

# Thèse de Doctorat de l'Université des Antilles

Spécialité Biologie des organismes marins

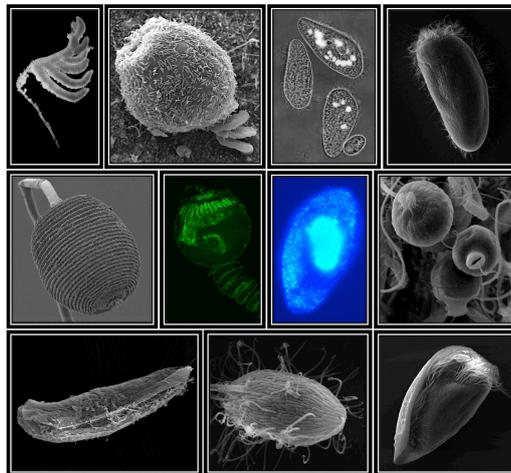
Ecole doctorale Diversité du Vivant

Présentée par

**Adrien Grimonprez**

Pour l'obtention de grade de Docteur de l'Université des Antilles

## Sujet de thèse :



## Symbioses bactériennes chez les protistes ciliés des sédiments réduits de mangroves de Guadeloupe

### Composition du jury :

<b>M. Bâ Amadou</b> , Prof. Univ. Antilles	Examineur
<b>Mme. Caro Audrey</b> , MCF, HDR, Univ. Montpellier	Rapporteur
<b>M. Duperron Sébastien</b> , Prof. MNHN	Rapporteur
<b>M. Gros Olivier</b> , Prof. Univ. Antilles	Directeur
<b>Mme. Gonzalez-Rizzo Silvina</b> , MCF, Univ. Antilles	Co-encadrante
<b>Mme. Guyomar-Rabenirina Stéphanie</b> , Inst. Pasteur Guadeloupe	Examinatrice

## *Remerciements*

*Je tiens à remercier à travers ces quelques lignes les personnes qui m'ont soutenu, qui m'ont encouragé et permis, grâce à leur patience, leur gentillesse, leur compréhension et leur engagement à terminer cette thèse.*

*Je tiens tout d'abord à remercier mes co-directeurs de thèse, le Pr. Olivier Gros et le Dr. Silvína Gonzales-Mayer sans qui tout ce travail n'aurait jamais été possible. Merci de m'avoir pris sous votre aile et de m'avoir transmis une partie de votre savoir. Travailler avec vous a été une des expériences les plus enrichissantes de ma vie aussi bien sur le plan intellectuel que social. À Olivier, je sais que je t'en ai fait voir de toutes les couleurs mais merci de m'avoir accordé ta confiance jusqu'au bout ! Je tiens à te remercier pour ton investissement et pour tout le temps que tu as passé à me former et pour celui que tu consacres à la formation des étudiants. Je n'oublierais jamais ton engagement et ta disponibilité durant ces quelques années que l'on a passé ensemble. À Silvína, merci pour toutes ces heures passées à me former à la phylogénie et aux différentes techniques de biologie moléculaire. Merci à vous deux d'avoir été présents durant les périodes un peu difficiles et d'avoir su être à l'écoute.*

*Je remercie également mes rapporteurs, Mr Sébastien Duperron et Mme Audrey Caro, qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger mon travail. Je sais que vous avez passé du temps à corriger mon manuscrit afin qu'il soit meilleur, merci à vous deux pour votre investissement dans mon travail et pour les échanges très enrichissants que nous avons partagé. Ce fut un plaisir de vous avoir dans mon jury,*

*Pour l'accueil qu'ils m'ont réservé, j'adresse de vifs remerciements à mon unité de recherche au laboratoire de biologie marine de l'UA où j'ai réalisé ma thèse et à l'équipe enseignante*

*du département de Sciences de Fouillole avec laquelle j'ai découvert l'activité d'enseignement. Je tiens à remercier particulièrement Mme Catherine Azedé, Mrs Jean-louis Patrick et Cordonnier Sébastien qui ont été présents et m'ont beaucoup aidé durant toutes ces années au laboratoire pour l'avancée de mes différents travaux, mais également pour les enseignements. Merci à vous pour votre gentillesse et votre engagement personnel dans mes travaux, vous faites un travail fabuleux qui mérite d'être plus reconnu. Aux autres collègues et amis du laboratoire de biologie marine pour leur soutien, leurs encouragements et tout simplement leur amitié sincère, merci à vous tous d'avoir été présents pour moi.*

*J'adresse également mes remerciements à la Région Guadeloupe pour son soutien financier. Grâce à vous j'ai pu réaliser mes études en toute sérénité et aller au bout de l'un de mes rêves. J'espère pouvoir en faire autant pour la Guadeloupe que ce que vous avez pu faire pour moi.*

*Mes derniers remerciements iront à ma famille, mes amis et à l'élú de mon cœur. Merci pour votre patience, votre compréhension et votre soutien durant toutes ces années. Ce ne fut pas facile mais à vos côtés, on ne peut que devenir meilleur. Merci de faire partie de ma vie, vous avez tous contribué à votre manière à ma réussite. Je vous aime fort !*

*Aux autres lecteurs, merci de vous intéresser à mon travail.*

*Bonne lecture !*

# Table des matières

<b>Liste des Figures.....</b>	<b>6</b>
<b>Liste des Tableaux.....</b>	<b>9</b>
<b>Liste des Abréviations.....</b>	<b>10</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>13</b>
<b>Partie 1 : Etat de l'art.....</b>	<b>18</b>
<i>Chapitre 1. Les protistes : eucaryotes unicellulaires.....</i>	<i>18</i>
A. Histoire et Classification.....	18
1. Les Opisthocontes.....	20
2. Les Amoebozoaires.....	21
3. Les Excavates.....	21
4. Les SAR (Straménopiles-Alvéolates-Rhizaires).....	23
5. Les Archéoplastidés (ou Archaeplastida).....	24
B. Caractérisation des protistes.....	25
1. L'enveloppe cellulaire.....	26
2. Organites de locomotion.....	26
3. Formation de cystes.....	26
4. Nutrition.....	26
5. Reproduction.....	27
6. Mise en perspective : caractérisation des protistes ciliés.....	28
C. Rôles et fonctions écologiques des protistes.....	33
1. Rôles des protistes dans la boucle microbienne et dans le réseau trophique marin.....	33
2. Les associations symbiotiques chez les protistes : mutualisme, commensalisme, parasitisme.....	36
<i>Chapitre 2. Relation symbiotique entre protistes ciliés et bactéries : une stratégie écologique ?.....</i>	<i>41</i>
A. Les symbiotes bactériens hétérotrophes associés aux ciliés.....	45
1. Les endosymbiotes nucléaires du genre <i>Holospora</i> chez les paramécies.....	45
2. Les particules Kappa ou « bactéries tueuses ».....	46
3. <i>Polynucleobacter necessarius</i> : un symbiote obligatoire.....	48
4. Les épixénosomes : des bactéries « kamikazes ».....	50
B. Les symbiotes bactériens chimiosynthétiques associés aux ciliés.....	52
1. La chimiosynthèse.....	54
2. Les environnements marins chimiosynthétiques.....	56

a. Les sources hydrothermales .....	57
b. Les suintements froids.....	57
c. Les Whales Falls et Wood Falls.....	58
d. Les sédiments côtiers réduits.....	61
3. Symbioses entre ciliés et bactéries sulfo-oxydantes .....	63
a. <i>Kentrophoros</i> sp. ....	63
b. <i>Zoothamnium niveum</i> .....	65
c. <i>Vorticella</i> sp.....	67
d. <i>Folliculinopsis</i> sp.....	68
4. Symbioses entre ciliés et archées méthanogènes et/ou bactéries sulfato-réductrices ...	70
<b>Chapitre 3. Présentation de l'étude.....</b>	<b>72</b>
A. Les mangroves marines.....	72
1. Description générale .....	72
2. La production primaire marine en mangrove.....	76
3. Les processus de minéralisation de la matière organique et d'émission de sulfure en mangrove .....	79
B. Les symbioses décrites en mangrove .....	82
1. Endosymbiose chez les Bivalves .....	82
2. La chevelure bactérienne du nématode <i>Eubostrichus diana</i> e .....	83
3. Ectosymbiose chez un polype de méduse.....	84
C. Objectifs de l'étude.....	85
<b>Partie 2. Etudes de cas.....</b>	<b>87</b>
<b>Chapitre 1. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>87</b>
A. Description générale du site d'étude : la lagune de la Manche-à-Eau .....	87
B. Echantillonnage.....	90
C. Microscopie optique .....	92
D. Microscopie électronique à balayage .....	93
E. Microscopie électronique à transmission .....	94
F. Analyses par spectrométrie Raman .....	95
G. Extraction d'ADN et amplification .....	95
H. Clonage .....	96
I. Analyses phylogénétiques.....	97
J. Expériences d'hybridation fluorescente <i>in situ</i> (FISH).....	98
K. Culture <i>in vitro</i> .....	100
<b>Chapitre 2. Résultats.....</b>	<b>102</b>
A. Les espèces benthiques sessiles.....	102
1. Morphotype sessile 1 : <i>Pseudovorticella</i> sp. isolat Guadeloupe .....	103

a. Morphologie générale de <i>Pseudovorticella</i> sp.....	103
b. Analyses au microscope électronique à balayage.....	105
c. Observations au microscope électronique à transmission .....	106
d. Analyses par spectrométrie Raman.....	107
e. Analyse phylogénétique de l'hôte .....	108
f. Analyse phylogénétique des bactéries ectosymbiotiques.....	110
g. Observations microscopiques des hybridations réalisées par FISH.....	111
2. Morphotype sessile 2 : <i>Zoothamnium niveum</i> isolat Guadeloupe.....	113
a. Analyse phylogénétique de l'hôte .....	113
b. Morphologie générale de <i>Zoothamnium niveum</i> et cycle de vie.....	114
c. Analyses au microscope électronique à balayage .....	116
d. Analyses ultrastructurales au microscope électronique à transmission.....	117
e. Analyse phylogénétique du symbiote de <i>Zoothamnium niveum</i> isolat Guadeloupe ..	119
B. Les espèces benthiques mobiles .....	121
1. Analyses par microscopie photonique des biofilms récupérés sur les substrats organiques déposés en mangrove.....	121
2. Morphotype mobile 1 : <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe .....	123
a. Observations par microscopie photonique.....	123
b. Analyses au microscope électronique à balayage.....	124
c. Analyses ultrastructurales au microscope électronique à transmission .....	125
d. Analyses par spectrométrie Raman.....	127
e. Analyse phylogénétique de l'hôte .....	128
f. Analyse phylogénétique du symbiote de <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe .....	130
g. Observations microscopiques des hybridations réalisées par FISH.....	131
h. Culture <i>in vitro</i> .....	134
3. Morphotype mobile 2 : <i>Dysteria</i> sp. isolat Guadeloupe.....	135
a. Analyses morphologiques au microscope photonique et au microscope électronique à balayage.....	135
b. Analyses ultrastructurales au microscope électronique à transmission.....	136
c. Analyse phylogénétique de l'hôte.....	138
d. Observations microscopiques des hybridations réalisées par FISH.....	140
C. Etudes complémentaires.....	141
<i>Chapitre 3. Discussion.....</i>	<i>142</i>
A. Identification et caractérisation des partenaires symbiotiques .....	144
1. Les ciliés péritriches sessiles .....	146
a. <i>Pseudovorticella</i> sp. isolat Guadeloupe .....	147
b. <i>Zoothamnium niveum</i> isolat Guadeloupe .....	148
c. Identification des bactéries ectosymbiotiques des ciliés péritriches sessiles .....	149
2. Les protistes ciliés mobiles.....	151

a. <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe .....	152
b. <i>Dysteria</i> sp. isolat Guadeloupe.....	153
c. Les bactéries endosymbiotiques de <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe .....	154
d. Les bactéries ectosymbiotiques de <i>Dysteria</i> sp. isolat Guadeloupe .....	156
3. Acquisition et transmission des bactéries symbiotiques chez les protistes ciliés .....	156
B. Les sédiments marins de mangroves : un environnement propice au développement des symbioses bactériennes .....	158
1. Les ciliés anaérobies et micro-aérophiles sont souvent associés à des bactéries .....	159
2. Les ciliés symbiotiques associés au périphyton des mangroves de Guadeloupe.....	164
a. Les ciliés péritriches sessiles et leurs bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes.	164
b. Les ciliés mobiles symbiotiques présents dans le périphyton des mangroves de Guadeloupe.....	169
C. D'autres symbiotes potentiels chez les protistes ciliés des mangroves de Guadeloupe ? .....	172
Chapitre 4. Conclusion et perspectives.....	176
<b>Bibliographie.....</b>	<b>179</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>219</b>
Annexe 1 : Liste des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries présentes dans le cytoplasme de <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe obtenues après clonage.....	219
Annexe 2 : Article sur la symbiose entre <i>Pseudovorticella</i> sp. isolat Guadeloupe et des bactéries sulfo-oxydantes accepté dans <i>EJOP</i> .....	231
Annexe 3 : Article sur la symbiose entre <i>Cladodema</i> sp. et des bactéries sulfo-oxydantes accepté dans <i>PLOS One</i> .....	244

# Liste des Figures

Figure 1. Classification traditionnelle du vivant avant l'arrivée des méthodes moléculaires et phylogénétiques.....	19
Figure 2. Classification des eucaryotes réalisée à partir d'un consensus de preuves phylogénétiques, de signatures génomiques rares et de caractéristiques morphologiques.....	20
Figure 3. Différentes espèces de protistes appartenant aux Amorphes .....	21
Figure 4. Certains protistes parasitaires appartenant aux Excavates .....	23
Figure 5. Protistes appartenant au super-groupe SAR (Straménopiles-Alvéolates-Rhizaires).....	24
Figure 6. Gamme de taille des eucaryotes unicellulaires.....	25
Figure 7. Structure générale d'une paramécie, l'une des espèces de protistes ciliés les plus connus.....	29
Figure 8. Schéma général de la surface ventrale d'un cilié .....	31
Figure 9. Schéma général du cycle de vie d'un cilié .....	32
Figure 10. Schéma simplifié de la chaîne trophique marine classique associée à la boucle microbienne.....	35
Figure 11. Schéma représentant les relations interspécifiques pouvant avoir lieu entre deux espèces en fonction de leurs impacts respectifs sur leur partenaire.....	38
Figure 12. Localisation des symbiotes (gris foncé) par rapport à leur hôte (gris clair).....	39
Figure 13. Distribution phylogénétique des symbioses entre Eucaryotes et Procaryotes.....	40
Figure 14. Distribution des symbiotes bactériens chez les ciliés .....	43
Figure 15. Les endosymbiotes bactériens de Paramecium .....	46
Figure 16. Les bactéries tueuses .....	48
Figure 17. Polynucleobacter necessarius.....	50
Figure 18. Epixénosomes d'Euplotidium itoi.....	51
Figure 19. Schéma montrant les différentes voies d'accès à l'énergie pour la photosynthèse et la chimiosynthèse.....	55
Figure 20. Schéma du fonctionnement des sources hydrothermales et suintements froids.....	58
Figure 21. Représentation schématique du processus d'émission de sulfures au niveau des « whale falls »	59
Figure 22. Représentation schématique du processus d'émissions de sulfures au niveau des bois coulés.....	61
Figure 23. Représentation schématique des différents processus d'émission de sulfures en mangrove et dans les sables anoxiques côtiers des herbiers marins .....	63
Figure 24. Kentrophoros et ses bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes.....	65
Figure 25. Zoothamnium niveum et ses bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes.....	67
Figure 26. Vorticella sp. et ses bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes .....	68
Figure 27. Folliculinopsis sp. et ses bactéries endo- et ectosymbiotiques.....	70
Figure 28. Metopus consortus et ses bactéries endo- et ectosymbiotiques.....	71
Figure 29. Courantologie et bathymétrie de la lagune de la Manche-à-Eau.....	76

Figure 30. Schéma général montrant les processus de minéralisation de la matière organique, d'émission de sulfures ainsi que la chaîne trophique en mangrove.....	81
Figure 31. Relations métaboliques entre les bactéries et les cellules branchiales chez les Lucinacea.....	83
Figure 32. <i>Eubostrichus diana</i> e et ses bactéries ectosymbiotiques filamenteuses.....	85
Figure 34. Site d'étude et d'échantillonnage.....	88
Figure 35. Photos de la Manche-à-Eau.....	89
Figure 36. Schéma représentant les substrats utilisés pour l'échantillonnage ainsi que les conditions environnementales du site.....	91
Figure 37. Photo d'un morceau de crâne de cochon recouvert d'un biofilm blanchâtre.....	92
Figure 38. Schéma général expliquant la culture mise en place en laboratoire.....	102
Figure 39. Plusieurs individus de <i>Pseudovorticella</i> sp. fixés à la surface d'une feuille de palétuvier rouge récoltée sur le sédiment de mangrove.....	104
Figure 40. Analyse morphologique de <i>Pseudovorticella</i> sp. au MEB.....	106
Figure 41. Analyse ultrastructurale de <i>Pseudovorticella</i> sp. par MET.....	107
Figure 42. Analyse de <i>Pseudovorticella</i> sp. par microspectrométrie Raman.....	108
Figure 43. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARN 18S par la méthode du Neighbour Joining (NJ) révélant la position phylogénétique de <i>Pseudovorticella</i> sp.....	109
Figure 44. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de <i>Pseudovorticella</i> sp.....	110
Figure 45. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique des bactéries ectosymbiotiques de <i>Pseudovorticella</i> sp.....	111
Figure 46. Observations des hybridations in situ (FISH) réalisées sur les ectosymbiotes de <i>Pseudovorticella</i> sp.....	112
Figure 47. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de <i>Zoothamnium niveum</i> isolat Guadeloupe.....	114
Figure 48. Transformation d'une colonie de <i>Zoothamnium niveum</i> durant sa croissance.....	115
Figure 49. Analyses morphologiques des différentes formes trophiques F1, F2, F3 de <i>Zoothamnium</i> sp. au MEB.....	117
Figure 50. Analyse ultrastructurale de <i>Zoothamnium</i> sp. au MET.....	119
Figure 51. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique des bactéries ectosymbiotiques de <i>Z. niveum</i> isolat Guadeloupe.....	120
Figure 52. Analyse par microscopie photonique de la composition microbienne des biofilms récupérés à différents intervalles de temps à la surface des substrats organiques.....	122
Figure 53. Détection des morphotypes de protistes ciliés symbiotiques par marquage des individus au DAPI et observation au microscope à épifluorescence.....	123
Figure 54. Analyse au microscope photonique du morphotype mobile 1.....	124
Figure 55. Analyse morphologique de <i>Trochochilodon</i> sp. au MEB.....	125

Figure 56. Analyse ultrastructurale de <i>Trochochilodon</i> sp. par MET.....	126
Figure 57. Analyse de <i>Trochochilodon</i> sp. par microspectrométrie Raman.....	127
Figure 58. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe.....	129
Figure 59. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique des bactéries endosymbiotiques de <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe.....	131
Figure 60. Observations des hybridations FISH réalisés sur les symbiotes d'individus de <i>Trochochilodon</i> sp. isolat Guadeloupe fraîchement récoltés en mangrove et celles réalisées sur des individus provenant de cultures pures.....	133
Figure 61. Schéma récapitulatif des résultats obtenus après la mise en culture de <i>Trochochilodon</i> sp. ....	135
Figure 62. Analyse morphologique de <i>Dysteria</i> sp. isolat Guadeloupe au microscope photonique et au MEB.....	136
Figure 63. Analyse ultrastructurale de <i>Dysteria</i> sp. par STEM.....	137
Figure 64. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de <i>Dysteria</i> sp. isolat Guadeloupe.....	139
Figure 65. Observations des hybridations FISH réalisées sur les ectosymbiotes de <i>Dysteria</i> sp. isolat Guadeloupe.....	140
Figure 66. Analyse morphologique au MEB de plusieurs ciliés et flagellés récoltés dans les mangroves de Guadeloupe.....	142
Figure 67. Caractères morphologiques du genre <i>Vorticella</i> .....	147
Figure 68. Classification schématique des morphotypes de chaque espèce représentant les différents genres de <i>Cyrtophoridés</i> .....	152
Figure 69. Représentation schématique des divers métabolismes utilisés par les endosymbiotes et leur hôte ainsi que leurs interactions potentielles.....	162
Figure 70. Observation en MEB de plusieurs morphotypes de bactéries et de ciliés.....	163
Figure 71. Phénomène de contraction chez les ciliés péritriches sessiles.....	165
Figure 72. Cycle de vie du cilié colonial péritriche sessile <i>Zoothamnium niveum</i> .....	166
Figure 73. Observations microscopiques des espèces symbiotiques appartenant au genre <i>Dysteria</i> .....	172
Figure 74. Plusieurs protistes ciliés marins en associations avec des micro-algues endosymbiotiques.....	174
Figure 75. Observations au microscope électronique à transmission d'une cellule de <i>Mesodinium rubrum</i> .....	175

## *Liste des Tableaux*

<i>Tableau 1. Diversité métabolique des organismes basée sur la source d'énergie et d'électrons pour leurs besoins énergétiques et la source de carbone pour la construction d'une nouvelle biomasse.....</i>	<i>54</i>
<i>Tableau 2. Récapitulatif des différents métabolismes chimiosynthétiques.....</i>	<i>56</i>
<i>Tableau 3. Liste et détails des amorces utilisées pour les PCR.....</i>	<i>97</i>
<i>Tableau 4. Liste et détails des sondes utilisées pour les analyses FISH.....</i>	<i>100</i>

## Liste des Abréviations

<i>ADN</i> : Acide DesoxyriboNucléique	<i>g</i> : gramme
<i>ARN</i> : Acide RiboNucléique	<i>mg</i> : milligramme
<i>ARNr 18S</i> : Arn de la petite sous-unité 40S des ribosomes eucaryotes	<i>ng</i> : nanogramme
<i>ARNr 16S</i> : Arn de la petite sous-unité 30S des ribosomes procaryotes	<i>l</i> : litre
<i>DAPI</i> : 4',6'-diamidino-2-phénylindole	<i>µl</i> : microlitre
<i>Eau PPI</i> : eau pour préparation injectable	<i>kV</i> : kilovolt
<i>FISH</i> : Fluorescence in situ Hybridization	<i>V</i> : volt
<i>MEB</i> : Microscopie électronique à balayage	<i>h</i> : heure
<i>MET</i> : Microscopie électronique à transmission	<i>min</i> : minute
<i>STEM</i> : Microscope électronique à balayage par transmission	<i>s</i> : seconde
<i>PCR</i> : Polymerase Chain Reaction	
<i>SAR</i> : Stramenopiles-Alveolata-Rhizaria	
<i>M</i> : molaire	
<i>mM</i> : millimolaire	
<i>µM</i> : micromolaire	
<i>m</i> : mètre	
<i>cm</i> : centimètre	
<i>mm</i> : millimètre	
<i>µm</i> : micromètre	
<i>nm</i> : nanomètre	
<i>ha</i> : hectare	
<i>mOsm</i> : milliosmole	
° : degré	
°C : degré Celsius	
% : pour cent	

**Résumé :** Alors que la Guadeloupe possède la plus grande bordure littorale de mangroves des Petites Antilles, la microfaune et la microflore bactérienne marine associées à cet écosystème sont mal connues. Pourtant, ces diverses communautés de micro-organismes sont à la base du réseau trophique des sédiments marins de mangrove. En effet, grâce à leurs activités basées sur des processus hétérotrophes, ces micro-organismes vont permettre de dégrader la litière constituée de feuilles et branches de palétuviers tombées à la surface du sédiment. En condition anoxique, la dégradation des substrats végétaux par des bactéries sulfato-réductrices entraîne la production de sulfures qui vont soutenir l'activité de bactéries chimiosynthétiques. Les protistes ciliés sont des micro-organismes eucaryotes unicellulaires caractérisés par la présence de cils sur la surface cellulaire et appartenant au micro-zooplancton. Leur mode de nutrition basé sur la phagocytose permet non seulement de favoriser la reminéralisation de la biomasse microbienne, ce qui augmente le transfert de nutriments à d'autres organismes du réseau trophique, mais facilite surtout l'émergence de nombreuses associations symbiotiques. Les résultats obtenus durant cette thèse ont permis de mettre en évidence la présence d'associations symbiotiques entre des bactéries sulfoxydantes ou hétérotrophes et des espèces de protistes ciliés faisant parties du périphyton de la mangrove. Certaines espèces comme *Pseudovorticella* sp. et *Zoothamnium niveum* vivent fixées aux substrats végétaux en décomposition à la surface des sédiments marins et sont couvertes d'un manteau bactérien. Les analyses phylogénétiques menées sur ces deux espèces ont montré que leurs bactéries ectosymbiotiques sont différentes et que les deux souches appartiennent au  $\gamma$ -protéobactéries sulfo-oxydantes. De plus, les analyses microscopiques ont montré que les ectosymbiotes constituent l'essentiel du régime alimentaire de ces ciliés. Ces résultats suggèrent que *Pseudovorticella* sp. et *Zoothamnium niveum* cultivent leurs symbiotes respectifs comme source de nourriture. D'autre part, deux autres espèces symbiotiques de protistes ciliés ont été identifiées à l'intérieur de biofilms microbiens formés par la dégradation de la matière organique en mangrove. L'une de ces espèces appartenant au genre *Trochochilodon* possède des bactéries dans son cytoplasme. Les analyses phylogénétiques ont montré que *Trochochilodon* sp. a une alimentation non-sélective et que les bactéries majoritairement présentes dans son cytoplasme appartiennent au genre *Umboniibacter*. Ce sont des bactéries chimio-organohétérotrophes également présentes dans l'intestin de gastéropodes marins. L'hypothèse avancée est que ces bactéries peuvent jouer un rôle dans l'alimentation du cilié, lui permettant l'accès à de nouveaux substrats comme sources de nourriture. Cependant, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour

pouvoir le confirmer. Enfin, la deuxième espèce identifiée à l'intérieur des biofilms formés par la dégradation de la matière organique à la surface des sédiments marins de mangrove de Guadeloupe appartient au genre *Dysteria*. Cette espèce possède également des bactéries ectosymbiotiques formant un manteau bactérien. Les résultats obtenus suggèrent que ces ectosymbiotes sont des bactéries sulfo-oxydantes mais d'autres analyses sont nécessaires pour pouvoir le confirmer. Toutes les espèces de protistes ciliés étudiées durant cette thèse étaient associées à des bactéries symbiotiques. Il semblerait donc que la symbiose joue un rôle très important pour la colonisation et la survie de ces espèces dans cet environnement chimiosynthétique. De nombreuses autres espèces de protistes, dont majoritairement des ciliés et probablement des flagellés, ont également pu être observées au niveau des sédiments marins réduits anoxiques de la partie marine des mangroves. Des études complémentaires devront être menées afin de révéler la véritable diversité des espèces de protistes ciliés présents dans les mangroves de Guadeloupe et de mieux comprendre l'importance des associations symbiotiques dans cet écosystème sulfidique côtier.

**Mots clés :** ARNr 18S ; ARNr 16S ; Bactéries ; Ciliés ; Mangrove ; MEB ; MET ; Microscopie ; Phylogénie ; Sédiments ; Spectrométrie Raman ; Symbioses.

## *Introduction générale*

La première définition du règne des *Protista* fut proposée par Ernst Haeckel en 1866, celui-ci regroupa tous les organismes qui, à son sens, et selon les connaissances de l'époque, ne correspondaient ni aux végétaux ni aux animaux (Corliss, 1998). Ce règne se divisait en trois parties : les algues unicellulaires se trouvèrent réunies parmi les protophytes, les champignons unicellulaires au sein des protomycètes et les autres protistes à affinités animales chez les protozoaires (Whittaker et Margulis, 1978). Le taxon des Protistes a ainsi perduré pendant plus d'un siècle, mais la délimitation de ce règne a souvent, et fortement, varié en fonction des auteurs (Cavalier-Smith, 2003 ; Keeling *et al.*, 2005 ; Roger et Simpson, 2009 ; Adl *et al.*, 2012 ; Burki *et al.*, 2014 ; Ruggiero *et al.*, 2015). Dans la classification phylogénétique moderne, il disparaît. Le caractère polyphylétique des protistes a été démontré, réduisant considérablement la pertinence d'un tel groupe, qui par ailleurs, était sans unité écologique ou morphologique (Cavalier-Smith, 2003). Aujourd'hui, le terme protiste se réfère aux organismes unicellulaires eucaryotes capables d'exister en tant que cellules individuelles (Pawlowski et Burki, 2009). En écologie, la classification des protistes en groupes fonctionnels est souvent plus utile et plus pertinente que les groupements taxonomiques (Mittra *et al.*, 2016). Cela permet de regrouper différentes classes taxonomiques au sein de catégories d'organismes qui vont assurer une fonction écologique similaire. Les protistes sont ubiquistes, on les retrouve dans la majorité des écosystèmes marins, terrestres et lacustres occupant des niches écologiques très variées (Corliss, 2002). En milieu marin, la majorité des protistes appartiennent soit au phytoplancton autotrophe, qui utilise la photosynthèse pour fixer le CO<sub>2</sub> et produire de l'oxygène, soit au micro-zooplancton hétérotrophe qui phagocyte des bactéries, du phytoplancton et des particules minérales et/ou organiques en suspension (Fasham *et al.*, 1990 ; Baretta *et al.*, 1995). Certains de ces protistes hétérotrophes sont également capables d'effectuer la photosynthèse, ce sont des mixotrophes. Les protistes vivent à tous les niveaux de la colonne d'eau, de la surface jusqu'au fond océanique. Certains sont benthiques et peuvent vivre fixés à la surface d'un substrat ou à l'intérieur des sédiments marins (Corliss, 2002). Les habitats peuvent comprendre des niches manifestant des conditions extrêmes de température, d'oxygène, de dessiccation, de salinité, de pH, de pression atmosphérique et la présence de composés minéraux en forte concentration ainsi que des composés toxiques (Rothschild et Mancinelli, 2001 ; Hu, 2014). Certains protistes peuvent également s'associer avec des archées, des

bactéries ou encore des algues unicellulaires au travers d'interactions symbiotiques, afin de survivre aux conditions environnementales difficiles et ainsi coloniser de nouvelles niches écologiques (Gast *et al.*, 2009 ; Dziallas *et al.*, 2012). Ces associations symbiotiques sont classées en différentes catégories en fonction du rôle joué par le symbiote, même si bien souvent le métabolisme du symbiote n'a pas été identifié. Ainsi, le symbiote peut être utilisé comme source de nourriture ; il peut aussi aider à la défense de l'hôte ou encore permettre à l'hôte de s'adapter aux conditions environnementales difficiles (Gast *et al.*, 2009 ; Dziallas *et al.*, 2012). Bien que les associations symbiotiques entre protistes et procaryotes soient très répandues, c'est au sein de l'embranchement des ciliés (Ciliates ou Ciliophores) que l'on retrouve la plus grande diversité d'associations impliquant des symbiotes utilisant des métabolismes différents. On y retrouve des symbiotes photoautotrophes, chimiosynthétiques (lithoautotrophes) ou encore hétérotrophes (Dziallas *et al.*, 2012).

Les protistes ciliés sont des micro-organismes eucaryotes présents dans presque tous les milieux aquatiques (Lynn, 2008 ; Dziallas *et al.*, 2012). Leur mode de nutrition basé sur la phagocytose permet non seulement de réguler les populations de micro-organismes, mais favorise également la reminéralisation de cette biomasse microbienne, ce qui augmente le transfert de nutriments à d'autres organismes du réseau trophique (Taylor et Sullivan, 1984 ; Gast *et al.*, 2009 ; Dziallas *et al.*, 2012). De plus, la phagocytose facilite l'émergence de nombreuses associations symbiotiques (Gast *et al.*, 2009 ; Dziallas *et al.*, 2012). En effet, les ciliés hébergent régulièrement des bactéries dans leur cytoplasme, ceci est en partie dû à la structure cellulaire et aux modes de nutrition de ces protistes hétérotrophes (Hausmann et Bradbury, 1996). En tant que prédateurs phagocytaires de micro-organismes, ils présentent un risque élevé « d'infections microbiennes », et plus particulièrement de la part des bactéries. Ces dernières sont tout d'abord ingérées, puis stockées dans des vacuoles (ou phagosomes) afin d'être digérées par des enzymes après la fusion de la vacuole digestive avec des lysosomes primaires (Fok et Allen, 1988). Cependant dans certains cas, ces bactéries peuvent s'échapper des phagosomes et persister dans les cellules sous forme d'endosymbiotes (Schweikert, 2013). En plus des bactéries intracellulaires présentes dans le cytoplasme, il est possible de trouver des bactéries ectosymbiotiques intimement associées aux protistes ciliés (Ott *et al.*, 2004a ; Rosati, 2004). La plupart de ces bactéries appartiennent à de nombreux genres non apparentés de différents sous-groupes de protéobactéries (Ott *et al.*, 2004a ; Dubilier *et al.*, 2008 ; Gast *et al.*, 2009). Dans le cytoplasme, certaines bactéries sont présentes à l'intérieur des organites ou y sont directement associées. Des bactéries ont

également été décrites associées au système endomembranaire ou aux éléments du cytosquelette (Schweikert, 2013). Par exemple, des symbiotes bactériens ont été trouvés dans les micro- et macronoyaux (Preer, 1969 ; Preer et Preer, 1984), dans l'espace périnucléaire et dans le réticulum endoplasmique (Fokin et Karpov, 1995) de certains protistes, principalement des ciliés. Toutes les symbioses « mutualistes » entre les procaryotes et les eucaryotes sont liées à la nutrition, à la protection et au catabolisme (Moya *et al.*, 2008). Dans le cas des symbioses chimiosynthétiques ces bactéries peuvent également jouer un rôle de détoxification, permettant ainsi à l'hôte d'accéder à de nouvelles niches écologiques (Fisher et Childress, 1992 ; Ott *et al.*, 2004a ; Stewart *et al.*, 2005 ; Cavanaugh *et al.*, 2006 ; Dubilier *et al.*, 2008 ; Bright *et al.*, 2014). Certains protistes, comme *Kentrophoros* sp. ou *Zoothamnium niveum*, cultivent et utilisent leurs ectosymbiotes comme source de nourriture (Ott *et al.*, 2004a). Les ectosymbiotes d'*Euplotidium* sp. lui permettent de se protéger de l'ingestion par les prédateurs en modifiant son apparence, empêchant ainsi son identification (Rosati *et al.*, 1999). Tandis que les endosymbiotes bactériens appartenant au genre *Caedibacter* vivant chez l'un des ciliés les plus connus, la paramécie (*Paramecium* sp.), favorisent le développement de leur hôte en lui donnant la capacité de tuer les individus dépourvus de ces bactéries (Kusch *et al.*, 2002). Malgré la diversité des fonctions métaboliques utilisées par les symbiotes procaryotes, les symbiotes photosynthétiques eucaryotes sont plus communs chez les protistes (Esteban *et al.*, 2010 ; Sauvadet, 2015). Ces organismes peuvent effectuer la photosynthèse grâce à des associations endosymbiotiques avec des cyanobactéries, des algues unicellulaires ou par l'acquisition de chloroplastes. Les chloroplastes proviennent alors de l'endosymbiose secondaire ou tertiaire entre un protiste cilié hétérotrophe et une algue unicellulaire (Nowack et Melkonian, 2010). Mise à part les voies d'acquisition symbiotiques, les protistes ciliés peuvent également obtenir leurs plastes par kleptoplastie (Dziallas *et al.*, 2012). Dans ce cas, des algues unicellulaires sont phagocytées, puis digérées, tandis que leurs plastes sont séquestrés et maintenus intacts et fonctionnels pour réaliser la photosynthèse (Nowack et Melkonian, 2010 ; Dziallas *et al.*, 2012).

D'autres protistes sont également connus pour vivre dans des conditions contraignantes au sein d'écosystèmes chimiosynthétiques (sédiments côtiers anoxiques réduits, « wood falls » et « whale falls », sources hydrothermales profondes et suintements froids). Le fonctionnement de ces écosystèmes est conditionné par la présence de concentrations élevées en composés réduits tels que les sulfures ( $\text{HS}^-$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ), le thiosulfate ou encore le méthane

(Fiala-Médioni, 2000 ; Van Dover, 2000 ; Cavanaugh *et al.*, 2006). Ces composés sont une source d'énergie chimique importante et perpétuelle pour les bactéries chimioautotrophes mais sont également parfois toxiques pour les autres organismes, notamment les métazoaires et les protistes, pouvant vivre dans ces environnements contraignant (Ramirez-Llodra *et al.*, 2010). Parmi les protistes ciliés symbiotiques observés au niveau des écosystèmes chimiosynthétiques, les plus étudiés sont *Zoothamnium niveum* et *Kentrophoros* sp. Ils ont été respectivement observés, fixés à des débris végétaux présents à la surface de sédiments de mangrove (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; Ott et Bright, 2004 ; Himmel *et al.*, 2009 ; Laurent *et al.*, 2013), et à l'intérieur de sédiments sableux anoxiques (Sauerbrey, 1928 ; Kahl, 1933 ; 1935 ; Fauré-Fremiet, 1950a ; 1951 ; Fenchel et Finlay, 1989). Ces deux écosystèmes chimiosynthétiques sont spécifiques des sédiments côtiers réduits présents en abondance au niveau des écosystèmes marins tropicaux. Ces écosystèmes sont connus pour soutenir une activité chimiosynthétique intense favorisant le développement de symbioses sulfo-oxydantes (Ott *et al.*, 2004a ; Dubilier *et al.*, 2008 ; Laurent *et al.*, 2009). En Guadeloupe, de nombreuses associations impliquant des bactéries chimiosynthétiques sulfo-oxydantes ont été découvertes chez divers phyla d'invertébrés et de protistes ciliés (Frenkiel *et al.*, 1996 ; Gros *et al.*, 2003 ; Himmel *et al.*, 2009 ; Maurin *et al.*, 2010 ; Laurent *et al.*, 2013 ; Abouna *et al.*, 2015). Toutes ces symbioses ont été observées au niveau des écosystèmes chimiosynthétiques côtiers tels que : les sédiments anoxiques des herbiers de phanérogames marines, les vases de mangroves et les débris végétaux, principalement des branches et feuilles de palétuviers, tombées à la surface du sédiment marin en mangrove et dans des dépressions dans le sédiment. Les mangroves sont des écosystèmes à l'interface entre terre et mer recouvrant 60 à 75% des côtes intertidales dans les régions subtropicales et tropicales (Macintosh et Ashton, 2004 ; Alongi, 2008 ; Lambs *et al.*, 2011). La partie marine des mangroves est un écosystème peu étudié de nos jours alors que la Guadeloupe possède la plus grande bordure littorale de mangrove des Petites Antilles (Spalding *et al.*, 1997). La microfaune et la microflore bactérienne marine associées à cet écosystème sont mal connues, pourtant elles sont à la base de la chaîne trophique d'un environnement considéré comme zone de nurserie pour de nombreuses espèces à importance commerciale (Nagelkerken *et al.*, 2008). Le but de cette thèse était donc de pouvoir caractériser d'un point de vue cellulaire et moléculaire, certains des protistes symbiotiques et leurs différents symbiotes vivant au niveau des écosystèmes de mangroves de Guadeloupe. Nous nous sommes focalisés principalement sur les espèces de protistes ciliés, qui de par leur mode de vie, leur morphologie et leur répartition à l'échelle mondiale, ont déjà montré une remarquable aptitude à s'associer avec

des micro-organismes eucaryotes et procaryotes. En effet, plus de 250 espèces de ciliés ont déjà été recensées en association symbiotique avec des bactéries à travers le monde (Fokin, 2012). De plus, des associations symbiotiques entre des protistes ciliés et des bactéries sulfo-oxydantes ont déjà été observées au niveau des sédiments anoxiques réduits de mangrove de Guadeloupe (Maurin *et al.*, 2010 ; Laurent *et al.*, 2013). Les différentes symbioses recensées durant cette thèse ont été décrites grâce aux analyses microscopiques et phylogénétiques des différentes espèces de protistes ciliés symbiotiques potentielles (ou morphotypes) récoltées lors des campagnes d'échantillonnage. La microscopie (photonique et électronique) a permis d'avoir accès à des informations cruciales pour l'identification morphologique des différents partenaires rencontrés, notamment à l'aide de l'analyse ultrastructurale de l'hôte et de son symbiote. Afin d'étayer les analyses morphologiques réalisées par microscopie, une analyse des gènes codants pour l'ARNr 18S des eucaryotes et pour l'ARNr 16S des procaryotes a été réalisée permettant ainsi de finaliser l'identification des deux partenaires. Les analyses phylogénétiques ont été confirmées par des hybridations *in situ* (FISH) des bactéries symbiotiques observées à la surface cellulaire ou à l'intérieur du cytoplasme de différentes espèces de protistes ciliés récoltées en environnement naturel ou sur des individus provenant de culture mise en place en laboratoire. Les hybridations *in situ* ont été réalisées à l'aide de sondes spécifiques conçues pour chaque symbiote. L'activité métabolique des symbiotes a également été étudiée grâce à l'utilisation de la spectrométrie Raman dans le cas des symbioses thiotrophiques. La spectrométrie Raman permet en effet de caractériser les composés chimiques présents à l'intérieur des bactéries, ce qui permet de supposer un métabolisme pour ces bactéries. Les résultats obtenus ont ainsi permis de mieux comprendre l'impact de ces micro-organismes eucaryotes (Protistes) et procaryotes dans le fonctionnement des mangroves de bord de mer ; en particulier, sur le compartiment benthique de cet écosystème dont le fonctionnement repose sur la dégradation de la matière organique enfouie dans le sédiment et de celle présente à sa surface. C'est cette dégradation anaérobie de la matière organique qui provoque le dégagement d'hydrogène sulfuré ou H<sub>2</sub>S en mangrove, à la différence des sources hydrothermales et des suintements froids où la production d'H<sub>2</sub>S est d'origine géologique. À ce titre, les sédiments marins de mangroves et les bois coulés seront considérés dans le reste du document comme des écosystèmes chimiosynthétiques à part entière, au même titre que les écosystèmes chimiosynthétiques de grandes profondeurs (sources hydrothermales, carcasses de baleines et suintements froids).

# Partie 1 : Etat de l'art

## Chapitre 1. Les protistes : eucaryotes unicellulaires

### **A. Histoire et Classification**

Alors que la majorité des grands taxons de plantes et animaux sont relativement bien établis dans la classification phylogénétique moderne des eucaryotes, les protistes sont de leur côté beaucoup plus difficiles à classer. En effet, si les découvertes de nouvelles espèces de plantes et d'animaux sont encore fréquentes aujourd'hui, celles de rangs taxonomiques supérieurs (genre, famille, ordre ou classe) sont devenues exceptionnelles (Silar, 2016). Au contraire, dans le cas des protistes, les descriptions de tels niveaux taxonomiques ou de nouveaux embranchements ne sont pas rares (Silar, 2016). Ceci est en partie dû au fait que les eucaryotes dits « supérieurs » sont visibles et présents tout autour de nous. Cependant cette biodiversité animale et végétale ne représente qu'une infime partie de la diversité totale des eucaryotes et masque la grande majorité des organismes eucaryotes invisibles, dits « inférieurs », dont beaucoup appartiennent aux protistes. La classification en trois règnes proposée par Ernst Haeckel est devenue aujourd'hui obsolète. Elle proposait de réunir tous les organismes unicellulaires dans un groupe « fourre-tout », celui des « *Protista* » (Haeckel, 1866). Dans ce groupe figurait aussi bien les Monères (ou bactéries), les champignons, les éponges, que les algues ou encore les cyanobactéries. Les classifications suivantes des eucaryotes unicellulaires basées sur des critères simples comme les différents modes de nutrition, la morphologie ou encore la motilité ont duré jusqu'à la fin des années 1980, malgré l'accumulation d'informations pour réfuter de tels critères de classification (Caron *et al.*, 2012). Le dernier de ces schémas de classification (Figure 1) plaçait les eucaryotes unicellulaires dans le règne des Protistes comme un groupe évolutif transitoire entre les Monères d'une part et les règnes des Plantes, des Animaux et des Champignons d'autre part (Whittaker, 1969).

