de 250L. Cette expérience complémentaire dans les mêmes conditions révélerait peut-être une erreur dans l'acquisition des données au niveau du casier après 1 mois d'immersion et permettrait de valider l'influence de la dégradation du bois sur les concentrations en sulfures dans le sédiment. Une seconde expérimentation pourrait être effectuée en augmentant la quantité de bois immergé afin d'évaluer si la dégradation du bois influence réellement les concentrations de sulfures dans le sédiment, ou si le sédiment est déjà trop chargé en matières organiques en cours de dégradation pour varier sous l'influence d'un apport supplémentaire de bois. En milieu profond, des expérimentations de bois coulés ont été effectuées soit à partir de petits morceaux de bois et de minéraux afin d'identifier les organismes participant à leur

IV. Discussion

dégradation au cours du temps (Pailleret *et al.*, 2007ab), soit à partir de troncs immergés en grande profondeur afin d'étudier le développement méiofaunistique symbiotique et libre autour et sur le bois (Bienhold *et al.*, 2008). Sur ces deux expérimentations, il a été constaté l'installation d'une faune diversifiée (Pailleret *et al.*, 2007b ; Bienhold *et al.*, 2008) et donc non liée à la quantité de matière. Les bois coulés comme les carcasses de baleines sont des habitats propices au développement d'invertébrés symbiotiques (Deming *et al.*, 1997 ; Smith & Baco, 2003 ; Fujiwara *et al.*, 2007 ; Gros & Gaill, 2007 ; Gros *et al.*, 2007 ; Treude *et al.*, 2009). Certains organismes hôtes ont ainsi été retrouvés sur ces deux habitats et sont capables de s'adapter au milieu. La densité des endosymbiotes des Bathymodiolidae variant en fonction de la quantité d'hydrogène sulfureux disponible (Lorion *et al.*, 2009). Une différence dans les émissions de sulfures par le bois entre les deux années d'expérimentation, pourrait donc expliquer le fait que *E. diana*, le seul nématode collecté en mangrove et associé à des ectosymbiotes, ne soit retrouvé que en 2008 lors de la première expérimentation. Cependant, trop peu d'individus appartenant à l'espèce *E. diana* ont été collectés pour que les tendances observées soient statistiquement interprétables.

Les observations de répartition quantitative de la nématofaune du sédiment de mangrove en fonction du temps d'immersion du casier de bois n'ont pas permis d'obtenir un profil interprétable et répétitif. Les détritivores ont été observés en majorité sur le transect étudié, lors de l'expérimentation de 2008, où l'on retrouve une population dominée par le nématode *Terchellingia* sp.. Cette dominance du peuplement par une espèce peut être liée à un phénomène de reproduction intense. Comme décrit par Hopper *et al.* (1973), le cycle de vie des nématodes en mangrove peut varier en fonction des modifications de température.

En introduction, nous avons vu que certaines espèces étaient prélevées majoritairement dans la mangrove de Guadeloupe dont *Neonyx* sp. *Metachromadora obesa* (Chitwood, 1936), *Daptonema miamiensis* (Hopper, 1969), *Gomphionema* sp. (Gerlach, 1957), *Metalinhomeus* sp.1 (Chitwood, 1951), *Terschellingia longicaudata* (De Man, 1907), *Croconema* sp. (Cobb, 1920), *Eubostrichus* sp. (Greef, 1869) et *Pseudolelloides* sp. (Timm, 1957 ; Boucher & Goubault, 1990). D'autres espèces de nématodes appartenant aux genres *Chromaspirinia*, *Pseudochromadora* et *Eubostrichus* ont aussi été collectés dans le sédiment de mangrove au Kenya, où la forêt de mangrove est constituée par des *Ceriops* (Muthumbi *et al.*, 1995). Dans notre étude, nous retrouvons trois genres en majorité d'effectifs *Terschellingia*, *Daptonema* et *Gomphionema*. Deux autres genres *Croconema* et *Eubostrichus*, sont retrouvés en plus faible quantité dans le sédiment de mangrove mais sont

IV. Discussion

facilement repérables par leurs caractères morphologiques particuliers. Ces observations confirment la présence d'une nématofaune particulière propre au sédiment de mangrove. Les nématodes du genre *Eubostrichus* n'ont été collectés en mangrove dans notre étude que lors de l'expérimentation de 2008 alors que l'espèce *Parapinnanema* précédemment décrite par Gourbault & Vincx (1994) comme nouvelle espèce de mangrove en Guadeloupe a été retrouvée uniquement au cours de notre expérimentation de 2009. Cette différence de peuplement ne permet pas de valider une expérimentation plutôt qu'une autre entre 2008 et 2009. Des analyses statistiques multivariées permettraient de comparer la composition des communautés en considérant les deux années d'étude comme une seule analyse répliquée.

Les différences dans le peuplement de nématodes entre l'année 2008 et 2009 ne peuvent pas s'expliquer par des dysfonctionnements techniques, les échantillons ayant été prélevés et traités de la même manière et dans les mêmes conditions, par le même manipulateur et avec les mêmes produits. Aussi, les prélèvements ont été effectués à la même période en saison sèche. Il existe donc une variation de dynamique de la nématofaune dans le sédiment de mangrove. Il aurait été nécessaire d'effectuer des répliqués à chaque expérimentation, afin de prendre en considération la répartition en patches des nématodes dans le sédiment de mangrove. L'expérimentation menée en 2008, où le casier de bois semble, dans les 15 premiers jours, attirer les herbivores puis les prédateurs après 1 mois d'immersion, suggère l'attraction d'autres organismes régulant la composition de la nématofaune au niveau du casier de bois. Cette observation mériterait d'être liée à la description de la macrofaune dans les mêmes conditions d'immersion d'un casier de bois. Dans des études précédentes, il a été observé que les herbivores étaient attirés par les feuilles en décomposition et les racines de palétuviers, correspondant à l'augmentation sur ces végétaux, de micro-algues benthiques et de phytodétritus (Alongi, 1990 ; Nicholas *et al.*, 1991 ; Chinnadurai & Fernando, 2007). Torres-Pratts & Schizas (2007) mettent en évidence qu'aucune succession des groupes trophiques ne peut être observée chez les nématodes et que les successions taxonomiques ne suivent pas un profil défini lors de la décomposition des feuilles de *Rhizophora mangle*. Pourtant, les groupes trophiques sont comparables entre les différentes zones géographiques étudiées, avec une dominance des détritivores (Hopper *et al.*, 1973 ; Ólafsson, 1995 ; Somerfield *et al.*, 1998 ; Zhou, 2001 ; Gwyther, 2003). L'abondance et la taxonomie des nématodes sur les feuilles en décomposition varient selon les études publiées (Alongi, 1987 ; Jensen, 1987 ; Tietjen & Alongi, 1990 ; Vanhove *et al.*, 1992 ; Ólafsson, 1995 ; Gee & Somerfield, 1997 ; Schrijvers & Vincx, 1997 ; Somerfield *et al.*, 1998 ; Chinnadurai & Fernando, 2007). Le fait que seulement trois groupes trophiques ont été considérés lors de

IV. Discussion

notre analyse, ne permet pas d'avoir une répartition des nématodes en fonction de leur préférence alimentaire. Il serait intéressant d'utiliser un index de diversité trophique afin d'interpréter les données spatio-temporelles obtenues lors de nos deux études. Cependant, les prédateurs étant faiblement représentés (moins de cinq individus par site), ils ne pourraient pas être intégrés aux analyses statistiques.

L'étude de la répartition dans le temps de la nématofaune et de la macrofaune a précédemment été menée sur une carcasse de baleine posée à 1657m de profondeur (Debenham *et al.*, 2004). Après 18 mois de dégradation de la carcasse de baleine, il a été observé une relation inverse et non linéaire entre l'abondance de nématodes et la macrofaune. Les nématodes ont été collectés en faible quantité jusqu'à 9m de distance de la baleine, puis en grande quantité jusqu'à 30m de distance, alors que l'inverse a été observé pour la macrofaune. Dans notre étude, le bois se dégradant plus vite qu'une carcasse de baleine, les prélèvements ont été répétés tous les 15 jours pendant 1 mois ½ et ont été effectués sur deux années. La mangrove constitue un milieu facile d'accès et de faible profondeur, où les conditions de concentration en sulfures sont proches de celles des milieux profonds. Nous pouvons donc penser que la macrofaune joue un rôle dans la répartition de la nématofaune dans le sédiment de mangrove. Aussi, il a été démontré par Ashton *et al.*, (1999) que les feuilles et branchages immergés se dégradent rapidement dans les eaux de mangrove (en environ 1 mois ½) et que le temps de dégradation varie en fonction des bois coulés. Cette observation s'expliquerait par les différentes concentrations en tanin contenues dans les feuilles, ainsi que par la densité de macro-invertébrés (Netto & Gallucci, 2003) qui influencerait le taux de décomposition. Zhou, en 2001, met en place une expérimentation pour observer l'effet de la litière de feuilles sur la méiofaune de mangrove. Il constate que la réponse de la méiofaune change en fonction de la dégradation des feuilles et met en évidence un bloom d'une espèce de nématode détritivore (*Laimella* sp.) lors de son expérimentation.

4.3 *Utilisation de la microspectrométrie Raman comme outil de détection des organismes thiotrophiques*

La microspectrométrie Raman nous a permis de détecter la présence de soufre élémentaire dans des échantillons biologiques, d'identifier sa structure comme soufre S_8 et de la localiser sur un nématode avec une résolution de $10\mu\text{m}$. Cette résolution pourrait être améliorée pour atteindre $2\mu\text{m}$. En raison de la taille de la sonde utilisée dans notre analyse, par rapport à celle des bactéries, il n'a pas été possible de montrer que le soufre était localisé à l'intérieur (c'est-à-dire dans le cytoplasme), ou contenu dans des granules de l'espace périplasmique, ou à l'extérieur des bactéries comme décrit précédemment chez les bivalves symbiotiques par microanalyse cryo-EFTEM + EELS (Lechaire *et al.*, 2006 ; 2008). La spectrométrie Raman s'est révélée être un outil très intéressant et efficace pour la détection du soufre élémentaire dans les organismes thiotrophiques libres et symbiotiques et, plus particulièrement, pour la détermination des symbioses sulfo-oxydantes.

Le soufre élémentaire S_8 est connu pour être soluble dans l'éthanol, solvant utilisé habituellement pour l'observation en MET (cTEM) lors de la déshydratation des organismes avant leur inclusion en résine époxy (Vetter, 1985 ; Truchet *et al.*, 1998 ; Pasteris *et al.*, 2001) et LR White. Par conséquent, les petits granules translucides à l'intérieur des symbiotes bactériens sont des vésicules vides dans les coupes fines. Ces observations démontrent que la microspectrométrie Raman et l'analyse en perte d'énergie (EELS) sont des techniques inefficaces sur les organismes inclus après fixation chimique des organismes. Néanmoins, l'EELS sur des échantillons cryo-fixés permet une localisation précise des composés (Lechaire *et al.*, 2006 ; 2008). De plus, la microspectrométrie Raman est la technique la plus simple qui fournit un résultat positif en quelques secondes à partir d'un animal entier et sans préparation complexe de l'échantillon. Elle permet ainsi d'obtenir facilement et rapidement un « screening » de détection du soufre à partir d'échantillons biologiques et constitue une étape préliminaire avant les analyses phylogénétiques des organismes.

Cette technique utilisable sur des organismes entiers ne cause aucun dommage sur les échantillons. Ce caractère non destructif de l'analyse permet d'utiliser l'échantillon après les expérimentations Raman afin de réaliser des études complémentaires analytiques (EELS, EDXS, Diffraction d'électron, etc.), enzymologiques et ultrastructurales (MET, MEB, immunologie, etc.). Cette utilisation multiple de l'échantillon est un avantage considérable et sans précédent pour les organismes rares, difficiles à collecter ou retrouvés en faible quantité dans l'environnement. Cette technique permet à partir d'un unique individu d'obtenir

IV. Discussion

plusieurs résultats permettant de caractériser une éventuelle symbiose bactérienne sulfo-oxydante.

Cependant, nous avons également mis en évidence dans notre étude, le risque d'obtenir un signal positif en soufre par microspectrométrie Raman sur un organisme (*Lucina pectinata*), alors que celui-ci n'est pas uniquement associé à des bactéries sulfo-oxydantes mais développe aussi des cellules de stockage du soufre. La microspectrométrie Raman ne permet pas de définir exactement si le composé soufré est contenu dans des granules internes produits par l'organisme lui-même lors d'une exposition au H₂S comme le nématode *Oncholaimus campylocercoides* (Thiermann *et al.*, 2000), ou s'il est stocké dans des bactéries ectosymbiotiques comme chez *E. diana*e ou encore dans des bactéries endosymbiotiques comme chez *Astomonema jenneri* (Ott *et al.*, 1982).

La microspectrométrie Raman ne s'utilise pas uniquement sur les organismes symbiotiques puisqu'elle permet la détection du soufre élémentaire ; elle caractérise aussi le métabolisme bactérien. Cette utilisation a été prouvée dans l'étude des mattes bactériennes étudiées sur les feuilles de mangrove. La microspectrométrie Raman a été récemment utilisée sur des mattes bactériennes en milieu profond par White *et al.*, (2005). Cette étude a montré les capacités de cette technique à analyser la composition minérale des roches, des gaz mais aussi de détecter du soufre élémentaire dans du matériel biologique en milieu profond (White *et al.*, 2006). A partir de l'analyse des composés (soufre, fer, méthane, etc.), il est possible de réduire le temps des plongées profondes et de sélectionner les échantillons désirés. La microspectrométrie Raman permet donc d'obtenir directement les échantillons recherchés et de réduire la quantité de matériel indésirable collecté.

Les principaux avantages de cette technique sont : (i) une application possible sur des échantillons vivants dans leur environnement naturel (dans notre étude il s'agit de l'eau de mer) ; (ii) une nature non destructive (interaction de la lumière visible avec l'échantillon) ; (iii) un temps d'acquisition court (quelques secondes à quelques minutes en fonction de la puissance de la lumière excitatrice et de la concentration en soufre) ; (iv) une capacité à extraire une cartographie ou des profils de répartition d'une espèce chimique avec une résolution spatiale de l'ordre du micromètre. Finalement, la spectrométrie Raman permet des analyses moléculaires et structurales et peut être adaptée à différentes conditions environnementales.

Elle a été précédemment utilisée pour l'identification des phases minérales telles que les constituants des coquilles de mollusques (Barnard & De Waal, 2006). Au niveau de l'identification des molécules biologiques et de leur distribution, la spectrométrie Raman peut

IV. Discussion

principalement être utilisée dans le cas de molécules présentant des spectres de haute intensité Raman, c'est-à-dire, dans le cas de molécules colorées (absorbent de la lumière dans le domaine du visible) telles que les métalloprotéines ou de métaux chélatés (association d'un métal avec une autre substance par liaisons faibles). Cette technique est d'ailleurs utilisée pour déterminer la structure moléculaire des protéines et définir leur fonction (Wang *et al.*, 1994 ; Gao *et al.*, 2006 ; Krafft *et al.*, 2006). La microspectrométrie Raman a aussi été utilisée pour étudier la composition biochimique des cellules dans des cultures bactériennes pures (Schuster *et al.*, 2000ab ; Escoriza *et al.*, 2006) et pour identifier des cultures bactériennes pures à partir de leurs constituants cellulaires (Huang *et al.*, 2004 ; Jarvis *et al.*, 2006). Enfin, il a été réalisé le suivi de l'incorporation de l'isotope stable du carbone ^{13}C dans des cellules microbiennes en couplant des analyses en FISH et en microspectrométrie Raman (Huang *et al.*, 2007). Cette dernière analyse pourrait se révéler utile dans l'étude de l'échange des isotopes de l'azote et du soufre entre les symbiotes et leur nématode hôte.

5 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude complète les informations concernant les nématodes de la sous-famille des Stilbonematinae avec la description de huit espèces de nématodes appartenant à 3 genres différents. Ces nématodes colonisent l'herbier à *Thalassia testudinum* en Guadeloupe et une espèce, *Eubostrichus diana* est aussi collectée dans le sédiment et sur les feuilles en décomposition de mangrove. Il est important de mieux appréhender les symbioses bactériennes chez ces organismes, puisque les Nématodes représentent le taxon le plus important dans ces milieux côtiers.

L'ensemble des résultats obtenus – la présence de granules dans le périplasme des bactéries recouvrant les nématodes (MET), l'appartenance de ces bactéries aux eubactéries- γ -protéobactéries et, plus particulièrement, la détection de soufre élémentaire par microspectrométrie Raman – confirment la présence de soufre dans les symbiotes extracellulaires et détermine leur appartenance aux bactéries sulfo-oxydantes.

La détection et la caractérisation du soufre dans les bactéries thioautotrophiques sont intéressantes afin de mieux connaître les interactions symbiotiques des invertébrés marins colonisant les environnements soufrés réduits. Dans notre étude, l'utilisation de la microspectrométrie Raman nous a permis de mettre en évidence de potentielles symbioses bactériennes sulfo-oxydantes chez des organismes de la méiofaune non décrits à ce jour comme symbiotiques. Cette technique s'est révélée être un outil très intéressant pour la détection des symbioses sulfo-oxydantes et plus globalement pour la détection des organismes thioautotrophiques. Cependant, d'autres techniques telles que la microscopie électronique doivent être utilisées pour préciser la présence ou non de bactéries et l'existence de granules translucides correspondant au soufre détecté. La microspectrométrie Raman est donc facile à utiliser en routine pour la détection de la nature métabolique des organismes symbiotiques ou des bactéries libres et peut aussi bien être utilisée en milieu côtier qu'en milieu profond.

Les études physico-chimiques menées dans les deux écosystèmes tropicaux, l'herbier à *T. testudinum* et la mangrove, nous ont permis (i) de déterminer la présence d'un gradient de concentration en H_2S dans le sédiment d'herbier et de mettre en évidence le caractère faiblement soufré réduit de ce milieu (maximum $30\mu M$) ; (ii) de constater l'hétérogénéité du sédiment de mangrove et de mettre en évidence le caractère fortement soufré réduit de ce milieu (maximum $10mM$) proche des conditions extrêmes de H_2S au niveau des sources hydrothermales.

V. Conclusions et perspectives

Les peuplements d'herbiers semblent être organisés en fonction du gradient de concentration en H_2S , alors qu'en mangrove la nématofaune se répartit différemment dans le sédiment et pas forcément en fonction des concentrations en sulfures. Il a été observé une évolution de la dynamique des populations entre les deux années d'étude en mangrove, que l'on suppose liée à la présence du bois immergé mais aussi à une éventuelle prédation par la macrofaune et au cycle de vie des nématodes. Les espèces collectées en mangrove correspondent aux espèces décrites précédemment dans ce même environnement et sont principalement représentées par les nématodes des genres *Terschellingia*, *Daptonema* et *Gomphonema*. Des genres caractéristiques tels que *Eubostrichus*, *croconema* et *Pseudochromadora* sont aussi retrouvés comme appartenant à la nématofaune du sédiment lagunaire de mangrove.

Les difficultés d'extraction d'ADN rencontrées dans notre étude ne nous ont pas permis de réaliser des études phylogénétiques des nématodes symbiotiques retrouvés dans le sédiment d'herbier. Néanmoins d'autres outils d'identifications morphologique et moléculaire nous ont permis d'avoir un aperçu de la constitution du peuplement des nématodes dans ce milieu.

En mangrove, une expérimentation supplémentaire avec un apport de bois plus important permettrait de confirmer nos résultats et de constater l'hétérogénéité du sédiment et la variation de structure dans la dynamique de la nématofaune ou de mettre en évidence une réelle évolution de la population dans le sédiment en fonction de l'apport en bois et de ses émissions de sulfures. Il serait intéressant d'ajouter un prélèvement de la macrofaune afin de vérifier les phénomènes de prédation sur la nématofaune sur le bois coulé et dans le sédiment.

Enfin la recherche d'autres formes de symbioses dans les milieux tropicaux côtiers pourrait être utile à une meilleure compréhension du développement et de la mise en place de la symbiose chimioautotrophe en milieu marin et constituerait un modèle de comparaison avec les symbioses observées en milieu profond.

BIBLIOGRAPHIE

- Abebe E, Andrassy I, Traunspurger W. (2006) Freshwater nematodes. Ecology and taxonomy. CABI Publishing.
- Ahn CC and Krivanek OL (1983) EELS atlas. A Reference Guide of Electron Energy Loss Spectra Covering all Stable Elements. Gatan Inc., Warrendale, U.S.A.
- Alongi DM (1990) Community dynamics of free-living nematodes in some tropical mangrove and sandflat habitats. *Bull. Mar. Sci.* 46(2): 358-373.
- Alongi DM (1987) Intertidal zonation and seasonality of meiobenthos in tropical mangrove estuaries. *Mar. Biol.* 95(3): 447-458.
- Amann R, Fuchs BM, Behrens S (2001) The identification of microorganisms by fluorescence *in situ* hybridisation. *Current Opinion in Biotechnology* 12(3): 231-236.
- Amann RI, Binder BJ, Olson RJ, Chisholm SW, Devereux R, Stahl DA (1990) Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(6): 1919-1925.
- Arp AJ and Childress JJ (1983) Sulfide binding by the blood of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila*. *Science* 219(4582): 295-297.
- Arp AJ and Childress JJ (1981) Blood function in the hydrothermal vent Vestimentiferan tube worm. *Science* 213(4505): 342-344.
- Arp AJ, Childress JJ, Vetter RD (1987) The sulphide-binding protein in the blood of the Vestimentiferan tube-worm, *Riftia pachyptila*, is the extracellular haemoglobin. *J. Exp. Biol.* 128: 139-158.
- Ashton EC, Hogarth PJ, Ormond R (1999) Breakdown of mangrove leaf litter in a managed mangrove forest in peninsular Malaysia. *Hydrobiologia* 413: 77-88.
- Assor R (1988) Hydrologie et sédimentologie du Grand Cul-de-Sac marin (Guadeloupe, F.W.I.). *Ann. Soc. Géol. Nord* CVII: 221-238.
- Austen MC, Warwick RM, Ryan KP (1993) *Astomonema southwardorum* sp. nov., a gutless nematode dominant in a methane seep area in the north sea. *J. Mar. Biol. Assoc. U K* 73: 627-634.
- Barnard W and De Waal D (2006) Raman investigation of pigmentary molecules in the molluscan biogenic matrix. *J. Raman Spectrosc.* 37(1-3): 342-352.
- Bauer WD (1981) Infection of legumes by rhizobia. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 32: 407-449.
- Bauer-Nebelsick M, Blumer M, Urbancik W, Ott JA (1995) The glandular sensory organ of Desmodoridae (Nematoda) - ultrastructure and phylogenetic implications. *Invertebr. Biol.* 114(3): 211-219.

Références bibliographiques

- Bauer-Nebelsick M, Bardele CF, Ott JA (1996a) Electron microscopic studies on *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Eur. J. Protistol.* 32(2): 202-215.
- Bauer-Nebelsick M, Bardele CF, Ott JA (1996b) Redescription of *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg, 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Eur. J. Protistol.* 32(1): 18-30.
- Bayer C, Heindl NR, Rinke C, Lücker S, Ott JA, Bulgheresi S (2009) Molecular characterization on the symbionts associated with marine nematodes of the genus *Robbea*. *Environ. Microbiol. Reports* 1(2): 136-144.
- Behrens S, Lösekann T, Pett-Ridge J, Weber PK, Ng W-O, Stevenson BS, Hutcheon ID, Relman DA, Spormann AM (2008) Linking microbial phylogeny to metabolic activity at the single-cell level by using enhanced element labeling-catalyzed reporter deposition fluorescence *in situ* hybridization (EL-FISH) and NanoSIMS. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(10): 3143-3150.
- Bell SS, Walters K, Kern JC (1984) Meiofauna from seagrass habitats: A review and prospectus for future research. *Estuaries* 7(4A): 331-338.
- Berger EC, Urbancik W, Ott JA (1996) *Eubostrichus topiarius* sp. n., a new free-living, marine species of Stilbonematinae (Nematoda: Desmodoridae) from a shallow subtidal sand bottom. *Nematologica* 42: 521-536.
- Beyrem H, Mahmoudi E, Essid N, Hedfi A, Boufahja F, Aïssa P (2007) Individual and combined effects of cadmium and diesel on a nematode community in a laboratory microcosm experiment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68(3): 412-418.
- Bhadury P, Austen MC, Bilton DT, Lamshead PJD, Rogers AD, Smerdon GR (2008) Evaluation of combined morphological and molecular techniques for marine nematode (*Terschellingia* spp.) identification. *Mar. Biol.* 154(3): 509-518.
- Bhadury P, Austen MC, Bilton DT, Lamshead PJD, Rogers AD, Smerdon GR (2006) Development and evaluation of a DNA-barcoding approach for the rapid identification of nematodes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 320: 1-9.
- Bienhold C, Wenzhöfer F, Beier V, Le Bris N, Boetius A (2008) Wood colonization experiments. *Medeco Leg 2 Cruise Report*.
- Blazejak A, Erséus C, Amann R, Dubilier N (2005) Coexistence of bacterial sulfide oxidizers, sulfate reducers, and spirochetes in a gutless worm (Oligochaeta) from the Peru margin. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(3): 1553-1561.
- Blazejak A, Kuever J, Erséus C, Amann R, Dubilier N (2006) Phylogeny of 16S rRNA, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, and adenosine 5'-phosphosulfate reductase genes from gamma- and alphaproteobacterial symbionts in gutless marine worms (Oligochaeta) from Bermuda and the Bahamas. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(8): 5527-5536.

- Blondel J (1979) Biologie et écologie. Masson & Cie.
- Boucher G and Gourbault N (1990) Sublittoral meiofauna and diversity of nematode assemblages off Guadeloupe islands (French West Indies). *Bull. Mar. Sci.* 47(2): 448-463.
- Bright M and Giere O (2005) Microbial symbiosis in Annelida. *Symbiosis* 38(1): 1-45.
- Brooks JM, Kennicutt II MC, Fisher CR, Macko SA, Cole K, Childress JJ, Bidigare RR, Vetter RD (1987) Deep-sea hydrocarbon seep communities: Evidence for energy and nutritional carbon sources. *Science* 238(4830): 1138-1142.
- Buchner P (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Rev. English Ed.
- Bulgheresi S, Schabussova I, Chen T, Mullin NP, Maizels RM, Ott JA (2006) A new C-type lectin similar to the human immunoreceptor DC-SIGN mediates symbiont acquisition by a marine nematode. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4): 2950-2956.
- Calhoun RS and Field ME (2008) Sand composition and transport history on a fringing coral reef, Molokai, Hawaii. *J. Coast Res.* 24(5): 1151-1160.
- Campbell BJ and Cary SC (2001) Characterization of a novel spirochete associated with the hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(1): 110-117.
- Caro A, Gros O, Got P, De Wit R, Troussellier M (2007) Characterization of the population of the sulfur-oxidizing symbiont of *Codakia orbicularis* (Bivalvia, Lucinidae) by single-cell analyses. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(7): 2101-2109.
- Cary SC (1994) Vertical transmission of a chemoautotrophic symbiont in the protobranch bivalve, *Solemya reidi*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3(3): 121-130.
- Cary SC and Giovannoni SJ (1993) Transovarial inheritance of endosymbiotic bacteria in clams inhabiting deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90(12): 5695-5699.
- Cary SC, Warren W, Anderson E, Giovannoni SJ (1993) Identification and localization of bacterial endosymbionts in hydrothermal vent taxa with symbiont-specific polymerase chain reaction amplification and *in situ* hybridization techniques. *Mol. Marine. Biol. Biotechnol.* 2(1): 51-62.
- Cavanaugh CM (1985) Symbioses of chemoautotrophic bacteria and marine invertebrates from hydrothermal vents and reducing sediments. *Bull. Biol. Soc. Wash.* 6: 373-388.
- Cavanaugh CM (1983) Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature* 302(5903): 58-61.
- Cavanaugh CM, Levering PR, Maki JS (1987) Symbiosis of methylotropic bacteria and deep-sea mussels. *Nature* 325(6102): 346-348.

Références bibliographiques

- Cavanaugh CM, McKiness ZP, Newton ILG, Stewart FJ (2006) Marine chemosynthetic symbioses. *The Prokaryotes* : 473-507.
- Cavanaugh CM, Gardiner SL, Jones ML, Jannasch HW, Waterbury JB (1981) Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones: Possible chemoautotrophic symbionts. *Science* 213(4505): 340-342.
- Childress JJ and Fisher CR (1992) The biology of hydrothermal vent animals: Physiology, biochemistry, and autotrophic symbioses. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 30: 337-441.
- Childress JJ, Arp AJ, Fisher Jr. CR (1984) Metabolic and blood characteristics of the hydrothermal vent tube-worm *Riftia pachyptila*. *Mar. Biol.* 83(2): 109-124.
- Chinnadurai G and Fernando OJ (2007) Meiofauna of mangroves of the southeast coast of India with special reference to the free-living marine nematode assemblage. *Est. Coast. Shelf Sci.* 72(1-2): 329-336.
- Clode PL, Stern RA, Marshall AT (2007) Subcellular imaging of isotopically labeled carbon compounds in a biological sample by ion microprobe (NanoSIMS). *Microsc. Res. Tech.* 70(3): 220-229.
- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, Von Herzen RP, Ballard RD, Green K, Williams D, Bainbridge A, Crane K, Van Andel TH (1979) Submarine thermal springs on the Galápagos rift. *Science* 203(4385): 1073-1083.
- Coull BC (1999) Role of meiofauna in estuarine soft-bottom habitats. *Aust. J. Ecol.* 24(4): 327-343.
- Crozier PA (1995) Quantitative elemental mapping of materials by energy-filtered imaging. *Ultramicroscopy* 58(2): 157-174.
- Dando PR, Austen MC, Burke R.A. J, Kendall MA (1991) Ecology of a north sea pockmark with an active methane seep. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 107: 157-167.
- De Ley P and Blaxter ML (2002) Systematic position and phylogeny. *The Biology of Nematodes* : 1-30.
- Debenham NJ, Lamshead PJD, Ferrero TJ, Smith CR (2004) The impact of whale falls on nematode abundance in the deep sea. *Deep-Sea Res. Part I* 51(5): 701-706.
- Decraemer W and Goubault N (1997) Deep-sea nematodes (Nemata, Prochaetosomatinae): New taxa from hydrothermal vents and a polymetallic nodule formation of the Pacific (East Rise; north Fiji and Lau basins; Clarion-Clipperton fracture zone). *Zool. Scr.* 26(1): 1-12.
- Decraemer W and Goubault N (1990a) Marine nematodes from Guadeloupe. IX. the genus *Metepsilonema* (Epsilonematidae). *Bull. Inst. Roy. Sci. Nat. Belg. (Biol)* 59: 25-38.