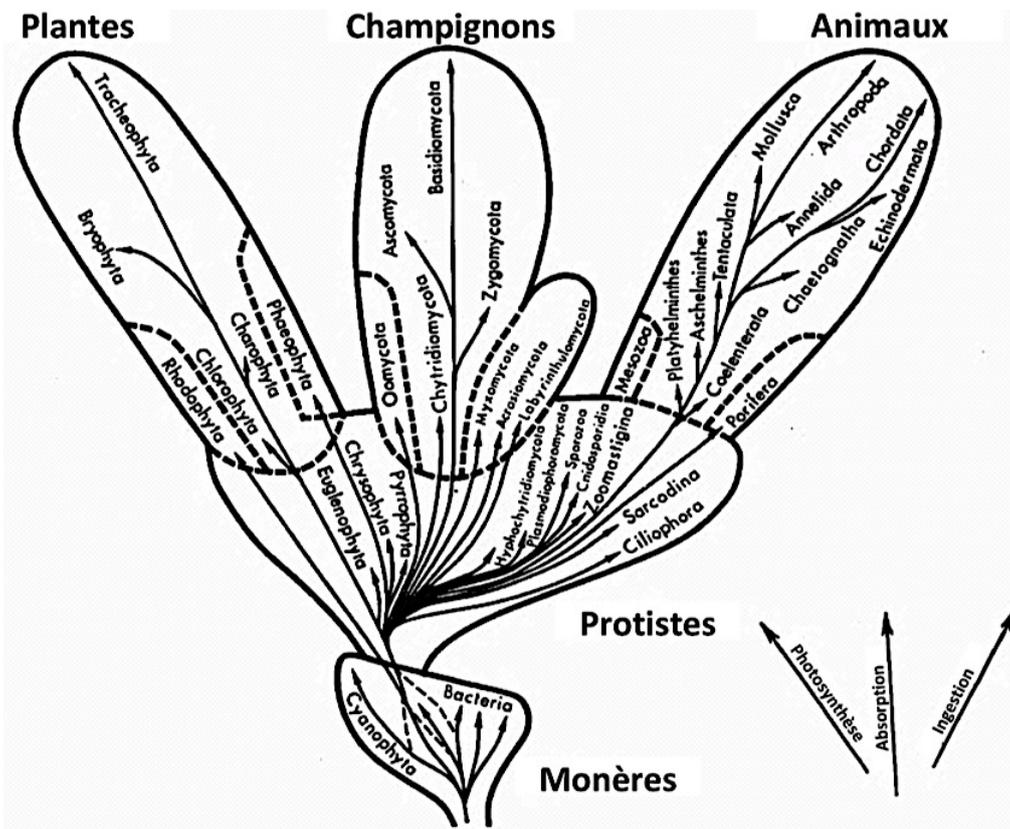


Figure 1. Classification traditionnelle du vivant avant l'arrivée des méthodes moléculaires et phylogénétiques (modifié d'après Andersen, 1998). Les bactéries et cyanobactéries sont regroupées parmi les Monères tandis que les Protistes représentent un groupe de transition entre les règnes des Monères, des Animaux, des Végétaux et des Champignons. La classification a été établie selon les différents modes nutritifs des organismes. Ainsi, les organismes effectuant la photosynthèse sont regroupés parmi les Plantes, ceux qui absorbent leurs nutriments sont placés chez les Champignons et ceux qui ingèrent leurs proies parmi les Animaux. Les ciliés (Ciliophora) sont décrits comme un groupe transitoire entre les Monères et les animaux dans cette classification.

La dichotomie Eucaryote/Procaryote ne s'est pas tout de suite imposée. Il a fallu attendre l'avènement des méthodes génétiques et biochimiques (dont le séquençage de l'ADN) et les avancées en microscopie, pour démontrer que les bactéries avaient bien des différences fondamentales non seulement au niveau de leur structure cellulaire, mais aussi de leur fonctionnement. Ces techniques ont également permis d'identifier vers le milieu des années 1970 un groupe inconnu d'êtres vivants : les Archées (Woese et Fox, 1977). Actuellement, les eucaryotes ne forment donc qu'un seul des trois domaines du vivant : Eucaryotes, Bactéries (=Eubacteria) et Archées (=Archaea). Les méthodes de classification modernes permettent donc désormais d'associer la classification traditionnelle aux techniques moléculaires et génétiques. Les protistes sont aujourd'hui considérés comme polyphylétiques, c'est-à-dire que les différentes lignées ne descendent pas d'un même ancêtre commun, bien que certaines lignées ont été démontrées comme étant monophylétiques (Cavalier-Smith, 2003 ; Taylor et Sanders, 2010 ; Adl *et al.*, 2012 ; Ruggiero *et al.*, 2015). En se basant sur la classification phylogénétique moderne des eucaryotes (Burki *et al.*, 2014), on distingue cinq

super-groupes ainsi que plusieurs lignées indépendantes dont la classification reste incertaine, dans lesquels sont classés tous les protistes, animaux, plantes et champignons (Figure 2) : (1) les Opisthocontes, (2) les Amoebozoaires, (3) les Excavates, (4) les SAR (Straménopiles, Alvélolata, Rhizaria) et (5) les Archéoplastidés.

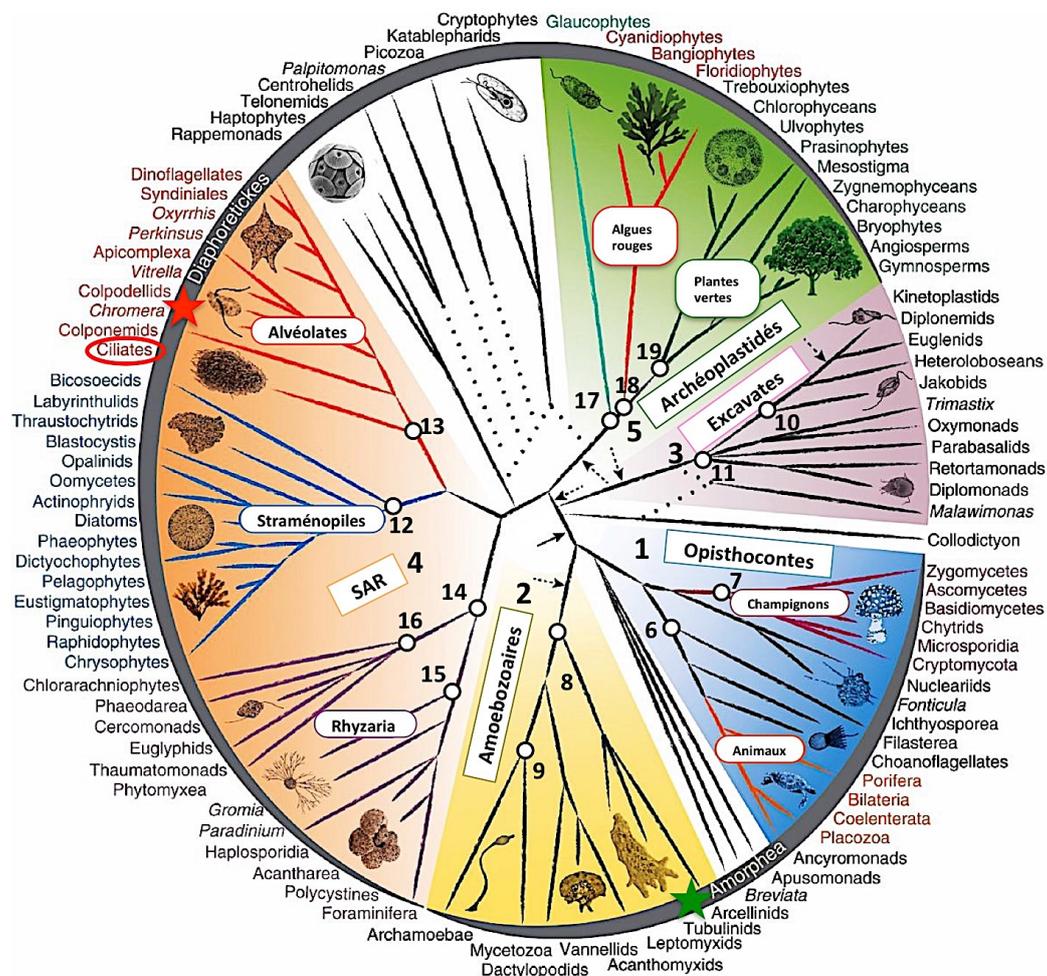


Figure 2. Classification des eucaryotes réalisée à partir d'un consensus de preuves phylogénétiques, de signatures génomiques rares et de caractéristiques morphologiques (modifié d'après Burki *et al.*, 2014). De nombreux groupes eucaryotes sont représentés, les principaux assemblages (cases colorées) sont numérotés et décrits dans le texte. Le modèle de branchement ne représente pas nécessairement les relations inférées entre les lignées. Les lignes pointillées dénotent des relations incertaines, y compris des positions conflictuelles. Les flèches indiquent les positions probables pour l'enracinement de l'arbre; la flèche pleine correspond à l'hypothèse la plus populaire (Amorphea-bikont rooting), les flèches brisées représentent les hypothèses alternatives. Le groupe des Amorphes est indiqué par une étoile verte tandis que celui des Bicontes, formés par les Diaphoretickes (étoile rouge) et les Excavates (3) est aujourd'hui obsolète.

## 1. Les Opisthocontes

Les Opisthocontes (1) et les Amoebozoaires (2) sont aujourd'hui réunis au sein du groupe des Amorphes (★) (Adl *et al.*, 2012), anciennement appelé Unicontes (Cavalier-Smith, 2002), avec trois lignées incertaines de protistes (Apusomonadidés, Ancyromonades, et Breviatea). Le super-groupe des Opisthocontes contient les animaux (Métazoaires) et les Eumycètes (ou champignon vrai) ainsi que plusieurs lignées de protistes hétérotrophes

(Figure 2). Il se divise en deux groupes : les Holozoaires (6) et les Holomycètes (7). Les animaux, regroupés au sein des Holozoaires, ont probablement émergé d'un assemblage paraphylétique de protistes, parmi lesquels figurent les Choanoflagellés. Tandis que, les champignons sont étroitement apparentés à deux autres genres de protistes : les Nucléariidés et les Cryptomycètes, (ou Rozellida) (Brown *et al.*, 2009 ; Liu *et al.*, 2009 ; Burki *et al.*, 2014). Ensemble, ils forment le groupe des Holomycètes.

## 2. Les Amoebozoaires

Le super-groupe des Amoebozoaires (2) comprend principalement des amibes hétérotrophes se déplaçant à l'aide de pseudopodes lobés. Il est séparé en deux groupes : les Lobosés (8) et les Conosés (9). Les amibes peuvent être nues ou protégées dans des tests (ou thèques), certaines sont des parasites sans mitochondries qui peuvent infester les animaux, dont l'homme (par exemple : *Entamoeba histolytica*), tandis que d'autres possèdent des cellules flagellées, ou bien même plusieurs noyaux. Ce super-groupe comprend également les myxomycètes cellulaires comme *Dictyostelium discoideum* et plasmodiaux comme *Trichia decipiens* (Figure 3).

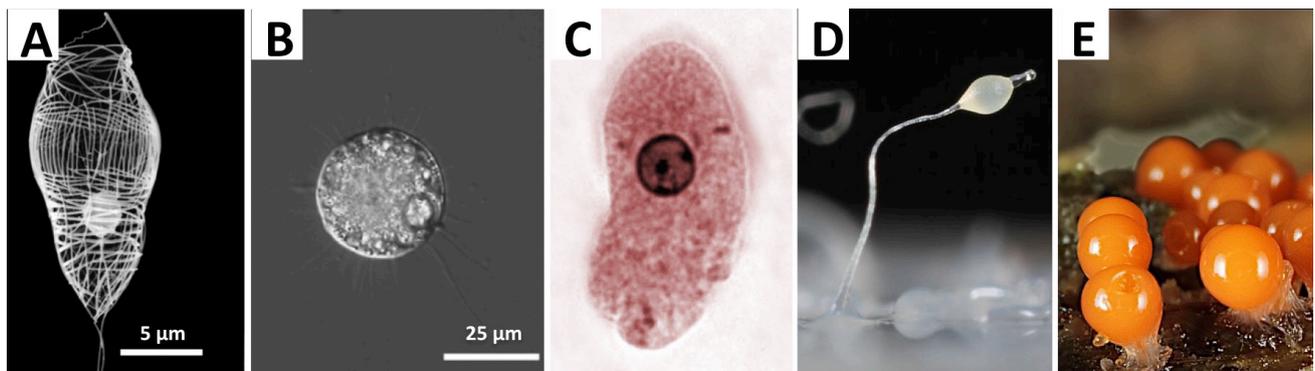


Figure 3. Différentes espèces de protistes appartenant aux Amorphes : (A) *Stephanoeca norrisii*, un Choanoflagellés (Marchant *et al.*, 1987) ; (B) *Nuclearia thermophila*, un Nucléariidés (Yoshida *et al.*, 2009) ; (C) *Entamoeba histolytica* (AJ Cann, <https://www.flickr.com>) ; (D) *Dictyostelium discoideum* (Usman Bashir, <https://commons.wikimedia.org>) ; *Trichia decipiens* (Oldrich Roucka, <http://www.naturephoto-cz.com>).

## 3. Les Excavates

Les Excavates (3) forment avec les Diaphoretickes (★) l'ancien groupe des Bicontes (Adl *et al.*, 2012). Ils rassemblent tous les organismes unicellulaires possédant deux flagelles, et pluricellulaires dont les gamètes mâles sont biflagellés. Les organismes sont très différents et possèdent des modes de vie variées (phagotrophie, osmotrophie, phototrophie). De plus, certains membres des Excavates, notamment les Discobés, sont apparentés aux Diaphoretickes. Les Diaphoretickes comprennent les Archéoplastidés, les SAR et d'autres

protistes de lignée incertaine. Le style de vie le plus marquant chez les Diaphoretickes est celui des photo-autotrophes photosynthétiques car c'est dans ce super-embranchement que se trouve la plupart des lignées photosynthétiques, toutes celles issues des endosymbioses primaires et la majorité de celles issues des endosymbioses secondaires et tertiaires.

Les Excavates sont séparés en deux groupes les Discobés (10) et les Métamonades (11), auxquels vient s'ajouter parfois celui des Malawimonas. Cependant, les analyses phylogénétiques ne supportent pas cette parenté (Hampl *et al.*, 2009 ; Zhao *et al.*, 2012 ; Burki *et al.*, 2014). Les membres sont réunis uniquement sur la base de caractéristiques morphologiques communes (cytosquelette et sillon servant à l'alimentation) (Simpson, 2003). Il semblerait que ce super-groupe comprenne les eucaryotes les plus primitifs, descendants directs de l'ancêtre des eucaryotes. Leur grande diversité génétique fait que leur classification est incertaine et les analyses phylogénétiques tendent de plus en plus à montrer que l'enracinement des eucaryotes se fait au sein de ce super groupe (Burki *et al.*, 2014). L'embranchement des Métamonades regroupe un ensemble de protistes anaérobies dont certains vivent libres dans les sédiments ou les eaux chargées en matières organiques et d'autres vivent en associations mutualistes ou parasitaires avec les animaux (Silar, 2016). Par exemple : *Trepomonas agilis*, *Hexamita salmonalis* et *H. truttae* peuvent vivre libres dans les sédiments mais sont également considérés comme des parasites que l'on retrouve dans l'intestin des amphibiens et des poissons. Du fait de leurs styles de vie, les mitochondries de ces organismes se sont transformées et sont devenues soit des hydrogénosomes soit des mitosomes (Figure 4). Les Métamonades ne sont affiliés ni aux amorphes ni aux diaphoretickes de par la morphologie et la biologie particulière de ces membres. À l'inverse des Métamonades, les Discobés sont pour leur part rattachés aux Diaphoretickes. Ce sont des micro-organismes biflagellés bactéricivores qui vivent dans les eaux douces ou marines. Ils peuvent nager librement ou être attachés à un substrat et peuvent également être protégés par une lorica, qui est un test (ou thèque) en forme de panier (Silar, 2016).

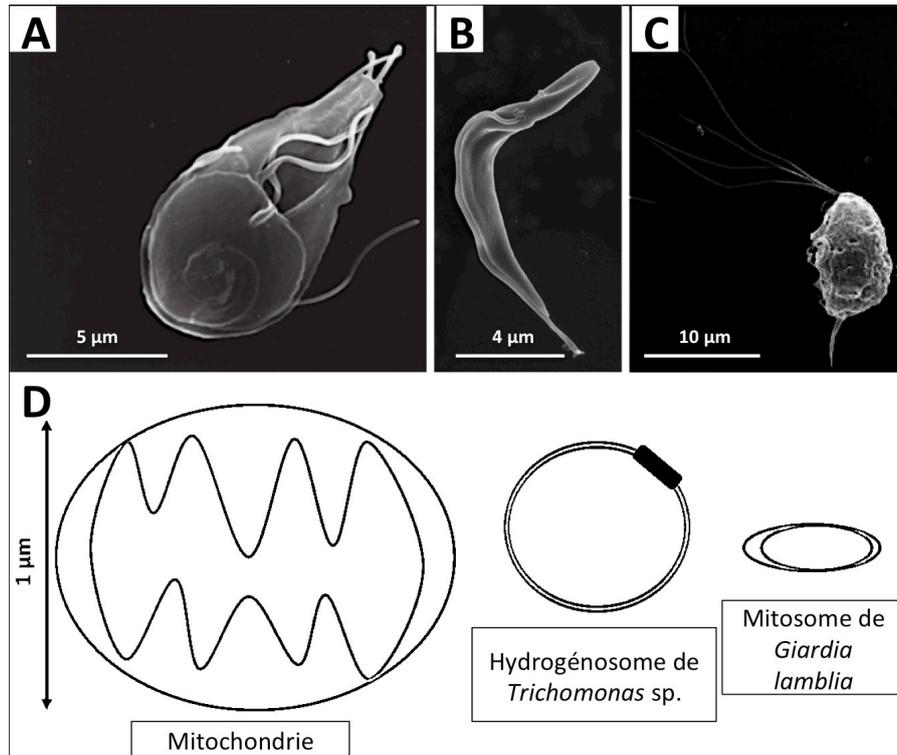
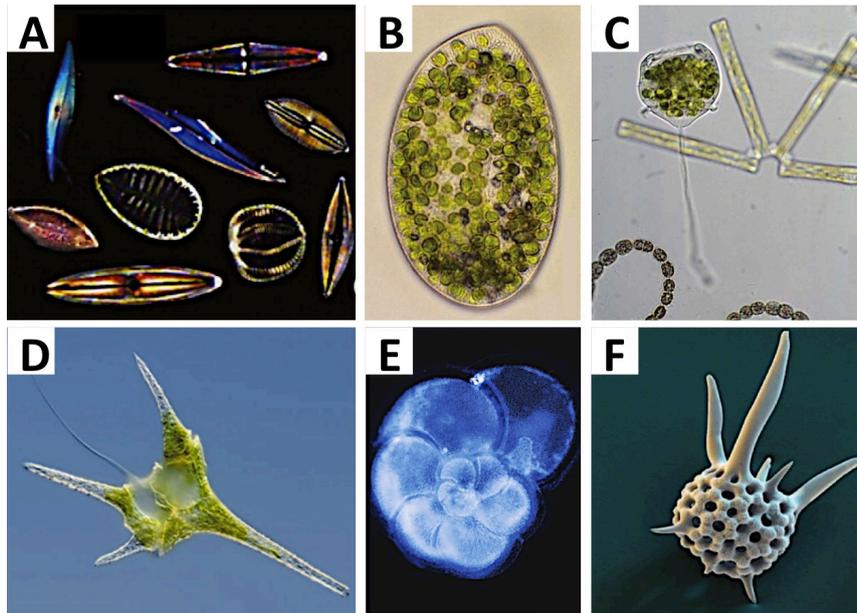


Figure 4. Certains protistes parasitaires appartenant aux Excavates : (A) *Giardia lamblia* est un parasite de l'intestin chez l'homme, il possède des mitosomes à la place des mitochondries (Castillo-Romero *et al.*, 2009). *Trypanosoma brucei*, (B) qui cause la maladie du sommeil via la pique de la mouche *Tse tse*, possède des mitochondries (Morga et Bastin, 2013) et *Trichomonas vaginalis* (C) des hydrogénosomes (Cheon *et al.*, 2013). (D) Comparaison structurelle entre une mitochondrie, un hydrogénosome et un mitosome. Les mitosomes sont le siège de l'assemblage des centres fer/soufre (Fe-S), une fonction aussi assurée par la mitochondrie ; cependant ils ne possèdent pas de matériel génétique à la différence de cette dernière. Les hydrogénosomes assurent la production d'ATP sans consommation d'oxygène mais avec excrétion d' $H_2$  (Schweikert, 2013).

#### 4. Les SAR (Straménopiles-Alvéolates-Rhizaires)

Le super-embranchement des Straménopiles (12), encore appelé Hétérocontes, forme avec les Alvéolates (13) et les Rhizaires (14) une lignée monophylétique connue sous le nom de SAR (Straménopiles + Alvéolates + Rhizaires). Ils regroupent de nombreux organismes uni- et pluricellulaires qui n'ont que peu de choses en commun (Figure 5). Les Straménopiles, au sein desquels figurent les Diatomées, sont unis sur la base de données phylogénétiques et sur leur relation endosymbiotique (secondaire) avec une algue rouge. Les Alvéolates sont des organismes exclusivement unicellulaires aux morphologies très variées, dont le caractère commun est d'avoir des alvéoles corticales. Les trois principales lignées des Alvéolates sont les Dinoflagellés, les Apicomplexés et les Ciliés (Ciliates). Au sein des Alvéolates, certains organismes ont aussi acquis un chloroplaste par endosymbiose secondaire (voire tertiaire) entre leur ancêtre phagotrophe et une algue à plastes rouges. Enfin, les Rhizaires sont un groupe d'organismes unicellulaires, dont les principales lignées sont les Cercozoaires (ou Cercozoa), et les Rétaires (ou Retaria) (Adl *et al.*, 2012).



**Figure 5.** Protistes appartenant au super-groupe SAR (Straménopiles-Alvéolates-Rhizaires) : (A) les Diatomées sont de petites algues unicellulaires photosynthétiques enfermées à l'intérieur d'une coque de silice appelée frustule (Gordon *et al.*, 2008). *Paramecium bursaria* (B) et *Pseudovorticella* sp. (C) sont des ciliés mixotrophes, ils phagocytent leurs proies mais sont également capables de photosynthèse grâce aux algues symbiotiques présentes dans leur cytoplasme (Esteban *et al.*, 2010). Les dinoflagellés (D) possèdent deux flagelles, ils appartiennent aux Alvéolates. Certains sont photosynthétiques, tandis que d'autres sont hétérotrophes ou encore mixotrophes ; Les Foraminifères (E) et Radiolaires (F) forment le groupe des Rétaires (Sibbald et Archibald, 2017).

## 5. Les Archéoplastidés (ou Archaeplastida)

Les Archéoplastidés (5) regroupent l'ensemble des organismes qui possèdent des plastes issus de l'endosymbiose cyanobactérienne (ou endosymbiose primaire). Le chloroplaste peut parfois être réduit mais il possède dans tous les cas de la chlorophylle *a*. Ce super-groupe se divise en trois lignées : les Glaucophytes (17) qui sont un petit groupe d'algues microscopiques d'eau douce énigmatiques dont les plastes ont retenu la couche de peptidoglycane de l'algue endosymbiotique primaire entre leurs deux membranes ; les Rhodophytes (ou algues rouges) (18) qui forment un groupe diversifié d'algues uni- et pluricellulaires (par exemple, le genre *Porphyra* communément utilisé dans la cuisine japonaise) ; et les Chloroplastidés (ou Viridiplantae = plantes vertes) (19), qui réunissent les Charophytes (ou Streptophyta parmi lesquels on retrouve les plantes terrestres) et les Chlorophytes (algues vertes) (Adl *et al.*, 2012).

## B. Caractérisation des protistes

Le terme protiste se réfère aux organismes unicellulaires eucaryotes capables d'exister en tant que cellules individuelles (Figure 6), bien que certaines espèces puissent former des colonies de plusieurs cellules comme les ciliés péritriches (Corliss, 2002 ; 2004 ; Caron *et al.*, 2012) et que d'autres espèces comme *Dyctiostelium discoideum* sont capables d'agrégation multicellulaires (Pawlowski et Burki, 2009). Les organismes appartenant aux protistes peuvent avoir des formes très diverses et leur taille est généralement comprise entre 2 et 2000  $\mu\text{m}$  (Corliss, 2002). Toutes les symétries sont représentées (bilatérales, radiales, etc.) et tous les modes de nutrition existent (sauf la chimiosynthèse). Malgré la grande diversité d'espèces, de morphologie et de comportements, certaines caractéristiques peuvent permettre de décrire et identifier les protistes (Corliss, 2002 ; Taylor et Sanders, 2010 ; Raven *et al.*, 2017) :

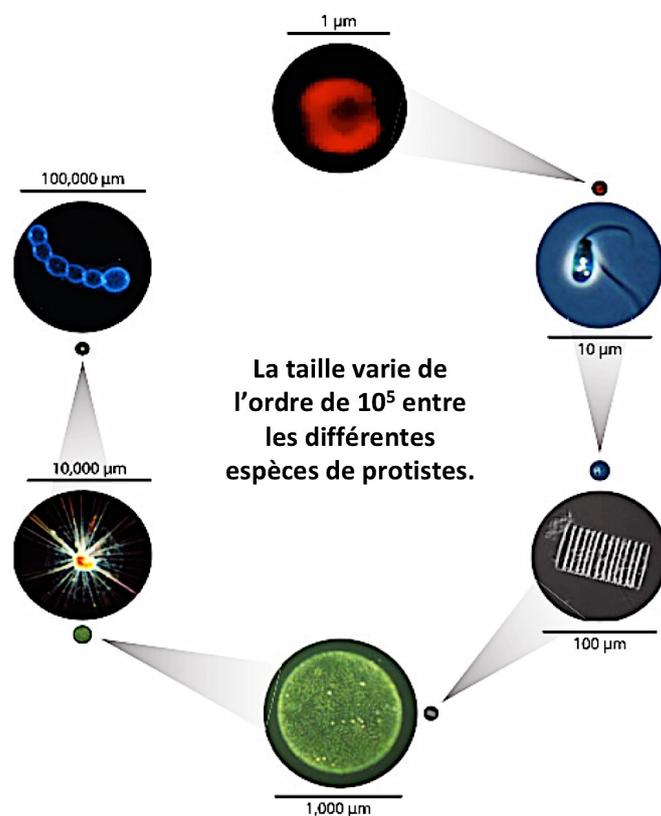


Figure 6. Gamme de taille des eucaryotes unicellulaires (Caron *et al.*, 2012) : le plus petit protiste connu (une espèce du genre *Ostreococcus*) mesure 1  $\mu\text{m}$ , alors que les plus grandes cellules non coloniales font plus d'1 cm de diamètre. Certaines colonies de radiolaires coloniaux forment des structures gélatineuses pouvant atteindre une largeur supérieure à 1 cm et atteindre plus d'1 m de longueur. Cependant, la plupart des espèces sont microscopiques. Certaines espèces sont présentées ici, dans le sens des aiguilles d'une montre : *Ostreococcus tauri* (image microscopique à épifluorescence montrant l'autofluorescence de la chlorophylle) ; *Bodo* sp., un flagellé hétérotrophe ; une petite colonie de diatomée du genre *Fragilariopsis* ; une colonie de l'haptophyte *Phaeocystis antarctica*, le foraminifère planctonique *Hastigerina pelagica* et un radiolaire colonial (les capsules centrales individuelles ont un diamètre de 100  $\mu\text{m}$  et sont trop petites pour être vues sur cette photographie).

## **1. L'enveloppe cellulaire**

L'enveloppe cellulaire peut être très variée chez les protistes (Corliss, 2002 ; Raven *et al.*, 2017). Les amibes par exemple ne possèdent que leur membrane plasmique. Chez tous les autres, un matériel extracellulaire se dépose à la surface de la membrane plasmique. Ce matériel forme parfois une paroi cellulaire résistante comme chez les diatomées et les foraminifères qui sécrètent des coques siliceuses appelées tests ou thèques (Corliss, 2002 ; Raven *et al.*, 2017).

## **2. Organites de locomotion**

Les protistes se déplacent grâce à divers mécanismes. Ils utilisent principalement un mouvement flagellaire ou pseudopodial. Beaucoup de protistes se propulsent dans l'eau à l'aide d'un ou plusieurs flagelles, alors que d'autres utilisent des rangées de cils, pour créer les courants d'eau nécessaires à leur alimentation ou à leur propulsion. D'autres encore comme les diatomées sécrètent un mucus qui leur permet de glisser sur les substrats (Corliss, 2002 ; Raven *et al.*, 2017).

## **3. Formation de cystes**

Beaucoup de protistes sont adaptés à des habitats où les conditions sont contraignantes voire toxiques pour les autres organismes. Ils peuvent former des cystes (ou kystes), formes cellulaires dormantes pourvues d'un revêtement externe plus ou moins résistant, à l'intérieur duquel le métabolisme cellulaire est ralenti et ainsi survivre aux conditions difficiles (Corliss, 2002 ; Raven *et al.*, 2017).

## **4. Nutrition**

Tous les modes de nutrition sont représentés, à l'exception de la chimioautotrophie, qui n'a encore été observée que chez les procaryotes (Corliss, 2002 ; Taylor et Sanders, 2010). Certains sont photosynthétiques, tandis que d'autres sont des hétérotrophes qui se procurent leur énergie à partir de molécules organiques synthétisées par d'autres organismes. Parmi les protistes hétérotrophes, ceux qui ingèrent des particules de nourriture sont des phagotrophes. La matière organique est stockée dans des vésicules intracellulaires appelées vacuoles alimentaires ou phagosomes. Les lysosomes fusionnent avec ces vacuoles et y introduisent des enzymes qui digèrent les particules alimentaires qui s'y trouvent. Les

molécules digérées sont absorbées à travers la membrane de la vacuole. Les osmotrophes sont des protistes ingérant la nourriture sous une forme soluble. Les mixotrophes sont à la fois autotrophes et hétérotrophes (Jones, 2000).

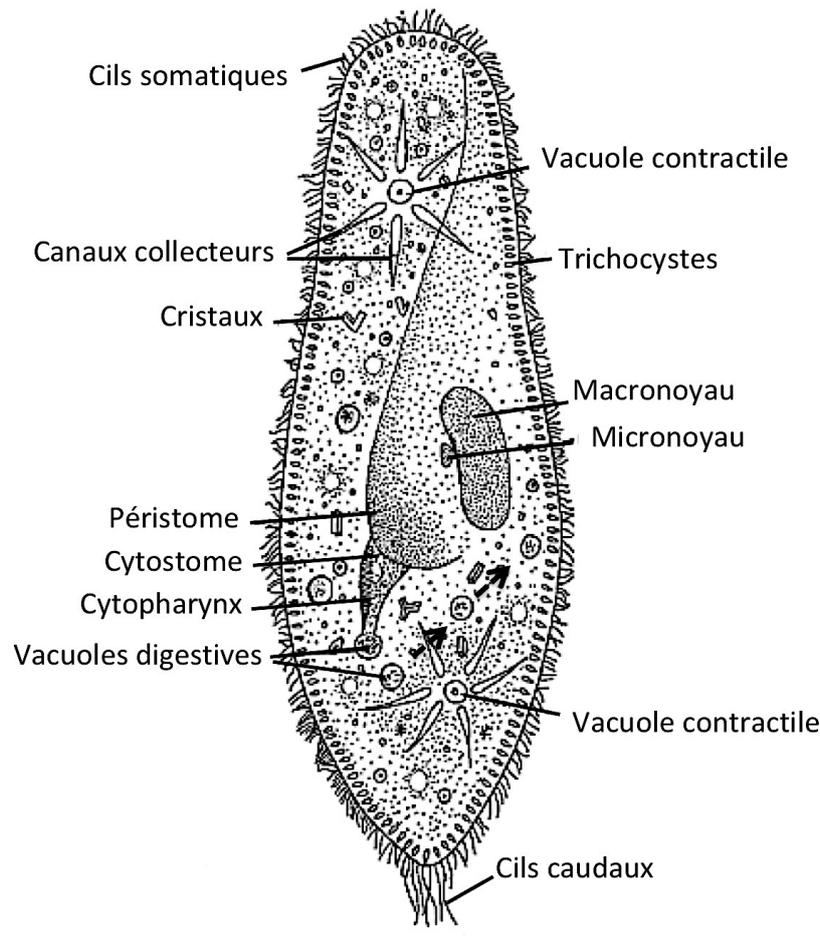
## 5. Reproduction

Les protistes se reproduisent typiquement par voie asexuée, bien que certains possèdent un stade obligatoire de reproduction sexuée et que d'autres se reproduisent sexuellement en cas de stress, comme lors de manque de nourriture (Corliss, 2002 ; Taylor et Sanders, 2010 ; Raven *et al.*, 2017). Lors de la reproduction asexuée, l'enveloppe nucléaire persiste souvent pendant la mitose et le fuseau mitotique se forme à l'intérieur du noyau. On parle alors de mitose « fermée ». Par la suite, la cellule va être scindée en deux, le plus souvent par scissiparité, elle se divise ainsi simplement en deux moitiés à peu près égales. Parfois la cellule fille est nettement plus petite que la cellule mère et grandit ensuite pour atteindre la taille adulte, on parle alors de bourgeonnement (Corliss, 2002 ; Raven *et al.*, 2017). Dans le cas de scission multiple, ou schizogonie, commune chez certains protistes, la division est précédée par plusieurs divisions nucléaires et plusieurs individus sont produits presque simultanément (Corliss, 2002 ; Raven *et al.*, 2017). La reproduction sexuée existe également chez de nombreuses formes de protistes (Corliss, 2002 ; Raven *et al.*, 2017). Cependant pour une seule cellule, les coûts de la méiose sont élevés en raison du temps et des efforts investis (Speijer *et al.*, 2015). Chez les protistes, la reproduction sexuée est donc liée à la survie lors des périodes difficiles (Speijer *et al.*, 2015). Dans des conditions optimales, les organismes relativement simples avec des temps de génération courts et un grand nombre de descendants sont avantagés, ce qui peut être réalisé de manière plus efficace par une reproduction asexuée (Speijer *et al.*, 2015). Ainsi, la reproduction asexuée peut durer pendant une période prolongée. Cependant, lorsque des conditions défavorables ou des contraintes internes sont rencontrées, le sexe est induit. Chez les diatomées par exemple, la construction de parois cellulaires siliceuses (frustules) les rend plus petites après chaque division mitotique. Ceci induit la méiose, la fusion des gamètes et la restauration de la taille de la cellule d'origine grâce à la formation du zygote (Speijer *et al.*, 2015). Chez les parasites apicomplexés, les stades sexuels sont obligatoires et peuvent être induits en culture *in vitro*. Le stade adulte doit se produire pour compléter le cycle biologique (Speijer *et al.*, 2015).

## 6. Mise en perspective : caractérisation des protistes ciliés

Les ciliés sont répartis en deux sous-classes basées sur des critères morphologiques et génétiques. Les Postciliodesmatophora possèdent un complexe de microtubules reliés entre eux par des bras (postciliodesmata) permettant la contraction de la cellule, tandis que chez les Intramacronucleata, la division du macronoyau se fait grâce à des microtubules intramacronucléaires (Lynn, 2017). Les ciliés sont sans doute l'un des groupes de protistes les plus faciles à identifier d'un point de vue morphologique (Figure 7). Ils sont facilement reconnaissables grâce à la présence de files ou de rangées de cils, appelées cinéties, sur la surface cellulaire (Lynn, 2017). La plupart des protistes ciliés ont aussi un cytostome qui est l'équivalent de la bouche chez les métazoaires autour duquel sont disposés des cils oraux (Lynn, 2017). Les ciliés possèdent également deux noyaux (dimorphisme nucléaire) : le macronoyau relativement plus grand est physiologiquement actif ; il est considéré comme étant ampliploïde, c'est-à-dire qu'il contient de nombreuses copies amplifiées du génome du cilié (Lynn, 2008). Le micronoyau diploïde, relativement plus petit, sert de noyau germinal. Les ciliés ont généralement un macronoyau et de un à plusieurs micronoyaux. Le macronoyau contrôle les fonctions métaboliques et le développement de la cellule, synthétisant activement l'ARNm et l'ARNr, tandis que les micronoyaux, dépositaires de l'ADN génomique, sont impliqués dans la recombinaison génétique et la reproduction sexuée (Lynn, 2017). Ces caractéristiques générales ne se trouvent ensemble dans aucun autre groupe de protistes et d'eucaryotes. Il y a plus de 1100 genres de ciliés et plus de 8000 espèces incluses dans ces genres (Lynn, 2008), bien que certains prétendent que cette diversité peut représenter seulement 10% de la diversité réelle des espèces (Foissner, 2008). Les ciliés comprennent certains des plus grands organismes unicellulaires libres (le *Stentor* peut atteindre 2 millimètres de longueur) et comprennent une grande variété de formes. En dehors des noyaux, un cilié contient plusieurs vacuoles qui peuvent renfermer des aliments, des déchets ou diverses structures. Les vacuoles digestives se forment à l'extrémité du cytopharynx lorsque les particules alimentaires sont ingérées, puis circulent dans la cellule. Les déchets qui restent dans ces vacuoles sont évacués par un point particulier de la membrane cellulaire connu sous le nom de cytoprocte (Lynn, 2017). Les ciliés possèdent également un système d'osmorégulation de la cellule grâce aux vacuoles contractiles qui peuvent prendre différentes formes en fonction des espèces. Dans certains cas, on retrouve une seule vacuole contractile, et dans d'autres, il peut y en avoir plusieurs. La forme, le

nombre et la disposition des vacuoles contractiles sont des critères d'identification qui permettent de distinguer différents groupes de ciliés.



**Figure 7.** Structure générale d'une paramecie, l'une des espèces de protistes ciliés les plus connus (modifié d'après Dragesco, 1980). La surface de la cellule est recouverte de cils somatiques tandis que les cils caudaux se trouvent sur l'une des extrémités du cilié. Les cils sont les principaux appareils locomoteurs de la cellule et peuvent servir aussi à l'alimentation. Lors de l'ingestion, les aliments passent à travers le cytotome qui constitue la bouche du cilié, puis par le cytopharynx, avant d'être finalement enfermés dans des vacuoles digestives. Les aliments sont par la suite digérés dans les vacuoles digestives, qui circulent à l'intérieur du cytoplasme (flèches noires). On retrouve également un macronoyau et un ou plusieurs micronoyaux, ainsi que des vacuoles contractiles en forme d'étoiles à l'intérieur du cytoplasme. Les vacuoles contractiles présentent un emplacement fixe et une activité rythmique : elles se remplissent d'eau puis la déversent à l'extérieur par un pore. Parfois des canaux collecteurs entourent les vacuoles contractiles afin de puiser l'eau dans le cytoplasme environnant. La vacuole contractile est avant tout une pompe osmotique mais il n'est pas impossible qu'elle puisse aussi jouer un rôle excréteur. On observe également des corps de Golgi (ou dictyosomes), des lysosomes (appareil de protéolyse), des vacuoles lipidiques, des grains de glycogène, des concrétions calcaires, et divers cristaux. Diverses structures membranaires appelées extrusomes peuvent être également présentes à la surface de la cellule. Ces corps extrusifs sont de divers types tels que: les trichocystes, les haptocystes, les toxicystes et les mucocystes.

La cellule est protégée par une pellicule, ou cortex, séparée du cytoplasme de la cellule par une couche de microfilaments (Figure 8). La membrane cellulaire, encore appelée plasmalemme (Lynn, 2008) délimite la cellule et repose sur des sacs liés à la membrane, appelés alvéoles, auxquels est associée une famille de protéines corticales, les alvéolines (Lynn, 2017). Les alvéoles à leur tour sont sous-tendues par une couche fibreuse d'épaisseur variable appelée épiplasma, dont les protéines constitutives, les épiplasmines, forment un

réseau squelettique complexe (Lynn, 2017). La membrane plasmique, les alvéoles et l'épiplasma forment la pellicule du cortex. Une variété d'autres organites se trouve dans le cortex ou lié à celui-ci. La majorité des mitochondries à crêtes tubulaires se trouvent dans les crêtes corticales entre les cinéties, où elles sont ancrées en position par des connexions aux microtubules corticaux et à l'épiplasma. Certains protistes ciliés possèdent également des organites liés au cortex, appelés extrusomes, qui aident à la capture des proies, à la construction de la paroi des cystes ou à d'autres fonctions encore inconnues (Lynn, 2008 ; 2017). Le type et la distribution des extrusomes, la présence de stolon, de lorica ou d'autres structures d'attache, et types de structures d'enkystement peuvent également servir à l'identification des différents groupes de ciliés (Lynn, 2008). Tous les cils sont issus des cinétosomes ou granules basaux ; ils ne sont pas isolés mais réunis les uns aux autres par le cinétodesme (ensemble fibrillaire à orientation antéro-postérieure) (Dragesco, 1980). Les cils sont habituellement disposés en rangées, appelés cinéties, sur la pellicule, mais ils peuvent fusionner près du cytostome (bouche) de certaines espèces pour former des membranelles ou des membranes adorales (Dragesco, 1980 ; Lynn, 2017). Ailleurs sur la pellicule, les cils peuvent former des touffes appelées cirri. Le cortex (1-2  $\mu\text{m}$  extérieurs de la cellule) peut être divisé en deux régions principales : la région somatique et la région orale (Figure 8). La région somatique, composée d'un système de support « squelettique » joue un rôle dans la locomotion, la détection de l'environnement, la fixation aux surfaces et la sécrétion de revêtements protecteurs. La région orale permet la détection, l'acquisition et l'ingestion de nutriments (Lynn, 2017). Chaque région est formée par une structure complexe de cinétosomes, de microfilaments, de microtubules et d'autres fibres qui sont collectivement connus sous le nom d'infaciliature. Les infaciliatures somatiques et orales sont caractéristiques de divers groupes de ciliés (Lynn et Small, 2002 ; Lynn, 2008). L'argyrome ou « Silverline system » est un réseau superficiel, colorable par imprégnation argentique, dont la signification exacte reste controversée, mais dont la disposition présente une valeur taxonomique (Dragesco, 1980).

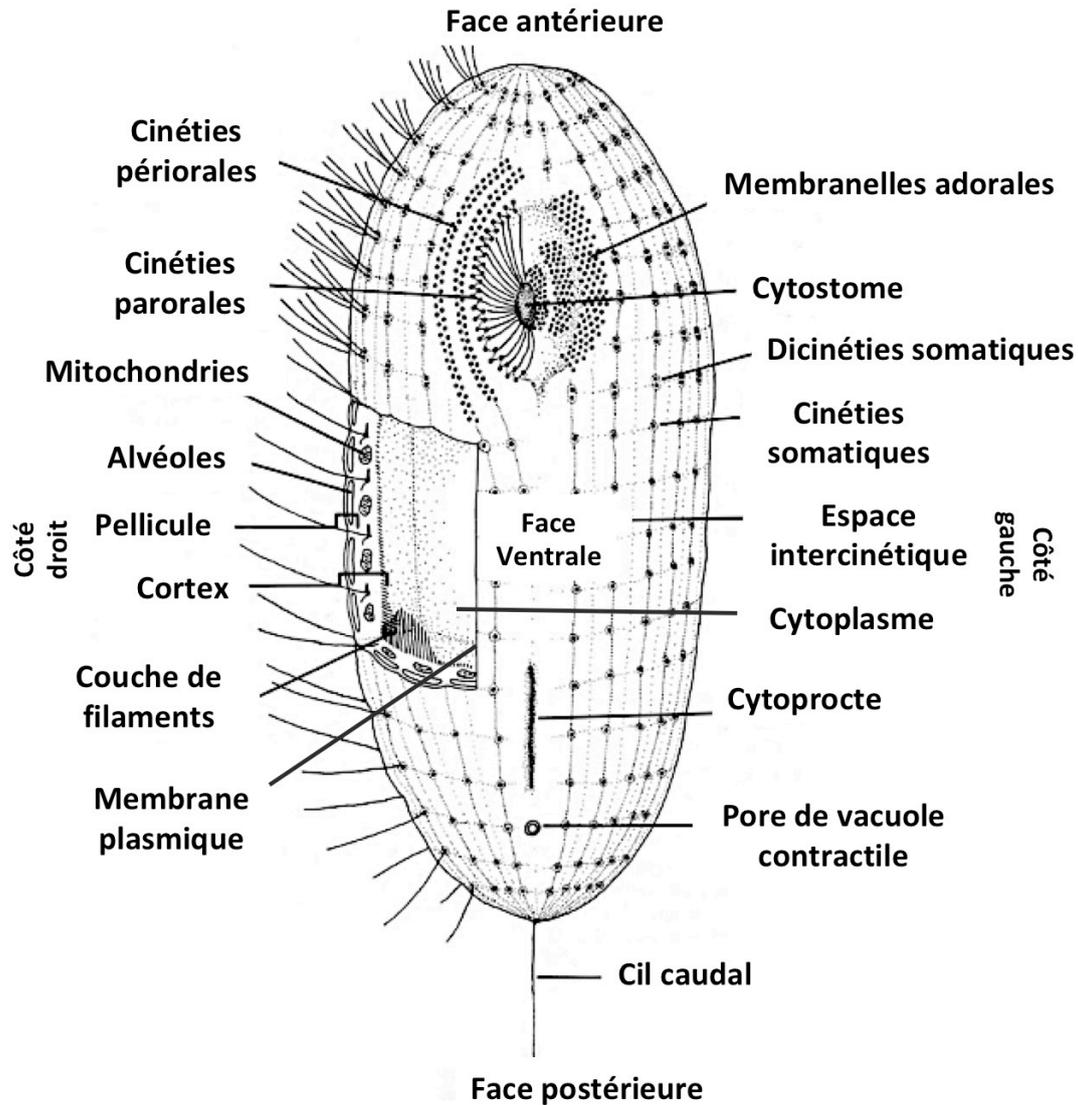
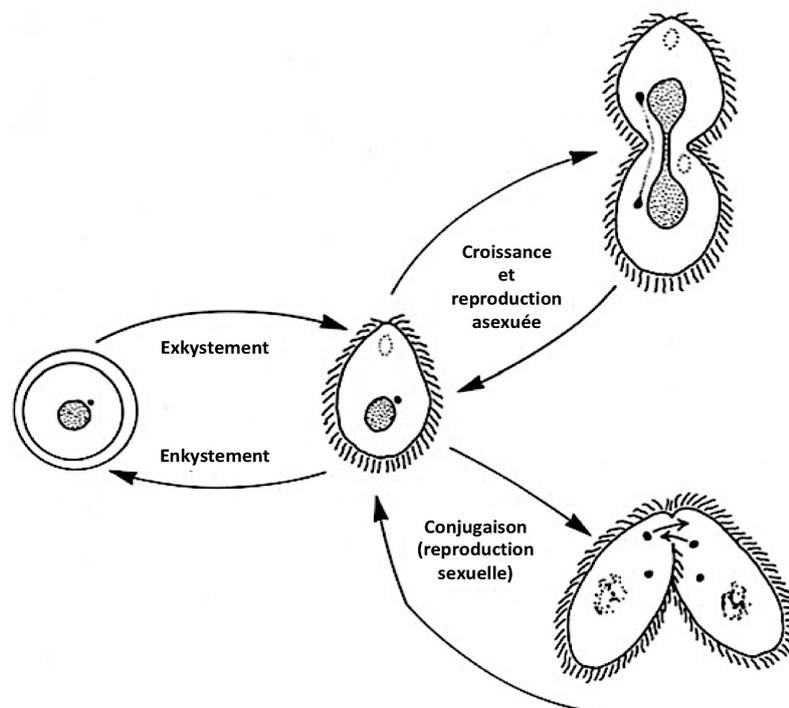


Figure 8. Schéma général de la surface ventrale d'un cilié (modifié d'après Lynn, 2017). Le cortex est formé d'une pellicule de sacs alvéolaires, de mitochondries et d'un ensemble de microtubules, de fibres et de filaments. Le cortex d'un cilié peut être divisé en régions somatiques et orales. Les cils locomoteurs de la région somatique sont alignés sur la pellicule en files appelées cinéties. Ces cils peuvent être seuls ou réunis par paires (issus de deux cinétosomes). Souvent, un cil caudal plus long est porté postérieurement. La région orale peut être bordée par une ciliature périorale qui provient de la spécialisation de certaines cinéties somatiques. Dans cet exemple, il y a deux cinéties parorales à droite du cytostome et trois membranelles adorales à gauche du cytostome. Les cils de ces complexes n'ont pas été illustrés. Les aliments sont ingérés par le cytostome et les déchets sont évacués par le cytoprocte.

Généralement, les ciliés se reproduisent asexuellement par fission binaire transverse, également appelée fission homothétogène (Lynn, 2008 ; 2017) : les micronoyaux subissent la mitose, alors que dans la plupart des ciliés, le macronoyau se sépare simplement en deux (Figure 9). La division nucléaire est fermée, les membranes nucléaires des macro et des micronoyaux restent intactes tandis que l'appareil mitotique sépare l'ADN. Cependant chez les ciliés Hétérotriches qui sont caractérisés par des cils de tailles différentes, la plupart des microtubules mitotiques sont externes à la membrane macronucléaire. Cette caractéristique sert de critère d'identification pour cette classe. Le plan de fission se produit sur l'axe

longitudinal des cinéties et du corps. Dans de nombreux taxons, la fission binaire peut être modifiée de sorte qu'une division inégale se produise. Les ciliés se reproduisent également sexuellement (Figure 9), grâce à un processus connu sous le nom de conjugaison (Speijer *et al.*, 2015). La conjugaison est souvent induite par le manque de nourriture (Lynn, 2017). Deux ciliés de types d'accouplement opposés se rapprochent et forment un pont cytoplasmique entre les deux cellules ; les micronoyaux se divisent par méiose, les macronoyaux se désintègrent et les cellules conjuguées échangent des micronoyaux haploïdes sur la connexion cytoplasmique (Corliss, 2002 ; Lynn et Small, 2002 ; Lynn, 2008). Ils se séparent ensuite, forment de nouveaux macronoyaux à partir de leurs micronoyaux et se divisent. Un nouvel organisme est ainsi créé à partir du matériel génétique combiné des parents. Après la conjugaison, chaque partenaire cilié a acquis un nouveau matériel génétique et se divise pour donner naissance à une progéniture avec une nouvelle combinaison de gènes (Lynn et Small, 2002). Ceci est essentiel à la survie des lignées de ciliés, la plupart des ciliés ne peuvent pas se reproduire indéfiniment par fission asexuée et finissent par mourir si la conjugaison est interdite.



**Figure 9.** Schéma général du cycle de vie d'un cilié (modifié d'après Lynn, 2017). En présence de nutriments, les cellules se développent et se reproduisent par fission binaire pour augmenter la taille de la population. Quand la nourriture devient limitée, la famine initie le processus de reproduction sexuelle chez de nombreuses espèces. Les ciliés entrent en conjugaison lorsqu'ils rencontrent des types d'accouplement complémentaires. Si aucun partenaire d'accouplement n'est disponible, l'autogamie (autofécondation) peut se produire. Si les éléments nutritifs ne sont pas disponibles avant ou après la conjugaison ou l'autogamie, de nombreuses espèces s'enkystent en sécrétant un mur protecteur sur elles-mêmes. Les kystes au repos peuvent ou non résister à la dessiccation et persister durant des mois ou des années en attendant que les conditions redeviennent appropriées au développement de la cellule.

## C. Rôles et fonctions écologiques des protistes

### 1. Rôles des protistes dans la boucle microbienne et dans le réseau trophique marin

À la base du réseau trophique marin se trouve un réseau microbien constitué de micro-algues unicellulaires, d'archées, de bactéries, de protozoaires et de virus, connu sous le nom de boucle microbienne (Azam *et al.*, 1983 ; Pomeroy, 2007). La boucle microbienne est le siège de processus de transformation constants entre les formes organiques, inorganiques, particulaires et dissoutes de la matière (Figure 10). La matière organique dissoute (MOD) et la matière organique particulaire (MOP) jouent un rôle primordial dans le réseau trophique microbien. Elles constituent les supports nutritifs pour le développement du réseau microbien et proviennent, en partie, de l'exsudation phytoplanctonique et de l'activité de broutage par le zooplancton. La MOD est une source de substrat nécessaire pour la production bactérienne. Les bactéries et les algues unicellulaires servent de sources de nourriture aux protistes hétérotrophes qui serviront eux-mêmes de proies aux organismes du zooplancton, permettant ainsi le transfert de la biomasse microbienne au niveau trophique supérieur (Sherr et Sherr, 2002). Les protistes ont une répartition très large, on retrouve les mêmes espèces occupant des habitats ou des niches similaires dans le monde entier. Tous les modes de nutrition (phototrophie, hétérotrophie, mixotrophie, osmotrophie) sont représentés et il existe un chevauchement considérable entre ces différents modes de nutrition (Corliss, 2002). Dans écosystèmes marins, la majorité des protistes appartiennent soit au phytoplancton autotrophe, qui utilise la photosynthèse pour fixer le CO<sub>2</sub> et produire de l'oxygène, soit au micro-zooplancton hétérotrophe qui phagocyte des bactéries, du phytoplancton et des particules minérales et/ou organiques en suspension (Fasham *et al.*, 1990 ; Baretta *et al.*, 1995). Certains de ces protistes hétérotrophes sont également capables d'effectuer la photosynthèse, ce sont des mixotrophes. Il est clair que le rôle des protistes dans la régulation des écosystèmes provient de leur diversité tant dans leurs modes d'alimentation, que leurs tailles, leurs formes ou encore leur répartition (Corliss, 2002).

Les protistes photosynthétiques et notamment les algues unicellulaires possèdent des pigments chlorophylliens à l'intérieur de leurs plastes. Avec les cyanobactéries et les algues, les protistes sont à l'origine d'environ 40 % de la photosynthèse globale (fixation du carbone et production d'oxygène) sur Terre et près de 100 % de la production primaire des systèmes

marins (Andersen, 1998). Les protistes hétérotrophes, particulièrement représentés par les flagellés et les ciliés, sont les consommateurs les plus importants de bactéries dans les écosystèmes aquatiques et terrestres et jouent donc des fonctions majeures dans le cycle du carbone organique et des nutriments (Foissner, 1987 ; Finlay *et al.*, 1998 ; Wetzel, 2001a). Les ciliés sont les phagotrophes les plus abondants de la biosphère (Finlay *et al.*, 1998). Ils consomment non seulement des populations bactériennes mais aussi des micro-algues et d'autres protistes. Certains consomment même des débris particuliers, comme les matières fécales de métazoaires (Silver *et al.*, 1984 ; Corliss, 2002). Les flagellés, généralement plus petits mais beaucoup plus abondants que les ciliés et souvent mixotrophes, occupent à la fois des niches planctoniques et benthiques et se nourrissent d'autres micro-organismes tout en fixant le carbone par photosynthèse. La consommation du phytoplancton et des bactéries par les protistes phagotrophes produit des déchets sous forme de matières organiques dissoutes et particulières, et de nutriments inorganiques dissous comme le fer, l'ammonium et le phosphate (Sherr et Sherr, 2002). Ces déchets vont servir par la suite de substrats pour la croissance de la génération suivante de bactéries et d'algues unicellulaires (Sherr et Sherr, 2002). Les flagellés et les ciliés (moins souvent les amibes) sont donc à la fois les principaux décomposeurs et les médiateurs du recyclage des éléments nutritifs dans les écosystèmes (Wetzel, 2001a ; 2001b ; Corliss, 2002).

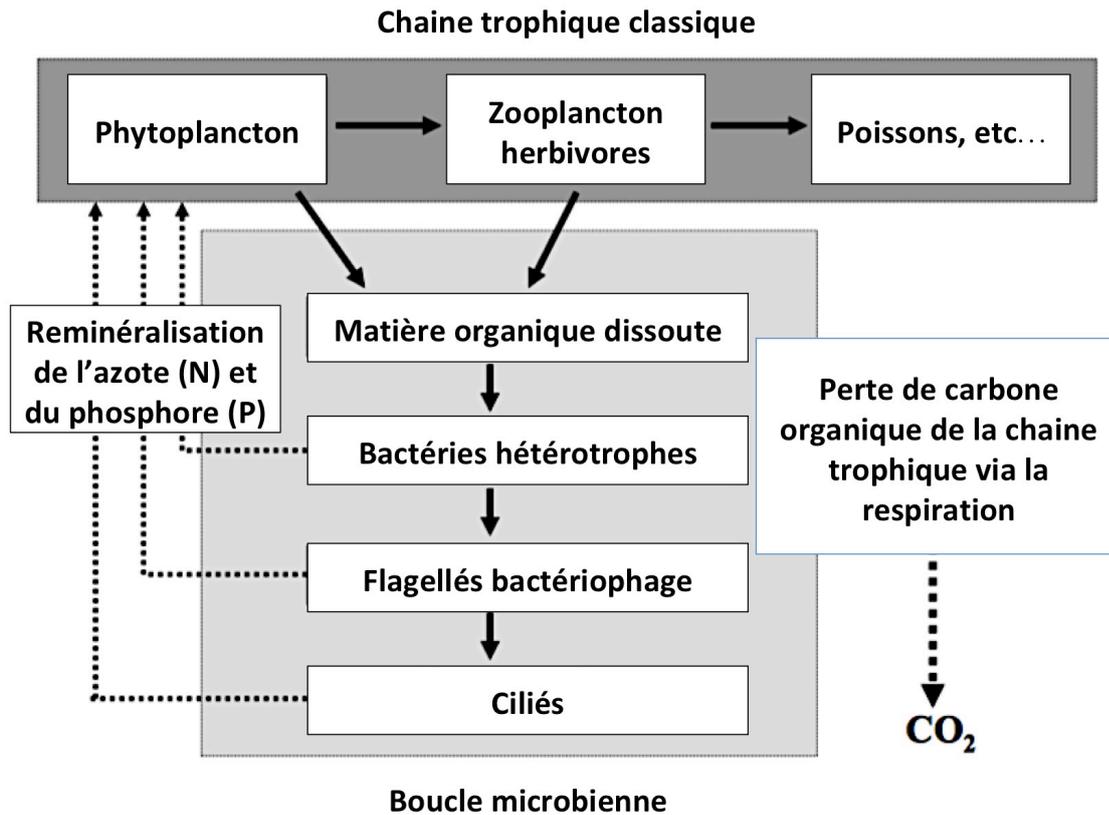


Figure 10. Schéma simplifié de la chaîne trophique marine classique associée à la boucle microbienne (modifié d'après Sherr et Sherr, 2008). La boucle microbienne permet à travers les bactéries hétérotrophes de reminéraliser la matière organique dissoute. Ces bactéries vont servir de source de nourriture pour les protistes hétérotrophes et mixotrophes représentés par les ciliés et les flagellés. Les ciliés consomment aussi bien des bactéries, que des algues unicellulaires ou encore des flagellés. Ils seront eux-mêmes ingérés par d'autres organismes du zooplancton qui serviront ensuite de nourriture pour les maillons trophiques supérieurs (poissons, mammifères, oiseaux, etc...). Les déchets produits par les protistes hétérotrophes serviront ensuite de substrat pour la croissance des bactéries et des algues unicellulaires. De cette façon, certains nutriments comme l'azote, et le phosphore sont également transférés aux niveaux trophiques supérieurs.

En plus d'être activement impliqués dans les réseaux trophiques marins, les protistes affectent la santé et même la survie d'une multiplicité d'organismes comprenant, en fin de compte, les mammifères carnivores et herbivores (y compris les humains) au sommet de la chaîne alimentaire (Corliss, 2002). Outre les écosystèmes marins et lacustres, de nombreux systèmes bénéficient également d'un contrôle des populations bactériennes par les protistes, tels que les centres de traitement et d'évacuation des eaux usées, les systèmes aquacoles et les sols dans le monde entier (Foissner, 1994 ; Sherr et Sherr, 1994 ; Foissner et Berger, 1996 ; Andersen, 1998 ; Sherr et Sherr, 2002). Les rhizopodes, foraminifères et amibes à thèques sont également impliqués dans les cycles biogéochimiques des écosystèmes terrestres, lacustres et marins (Foissner, 1987 ; Arndt, 1993 ; Ekelund et Rønn, 1994 ; Finlay *et al.*, 2001 ; Smith et Coupe, 2002 ; Anderson, 2005), mais souvent de façon moins bien comprise que les ciliés et les flagellés. Certains protistes sont des espèces invasives causant souvent une perte significative de biodiversité parmi les organismes indigènes présents dans

l'environnement (Corliss, 2002). Les protistes sont également importants d'un point de vue économique. Leurs implications dans l'alimentation et dans les produits industriels et médicaux sont nombreuses. En aquaculture, les poissons et les crustacés sont régulièrement nourris par du phytoplancton. Dans l'industrie, les diatomites, des roches provenant de la fossilisation des diatomées, sont les bases abrasives de nombreux composés de lavage et de nettoyage, y compris le dentifrice (Lembi et Waaland, 1988 ; Andersen, 1996 ; 1998). La craie pour tableau est également composée principalement de minuscules coquilles de foraminifères, extraites directement des dépôts naturels.

## **2. Les associations symbiotiques chez les protistes : mutualisme, commensalisme, parasitisme**

Il existe des espèces de protistes symbiotiques (bénignes ou pathogènes) chez quasiment tous les phyla. Certaines espèces de protistes sont des parasites, on en retrouve chez les différentes classes d'invertébrés, de vertébrés et même chez les plantes. Ces espèces pathogènes provoquent des pertes significatives de rendement dans les fermes d'élevage d'animaux, les exploitations agricoles ou encore les fermes aquacoles (Corliss, 2002). En plus des protistes parasites, certaines espèces de protistes commensaux dont principalement des ciliés anaérobies, sont également connues pour habiter le tractus intestinal des animaux comme les insectes, les amphibiens et les ruminants (Germond et Nakajima, 2016). Les ruminants en particulier possèdent des symbiotes archées, bactériens et protozoaires obligatoires parmi lesquels les ciliés anaérobies représentent environ 40 % de la biomasse totale du rumen (Germond et Nakajima, 2016). Dans le tractus intestinal, les ciliés ingèrent des bactéries et des fragments de petites plantes. Ils digèrent l'amidon et les protéines dans leurs vacuoles alimentaires et libèrent des acides gras volatils, de l'ammoniac, de l'hydrogène, des acides aminés et des sucres (Germond et Nakajima, 2016). En retour, ces produits chimiques peuvent être bénéfiques pour divers types de bactéries hétérotrophes extracellulaires (bactéries fixant l'azote ou dégradant la cellulose) et archées méthanogènes (Germond et Nakajima, 2016). C'est notamment le cas chez les ciliés anaérobies *Dasytricha ruminantium* et *Entodinium* spp. vivant dans le rumen des mouton qui peuvent développer des associations endosymbiotiques avec des archées méthanogènes (Finlay *et al.*, 1994). Les algues photosynthétiques symbiotiques sont également très répandues chez d'autres organismes. Elles peuvent être associées à d'autres protistes (Esteban *et al.*, 2010 ; Nowack et

Melkonian, 2010), ainsi qu'à divers groupes d'animaux invertébrés appartenant aux Cnidaires.

Par ailleurs, certains protistes peuvent eux-mêmes abriter des ecto- ou des endosymbiotes, des virus, des bactéries et/ou d'autres protistes, voire des micro-métazoaires (Corliss, 2002). Parmi les relations les plus fascinantes que l'on peut trouver, on peut citer celles des symbioses chimiosynthétiques qui permettent à des organismes invertébrés et à certains protistes ciliés associés à des bactéries chimioautotrophes de vivre dans des conditions toxiques pour la majorité des autres organismes (Dubilier *et al.*, 2008). Le terme « symbiose » a été introduit à la fin des années 1870 par Anton de Bary et Bernard Frank lors de leurs travaux respectifs portant sur les lichens (De Bary, 1879) et les mycorhizes (Frank, 1885). Du grec, sym « avec » et biosis « vivant », la symbiose est définie comme une association à long terme entre deux ou plusieurs organismes d'espèces différentes qui est intégrée au niveau comportemental, métabolique et/ou génétique (Moya *et al.*, 2008). Les associations symbiotiques sont connues pour avoir joué un rôle important dans le processus évolutif des organismes (Margulis et Fester, 1991 ; Rosati, 2004). Selon le niveau de dépendance vis-à-vis de l'hôte, la symbiose peut être obligatoire ou facultative (Moya *et al.*, 2008). Le concept de symbiose ainsi défini par de Bary et Frank ne distingue pas les interactions bénéfiques (mutualisme) ou au contraire néfastes (parasitisme) que peuvent générer ce genre d'association (Cavanaugh *et al.*, 2006). Ainsi le terme « symbiose » sera utilisé dans ce document au sens « mutualiste » du terme. C'est-à-dire une association où chacun des protagonistes tire un bénéfice à coexister l'un avec l'autre. Le mutualisme, le parasitisme ou encore le commensalisme sont basés sur la notion de valeur sélective ou de « fitness » en anglais. La valeur sélective se décrit comme étant le succès ou la chance qu'a un organisme de se reproduire et que ses descendants atteignent eux-même la maturité sexuelle. Ces interactions entre organismes vont avoir un impact positif ou négatif sur ce succès reproductif et c'est sur cette base que sont décrits ces termes (Mushegian et Ebert, 2016 ; Duperron, 2017). De ce fait, le parasitisme est une association où l'un des partenaires (généralement le symbiote) augmente sa fitness au détriment de celle de son hôte (Moya *et al.*, 2008). Le commensalisme est lui décrit comme un type d'association où le symbiote augmente sa fitness sans affecter celle de son hôte. En réalité, les frontières entre toutes ces interactions sont souvent minces, ce qui permet un *continuum* entre ces différentes associations (Figure 11). Les associations symbiotiques peuvent également évoluer dans le temps et générer des variations morphologiques, physiologiques et/ou génétiques chez les

partenaires en fonction de l'implication de chacun dans l'association. Les associations symbiotiques sont donc à ce titre un moteur pour de nombreux processus évolutifs intervenant chez divers phyla d'organismes (Margulis et Fester, 1991 ; Rosati, 2004).

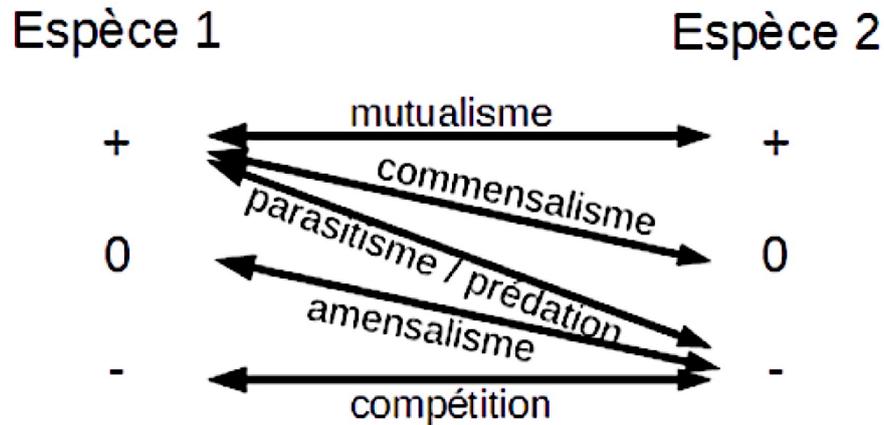


Figure 11. Schéma représentant les relations interspécifiques pouvant avoir lieu entre deux espèces en fonction de leurs impacts respectifs sur leur partenaire (Duperron, 2017). La compétition entre deux espèces tend à diminuer la valeur sélective des deux partenaires tandis que l'amensalisme se traduit par une diminution de la valeur sélective de l'un des partenaires alors que ses impacts sont neutres pour l'autre (exemple : le piétinement d'un herbier de phanérogames par les hommes).

Au sein de la symbiose, le partenaire le plus grand est appelé hôte, et le plus petit symbiote (Smith et Douglas, 1987). En dehors de l'association symbiotique, l'hôte sans symbiote est dit « aposymbiotique » et le symbiote non associé à son hôte est dit « sous forme libre ». De plus, on distingue deux types de symbioses en fonction de la localisation du symbiote chez son hôte : l'ectosymbiose et l'endosymbiose (Figure 12).

- L'ectosymbiose

On parle d'ectosymbiose lorsque le symbiote vit sur la surface du corps de l'hôte, y compris les surfaces internes tels que la paroi du tube digestif et les canaux des glandes (Moya *et al.*, 2008). L'ectosymbiose peut être considérée comme un outil adaptatif utilisé par un grand nombre d'organismes afin de lutter contre les contraintes environnementales (Rosati, 2004). Ainsi chez les protistes ciliés *Zoothamnium niveum* et *Kentrophoros* sp., et les nématodes de la sous famille des Stilbonematinae (Ott *et al.*, 2004a), les ectosymbiotes bactériens constituent la principale source de nourriture de l'hôte et jouent un rôle important dans la détoxification du milieu (Ott *et al.*, 2004a ; Rosati, 2004). Dans le cas d'*Euplotidium* sp., les ectosymbiotes (ou epixenosomes) appartenant aux Verrumicrobia, permettent à leur hôte de se défendre, en projetant une sorte de filament (ou tubule) terminé par un harpon sur ses prédateurs. De plus les epixenosomes modifient la surface de la cellule, le rendant plus difficilement identifiable (Rosati *et al.*, 1999 ; Petroni *et al.*, 2000).

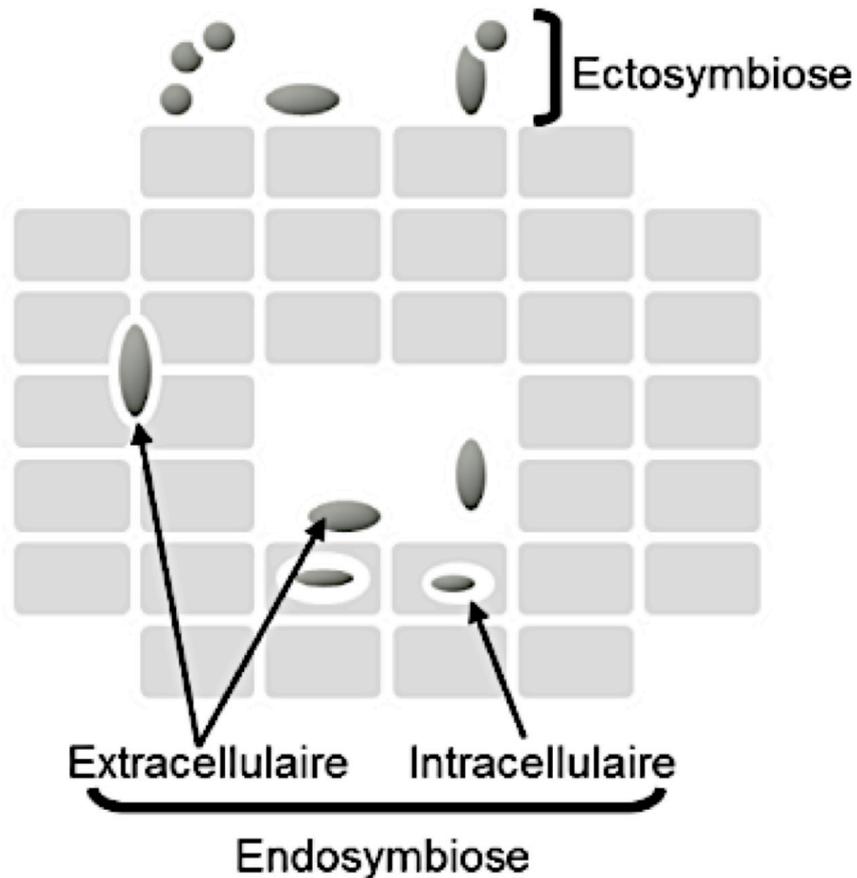


Figure 12. Localisation des symbiotes (gris foncé) par rapport à leur hôte (gris clair) (Duperron, 2017). Dans le cas de l'ectosymbiose, les symbiotes occupent les surfaces externes de l'organisme. Dans le cas de l'endosymbiose, les symbiotes se trouvent à l'intérieur de l'hôte. Ils peuvent résider à l'extérieur de ses cellules (endosymbiose extracellulaire) ou bien à l'intérieur du cytoplasme des cellules de l'hôte (endosymbiose intracellulaire).

- L'endosymbiose

On parle d'endosymbiose (ou d'endocytobiose) lorsqu'un symbiote vit à l'intérieur d'une cellule hôte, il s'agit de la forme la plus intime d'association entre deux partenaires (Nowack et Melkonian, 2010). Lorsque l'hôte est un eucaryote, le symbiote peut se trouver libre dans le cytoplasme, à l'intérieur de vacuoles ou encore associé à certains organites (Nowack et Melkonian, 2010). Les symbioses intracellulaires sont différenciées en fonction de l'interdépendance respective de l'hôte et du symbiote, et de la durée de l'association. On parle alors d'endosymbiote primaire obligatoire, quand l'histoire évolutive entre les partenaires est longue, et d'endosymbiote secondaire facultatif, quand l'association semble être plus récente et que le symbiote conserve sa capacité à recouvrer une forme libre (Moya *et al.*, 2008). Dans certains cas, l'endosymbiote secondaire peut devenir un endosymbiote primaire et si une symbiose obligatoire est déjà établie avec un autre partenaire, un consortium peut alors s'installer (Moya *et al.*, 2008). Il existe des associations symbiotiques entre plusieurs phyla de procaryotes et d'eucaryotes (Figure 13).

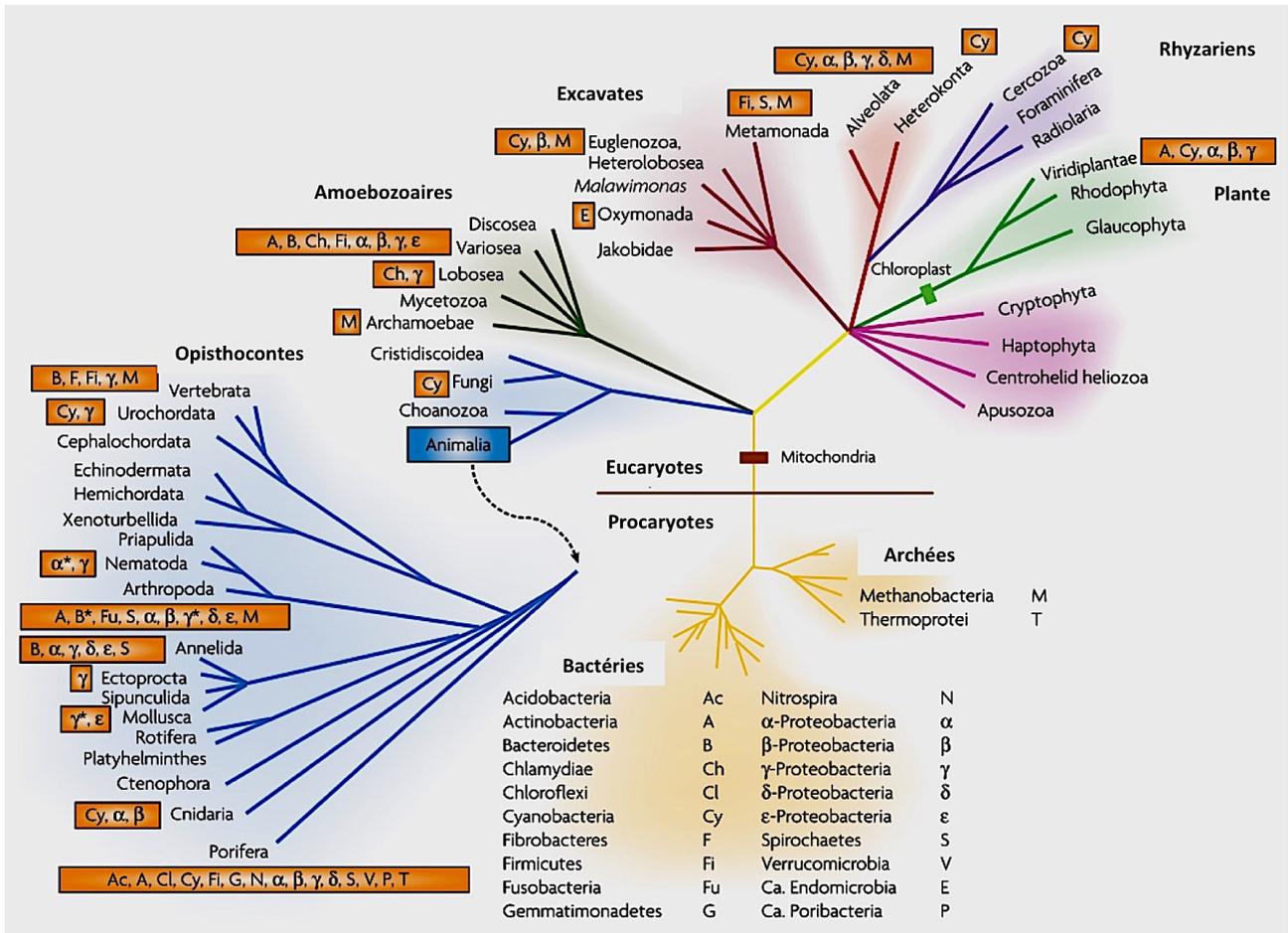


Figure 13. Distribution phylogénétique des symbioses entre Eucaryotes et Procaryotes. Les différentes classes de bactéries et d'archées sont représentées respectivement par des lettres lorsqu'il existe des associations avec des hôtes eucaryotes (modifiés d'après Moya *et al.*, 2008).

Pour conclure ce chapitre, les protistes regroupent donc les différents organismes unicellulaires eucaryotes à la base des différents écosystèmes marins. Grâce à leurs différents modes de vie et d'alimentation, ils jouent un rôle essentiel dans la chaîne alimentaire marine en permettant notamment le transfert de matière organique vers les niveaux trophiques supérieurs (Sherr et Sherr, 2002 ; Capriulo *et al.*, 2013). Il est également admis aujourd'hui que les protistes sont paraphylétiques et donc descendent de plusieurs lignées qui ne possèdent pas d'ancêtre commun (Burki *et al.*, 2014). Cependant, ils partagent des caractères morphologiques ou génétiques aussi bien avec les animaux, que les plantes, ou encore les champignons. Ceci peut expliquer les difficultés qu'ont eu les scientifiques à classer ces organismes durant des dizaines d'années. Il semblerait même que les protistes soient la clé de voute pour comprendre l'évolution entre les Procaryotes et les Eucaryotes. En effet, les protistes regroupent certains des organismes cellulaires les plus primitifs et il est fort probable que ces organismes descendent de l'ancêtre direct des eucaryotes (Burki *et al.*, 2014). Par exemple, il est admis que l'origine des eucaryotes est définie entre autres par

l'apparition des mitochondries dans une cellule précurseuse (López-garcía et Moreira, 2015). Certaines espèces de protistes, comme les Jakobidés, apportent des renseignements intéressants. Il est admis par l'ensemble de la communauté scientifique que la mitochondrie dérive de l'endosymbiose d'une bactérie de la classe des  $\alpha$ -protéobactéries dans une cellule primitive (Gray *et al.*, 2004 ; Burger *et al.*, 2013). L'argument central en faveur de cette hypothèse est que la mitochondrie possède son propre système génétique, c'est-à-dire qu'elle fonctionne comme une bactérie très simplifiée (Silar, 2016). Certaines espèces, tels que *Reclinomonas americana* ou *Andalucia godoyi* possèdent des génomes mitochondriaux codant pour une centaine de gènes, ce qui est le plus grand nombre observé pour des génomes mitochondriaux (Burger *et al.*, 2013). De ce fait, tous les gènes mitochondriaux présents chez les autres eucaryotes se retrouvent dans les génomes mitochondriaux des Jakobidés (Burger *et al.*, 2013 ; Silar, 2016). On y retrouve également certains gènes bactériens comme celui codant pour le système bactérien secY d'exportation des protéines et quatre gènes qui codent pour une ARN polymérase de type bactérien (Burger *et al.*, 2013 ; Silar, 2016).

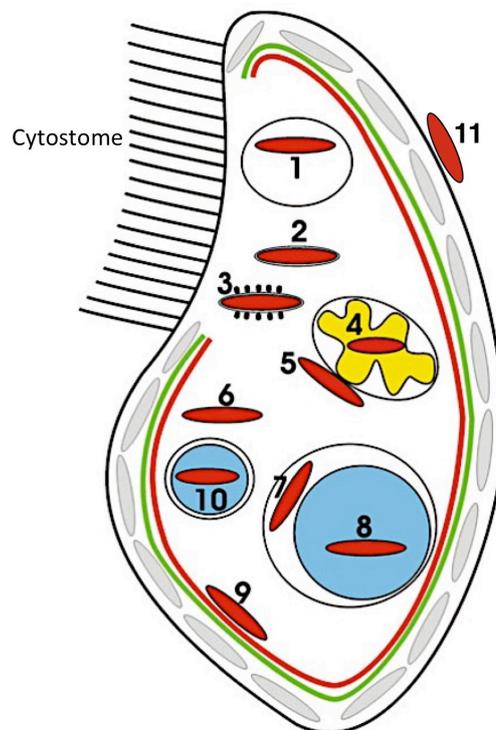
## **Chapitre 2. Relation symbiotique entre protistes ciliés et bactéries : une stratégie écologique ?**

La plupart des études sur les symbioses se concentrent majoritairement sur les interactions endosymbiotiques (Dziallas *et al.*, 2012). Pourtant d'après Rosati (2004), la première étape du développement évolutif des eucaryotes a pu être la formation de consortia avec des ectosymbiotes offrant une protection ou une adaptation aux contraintes environnementales et physiologiques. Même si les endosymbioses accélèrent considérablement les changements évolutifs des génomes des partenaires symbiotiques (Margulis et Fester, 1991 ; Rosati, 2004), l'établissement d'interactions symbiotiques semble plutôt être lié à l'intérêt suscité par les capacités métaboliques spécifiques des symbiotes (Hoffmeister et Martin, 2003 ; Nowack et Melkonian, 2010). Dans les milieux eutrophes et stables, il semblerait que la présence d'endosymbiotes bactériens chez les ciliés relève plus du parasitisme que d'une véritable relation mutualiste (Nowack et Melkonian, 2010 ; Dziallas *et al.*, 2012). En effet, dans ce genre d'écosystème les protistes ciliés ont tendance à abriter préférentiellement des eucaryotes phototrophes unicellulaires ou possèdent des plastes photosynthétiques fonctionnels obtenus par kleptoplastie (Nowack et Melkonian, 2010 ; Dziallas *et al.*, 2012). L'incorporation de procaryotes dans des relations symbiotiques est

supposée être un processus sélectif, mais certains ciliés vivant dans ces milieux eutrophiques (par exemple, *Uronema* sp.) n'ont pas de préférence alimentaire, ils sont « non sélectifs » (Alonso *et al.*, 2000). Le choix de leur symbiote dans ce cas ne peut pas s'inscrire dans un processus évolutif dirigé. Cependant des avantages subsistent pour les symbiotes, ils sont protégés contre les prédateurs bactériophages à l'intérieur de leur hôte, ce qui entraîne probablement des taux de mortalité inférieurs à ceux des mêmes bactéries libres dans l'environnement (Dziallas *et al.*, 2012). L'hôte subvient également aux besoins nutritionnels du symbiote et lui assure des conditions de développement stables et dépourvues de compétition (Dziallas *et al.*, 2012).

Dans les écosystèmes oligotrophiques (pauvre en nutriments) et les écosystèmes extrêmes où les conditions physico-chimiques (températures, pH, pression, oxygène, présence de composés minéraux en forte concentration) sont hostiles à la survie de la majorité des autres organismes, les ciliés peuvent être associés à des bactéries chimiosynthétiques qu'ils utilisent comme source de nourriture et qui leurs assurent la détoxification du milieu (Ott *et al.*, 2004a). Dans ces milieux, les interactions symbiotiques se forment donc probablement lorsque le déficit nutritif menace la reproduction et la survie de l'un des partenaires potentiels (Dziallas *et al.*, 2012). Le style de vie de l'hôte adapté à l'environnement permet généralement d'assurer tous les besoins nécessaires au métabolisme de son symbiote, en plus de lui assurer une niche écologique dépourvue de prédation. Par exemple, le battement des cils et la contraction du stolon chez les ciliés péritriches permettent de fournir à la fois l'oxygène et les sulfures nécessaires à leurs bactéries ectosymbiotiques. Dans le cas de *Kentrophoros* sp., celui-ci se déplace à l'intérieur des sédiments réduits anoxiques, il est capable de migrer verticalement et peut donc évoluer de part et d'autre de l'interface anoxique/oxique des sédiments (chemocline), fournissant ainsi à ces ectosymbiotes l'accès à l'oxygène et aux sulfures. À ce jour, plus de 250 espèces de ciliés ont été décrites en association symbiotique avec des bactéries (Fokin, 2012), ce qui en fait l'un des groupes les plus intéressants pour l'étude des interactions symbiotiques chez les protistes. Pour mieux comprendre de telles interactions, une connaissance plus approfondie de la véritable diversité des ciliés porteurs de symbiotes pro- et eucaryotes est nécessaire, d'autant plus que la majorité des ciliés aquatiques peuvent héberger des micro-organismes symbiotiques (Fenchel *et al.*, 1977 ; Fenchel et Finlay, 1991a ; Finlay *et al.*, 1996 ; Dziallas *et al.*, 2012). De plus, la diversité des ciliés peut être égale ou même dépassée celle des symbiotes car les protistes ciliés peuvent s'associer à plusieurs espèces de bactéries et même

plusieurs symbiotes (Finlay *et al.*, 1996). En plus des bactéries ectosymbiotiques présentes à la surface des ciliés, certaines bactéries s'associent aux organites du cytoplasme, au système endomembranaire ou aux éléments du cytosquelette (Schweikert, 2013) (Figure 14). Des symbiotes bactériens ont également été trouvés dans les micro- et macro-noyaux (Preer, 1969 ; Preer et Preer, 1984), dans l'espace périnucléaire et dans le réticulum endoplasmique (Fokin et Karpov, 1995) de certains protistes, principalement des ciliés.



**Figure 14.** Distribution des symbiotes bactériens chez les ciliés (modifié d'après Schweikert, 2013) : (1) à l'intérieur des vacuoles alimentaires, (2) à l'intérieur de vacuoles symbiotiques, (3) à l'intérieur de la lumière du réticulum endoplasmique rugueux, (4) à l'intérieur des mitochondries, (5) associés aux mitochondries, (6) dans le cytoplasme, (7) dans la lumière de l'enveloppe nucléaire, (8) à l'intérieur du macronoyau, (9) associé aux structures du cortex cellulaire, (10) à l'intérieur du micronoyau, et (11) fixés à la surface du cilié. Le cytostome est l'appareil buccal du cilié et le seul site de phagocytose. La ligne verte externe représente le cytosquelette et la ligne interne représente les éléments fibrillaires (par exemple : les myonèmes).

Les ciliés et d'autres protistes connus comme les amibes et les flagellés hétérotrophes ingèrent tous des proies, le plus souvent des procaryotes (bactéries, archées), des algues ou d'autres protistes. Les protistes phagotrophes peuvent ingérer différents types de proies, mais ils ont tendance à présenter une sélectivité pour certains aliments (Montagnes *et al.*, 2008). Cette sélectivité est basée sur des critères comme la libération de signaux chimiques dissous par la proie, sa motilité, sa composition biochimique ou la stœchiométrie des nutriments, les caractéristiques de la surface cellulaire et enfin sa taille (Montagnes *et al.*, 2008). La taille des proies est la plus fondamentale de ces caractéristiques et influence clairement l'ingestion et la sélection (Montagnes *et al.*, 2008). De plus, la population de chaque proie potentielle

doit présenter une densité suffisante pour l'alimentation du prédateur. Une méthode est alors efficace pour assurer aux protistes hétérotrophes une nutrition adéquate : cultiver leur propre source de nourriture (Moya *et al.*, 2008). Les symbiotes procaryotes utilisés comme source de nourriture peuvent être ecto- ou endosymbiotique chez les protistes. Les modèles les plus étudiés à ce jour concernent les ciliés *Kentrophoros* sp. (Ott *et al.*, 2004a) et *Zoothamnium niveum* (Rinke *et al.*, 2007 ; Bright *et al.*, 2014) qui cultivent leurs bactéries chimiosynthétiques sulfo-oxydantes en leurs apportant les substrats nécessaires à leur métabolisme et les ingèrent par la suite par phagocytose. Dans les deux cas les bactéries ectosymbiotiques ont été décrites comme étant majoritairement présentes à l'intérieur des vacuoles digestives (Ott *et al.*, 2004a ; Bright *et al.*, 2014). Par ailleurs, de nombreux dinoflagellés et certains ciliés Tintinnides sont également associés à des cyanobactéries ectosymbiotiques des genres *Synechococcus* et *Prochlorococcus* fixatrices d'azote (Foster *et al.*, 2006b ; 2006a). Il a été avancé que les cyanobactéries avaient pour rôle de compléter les besoins en carbone et en azote de leurs hôtes, cependant, aucune preuve de transfert n'a encore été démontrée. Plusieurs symbioses obligatoires existent également entre des protéobactéries et les ciliés du genre *Euplotes*. Les bactéries du genre *Devosia* associées au cilié *Euplotes magnicirratu*s agissent sur le métabolisme du glycogène de leur hôte. En absence de leurs symbiotes, les individus ne sont plus capables de digérer leur proies et finissent par mourir (Vannini *et al.*, 2003). D'autre part, les endosymbiotes du genre *Polynucleobacter* associées à l'espèce *Euplotes aediculatus* fournissent les métabolites nécessaires pour alimenter la glycogénolyse de leur hôte (Vannini *et al.*, 2007). Ainsi en l'absence du symbiote, les processus morphogénétiques nécessitant beaucoup d'énergie ne peuvent être pleinement accomplis, ce qui expliquerait pourquoi l'hôte cilié dépend de son symbiote (Vannini *et al.*, 2003). Outre le rôle joué dans l'alimentation de leur hôte, de nombreuses bactéries hétérotrophes jouent un rôle défensif chez certaines espèces de ciliés. Les bactéries ectosymbiotiques du cilié *Euplotidium* appartenant aux Verrucomicrobia sont appelées épixénosomes, elles empêchent l'ingestion du protiste par d'autres ciliés prédateurs en projetant des filaments qui ressemblent à des harpons (Rosati *et al.*, 1999). Les espèces ciliées de *Paramecium* associées à des bactéries endosymbiotiques du genre *Caedibacter* produisent des toxines favorisant l'élimination des ciliés qui n'abritent pas le même symbiote (Kusch *et al.*, 2002 ; Görtz, 2006). Bien que les symbioses nutritives et défensives impliquent des interactions qui améliorent le succès de leurs hôtes dans l'environnement, il existe d'autres relations symbiotiques qui permettent à l'hôte de coloniser de nouveaux environnements (Cavanaugh *et al.*, 2006). C'est notamment le cas pour les ciliés

*Zoothamnium niveum*, *Kentrophoros* sp. et *Folliculinopsis* sp. qui vivent dans des environnements qualifiés d'extrêmes où les conditions sont défavorables à la survie de la majorité des autres organismes (Ott *et al.*, 2004a ; Kouris *et al.*, 2007). Dans ces différents cas, la symbiose peut également être considérée comme une adaptation aux conditions environnementales difficiles (Gast *et al.*, 2009).