Références bibliographiques

- Decraemer W and Gourbault N (1990b) Marine nematodes from Guadeloupe. X. three new species of the *Metepsilonema callosum* group (Epsilonematidae). *Bull. Mus. Natn. Hist. Nat.* 12: 385-400.
- Decraemer W and Gourbault N (1987) Marine nematodes from Guadeloupe and other Caribbean islands. VII. the genus *Epsilonema* (Epsilonematidae). *Bull. Inst. Roy. Sci. Nat. Belg. (Biol)* 57: 57-77.
- Decraemer W and Gourbault N (1986) Marine nematodes from Guadeloupe and other Caribbean islands. II. Draconematidae. *Zool. Scr.* 15(2): 107-118.
- Deming JW, Reysenbach A-, Macko SA, Smith CR (1997) Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: Bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Microsc. Res. Tech.* 37(2): 162-170.
- Deprez T (2006) Nemys, an all-round database system for biological information. MarBEF Newsletter.
- Diouris M, Le pennec M, Herry A (1989) Rôle des bactéries symbiotiques chimioautotrophes dans la nutrition de bivalves marins de milieux réducteurs. *Vie Marine* 10: 5-16.
- Distel DL and Cavanaugh CM (1994) Independent phylogenetic origins of methanotrophic and chemoautotrophic bacterial endosymbioses in marine bivalves. *J. Bacteriol.* 176(7): 1932-1938.
- Distel DL, Lee HK-W, Cavanaugh CM (1995) Intracellular coexistence of methano- and thioautotrophic bacteria in a hydrothermal vent mussel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 92(21): 9598-9602.
- Distel DL, Felbeck H, Cavanaugh CM (1994) Evidence for phylogenetic congruence among sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacterial endosymbionts and their bivalve hosts. *J. Mol. Evol.* 38(5): 533-542.
- Distel DL, DeLong EF, Waterbury JB (1991) Phylogenetic characterization and *in situ* localization of the bacterial symbiont of shipworms (Teredinidae: Bivalvia) by using 16S rRNA sequence analysis and oligodeoxynucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(8): 2376-2382.
- Distel DL, Lane DJ, Olsen GJ, Giovannoni SJ, Pace B, Pace NR, Stahl DA, Felbeck H (1988) Sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts: Analysis of phylogeny and specificity by 16S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* 170(6): 2506-2510.
- Douglas AE (1994) Symbiotic interactions. Oxford Science Publications, New-York.
- Dubilier N (1986) Association of filamentous epibacteria with *Tubificoides benedii* (Oligochaeta: Annelida). *Mar. Biol.* 92: 285-288.
- Dubilier N and Giere O (1995) Morphological and ecophysiological adaptations of the marine oligochaete *Tubificoides benedii* to sulfidic sediments. *Amer. Zool.* 35: 163-173.

- Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: The art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology* 6(10): 725-740.
- Dubilier N, Blazejak A, Rühland C (2006) Symbioses between bacteria and gutless marine oligochaetes. *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 41: 251-275.
- Dubilier N, Amann R, Erséus C, Muyzer G, Park S, Giere O, Cavanaugh CM (1999) Phylogenetic diversity of bacterial endosymbionts in the gutless marine oligochaete *Olavius loisae* (Annelida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 178: 271-280.
- Dubilier N, Mülders C, Ferdelman T, De Beer D, Pernthaler A, Klein M, Wagner M, Erséus C, Thiermann F, Krieger J, Giere O, Amann R (2001) Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature* 411: 298-302.
- Duperron S, Laurent MCZ, Gaill F, Gros O (2008) Sulphur-oxidizing extracellular bacteria in the gills of mytilidae associated with wood falls. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63(3): 338-349.
- Duperron S, Fiala-Médioni A, Caprais J-C, Olu K, Sibuet M (2007) Evidence for chemoautotrophic symbiosis in a mediterranean cold seep clam (Bivalvia: Lucinidae): Comparative sequence analysis of bacterial 16S rRNA, APS reductase and RubisCO genes. *FEMS Microbiol. Ecol.* 59(1): 64-70.
- Duperron S, Bergin C, Zielinski F, Blazejak A, Pernthaler A, McKiness ZP, DeChaine E, Cavanaugh CM, Dubilier N (2006) A dual symbiosis shared by two mussel species, *Bathymodiolus azoricus* and *Bathymodiolus puteoserpentis* (Bivalvia: Mytilidae), from hydrothermal vents along the northern mid-atlantic ridge. *Environ. Microbiol.* 8(8): 1441-1447.
- Duplessis MR, Ziebis W, Gros O, Caro A, Robidart J, Felbeck H (2004) Respiration strategies utilized by the gill endosymbiont from the host lucinid *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 70(7): 4144-4150.
- Durand P, Gros O, Frenkiel L, Prieur D (1996) Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 5(1): 37-42.
- Egerton RF. (1986) Electron energy-loss spectroscopy in the electron microscope. Plenum Press, New-York.
- Elsasser SC, Floyd R, Hebert PDN, Schulte-Hostedde AI (2009) Species identification of north american guinea worms (Nematoda: Dracunculus) with DNA barcoding. *Mol. Ecol. Resources* 9(3): 707-712.
- Escoriza MF, Vanbriesen JM, Stewart S, Maier J (2006) Studying bacterial metabolic states using Raman spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* 60(9): 971-976.
- Felbeck H (1981) Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila jones* (Vestimentifera). *Science* 213: 336-338.

Références bibliographiques

- Felbeck H, Childress JJ, Somero GN (1981) Calvin-benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* 293: 291-293.
- Felbeck H, Childress JJ, Somero GN (1983a) Biochemical interactions between molluscs and their algal and bacterial symbionts. *The Mollusca* 2: 331-358.
- Felbeck H, Liebezeit G, Dawson R, Giere O (1983b) CO₂ fixation in tissues of marine oligochaetes (*Phallogdrilus leukodermatus* and *P. planus*) containing symbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Mar. Biol.* 75(2-3): 187-191.
- Fenchel T and Finlay B (2008) Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biol. Rev.* 83(4): 553-569.
- Fenchel T and Finlay BJ (1989) *Kentrophoros*: A mouthless ciliate with a symbiotic kitchen garden. *Ophelia* 30: 75-93.
- Fenchel TM and Riedl RJ (1970) The sulfide system: A new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. *Mar. Biol.* 7(3): 255-268.
- Fisher CR (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine invertebrates. *Rev. Aquat. Sci.* 2(3-4): 399-436.
- Fisher CR, Brooks JM, Vodenichar JS, Zande JM, Childress JJ, Burke Jnr RA (1993) The co-occurrence of methanotrophic and chemoautotrophic sulfur-oxidizing bacterial symbionts in a deep-sea mussel. *Mar. Ecol.* 14(4): 277-289.
- Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. *Mol. Ecol.* 11(4): 839-850.
- Floyd RM, Rogers AD, Lamshead PJD, Smith CR (2005) Nematode-specific PCR primers for the 18S small subunit rRNA gene. *Mol. Ecol. Notes* 5(3): 611-612.
- 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, Mouëza M (1996) Gill structure in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae) with reference to hemoglobin in bivalves with symbiotic sulphur-oxidizing bacteria. *Mar. Biol.* 125(3): 511-524.
- Frontier S (1983) Choix et contraintes de l'échantillonnage écologique. Stratégies d'échantillonnage en écologie : 15-62.
- Fry B (1988) Food web structure on Georges Bank from stable C, N, and S isotopic compositions. *Limnol. Oceanogr.* 33(5): 1182-1190.
- Fry B, Gest H, Hayes JM (1983) Sulphur isotopic compositions of deep-sea hydrothermal vent animals. *Nature* 306(5938): 51-52.

Références bibliographiques

- Fujiwara Y, Kawato M, Yamamoto T, Yamanaka T, Sato-Okoshi W, Noda C, Tsuchida S, Komai T, Cubelio SS, Sasaki T, Jacobsen K, Kubokawa K, Fujikura K, Maruyama T, Furushima Y, Okoshi K, Miyake H, Miyazaki M, Nogi Y, Yatabe A, Okutani T (2007) Three-year investigations into sperm whale-fall ecosystems in Japan. *Mar. Ecol.* 28(1): 219-232.
- Fuller RC (1999) Microbial inclusions with special reference to PHA inclusions and intracellular boundary envelopes. *Int. J. Biol. Macromol.* 25(1-3): 21-29.
- Gaill F, Desbruyères D, Prieur D (1987) Bacterial communities associated with "pompeii worms" from the east pacific rise hydrothermal vents: SEM, TEM observations. *Microb. Ecol.* 13(2): 129-139.
- Gao Y, El-Mashtoly SF, Pal B, Hayashi T, Harada K, Kitagawa T (2006) Pathway of information transmission from heme to protein upon ligand binding/dissociation in myoglobin revealed by UV resonance Raman spectroscopy. *J. Biol. Chem.* 281(34): 24637-24646.
- Gee JM and Somerfield PJ (1997) Do mangrove diversity and leaf litter decay promote meiofaunal diversity? *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 218(1): 13-33.
- Giere O. (2009) Meiobenthology - the microscopic motil fauna of aquatic sediments. Springer.
- Giere O (1996) Bacterial endosymbioses in marine littoral worms. *Biosyst. Ecol. Ser.* 11: 353-367.
- Giere O (1992) Benthic life in sulfidic zones of the sea - ecological and structural adaptations to a toxic environment. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.* 85: 77-93.
- Giere O and Langheld C (1987) Structural organisation, transfer and biological fate of endosymbiotic bacteria in gutless oligochaetes. *Mar. Biol.* 93: 641-650.
- Giere O, Nieser C, Windoffer R, Erséus C (1995) A comparative structural study on bacterial symbioses of Caribbean gutless tubificidae (Annelida, Oligochaeta). *Acta Zool.* 76: 281-290.
- Giere O, Conway NM, Gastrock G, Schmidt C (1991) Regulation of gutless annelid ecology by endosymbiotic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68: 287-299.
- Giovannoni SJ, DeLong EF, Olsen GJ, Pace NR (1988) Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* 170(2): 720-726.
- Goffredi SK, Childress JJ, Desaulniers NT, Lallier FH (1997) Sulfide acquisition by the vent worm *Riftia pachyptila* appears to be via uptake of HS⁻, rather than H₂S. *J. Exp. Biol.* 200(20): 2609-2616.

Références bibliographiques

- Gourbault N and Vincx M (1994) New species of *Parapinnanema* (Nematoda: Chromadoridae) are described, with a discussion of the genus. *Aust. J. Mar. Fresw. Res.* 45: 141-159.
- Gourbault N (1982) Nématodes marins de Guadeloupe. I. Xyalidae nouveaux des genres *Rhynchonema* cobb et *Prorhynchonema* nov. gen. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 4: 75-87.
- Gourbault N and Vincx M (1990) Two new species of brood protecting Desmodoridae (Nematoda) from Guadeloupe. *Nematologica* 36(2): 131-143.
- Gourbault N and Decraemer W (1988) Nématodes marins de Guadeloupe. VIII. le genre *Perepsilon* (Epsilonematidae). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 10: 535-551.
- Gourbault N and Decraemer W (1987) Nématodes marins de Guadeloupe. VI. les genres *Bathyepsilon* et *Leptepsilon* (Epsilonematidae). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 9: 605-631.
- Gourbault N and Decraemer W (1986) Nématodes marins de Guadeloupe. III. Epsilonematidae des genres nouveaux *Metaglochinema* n. g. (Glochinematinae) et *Keratonema* n. g. (Keratonematinae, n. subfam.). *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 8(A): 171-183.
- Gourbault N, Warwick RM, Helléouet M-N (1998) Spatial and temporal variability in the composition and structure of meiobenthic assemblages (especially nematodes) in tropical beaches (Guadeloupe, FWI). *Cah. Biol. Mar.* 39(1): 29-39.
- Grassé PP. (1965) *Traité de zoologie*. Masson and Cie, France.
- Grassle JF (1986) The ecology of deep-sea hydrothermal vent communities. *Adv. Mar. Biol.* 23 : 301-362.
- Grassle JF (1985) Hydrothermal vent animals: Distribution and biology. *Science* 229(4715): 713-717.
- Gray S. (1981) *The ecology of marine sediments*. CUP Archive.
- Grieshaber MK and Völke S (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 33-53.
- Gros O. (1997) Symbiose bactérienne et transmission des symbiotes chez les mollusques bivalves tropicaux de la famille des lucinidae inféodés aux herbiers et à la mangrove. Thèse De Doctorat, Université Claude Bernard Lyon I: 128pp.
- Gros O and Gaill F (2007) Extracellular bacterial association in gills of «wood mussels». *Cah. Biol. Mar.* 48(1): 103-109.
- Gros O, Guibert J, Gaill F (2007) Gill-symbiosis in mytilidae associated with wood fall environments. *Zoomorphology* 126(3): 163-172.

Références bibliographiques

- Gros O, Liberge M, Felbeck H (2003) Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Mar. Biol.* 142(1): 57-66.
- Gros O, Frenkiel L, Moueza M (1996) Gill ultrastructure and symbiotic bacteria in the tropical lucinid, *Linga pensylvanica* (linne). *Symbiosis* 20(3): 259-280.
- Gros O, Liberge M, Heddi A, Khatchadourian C, Felbeck H (2003) Detection of the free-living forms of sulfide-oxidizing gill endosymbionts in the lucinid habitat (*Thalassia testudinum* environment). *Appl. Environ. Microbiol.* 69(10): 6264-6267.
- Gros O, Darrasse A, Durand P, Frenkiel L, Mouëza M (1996) Environmental transmission of a sulfur-oxidizing bacterial gill endosymbiont in the tropical lucinid bivalve *Codakia orbicularis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(7): 2324-2330.
- Gwyther J (2003) Nematode assemblages from *Avicennia marina* leaf litter in a temperate mangrove forest in south-eastern Australia. *Mar. Biol.* 142(2): 289-297.
- Haddad A, Camacho F, Durand P, Cary SC (1995) Phylogenetic characterization of the epibiotic bacteria associated with the hydrothermal vent polychaete *Alvinella pompejana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5): 1679-1687.
- Harmer TL, Rotjan RD, Nussbaumer AD, Bright M, Ng AW, DeChaine EG, Cavanaugh CM (2008) Free-living tube worm endosymbionts found at deep-sea vents. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(12): 3895-3898.
- Hedfi A, Mahmoudi E, Boufahja F, Beyrem H, Aïssa P (2007) Effects of increasing levels of nickel contamination on structure of offshore nematode communities in experimental microcosms. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 79(3): 345-349.
- Heip C, Vincx M, Vranken G (1985) The ecology of marine nematodes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 23: 399-489.
- Hentschel U and Felbeck H (1995) Nitrate respiration in chemoautotrophic symbionts of the bivalve *Lucinoma aequizonata* is not regulated by oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4): 1630-1633.
- Hentschel U and Felbeck H (1993) Nitrate respiration in the hydrothermal vent tubeworm *Riftia pachyptila*. *Nature* 366(6453): 338-340.
- Hentschel U, Cary SC, Felbeck H (1993) Nitrate respiration in chemoautotrophic symbionts of the bivalve *Lucinoma aequizonata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 94(1): 35-41.
- Hentschel U, Berger EC, Bright M, Felbeck H, Ott JA (1999) Metabolism of nitrogen and sulfur in ectosymbiotic bacteria of marine nematodes (Nematoda, Stilbonematinae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 183: 149-158.
- Herman PMJ, Middelburg JJ, Widdows J, Lucas CH, Heip CHR (2000) Stable isotopes as trophic tracers: Combining field sampling and manipulative labelling of food resources for macrobenthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 204: 79-92.

- Himmel D (2005) Application de la microspectrométrie raman à la mesure *in situ* de paramètres physiques régnant dans un contact sphère/plan en régime de lubrification elastohydrodynamique. Thèse De Doctorat, Université des Antilles et de la Guyane : 90pp.
- Himmel D, Maurin LC, Gros O, 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.
- Hodda M (1990) Variation in estuarine littoral nematode populations over three spatial scales. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 30(4): 325-340.
- Hope WD and Murphy DG (1969) *Rhaptothyreus typicus* n. g., n. sp., an abyssal marine nematode representing a new family of uncertain taxonomic position. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 82: 81-92.
- Hopper BE, Fell JW, Cefalu RC (1973) Effect of temperature on life cycles of nematodes associated with the mangrove (*Rhizophora mangle*) detrital system. *Mar. Biol.* 23(4): 293-296.
- Hoschitz M, Buchholz TG, Ott JA (1999) *Leptonemella juliae* sp.n. and *Leptonemella vestari* sp.n. (Stilbonematinae), two new free-living marine nematodes from a subtidal sand bottom. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 101: 423-435.
- Hoschitz M, Bright M, Ott JA (2001) Ultrastructure and reconstruction of the pharynx of *Leptonemella juliae* (Nematoda, Adenophorea). *Zoomorphology* 121: 95-107.
- Huang WE, Griffiths RI, Thompson IP, Bailey MJ, Whiteley AS (2004) Raman microscopic analysis of single microbial cells. *Anal. Chem.* 76(15): 4452-4458.
- Huang WE, Stoecker K, Griffiths R, Newbold L, Daims H, Whiteley AS, Wagner M (2007) Raman-FISH: Combining stable-isotope Raman spectroscopy and fluorescence *in situ* hybridization for the single cell analysis of identity and function. *Environ. Microbiol.* 9(8): 1878-1889.
- Hungate RE (1975) The rumen microbial ecosystem. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 6: 39-66.
- Jannasch HW (1989) Sulphur emission and transformations at deep sea hydrothermal vents. Evolution of the Global Biogeochemical Sulphur Cycle. *SCOPE.* 7: 181-190.
- Jannasch HW and Wirsén CO (1985) The biochemical versatility of chemosynthetic bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *Biol. Soc. Wash. Bull.* 6: 325-334.
- Jarvis RM, Brooker A, Goodacre R (2006) Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria. *Faraday Discuss.* 132: 281-292.
- Jensen P (1987) Feeding ecology of free-living aquatic nematodes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 35: 187-196.

Références bibliographiques

- Jørgensen BB (1977) The sulfur cycle of a coastal marine sediment (Limfjorden, Denmark). *Limnol. Oceanogr.* 22: 814-832.
- Jørgensen BB and Fenchel T (1974) The sulfur cycle of a marine sediment model system. *Mar. Biol.* 24(3): 189-201.
- Julian D, Dalia WE, Arp AJ (1998) Neuromuscular sensitivity to hydrogen sulfide in the marine invertebrate *Urechis caupo*. *J. Exp. Biol.* 201(9): 1393-1403.
- Kamenev GM, Fadeev VI, Selin NI, Tarasov VG, Malakhov VV (1993) Composition and distribution of macro- and meiobenthos around sublittoral hydrothermal vents in the bay of Plenty, New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwat. Res.* 27(4): 407-418.
- Kampfer S, Sturmbauer C, Ott J (1998) Phylogenetic analysis of rDNA sequences from Adenophorean nematodes and implications for the adenophorea-secernentea controversy. *Invertebr. Biol.* 117(1): 29-36.
- Kito K (1989) A new mouthless marine nematode from Fiji. *J. Nat. Hist.* 23: 635-642.
- Kito K and Aryuthaka C (2006) New mouthless nematode of the genus *Parastomonema* Kito, 1989 (Nematoda: Siphonolaimidae) from a mangrove forest on the coast of Thailand, and erection of the new subfamily Astomonematinae within the Siphonolaimidae. *Zootaxa* 1177: 39-49.
- Kleinfeld AM, Kampf JP, Lechene C (2004) Transport of ^{13}C -oleate in adipocytes measured using multi imaging mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15(11): 1572-1580.
- Krafft C, Knetschke T, Funk RHW, Salzer R (2006) Studies on stress-induced changes at the subcellular level by Raman microspectroscopic mapping. *Anal. Chem.* 78(13): 4424-4429.
- Krueger DM and Cavanaugh CM (1997) Phylogenetic diversity of bacterial symbionts of *Solemya* hosts based on comparative sequence analysis of 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(1): 91-98.
- Krueger DM, Gustafson RG, Cavanaugh CM (1996) Vertical transmission of chemoautotrophic symbionts in the bivalve *Solemya velum* (Bivalvia: Protobranchia). *Biol. Bull.* 190(2): 195-202.
- Laurent MCZ, Gros O, Brulport J-P, Gaill F, Bris NL (2009) Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. *Mar. Environ. Res.* 67(2): 83-88.
- Lawry NH, Jani V, Jensen TE (1981) Identification of the sulfur inclusion body in *Beggiatoa alba* B18LD by energy-dispersive X-ray microanalysis. *Curr. Microbiol.* 6(2): 71-74.
- Lechaire J-P, Frébourg G, Gaill F, 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. *Mar. Biol.* 154(4): 693-700.

Références bibliographiques

- Lechaire J-P, Frébourg G, Gaill F, Gros O (2006) *In situ* localization of sulphur in the thioautotrophic symbiotic model *Lucina pectinata* (Gmelin, 1791) by cryo-EFTEM microanalysis. *Biology of the Cell* 98(3): 163-170.
- Lechaire J-P, Shillito B, Frébourg G, Gaill F (2002) Elemental characterization of microorganism granules by EFTEM in the tube wall of a deep-sea vent invertebrate. *Biology of the Cell* 94(4-5): 243-249.
- Lechene CP, Luyten Y, McMahon G, Distel DL (2007) Quantitative imaging of nitrogen fixation by individual bacteria within animal cells. *Science* 317(5844): 1563-1566.
- Liberge M, Gros O, Frenkiel L (2001) Lysosomes and sulfide-oxidizing bodies in the bacteriocytes of *Lucina pectinata*, a cytochemical and microanalysis approach. *Mar. Biol.* 139(3): 401-409.
- Long DA. (1977) Raman spectroscopy. McGraw-Hill, U.K.
- Lorion J, Duperron S, Gros O, Cruaud C, Samadi S (2009) Several deep-sea mussels and their associated symbionts are able to live both on wood and on whale falls. *Proc. R. Soc. B* 276(1654): 177-185.
- Lösekan T, Robador A, Niemann H, Knittel K, Boetius A, Dübilier N (2008) Endosymbioses between bacteria and deep-sea siboglinid tubeworms from an arctic cold seep (haakon mosby mud volcano, barents sea). *Environ Microbiol* 10(12): 3237-3254.
- Loy A, Duller S, Baranyi C, Mußmann M, Ott J, Sharon I, Béjà O, Le Paslier D, Dahl C, Wagner M (2009) Reverse dissimilatory sulfite reductase as phylogenetic marker for a subgroup of sulfur-oxidizing prokaryotes. *Environ. Microbiol.* 11(2): 289-299.
- Mahmoudi E, Essid N, Beyrem H, Hedfi A, Boufahja F, Vitiello P, Aissa P (2005) Effects of hydrocarbon contamination on a free living marine nematode community: Results from microcosm experiments. *Mar. Pollut. Bull.* 50(11): 1197-1204.
- Mantran M, Hamparian R, Bouchereau JL (2009) Géomorphologie et hydrologie de la lagune de la Manche-à-Eau (Guadeloupe, Antilles françaises). *Géomorphologie: Relief, Processus, Environnement* 3: 47-57.
- Manz W, Amann R, Ludwig W, Wagner M, Schleifer K- (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: Problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15(4): 593-600.
- Marchand C, Baltzer F, Lallier-Vergès E, Albéric P (2004) Pore-water chemistry in mangrove sediments: Relationship with species composition and developmental stages (French Guiana). *Mar. Geol.* 208(2-4): 361-381.
- Markert S, Arndt C, Felbeck H, Becher D, Sievert SM, Hügler M, Albrecht D, Robidart J, Bench S, Feldman RA, Hecker M, Schweder T (2007) Physiological proteomics of the uncultured endosymbiont of *Riftia pachyptila*. *Science* 315(5809): 247-250.

Références bibliographiques

- McMullin ER, Bergquist DC, Fisher CR (2000) Metazoans in extreme environments: Adaptations of hydrothermal vent and hydrocarbon seep fauna. *Gravitational and Space Biology Bulletin: Publication of the American Society for Gravitational and Space Biology* 13(2): 13-23.
- Meibom A, Cuif J-P, Hillion F, Constantz BR, Juillet-Leclerc A, Dauphin Y, Watanabe T, Dunbar RB (2004) Distribution of magnesium in coral skeleton. *Geophys. Res. Lett.* 31(23): 1-4.
- Meldal BHM, Debenham NJ, De Ley P, De Ley IT, Vanfleteren JR, Vierstraete AR, Bert W, Borgonie G, Moens T, Tyler PA, Austen MC, Blaxter ML, Rogers AD, Lamshead PJD (2007) An improved molecular phylogeny of the nematoda with special emphasis on marine taxa. *Mol. Phylogenet. Evol.* 42(3): 622-636.
- Meyer B and Kuever J (2007a) Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using *aprA* as functional marker gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(23): 7664-7679.
- Meyer B and Kuever J (2007b) Molecular analysis of the distribution and phylogeny of dissimilatory adenosine-5'-phosphosulfate reductase-encoding genes (*aprBA*) among sulfur-oxidizing. *Microbiology* 153(10): 3478-3498.
- Miljutin DM, Tchessunov AV, Hope DW (2006) *Rhaphothyreus typicus* Hope & Murphy, 1969 (Nematoda: Rhaphothyreidae): An anatomical study of an unusual deep-sea nematode. *Nematology* 8(1): 1-20.
- Millero FJ, Plese T, Fernandez M (1988) The dissociation of hydrogen sulfide in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 33: 269-274.
- Minic Z and Hervé G (2004) Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont. *Eur. J. Biochem.* 271(15): 3093-3102.
- Minic Z, Serre V, Hervé G (2006) Adaptation of organisms to extreme conditions of deep-sea hydrothermal vents. *CR Biologies* 329(7): 527-540.
- Mitreva M, Blaxter ML, Bird DM, McCarter JP (2005) Comparative genomics of nematodes. *Trends in Genetics* 21(10): 573-581.
- Moens T and Vincx M (1997) Observations on the feeding ecology of estuarine nematodes. *J. Mar. Biol. Assoc. UK* 77(1): 211-227.
- Moens T, Luyten C, Middelburg JJ, Herman PMJ, Vincx M (2002) Tracing organic matter sources of estuarine tidal flat nematodes with stable carbon isotopes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 234: 127-137.
- Mullin MM, Rau GH, Eppley RW (1984) Stable nitrogen isotopes in zooplankton: Some geographic and temporal variations in the north pacific. *Limnol. Oceanogr.* 29(6): 1267-1273.

Références bibliographiques

- Murray MG and Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8(19): 4321-4325.
- Musat N, Giere O, Gieseke A, Thiermann F, Amann R, Dubilier N (2007) Molecular and morphological characterization of the association between bacterial endosymbionts and the marine nematode *Astomonema* sp. from the Bahamas: Brief report. *Environ. Microbiol.* 9(5): 1345-1353.
- Muthumbi A, Verschelde D, Vincx M (1995) New Desmodoridae (Nematoda: Desmodoridae): Tree new species from *Ceriops* mangrove sediments (Kenya) and one related new species from the north sea. *Cah. Biol. Mar.* 36: 181-195.
- Nebelsick M, Blumer M, Novak R, Ott J (1992) A new glandular sensory organ in *Catanema* sp. (Nematoda, Stilbonematinae). *Zoomorphology* 112(1): 17-26.
- Netto SA and Gallucci F (2003) Meiofauna and macrofauna communities in a mangrove from the island of Santa Catarina, south Brazil. *Hydrobiologia* 505: 159-170.
- Nicholas WL (2001) Seasonal variations in nematode assemblages on an Australian temperate ocean beach; the effect of heavy seas and unusually high tides. *Hydrobiologia* 464: 17-26.
- Nicholas WL, Elek JA, Stewart AC, Marples TG (1991) The nematode fauna of a temperate Australian mangrove mudflat; its population density, diversity and distribution. *Hydrobiologia* 209(1): 13-27.
- Nussbaumer AD, Bright M, Baranyi C, Beisser CJ, Ott JA (2004) Attachment mechanism in a highly specific association between ectosymbiotic bacteria and marine nematodes. *Aquat. Microb. Ecol.* 34(3): 239-246.
- Ólafsson E (1995) Meiobenthos in mangrove areas in eastern Africa with emphasis on assemblage structure of free-living marine nematodes. *Hydrobiologia* 312(1): 47-57.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL, Robertson HM (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89(7): 2699-2702.
- Ott JA (1997) A new symbiotic marine nematode, *Adelphos rolandi* gen.n. sp.n. (Stilbonematinae), from the Caribbean sea. *Ann. Naturhist. Mus. Wien* 99: 417-422.
- Ott JA (1996) Sulphide ectosymbioses in shallow marine habitats. *Biosyst. Ecol. Ser.* 11: 369-382.
- Ott JA and Novak R (1989) Living at an interface: Meiofauna at the oxygen/sulfide boundary of marine sediments. *Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms* : 415-422.
- Ott JA, Bauer-Nebelsick M, Novotny V (1995) The genus *Laxus* Cobb, 1894 (Stilbonematinae: Nematoda): Description of two new species with ectosymbiotic chemoautotrophic bacteria. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 108(3): 508-527.

Références bibliographiques

- Ott J, Bright M, Bulgheresi S (2004) Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* 36: 103-126.
- Ott J, Rieger G, Rieger R, Enderes F (1982) New mouthless interstitial worms from the sulfide system: Symbiosis with prokaryotes. *Mar. Ecol.* 3(4): 313-333.
- Ott JA (1995) Sulphide symbioses in shallow sands. Biology and Ecology of Shallow Coastal Waters. *Proc. 28th European Marine Biology Symposium, Iraklio, Crete, 1993* : 143-147.
- Ott JA, Bright M, Schiemer F (1998) The ecology of a novel symbiosis between a marine peritrich ciliate and chemoautotrophic bacteria. *Mar. Ecol.* 19(3): 229-243.
- Ott JA, Novak R, Schiemer F, Hentschel U, Nebelsick M, Polz M (1991) Tackling the sulfide gradient: A novel strategy involving marine nematodes and chemoautotrophic ectosymbionts. *Mar. Ecol.* 12(3): 261-279.
- Pailleret M, Saedlou N, Palacios C, Zbinden M, Lebaron P, Gaill F, Privé-Gill C (2007a) Identification of natural sunken wood samples. *CR - Palevol.* 6(6-7): 463-468.
- Pailleret M, Haga T, Petit P, Privé-Gill C, Saedlou N, Gaill F, Zbinden M (2007b) Sunken wood from the Vanuatu islands: Identification of wood substrates and preliminary description of associated fauna. *Mar. Ecol.* 28(1): 233-241.
- Parkinson J, Mitreva M, Whitton C, Thomson M, Daub J, Martin J, Schmid R, Hall N, Barrell B, Waterston RH, McCarter JP, Blaxter ML (2004) A transcriptomic analysis of the phylum nematoda. *Nat. Genet.* 36(12): 1259-1267.
- Pasteris JD, Freeman JJ, Goffredi SK, Buck KR (2001) Raman spectroscopic and laser scanning confocal microscopic analysis of sulfur in living sulfur-precipitating marine bacteria. *Chem. Geol.* 180(1-4): 3-18.
- Paull CK, Jull AJT, Toolin LJ, Linick T (1985) Stable isotope evidence for chemosynthesis in an abyssal seep community. *Nature* 317(6039): 709-711.
- Pernthaler A, Pernthaler J, Amann R (2002) Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(6): 3094-3101.
- Peteranderl R and Lechene C (2004) Measure of carbon and nitrogen stable isotope ratios in cultured cells. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 15(4): 478-485.
- Peterson BJ (1999) Stable isotopes as tracers of organic matter input and transfer in benthic food webs: A review. *Acta Oecol.* 20(4): 479-487.
- Peterson BJ and Fry B (1987) Stable isotopes in ecosystem studies. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18 : 293-320.