## **A. Les symbiotes bactériens hétérotrophes associés aux ciliés**

### **1. Les endosymbiotes nucléaires du genre *Holospora* chez les paramécies**

Il existe près de 60 endosymbiotes différents décrits pour les espèces du genre *Paramecium*. Ils peuvent être localisés dans les micronoyaux, le macronoyau, l'espace périnucléaire et le cytoplasme (Schweikert, 2013). Parmi les symbiotes retrouvés chez les paramécies, on distingue les bactéries du genre *Holospora* qui infectent les micro- et macronoyaux de différentes espèces. Le symbiote endonucléaire *H. obtusa* est le plus proche parent connu à ce jour des mitochondries (Görtz et Fokin, 2009 ; Dziallas *et al.*, 2012). Ces bactéries peuvent conférer à certaines espèces de *Paramecium* une résistance aux chocs thermiques (Fujishima *et al.*, 2005) et/ou une résistance aux chocs osmotiques (Smurov et Fokin, 1999), leur permettant ainsi de coloniser de nouvelles niches écologiques. À cause de leur mode d'infection, les bactéries du genre *Holospora* peuvent être considérées comme de véritables parasites. Cependant, ces bactéries n'ont aucun effet sur le taux de croissance de l'hôte dans des conditions normales (Görtz et Brigge, 1998 ; Dziallas *et al.*, 2012). En effet, bien que la majorité des symbiotes chez les ciliés ne soient pas pathogènes, les bactéries du genre *Holospora* développent des formes infectieuses qui sont libérées dans l'environnement pour l'infection de nouveaux hôtes. Plus de 15 endosymbiotes bactériens différents appartenant au genre *Holospora* ou proche de celui-ci ont déjà été décrits à l'intérieur des noyaux des paramécies (Görtz et Fokin, 2009). Ces bactéries infectieuses jouent probablement un rôle très particulier dans l'augmentation de la diversité des endosymbiotes nucléaires. En effet, elles ont la capacité d'introduire d'autres micro-organismes non spécifiques dans les noyaux. Par exemple, les bactéries du genre *Holospora obtusa* pénètrent à l'intérieur du macronoyau de leur hôte à l'aide de vésicule de transport, il semblerait que

des bactéries alimentaires puissent profiter de ce système pour être co-transportées à l'intérieur des noyaux (Fokin *et al.*, 2004). Une telle aptitude a pu jouer un rôle important dans les processus évolutifs et peut être considérée comme une source de diversification des organismes via des co-évolutions non-dirigées (Fokin et Sera, 2014) (Figure 15).

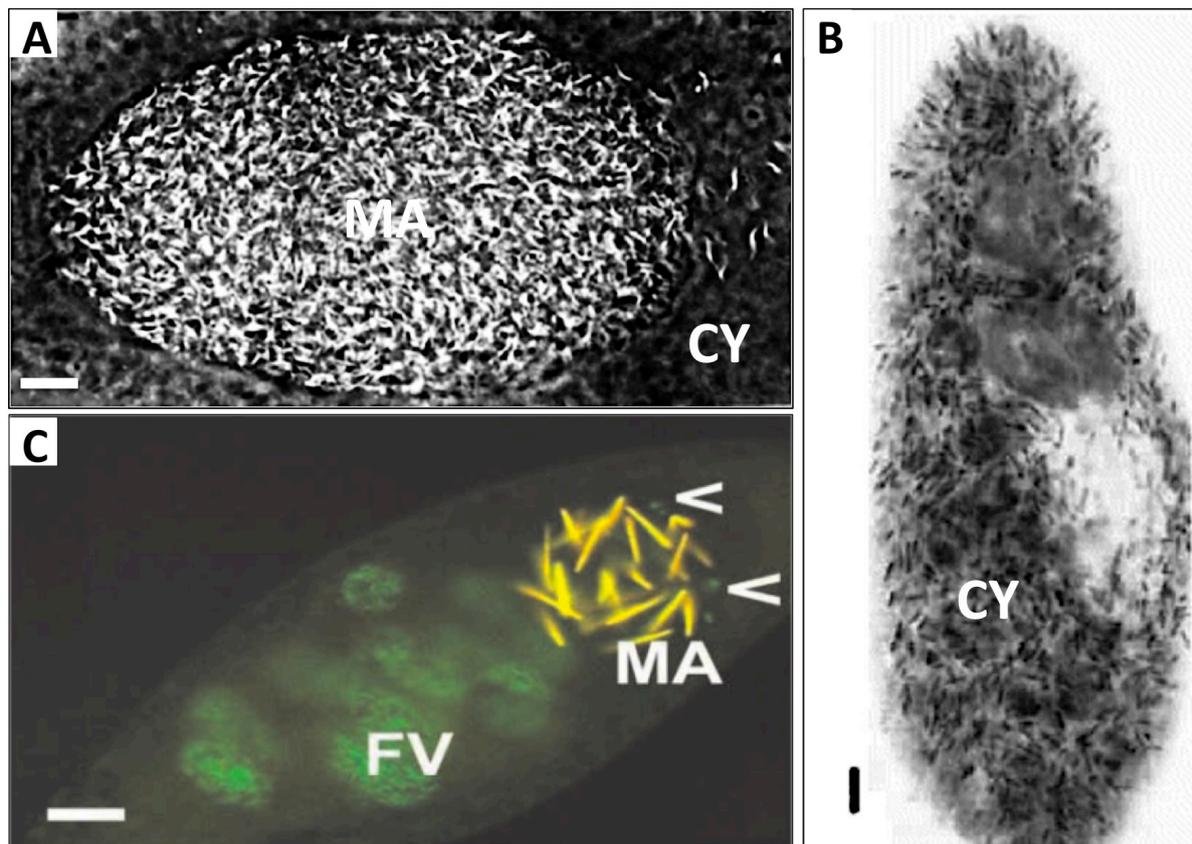


Figure 15. Les endosymbiotes bactériens de *Paramecium* : (A) *Holospora caryophila* colonisant le macronoyau (MA) de *P. biaurelia* et (B) *Lyticum flagellatum* colonisant le cytoplasme (CY) de *P. Tetraurelia* (modifié d'après Schweikert, 2013). Echelles : 10  $\mu\text{m}$ . (C) Observation d'un double signal FISH (sondes eubactériennes universelles et spécifiques d'*Holospora*) réalisée après l'infection expérimentale du macronucléus de *P. caudatum* avec *Holospora obtusa*. *H. obtusa* (jaune) se trouve à l'intérieur du macronoyau (MA) ; d'autres bactéries (vert) se trouvent à l'intérieur des vacuoles alimentaires (FV), tandis que de petites bactéries alimentaires ont été introduites à l'intérieur du macronoyau (tête de flèche) (Fokin et Sera, 2014). Echelle : 15  $\mu\text{m}$ .

## 2. Les particules Kappa ou « bactéries tueuses »

D'autres symbiotes sont fréquemment présents dans le cytoplasme des protistes ciliés du genre *Paramecium* mais aussi dans celui des individus du genre *Euplotes*, *Paraauronema* (Görtz et Brigge, 1998) et chez *Spirostomum ambiguum* (Fokin, 2003). Ces bactéries sont appelées « particules Kappa » et permettent à leur hôte de tuer les individus aposymbiotiques en libérant des toxines produites par les bactéries (Schweikert, 2013). Les individus symbiotiques qui libèrent ces toxines sont appelés « tueurs » tandis que les individus aposymbiotiques sont dits « sensibles ». Les particules Kappa les plus étudiées appartiennent au genre *Caedibacter* et sont capables de produire plusieurs toxines mortelles

(Schrallhammer, 2010). Les toxines sont produites grâce à des structures composées de rubans protéiques de 20-30  $\mu\text{m}$  de long enroulés à l'intérieur de la cellule bactérienne (Figure 16). Lorsque les rubans sont enroulés, ils forment des structures cylindriques creuses d'environ 0,4  $\mu\text{m}$  de diamètre appelées corps-R à l'intérieur des bactéries. Il a été montré que seuls les symbiotes *Caedibacter* contenant des corps-R étaient toxiques pour les paramécies sensibles (Schweikert, 2013). Ces bactéries peuvent produire différentes toxines avec des effets prélétaux caractéristiques. Ces symptômes comprennent la rotation des individus, une surproduction de vacuole, la paralysie, la formation de bosses aborales et la lyse rapide de la cellule (Schweikert, 2013). Cependant jusqu'à présent, ni les toxines mortelles ni le mécanisme par lequel les paramécies infectées par *Caedibacter* deviennent résistantes ont été identifiés (Görtz et Brigge, 1998). En effet, en plus de rendre leurs hôtes capables de libérer des toxines, les symbiotes confèrent aussi une résistance spécifique aux toxines produites. Lorsque le symbiote n'est plus présent chez l'hôte, celui-ci perd à la fois la capacité de libérer des toxines et la résistance à la toxine (Sonneborn, 1959). Cependant, lorsqu'un individu symbiotique perd ses symbiotes, des plasmides peuvent néanmoins subsister dans le cytoplasme et peuvent transformer une bactérie symbiotique « non tueuse » en bactérie tueuse (Görtz et Brigge, 1998).

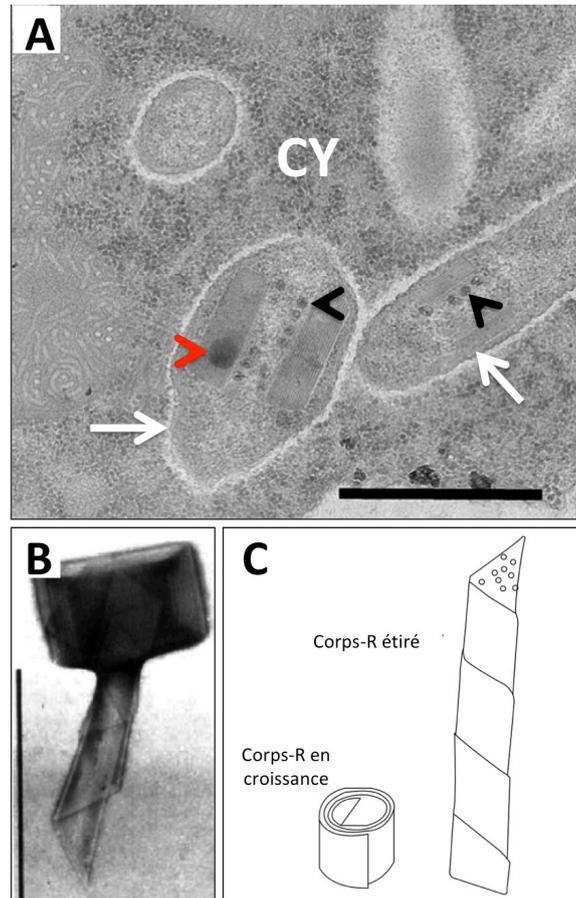


Figure 16. Les bactéries tueuses (modifié d'après Schweikert, 2013) : (A) Observation au microscope électronique à transmission de section longitudinale et transversale de *Caedibacter varicaedens* (flèches blanches), un endosymbiote vivant dans le cytoplasme (CY) de *Paramecium biaurelia*. Notez la présence de corps-R (tête de flèche rouge) à l'intérieur des bactéries ainsi que de phages réfractiles (têtes de flèches noires). (B) Corps-R isolé de *Caedibacter taeniospiralis* observé au MET après coloration négative. Le corps-R est un ruban protéique enroulé (C) qui peut se dérouler lorsque le pH de la cellule devient plus acide. Echelles : 1 $\mu$ m.

### 3. *Polynucleobacter necessarius* : un symbiote obligatoire

La bactérie *Polynucleobacter necessarius* (Figure 17), encore appelée « Omikron », a d'abord été décrite comme bactérie endosymbiotique obligatoire présente à l'intérieur du cytoplasme du cilié *Euplotes aediculatus* (Heckmann et Schmidt, 1987). D'autres études ont également permis de montrer sa présence chez un groupe monophylétique d'espèces de cilié du genre *Euplotes* d'eau douce et d'eau saumâtre (Heckmann *et al.*, 1983 ; Vannini *et al.*, 2005). L'association est obligatoire pour les deux partenaires car privés de leurs symbiotes, les ciliés ne peuvent plus se diviser et finissent par mourir au bout de deux semaines tandis que les bactéries ne peuvent plus survivre ou croître en dehors de leur hôte (Heckmann, 1975 ; Heckmann *et al.*, 1983 ; Vannini *et al.*, 2005 ; 2007 ; 2012). Comme les bactéries sont essentielles à la reproduction et à la survie de l'hôte, il est admis que ces bactéries comblent certaines fonctions métaboliques perdues par l'ancêtre commun de l'espèce hôte (Heckmann *et al.*, 1983). Ces bactéries sont caractérisées par de multiples nucléoïdes, ce sont des

bactéries Gram-négatif non-mobiles qui semblent appartenir aux  $\beta$ -protéobactéries proches des Burkholderiaceae (Springer *et al.*, 1996 ; Hahn *et al.*, 2009). Les espèces *Polynucleobacter necessarius* et *Candidatus Protistobacter heckmanni* sont alternativement présentes dans le cytoplasme hôte et peuvent jouer des rôles fonctionnels similaires comme symbiotes obligatoires (Heckmann et Schmidt, 1987 ; Vannini *et al.*, 2012 ; 2013). Alors que le genre *Candidatus Protistobacter* n'est constitué que d'espèces symbiotiques, le genre *Polynucleobacter* comprend également des bactéries sous formes libres qui sont strictement apparentées à l'espèce *Polynucleobacter necessarius* (Hahn *et al.*, 2009 ; Vannini *et al.*, 2017). Des études récentes ont permis de suggérer que *Polynucleobacter* fournissait les métabolites nécessaires pour alimenter la glycolyse d'*Euplotes* (Vannini *et al.*, 2007). Cependant aucune preuve génétique ne soutient cette hypothèse (Boscaro *et al.*, 2013). Le symbiote repose sur le cilié au moins pour les sources de carbone, l'azote organique, le soufre, et d'autres molécules essentielles, y compris de nombreux cofacteurs (Boscaro *et al.*, 2013). Il est plus difficile de comprendre pourquoi le symbiote est essentiel pour la survie d'*Euplotes*. De nombreux symbiotes obligatoires d'eucaryotes décrits comme mutualistes servent de source de nutriments à leur hôte (Dale et Moran, 2006 ; Boscaro *et al.*, 2013). Il est donc probable que *P. necessarius* fournisse au moins certains métabolites à son hôte bien que cela n'ait pas encore été démontré. Les ciliés du genre *Euplotes* se nourrissent d'algues et de bactéries hétérotrophes et peuvent probablement obtenir tous les acides aminés et cofacteurs nécessaires à leur alimentation. Il est donc plus probable que l'hôte cilié ait besoin de *Polynucleobacter* pour combler une déficience catabolique mais d'autres analyses sont nécessaires afin de pouvoir l'affirmer (Boscaro *et al.*, 2013). Cette association, autrefois considérée comme remontant à l'ancêtre des espèces d'*Euplotes* d'eau douce (Heckmann *et al.*, 1986 ; Görtz, 2006), est aujourd'hui considérée comme l'endosymbiose la plus jeune dans l'histoire évolutive (Vannini *et al.*, 2007). Ces bactéries ont également été décrites chez le cilié *Euplotes harpa* où leur disparition arrête le cycle de reproduction du cilié (Vannini *et al.*, 2005). Dans deux des trois types d'*Euplotes harpa* étudiés, *Polynucleobacter* co-existait avec d'autres bactéries symbiotiques. Cependant, les autres bactéries ne représentaient qu'une faible abondance (Vannini *et al.*, 2005). Ces résultats récents suggèrent que l'endosymbiose chez les ciliés devrait être considérée comme un système ouvert et dynamique dans lequel différents types d'associations peuvent être établis en relativement peu de temps. Par conséquent, il semblerait que certains endosymbiotes bactériens des ciliés et des protistes ne sont pas nécessairement dérivés de longues co-évolutions avec certains taxons hôtes (Schweikert, 2013).

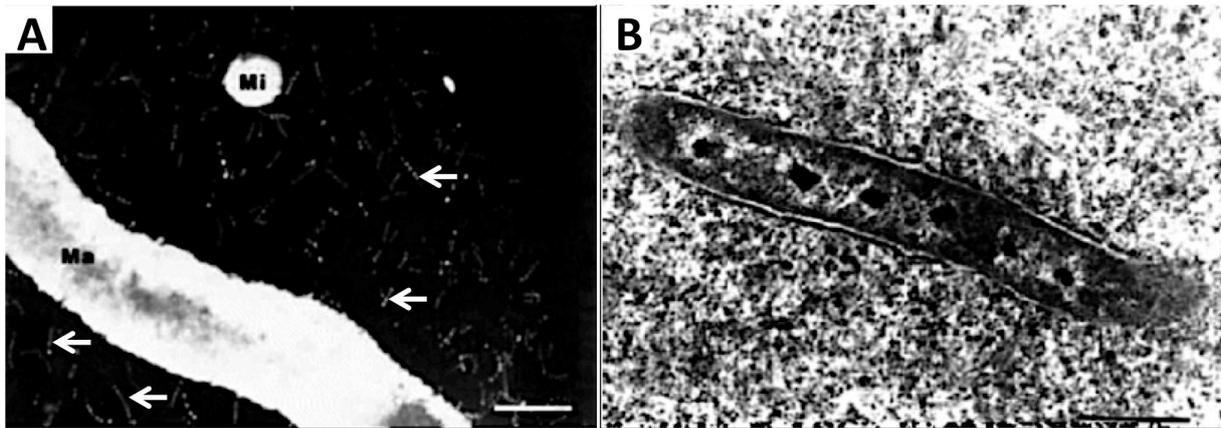


Figure 17. *Polynucleobacter necessarius* (Schweikert, 2013) : (A) Observation au microscope à fluorescence de *P. necessarius* (flèches) dans le cytoplasme d'une cellule d'*Euplotes aediculatus*. Ma = macronoyau et Mi = micronoyau. Echelle = 1  $\mu\text{m}$  ; (B) Section longitudinale de *P. necessarius* observée au MET. La double membrane observée chez cette bactérie est caractéristique des bactéries GRAM négative. Echelle : 0,5  $\mu\text{m}$ .

#### 4. Les épixénosomes : des bactéries « kamikazes »

Les ectosymbiotes observés à la surface du cilié marin *Euplotidium itoi* et d'autres espèces du même genre (Verni et Rosati, 1990) sont assez particuliers. En effet, bien qu'ils aient été étudiés en détail, leur position phylogénétique est restée obscure pendant des années jusqu'à ce que leur apparenté avec les Verrucomicrobia soit élucidée (Petroni *et al.*, 2000). C'est le seul symbiote de cilié appartenant à cette famille, alors que la plupart des symbiotes de ciliés appartiennent aux Protéobactéries. Les auteurs ont relevé deux morphotypes chez ces bactéries appelées épixénosomes (Figure 18). Au stade I du cycle de vie, les bactéries sont sphériques (1  $\mu\text{m}$  de diamètre). Les cellules se divisent apparemment par fission binaire. Les épixénosomes de stade I peuvent se transformer en stade II en acquérant progressivement une structure plus complexe avec des compartiments cytoplasmiques organisés et une structure extrusive contenue dans une matrice protéique contenant un long filament (ou tubule) surenroulé. Les épixénosomes ont une fonction défensive pour la cellule hôte (Rosati *et al.*, 1999). Des prédateurs tels que le cilié *Litonotus lamella* peuvent facilement ingérer les individus d'*Euplotidium itoi* sans épixénosomes, alors qu'ils ne sont pas capables d'ingérer ceux avec des épixénosomes (Petroni *et al.*, 2000). Il semblerait que l'association entre *Euplotidium itoi* et ses ectosymbiotes soit obligatoire (Radek, 2010). En effet, tous les individus étudiés, prélevés dans la nature ou provenant de cultures en laboratoire ont des ectosymbiotes (Rosati, 2005). De plus, le cycle cellulaire de l'hôte est coordonné avec les processus de multiplication et de différenciation des stades I à II des bactéries (Giambelluca et Rosati, 1996). Les ciliés placés expérimentalement en stabulation peuvent survivre, ce qui signifie que les épixénosomes ne sont pas vitaux (au moins pour la survie en laboratoire). En

revanche, les bactéries ectosymbiotiques isolées ne peuvent pas être cultivées dans des milieux artificiels. La présence d'un seul opéron ribosomal chez ces bactéries avec des gènes codant pour l'ARNr 16S et 23S non liés, traduisant une efficacité réduite de synthèse des ribosomes, est un autre argument en faveur du caractère obligatoire de cette symbiose (Rosati 2006).

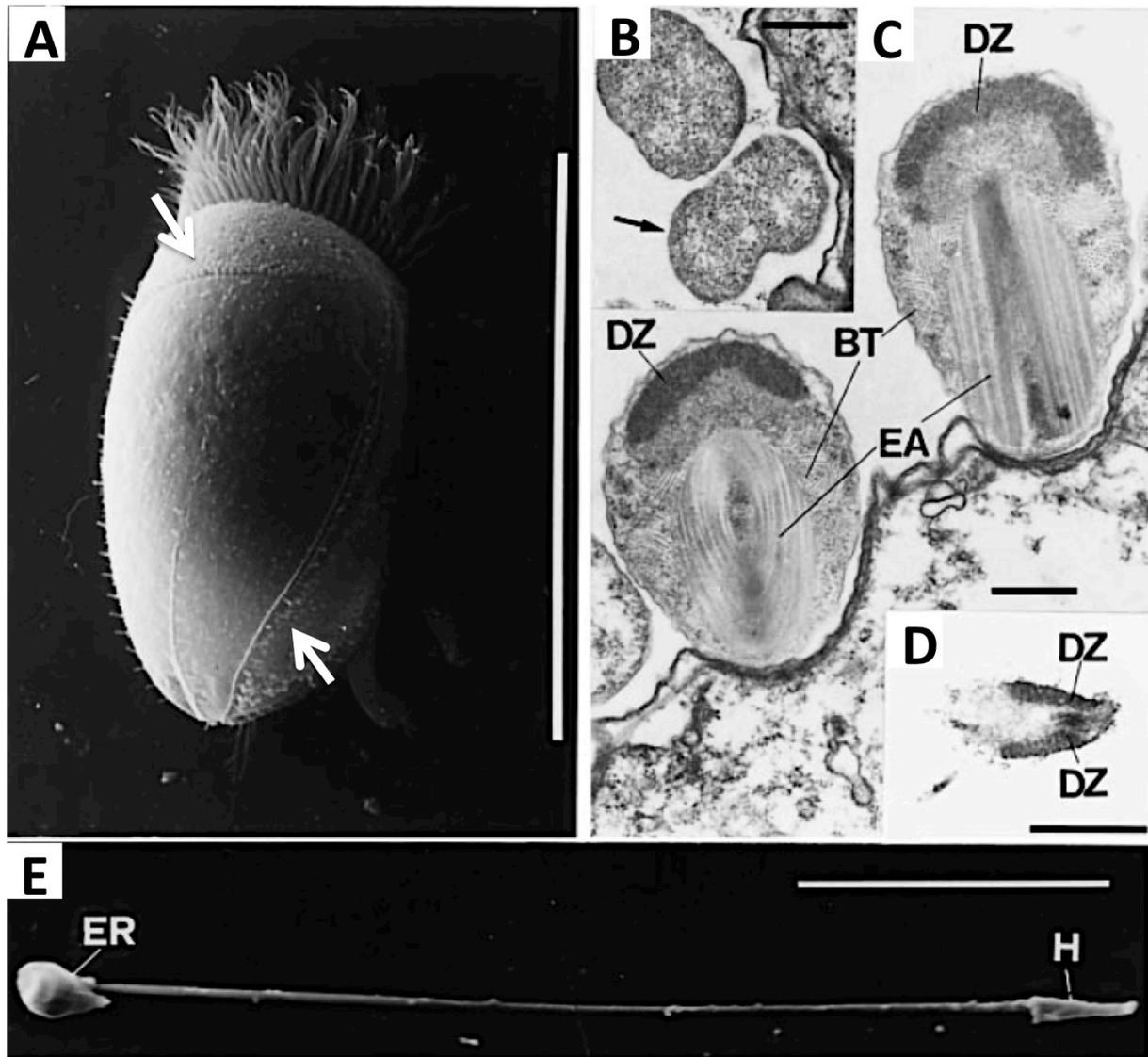


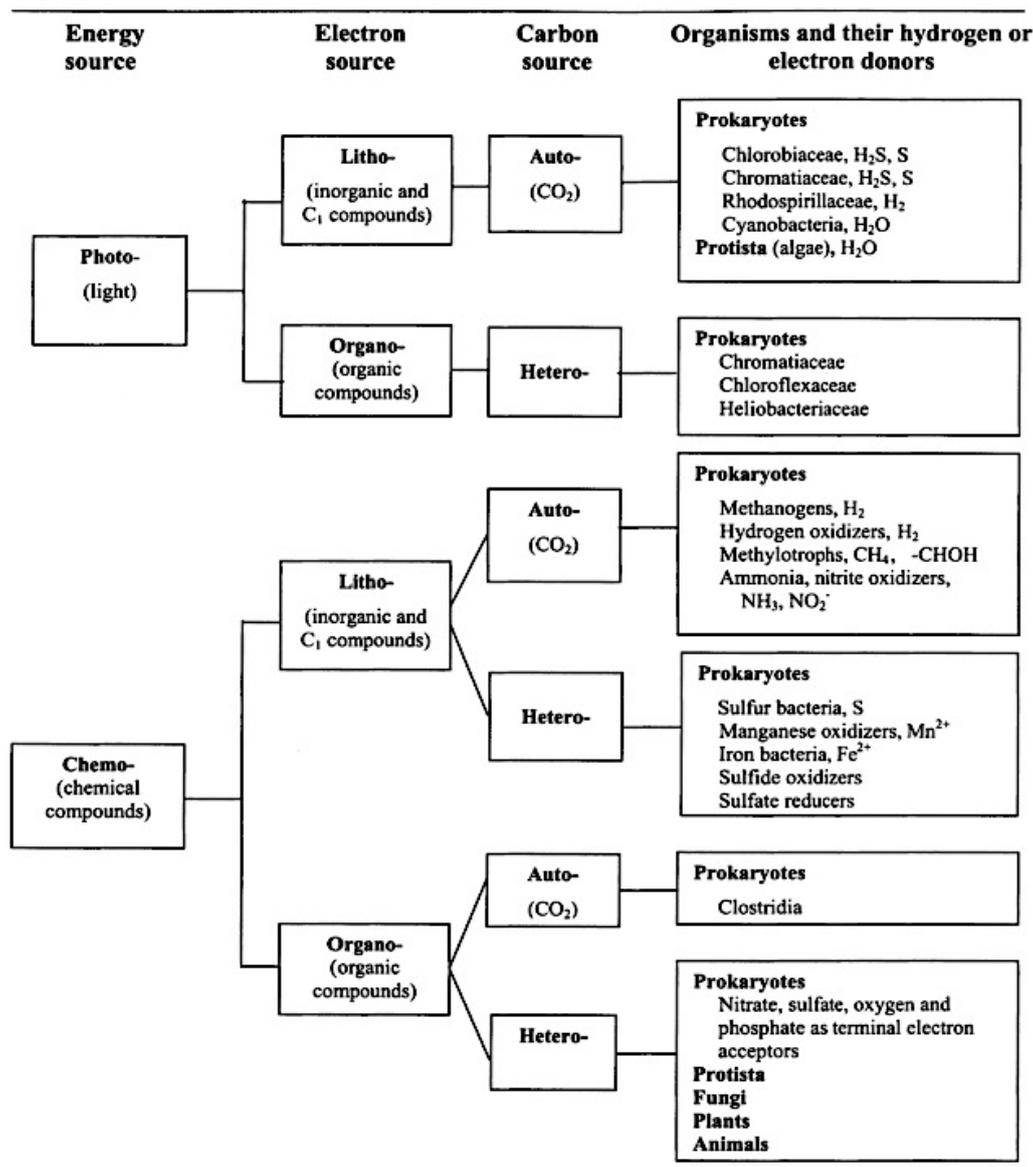
Figure 18. Epixénosomes d'*Euplotidium itoi* (Petroni *et al.*, 2000) : (A) Vue dorsale d' *E. itoi* au microscope électronique à balayage. Les flèches indiquent les épixénosomes dans la bande corticale. Echelle = 100 $\mu$ m. (B) Épixénosomes de stade I en coupe. La flèche indique une cellule en division. (C) Sections d'epixénosomes de stade II montrant une zone apicale en forme de dôme (DZ), l'appareil extrusif (EA) et des éléments ressemblant à des microtubules formant un « panier » autour de l'appareil extrusif (BT). (D) Coupe transversale d'une tête d'un épixénosome éjecté. (Echelle = 1 $\mu$ m). (E) Epixénosome après éjection (ER) montrant une structure en forme de harpon (H) qui ressemble à celle des cnidocytes retrouvés chez les Cnidaires. Echelle : 10 $\mu$ m.

## **B. Les symbiotes bactériens chimiosynthétiques associés aux ciliés**

Tous les organismes ont besoin d'énergie, d'eau et de nutriments (organiques et/ou inorganiques) pour vivre et ils ont développé différentes stratégies, grâce à l'évolution, pour les obtenir (Ulloa et Grob, 2013). Certains organismes peuvent utiliser l'énergie solaire comme source d'énergie, l'eau comme source d'électrons et le carbone et les nutriments inorganiques pour satisfaire leurs besoins métaboliques (Tableau 1). Ce sont les photolithoautotrophes ou plus communément appelés photoautotrophes. En biologie marine, les micro-organismes capables de réaliser la photosynthèse oxygénée sont collectivement connus sous le nom de phytoplancton. Grâce à la photosynthèse, ils transforment le carbone inorganique et les nutriments en biomasse et en matière organique dissoute (par exemple les exsudats de phytoplancton) et produisent de l'oxygène dans un processus connu sous le nom de production primaire (PP). La matière organique produite par les autotrophes devient alors la source de nourriture de la plupart des formes de vie dans l'océan, fournissant les éléments constitutifs et l'énergie métabolique requis par les niveaux trophiques supérieurs pour l'entretien, la croissance et la reproduction (Ulloa et Grob, 2013). À l'autre extrémité du spectre métabolique, les organismes qui dépendent entièrement de la matière organique produite par d'autres organismes comme source d'énergie, d'électrons et de carbone sont appelés chimio-organohétérotrophes ou simplement hétérotrophes (Tableau 1). Ils se nourrissent d'autres organismes et consomment la matière organique lors d'un processus connu sous le nom de respiration. Certains de ces organismes oxydent la matière organique avec l'oxygène comme accepteur d'électrons pour gagner de l'énergie, la respiration est alors qualifiée d'aérobie. D'autres organismes sont capables de dégrader la matière organique en absence d'oxygène. Ces organismes utilisent des molécules inorganiques autre que l'oxygène comme accepteurs d'électrons (par exemple les nitrates, les sulfates ou le  $\text{CO}_2$ ) lors d'un processus appelé respiration anaérobie. Parmi les hétérotrophes qui pratiquent la respiration anaérobie, on trouve des archées thermophiles et méthanogènes qui utilisent le  $\text{CO}_2$  et les molécules d'hydrogène provenant d'autres organismes pour produire du méthane. On y trouve également des bactéries comme les bactéries sulfato-réductrices qui utilisent les sulfates inorganiques présents dans l'eau de mer et les molécules d'hydrogène provenant d'autres organismes pour produire du sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ). En condition anaérobie, la matière organique peut être également dégradée pour produire de l'énergie grâce aux

enzymes produites par des micro-organismes ; on parle alors de fermentation. Parmi les organismes hétérotrophes, on trouve le zooplancton, les poissons et d'autres prédateurs, y compris les humains mais également des bactéries et des archées (faisant partie du picoplancton hétérotrophe). Bien souvent, une partie de la matière organique produite en surface de l'océan n'est pas dégradée et sédimente dans l'océan profond, où elle peut ensuite être assimilée et dégradée par d'autres organismes ou encore enfouie dans les sédiments. C'est au niveau de ces habitats qualifiés d'extrêmes que vivent certains organismes dont le métabolisme est basé sur des processus chimiosynthétiques. Ces micro-organismes procaryotes, peuvent vivre libres dans l'environnement ou être associés à des invertébrés ou des protistes. Les symbiotes bactériens chimiolithoautotrophes utilisent des composés réduits comme donneurs d'électrons (sulfures, thiosulfate, méthane, hydrogène sulfuré) pour leur métabolisme (Fiala-Médioni, 2000). Ils vivent en association ectosymbiotique ou endosymbiotique avec de nombreuses espèces de ciliés vivants dans des conditions aérobies ou anaérobies et permettent dans la plupart des cas de subvenir aux besoins nutritionnels de leurs hôtes.

Tableau 1. Diversité métabolique des organismes basée sur la source d'énergie et d'électrons pour leurs besoins énergétiques et la source de carbone pour la construction d'une nouvelle biomasse (Margulis *et al.*, 2000)



## 1. La chimiosynthèse

La chimiosynthèse est un processus qui permet de synthétiser des composés organiques à partir de composés inorganiques (Figure 19). Ce processus, comparable à la photosynthèse des plantes vertes, utilise l'énergie issue de réactions d'oxydation de composés chimiques (au lieu de la lumière) afin de produire de l'ATP ou du NADPH. Cette énergie d'origine chimique permet par la suite l'incorporation du carbone provenant du CO<sub>2</sub> dans le cycle de Calvin-Benson pour produire des molécules organiques (sucres et acides aminés) (Fiala-Médioni, 2000 ; Tunnicliffe *et al.*, 2003). Ce processus est réalisé par des micro-organismes autotrophes (bactéries ou archées) et nécessite généralement la

consommation d'oxygène à la différence des organismes photosynthétiques qui au contraire en produisent (MacDonald, 1992).

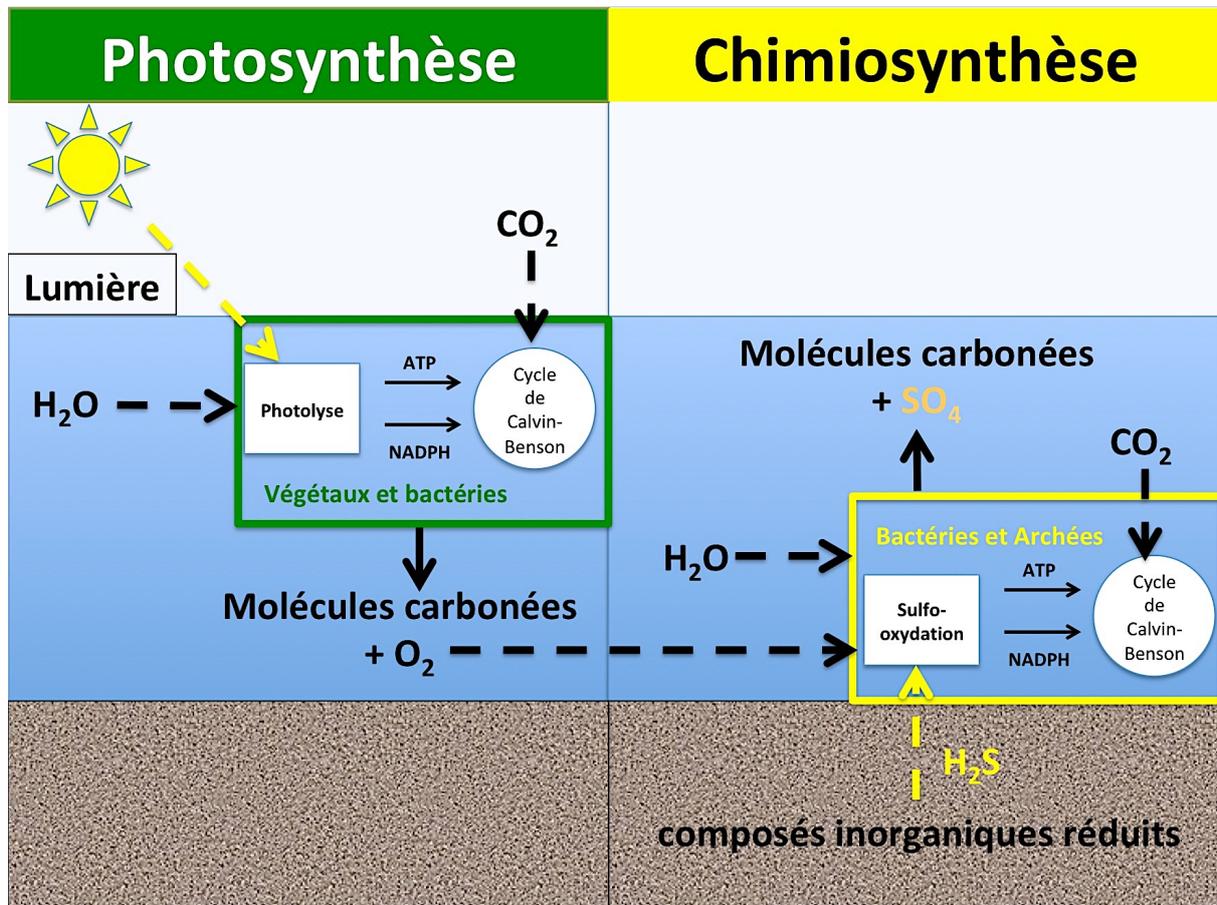


Figure 19. Schéma montrant les différentes voies d'accès à l'énergie pour la photosynthèse et la chimiosynthèse (modifié d'après Desbruyères, 2010). La chimiosynthèse est une voie métabolique parallèle à la photosynthèse qui diffère de celle-ci par l'origine de l'énergie employée pour le fonctionnement du cycle de Calvin-Benson qui produit des molécules carbonées. Lors de la photosynthèse, la lumière est la source d'énergie qui permet à la chlorophylle de prendre ses électrons à l'eau en libérant de l'oxygène. Le transport d'électrons et le fonctionnement de la pompe protonique qui s'ensuit permettent de produire des molécules biologiques riches en énergie (ATP et NADPH). Dans le cas de la chimiosynthèse, c'est l'oxydation d'un composé minéral réduit (donneur d'électrons) par les micro-organismes qui va permettre de synthétiser les molécules biologiques riches en énergie. Le plus souvent, c'est l' $H_2S$  qui est utilisé comme donneur d'électrons. L'oxygène contenu dans l'eau de mer est l'accepteur d'électrons dans la majorité des cas mais en conditions anoxiques c'est généralement l' $H_2$  qui est le donneur d'électrons alors que les accepteurs peuvent être le gaz carbonique, les sulfates, les nitrates ou le soufre élémentaire. Dans tous les cas, c'est le  $CO_2$  dissout qui est la source de carbone.

Il existe plusieurs types de métabolismes (Tableau 1 et 2), selon que le donneur d'électron et la source de carbone soient de nature organique (organotrophe) ou minérale (lithotrophe) (McCollom et Shock, 1997). Cependant, le plus souvent, le terme de chimiosynthèse est utilisé en référence aux métabolismes chimioautolithotrophes (Tableau 1 et 2). Les bactéries chimiosynthétiques sont de formes très variées (coques, bâtonnets, ou filamenteuses), elles se développent à des températures comprises entre quelques degrés et  $113\text{ }^\circ\text{C}$  (hyperthermophiles) (Zinder et Dworkin, 2006). Elles peuvent être libres dans les fluides ou associées à des particules dans l'eau, former d'épais tapis à la surface des rochers

ou du sédiment (Fiala-Médioni, 2000 ; Zinder et Dworkin, 2006) ou encore être associées symbiotiquement à des invertébrés et des protistes (Dubilier *et al.*, 2008 ; Moya *et al.*, 2008). Si le métabolisme sulfo-oxydant est le plus répandu, les oxydations anaérobies et aérobies du méthane sont aussi importantes dans les symbioses chimiosynthétiques (Dubilier *et al.*, 2008). En ce qui concerne le méthane, il peut également servir comme source de carbone. La méthanotrophie ne peut donc pas être qualifiée de processus autotrophe si le méthane est d'origine biogénique ou si le carbone utilisé ne provient pas du CO<sub>2</sub>. Sinon, il s'agit simplement d'un recyclage du carbone fixé lors d'une photosynthèse ancienne (Fiala-Médioni, 2000).

**Tableau 2. Récapitulatif des différents métabolismes chimiosynthétiques. Le signe + indique que le métabolisme est largement répandu et est accessible à une grande diversité de procaryotes (Duperron, 2005).**

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

## 2. Les environnements marins chimiosynthétiques

Le fonctionnement des écosystèmes à base chimiosynthétique est conditionné par la présence de concentrations élevées en composés réduits tels que les sulfures (HS<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>S), le thiosulfate ou encore le méthane (Fiala-Médioni, 2000 ; Van Dover, 2000 ; Cavanaugh *et al.*, 2006). Ces composés sont une source d'énergie chimique importante et perpétuelle pour les bactéries chimioautotrophes mais sont également toxiques pour les autres organismes, notamment les métazoaires, pouvant vivre dans ces environnements contraignant (Ramirez-Llodra *et al.*, 2010). Une exposition trop longue au sulfure d'hydrogène par exemple provoque un empoisonnement de la cytochrome oxydase C. Cette enzyme, essentielle dans la

chaîne respiratoire cellulaire, se situe dans la mitochondrie et son inhibition peut conduire à une asphyxie cellulaire. Dans le cas des écosystèmes chimiosynthétiques profonds, les organismes sont souvent confrontés à l'absence de lumière, aux pressions élevées et à la pauvreté en apports organiques d'origine photosynthétiques (Fiala-Médioni, 2000). De plus, ces écosystèmes océaniques profonds peuvent présenter des concentrations importantes en métaux et autres composés (Si, P, V, Mn, Mg, Fe, Cu, et Zn) ainsi qu'en hydrocarbures (Leveille et Juniper, 2003 ; Levin *et al.*, 2016) toxiques pour de nombreux organismes. Les principaux écosystèmes chimiosynthétiques permettant le développement de communautés thiotrophiques et méthanotrophes sont décrits ci-dessous.

### **a. Les sources hydrothermales**

Les sources hydrothermales se retrouvent dans tous les océans au niveau des zones à forte activité tectonique et des zones d'expansion ou d'accrétion du plancher océanique (Figure 20). Les sources hydrothermales profondes résultent de l'infiltration de l'eau de mer dense et froide (2 °C), parfois sur plusieurs kilomètres de roches, à travers les fissures de la croûte océanique rendue fragile par l'activité tectonique (Jannasch, 1995). À l'approche de la chambre magmatique et au contact des roches en fusion, l'eau s'échauffe et perd en densité (Kelley *et al.*, 2002). Sous l'effet des pressions hydrostatiques et lithosphériques, le fluide surchauffé remonte à la surface en lessivant les roches basaltiques et se charge ainsi en ions métalliques (e.g.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Si}^+$ ) et en gaz dissous (e.g.  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ) (Von Damm, 1995). La composition du fluide varie en fonction des roches traversées lors de son parcours. Le fluide peut atteindre des températures supérieures à 350 °C et jaillir directement au travers du plancher océanique sous la forme de fumées noires ou être dilué avant sa sortie ; on parlera alors de fumées blanches (Leveille et Juniper, 2003). Lorsque le fluide est émis sans dilution préalable, les sulfures polymétalliques précipitent pour former des édifices hydrothermaux lors du mélange avec l'eau de mer (Goldfarb, 1983).

### **b. Les suintements froids**

Les suintements froids sont des émissions diffuses de fluides au travers des sédiments dont la température se distingue peu de celle de l'eau environnante (Laubier, 1990 ; Aharon, 2000 ; Leveille et Juniper, 2003). Ces émissions de fluides sont d'origine et de composition très variables. Ces suintements se produisent sous une variété de forces tectoniques. Elles se trouvent généralement au niveau des prismes d'accrétion formés lors de la subduction d'une plaque lithosphérique sous une autre, au bord des volcans de boue, aux niveaux des zones de

remontée de diapirs salifères, à travers les sédiments de marge continentale ou en liaison avec des infiltrations d'hydrocarbures (Ott *et al.*, 2004a). Les fluides expulsés diffèrent chimiquement de l'eau de mer environnante (Figure 20). Comme le débit est généralement lent et que les fluides ne présentent que de petites différences de température avec celle de l'eau de mer, ces sites sont appelés « suintements froids » (Tunnicliffe *et al.*, 2003). Ils sont anoxiques et peuvent contenir du méthane ou des sulfures, des hydrocarbures ou des concentrations élevées de sel, mais pas les concentrations élevées de métaux lourds typiques des événements hydrothermaux (Ott *et al.*, 2004a).

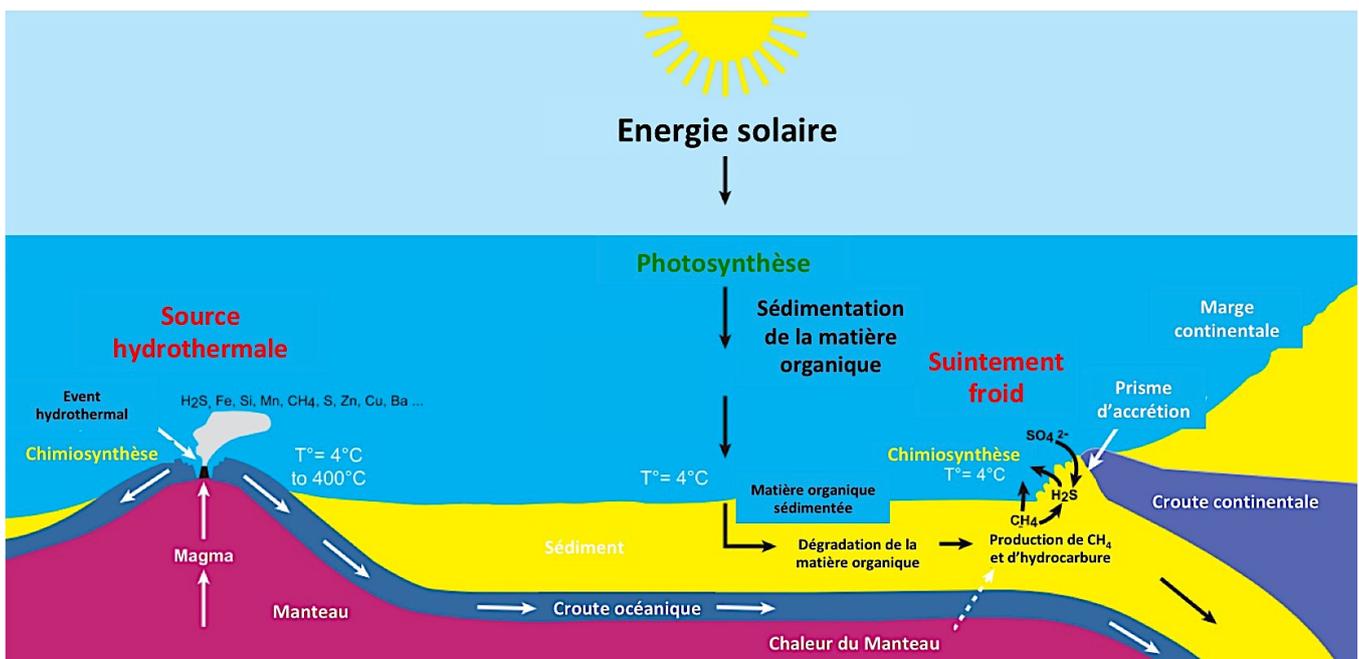


Figure 20. Schéma du fonctionnement des sources hydrothermales et suintements froids (modifié d'après Ramirez-Llodra *et al.*, 2010). Dans le cas des suintements froids, le méthane est produit par thermogénie dans les sédiments ou par des processus biogènes impliquant des archées méthanogènes. Le sulfure est produit par des bactéries sulfato-réductrices qui forment un consortium avec des archées méthanotrophes.