Références bibliographiques

- Pirrotte P. (2007) Applications biologiques du NanoSIMS. Thèse De Doctorat, Université Louis Pasteur, Strasbourg.
- Plague GR, Dunbar HE, Tran PL, Moran NA (2008) Extensive proliferation of transposable elements in heritable bacterial symbionts. *J. Bacteriol.* 190(2): 777-779.
- Platt HM and Warwick RM (1988) A synopsis of the freeliving marine nematodes part II. british chromadorids.
- Poborchii VV (1996) Polarized Raman and optical absorption spectra of the mordenite single crystals containing sulfur, selenium, or tellurium in the one-dimensional nanochannels. *Chem. Phys. Lett.* 251(3-4): 230-234.
- Polz MF and Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(10): 3724-3730.
- Polz MF and Cavanaugh CM (1995) Dominance of one bacterial phylotype at a mid-atlantic ridge hydrothermal vent site. *Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A.* 92(16): 7232-7236.
- Polz MF, Harbison C, Cavanaugh CM (1999) Diversity and heterogeneity of epibiotic bacterial communities on the marine nematode *Eubostrichus diana*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(9): 4271-4275.
- Polz MF, Felbeck H, Novak R, Nebelsick M, Ott JA (1992) Chemoautotrophic, sulfur-oxidizing symbiotic bacteria on marine nematodes: Morphological and biochemical characterization. *Microb. Ecol.* 24: 313-329.
- Polz MF, Distel DL, Zarda B, Amann R, Felbeck H, Ott JA, Cavanaugh CM (1994) Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(12): 4461-4467.
- Powell EN, Crenshaw MA, Rieger RM (1979) Adaptations to sulfide in the meiofauna of the sulfide system. I. ^{35}S -sulfide accumulation and the presence of a sulfide detoxification system. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 37(1): 57-76.
- Puillandre N, Strong EE, Bouchet P, Boisselier MC, Couloux A, Samadi S (2009) Identifying gastropod spawn from DNA barcodes: Possible but not yet practicable. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02576.x.
- Rau GH (1981) Hydrothermal vent clam and tube worm $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: Further evidence of nonphotosynthetic food sources. *Science* 213(4505): 338-340.
- Rau GH and Hedges JI (1979) Carbon-13 depletion in a hydrothermal vent mussel: Suggestion of a chemosynthetic food source. *Science* 203(4381): 648-649.
- Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH (1992) Toxicology of hydrogen sulfide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 109-134.
- Reise K and Ax P (1980) Statement on the thiobios-hypothesis. *Mar. Biol.* 58(1): 31-32.

Références bibliographiques

- Reise K and Ax P (1979) A meiofaunal "thiobios" limited to the anaerobic sulfide system of marine sand does not exist. *Mar. Biol.* 54(3): 225-237.
- Renaud-Mornant J and Gourbault N (1981) Premières prospections méiofaunistiques en Guadeloupe I. Les biotopes et leurs peuplements. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat.* 3: 1011-1034.
- Renaud-Mornant J and Gourbault N (1984) Premières prospections méiofaunistiques en Guadeloupe II. Communautés des sables littoraux. *Hydrobiologia* 118(1): 113-118.
- Reysenbach A-L, Giver LJ, Wickham GS, Pace NR (1992) Differential amplification of rRNA genes by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(10): 3417-3418.
- Riemann F (1993) The mouthless deep-sea nematode *Rhaphothyreus minor* sp. n. (Rhaphothyreidae, mermithoid nematodes of uncertain systematic position). *Zool. Scr.* 22(4): 341-346.
- Riemann F and Helmke E (2002) Symbiotic relations of sediment-agglutinating nematodes and bacteria in detrital habitats: The enzyme-sharing concept. *Mar. Ecol.* 23(2): 93-113.
- Riemann F and Schrage M (1978) The mucus-trap hypothesis on feeding of aquatic nematodes and implications for biodegradation and sediment texture. *Oecologia* 34(1): 75-88.
- Riemann F, Thiermann F, Bock L (2003) *Leptonemella* species (Desmodoridae, Stilbonematinae), benthic marine nematodes with ectosymbiotic bacteria, from littoral sand of the north sea island of sylt: Taxonomy and ecological aspects. *Helgol. Mar. Res.* 57(2): 118-131.
- Riera P, Richard P, Grémare A, Blanchard G (1996) Food source of intertidal nematodes in the bay of Marennes-Oleron (France), as determined by dual stable isotope analysis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 142(1-3): 303-309.
- Riera P, Stal LJ, Nieuwenhuize J, Richard P, Blanchard G, Gentil F (1999) Determination of food sources for benthic invertebrates in a salt marsh (Aiguillon bay, France) by carbon and nitrogen stable isotopes: Importance of locally produced sources. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 187: 301-307.
- Rinke C, Schmitz-Esser S, Stoecker K, Nussbaumer AD, Molnár DA, Vanura K, Wagner M, Horn M, Ott JA, Bright M (2006) "*Candidatus thiobios zoothamnicoli*," an ectosymbiotic bacterium covering the giant marine ciliate *Zoothamnium niveum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(3): 2014-2021.
- Robidart JC, Bench SR, Feldman RA, Novoradovsky A, Podell SB, Gaasterland T, Allen EE, Felbeck H (2008) Metabolic versatility of the *Riftia pachyptila* endosymbiont revealed through metagenomics. *Environ. Microbiol.* 10(3): 727-737.

Références bibliographiques

- Rowan B and Knowlton N (1995) Intraspecific diversity and ecological zonation in coral-algal symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92(7): 2850-2853.
- Ruby EG, Jannasch HW, Deuser WG (1987) Fractionation of stable carbon isotopes during chemoautotrophic growth of sulfur-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(8): 1940-1943.
- Ruehland C, Blazejak A, Lott C, Loy A, Erséus C, Dubilier N (2008) Multiple bacterial symbionts in two species of co-occurring gutless oligochaete worms from mediterranean sea grass sediments. *Environ. Microbiol.* 10(12): 3404-3416.
- Rzeznik-Orignac J. (2004) Contribution de la méiofaune aux transferts des métaux dans le réseau trophique dans la baie de Gdansk (Baltique) et de la baie de Marennes-Oléron (Atlantique). Thèse De Doctorat, Université De La Rochelle Et De Gdansk.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Schiemer F, Novak R, Ott J (1990) Metabolic studies on thiotrophic free-living nematodes and their symbiotic microorganisms. *Mar. Biol.* 106(1): 129-137.
- Schindel DE and Miller SE (2005) DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435(7038): 17.
- Schmitt M and Popp J (2006) Raman spectroscopy at the beginning of the twenty-first century. *J. Raman Spectrosc.* 37(1-3): 20-28.
- Schrijvers J and Vincx M (1997) Cage experiments in an east African mangrove forest: A synthesis. *J. Sea Res.* 38(1-2): 123-133.
- Schuster KC, Urlaub E, Gapes JR (2000a) Single-cell analysis of bacteria by Raman microscopy: Spectral information on the chemical composition of cells and on the heterogeneity in a culture. *J. Microbiol. Methods* 42(1): 29-38.
- Schuster KC, Reese I, Urlaub E, Gapes JR, Lendl B (2000b) Multidimensional information on the chemical composition of single bacterial cells by confocal Raman microspectroscopy. *Anal. Chem.* 72(22): 5529-5534.
- Seinhorst W (1959) A rapid method for the transfer of nematodes from fixative to anhydrous glycerin. *Nematologica* 4: 29-32.
- Shively JM (1974) Inclusion bodies of prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* 28(0): 167-187.
- Sievert SM, Kiene RP, Schulz-Vogt HN (2007) The sulfur cycle. *Oceanography* 4(9): 117-123.
- Smith CR and Baco AR (2003) Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 41: 311-354.

Références bibliographiques

- Soldo AT, Godoy GA, Brickson S (1974) Infectious particles in a marine ciliate. *Nature* 249(5454): 284-286.
- Somerfield PJ, Gee JM, Aryuthaka C (1998) Meiofaunal communities in a Malaysian mangrove forest. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 78(3): 717-732.
- Southward AJ, Southward EC, Dando PR (1981) Bacterial symbionts and low $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in tissues of Pogonophora indicate unusual nutrition and metabolism. *Nature* 293(5834): 616-620.
- Spiess FN, Macdonald KC, Atwater T, Ballard R, Carranza A, Cordoba D, Cox C, Diaz Garcia VM, Francheteau J, Guerrero J, Hawkins J, Haymon R, Hessler R, Juteau T, Kastner M, Larson R, Luyendyk B, Macdougall JD, Miller S, Normark W, Orcutt J, Rangin C (1980) East pacific rise: Hot springs and geophysical experiments. *Science* 207(4438): 1421-1433.
- Spiro B, Greenwood PB, Southward AJ, Dando PR (1986) $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in marine invertebrates from reducing sediments: Confirmation of nutritional importance of chemoautotrophic endosymbiotic bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 28: 233-240.
- Stahl DA, Lane DJ, Olsen GJ, Pace NR (1984) Analysis of hydrothermal vent-associated symbionts by ribosomal RNA sequences. *Science* 224(4647): 407-408.
- Stein JL, Cary SC, Hessler RR, Ohta S, Vetter RD, Childress JJ, Felbeck H (1988) Chemoautotrophic symbiosis in a hydrothermal vent gastropod. *Biol. Bull.* 174: 373-378.
- Stewart FJ, Newton ILG, Cavanaugh CM (2005) Chemosynthetic endosymbioses: Adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends Microbiol.* 13(9): 439-448.
- Suzuki I (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* 45(2): 97-105.
- Takai K and Fujiwara Y (2002) Hydrothermal vents: Biodiversity in deep-sea hydrothermal vents. *Encyclopedia of Environmental Microbiology* 3: 1604-1617.
- Tarjan AC and Keppner EJ (1999) Illustrated key to the genera of free-living marine nematodes in the superfamily Chromadoroides exclusive of the Chromadoridae. University of Florida.
- Temara A, de Ridder C, Kuenen JG, Robertson LA (1993) Sulfide-oxidizing bacteria in the burrowing echinoid, *Echinocardium cordatum* (Echinodermata). *Mar. Biol.* 115(2): 179-185.
- Thiermann F, Vismann B, Giere O (2000) Sulphide tolerance of the marine nematode *Oncholaimus campylocercoides* - A result of internal sulphur formation? *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 193: 251-259.

Références bibliographiques

- Thiermann F, Windoffer R, Giere O (1994) Selected meiofauna around shallow water hydrothermal vents off Milos (Greece): Ecological and ultrastructural aspects. *Vie et Milieu* 44(3-4): 215-226.
- Thiermann F, Akoumianaki I, Hughes JA, Giere O (1997) Benthic fauna of a shallow-water gaseohydrothermal vent area in the Aegean sea (Milos, Greece). *Mar. Biol.* 128(1): 149-159.
- Tietjen JH and Alongi DM (1990) Population growth and effects of nematodes on nutrient regeneration and bacteria associated with mangrove detritus from northeastern Queensland (Australia). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 68(1-2): 169-179.
- Torres-Pratts H and Schizas NV (2007) Meiofaunal colonization of decaying leaves of the red mangrove *Rhizophora mangle*, in southwestern Puerto Rico. *Caribb. J. Sci.* 43(1): 127-137.
- Treude T, Smith CR, Wenzhöfer F, Carney E, Bernardino AF, Hannides AK, Krgüer M, Boetius A (2009) Biogeochemistry of a deep-sea whale fall: Sulfate reduction, sulfide efflux and methanogenesis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 382: 1-21.
- Truchet M, Ballan-Dufrançais C, Jeantet A-Y, Lechaire J-P, Cosson R (1998) The trophosome of the vestimentifera *Riftia pachyptila* and *Tevnia jerichonana*: Metal bioaccumulations and sulphur metabolism. *Cah. Biol. Mar.* 39(2): 129-141.
- Tunnicliffe V, Juniper SK, Sibuet M (2003) Reducing environments of the deep-sea floor. *Ecosystems of the Deep Oceans* : 81-110.
- Urbancik W, Novotny V, Ott JA (1996a) The ultrastructure of the cuticle of nematoda. II. The cephalic cuticle of Stilbonematinae (Adenophorea, Desmodoridae). *Zoomorphology* 116(2): 65-75.
- Urbancik W, Bauer-Nebelsick M, Ott JA (1996b) The ultrastructure of the cuticle of nematoda. I. The body cuticle within the Stilbonematinae (Adenophorea, Desmodoridae). *Zoomorphology* 116(2): 51-64.
- Van Dover CL and Fry B (1989) Stable isotopic compositions of hydrothermal vent organisms. *Mar. Biol.* 102(2): 257-263.
- Vandepitte L, Vanaverbeke J, Vanhoorne B, Hernandez F, Campinas-Bezerra T, Mees J, Vanden Berghe E (2008) The MANUELA database: An integrated database on meiobenthos from european marine waters. *Meiofauna Marina*.
- Vanhove S, Vincx M, Van Gansbeke D, Gijselinck W, Schram D (1992) The meiobenthos of five mangrove vegetation types in Gazi Bay, Kenya. *Hydrobiologia* 247(1-3): 99-108.
- Vanreusel A (1991) Ecology of free-living marine nematodes in the Voordelta (southern bight of the North Sea). II. Habitat preferences of the dominant species. *Nematologica* 37(3): 343-359.

Références bibliographiques

- Vanreusel A, Van Den Bossche I, Thiermann F (1997) Free-living marine nematodes from hydrothermal sediments: Similarities with communities from diverse reduced habitats. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 157: 207-219.
- Vanura K. (2001) Molecular phylogeny of chemoautotrophic, ectosymbiotic bacteria of free-living marine nematodes (Desmodoridae, Stilbonematinae). Thèse De Doctorat, Université De Vienne.
- Vetter RD (1985) Elemental sulfur in the gills of three species of clams containing chemoautotrophic symbiotic bacteria: A possible inorganic energy storage compound. *Mar. Biol.* 88(1): 33-42.
- Vidakovic J and Boucher G (1987) Gutless marine nematodes of the genus *Astomonema* Ott *et al.*, 1982. *Cah. Biol. Mar.* 28: 111-120.
- Vincx M (1986) Free-living marine nematodes from the southern bight of the North Sea. Thèse De Doctorat, Université De Ghent.
- Wang J, Rousseau DL, Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1994) Heme coordination of NO in NO synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91(22): 10512-10516.
- Warwick RM (1971) Nematode associations in the estuary. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 51: 439-454.
- White SN, Dunk RM, Peltzer ET, Freeman JJ, Brewer PG (2006) *In situ* Raman analyses of deep-sea hydrothermal and cold seep systems (Gorda Ridge & Hydrate Ridge). *Geochem. Geophys. Geosyst.* 7(5): 1-12.
- White SN, Kirkwood W, Sherman A, Brown M, Henthorn R, Salamy K, Walz P, Peltzer ET, Brewer PG (2005) Development and deployment of a precision underwater positioning system for *in situ* laser Raman spectroscopy in the deep ocean. *Deep-Sea Res. Part I* 52(12): 2376-2389.
- Wieser W (1953) Die Beziehungen zwischen Mundhöhengestalt, Ernährungsweise und Vorkommen bei freilebenden marinen nematoden. Ein ökologisch-morphologische studie. *Arkiv. fur Zoologi.* 4: 439-484.
- Williams PM, Smith KL, Druffel EM, Linick TW (1981) Dietary carbon sources of mussels and tubeworms from Galapagos hydrothermal vents determined from tissue ¹⁴C activity. *Nature* 292(5822): 448-449.
- Woese CR (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51(2): 221-271.
- Woyke T, Teeling H, Ivanova NN, Huntemann M, Richter M, Gloeckner FO, Boffelli D, Anderson IJ, Barry KW, Shapiro HJ, Szeto E, Kyrpides NC, Mussmann M, Amann R, Bergin C, Ruehland C, Rubin EM, Dubilier N (2006) Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. *Nature* 443(7114): 950-955.

Références bibliographiques

- Yoshii K, Melnik NG, Timoshkin OA, Bondarenko NA, Anoshko PN, Yoshioka T, Wada E (1999) Stable isotope analyses of the pelagic food web in lake baikal. *Limnol. Oceanogr.* 44(3 D): 502-511.
- Zbinden M, LeBris N, Gaill F, Compère P (2004) Distribution of bacteria and associated minerals in the gill chamber of the vent shrimp *Rimicaris exoculata* and related biogeochemical processes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 284: 237-251.
- Zbinden M, Shillito B, Le Bris N, de Villardi de Montlaur C, Roussel E, Guyot F, Gaill F, Cambon-Bonavita M-A (2008) New insights on the metabolic diversity among the epibiotic microbial community of the hydrothermal shrimp *Rimicaris exoculata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 359(2): 131-140.
- Zhou H (2001) Effects of leaf litter addition on meiofaunal colonization of azoic sediments in a subtropical mangrove in Hong Kong. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 256(1): 99-121.

ANNEXES

Annexe 1 : Solutions tampons pour le FISH.....	1
Annexe 2 : Solutions tampons pour le Card-FISH.....	2
Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN eucaryotique	3
Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN procaryotique	4
Annexe 5 : Electrophorèse sur gel d'agarose	6
Annexe 6 : Schéma initial de la construction de la potence pour les prélèvements en mangrove.....	7
Annexe 7 : Microspectrométrie Raman	8
Annexe 8 : Morphotypes de nématodes récoltés dans le sédiment de mangrove	14
Annexe 9 : Tableau des effectifs de nématodes récoltés dans le sédiment de mangrove	22

Annexe 1 : Solutions tampons pour le FISH

Tampon d'hybridation

Produits (ml)	1 lame	2 lames	3 lames
NaCl 5M	1,08	2,16	3,24
Tris-HCl 1M	0,12	0,24	0,36
H ₂ O	3,6	7,2	10,8
SDS 20%	0,003	0,006	0,009
Formamide 20%	1,2	2,4	3,6

Tampon de lavage (Formamide 20%)

Produits (ml)	2 bains	4 bains
NaCl 5M	4,3	8,6
Tris-HCl 1M	2	4
EDTA 0,5M	1	2
SDS 20%	0,05	0,1
H ₂ O	93	185

Annexe 2 : Solutions tampons pour le Card-FISH

Tampon d'hybridation

Produits	Quantité (ml)
NaCl 5M	3,6
Tris-HCl 1M	0,4
H ₂ O	4
Formamide 50%	10
SDS 10%	20µl
Dextrane sulfate	2g

Dissoudre le dextrane sulfate dans la solution à 58°C puis laisser refroidir. Ajouter ensuite 2ml de **Blocking reagent 10%**. Mélanger, aliquoter à 1ml et conserver à -20°C.

Tampon de lavage (55% Formamide)

Produits (ml)	1 bain	3 bains
EDTA 0,5M	0,5	1,5
Tris-HCl 1M	1	3
NaCl 5M	30µl	90µl
H ₂ O	Ad 50ml	Ad 150ml
SDS 10%	25µl	75µl

Tampon d'amplification

Produits	Quantité (ml)
PBS 20X	2
Blocking reagent 10%	0,4
NaCl 5M	16
H ₂ O	Ad 50ml
Dextrane sulfate	4g

Dissoudre le dextrane sulfate dans la solution à 58°C puis laisser refroidir. Mélanger, aliquoter à 1ml et conserver à -20°C.

Annexe 3 : Protocole d'extraction d'ADN eucaryotique

Bench Protocol: Animal Tissues (Spin-Column Protocol)



Note: Before using this bench protocol, you should be completely familiar with the safety information and detailed protocols in the *DNeasy Blood & Tissue Handbook*.

Important points before starting

- Perform all centrifugation steps at room temperature (15–25°C).
- If necessary, redissolve any precipitates in Buffers ATL and AL.
- Ensure that ethanol has been added to Buffers AW1 and AW2.
- Preheat a thermomixer, shaking water bath, or rocking platform for heating at 56°C.
- If using frozen tissue, equilibrate the sample to room temperature.

Procedure

1. Cut tissue (up to 25 mg; up to 10 mg spleen) into small pieces, and place in 1.5 ml microcentrifuge tube. For rodent tails, use one (rat) or two (mouse) 0.4–0.6 cm lengths of tail. Add 180 µl Buffer ATL.
2. Add 20 µl proteinase K. Mix by vortexing, and incubate at 56°C until completely lysed. Vortex occasionally during incubation, or place in a thermomixer, in a shaking water bath, or on a rocking platform.
Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h. Samples can be lysed overnight.
3. Vortex for 15 s. Add 200 µl Buffer AL to the sample. Mix thoroughly by vortexing. Then add 200 µl ethanol (96–100%). Mix again thoroughly.
Alternatively, premix Buffer AL and ethanol, and add together.
4. Pipet the mixture into a DNeasy Mini spin column in a 2 ml collection tube. Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.
5. Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW1. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$. Discard flow-through and collection tube.
6. Place the spin column in a new 2 ml collection tube. Add 500 µl Buffer AW2. Centrifuge for 3 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm). Discard flow-through and collection tube.
Remove the spin column carefully so that it does not come into contact with the flow-through.
7. Transfer the spin column to a new 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube, and add 200 µl Buffer AE for elution. Incubate for 1 min at room temperature. Centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$.
Recommended: Repeat this step for maximum yield.

Annexe 4 : Protocole d'extraction d'ADN procaryotique

Bacterial DNA Miniprep Protocol

Kit Contents

Product	D3350-00 5 preps	D3350-01 50 Preps	D3350-02 200 Preps
HIBind® DNA Columns	5	50	200
2 ml Collection Tubes	10	100	400
Buffer BTL	1.5 ml	20 ml	50 ml
Buffer BDL	2 ml	20 ml	50 ml
DNA Wash Buffer	12 ml	40 ml	2 x 60 ml
Elution Buffer	1 ml	10 ml	40 ml
Lysozyme	5 mg	50mg	4 x 50mg
Proteinase K	3.0 mg	19 mg	78 mg
RNase A	30µl	275µl	1.1 ml
User Manual	1	1	1



Buffer BDL contains a chaotropic salt. Use gloves and protective eyewear when handling this solution.

Before Starting

- Please read the entire booklet to become familiar with the E.Z.N.A.® Bacterial DNA procedure.
- Prepare a stock solution of Proteinase K (provided) as follows and aliquot into adequate portions. Store aliquots at -20°C.

D3350-00	dissolve with 130 µl of TE Buffer
D3350-01	dissolve with 1.30 ml of TE Buffer
D3350-02	dissolve with 5.1 ml of TE Buffer
- Prepare a lysozyme stock solution at 50 mg/ml and aliquot into adequate portions. Store each aliquot at -20°C and thaw before use. Each sample will require 20 µl of this solution.

D3350-00	dissolve with 100 µl of TE Buffer
D3350-01	dissolve with 1 ml of TE Buffer
D3350-02	dissolve with 1 ml of TE Buffer
- Equilibrate Elution Buffer provided to 65°C.

- Dilute DNA Wash Buffer Concentrate with ethanol as follows and store at room temperature:

D3450-00, D3350-00	Add 18 ml absolute (96%-100%) ethanol
D3450-01, D3350-01	Add 60 ml absolute (96%-100%) ethanol
D3450-02, D3350-02	Add 90 ml absolute (96%-100%) ethanol/boise

Bacterial DNA Miniprep Protocol

Have the following reagents and supplies ready:

- Tabletop microcentrifuge and nuclease-free 1.5 ml tubes
- Water bath set to 30°C
- Shaking water bath set to 55°C
- Incubator or waterbath set to 65°C
- Absolute ethanol (96%-100%) - Do not use other alcohols

- This method allows genomic bacterial isolation from up to 3ml LB culture. Grow Bacteria in LB media to log phase. (Overnight culture can be used in many cases.)
- Harvest no more than 3 ml culture by centrifugation at 4,000 x g for 10 min at room temperature.
- Discard medium and resuspend cells in 180µl TE buffer. Add 20 µl of 50mg/ml lysozyme solution, followed by 10 min incubation at 30°C.

Note: The amount of enzyme required and/or the incubation time may need to be modified depending on the bacterial strain used. Complete digestion of the cell wall is essential for efficient lysis. Longer incubation time might yield better results.
- Pellet digested cell by centrifuging 5 min at 5,000 x g at room temperature.
- Resuspend cells in 200 µl Buffer BTL. Add 25 µl Proteinase K solution. Shake or briefly vortex to mix well, then incubate at 55°C in a shaking water bath to effect complete lysis. Usually no more than 1h is required for

bacterial lysis. If no shaking waterbath is available, incubate and shake or briefly vortex the samples every 20-30 minutes.

6. Add 5µl RNase A to samples and invert tube several times to mix. Incubate at room temperature for 2 minutes.
7. Add 220 µl Buffer BDL and shake or briefly vortex to mix. Incubate at 65°C for 10 minutes. A wispy precipitate may form upon addition of Buffer BDL; it does not interfere with DNA recovery.
8. Add 220 µl absolute (96%-100%) ethanol and mix thoroughly by shaking or briefly vortexing.
9. Assemble a HiBind® DNA spin-column in a 2 ml collection tube (provided). Transfer the entire sample from Step 8 into the column, including any precipitate that may have formed. Centrifuge at 8,000 x g for 1 min to bind DNA. Discard the collection tube and filtrate.
10. Place the column into a second 2 ml tube and wash by adding 650 µl DNA Wash Buffer diluted with ethanol. Centrifuge at 8,000 x g for 1 min. Discard flow-through and reuse the collection tube.

NOTE: DNA Wash Buffer is supplied as a concentrate and must be diluted with absolute ethanol according to the instructions on Page 3, under "Before Starting."

11. Wash the column with a second 650 µl DNA Wash Buffer and centrifuge as above. Discard flow-through and reuse the collection tube.
12. Using the same 2 ml collection tube, centrifuge the spin-column at maximum speed (> 10,000 x g) for 2 min to dry the column. *This step is critical for removal of trace ethanol that might otherwise interfere with downstream applications.*
13. Place the column into a nuclease-free 1.5 ml microfuge tube and add 100µl of preheated (65°C) Elution Buffer. Allow columns to incubate for 3 to 5 min at room temperature after addition of Elution Buffer.

NOTE: Incubating the HiBind® DNA column at 65°C rather than at room temperature prior

to centrifugation will give a modest increase in DNA yield per elution.

14. To elute DNA from the column, centrifuge at 8,000 x g for 1 min.
15. **Optional:** Repeat the elution with a second 100 µl of pre-heated Elution Buffer, if desired. The first DNA eluate can be used for a second elution to maintain a higher DNA concentration, if desired. Store eluted DNA at -20°C.

Determination of Yield and Quality

The total DNA yield can be determined by a spectrophotometer using deionized water or Tris-HCl buffer as blank. DNA concentration is calculated as:

$$[DNA] = (Absorbance_{260}) \times (0.05 \mu\text{g}/\mu\text{l}) \times (\text{Dilution factor})$$

The quality of DNA can be assessed by measuring absorbance at both 260 nm and at 280 nm. A ratio of (A_{260}/A_{280}) of 1.7-1.9 corresponds to 85%-95% purity.

The expected yield from a 3 ml culture sample is 15-30 µg DNA depending on bacterial strain, medium, and growth phase.

Vacuum/Spin Protocol for Bacterial DNA Isolation (V-Spin column only)

Note: Please read through previous section of this manual before using this protocol.

1. **Prepare samples by following the standard Protocol in previous section (Steps 1-9).**
2. Prepare the vacuum manifold according to manufacturer's instructions and connect the V-Spin column to the manifold.
3. Load the sample/BDU/Ethanol mixture to the column.
4. Switch on vacuum source to draw the sample through the column and turn off the vacuum.
5. Wash the column by adding 650 µl DNA wash buffer, draw the wash buffer through the column by turning on the vacuum source. Repeat this step with another 650 µl DNA wash buffer.
6. **Assemble the column into a 2 ml collection tube and transfer the column to a micro centrifuge. Spin 1 minute to dry the column.**
7. Place the column in a clean 1.5 ml microfuge tube and add 30-50µl TE or water. Stand for 1-2 minutes then centrifuge 1 minute to elute DNA.

Annexe 5 : Electrophorèse sur gel d'agarose

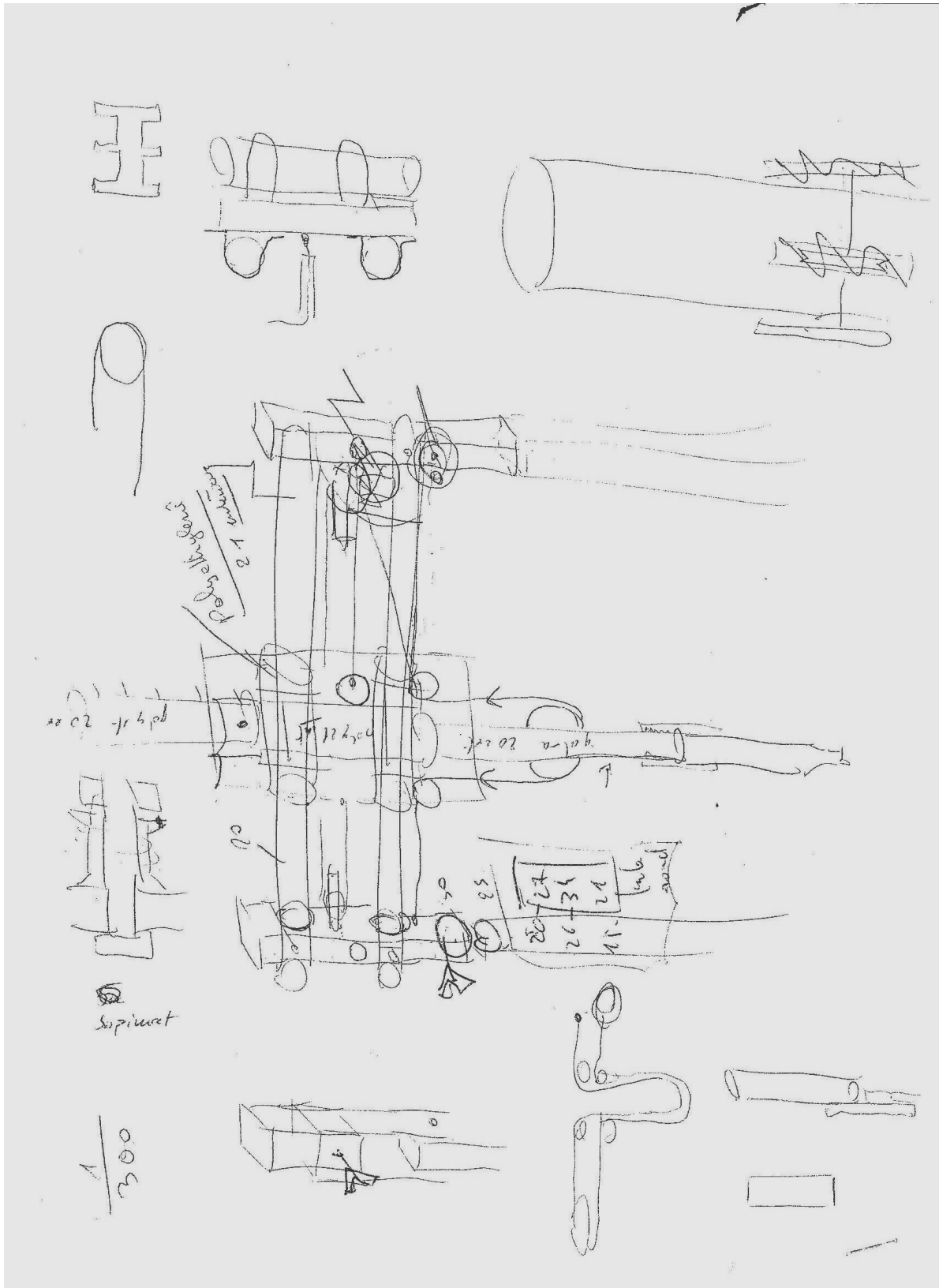
Bleu-Orange 6X Loading Dye

Pour 1ml de Bleu de migration :

Produits	Quantité (mg)
Ficoll 400 à 10%	100
Bromophenol blue 0,25%	2,5
Xylene cyanol 0,25%	2,5
Orange G 0,4%	4
Tampon TE	900µl

Tampon TE : Tris 10mM + EDTA 50mM ajusté à pH 7,5

Annexe 6 : Schéma initial de la construction de la potence pour les prélèvements en mangrove



Annexe 7 : Microspectrométrie Raman

Outline on the technique

Raman spectrometry is based on inelastic light / matter interaction. It allows us to probe the vibrational energy levels of materials i.e. molecular or crystalline bonding. The probed material can either be in the gaseous, liquid or solid state. This spectrometry cannot be applied to metallic compounds.