### c. Les Whales Falls et Wood Falls

Il peut également arriver que de grandes quantités de matière organique tombent sur le fond marin sous forme de carcasses de baleines ou de bois coulés (respectivement « whale falls » et « wood falls »). Lorsqu'il s'agit de carcasses de baleines, les sédiments autour de la carcasse ainsi que les os deviennent fortement sulfurés en raison de la dégradation microbienne des restes de baleines riches en matières organiques au niveau des sédiments et des lipides contenus dans la moelle des os (Deming *et al.*, 1997 ; Smith et Baco, 2003). Des études récentes menées sur des carcasses de baleines naturelles ou implantées en eau profonde au large de la Californie, aux États-Unis, indiquent qu'il existe au moins trois stades successifs de colonisation (Smith et Baco, 2003) :

- un stade de plusieurs mois à plusieurs années, au cours duquel les charognards (requins-dormeurs, myxines, grenadiers, invertébrés) éliminent les tissus mous des baleines ;
- un stade d'enrichissement d'espèces opportunistes (durée de plusieurs mois à années) au cours duquel des sédiments enrichis en matière organique et les os exposés à la surface du sédiment sont colonisés par des assemblages denses de polychètes et de crustacés opportunistes ;
- un stade sulfurique qui peut durer des décennies, durant lequel un grand assemblage trophique complexe, riche en espèces, vit sur le squelette. Celui-ci émet des sulfures qui proviennent de la dégradation anaérobie des lipides osseux par des bactéries sulfato-réductrices (BSR) qui vont réduire les sulfates de l'eau de mer en  $H_2S$  (Figure 21). C'est durant ce stade qu'apparaissent des bactéries chimioautotrophes qui oxydent le soufre (ou bactéries sulfo-oxydantes). Ces bactéries peuvent vivre sous forme libres ou être associées à des invertébrés comme les bivalves des genres *Idas* (Smith et Baco, 2003), *Adipicola* et *Solemya* (Fujiwara *et al.*, 2007). D'autres animaux sont spécifiques de cet écosystème comme les vers Siboglinidae appartenant au genre *Osedax* (Verna *et al.*, 2010).

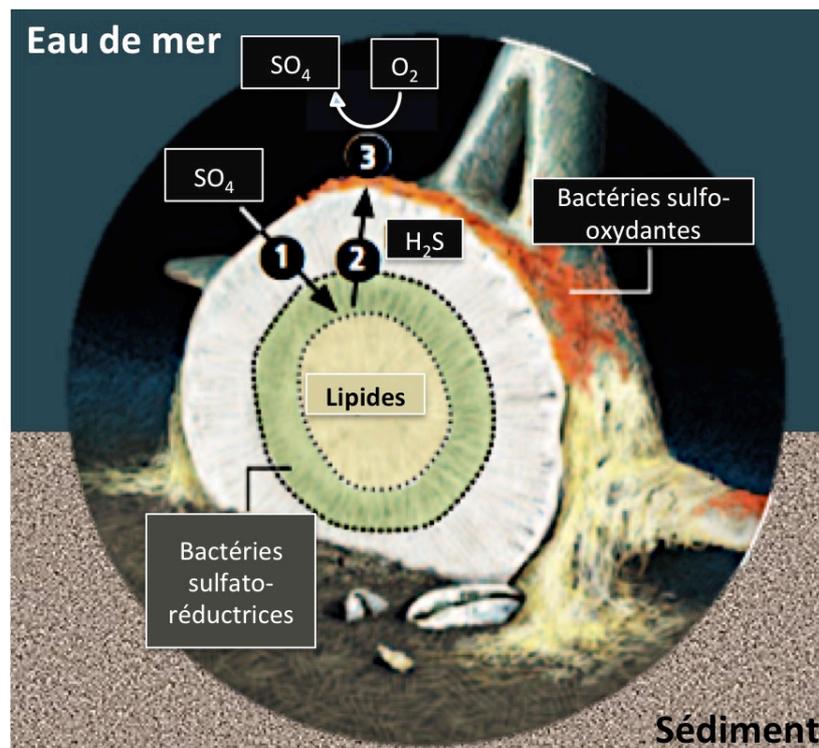


Figure 21. Représentation schématique du processus d'émission de sulfures au niveau des « whale falls » (Little, 2010). Les bactéries anaérobies sulfato-réductrices dans les os (zone verte) extraient l'oxygène du sulfate d'eau de mer ( $SO_4$ ) et l'utilisent pour digérer lentement les lipides des os (1). Le sulfure d'hydrogène ( $H_2S$ ) est rejeté comme déchet (2). Les bactéries sulfo-oxydantes (orange) vont utiliser cet  $H_2S$  comme source d'énergie en utilisant l'oxygène de l'eau de mer comme accepteur d'électrons (3)

En ce qui concerne les « wood falls », les conditions nécessaires à l'établissement de communautés chimiosynthétiques sont fortement dépendantes de l'activité métabolique de bactéries cellulolytiques et de bactéries sulfato-réductrices (BSR) (Bienhold *et al.*, 2013). La colonisation initiale du bois se fait par une faune spécialisée d'opportunistes (en général des amphipodes et d'autres crustacés) et par des bivalves xylophages qui vont creuser des galeries dans le bois. Ils contribuent à l'apparition de micro-niches anoxiques nécessaires au fonctionnement du métabolisme des bactéries sulfato-réductrices qui vont réduire les sulfates présents dans l'eau de mer et produire des sulfures. Les bivalves de la sous-famille des *Xylophaginae* (famille des *Pholadidae*) sont les principaux décomposeurs de bois coulés sur les fonds marins, ils possèdent des bactéries symbiotiques cellulolytiques qui leur permettent de dégrader la cellulose (Bienhold *et al.*, 2013). Ces bivalves d'eau profonde occupent la même niche écologique que leurs homologues des eaux peu profondes de la famille des *Teredinidae* (les tarets). Les tarets colonisent le bois qui dérive dans les eaux de surface, tandis que les larves de *Xylophaginae* se déposent sur les bois coulés présents dans les zones benthiques de profondeur modérées à abyssales (Palacios *et al.*, 2009 ; Bienhold *et al.*, 2013). Les symbiotes des tarets ont été identifiés comme appartenant aux  $\gamma$ -protéobactéries cellulolytiques et fixatrices d'azote (Waterbury *et al.*, 1983 ; Distel *et al.*, 2002).

La suite de la décomposition du bois est réalisée par une succession d'organismes : des champignons, des bactéries et des archées (Fagervold *et al.*, 2012). La dégradation de la cellulose par les champignons et les bactéries cellulolytiques va produire de la cellobiose et du glucose. Les bactéries et archées vont par la suite fermenter ces composés en acides organiques, en  $\text{CO}_2$  et en  $\text{H}_2$ . Il a été montré que l'hémicellulose est plus facilement dégradable que la cellulose, alors que la lignine est très difficile à dégrader et peut maintenir la structure du bois même lorsque les autres composants sont dégradés (Clausen, 1996 ; Fagervold *et al.*, 2012). Dans les environnements marins, en raison de la concentration élevée de sulfate, les bactéries sulfato-réductrices peuvent neutraliser l'activité des méthanogènes pour l'utilisation du dihydrogène (Leschine, 1995). Cela peut donc conduire à un enrichissement d' $\text{H}_2\text{S}$  à la surface du bois, comme l'ont observé Laurent *et al.*, (2009) dans du bois coulé présent dans les écosystèmes de mangrove (Figure 22).

Les micro-organismes chimioautotrophes peuvent alors utiliser les sulfures comme source d'énergie, comme cela a déjà été observé au niveau des sources hydrothermales, des suintements froids (Jørgensen et Boetius, 2007), des whale falls (Deming *et al.*, 1997 ; Goffredi *et al.*, 2008 ; Goffredi et Orphan, 2010) ou encore chez les bactéries

endosymbiotiques présentes dans les branchies des bivalves colonisant les bois coulés (Duperron *et al.*, 2009 ; Lorion *et al.*, 2009). Les espèces tolérantes aux sulfures sont parmi les premiers colonisateurs et dominant sur plusieurs semaines lorsque la teneur en sulfure est maximale, suivie par des espèces opportunistes moins tolérantes lorsque le sulfure diminue (Laurent *et al.*, 2013). Les communautés de procaryotes colonisant les bois coulés sont très diversifiées car elles impliquent deux composantes : la première est représentée par une communauté de bactéries hétérotrophes qui dégradent le bois grâce à divers processus aérobie et anaérobie et dont l'activité va produire principalement des sulfures. La seconde est représentée par, une communauté de bactéries chimiosynthétiques sulfo-oxydantes qui vont utiliser les sulfures comme source d'énergie.

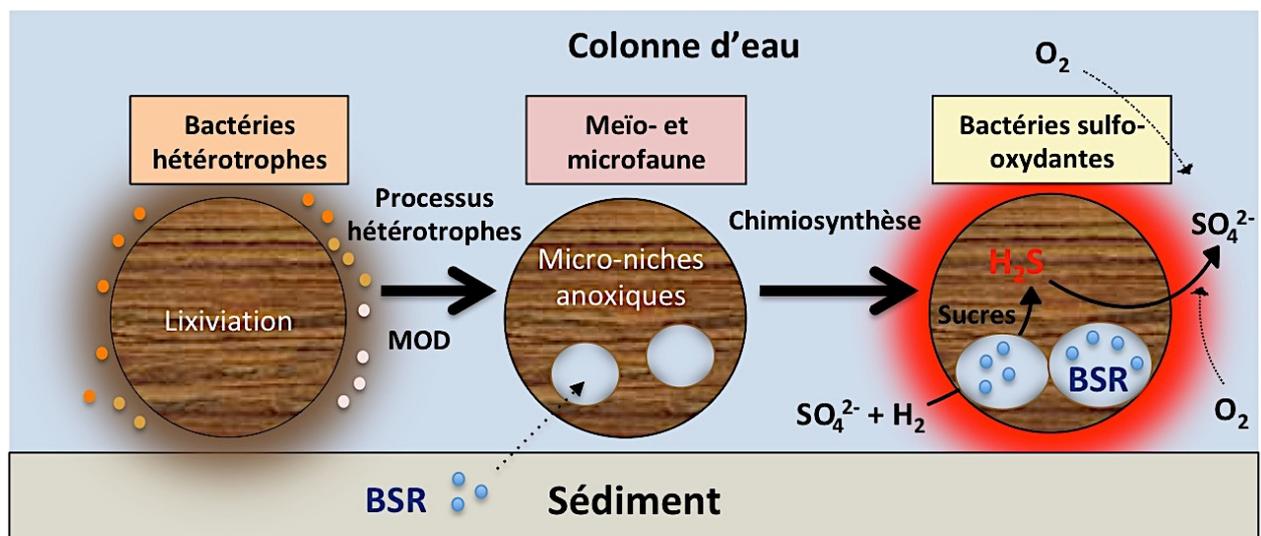


Figure 22. Représentation schématique du processus d'émissions de sulfures au niveau des bois coulés. L'eau de mer pénètre vers l'intérieur du bois (représenté en coupe transversale) posé sur le sédiment marin. Les composés les plus solubles sont rapidement dégradés par des bactéries hétérotrophes qui vont coloniser le bois. Des micro-niches anoxiques vont apparaître à l'intérieur du bois grâce à l'action combinée des bactéries hétérotrophes et d'organismes de la meïo- et macrofaune. Des bactéries sulfato-réductrices provenant du sédiment vont alors se développer à l'intérieur du bois et dégrader la cellulose en conditions anaérobies en utilisant les sulfates de l'eau de mer comme accepteurs d'électrons. Enfin, les sulfures résultant de cette réduction des sulfates vont diffuser vers la surface du débris, permettant ainsi le développement d'organismes chimiosynthétiques sulfo-oxydants à l'interface entre l'eau de mer et la couche d'eau enrichie en sulfures.

#### d. Les sédiments côtiers réduits

C'est de loin le plus grand habitat thiotrophique en terme de surface, les sédiments côtiers réduits sont présents sur une grande majorité du plateau continental (Ott *et al.*, 2004a). Ils comprennent aussi bien les sables intertidaux et vasières que les marécages, les herbiers de phanérogames marines et les sédiments de mangroves (Figure 23). On en retrouve aussi au niveau des bassins dysoxiques et au niveau des sédiments de la pente continentale (Ott *et al.*, 2004a). La couche oxique des sédiments de surface est d'épaisseur variable, allant de quelques millimètres à plusieurs centimètres. La séparation avec la couche anoxique du dessous se fait

au niveau d'une chemocline : la « couche de discontinuité du potentielle redox » où « redox potential discontinuity layer (RPD) » en anglais (Fenchel et Riedl, 1970). Dans la couche anoxique, les bactéries sulfato-réductrices vont réduire les sulfates, provenant de l'eau de mer ayant diffusée à travers le sédiment et vont produire du sulfure dans les couches plus profondes. La diffusion vers le haut du sulfure conduit à son oxydation chimique par l'oxygène présent dans l'eau de mer. De nombreux micro-organismes, notamment des bactéries, utilisent l'énergie libre de ce processus d'oxydation pour la fixation du carbone (Jørgensen, 1989). Ces bactéries, et parfois les organismes associés, doivent donc s'installer ou être capables de se déplacer au niveau de l'interface oxygène-anoxique du sédiment et de l'eau de mer afin de pouvoir bénéficier de la production de sulfures provenant des couches inférieures du sédiment avant que ceux-ci ne soient naturellement oxydés. Dans les eaux peu profondes, les débris provenant des marais et des mangroves, des algues ou des herbiers marins peuvent s'accumuler dans des endroits tels que des dépressions, des crevasses, des grottes ou encore des anfractuosités entre les rochers (Fenchel, 1970 ; Mann, 1976). La décomposition de cette matière organique crée des habitats sulfidiques de diverses étendues spatiales et temporelles (Ott *et al.*, 2004a). La vase de mangrove est un substrat relativement stable ayant des concentrations internes de sulfures allant jusqu'à 4 mM (McKee, 1993). La diffusion du sulfure dans l'eau sus-jacente crée une couche limite sulfureuse de quelques millimètres d'épaisseur (Ott *et al.*, 1998 ; 2004a). D'autre part, la diffusion de sulfures provenant de la dégradation des débris végétaux présents en surface du sédiment est beaucoup moins stable et prévisible que la vase de mangrove. Cependant, lorsque les débris végétaux sont rassemblés sous les racines de palétuviers, les conditions deviennent plus propices à la production de sulfures. En effet, les masses d'eau sont ralenties sous les racines de palétuviers, ce qui permet aux débris végétaux de se déposer et de se décomposer à la surface du sédiment marin au lieu d'être emportés par le courant (Gontharet *et al.*, 2017).

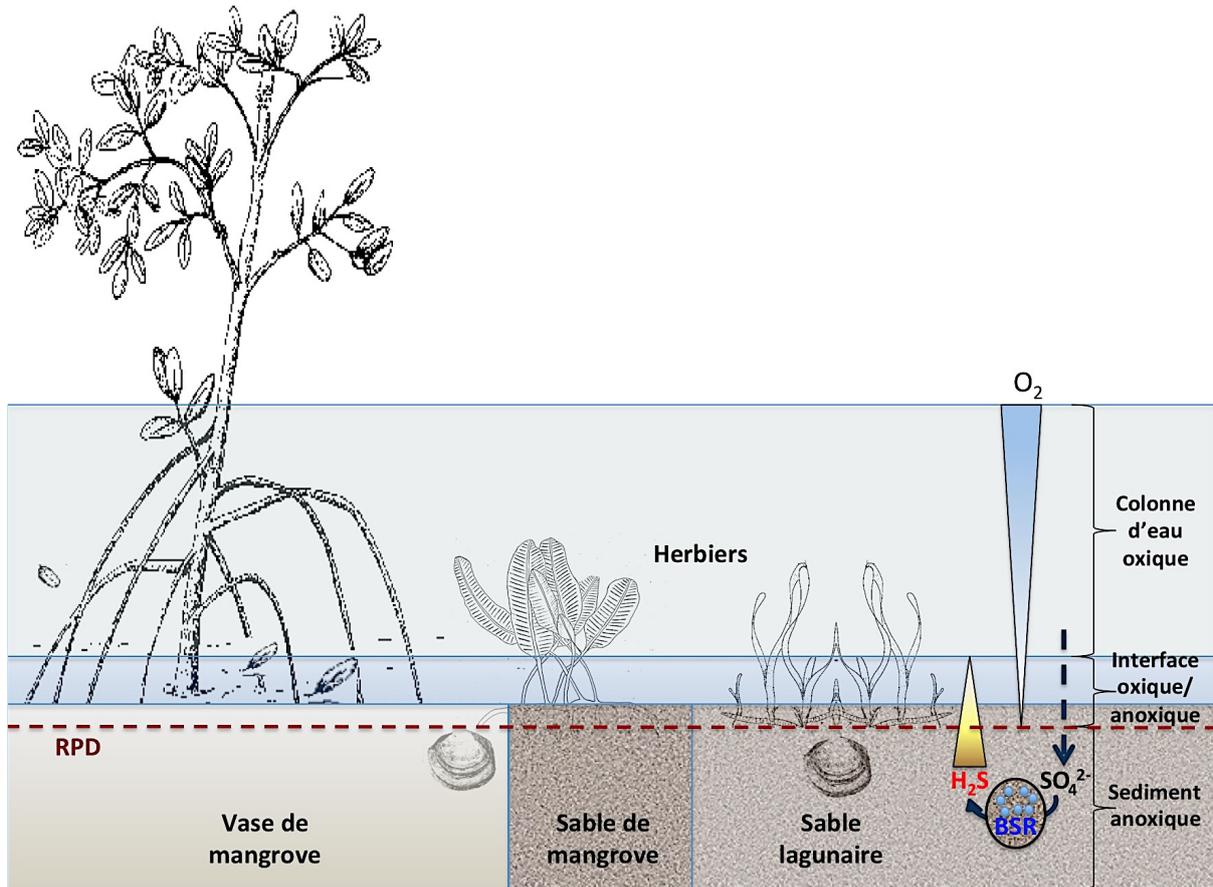


Figure 23. Représentation schématique des différents processus d'émission de sulfures dans les sédiments de mangroves et dans les sables anoxiques côtiers des herbiers marins. Le sulfure est produit dans le sédiment grâce à l'activité de bactéries sulfato-réductrices. Ces bactéries vivant en conditions anaérobies vont réduire le sulfate présent dans l'eau de mer et produire des sulfures qui vont diffuser à travers les sédiments et dans l'eau de mer. La chemocline encore appelée couche de discontinuité du potentiel redox (RPD) correspond à l'interface entre les sédiments anoxiques et les sédiments de surface oxygénés.

### 3. Symbioses entre ciliés et bactéries sulfo-oxydantes

#### a. *Kentrophoros* sp.

Une vingtaine d'espèces appartiennent au genre *Kentrophoros* et vivent dans les sédiments côtiers sablonneux anoxiques (Fenchel et Finlay, 1989). Peu de temps après la description de la première espèce (Sauerbrey, 1928), il a été montré que la surface dorsale de ces ciliés était recouverte de bactéries en forme de bâtonnets contenant des granules de soufre (Kahl, 1935). Raikov (1971 ; 1974) a suggéré que le métabolisme des bactéries était de nature chimiolithoautotrophique et a montré que les bactéries étaient phagocytées par le cilié. Les spécimens de *Kentrophoros* ont une forme de ruban. Cette forme extrêmement aplatie est interprétée comme une adaptation pour fournir plus d'espace aux symbiotes bactériens. Le côté ventral porte des cils disposés en rangées longitudinales. Ces organismes ne possèdent pas de structures buccales fonctionnelles, ils ne possèdent qu'un cytostome vestigial

(Foissner, 1995). Les bactéries en forme de bâtonnets occupent le côté dorsal, dépourvu de cils, de *Kentrophoros* (Figure 24). Ce sont des bactéries Gram-négatif, non mobiles qui se divisent par fission longitudinale. En plus de contenir des quantités plutôt importantes de polysaccharides, elles contiennent des granules de soufre élémentaire qui font prendre une couleur blanche aux individus observés sous microscope optique (Fauré-Fremiet, 1950b ; Görtz, 2006). Cette coloration peut être une bonne indication du métabolisme thiotrophique de ces bactéries qui appartiennent probablement aux bactéries pourpres sulfureuses (Görtz, 2006). Ces ciliés absorbent les bactéries ectosymbiotiques à l'aide de protrusions cytoplasmiques ressemblant à des pseudopodes pour se nourrir. Cela peut se produire n'importe où sur le côté dorsal non cilié de *Kentrophoros* (Figure 24). Ils les enferment ensuite dans des vacuoles alimentaires afin de les digérer. La forme unique de la phagocytose découverte chez ces espèces a été appelée « phagocytose aléatoire » (Görtz, 2006). D'après le contenu de la vacuole alimentaire de ces ciliés, leurs bactéries épizoïques semblent être leur principale source de nutrition. De plus, ces ciliés hébergent un microbiote spécifique de bactéries ecto- et endosymbiotiques.

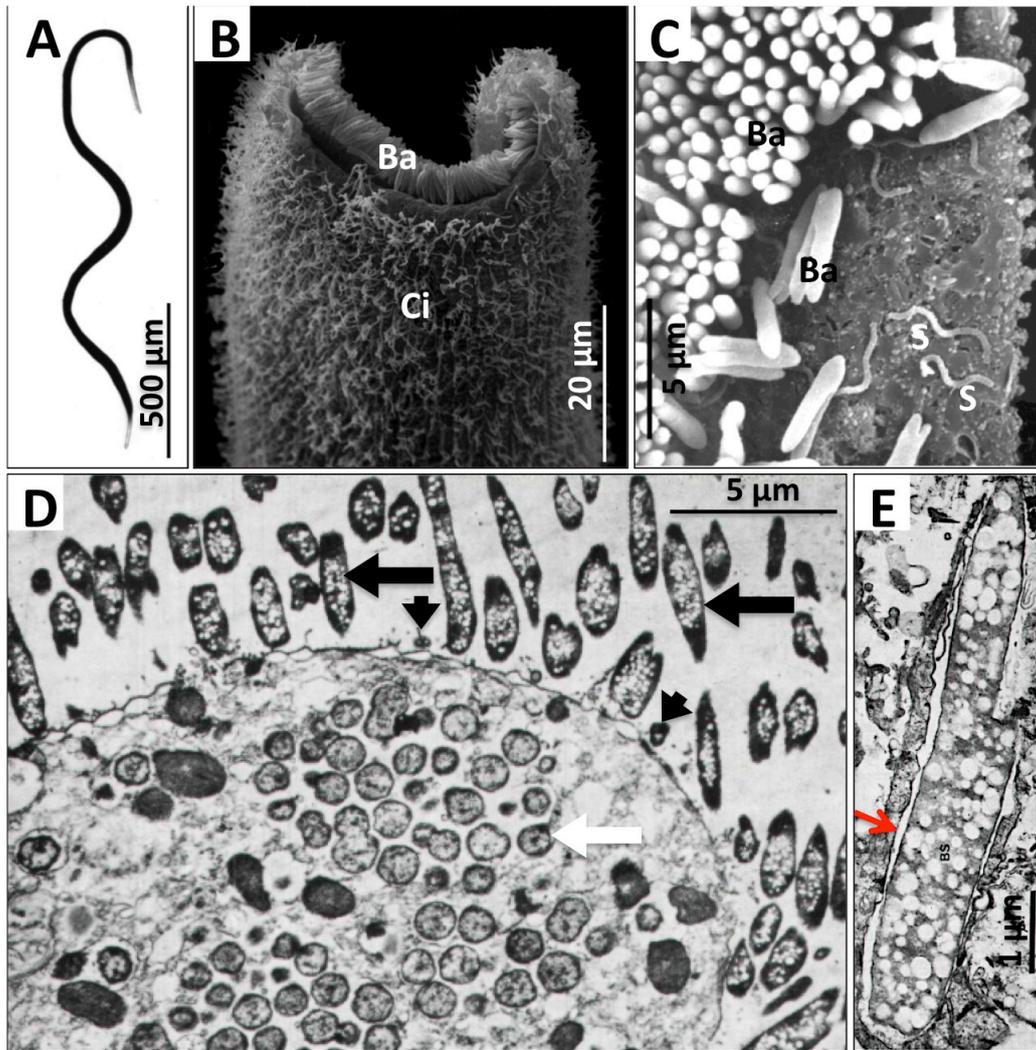


Figure 24. *Kentrophoros* et ses bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes : (A) *K. fistulosus* observé au microscope optique. Les observations au MEB (B) montrent des bactéries (Ba) sur la face dorsale tandis que la face ventrale est recouverte de cils (Ci). (C) D'autres bactéries de forme spiralée (S) sont également présentes à la surface du cilié (modifié d'après Ott *et al.*, 2004a). (D et E) Les observations faites au MET de *K. latum* (modifié d'après Raikov, 1971) montrent la présence de granules de soufre à l'intérieur du cytoplasme des bactéries ectosymbiotiques (flèches noires). Elles possèdent la double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatif (flèche rouge). On observe également les spirochètes (tête de flèche noire) présents à la surface du cilié ainsi que la présence de bactéries endosymbiotiques (flèche blanche).

### b. *Zoothamnium niveum*

Le cilié péritriche colonial sédentaire *Zoothamnium niveum* (Hemprich et Ehrenberg, 1831 ; Ehrenberg, 1838) a été découvert à l'origine dans la mer Rouge et il est devenu l'un des protistes ciliés symbiotiques les plus étudiés à ce jour. Bien que les auteurs aient été frappés par son apparence blanche, ils n'ont pas pu l'attribuer à l'époque à la présence de bactéries ectosymbiotiques thiotrophiques. *Z. niveum* a par la suite été observé fixé aux parois des canaux, façonnés par l'écoulement de l'eau, dans la tourbe des mangroves associées au système récifal de la barrière du Belize (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a). Les colonies peuvent atteindre jusqu'à 15 mm de long et sont formées de différentes cellules : les macrozoïdes, les

microzoïdes et les zoïdes terminaux (Figure 25). Les microzoïdes possèdent un cytopharynx fonctionnel et une structure de cils complète servant à l'alimentation de la colonie tandis que les macrozoïdes moins nombreux, localisés à la base des branches, possèdent des cils mais pas de cytopharynx fonctionnel. Les macrozoïdes ont un rôle de dispersion de la colonie. En effet, ils peuvent se détacher de la colonie et aller se fixer sur un substrat propice au développement d'une nouvelle colonie (Rinke *et al.*, 2007). Les macrozoïdes détachés sont alors appelés « Swarms ». Ces différentes cellules sont organisées le long d'une tige contractile appelée stolon produisant des branches alternées. Le stolon permet également à la colonie de se fixer à son substrat grâce à un disque adhésif. Cela lui confère une morphologie typique très semblable à celle d'une plume (Figure 25). La tige et les branches composant le stolon contiennent un spasmonème contractile qui permet à la colonie de se contracter rapidement en forme de « Zig-Zag ». Les extrémités de la tige et des branches encore en croissance portent des zoïdes terminaux ne possédant ni cils, ni cytopharynx pour s'alimenter. Ces zoïdes se divisent par fission longitudinale inégale et vont produire toutes les autres cellules de la colonie. À l'exception de la partie basale non contractile du stolon, les branches et les zoïdes sont densément couverts de bactéries symbiotiques thiotrophiques (Figure 25) (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; 1996b). D'après l'analyse phylogénétique, ces bactéries appartiennent aux  $\gamma$ -protéobactéries (Ott *et al.*, 2004a). De plus, ces bactéries possèdent une double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatif mais également de nombreuses inclusions blanches dans leur cytoplasme. Ces inclusions blanches ont été caractérisées comme étant des déchets métaboliques sous forme de granules de soufre élémentaire, suggérant ainsi une nature thioautotrophique des bactéries. Cette hypothèse a été vérifiée par la présence du gène codant pour la RuBisCO et par la fixation de carbone 14 radiomarqué chez le symbiote lors d'une analyse par autoradiographie (Rinke, 2002). D'après Rinke (2002), le carbone est ensuite transféré des symbiotes à l'hôte lors de la digestion des bactéries ectosymbiotiques qui sont ingérés et par le biais de molécules carbonées relâchées par le symbiote. Récemment, un transfert de carbone direct entre les bactéries ectosymbiotiques et les différentes cellules de *Z. niveum* a été montré sans ingestion préalable des bactéries. Les bactéries produisent des acides aminés via le cycle de Calvin-Benson qui sont transférés à *Z. niveum* (Bright *et al.*, 2014 ; Volland *et al.*, 2018).

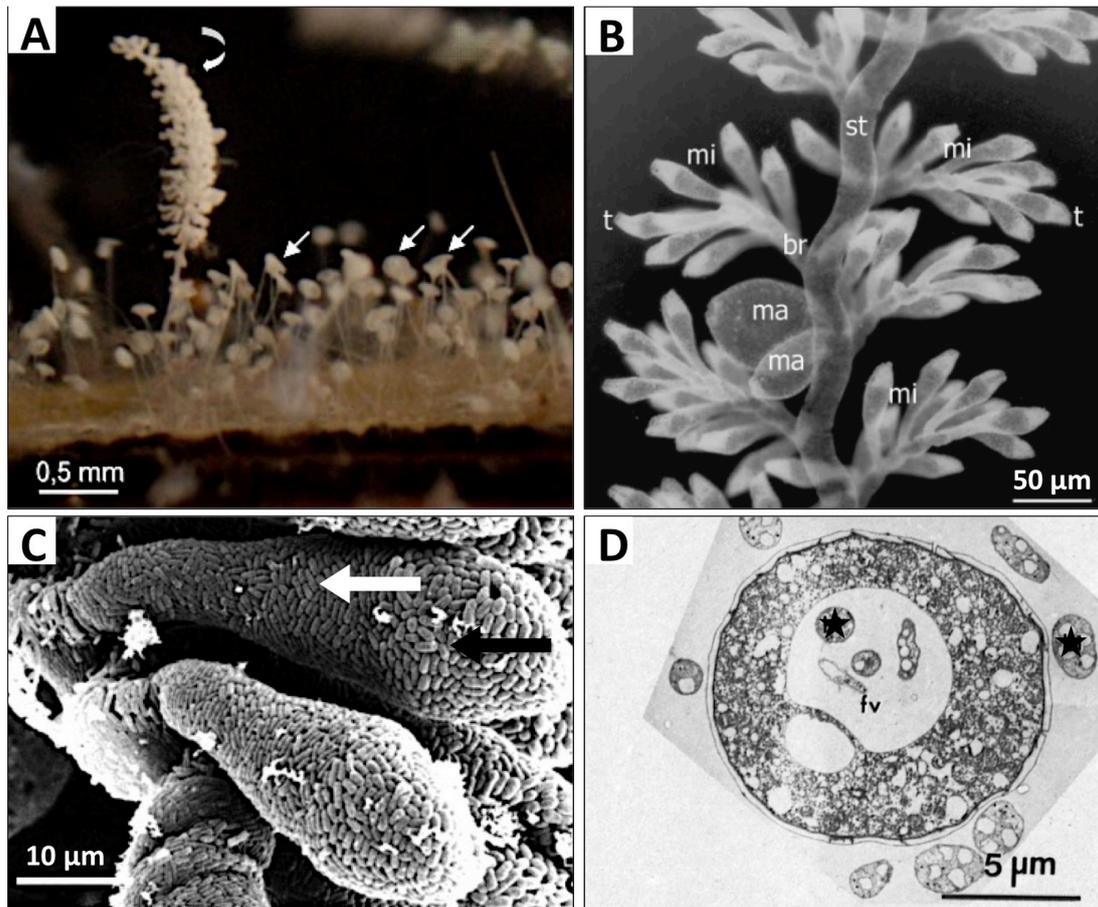


Figure 25. *Zoothamnium niveum* et ses bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes : (A) *Zoothamnium niveum* (flèche incurvée), fixé à la surface d'un débris végétal en mangrove, parmi de nombreux Vorticellidae (flèches blanches) (Laurent *et al.*, 2009). Les observations au microscope optique (B) permettent de mettre en évidence la structure de la colonie. Les microzoïdes (mi) se trouvent sur les branches alternées (br) qui poussent le long du stolon contractile (st). À l'extrémité de chaque branche se trouve un zoïde terminal (t) tandis que les macrozoïdes (ma) se trouvent à la base des ramifications et sont attachés au stolon (Rinke *et al.*, 2006). Les observations au MEB (C) montrent les bactéries ectosymbiotiques à la surface des microzoïdes (modifié d'après Ott *et al.*, 2004a). Les bactéries peuvent avoir une forme de coccobacilles (flèche noire) ou une forme de bâtonnets (flèche blanche). Les observations au MET (D) des microzoïdes (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a) montrent la présence de granules de sulfures à l'intérieur du cytoplasme des bactéries (étoiles). Les bactéries ectosymbiotiques ingérées sont également présentes à l'intérieur de vacuoles alimentaires (fv).

### c. *Vorticella* sp.

Le protiste cilié péritriche *Vorticella* sp. (Figure 26) a également été décrit au niveau des tourbes sulfidiques des mangroves du Belize (Ott et Bright, 2004). Cet organisme est un cilié solitaire pseudo-colonial comme tous les membres du même genre. Les individus sont composés d'un zoïde, présent à l'extrémité d'un long stolon (350-500 µm), qui leur permet de s'attacher au substrat grâce à un disque basal. Les formes des zoïdes sont variées et peuvent être utilisées comme critères d'identification pour le diagnostic des espèces (Warren, 1986). Tout comme *Zoothamnium niveum*, le stolon et les zoïdes des espèces de *Vorticella* peuvent se contracter. Cependant à la différence de *Z. niveum*, le stolon de *Vorticella* sp. se contracte cette fois-ci en spirale (Figure 26). La surface du zoïde et la tige entièrement contractile, grâce

à son spasmonème, sont densément couverts par des bactéries qui ressemblent à celles de *Z. niveum* (Vopel *et al.*, 2001 ; Ott et Bright, 2004). Les individus apparaissent également blancs sous lumière incidente. Il n'y a pas encore de données ultrastructurales de ces bactéries et des espèces de *Vorticella* pouvant servir d'hôtes. L'activité enzymatique et les séquences de gènes codants pour l'ARNr 16S des bactéries n'ont pas encore été étudiées. Cependant, l'environnement dans lequel *Vorticella* sp. a été décrit ainsi que leur couleur blanche observée au microscope optique suggèrent un stockage du soufre et un métabolisme chimioautotrophe des bactéries basé sur l'oxydation du soufre. Les vorticelles s'alimentent en produisant un courant d'eau via le mouvement de leurs cils. Le battement des cils forme un vortex qui va entraîner les bactéries dans le cytopharynx. En raison de leur petite taille, les zoïdes sont constamment dans la couche limite sulfidique et dépendent fortement du courant d'eau créé en battant leurs cils pour leur nutrition (Vopel *et al.*, 2001 ; 2002). Les zoïdes se divisent par scission binaire, se détachent et nagent pour s'installer non loin du zoïde parent, produisant ainsi rapidement des patches denses d'individus.

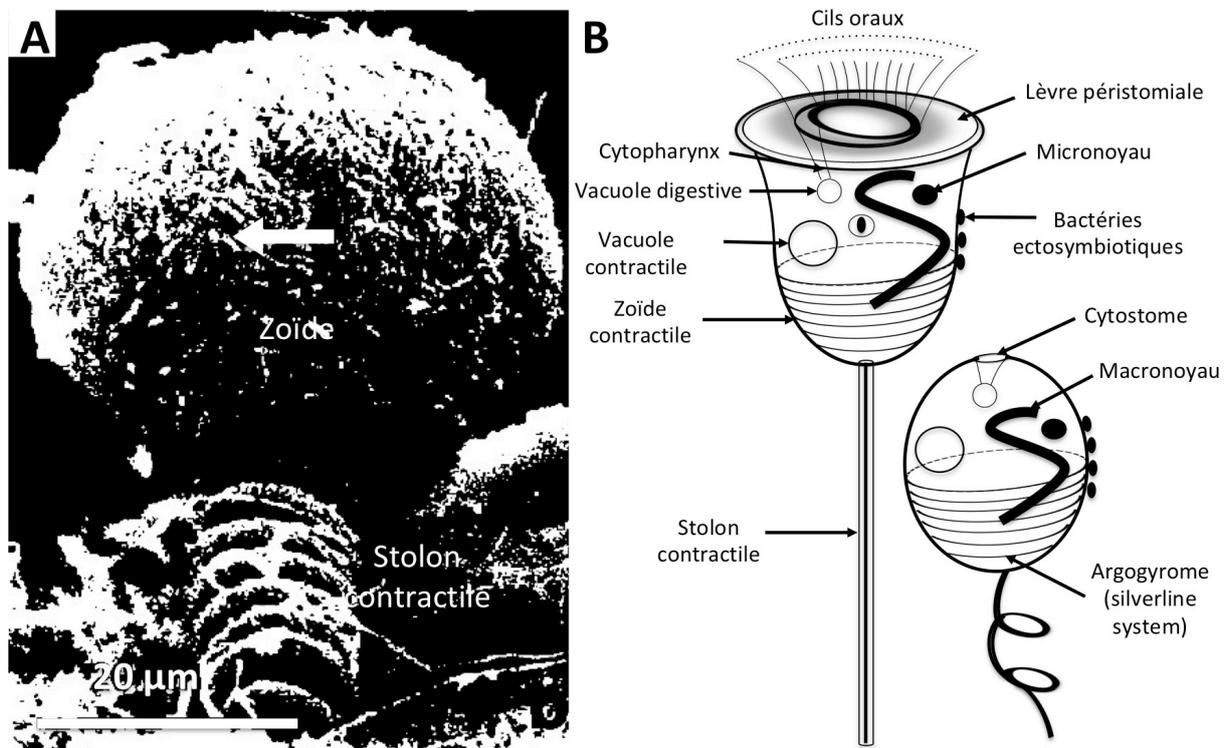


Figure 26. *Vorticella* sp. et ses bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes : Les observations au MEB de *Vorticella* sp. permettent de voir le zoïde recouvert de bactéries ectosymbiotiques (flèche blanche) et le stolon contractile (Ott et Bright, 2004). (B) Schéma simplifié montrant les principaux caractères morphologiques de *Vorticella* sp. (cette thèse).

#### d. *Folliculinopsis* sp.

A ce jour, il n'existe qu'une seule espèce de protiste cilié étudiée vivant au niveau des sources hydrothermales en association avec des bactéries chimiosynthétiques. Le cilié

*Folliculinopsis* est un protiste sessile qui vit à la surface des sédiments marins des sources hydrothermales profondes (Figure 27). Il vit à l'intérieur d'une coquille appelée « lorica » et possède à la fois des bactéries ecto- et endo-symbiotiques, (Kouris *et al.*, 2007). Les colonies de *Folliculinopsis* forment un tapis bleu à la surface du sédiment marin des sites hydrothermaux. Ils possèdent des bactéries filamenteuses attachées sur sa lorica. Cependant, la colonisation de la lorica est irrégulière et aucune structure ne facilite la fixation des ectosymbiotes comme cela a déjà pu être observé chez d'autres espèces ectosymbiotiques (Gaill et Hunt, 1991 ; Desbruyères *et al.*, 1998). De plus, le nombre de bactéries filamenteuses n'est pas plus élevé à la surface du cilié que sur les autres surfaces adjacentes. Tout ceci laisse plutôt supposer que ces bactéries filamenteuses ne sont pas ectosymbiotiques, et qu'il s'agit plus d'un processus de colonisation (ou biofouling) de la lorica par ces bactéries. Un grand nombre de bactéries de forme coccoïde et régulièrement distribuées entre les rangées de cils de *Folliculinopsis* sp., et sur les lobes péristomiaux, suggèrent cette fois-ci une ectosymbiose (Kouris *et al.*, 2007). Ces bactéries ont probablement pu se fixer à la surface du cilié lorsque celui-ci est étendu à l'extérieur de sa lorica. En effet, la simple présence de bactéries à l'intérieur ou à la surface des cellules des ciliés coloniaux, ou autres, n'est pas toujours le signe d'une relation symbiotique. La présence de bactéries intracellulaires chez *Folliculinopsis* sp. amène également à supposer l'existence d'une endosymbiose. Ces bactéries se trouvent à l'intérieur de vacuoles réparties uniformément le long du cortex de *Folliculinopsis* sp. Les bactéries à l'intérieur de ces vacuoles semblent être intactes et avoir échappées au processus de lyse. De plus, des structures similaires aux membranes empilées, denses aux électrons, déjà observées chez les endosymbiotes méthanogènes de moules du genre *Bathymodiolus* (Fujiwara *et al.*, 2000), ont également été observées chez ces bactéries.

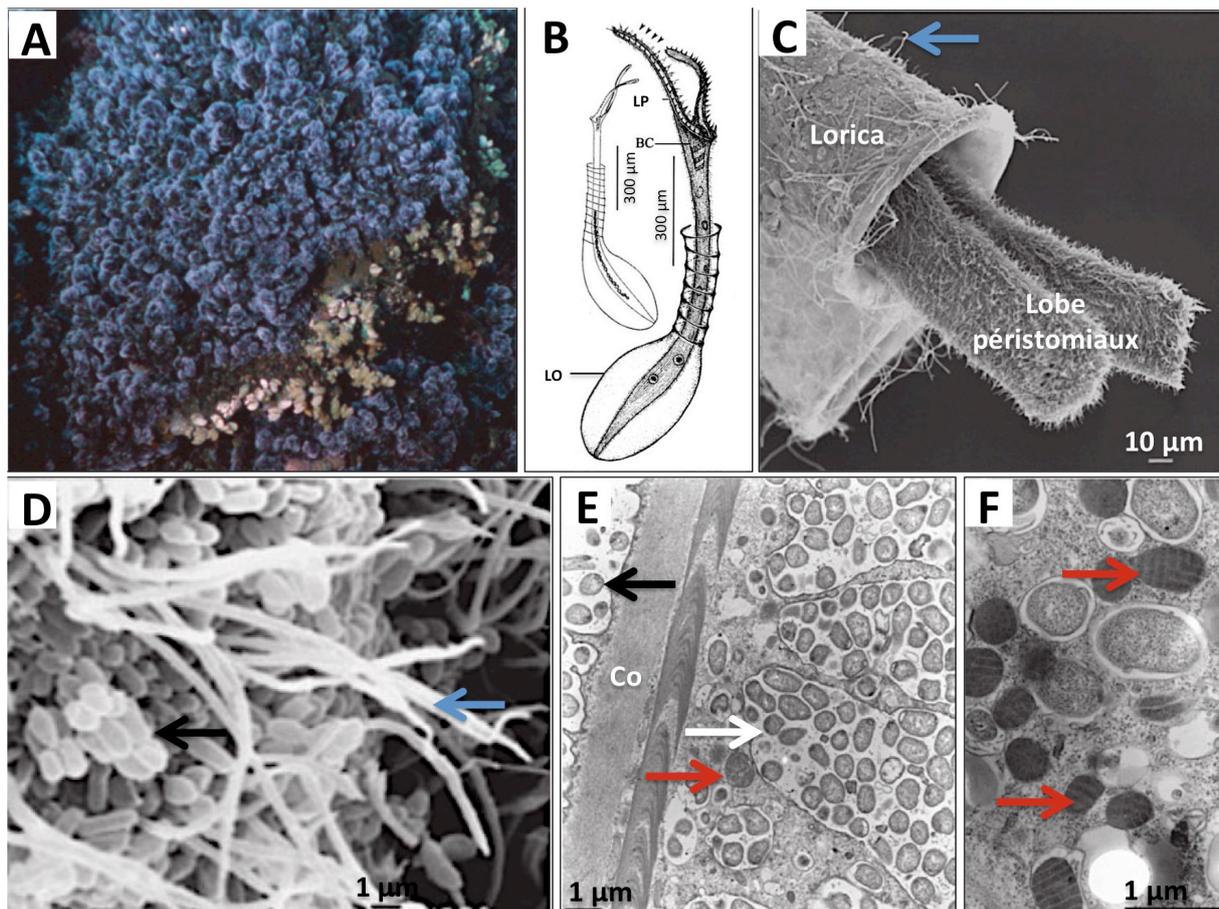
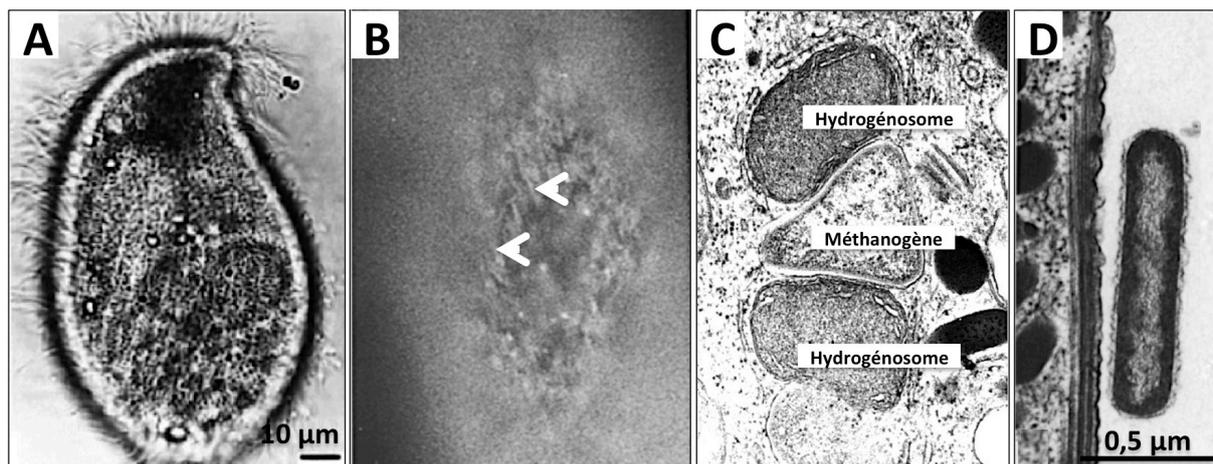


Figure 27. *Folliculinopsis* sp. et ses bactéries endo- et ectosymbiotiques : (A) *Folliculinopsis* sp. forme des mattes bleues à la surface du substrat des sources hydrothermales profondes (Kouris *et al.*, 2007). (B) Schéma descriptif de *Folliculinopsis* sp. (modifié d'après Ji *et al.*, 2004) : le cilié vit à l'intérieur d'une lorica (LO) et laisse ses lobes péristomiaux (LP) couvert de cils (têtes de flèches noires) dépasser afin de se nourrir. Les bactéries dont il se nourrit traversent la cavité buccale (BC) lors de l'ingestion avant d'être digérées dans des vacuoles digestives. Les observations au MEB (C et D) montrent les bactéries filamenteuses (flèches bleues) fixées à la lorica (Lo) tandis que les bactéries ectosymbiotiques (flèche noire) se trouvent entre les cils (modifié d'après Kouris *et al.*, 2007). Les coupes transversales observées au MET (E et F) confirment la présence de bactéries ectosymbiotiques entre les cils (flèche noire) et montrent de nombreuses bactéries à l'intérieur de vacuoles (flèches blanches) situées sous le cortex (Co) du cilié. De nombreuses archées méthanogènes (flèches rouges) se trouvent libres à l'intérieur du cytoplasme (modifié d'après Kouris *et al.*, 2007).

#### 4. Symbioses entre ciliés et archées méthanogènes et/ou bactéries sulfato-réductrices

La plupart des ciliés anaérobies, libres ou commensaux des organismes supérieurs ne possèdent pas de mitochondries mais des hydrogénosomes. Ces organites dont la fonction est de fermenter le pyruvate produit par la glycolyse en acétate et en hydrogène leurs permettent de s'adapter aux conditions anoxiques de l'environnement (Hackstein *et al.*, 2006 ; Hackstein, 2010). Il semblerait que les hydrogénosomes présents chez les différentes espèces de protistes anaérobies aient évolué plusieurs fois à partir de mitochondries (Hackstein *et al.*, 2006). Beaucoup de ces ciliés anaérobies ont des endo- ou ectosymbiotes. Les symbiotes peuvent appartenir à trois groupes de procaryotes différents : des bactéries photosynthétiques pourpres

non soufrées, des archées méthanogènes (vivant toutes deux à l'intérieur de la cellule) et des bactéries sulfato-réductrices vivant à la surface de l'hôte (Fenchel et Finlay, 1991a ; 1991b ; Fenchel et Bernard, 1993 ; Rosati, 2004). Les trois groupes ont un trait commun ; ils peuvent consommer de l'hydrogène sous forme d' $H_2$  comme substrat. Ceci suggère que la production de  $H_2$  par les ciliés au niveau des hydrogénosomes est significative dans le maintien de ces associations symbiotiques (Rosati, 2004). Les bactéries ectosymbiotiques sulfato-réductrices se trouvent presque exclusivement chez les espèces marines de ciliés, et certaines contiennent également des archées méthanogènes endosymbiotiques (Figure 28). Ces bactéries ectosymbiotiques ont des morphologies différentes même chez les espèces ciliées du même genre et s'attachent de différentes manières à leur hôte (Fenchel *et al.*, 1977 ; Fenchel et Finlay, 1991a). La possibilité que ces bactéries ectosymbiotiques puissent réduire le sulfate a d'abord été suggérée par Fenchel et Finlay (1991a). Cette hypothèse a ensuite été confirmée grâce à l'utilisation de sondes spécifiques permettant d'hybrider les bactéries sulfato-réductrices en laboratoire par technique FISH (Fenchel et Ramsing, 1992). Chez ces ciliés, les ectosymbiotes peuvent entrer en compétition avec les archées méthanogènes intracellulaires pour l'utilisation de l' $H_2$ . Ainsi, les ectosymbiotes sont significativement plus abondants chez les espèces qui n'ont pas de méthanogènes endosymbiotiques.



**Figure 28.** *Metopus consortus* et ses bactéries endo- et ectosymbiotiques : (A) observations au microscope optique de *M. consortus* (Schweikert, 2013). (B) Observations au microscope à épifluorescence des bactéries ectosymbiotiques sulfato-réductrices (têtes de flèches blanches) marquées à l'aide de sondes spécifiques par technique FISH (Fenchel et Ramsing, 1992). Les archées méthanogènes sont associées au hydrogénosome (C) tandis que les bactéries ectosymbiotiques sulfato-réductrices (D) se trouvent à la surface du cilié (modifiés d'après Schweikert, 2013 et Fenchel et Finlay, 1991b).

En conclusion de ce chapitre, il semblerait que les ciliés soient présents aussi bien dans les sols terrestres qu'à l'intérieur ou à la surface des sédiments marins, parmi les organismes constituant le plancton et en tant que symbiotes ou parasites chez de nombreuses espèces de mammifères, poissons, insectes et invertébrés (Lynn, 2017). Les associations symbiotiques

entre protistes ciliés et bactéries sont nombreuses et diversifiées (Görtz, 2006 ; Dziallas *et al.*, 2012 ; Schweikert, 2013 ; Germond et Nakajima, 2016). Mais, il semblerait que les symbioses bactériennes soient plus répandues chez les espèces vivant dans des environnements présentant des conditions extrêmes, anoxiques et/ou chimiosynthétiques (Dziallas *et al.*, 2012 ; Orsi *et al.*, 2012 ; Germond et Nakajima, 2016). En effet, les espèces de ciliés planctoniques semblent préférer héberger principalement des micro-algues unicellulaires en tant que symbiotes lorsque les conditions sont eutrophiques (Nowack et Melkonian, 2010). En Guadeloupe, les principaux environnements marins étudiés permettant la mise en place d'associations symbiotiques entre des bactéries chimiosynthétiques et des protistes ou des invertébrés marins sont les sédiments réduits de mangroves et les sédiments sableux anoxiques des herbiers marins de *Thalassia testudinum*. En effet, ces deux environnements présentent des conditions permettant le développement de symbioses entre des hôtes invertébrés et des bactéries mais également entre des protistes et des symbiotes bactériens. D'ailleurs, plusieurs espèces de protistes ciliés ont déjà été observées en association symbiotique avec des bactéries au sein des mangroves de Guadeloupe (Maurin *et al.*, 2010 ; Laurent *et al.*, 2013). C'est donc au sein de cet environnement et plus particulièrement au niveau des sédiments réduits anoxiques marins de la lagune de la Manche-à-Eau, que se portera notre étude.

## **Chapitre 3. Présentation de l'étude**

### **A. Les mangroves marines**

#### **1. Description générale**

Les mangroves sont des écosystèmes à l'interface entre terre et mer recouvrant 60 à 75% des côtes intertidales dans les régions subtropicales et tropicales (Macintosh et Ashton, 2004 ; Alongi, 2008 ; Lambs *et al.*, 2011). C'est au Brésil, en Indonésie et en Australie que les mangroves sont les plus abondantes (Hamilton et Snedaker, 1984 ; Holguin *et al.*, 2001). Cependant, la Guadeloupe possède la plus grande superficie de mangrove des Petites Antilles (Spalding *et al.*, 1997). Des études récentes ont montré que près d'un tiers des mangroves, des herbiers et des marais salants ont déjà été perdus à travers le monde au cours des dernières décennies à cause de la déforestation, de l'ingénierie et de l'urbanisation (Lewis *et al.*, 2011 ; Peixoto *et al.*, 2011 ; Penha-Lopes *et al.*, 2011 ; Bouchez *et al.*, 2013), ainsi que par la

création de fermes d'aquaculture (Alongi, 2002 ; Bouchez *et al.*, 2013). Or, ce sont des écosystèmes essentiels aux zones tropicales et subtropicales. Les mangroves sont considérées comme des zones de nurserie pour les juvéniles de poissons et de nombreux oiseaux, mammifères, crustacés et reptiles y viennent également se reproduire. De plus, elles jouent un rôle important contre l'action des vagues empêchant ainsi l'érosion des côtes (Othman, 1994 ; Kathiresan et Bingham, 2001 ; Alongi, 2008 ; Lambs *et al.*, 2011). Elles agissent également comme un filtre pour les masses d'eau d'origine terrigène qui transportent des matières en suspension, des nutriments et des contaminants (Alongi, 2002 ; Lambs *et al.*, 2011). Les nutriments minéraux et la matière organique des sédiments sont importés par l'eau douce provenant des bassins versants, la décomposition de la litière et des micro-et macro-organismes qui y sont associés (Tam *et al.*, 1990 ; Bano *et al.*, 1997). Les mangroves sont soumises à des conditions physico-chimiques très variables tels que la salinité, les inondations, la lumière ou encore la température et les organismes qui sont présents dans cet écosystème ont développé de grandes capacités d'adaptation afin de faire face à ces conditions extrêmes (Feller *et al.*, 2010 ; Bouchez *et al.*, 2013). Les micro-organismes sont les principaux moteurs dans les cycles de l'azote, du carbone, du soufre et du phosphore dans les mangroves (Toledo *et al.*, 1995 ; Vazquez *et al.*, 2000 ; Rojas *et al.*, 2001 ; Cao *et al.*, 2011). Les mangroves sont des environnements dynamiques où les sédiments, l'eau de mer et l'eau douce se mélangent. Les changements dans les propriétés physiques, chimiques, et microbiologiques entre l'eau douce et les environnements marins côtiers adjacents se produisent sur de courts laps de temps, poussés par les marées et les courants d'eau douce qui créent une pression abiotique intense influençant la composition des communautés bactérioplanctoniques (Crump *et al.*, 1999 ; Bouchez *et al.*, 2013). Les micro-organismes ont des populations de grandes tailles qui peuvent parfois se disperser sur de longues distances, une vitesse de reproduction, et une diversité génétique remarquable, ce qui suggère qu'ils peuvent faire face aux variations des conditions de l'environnement plus facilement que les métazoaires (Logares *et al.*, 2009 ; Bouchez *et al.*, 2013). Sur des surfaces solides telles que la surface des sédiments ou les racines des arbres, les micro-organismes s'organisent en biofilms microbiens ou en matre, constitués principalement de bactéries hétérotrophes, autotrophes et d'eucaryotes qui sont souvent connus collectivement en tant que "microphytobenthos" intégré dans une matrice microbienne ou organique (Toledo *et al.*, 1995 ; Decho, 2000 ; Holguin *et al.*, 2001 ; Gomes *et al.*, 2010 ; Bouchez *et al.*, 2013). Ils jouent un certain nombre de rôles, comme la transformation des éléments nutritifs, la stabilisation des sédiments, la promotion de la croissance végétale, et permettent même de lutter contre les agents pathogènes qui

peuvent entrer dans les écosystèmes marins. Les mangroves représentent également des milieux thiotrophes connus offrant une variété d'habitats pour les symbioses (Ott *et al.*, 2004a ; Laurent *et al.*, 2009) au même titre que les sources hydrothermales, des suintements froids et des carcasses de baleines (Cavanaugh *et al.*, 2006 ; Dubilier *et al.*, 2008). Ces symbioses thiotrophiques se trouvent généralement localisées dans les zones où la matière organique est susceptible de s'accumuler comme c'est le cas sous les racines de palétuviers ou encore dans les dépressions creusées dans la vase de mangrove. À l'inverse des processus lithotrophiques basés sur l'utilisation de ressources d'origine géothermique, les processus par lequel les sulfures sont produits dans les mangroves se déroulent à la fois à la surface et dans les sédiments anoxiques réduits. Les sulfures sont produits grâce à la dégradation du matériel végétal impliquant les activités métaboliques des bactéries hétérotrophes et des bactéries sulfato-réductrices (Palacios *et al.*, 2009 ; Bienhold *et al.*, 2013). En effet, la matière organique peut fortement s'accumuler dans les mangroves, notamment sous les racines de palétuviers, qui empêchent la resuspension et l'exportation des débris organiques par le courant (Gontharet *et al.*, 2017). Il semblerait également que la faible profondeur et le ralentissement du débit des masses d'eau au niveau des racines contribuent également à l'accumulation de la matière organique au niveau de ces sites. La décomposition de cette matière organique crée des habitats sulfidiques avec des répartitions spatiales et temporelles très diverses (Ott *et al.*, 2004a). Cette production de sulfures ( $\text{HS}^-$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ) permet le développement de bactéries thiotrophes libres (Jørgensen, 1989 ; Fenchel, 1994 ; Stocker et Seymour, 2012 ; Jean *et al.*, 2015) ou de symbiotes bactériens associés aux invertébrés et aux ciliés dans et sur les sédiments (Ott *et al.*, 2004a). Les écosystèmes de mangroves sont très variés notamment en ce qui concerne la géomorphologie et l'hydrodynamisme ; de ce fait différents types fonctionnels de mangroves ont été décrits (Woodroffe, 1992). L'hydrodynamisme de certains écosystèmes de mangrove est fortement influencé par les apports de la rivière, tandis que d'autres sont beaucoup plus dominés par ceux de l'océan (Holmer, 2009). La Manche-à-Eau est une lagune peu profonde et semi-fermée (Mantran *et al.*, 2009). La circulation de l'eau est lente et complexe (Figure 29), entraînée par l'interaction entre les courants d'alizés du sud-est, le courant de marée semi-diurne et l'afflux d'eau douce continental (Gontharet *et al.*, 2017). D'une manière générale, les criques et lagune de mangroves, comme la Manche-à-Eau, sont considérées comme étant des voies importantes pour l'échange de matières dissoutes et particulaires entre les milieux forestiers et les eaux côtières adjacentes (Wolanski *et al.*, 1993 ; Rivera-Monroy *et al.*, 1995 ; Holmer, 2009). Le temps nécessaire au renouvellement de l'eau est généralement un indicateur utile du devenir

biogéochimique des composés dans la colonne d'eau (Holmer, 2009), où de longs temps de séjour permettent l'absorption de nutriments par la végétation (phytoplanctons, palétuviers, algues benthiques), tandis que les temps de séjour courts entraînent une plus grande exportation de matière vers l'océan (Thong *et al.*, 1993). La Manche-à-Eau est soumise à l'influence de la mer avec la présence d'un chenal de marée et d'un drain alimentant sporadiquement la lagune (Mantran *et al.*, 2008). L'eau est renouvelée pendant les cycles de marée et le taux de renouvellement a été estimé de l'ordre de 15%, ce qui suggère un enrichissement de la masse d'eau de la lagune, à chaque marée, en divers oligo-éléments provenant des écosystèmes adjacents (Mantran *et al.*, 2008) ; mais également une exportation quotidienne des nutriments disponibles pour le fonctionnement de l'écosystème vers les écosystèmes associés (herbiers marins, lagon, récifs). Ce fort taux de renouvellement, associé à l'hydrodynamisme actif, se traduit par une eau de lagune bien mélangée et homogène (Mantran *et al.*, 2008). La température de l'eau ( $\sim 28$  ° C) et la salinité ( $\sim 35$  ‰) sont relativement constantes en dessous de 0,5 m de profondeur (Pascal *et al.*, 2014). La périodicité des marées est semi-diurne et l'amplitude des marées dans le lagon oscille entre 30 et 40 cm (Mantran *et al.*, 2008 ; Gontharet *et al.*, 2017). Les criques et lagunes sont habituellement caractérisées par de faibles concentrations de nutriments en raison d'une grande capacité de rétention et de recyclage des nutriments dans le système (Kristensen *et al.*, 1995). Même dans les zones à forte charge en nutriments, exposées aux activités anthropiques (décharges, fermes d'aquacultures, systèmes de traitements des eaux usées), les niveaux de nutriments sont généralement faibles (Harrison *et al.*, 1997). Ceci est en grande partie dû à l'activité de minéralisation des communautés hétérotrophes (Figure 30) dont principalement des bactéries et des champignons qui colonisent les sédiments intertidaux et la colonne d'eau en mangrove (Kristensen *et al.*, 2000 ; Wattayakorn *et al.*, 2000 ; Holmer, 2009)

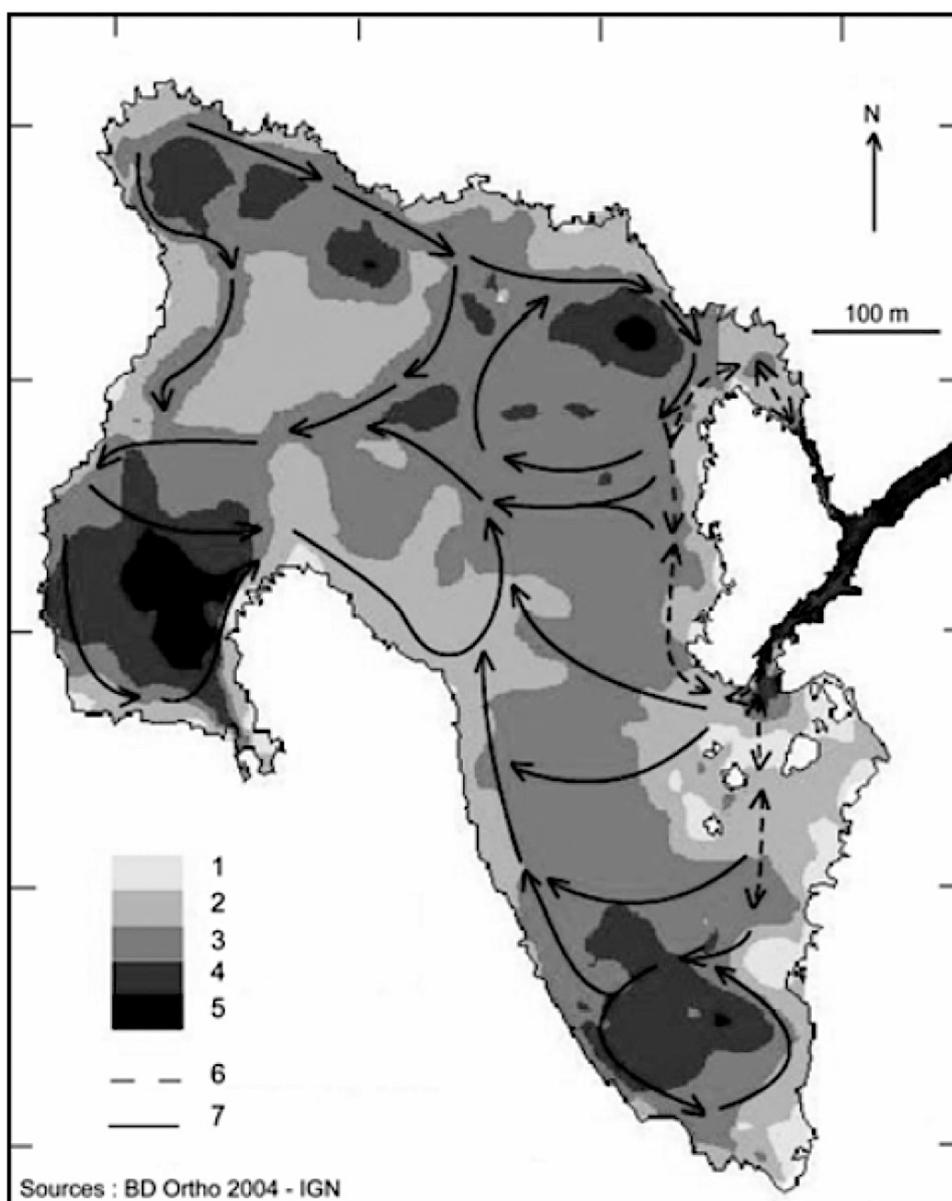


Figure 29. Courantologie et bathymétrie de la lagune de la Manche-à-Eau (Mantran *et al.*, 2008). 1 : 0 à 0,5 m; 2 : 0,6 à 1 m; 3 : 1,1 à 1,5 m; 4 : 1,6 à 2 m; 5 : > 2 m; 6 : courants de marée; 7 : courants de la circulation générale.

## 2. La production primaire marine en mangrove

Le phytoplancton à lui seul contribue à plus de 95 % de la production primaire dans les eaux océaniques (Lewis, 1974). Cependant, les zones néritiques peu profondes des zones côtières sont comparativement plus productives en raison de la production combinée d'algues unicellulaires, de macroalgues, d'algues symbiotiques de récifs coralliens et des herbiers marins (Lewis, 1974 ; Saifullah *et al.*, 2016). Dans l'ensemble, la population de micro-algues (phytoplancton) joue un rôle majeur dans la détermination de la productivité de l'environnement côtier et pélagique. La plupart des études révèlent une productivité plus élevée pendant la saison estivale (Saifullah *et al.*, 2016). Cette productivité peut être attribuée

à l'intensité lumineuse élevée, à la clarté de l'eau, à la disponibilité des nutriments et à la forte biomasse phytoplanctonique (Saifullah *et al.*, 2016). La production primaire dans les zones estuariennes présente des variations géographiques ; par exemple on retrouve des taux de 5 g.Cm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> en Côte d'Ivoire, 2,4 g.Cm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> sur la côte mexicaine et 0,0693 g.Cm<sup>-3</sup>.d<sup>-1</sup> dans le delta du fleuve Fly en Papouasie Nouvelle Guinée (Robertson et Blaber, 1993). La productivité est en moyenne plus élevée dans les estuaires de mangrove que dans d'autres estuaires en raison de la productivité primaire très élevée de la partie terrestre, complétée par celle des cyanobactéries, diatomées et micro-algues, ainsi que celle des algues fixées sur les racines des palétuvier (Saifullah *et al.*, 2016). En mangrove, la production de phytoplancton peut être limitée à cause d'un manque de nutriments, une turbidité élevée de la colonne d'eau, des grandes fluctuations de la salinité, la faible profondeur et le débit des masses d'eau qui contribuent souvent à une faible pénétration de la lumière dans la colonne d'eau, ce qui limite la productivité des micro-algues, en particulier les formes benthiques (Alongi, 1988 ; Harrison *et al.*, 1994). Les températures élevées peuvent également limiter la production (Lee, 1990). Les communautés de phytoplancton de mangrove peuvent être assez diverses mais la composition et la densité de la communauté sont fortement affectées par les conditions environnementales locales (Lee, 1990). Par exemple, dans le cas des mangroves à *Rhizophora*, il a été suggéré que la faible diversité du phytoplancton est liée à la libération de tanins par les racines, la décomposition du bois et les feuilles (Robertson et Blaber, 1993). Les populations de phytoplancton réagissent également à la variation de température et de salinité. Ainsi, les communautés peuvent montrer une variation saisonnière marquée (Mani, 1994). La Guadeloupe est soumise à l'influence des alizés et est marquée par une saison sèche de janvier à mars appelée « carême » et une saison humide de juillet à octobre appelée « hivernage » durant laquelle de fortes et abondantes précipitations se produisent. Cette alternance de sécheresse et de pluies abondantes favorise l'altération du sol puis l'apparition du lessivage aboutissant au transport de sédiments fins dans la lagune après les épisodes de fortes pluies ou d'importantes marées. La turbidité de l'eau et la faible pénétration de la lumière peuvent alors contribuer avec les températures élevées de l'eau, à une faible production du phytoplancton dans la Manche-à-Eau comme cela est le cas dans diverses mangroves notamment en Asie du Sud (Holmer, 2009). Les communautés phytoplanctoniques sont composées d'espèces autochtones permanentes ou temporaires et allochtones issues des écosystèmes adjacents continentaux ou océaniques (Guiral, 1999). Les peuplements généralement dominés par le nanoplancton (le microplancton principalement représenté par des diatomées ne constituant en général que 15 % du phytoplancton total) présentent des

variations temporelles de biomasse très importantes (Guiral, 1999). Les phases de prolifération sont liées à des modifications de la physico-chimie des eaux et suivent en général des périodes de dessalure associées à un enrichissement des eaux en azote et silice (Ricard, 1984). La productivité et la croissance du phytobenthos, constituant une communauté relativement diversifiée et dominée par des diatomées, semblent être limitées par la concentration des eaux interstitielles en composés phénoliques solubles, indépendamment du contrôle exercé par l'éclairement (distance par rapport à l'ombrage des arbres et degré de turbidité des eaux). Les supports verticaux (troncs, racines aériennes, pneumatophores et débris ligneux), très abondants et peu affectés par les processus de sédimentation minérale, offrent des surfaces très importantes pour la fixation des communautés d'algues et d'épibiontes qui peuvent localement présenter de fortes densités. Ces macroalgues constituent une association caractéristique dénommée « bostrychietum » (Guiral *et al.*, 1999). Des cyanobactéries filamenteuses et des diatomées colonisent aussi ces supports. Ces espèces coloniales présentent des adaptations morphologiques et physiologiques diverses leur permettant de subir des périodes d'exondation et de dessiccation plus ou moins longues (Dor, 1984). Les organismes photosynthétiques (planctoniques, benthiques et épiphytiques macro- et microalgales) ont une grande importance fonctionnelle car ils constituent une biomasse fraîche très activement exploitée. En effet, la composition isotopique de nombreux groupes faunistiques colonisant le milieu de mangrove, indique une utilisation importante de cette biomasse photosynthétique, en complément avec celles du réseau trophique détritique (Guiral *et al.*, 1999 ; Pascal *et al.*, 2014). Ces observations qualitatives ont été confirmées par l'étude des relations trophiques entre les consommateurs secondaires et les producteurs autotrophes et hétérotrophes de biomasse (Guiral *et al.*, 1999 ; Pascal *et al.*, 2014). Les variations temporelles des biomasses et des taux de croissance bactériens sont principalement dépendants de la physico-chimie des eaux (en particulier des variations de température liées aux phases d'inondation et d'exondation des sédiments), et sont peu affectées par la prédation exercée par les protozoaires et la méiofaune (Alongi, 1988). Bien que les micro-algues ne contribuent que faiblement à la productivité totale des systèmes de mangrove estuariens, ils peuvent être essentiels pour soutenir les niveaux trophiques supérieurs (Robertson et Blaber, 1993). Cela peut être particulièrement vrai en raison de la haute qualité nutritionnelle du phytoplancton par rapport aux détritiques de mangrove. La biomasse, la productivité et la taille du phytoplancton sont étroitement liées à la diversité et à l'abondance des niveaux trophiques supérieurs.

### 3. Les processus de minéralisation de la matière organique et d'émission de sulfure en mangrove

Les sédiments de mangrove sont souvent riches en matière organique mais comme les détritiques sont relativement pauvres en nutriments et réfractaires (Benner et Hodson, 1985 ; Kristensen *et al.*, 1995), les sédiments sont généralement caractérisés par de faibles taux de minéralisation nette (Kristensen *et al.*, 1992 ; 1995 ; Holmer, 2009). Le stockage de carbone dans les sédiments de mangrove a été estimé entre 4 et 20 gigatonnes (ou Pg) de carbone par an, ce qui montre qu'ils figurent parmi les sols de forêts les plus riches en carbone dans les tropiques (Donato *et al.*, 2011). L'azote et le phosphore des feuilles de mangrove sont réabsorbés et transloqués avant qu'elles ne se détachent de l'arbre, un phénomène appelé abscission (Woodroffe *et al.*, 1988 ; Feller *et al.*, 1999). De ce fait, la concentration en phosphore dans les feuilles jaunes de *Rhizophora* est deux fois moins importante que dans les feuilles vertes fraîches (Feller *et al.*, 1999). Les écosystèmes de mangrove sont également caractérisés par de faibles concentrations en composés azotés particuliers et dissouts, ce qui suggère que le cycle biogéochimique des composés azotés est étroitement dépendant des processus d'assimilation et de dissimulation (Holmer, 2009). La concentration de nitrate est faible dans les sédiments tropicaux et la dénitrification est considérée comme étant d'importance mineure pour la décomposition de la matière organique (Kristensen *et al.*, 1998). Des études biogéochimiques menées en Thaïlande (Kristensen *et al.*, 1991 ; 1995 ; Alongi *et al.*, 1998) et en Jamaïque (Nedwell *et al.*, 1994) suggèrent que la respiration aérobie et la réduction des sulfates sont les voies majeures de diagenèse dans les mangroves (Holmer, 2009). D'autres études ont montré que la réduction du fer peut également constituer un important processus de respiration anaérobie en mangrove (Alongi *et al.*, 1998 ; Kristensen *et al.*, 2000). Les débris végétaux comme les branches et les feuilles de *R. mangle* tombées à la surface du sédiment constituent les principaux composants de la litière au niveau de la Manche-à-Eau. Par son abondance et son caractère relativement réfractaire (richesse en composés phénoliques et en polymères de structure : cellulose, hémicellulose et lignine), la litière se trouve ainsi à la base d'un réseau trophique détritique complexe où intervient une succession d'organismes divers reliés par des relations de types syntrophiques (Guiral, 1999). La minéralisation de la matière organique dans les sédiments de mangrove (Figure 30) se déroule selon les mêmes processus fréquemment rencontrés dans d'autres sédiments marins (Kristensen *et al.*, 1995) et a donc lieu avec un certain nombre d'accepteurs d'électrons. L'oxygène est un accepteur d'électrons important et efficace dans les processus de respiration

aérobie ainsi que pour les bactéries chimiolithotrophes sulfo-oxydantes vivant libres à la surface du sédiment ou pour celles qui sont associées à des invertébrés et des protistes marins de mangrove. De ce fait, l'oxygène est rapidement consommé et il semblerait qu'il ne soit présent que dans les millimètres supérieurs du sédiment. La profondeur de pénétration de l'oxygène dans les sédiments marins de mangrove est donc assez limitée (Andersen et Kristensen, 1988) et est semblable à celle des sédiments côtiers tempérés, de l'ordre de 1 à 5 mm (Revsbech *et al.*, 1986). Environ 50% de l'oxydation de la matière organique est considérée avoir lieu dans des conditions aérobies (Canfield, 1993). L'immersion des feuilles et autres débris végétaux provoque la lixiviation (phénomène complètement abiotique) des matériaux labiles et favorise le conditionnement des feuilles par les microbes (Chale, 1993). La minéralisation de la matière organique repose dans un premier temps sur l'utilisation de ces composés hydrosolubles (glucides, acides phénoliques, acides organiques, acides aminés) qui peuvent représenter de 30 à 50% des feuilles des palétuviers (Guiral, 1999). Malgré des concentrations élevées en composés phénoliques, ces molécules sont très rapidement et efficacement incorporées par une biomasse microbienne composée essentiellement de bactéries hétérotrophes (Benner et Hodson, 1985). La lixiviation peut mener à une perte de poids sec de 14 à 40 % après seulement 9 jours d'immersion des feuilles de palétuvier (Camilleri et Ribí, 1986). Cette immobilisation limite considérablement les exportations de matière organique dissoute de la mangrove vers les écosystèmes adjacents (Stanley *et al.*, 1987 ; Boto *et al.*, 1989). Seuls les composés les plus réfractaires et dans un état de diagenèse avancé sont susceptibles de quitter le milieu de mangrove et principalement par l'activité hydrodynamique liée aux cycles de marée (Guiral, 1999). Dans les couches plus profondes du sédiment, ce sont les accepteurs d'électrons tels que le nitrate, le manganèse, le fer et le sulfate qui sont utilisés dans les processus biogéochimiques à l'origine de la minéralisation de la matière organique (Froelich *et al.*, 1979 ; Crémière *et al.*, 2017). Les communautés bactériennes du sous-sol (ainsi que les micro-algues épibenthiques) permettent donc de séquestrer les nutriments et les maintenir dans les sédiments limités en nutriments (Alongi *et al.*, 1993 ; Rivera - Monroy et Twilley, 1996). Cette biomasse microbienne quantitativement faible, de l'ordre de 1% de la biomasse azotée détritique totale et à très forte productivité, revêt qualitativement une grande importance pour l'écosystème (Guiral, 1999). En effet, elle constitue une source importante d'acides aminés et de vitamines, via les bactéries, et de stérols, via les champignons (Blum *et al.*, 1988). En association avec les détritus, la biomasse microbienne est activement exploitée au sein de l'écosystème benthique par une microfaune (communauté de protistes dominée par des ciliés, des flagellés, des foraminifères et des

amibes) et une méiofaune où les nématodes constituent en général le groupe dominant (Alongi et Sasekumar, 1993)

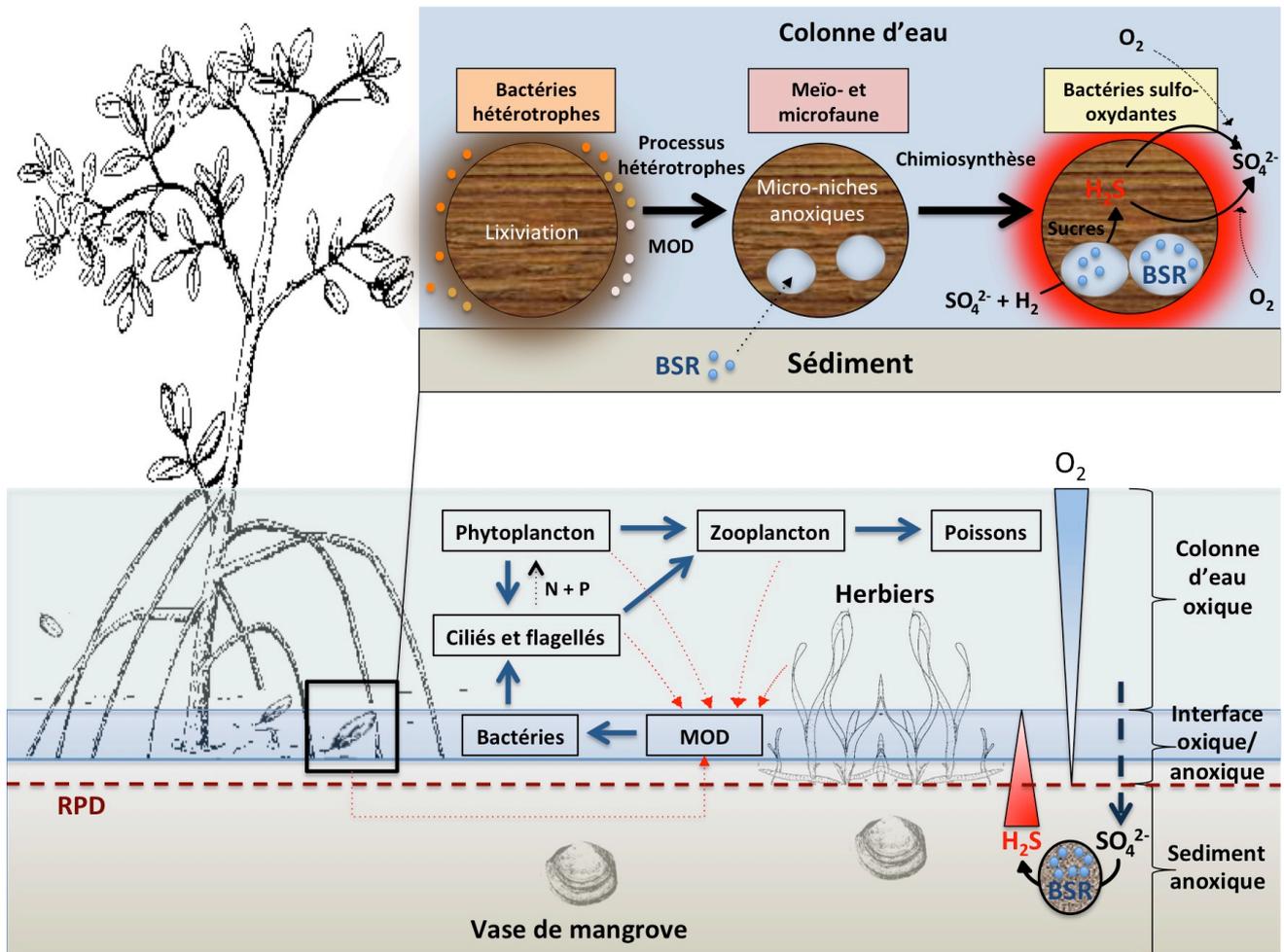


Figure 30. Schéma général montrant les processus de minéralisation de la matière organique, d'émission de sulfures ainsi que la chaîne trophique en mangrove. Les débris végétaux tombés à la surface du sédiment marin de mangrove vont subir une lixiviation de leurs composés les plus solubles. Cette matière organique dissoute (MOD) sera rapidement incorporée au sein d'une biomasse principalement bactérienne lors de processus hétérotrophes. Ces processus aérobies vont fortement faire diminuer la concentration du milieu en oxygène. Par la suite, l'hydrolyse des polysaccharides végétaux (principalement la cellulose, l'hémicellulose et l'amidon) va former des sucres (principalement glucose et cellobiose). La fragmentation des débris végétaux par la méio- et microfaune benthique va créer des micro-niches anoxiques qui vont être colonisées par des bactéries sulfato-réductrices. Ces bactéries vont utiliser les sucres produits par l'hydrolyse des polysaccharides et l' $\text{H}_2$  comme donneur d'électrons pour réduire les sulfates présents dans l'eau de mer et produire des sulfures. Les sulfures produits vont par la suite servir de sources d'énergie pour de nombreuses bactéries sulfo-oxydantes vivantes libres mais également pour celles qui sont en association symbiotiques avec des invertébrés et des protistes présents dans le sédiment ou à sa surface. Les bactéries hétérotrophes, les bactéries chimiosynthétiques et le phytoplancton sont consommés par les ciliés et flagellés qui seront eux-mêmes consommés par les organismes du zooplancton (flèches bleues). Les bactéries assurent les processus de minéralisation de la matière organique (flèches rouges en pointillées) tandis que les protistes ciliés et flagellés assurent la reminéralisation de cette biomasse microbienne et son exportation vers les niveaux trophique supérieurs. Les protistes ciliés et flagellés ainsi que les bactéries permettent également la reminéralisation de l'azote (N) et du phosphore (P) à travers leurs déchets qui serviront de nutriments pour le phytoplancton.

## B. Les symbioses décrites en mangrove

### 1. Endosymbiose chez les Bivalves

Les bivalves symbiotiques décrits dans les écosystèmes de mangroves et les sédiments réduits en Guadeloupe appartiennent tous à la famille des Lucinidae. Les bactéries sont endosymbiotiques et sont localisées dans des cellules spécialisées appelées bactériocytes. Toutes les bactéries endosymbiotiques décrites chez les différentes espèces de Lucinidae appartiennent à différents sous groupes de  $\gamma$ -protéobactéries et sont toutes des bactéries sulfuroxydantes (Felbeck *et al.*, 1981 ; Berg et Alatalo, 1984 ; Anderson, 1995 ; Arndt *et al.*, 2001). L'espèce *Lucina pectinata* (ou *Phacoides pectinatus*) vit à l'intérieur de la vase de mangrove (Frenkiel *et al.*, 1996) alors que *Codakia orbicularis* et *Ctena imbricatula* vivent dans les sédiments anoxiques et réduits des herbiers de *Thalassia testudinum* (Gros *et al.*, 2003). La possibilité de maintenir certains bivalves Lucinidae en aquarium, comme *C. orbicularis*, a permis de mener des expériences qui ont montré que les symbiotes sont transmis par l'environnement à des juvéniles aposymbiotiques. Cette transmission environnementale, ainsi que la découverte de formes libres des bactéries symbiotiques dans certains herbiers à *Thalassia testudinum* (Gros *et al.*, 1996), ont conduit à émettre l'hypothèse que l'apparition de ces symbioses chez les Lucinidae est récente (Gros *et al.*, 2003). Bien que chaque espèce de Lucinidae possède un symbiote spécifique, il semblerait que certaines espèces comme *C. orbicularis* peuvent effectuer des associations symbiotiques avec les bactéries d'une autre espèce (Gros *et al.*, 2003). Les bactéries semblent tirer un bénéfice de l'association, puisqu'elles sont environ cinq fois plus volumineuses lorsqu'elles sont à l'intérieur des branchies de l'hôte (Gros *et al.*, 2003). Une étude plus approfondie du génome du symbiote de *C. orbicularis* a montré que celui-ci code pour toutes les protéines nécessaires à la fixation biologique de l'azote ou diazotrophie (König *et al.*, 2016). La culture d'un symbiote « multi-talentueux » qui non seulement détoxifie les sulfures (Figure 31) mais aussi soutient les besoins en carbone et en azote de son hôte, peut permettre au bivalve de s'imposer dans les environnements thiotrophiques limité en azote (König *et al.*, 2016).

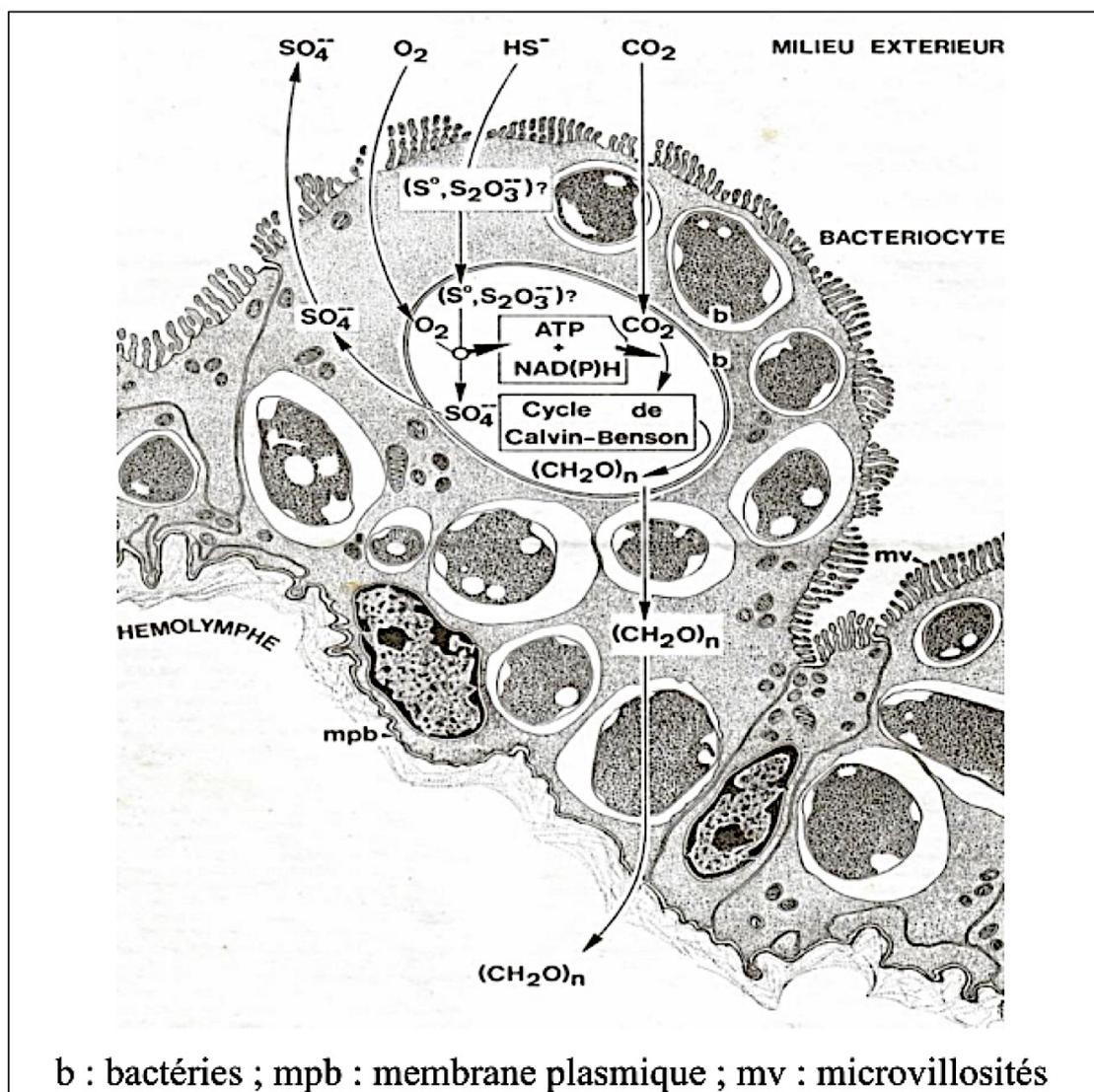


Figure 31. Relations métaboliques entre les bactéries et les cellules branchiales chez les *Lucinacea* (Diouris *et al.*, 1989)

## 2. La chevelure bactérienne du nématode *Eubostrichus diana*

La seule association symbiotique décrite à ce jour chez les nématodes vivant dans les sédiments anoxiques réduits de Guadeloupe a été observée entre *Eubostrichus diana* (Figure 32) et des bactéries sulfo-oxydantes (Himmel *et al.*, 2009). Pourtant, les nématodes constituent en général le groupe faunistique le plus important de la méiofaune dans les sédiments de mangrove (Alongi et Sasekumar, 1993 ; Kathiresan et Bingham, 2001). Cette espèce appartient à la sous famille des Stilbonematinae chez laquelle huit autres espèces ont été décrites avec des ectosymbiotes (Ott *et al.*, 1991 ; 2004b). Les bactéries ectosymbiotiques sont des chimioautotrophes oxydant les sulfures et les thiosulfates, elles contiennent les gènes codant pour la Ribulose biphosphate carboxylase/oxydase (RuBisCo), la sulfite oxydase et

l'APS Sulfurylase (Polz *et al.*, 1992). Selon les analyses du gène codant pour l'ARNr 16S, ces bactéries appartiennent au sous-groupe des  $\gamma$ -protéobactéries et sont étroitement liées aux endosymbiotes trouvés dans les branchies de bivalves côtiers et dans le trophosome du vers tubicole Vestimentifère *Riftia Pachyptila* (Polz *et al.*, 1994). Ces nématodes se nourrissent de leurs bactéries ectosymbiotiques. Les analyses des rapports isotopiques du carbone stable ( $\delta^{13}C$ ) effectuées chez les bactéries et les nématodes suggèrent que les bactéries sont leur source de nourriture principale (si ce n'est exclusive). En retour, les nématodes fournissent alternativement aux bactéries du sulfure et de l'oxygène en migrant à travers la couche oxygène-anoxique des sédiments (Ott *et al.*, 1991).