Fig. A7-1 shows the quantum mechanics representation of the main interaction processes of light with a molecule.

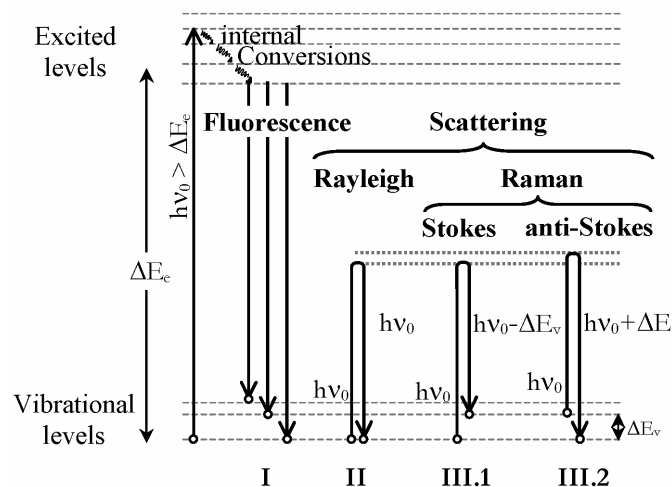


Fig. A7-1: Simplified energy bands diagram for a diatomic molecule and schematic representation of the main processes of photon / matter interactions.

Absorption / fluorescence phenomena (I) : The incident photon has an energy $h\nu_0$ sufficient to initiate a dipolar transition from electronic ground state to excited one. The return of the molecule to its ground state results in the emission of a fluorescence photon with an energy lower than the incident one (Fluorescence emission).

Scattering phenomena (II & III) : The energy $h\nu_0$ of the incident photon is not sufficient to initiate the transition between the electronic ground state and the excited one.

Rayleigh scattering process (II) : The transition from an initial vibrational state to the same final one via a virtual excited state results in the scattering of the photon at the same energy $h\nu_0$.

Raman Scattering: (III.1, III.2): The transition from an initial state to a different final one always via virtual excited level results in the scattering of a photon with an energy lower (Stokes III.1) or upper (anti-Stokes III.2) than the incident one.

The loss or gain in energy undergone by the photon during the scattering process is equal to the energy difference between the initial and the final vibrational levels and then characteristic of the bonded species and type of bonding.

These energy quanta can be theoretically calculated taking into account the atomic mass and bonds strength.

Spectrometry sensitivity

The sensitivity of Raman spectrometry is highly depending on the probed compound and especially on the energy difference ΔE between ground and excited electronic levels.

When the energy of the exciting photons is far from ΔE , “normal” Raman scattering occurs which intensity represents about 10^{-6} of the intensity of the incident light leading to a relatively low sensitivity.

When the energy of the incident photon is close to ΔE , pre-resonance or resonance Raman scattering occurs and the Raman scattering intensity can be enhanced by a 10^2 to 10^3 factor, increasing by the way the sensitivity of the method (Long, 1977).

The choice of Raman as the analytical technique used to identify and locate sulphur in low concentration in biological samples has been induced by the fact that sulphur in S_8 structure presents pre-resonance Raman scattering (Herzberg, 1945).

Raman scans

Computer controlled acquisition and data analysis treatment were developed at GTSI in order to acquire Raman profiles and maps. For this purpose Raman point spectra are acquired along lines in the case of profiles and along several lines covering a whole rectangular area in the case of a mapping (Himmel, 2005).

Quantitative interpretation of the spectra

It has been demonstrated in previous works (Himmel, 2005) that the probe geometry in the experimental conditions of this work can be represented by a cylinder of 120 μm length by 10 μm diameter. In the case of an homogeneous and transparent sample, the intensity of a

characteristic Raman line is linearly related to the analysed volume. In the case of an absorbing sample the intensity of the Raman lines must be corrected by the local attenuation of the exciting line and Raman scattered light. Taking into account the diameter of the nematode, the thickness of its bacterial coat and the exciting line attenuation profile in the sample Raman spectra treatment will allow us to determine the location of sulphur.

Influence of the light absorption by the various parts of the sample on the Raman scattering intensity

In order to evaluate the absorption of incident laser light as well as the Raman scattered one, we first record an optical micrograph of the ectosymbiotic nematode in transmission mode. White light for illumination and a green pass band filter ($514 \text{ nm} < \lambda < 556 \text{ nm}$) to analyze the transmitted light.

The intensity of the transmitted light through the bacterial coat, the nematode body (close to the digestive tube) and the body including the digestive tube are measured using free Gwyddion software.

The Fig. A7-2 shows two transmitted light intensity profiles corresponding to lines crossing the nematode surrounded by its bacterial coat and a part of the nematode where the bacterial coat has been removed.

Assuming that the transmitted light intensity is controlled by the Lambert Beer law:

$$I = I_0 e^{-\mu x}$$

I_0 being the incident light intensity, μ the absorption coefficient, x the thickness of matter crossed by the light, I being the intensity of the transmitted light through the thickness x .

We can deduce from the “green light” optical micrograph the absorption coefficient μ corresponding to each part of the sample. The obtained data are summarized in Fig. 6c.

Using these coefficients and applying the Lambert Beer formula for all the contributions of the samples' parts (bacterial coat, nematode body, digestive tube) the exciting line intensity can be calculated point by point.

Raman scattering being also green light lying in the frequency range used for the recording of the nematode micrograph the Lambert Beer equation is also applied to the damping of the Raman scattered light. The full equations are given in the following section.

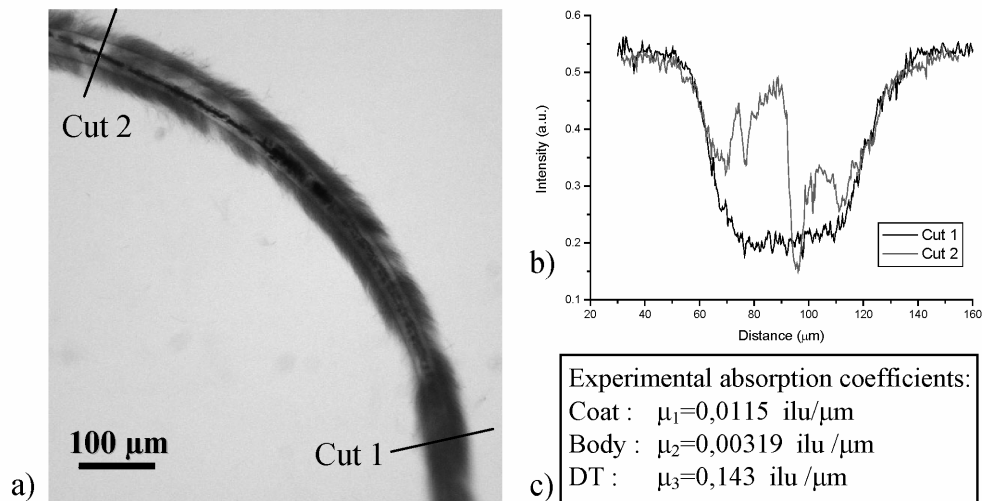


Fig. A7-2: Light-transmission analysis

The optical micrograph of an ectosymbiotic nematode obtained in transmission using a green light filter is given in Fig. 6a. For light-transmission analysis two light intensity profiles are extracted (Fig. 6b) by means of Gwyddion Software. The first profile crosses the body completely covered by bacteria, the second one crosses the sample on a part where the bacterial coat was removed. These analyses allow us to experimentally measure the absorption coefficients μ of the different parts of the sample reported in (c) and expressed in intensity light unity (ilu).

Mathematical expression of the Raman scattered light intensity for an idealized ectosymbiotic nematode

In order to express the Raman scattered light intensity which takes into account the light absorption by the sample the Lambert Beer law equation is applied to an idealized composite sample where the various parts (bacterial coat, nematode body, digestive tube) are considered homogeneous. The Fig. A7-3 presents the cross section of the idealized nematode and the parameters used in the equations.

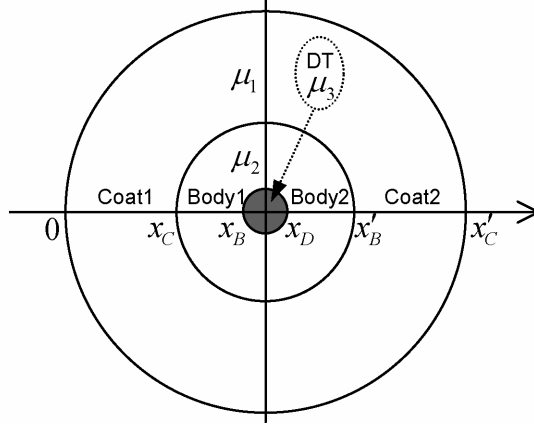


Fig. A7-3: Schematic cross section of the idealized ectosymbiotic nematode.
 μ_1, μ_2 and μ_3 are the extinction coefficients corresponding to the bacterial coat, the nematode body and the intestine. The x coordinates allow us to express the optical pathways of light in the sample.

As previously mentioned the intensity of light crossing a thickness x of absorbing medium with extinction coefficient μ is given by the Lambert Beer law: $I = I_0 e^{-\mu x}$.

Applied to the different parts of the nematode for the incident exciting line and Raman scattered light we can calculate the Raman intensity scattered by the various parts of the sample. The corresponding Equation are given below, with:

I_R Raman intensity outgoing from the illuminated sample,

σ Raman cross section of the studied species (here S_8),

c concentration of S_8 in the various parts of the sample.

The thickness crossed by light in the various parts of the sample (Fig. 7) are noted:

x_C (Coat1), $x_B - x_C$ (Body1), $x_D - x_B$ (Digestive Tube), $x'_B - x_D$ (Body2) and $x'_C - x'_B$.

$$I_{R \text{ Coat1}} = \sigma c I_0 \int_0^{x_C} e^{-2\mu_1 x} dx = \sigma c \frac{I_0}{2\mu_1} (1 - e^{-2\mu_1 x_C}),$$

$$I_{R \text{ Body1}} = \sigma c I_0 e^{-\mu_1 x_C} \int_{x_C}^{x_B} e^{-2\mu_2 (x - x_C)} dx$$

$$dx = \frac{\sigma c I_0 e^{-\mu_1 x_C}}{2\mu_2} (1 - e^{-2\mu_2 (x_B - x_C)}),$$

$$I_{R \text{ DT}} = \sigma c I_0 e^{-\mu_1 x_C} e^{-\mu_2 (x_B - x_C)} \int_{x_B}^{x_D} e^{-2\mu_3 (x - x_B)} dx$$

$$dx = \frac{\sigma c I_0 e^{-\mu_1 x_C} e^{-\mu_2 (x_B - x_C)}}{2\mu_3} \left(1 - e^{-2\mu_3 (x_D - x_B)}\right)$$

and analogue:

$$I_{R \text{ Body2}} = \frac{\sigma c I_0 \left(e^{-2\mu_1 x_C} e^{-2\mu_2 (x_B - x_C)} e^{-2\mu_3 (x_D - x_B)} \right)}{2\mu_2} \times \left(1 - e^{-2\mu_2 (x'_B - x_D)}\right),$$

$$I_{R \text{ Coat2}} = \frac{\sigma c I_0 \left(e^{-2\mu_1 x_C} e^{-2\mu_2 (x_B - x_C)} e^{-2\mu_3 (x_D - x_B)} e^{-2\mu_2 (x'_B - x_D)} \right)}{2\mu_1} \times \left(1 - e^{-2\mu_1 (x'_C - x'_B)}\right).$$

The total Raman intensity detected after a pathway constituted by the succession coat1, body1, digestive tube, body2, coat2 is expressed by the following sum:

$$I_{R \text{ total}} = I_{R \text{ Coat1}} + I_{R \text{ Body1}} + I_{R \text{ DT}} + I_{R \text{ body2}} + I_{R \text{ coat2}}.$$

The result is shown in Fig. 27B.

Annexe 8 : Morphotypes de nématodes récoltés dans le sédiment de mangrove



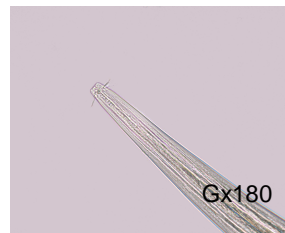
Morphotype 1 :

Classe : Enoplea

Ordre : Enoplida

Famille : Phanodermatidae

Genre : *Crenopharynx*



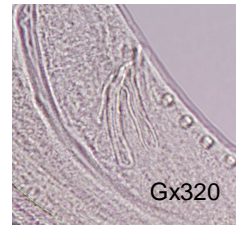
Morphotype 2 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Chromadorida

Famille : Neotonchidae

Genre : *Gomphionema* ♂





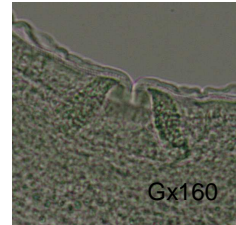
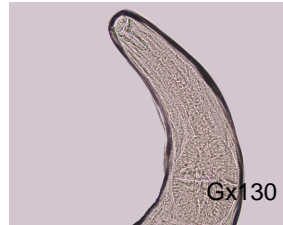
Morphotype 3 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Chromadorida

Famille : Neotonchidae

Genre : *Gomphonema* ♀



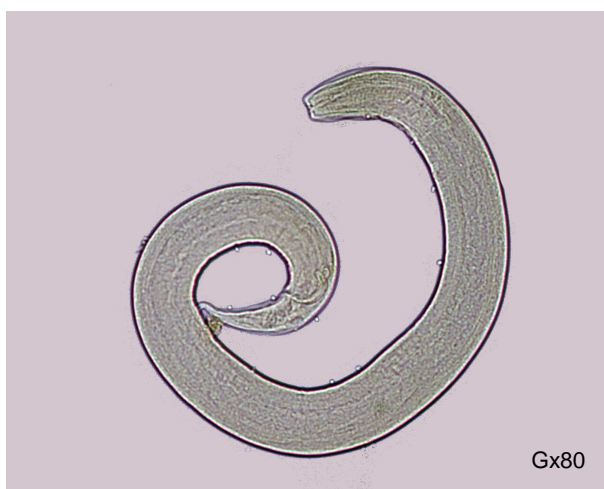
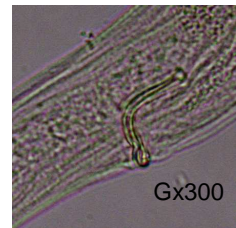
Morphotype 4 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Monhysterida