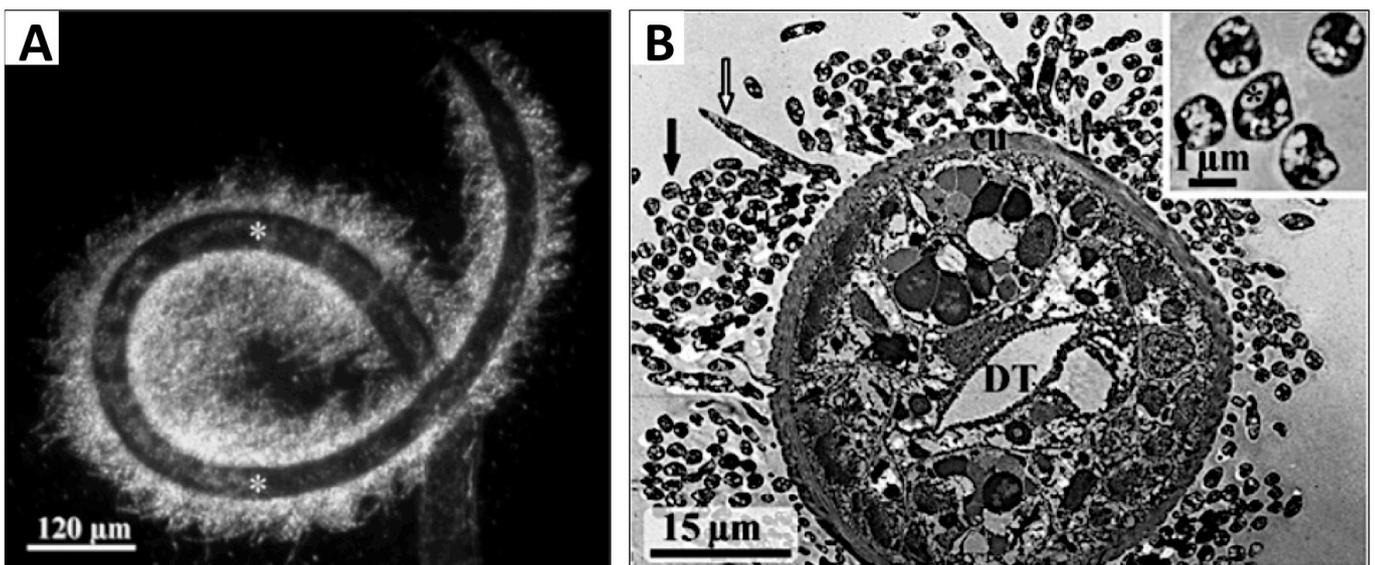
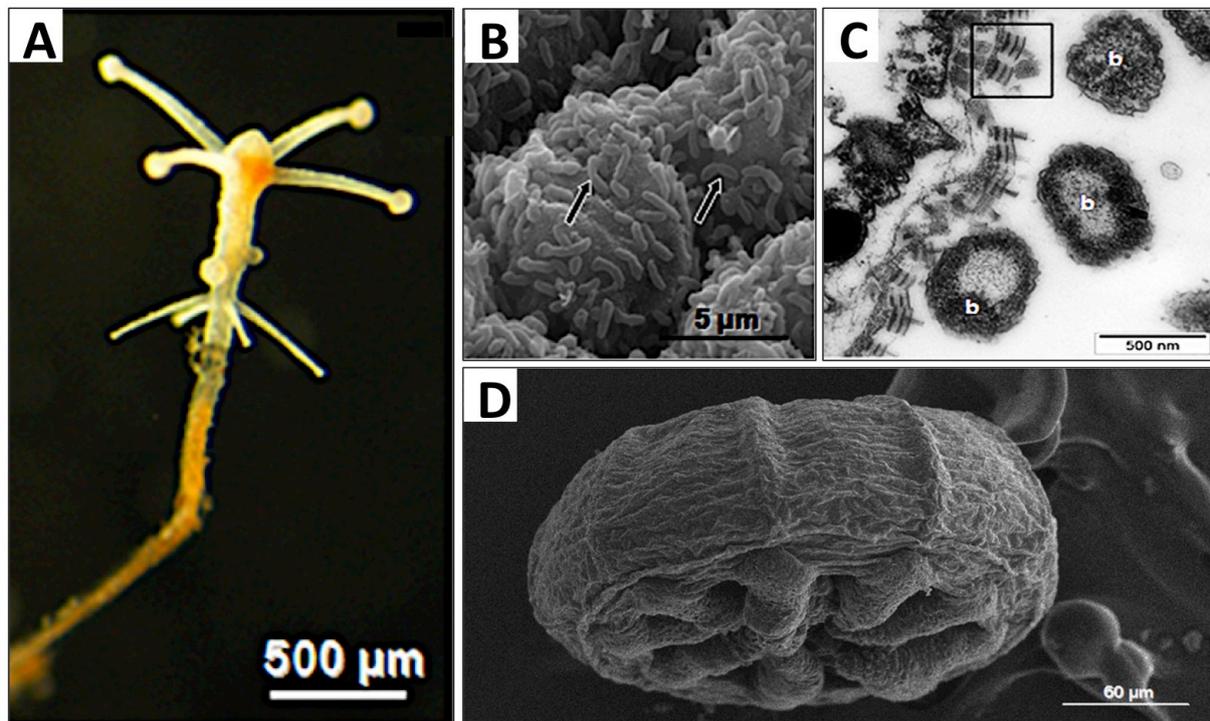


Figure 32. *Eubostrichus diana* et ses bactéries ectosymbiotiques filamenteuses (Himmel *et al.*, 2009) : (A) Les bactéries sulfuroxydantes forment un manteau bactérien blanc à la surface de la cuticule (astérisque) du nématode. (B) Les observations au MET permettent d'observer des coupes transversales (flèches noires) et longitudinales (flèches blanches) des bactéries fixées à la cuticule ainsi qu'un tube digestif très réduit et vide. Les bactéries possèdent des granules blancs de soufre dans leur cytoplasme (astérisque).

### 3. Ectosymbiose chez un polype de méduse

Il n'existe qu'une seule symbiose impliquant des bactéries sulfo-oxydantes décrite à ce jour chez les Cnidaires ; elle a été décrite dans les mangroves de Guadeloupe (Abouna *et al.*, 2015). Cette symbiose implique des polypes de méduses (Medusozoa) du genre *Cladonema* et des bactéries ectosymbiotiques chimiosynthétiques proches des ectosymbiotes de *Zoothamnium niveum*. Il existe deux stades chez les méduses qui dépendent de leur cycle de vie. Le premier est un stade sessile où l'organisme vit sous forme de polype fixé à son substrat, et le second est un stade mobile et sexué où l'organisme vit sous la forme d'une méduse libre d'évoluer dans la colonne d'eau (Figure 33). Les polypes de *Cladonema* sp. vivent fixés aux débris végétaux présents à la surface du sédiment, et sont donc constamment

en contact avec les sulfures produits dans le sédiment et à sa surface. D'un autre côté la méduse est libre d'évoluer dans la colonne d'eau et n'est pas soumise aux conditions sulfidiques du sédiment. De ce fait, les ectosymbiotes ne sont présents que chez le stade polype de cette méduse. Des structures sont également présentes à la surface du polype permettant ainsi probablement une meilleure fixation des bactéries ectosymbiotiques comme cela a déjà pu être observé chez d'autres organismes.



**Figure 33.** Symbiose chez la méduse *Cladonema* sp. (Abouna *et al.*, 2015): (A) Le polype de *Cladonema* sp. vit fixé à la surface des feuilles de palétuvier jonchant la surface du sédiment de mangrove. Les observations du stade polype au MEB (B) montrent la présence de bactéries ectosymbiotiques (flèches) en forme de bâtonnets qui recouvrent la surface du polype. Les observations au MET (C) laissent apparaître des structures (encadrer) permettant aux bactéries (b) de se fixer au polype. Le stade méduse observé au MEB (D) ne possède pas de bactéries ectosymbiotiques.

## C. Objectifs de l'étude

Alors que la Guadeloupe possède la plus grande bordure littorale de mangroves des Petites Antilles, la microfaune et la microflore bactérienne marine associées à cet écosystème sont encore mal connues. De nombreux organismes ont déjà été décrits en association symbiotique avec des bactéries sulfo-oxydantes principalement au niveau des sédiments marins. En effet, la dégradation de la matière organique dans le sédiment et à sa surface est à l'origine de la production de sulfures. Cette production de sulfures va permettre le développement d'une communauté de micro-organismes dont le métabolisme est basé sur des processus chimiosynthétiques. Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont pour but d'identifier, répertorier et caractériser les différentes espèces de protistes ciliés qui vivent au

niveau des sédiments marins anoxiques réduits de mangroves en association avec des bactéries symbiotiques. Ces travaux permettront de mieux comprendre le rôle de ces micro-organismes eucaryotes (Protistes) et procaryotes dans le fonctionnement des mangroves de bord de mer. Alors que les communautés phytoplanctoniques de protistes ont été relativement bien étudiées dans les écosystèmes de mangroves, les espèces de ciliés (et plus généralement les protozoaires) présentes dans cet écosystème sont mal connues. Des études réalisées dans les mangroves en Inde ont montré que les espèces de ciliés prédominantes appartiennent à l'ordre des Tintinides (Krishnamurthy *et al.*, 1995). Cependant, ces études se limitent principalement aux espèces planctoniques qui se déplacent dans la colonne d'eau. De ce fait, il n'existe que très peu d'informations concernant les espèces de ciliés benthiques qui vivent à la surface du sédiment marin de mangrove, et encore moins en ce qui concerne les espèces symbiotiques. Pourtant de nombreuses études ont montré que dans des écosystèmes anoxiques, micro-oxiques et chimiosynthétiques qui présentent des conditions environnementales difficiles, les organismes eucaryotes (dont les protistes ciliés) ont tendance à s'associer avec des bactéries (Bernhard *et al.*, 2000 ; Cavanaugh *et al.*, 2006 ; Dubilier *et al.*, 2008 ; Hackstein, 2010). Ces bactéries vont leur permettre de lutter contre les conditions difficiles du milieu et ainsi de coloniser ces nouveaux habitats. Lors de cette thèse, diverses techniques d'études et méthodes d'échantillonnages ont été utilisées afin de récolter et d'étudier ces différents micro-organismes symbiotiques. Ainsi, les espèces de protistes ciliés mobiles ont été récupérées à partir de biofilms générés par la dégradation des substrats végétaux ou animaux immergés (wood falls et whale falls). D'autre part, les espèces sessiles ont été directement prélevées à la surface de ces substrats. Les biofilms sont naturellement présents à la surface des sédiments (périphyton), des racines de palétuviers ainsi que sur les débris végétaux présents à la surface du sédiment marin. Les espèces présentes dans ces biofilms sont très importantes car avec le phytoplancton elles constituent la base du réseau trophique en mangrove. En effet, les protistes hétérotrophes petits et abondants, tels que les ciliés et les dinoflagellés constituent une source de nutriments importante pour les organismes plus gros du zooplancton (Ulloa et Grob 2013). Les principaux aliments des ciliés sont des particules, notamment des bactéries, des cyanobactéries chroococcoïdes, des micro-algues, des diatomées, des dinoflagellés, des microflagellés hétérotrophes et d'autres ciliés (Capriulo *et al.*, 2013) qui se trouvent principalement au niveau du sédiment marin en mangrove. Les ciliés permettent donc la reminéralisation de la biomasse microbienne et son exportation au niveau trophique supérieur et jouent donc un rôle important au sein de la boucle microbienne du réseau détritique des mangroves. L'étude de ces protistes hétérotrophes et des associations

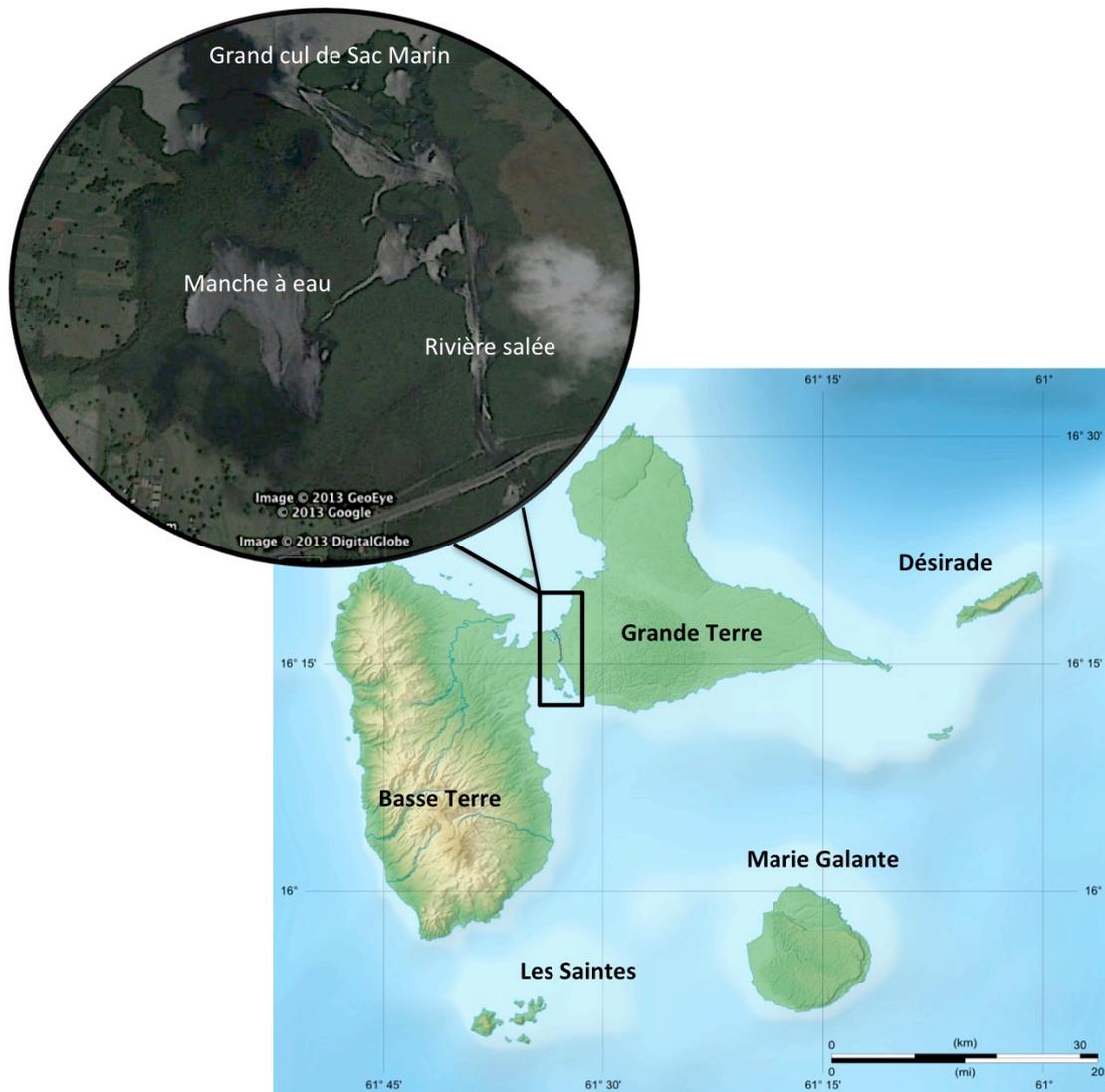
symbiotiques chez certaines espèces de ciliés permettra donc de mieux comprendre le rôle joué par ces micro-organismes dans cet environnement chimiosynthétiques, dont notamment, les stratégies employées pour survivre aux conditions extrêmes du milieu. Plusieurs techniques ont été utilisées afin de répondre à cette problématique. Les techniques de biologie moléculaire (PCR, FISH, clonage) ont permis l'identification génétique des différentes espèces ciliées servant d'hôtes ainsi que leurs symbiotes. Les techniques de biologie cellulaire (MEB, STEM, MET, microscope confocal, Raman) ont été utilisées pour la caractérisation cellulaire, morphologique et physiologique des organismes étudiés.

## ***Partie 2. Etudes de cas***

### **Chapitre 1. Matériels et Méthodes**

#### **A. Description générale du site d'étude : la lagune de la Manche-à-Eau**

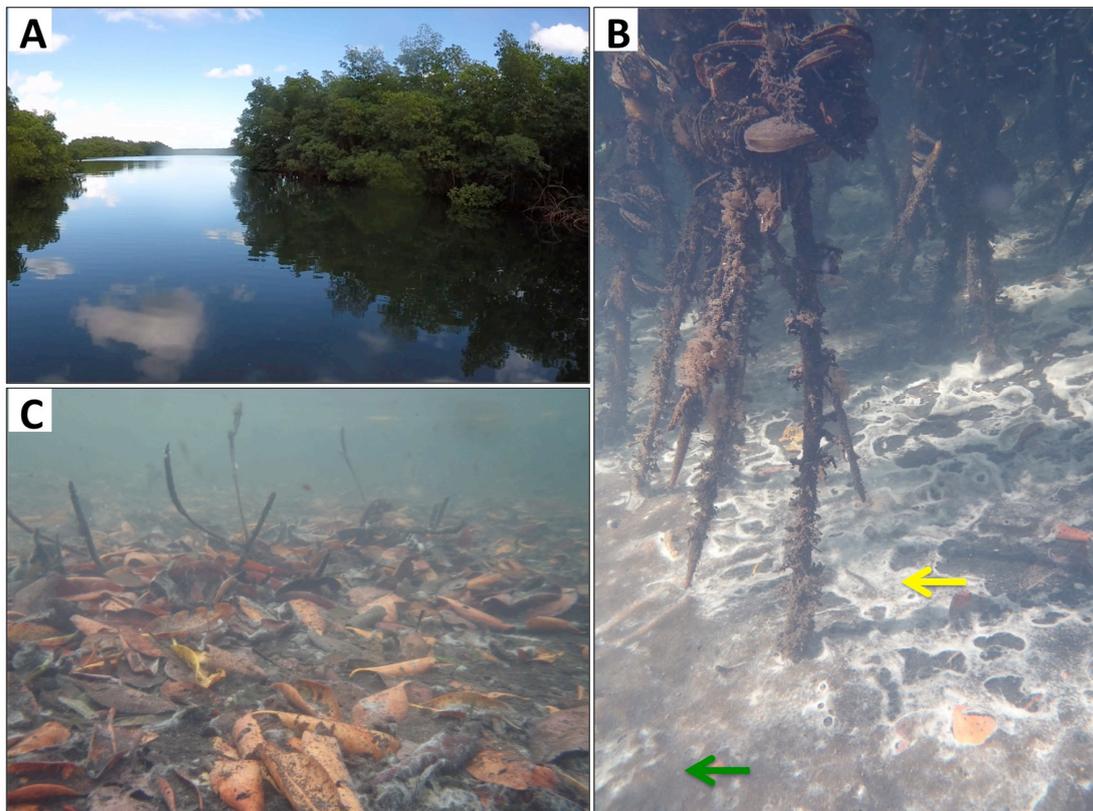
La Manche-à-Eau est une petite lagune qui se situe dans la Rivière salée en Guadeloupe (Figures 34 et 35). La Guadeloupe (16°N, 61°W) se trouve dans la mer des Caraïbes et fait partie de l'archipel des Petites Antilles. Elle est composée de deux îles principales, la Basse-Terre, d'origine volcanique, et la Grande-Terre, de nature calcaire, qui sont séparées par le chenal de la Rivière salée (Guilcher et Marec, 1978). Plusieurs petites îles sont également rattachées à la Guadeloupe (Désirade, Marie Galante et les Saintes).



**Figure 34. Site d'étude et d'échantillonnage.**

Le chenal de la Rivière salée est large de 40 à 60 m et peut atteindre 6m de profondeur par endroit. Il met en communication le Grand Cul-de-Sac Marin et le Petit Cul-de-Sac Marin en traversant la zone de mangrove la plus étendue de la Guadeloupe avec une superficie de 2325 ha (Chauvaud *et al.*, 2001). Les bords de la Rivière Salée sont constitués exclusivement de palétuviers rouges (*Rhizophora mangle*) qui forment une ceinture d'environ 10 m le long du littoral. La lagune de la Manche-à-Eau a une étendue de 281 700 m<sup>2</sup>, une profondeur moyenne de 1,5 m et une profondeur maximale de 3 m (Mantran *et al.*, 2008 ; 2009). Sous les racines de palétuviers, des assemblages complexes de différentes communautés de micro-organismes forment des tapis microbiens appelés également matre, qui ont également été observés dans d'autres habitats peu profonds (Jørgensen et Revsbech, 1982 ; Delfino *et al.*, 2012). Ces matres sont composées d'un assemblage complexe de bactéries phototrophes,

hétérotrophes et chimiolithoautotrophes, mais également d'archées et de micro-algues eucaryotes (Stolz, 2000) dont la répartition au sein de la communauté est conditionnée par des micro-gradients verticaux d'oxygène, d'hydrogène sulfuré et de lumière (Van Gemerden, 1993 ; Meysman *et al.*, 2015). La matre blanche présente à l'interface sédiment-eau, sous les racines de palétuvier présents dans la Manche-à-Eau, est composée en partie de bactéries filamenteuses incolores sulfo-oxydantes appartenant à deux nouvelles espèces : *Candidatus Isobeggiatoa* et *Candidatus Maribeggiatoa* de la famille des Beggiatoaceae (Jean *et al.*, 2015). Des cyanobactéries filamenteuses appartenant à la famille des Oscillatoriales ont également été observées dans les tapis de *Beggiatoa* (Guidi-Rontani *et al.*, 2014). Ces assemblages de bactéries constituent un assemblage appelé périphyton qui inclut également les invertébrés benthiques détritiques comme les mollusques gastéropodes, les nématodes, mais également les protistes ciliés et flagellés présents dans la lagune de la Manche-à-Eau (Figure 35). D'autres bactéries sont également parfois présentes en dessous du tapis de *Beggiatoa* dans la lagune de la Manche-à-Eau. Ce sont des bactéries anoxygéniques qui sont facilement reconnaissables grâce à leur coloration pourpre.



**Figure 35.** Photos de la Manche-à-Eau. La bordure littorale est composée d'une ceinture de palétuviers rouges (A), les racines plongent dans l'eau de mer jusqu'à parfois atteindre le sédiment (B). Celui-ci est recouvert de mottes bactériennes composées principalement de cyanobactéries (flèche verte) et de bactéries blanches filamenteuses sulfo-oxydantes (flèche jaune). Les feuilles, les branches et les graines de palétuviers jonchent également la surface du sédiment marin sous les racines (C).

## B. Echantillonnage

Les espèces ciliées sessiles ont été prélevées directement à la surface de feuilles de *Rhizophora mangle* tombées sur les sédiments entre les racines des palétuviers. Seules les feuilles en cours de décomposition (marrons ou noires) ont été prélevées à la surface du sédiment car celles-ci produisent des sulfures et sont exposées au dégagement du sulfure d'hydrogène provenant du sédiment. Les espèces mobiles ont été prélevées quant à elles à partir d'un biofilm obtenu en immergeant plusieurs types de substrats riches en matière organique tels que des branches de *Rhizophora mangle* ou encore des crânes de cochons dont la moelle osseuse est riche en lipides. Les espèces mobiles de protistes ciliés auraient pu être directement prélevés à l'intérieur des mattes et biofilms présents à la surface du sédiment. Cependant, les mattes et biofilms ne sont pas présents toute l'année à la surface du sédiment de la Manche-à-Eau. La méthode d'échantillonnage utilisée semblait être plus intéressante pour pouvoir mener à bien l'échantillonnage. Les crânes et les branches ont été déposés sur des grilles placées à plusieurs centimètres au-dessus du sédiment afin que l'os et les branches ne soient pas exposés à la diffusion des sulfures provenant du sédiment (Figure 36). En effet, lorsque les sulfures atteignent la surface des sédiments, ils sont rapidement oxydés par l'oxygène présent dans l'eau de mer (oxydation chimique) ou bien oxydés par l'activité métabolique des bactéries sulfo-oxydantes libres ou vivant en association symbiotiques avec des invertébrés et des protistes ciliés présents à la surface du sédiment. Cependant, des sulfures sont également produits au niveau des substrats organiques présents à la surface des sédiments. Des bactéries sulfato-réductrices provenant du sédiment vont rapidement coloniser les substrats organiques après leur immersion et vont dégrader la moelle riche en lipides des os où la cellulose des branches pour produire des sulfures. Ces sulfures vont attirer de nombreuses bactéries qui vont former un biofilm et attirer des prédateurs tels que les protistes ciliés. Ainsi, on peut recréer un écosystème chimiosynthétique de type « wood falls » ou de type « whale falls » artificiel dans un écosystème sulfidique peu profond connu pour héberger des symbioses thiotrophiques, dans le but d'attirer certaines espèces spécifiques. Les espèces de protistes ciblées dans cette thèse évoluent à la surface du sédiment, se nourrissent des bactéries présentes dans les biofilms et sont souvent exposées aux conditions sulfidiques. Ces espèces sont donc susceptibles d'héberger des symbiotes bactériens sulfo-oxydants.

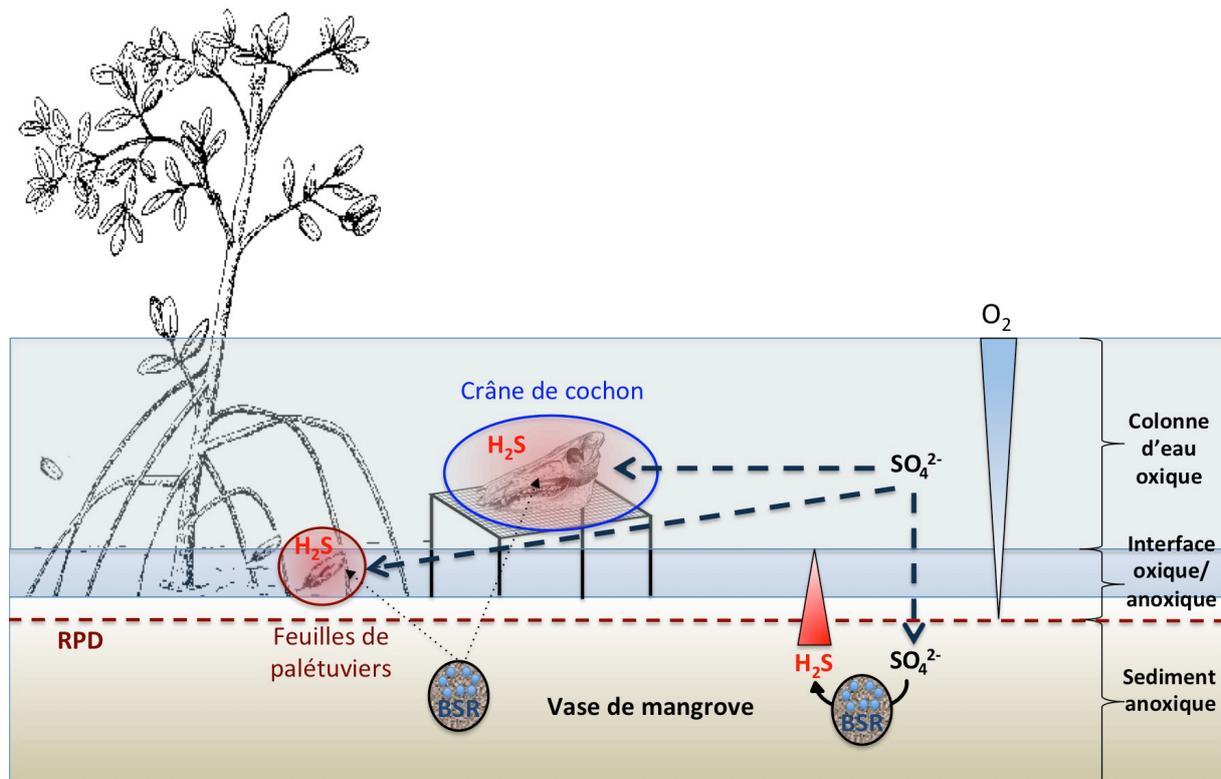


Figure 36. Schéma représentant les substrats utilisés pour l'échantillonnage ainsi que les conditions environnementales du site. Les feuilles de palétuviers ont été prélevées directement à la surface du sédiment tandis que les morceaux de crânes de cochon ont été placés sur des grilles placées à plusieurs centimètres du sédiment. Ces substrats vont être colonisés par des bactéries sulfato-réductrices provenant du sédiment et vont finir par produire eux-mêmes des sulfures au bout de 2-3 jours d'immersion.

Les biofilms ont été prélevés à divers intervalles de temps après avoir immergé les substrats organiques afin d'étudier le processus de colonisation par les bactéries et les protistes ciliés. Plusieurs substrats organiques ont été placés en mangrove à plusieurs reprises tout au long de cette thèse afin de répondre aux besoins des manipulations. Après 2-3 jours d'immersion, les débris végétaux et les substrats animaux commencent à produire des sulfures permettant ainsi le développement d'un biofilm blanc. Les biofilms ont donc été récupérés dès leur apparition au bout de 2 à 4 jours, entre 4 et 6 jours et entre 6 et 8 jours à la surface des branches et des crânes (Figure 37). Les biofilms ont été prélevés à l'aide de seringues de 25 ml. Les organismes apparaissant blanc à la loupe binoculaire ou présentant des inclusions blanches dans leur cytoplasme sous lumière incidente ont été récupérés à l'aide d'une micropipette et triés séparément afin d'obtenir divers lots de plusieurs morphotypes ou espèces sélectionnées sur la base de critères morphologiques. Les morphotypes choisis pour les différentes analyses ont été sélectionnés de par leur présence récurrente à la surface des feuilles et à l'intérieur des biofilms récupérés en mangrove, leur comportement atypique et facilement reconnaissable parmi les nombreux organismes récoltés (contractions des individus chez les espèces sessiles ou encore rotations des individus mobiles). De plus, des

observations au microscope à épifluorescence ont été réalisées chez les morphotypes mobiles après un marquage des individus au DAPI afin de détecter la présence de bactéries ectosymbiotiques et/ou endosymbiotiques. Deux espèces sessiles et deux espèces mobiles potentiellement symbiotiques ont ainsi pu être sélectionnées pour les différentes analyses. Ces espèces seront appelées « morphotypes sessiles 1 et 2 » et « morphotypes mobiles 1 et 2 ». D'autres morphotypes ont également pu être analysés mais leur étude n'a malheureusement pas pu être aussi approfondie.

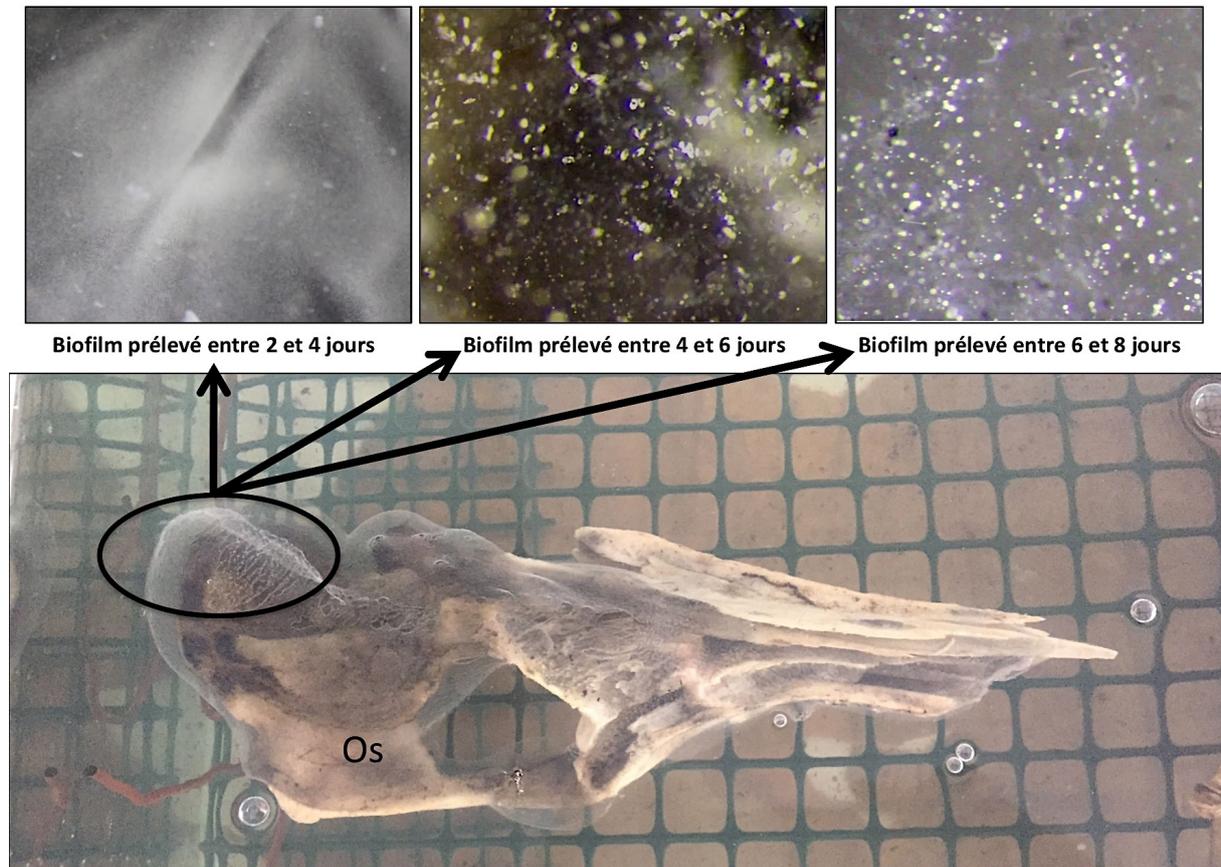


Figure 37. Photo d'un morceau de crâne de cochon recouvert d'un biofilm blanchâtre (cercle noire). Les biofilms ont été prélevés à divers intervalles de temps, après avoir immergé l'os en mangrove, afin de suivre le processus de colonisation de l'os par les bactéries sulfo-oxydantes et les protistes ciliés. Le biofilm prélevé entre 2 et 4 jours contient principalement des bactéries. Le biofilm récolté entre 4 et 6 jours contient des bactéries et plusieurs espèces de protistes ciliés. Au bout de 6 à 8 jours, les bactéries présentes dans les biofilms récupérés à des intervalles de temps plus court ont disparu. Le biofilm contient des bactéries plus grosses que les précédentes et les ciliés ont presque tous disparu.

## C. Microscopie optique

- Espèces sessiles

Les deux morphotypes de ciliés sessiles ont été observés directement à la loupe binoculaire (Leica MS 5), à la surface de feuilles placées dans des cristallisoirs, contenant de l'eau de mer récupérée dans la Manche-à-Eau. Des images ont été prises en utilisant un

appareil photo Canon EOS 70D. De tout petits fragments de feuilles avec des individus fixés dessus ont été coupés à l'aide d'un scalpel puis placés entre une lame creuse et une lamelle avant d'être observés à l'aide d'un microscope photonique Eclipse 80i (Nikon, France). Des photos ont par la suite été prises à l'aide d'une caméra Nikon DXM 1200F montée sur le microscope.

- Espèces mobiles

Après avoir récupéré le biofilm à l'aide de seringues de 25 ml en mangrove, celui-ci a été transféré dans un cristalliseur et laissé en repos 10 min afin qu'il puisse se reconstituer. Les morphotypes ont été observés et séparés en lots à la loupe binoculaire. Des images du biofilm et des différents lots de morphotypes ont été prises à l'aide d'un appareil photo Canon EOS 70D. Ces morphotypes ont ensuite été fixés dans une solution de paraformaldéhyde dilué à 2,5 % en eau de mer, rincés plusieurs fois dans une eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ , puis montés entre lames et lamelles avant d'être observés grâce à un microscope Eclipse 80i (Nikon, France). Des images ont été prises en utilisant une caméra Nikon DXM 1200 F montée sur le microscope

## **D. Microscopie électronique à balayage**

De petits fragments de feuilles de *Rhizophora mangle* présentant des individus fixés de chaque morphotype sessiles ont été recueillis à l'aide d'une lame de scalpel lors d'observation sous loupe binoculaire. Les échantillons ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde diluée à 4 % dans de l'eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ , puis placés à 4 °C pendant au moins 24 h. Les fragments ont ensuite été déshydratés par des bains d'acétone consécutifs de plus en plus concentrés tel que décrit ci-dessous :

- 30 % pendant 10 min
- 50 % pendant 10 min
- 70 % pendant 10 min
- 95 % pendant 10 min
- 100 % pendant 10 min (3 fois).

Les échantillons ont par la suite subi un point critique au CO<sub>2</sub> grâce à un appareil Leica EM CPD030 et une métallisation par pulvérisation cathodique d'or grâce à un CRESSINGTON sputter coater 108auto avant d'être observés avec un FEI Quanta 250 sous une tension d'accélération de 20 kV.

En ce qui concerne les espèces mobiles, plusieurs individus provenant de chaque lot de morphotypes ont été fixés dans une solution de glutaraldéhyde diluée à 4% dans de l'eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ , puis placés à 4 °C pendant au moins 24 h. Les individus ont ensuite été rincés 2 fois en eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$  puis déposés sur des fragments de lames silanisées dans une goutte d'eau de mer filtrée à 0,22  $\mu\text{m}$ . Les lames silanisées ont été préalablement préparées selon le protocole décrit ci-dessous :

- plongez les lames 3 à 5 fois dans de l'acétone à 95 % et laissez sécher
- plongez les lames 5 fois dans une solution de 3-aminopropyl-triéthoxysilane ou APTS (SIGMA) : 490 ml acétone et 10 ml d'APTS.
- rincez les lames 3 à 5 fois dans de l'eau distillée et laissez sécher.

Les fragments de lames silanisées avec les individus de chaque morphotype mobile ont été placés dans une chambre humide durant toute la nuit afin de laisser sédimenter les individus sur la lame et ainsi les coller. Les individus ont par la suite été déshydratés en plongeant les fragments de lames dans des bains d'acétone consécutifs de plus en plus concentrés comme décrit préalablement. Les échantillons ont par la suite subi un point critique au CO<sub>2</sub> et une métallisation par pulvérisation cathodique d'or avant d'être observés avec un FEI Quanta 250 sous une tension d'accélération de 20 kV.

## **E. Microscopie électronique à transmission**

En ce qui concerne les ciliés sessiles, plusieurs individus de chaque morphotype ont été prélevés délicatement à la surface des feuilles de *Rhizophora mangle* à l'aide d'un scalpel. En ce qui concerne les différents morphotypes des espèces mobiles étudiées, plusieurs individus ont également été séparés et prélevés à l'aide d'une micropipette. Les échantillons ont par la suite été préfixés pendant au moins 24 h à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde diluée à 2,5 % dans du tampon de cacodylate 0,1 M (pH 7,2 ajusté à une osmolarité de 900 mOsm). Après un bref rinçage (5 minutes) dans ce même tampon, les échantillons ont été fixés pendant 45 minutes à l'obscurité et à température ambiante avec du tétr oxyde d'osmium à 1 % dans du tampon de cacodylate 0,1 M (pH 7,2 ajusté à une osmolarité de 1100 mOsm). Les individus ont par la suite été rincés dans de l'eau distillée et post-fixés avec de l'acétate d'uranyle aqueux à 2 % pendant 2 h à température ambiante et à l'obscurité. Enfin, les échantillons ont été déshydratés dans des solutions d'acétone de concentrations croissantes avant d'être inclus dans une résine époxy. Des coupes fines de chaque morphotype ont été

réalisées à l'aide d'un microtome puis observées à l'aide d'un FEI tecnai fonctionnant à 200 KV et/ou grâce au microscope électronique à balayage Quanta 250 configuré en mode STEM et sous une tension d'accélération de 20 KV.

## **F. Analyses par spectrométrie Raman**

Les échantillons analysés par spectrométrie Raman ont été préalablement fixés dans une solution de paraformaldéhyde diluée à 2 % dans de l'eau de mer filtrée (0,22  $\mu\text{m}$ ) pendant au moins 24 h. Ils ont été par la suite rincés dans de l'eau de mer stérile avant analyse. L'eau de mer constitue un milieu isotonique pour les organismes marins et permet la dissipation d'énergie, ce qui permet ainsi d'éviter les dommages par irradiation des échantillons au cours des analyses Raman. Les spectres ont été enregistrés en utilisant un microspectromètre Raman HRevo Horiba, utilisant une longueur d'onde d'excitation de 514,5 nm délivrée par un laser à ions d'argon. Plusieurs individus des morphotypes analysés ont été déposés sur une lame silanisée dans une goutte d'eau de mer stérile puis placés dans une chambre humide durant au moins deux heures pour les laisser sédimenter et se coller à la lame. De cette façon les individus ne bougent pas lors du passage du laser, ce qui dans le cas contraire pourrait risquer de faire échouer l'analyse spectrométrique. Plusieurs spectres Raman ont par la suite été obtenus à différents endroits de la cellule et dans l'eau environnante utilisée comme témoin négatif. Les bandes spécifiques de soufre élémentaire  $\text{S}_8$  ont ensuite été recherchées dans les spectres enregistrés sur l'échantillon. Enfin, une cartographie complète de l'individu a été réalisée afin d'étudier la distribution du soufre dans la cellule. La méthode utilisée est celle développée précédemment par Himmel *et al.*, en 2009. La puissance du laser à la surface de l'échantillon était de 105  $\mu\text{W}$  et le temps d'acquisition des spectres de 10 secondes.

## **G. Extraction d'ADN et amplification**

Un total de 100 individus de chaque morphotype a été recueilli à chaque fois sur des échantillons frais, prélevés le jour même. Les ADN des protistes et de leurs éventuelles bactéries symbiotiques ont été extraits en utilisant le kit « DNeasy Blood and Tissue » (Qiagen) en se référant aux instructions du fabricant. Une élution finale de 100  $\mu\text{l}$  a été obtenue contenant l'ADN de chaque pool d'individus associé à un morphotype sélectionné ainsi que celui de ses potentiels symbiotes bactériens. Les gènes codant pour l'ARNr 16S des bactéries et l'ARNr 18S des eucaryotes ont été amplifiés en utilisant respectivement des couples d'amorces universelles 8F/1492R (Lane *et al.*, 1986 ; Lane, 1991) et 1F/5R (Giribet *et*

*al.*, 1996) à une concentration de 10 µmol/µl. Les séquences des amorces sont disponibles dans le Tableau 3. Les PCR ont été réalisées dans un « Master mix » composé de 30µl d'eau PPI, 10 µl de Flexi-Buffer X5 Green, 3 µl de MgCl<sub>2</sub> à (25 mM), 2 µl de chaque amorce servant à l'amplification des gènes procaryotes ou eucaryotes, 0,50 µl de TAQ polymérase, 0,50 µl de dNTPs et 2 µl d'ADN ou d'eau PPI (servant de témoin négatif) pour un volume final de 50 µl. Les PCR ont été effectuées à l'aide d'un thermocycleur GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystems) et le programme utilisé pour les amplifications PCR de ces deux gènes était le suivant : 94 °C pendant 5 min puis 30 cycles de :

- dénaturation (94 °C, 1 min),
- hybridation (55 °C, 30 s),
- élongation (72 °C, 90 s)
- élongation terminale (72 °C, 7 min).
- et enfin un stade de refroidissement à 4 °C jusqu'à récupération des échantillons dans le thermocycleur.

Les produits PCR ont ensuite été purifiés en utilisant le kit de purification QIAquick PCR (Qiagen) et envoyés à séquencer chez Genoscreen (<http://www.genoscreen.com>).