Famille : Xyalidae

Genre : *Daptonema*



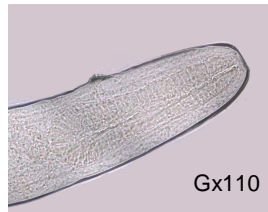
Morphotype 5 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Monhysterida

Famille : Linhomoeidae

Espèce : *Terschellingia brevicauda*





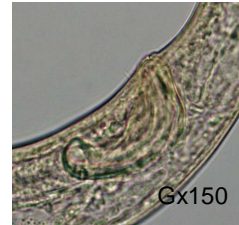
Morphotype 6 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Desmodorida

Famille : Desmodoridae

Genre : *Chromaspirina*



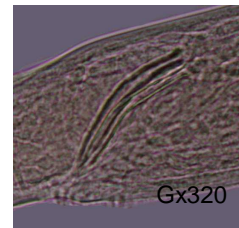
Morphotype 7 :

Classe : Enoplea

Ordre : Enoplida

Famille : Oncholaimidae

Genre : *Oncholaimus*



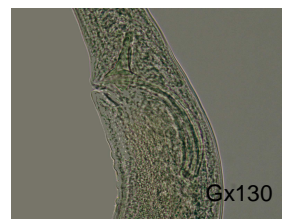
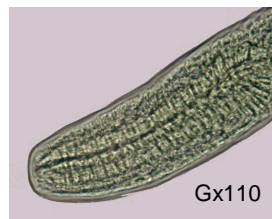
Morphotype 8 :

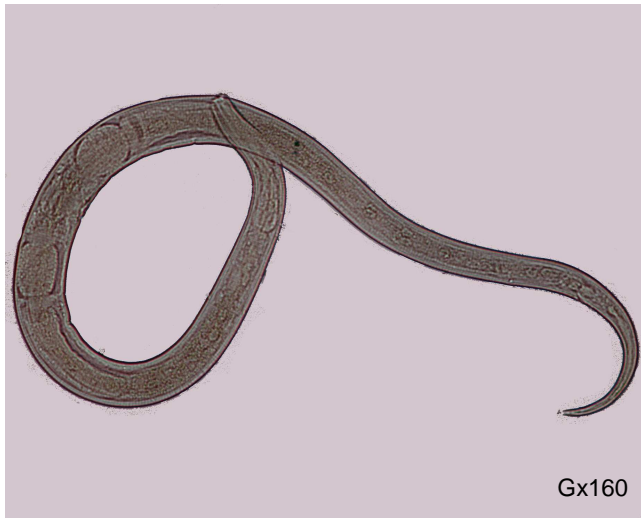
Classe : Chromadorea

Ordre : Monhysterida

Famille : Monhysteridae

Genre : *Diplolaimella*



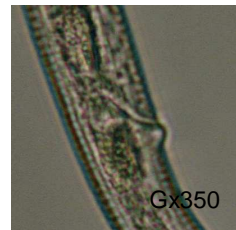
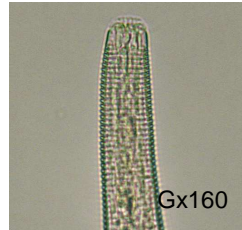


Morphotype 9 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Chromadorida

Famille : Chromadoridae



Morphotype 10 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Chromadorida

Famille : Selachinematidae

Genre : *Richtersia*

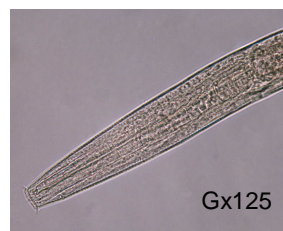


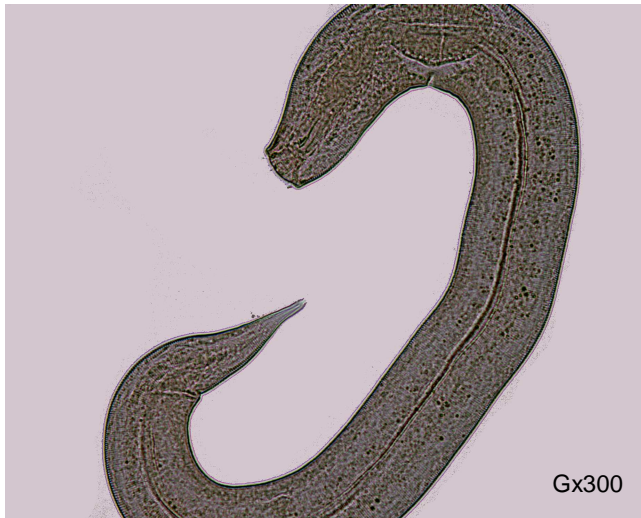
Morphotype 11 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Chromadorida

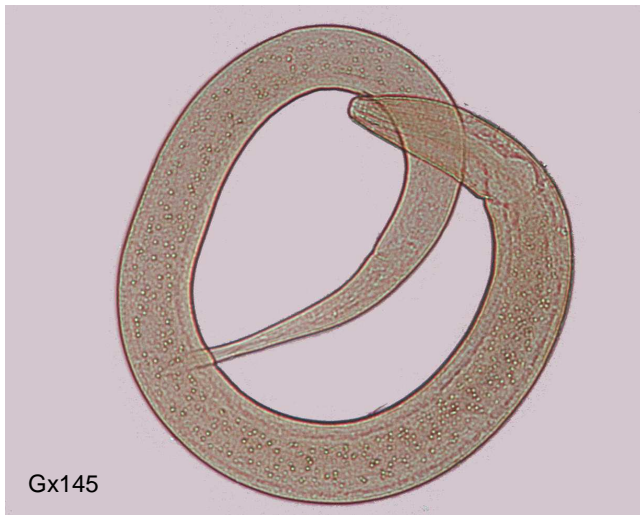
Famille : Chromadoridae





Morphotype 12 :

Classe : Chromadorea
 Ordre : Chromadorida
 Famille : Neotonchidae
 Genre : *Gomphonema*



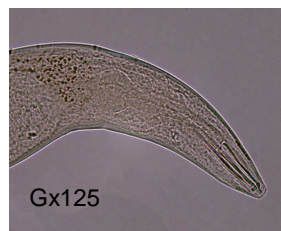
Morphotype 13 :

Classe : Chromadorea
 Ordre : Monhysterida
 Famille : Linhomoeidae
 Espèce : *Terschellingia*



Morphotype 14 :

Classe : Enoplea
 Ordre : Enoplida
 Famille : Ironidae
 Genre : *Thalassironus*





Morphotype 15 :

Classe : Enoplea

Ordre : Enoplida

Famille : Oncholaimidae

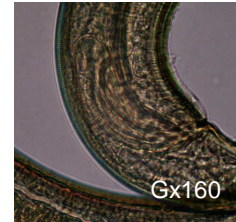


Morphotype 16 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Desmodorida

Famille : Desmodoridae



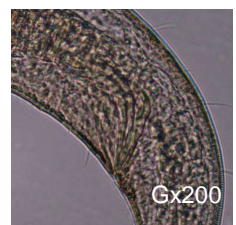
Morphotype 17 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Chromadorina

Famille : Chromadoridae

Genre: *Parapinnanema*



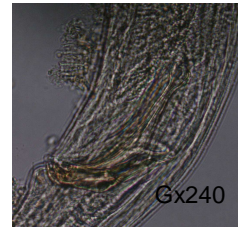


Morphotype 18 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Chromadorida

Famille : Chromadoridae



Morphotype 19 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Desmodorida

Famille : Desmodoridae

Genre: *Pseudochromadora*



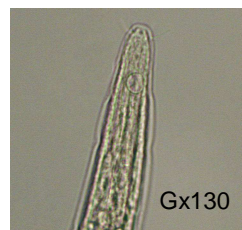
Morphotype 20 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Monhysterida

Famille : Monhysteridae

Genre: *Monhystrella*





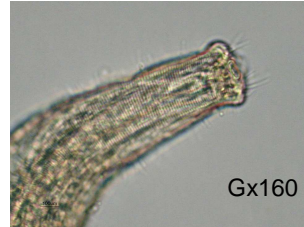
Morphotype 21 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Desmodorida

Famille : Desmodoridae

Genre: *Croconema*



Morphotype 22 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Monhysterida

Famille : Sphaerolaimidae



Morphotype 23 :

Classe : Chromadorea

Ordre : Araeolaimida

Famille : Axonolaimidae

Genre: *Odontophora*



Annexe 9 : Tableau des effectifs de nématodes récoltés dans le sédiment de mangrove

Récapitulatif 2008 du nombre d'espèce par morphotypes identifiés de nématodes colonisant le sédiment autour du casier de bois coulés à 15 jours et 1 mois d'immersion.

Identification	Sédiment lagune			15 jours			1 mois		
	casier	5m		casier	5m		casier	5m	
		2.5m	5m		2.5m	5m		2.5m	5m
morphotype 1	4	1	0	1	0	0	1	2	0
morphotype 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 3	7	0	0	0	0	0	4	0	0
morphotype 4	3	2	3	2	3	3	4	2	4
morphotype 5	5	2	0	2	0	0	4	7	1
morphotype 6	0	0	1	0	1	0	0	4	0
morphotype 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 8	16	10	0	10	0	0	25	33	3
morphotype 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 10	1	0	1	0	1	0	0	0	0
morphotype 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 12	3	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 13	87	18	12	18	12	12	31	63	7
morphotype 14	1	0	0	0	0	0	5	3	1
morphotype 15	1	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 16	1	1	0	1	0	0	0	0	3
morphotype 17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 18	1	0	0	0	0	0	0	0	1
morphotype 19	3	2	0	2	0	0	1	1	0
morphotype 20	0	0	0	0	0	0	0	0	0
morphotype 21	0	2	0	2	0	0	0	0	0
morphotype 22	0	1	1	1	1	1	2	4	0
morphotype 23	0	0	0	0	0	0	0	1	0
morphotype 24	7	4	3	4	3	3	2	3	4

Prédateurs/Omnivores (2B)

Détritivores (1A + 1B)

Succesurs d'épistrate/Herbivores (2A)

Sédiment lagune (Témoin)

Récapitulatif 2009 du nombre d'espèce par morphotypes identifiés de nématodes colonisant le sédiment autour du casier de bois coulés à 15 jours et 1 mois d'immersion.

Identification	Sédiment lagune			15 jours			1 mois		
		casier		casier	casier		casier	casier	
		2.5m	5m		2.5m	5m		2.5m	5m
morphotype 1	<i>Cronopharynx</i>	1	1	1	1	1	1	1	2
morphotype 2	<i>Gomphonema</i>	5	3	10	2	3	6	3	1
morphotype 3	<i>Gomphonema</i>	12	8	27	12	21	12	21	2
morphotype 4	<i>Daptonema</i>	16	22	25	1	2	1	2	2
morphotype 5	<i>Terschellingia</i>	2	2	2	1	4	7	10	4
morphotype 6	<i>Chromaspicula</i>	1	3	4	1	10	10	10	7
morphotype 7	<i>Oncholaimus</i>	3	1	28	2	1	1	1	1
morphotype 8	<i>Laimella</i>	1	2	2	2	1	1	3	1
morphotype 9	Chromadoridae	2	2	1	2	1	1	3	1
morphotype 10	<i>Richtersia</i>	1	1	2	4	3	1	3	2
morphotype 11	Chromadoridae	4	13	4	3	4	3	12	4
morphotype 12	<i>Gomphonema</i>	1	3	4	5	14	1	4	3
morphotype 13	<i>Terschellingia</i>	1	3	4	3	4	3	2	4
morphotype 14	<i>Thalassiroax</i>	1	4	5	14	4	4	4	3
morphotype 15	Oncholaimidae	1	4	3	3	3	3	2	6
morphotype 16	Desmudoridae	1	4	3	1	1	1	2	2
morphotype 17	<i>Parapinnanema</i>	1	3	3	1	6	6	6	2
morphotype 18	Chromadoridae	1	3	3	1	2	2	2	2
morphotype 19	<i>Pseudochromadora</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
morphotype 20	<i>Monhystrella</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
morphotype 21	<i>Croconema</i>	1	1	1	1	1	1	1	1
morphotype 22	Sphaerolaimidae	1	1	1	1	1	1	1	1
morphotype 23	<i>Odontophora</i>	1	1	1	1	1	1	1	1

Prédateurs/Omnivores (2B)

Détritivores (1A + 1B)

Suceurs d'épistrate/Herbivores (2A)

Sédiment lagune (Témoin)

**Ecologie des nématodes marins libres et symbiotiques en milieu tropical.
Développement de la microspectrométrie Raman comme outil
de caractérisation des organismes thiotrophiques.**

Résumé :

Les nématodes marins libres représentent le taxon le plus important dans les sédiments d'eau peu profonde. En milieu tropical, les nématodes colonisent préférentiellement les sédiments sablo-calcaires des herbiers à *Thalassia testudinum* et les sédiments vaseux de mangrove. Les résultats présentés démontrent par des analyses en MEB et par hybridation moléculaire FISH/CARD-FISH, l'existence des bactéries extracellulaires appartenant aux γ -Proteobactéries et localisées sur la surface du corps de huit espèces de nématodes appartenant aux genres *Eubostrichus*, *Robbea* et *Stilbonema* de la famille des Stilbonematinae. Les analyses réalisées en microspectrométrie Raman ont permis de mettre en évidence la présence de soufre élémentaire S₈ dans le manteau bactérien des nématodes et d'associer plus précisément ce soufre aux granules translucides observés en MET dans l'espace périplasmique des bactéries. La microspectrométrie Raman s'est révélée être un outil puissant de détection des symbioses sulfo-oxydantes et, plus généralement, pour la détection de la thiotrophie chez les organismes de la méiofaune de mangrove. L'étude de la nématofaune de mangrove a permis de mettre en évidence une dynamique variable du peuplement, soit monospécifique soit diversifié, colonisant un sédiment très hétérogène et fortement soufré réduit (1mM à 10mM). Les nématodes de mangrove sont dominés par les détritivores et certains genres tels que *Terschellingia*, *Daptonema* et *Gomphonema* constituent la nématofaune de base dans ce milieu avec des nématodes plus caractéristiques tels que *Eubostrichus*, *Croconema* et *Pseudochromadora*.

Mots clés : Nématode, Symbiose bactérienne, Herbier à phanérogames marines, Mangrove, Microspectrométrie Raman.

Abstract :

Free-living marine nematodes are the most important taxon in shallow-water sediments. In tropical environments, nematodes colonize preferentially the calcareous sand of *Thalassia testudinum* seagrass beds and mud sediments of mangrove swamp. The results presented demonstrate by SEM analysis and by molecular hybridization FISH/CARD-FISH, the presence of extracellular bacteria belonging to the γ -proteobacteria and localized on the body surface of eight species of nematodes belonging to the genera *Eubostrichus*, *Robbea* and *Stilbonema* (Stilbonematinae family). The analyses conducted in Raman microspectrometry have revealed the presence of elemental sulfur S₈ in the bacterial coat associated to nematodes and more specifically to the sulfur granules translucent observed by MET in the periplasmic space of bacteria. The Raman microspectrometry has demonstrated a powerful tool for the detection of sulfide-oxidizing symbioses and more generally for the detection of thiotrophic metabolism among mangrove meiofauna organisms. The study of the mangrove nematofauna has revealed a fluctuating population dynamics, either monospecific or diverse, colonizing a heterogeneous and reduced sulfur (1mM to 10mM) sediment. Mangrove nematodes are dominated by deposit feeders and some genera such as *Terschellingia*, *Daptonema* and *Gomphonema* constitute the basic nematofauna in this environment with more specific nematodes such as *Eubostrichus*, *Croconema* and *Pseudochromadora*.

Keywords: Nematoda, Bacterial symbiosis, Seagrass-bed, Mangrove, Raman microspectrometry.