## H. Clonage

Les produits PCR obtenus du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries présentes à l'intérieur du cytoplasme du morphotype mobile 1 ont été clonés en utilisant le Kit pGEM-T Easy Vector System I conformément aux instructions du fabricant PROMEGA (France) afin d'identifier les potentiels endosymbiotes. Un total de 40 colonies de chaque construction réalisée a été récupéré afin de vérifier par « PCR colonie » la présence de l'insert. Les colonies ont été prélevées à l'aide d'un cure-dent stérile et déposées dans des tubes de 0.2 ml contenant 10 µl d'eau PPI. Seulement 2 µl de ce mélange ont été utilisés comme ADN matrice pour la réalisation de chaque PCR. Les PCR ont été effectuées selon le même protocole décrit précédemment (voir Extraction d'ADN et amplification) en utilisant le couple d'amorces SP6 et T7 (Stump et Hall, 1993) du vecteur selon le programme suivant : un cycle de dénaturation de 94 °C pendant 10 min, puis 35 cycles de :

- dénaturation (94 °C, 30 s),
- hybridation (55 °C, 30 s),
- élongation (72 °C, 90 s)

- élongation terminale (72 °C, 7 min).

Les produits PCR ont par la suite été purifiés et séquencés en utilisant le même couple d'amorce (SP6/T7) via la plateforme Genoscreen (<http://www.genoscreen.com>) par la méthode de SANGER.

**Tableau 3. Liste et détails des amorces utilisées pour les PCR.**

	Séquence 5' → 3'	Spécificité	Références
1F	TACCTGGTTGATCCTGCCAGTAG	Eucaryotes	Lane <i>et al.</i> , 1986 ; Lane, 1991
5R	CTTGGCAAATGCTTTCGC	Eucaryotes	Lane <i>et al.</i> , 1986 ; Lane, 1991
8F	GGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG	Procaryotes	Giribet <i>et al.</i> , 1996
1492R	CGTTACCTTGTTACGACTT	Procaryotes	Giribet <i>et al.</i> , 1996
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	Procaryotes	Stump et Hall., 1993
T7	TAATACGACTCACTATAG	Procaryotes	Stump et Hall., 1993

## I. Analyses phylogénétiques

L'analyse phylogénétique a été effectuée directement à partir des séquences codant pour les gènes de l'ARNr 16S des procaryotes et de l'ARNr 18S des eucaryotes. Les séquences obtenues ont été comparées avec celles de la base de données du « National Center of Biotechnology Information » ou NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant BLAST. Les séquences les plus proches obtenues grâce au BLAST ont été incluses dans les analyses phylogénétiques afin de former un jeu de données pour chaque gène étudié. Par la suite, des alignements multiples ont été réalisés en utilisant MUSCLE. Les alignements obtenus ont été vérifiés manuellement. Les régions présentant un alignement ambigu ou incertain ont été éliminées du jeu de données. Enfin, un arbre phylogénétique basé sur les alignements multiples obtenus sur chaque jeu de données (18S rRNA et 16S rRNA) a été réalisé à l'aide du programme MEGA version 7. Les arbres phylogénétiques ont été construits en utilisant les

méthodes du Neighbor Joining (NJ) et Maximum Likelihood (ML) avec comme modèle de distance génétique Tamurai-Nei. Les arbres phylogénétiques montrant des résultats différents en fonction de la méthode utilisée pour la construction ont été présentés et interprétés individuellement dans le reste du document. Dans le cas où les résultats des constructions étaient similaires, la construction réalisée par la méthode du Maximum likelihood (ML) a été privilégiée. La robustesse des nœuds a été évaluée en effectuant 1000 répétitions bootstrap, et seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 % ont été indiquées aux nœuds des arbres. Après analyse, les séquences du gène codant pour l'ARNr 18S des ciliés et du gène codant pour l'ARNr 16S obtenues dans cette étude ont ensuite été déposées dans la base de données GenBank.

## **J. Expériences d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH)**

Les échantillons analysés ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde diluée à 4 % dans de l'eau de mer stérile à 4 °C pendant 2 h. Après deux lavages dans de l'eau de mer stérile, les échantillons ont été déshydratés par des bains successifs d'éthanol de plus en plus concentrés (30 %, 50 %, 70 %, 95 %, 3 fois 100 % et 10 min pour chaque bain). La déshydratation des échantillons avec de l'éthanol 100 % est très importante car elle permet de dissoudre le soufre présent dans les échantillons pouvant générer de l'autofluorescence. Les échantillons ont par la suite été partiellement réhydratés par des bains successifs d'éthanol pour être au final conservés dans de l'éthanol 70 % et déposés sur des lames silanisées. Après séchage, les lames ont été plongées pendant 12 min dans de l'HCl 0,2 M, rincées pendant 10 min dans du tampon de préhybridation (Tris-HCl 20 mM [pH 8,0]), incubées pendant 5 min dans une étuve à 37 °C dans du tampon de préhybridation contenant de la protéinase K (0,5 mg.ml<sup>-1</sup> (Sigma)) puis rincées dans le même tampon de préhybridation. Les lames ont été par la suite placées dans une chambre humide et à l'obscurité pour effectuer les hybridations. Les hybridations ont été effectuées toute la nuit à 46 °C dans du tampon d'hybridation (NaCl 0,9 M, tampon 0,01 M Tris-HCl [pH 7,8], SDS à 0,01%). Les sondes EUB338 (Amann *et al.*, 1990) ciblant la plupart des membres des bactéries et NON-EUB338 (Wallner *et al.*, 1993) ont été utilisées respectivement comme contrôles d'hybridation positifs et négatifs. De plus, plusieurs sondes spécifiques ont été réalisées à partir des séquences obtenues du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries symbiotiques associées aux protistes étudiés : VO16B et VORTI sont spécifiques des ectosymbiotes du morphotype sessile 1 tandis que UMB 1 et

UMB 2 sont spécifiques des endosymbiotes du morphotype mobile<sup>1</sup>. Les sondes VO16B, UMB 1 et UMB 2 ont été conçues lors de cette thèse en utilisant Primer3 (Untergasser *et al.*, 2012). En revanche, la sonde VORTI a été modifiée à partir de la sonde ZIS645 (Schuster et Bright, 2016). Les sondes VO16B, VORTI et UMB 2 ont été marquées avec de la cyanine 3 comme fluorochrome tandis que la sonde UMB 1 a été marquée avec de l'atto 488. La spécificité de chaque sonde a été testée sur Probes Match (Cole *et al.*, 2005) en utilisant la base de donnée 16S/18S rRNA Silva. La spécificité de chaque sonde a été calculée en admettant une erreur maximale d'un nucléotide lors des alignements de séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries et celle de la sonde testée (Tableau 4). Les détails de chaque sonde sont affichés dans le tableau 4. Les conditions d'hybridation optimales pour les sondes spécifiques ont été déterminées en appliquant une série de concentrations de formamide (0 à 40 %) dans le tampon d'hybridation afin d'atteindre la meilleure qualité du signal. Les échantillons ont été montés entre lames et lamelle avec du milieu de montage fluorescent VECTASHIELD® contenant du DAPI (VECTOR, USA) et visualisées sous un microscope à épifluorescence Eclipse 80i (Nikon, France) et/ou un microscope confocal Leica SPE II.

**Tableau 4. Liste et détails des sondes utilisées pour les analyses FISH. La spécificité des sondes construites dans cette étude a été analysée en accordant au maximum une erreur de nucléotide avec la séquence de la sonde testée.**

	Séquence 5'→3'	Marquage	Spécificité sans erreur	Spécificité avec 1 erreur acceptée	Références
EUB 338: EUB I EUB II EUB III	GCT GCC TCC CGT AGG AGT GCA GCC ACC CGT AGG TGT GCT GCC ACC CGT AGG TGT	Atto 488 ou Cyanine 3	La plupart des Eubactéries	La plupart des Eubactéries	Amann et al., 1990 Daims et al., 1999 Daims et al., 1999
NON EUB 338	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Cyanine 3	Témoin négatif (Comp. EUB 338)	Témoin négatif (Comp. EUB 338)	Wallner et al., 1993
VO 16B	CGT CAT CAT CTT CCC AAC TGA AAG	Cyanine 3	356	1624	Cette étude
VORTI	ASC AGA CTC TAG TCA GCC A	Cyanine 3	0	70	Cette étude
UMB 1	AGC TAA GGA TCG TCG CCA T	Atto 488	15	1018	Cette étude
UMB 2	CAC CAT CTA GCT AAT CCT AC	Cyanine 3	28	1570	Cette étude

## K. Culture *in vitro*

Après avoir récupéré les biofilms en mangrove, les organismes ont été triés et plusieurs individus du morphotype mobile 1 ont été sélectionnés et placés en culture (Figure 38) :

- 20 individus du morphotype mobile 1 ont été placés respectivement dans 4 boîtes de pétri contenant 30 ml d'eau de mer filtrée à 0,22 µm enrichie en matière organique (en l'occurrence des flocons d'avoine et de la levure *Saccharomyces cerevisiae* en poudre). La matière organique sert de substrat pour le développement de nombreuses bactéries hétérotrophiques qui serviront de source de nourriture pour les individus placés en culture. Afin de ne pas épuiser le milieu, un repiquage de 5 individus a été effectué régulièrement dans de nouvelles boîtes de pétri. Ces repiquages se sont avérés nécessaires après la constatation de fortes augmentations de la population de ciliés (Bloom) dans les boîtes de pétri après 3-4 jours de culture. La culture a ainsi pu être maintenue durant trois semaines prouvant ainsi l'efficacité du milieu et de la méthode utilisée pour la culture du morphotype mobile 1. Plusieurs individus ont également été prélevés de façon journalière dans chaque boîte de pétri tout au long du processus de culture. Ces individus ont été fixés dans une solution de paraformaldéhyde diluée à 4 % dans de l'eau de mer stérile à 4 °C pendant au moins 24 heures afin de réaliser un

suivi de la population symbiotique à l'intérieur du cytoplasme des individus de l'espèce sélectionnée. Ce suivi est possible grâce aux observations au microscope à épifluorescence des individus après l'hybridation des bactéries présentes dans leur cytoplasme avec des sondes spécifiques par technique FISH. Les hybridations et les observations ont été réalisées selon le même protocole énoncé précédemment.

- 5 individus ont été placés, chacun respectivement, dans un pilulier différent contenant de l'eau de mer filtrée à 0,22 µm pour étudier le processus de division du cilié.
- 10 autres individus contenant de nombreuses inclusions blanches ont été mis en stabulation dans un petit bécher contenant de l'eau oxygénée avec un bulleur afin d'étudier le processus d'excrétion.
- 100 individus ont été prélevés à la fin de la culture pour effectuer des analyses phylogénétiques par séquençage du gène codant pour l'ARNr 18S afin de vérifier qu'il n'y ai pas eu une éventuelle contamination des boites de pétri par d'autres espèces de protiste ciliés.
- 10 individus ont également été préfixés pendant au moins 24 h à 4 °C dans une solution de glutaraldéhyde diluée à 2,5 % dans du tampon de cacodylate 0,1 M [pH 7,2] ajusté à 900 mOsm. Ces individus ont par la suite été fixés à l'osmium et à l'acétate d'uranyle, inclus dans de la résine puis observés au microscope électronique à balayage configuré en mode STEM selon le même protocole énoncé précédemment (voir Microscopie électronique à transmission). Ces observations avaient pour but de vérifier la présence de bactéries dans le cytoplasme des individus du morphotype mobile 1 après 3 semaines de culture.

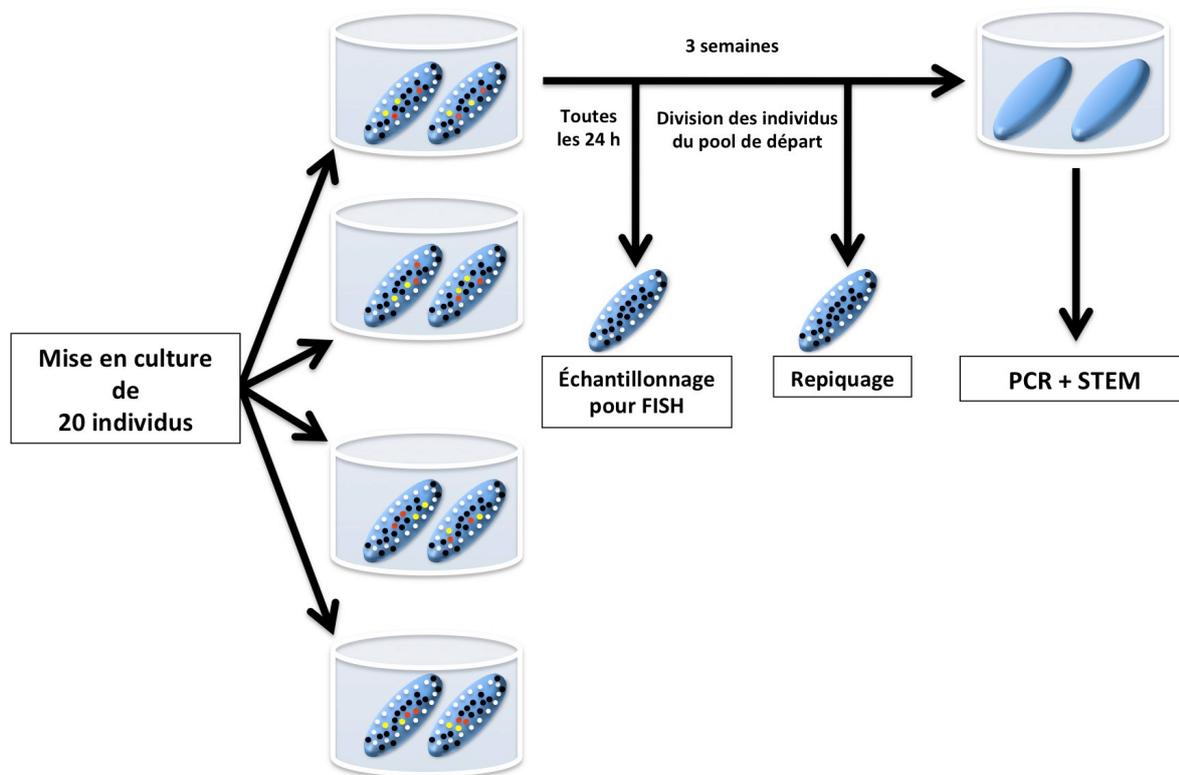


Figure 38. Schéma général expliquant la culture mise en place en laboratoire pour le morphotype mobile 1. 20 individus ont été placés à chaque fois dans 4 boîtes de pétri contenant de l'eau de mer filtrée enrichie en matière organique. Des prélèvements ont été réalisés toutes les 24 heures afin de suivre l'évolution de la population bactérienne dans le cytoplasme des ciliés grâce à des analyses FISH. Un repiquage des individus restants a été réalisé régulièrement dans de nouvelles boîtes de pétri afin de ne pas épuiser le milieu. Des individus ont été prélevés à la fin de la culture pour des analyses PCR et des observations au STEM.

## Chapitre 2. Résultats

### **A. Les espèces benthiques sessiles**

La surface des feuilles et des branches de *Rhizophora mangle* récoltées et observées sous la loupe binoculaire constitue un biotope pour de nombreux micro- et macro-organismes. En effet, on y retrouve des mollusques, des crustacés, des polypes de méduses, des anémones et des ciliés parmi de nombreuses bactéries filamenteuses. Certaines de ces bactéries filamenteuses sont blanches et sont fixées à la surface de la feuille. D'autres bactéries filamenteuses blanches du genre *Beggiatoa* ainsi que des cyanobactéries recouvrent également les échantillons de feuilles fraîchement récoltées.

# 1. Morphotype sessile 1 : *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe

## a. Morphologie générale de *Pseudovorticella* sp.

Les observations effectuées sous loupe binoculaire montrent que les individus de *Pseudovorticella* sp. apparaissent blancs lorsqu'ils sont exposés à une source de lumière, tout comme les bactéries filamenteuses et libres vivant à proximité. Les individus sont souvent regroupés en pseudocolonies pouvant atteindre une centaine d'individus sur la face d'une feuille. Certaines caractéristiques de leur morphologie sont visibles, on distingue nettement le stolon contractile qui permet aux individus de se fixer à leur substrat et le zoïde considéré comme l'organe de filtration et de nutrition de l'organisme. Une autre caractéristique frappante de ces organismes est leur capacité à se contracter lorsqu'ils perçoivent une perturbation dans l'environnement. Ainsi, le simple fait de toucher la feuille sur laquelle repose l'individu va provoquer un phénomène de contraction de ces organismes.

Le zoïde prend la forme d'une cloche inversée lorsqu'il est complètement relâché (Figures 39A, B) et celui-ci est arrondi ou légèrement ellipsoïdal lorsqu'il est contracté (Figure 39C). Il mesure 40 à 50  $\mu\text{m}$  de diamètre. Au sommet du zoïde apparaissent de nombreux cils qui encerclent le disque péristomiale, celui-ci constitue la porte d'entrée sur le vestibule qui représente la cavité buccale de cet organisme. La lèvre péristomiale, également appelée frontière du peristome ou bord de cloche, est le bord contractile qui englobe l'extrémité antérieure de la cellule. Lors de la contraction, la lèvre se limite à enfermer le disque péristomiale tandis que les cils sont repliés dans la cavité buccale. La lèvre péristomiale apparaît clairement lors de l'examen microscopique. Elle est blanche, plutôt large et aplatie, avec une bordure qui plonge vers le bas (Figures 39A, B). Lorsque l'individu est complètement relâché, la lèvre péristomiale forme un disque blanc au sommet du zoïde. Le macronoyau apparaît sous la forme d'un ruban qui forme un J étendu en spirale à travers toute la cellule (coloration au DAPI, figure 46). Ces organismes possèdent également un micronoyau généralement plus petit et sphérique ou ovale à l'intérieur de la cellule. Malheureusement celui-ci n'a pas pu être observé. Le cytoplasme apparaît incolore ou légèrement grisâtre au microscope optique et possède de nombreuses vacuoles sphériques blanches, d'environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, contenant probablement des bactéries (Figure 39C). Des bactéries apparaissent également à la surface du zoïde comme on peut l'observer sur la

figure 39C. Le stolon est la structure la plus caractéristique des Vorticellidae. Il est constitué essentiellement d'une gaine entourant un cordon contractile appelé spasmonème. Il apparaît blanc à la loupe binoculaire, cependant le spasmonème n'est visible que sous un microscope optique. Le stolon se contracte en spirale et est de longueur variable, généralement autour de 100  $\mu\text{m}$  quand l'organisme est contracté et 200  $\mu\text{m}$  quand celui-ci est relâché. Le stolon fait 6  $\mu\text{m}$  de diamètre et le spasmonème approximativement 3  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figures 39A, C).

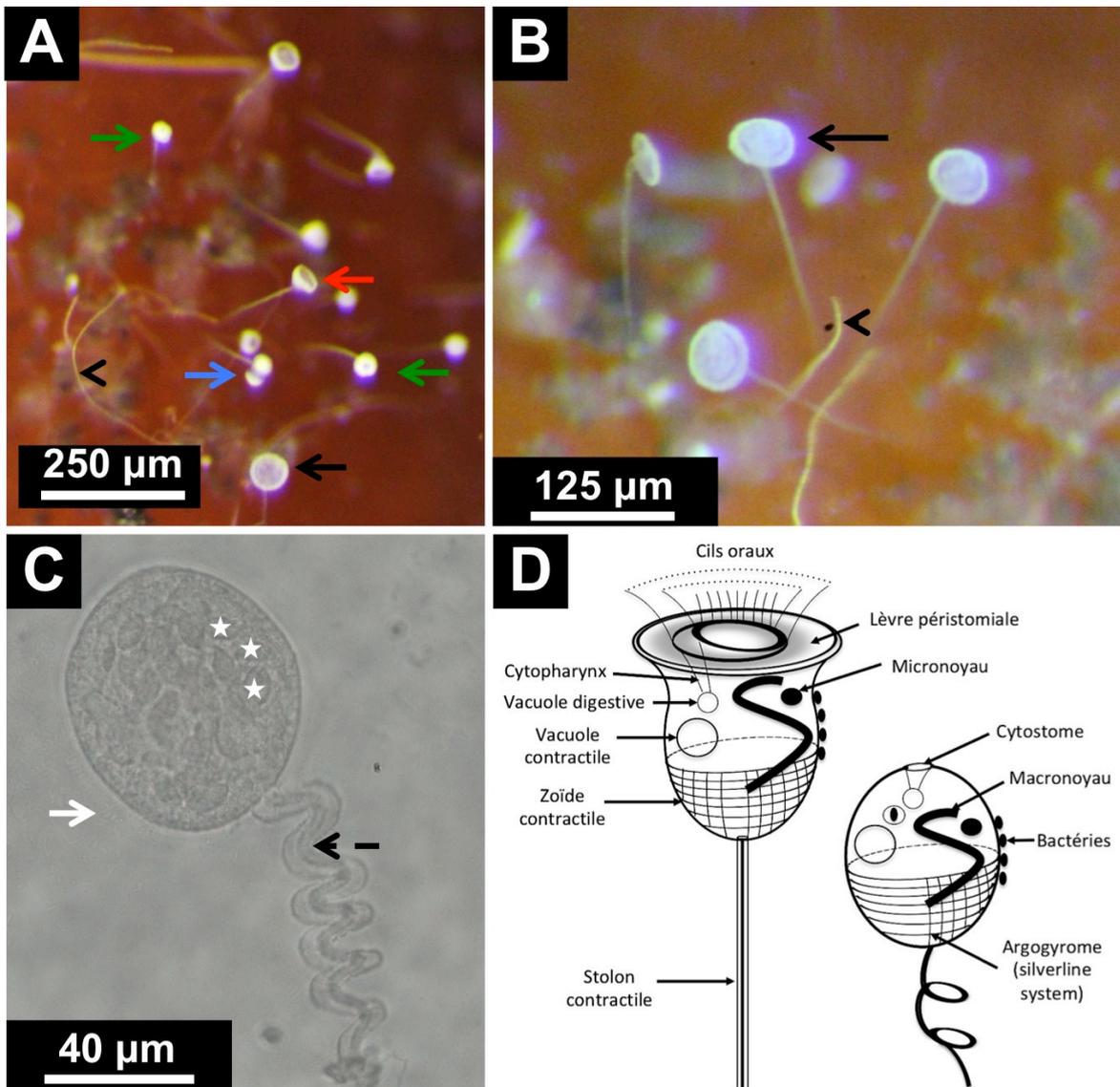


Figure 39. Plusieurs individus de *Pseudovorticella* sp. fixés à la surface d'une feuille de palétuvier rouge récoltée sur le sédiment de mangrove. (A et B) Les flèches noires pointent les individus complètement relâchés, la flèche rouge indique un individu qui se décontracte. Les flèches vertes montrent les individus contractés tandis que la flèche bleue montre un individu en fin de division avec un zoïde prêt à se détacher. Les ciliés et les bactéries filamenteuses (têtes de flèche) apparaissent blanc lorsqu'ils sont exposés à une lumière incidente et observés à la loupe binoculaire. (C) Individu observé au microscope optique. Les étoiles indiquent les vacuoles présentes à l'intérieur du cytoplasme, la flèche noire brisée montre le stolon avec le spasmonème et la flèche blanche indique les bactéries ectosymbiotiques. (D) Schéma général (cette thèse) montrant les différents caractères morphologiques observés chez *Pseudovorticella* sp.

## **b. Analyses au microscope électronique à balayage**

Les observations effectuées au MEB ont permis d'étudier précisément les principales caractéristiques morphologiques des bactéries ectosymbiotiques et du protiste *Pseudovorticella* sp. On distingue plusieurs individus contractés, le zoïde mesure environ 40 µm de diamètre (Figures 40A, B). Le stolon en forme d'hélice est ici nettement visible. Les individus étant contractés, il est impossible d'observer et d'étudier l'infaciliature. Il est très difficile d'observer des individus non-contractés au microscope. En effet ces derniers réagissent immédiatement lors de la fixation avec les aldéhydes ou autre stimuli de telle sorte que l'individu finit irrémédiablement par se contracter. Un autre effet néfaste des aldéhydes est une possible déformation de la partie supérieure du zoïde qui peut avoir tendance à s'élancer comme c'est probablement le cas ici. La forme sphérique du zoïde est cependant bien visible (Figures 40A, D). Le zoïde présente un « Silverline system » réticulé partiellement caché par le manteau bactérien (Figures 40B et C) mais visible sur la figure 40D. Le « Silverline system » réticulé représente l'agencement des crêtes pelliculaires à la surface du zoïde ; il est utilisé comme critère d'identification du genre *Pseudovorticella*. La partie basale du stolon est ancrée dans les feuilles. La surface du zoïde et du stolon est couverte par des bactéries assemblées en couche unique, comme un manteau bactérien (Figures 40B, C). Ces bactéries sont en forme de bâtonnets, ~ 2 µm de long et ~ 0.6 µm de large (Figures 40C, E). Elles n'ont pas de disposition particulière sur le zoïde, mais semblent avoir une organisation plus structurée sur le stolon. Seuls le disque adhésif, qui sert d'ancre à l'intérieur de la feuille et la partie basale non contractile du stolon sont dépourvus de bactérie (Figures 40B, E).

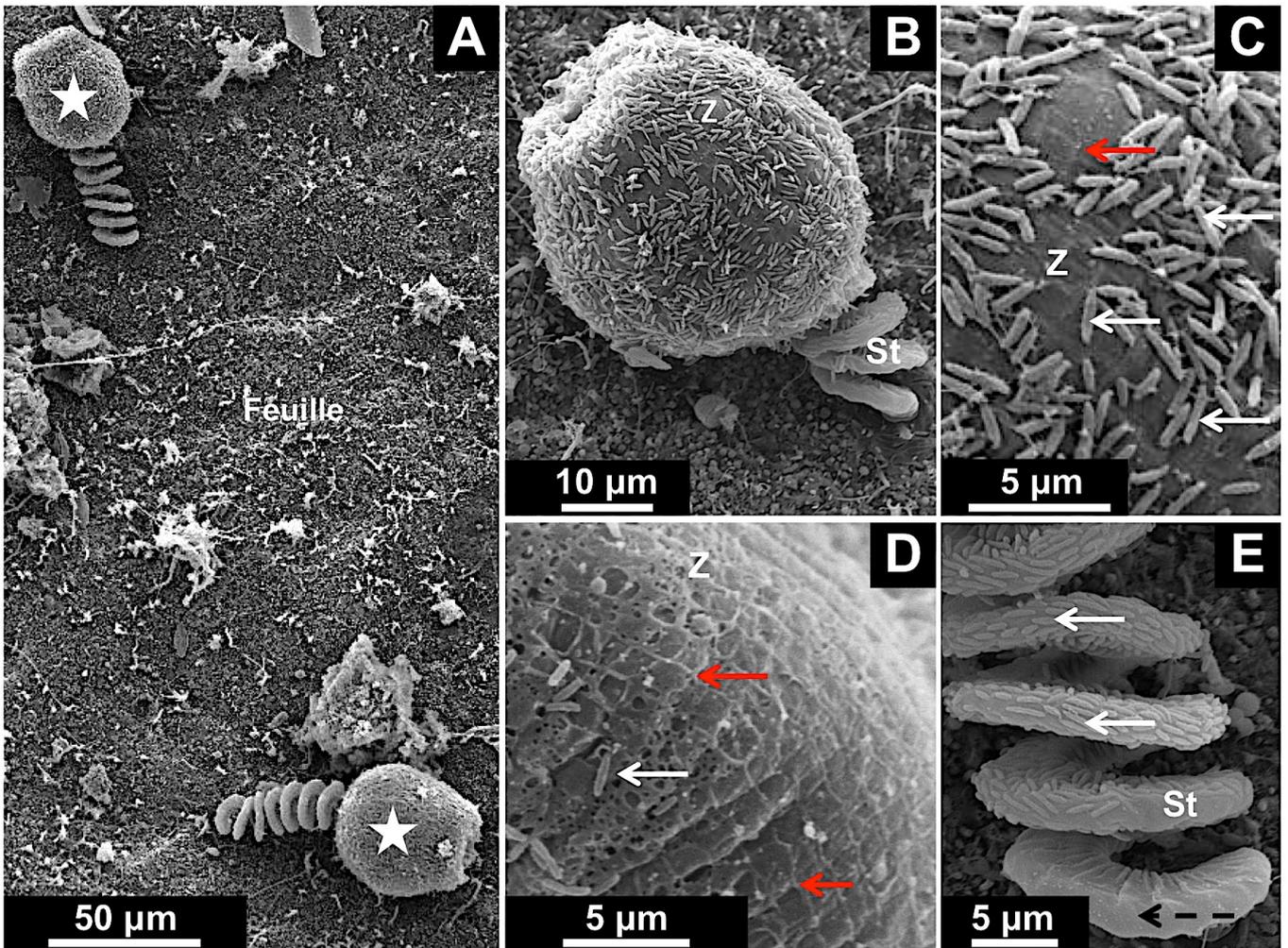


Figure 40. Analyse morphologique de *Pseudovorticella* sp. au MEB. (A) Les étoiles indiquent plusieurs individus fixés par leur stolon à la surface d'une feuille de *Rhizophora mangle* (feuille). Des grossissements plus élevés (B-D) permettent d'observer des bactéries (flèches blanches) couvrant toute la surface du zoïde (Z) et partiellement le stolon (St). Le Silverline system (flèches rouges) est partiellement caché par les bactéries sur les images B et C mais est clairement visible sur l'image D. Seule la partie basale du stolon (E) est exempte de bactéries (flèche noire en pointillée).

### c. Observations au microscope électronique à transmission

Les observations au MET ont confirmé que les bactéries qui se trouvent à la surface du zoïde (Z) et du stolon (St) sont organisées en une unique couche (Figure 41A). Le cytoplasme du protiste présente des vacuoles alimentaires contenant de nombreuses bactéries (Figures 41A et B). Des bactéries sont également présentes dans le vestibule (V) du protiste (Figure 41A). Ces bactéries sont semblables à celles observées à la surface du zoïde et du stolon. Elles ont une double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatif (Figure 41B). Des inclusions blanches sont visibles à l'intérieur du cytoplasme bactérien (Figure 41B). Elles correspondent aux empreintes laissées par les granules de soufre après leur dissolution durant le processus de déshydratation à l'acétone. En ce qui concerne l'intérieur du stolon, une étude approfondie de son ultrastructure révèle qu'il est constitué essentiellement d'une paroi externe

ou « gaine » renfermant une matrice fibrillaire qui supporte un cordon contractile. Le cordon se compose d'une couche liée à la membrane du cytoplasme et se trouve au centre du stolon. À l'intérieur de ce cordon se trouve le myonème contractile ou « spasmoneme ». Le plasma contient souvent de petits corps réfractiles appelés granules coplastiques qui se situent à côté du spasmoneme.

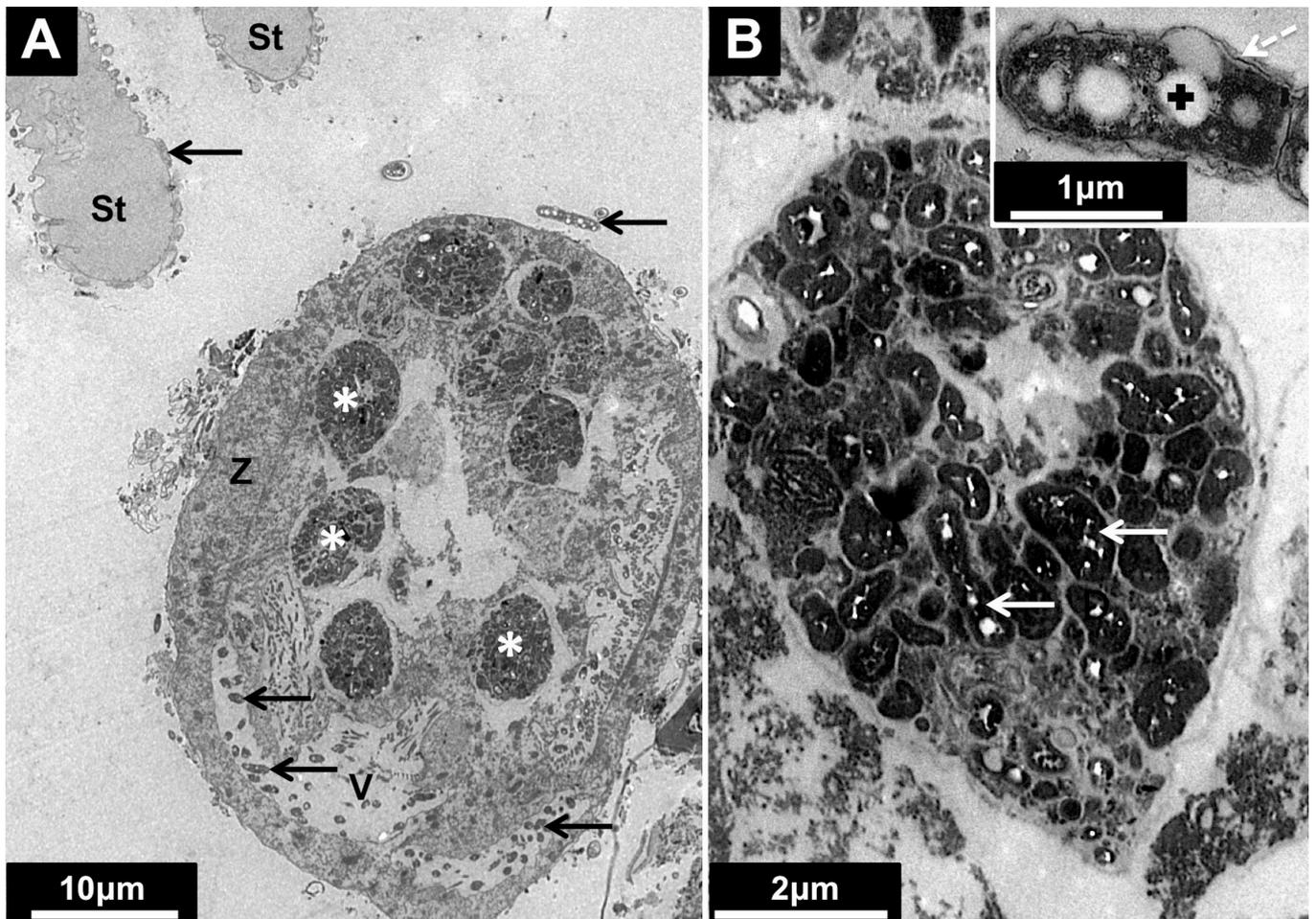


Figure 41. Analyse ultrastructurale de *Pseudovorticella* sp. par MET. (A) L'observation des coupes fines confirme la présence de bactéries (flèches noires) à la surface du zoïde (Z), sur le stolon (St) et dans le vestibule (V). Dans le cytoplasme, les vacuoles alimentaires (astérisques) contiennent des bactéries qui ont été ingérées. (B) Observation du contenu d'une des vacuoles alimentaires. Elle contient des bactéries ayant la même forme que celles observées à la surface du protiste. L'insert montre des granules blancs situés dans les bactéries (croix noire) trouvées dans les vacuoles alimentaires, ainsi que la double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatif (flèche blanche pointillée).

#### d. Analyses par spectrométrie Raman

Les observations au microscope optique permettent d'observer la présence de taches blanches à l'intérieur du cytoplasme (Figure 42A). Les spectres enregistrés sur ces points ont révélé la présence de soufre élémentaire  $S_8$  dans le zoïde alors qu'aucun élément soufré n'a été détecté dans l'eau environnante ou sur le stolon (Figure 42B). La cartographie du soufre réalisée sur le zoïde (Figure 42C) a montré que le soufre est principalement concentré dans le

cytoplasme du cilié et plus particulièrement à l'intérieur des bactéries contenues dans les vacuoles alimentaires.

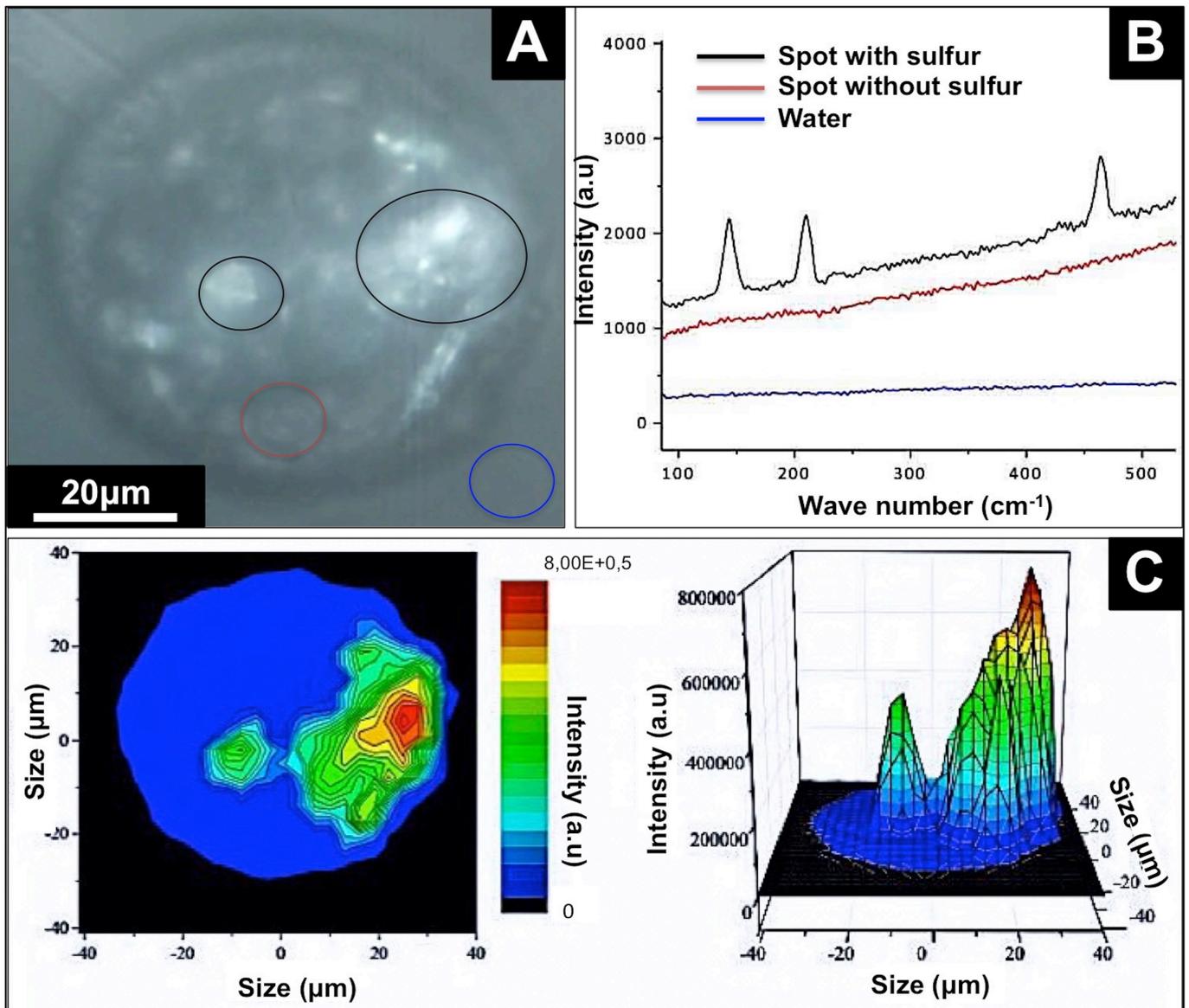


Figure 42. Analyse de *Pseudovorticella* sp. par microspectrométrie Raman. En se basant sur les observations faites par microscopie optique (A), le zoïde contient des zones blanches (cercles noirs) soupçonnées de contenir des composés élémentaires soufrés alors que d'autres zones semblent être dépourvues de ces composés (cercle rouge). Le cercle bleu indique l'eau environnante. (B) Spectres Raman acquis sur cet individu. La ligne noire représente le soufre élémentaire pur  $S_8$  détecté dans les zones blanches décrites précédemment, elle se caractérise par deux pics à  $480\text{ cm}^{-1}$  et  $210\text{ cm}^{-1}$ . La ligne rouge confirme l'absence de soufre dans les autres zones de la cellule. L'eau de mer environnante, utilisée comme contrôle négatif, ainsi que la surface du protiste ne présentent pas de soufre, aucun pic n'ayant été détecté (ligne bleue). (C) Les cartographies 2D et 3D montrent que le soufre est situé dans les zones blanches considérées comme étant les vacuoles alimentaires de *Pseudovorticella* sp. L'intensité des pics représentée par leur couleur est directement liée à la quantité de soufre détecté dans l'échantillon.

### e. Analyse phylogénétique de l'hôte

La séquence partielle du gène codant pour l'ARNr 18S (No. d'accession KY777484) obtenue pour l'hôte a une longueur totale de 1005 nucléotides. La reconstruction phylogénétique basée sur l'alignement multiple des séquences du gène codant pour l'ARNr

18S de divers ciliés péritriches sessiles place cet organisme parmi le genre *Pseudovorticella* (Foissner et Schiffmann, 1974) en utilisant la méthode Neighbor Joining (NJ) (Figure 43) et dans un nouvel embranchement rattaché à celui des *Vorticella* (Linnaeus, 1767) lorsque l'on utilise la méthode Maximum Likelihood (ML) (Figure 44). Cependant, la faible robustesse du nœud ne supporte pas cette affiliation. En se basant sur les résultats obtenus précédemment et à la vue de la relation phylogénétique étroite qui relie ces deux genres, cet organisme a été nommé *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe.

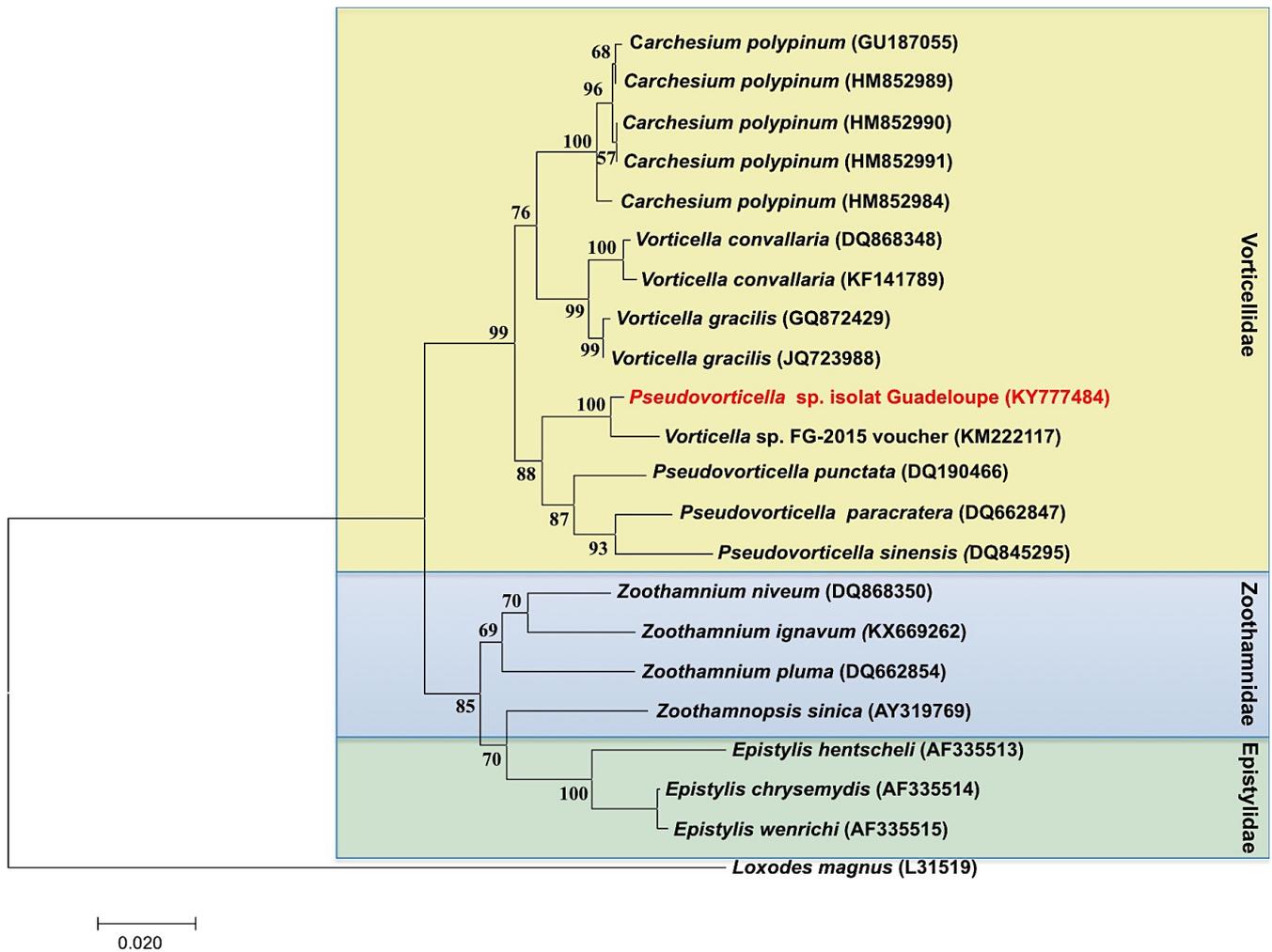


Figure 43. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARN 18S par la méthode du Neighbour Joining (NJ) révélant la position phylogénétique de *Pseudovorticella* sp. Cet arbre montre les relations phylogénétiques entre *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe et d'autres espèces de Ciliés. Cet arbre est basé sur l'alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 781 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 18S. *Loxodes magnus* a été utilisé comme extra groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 2 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences

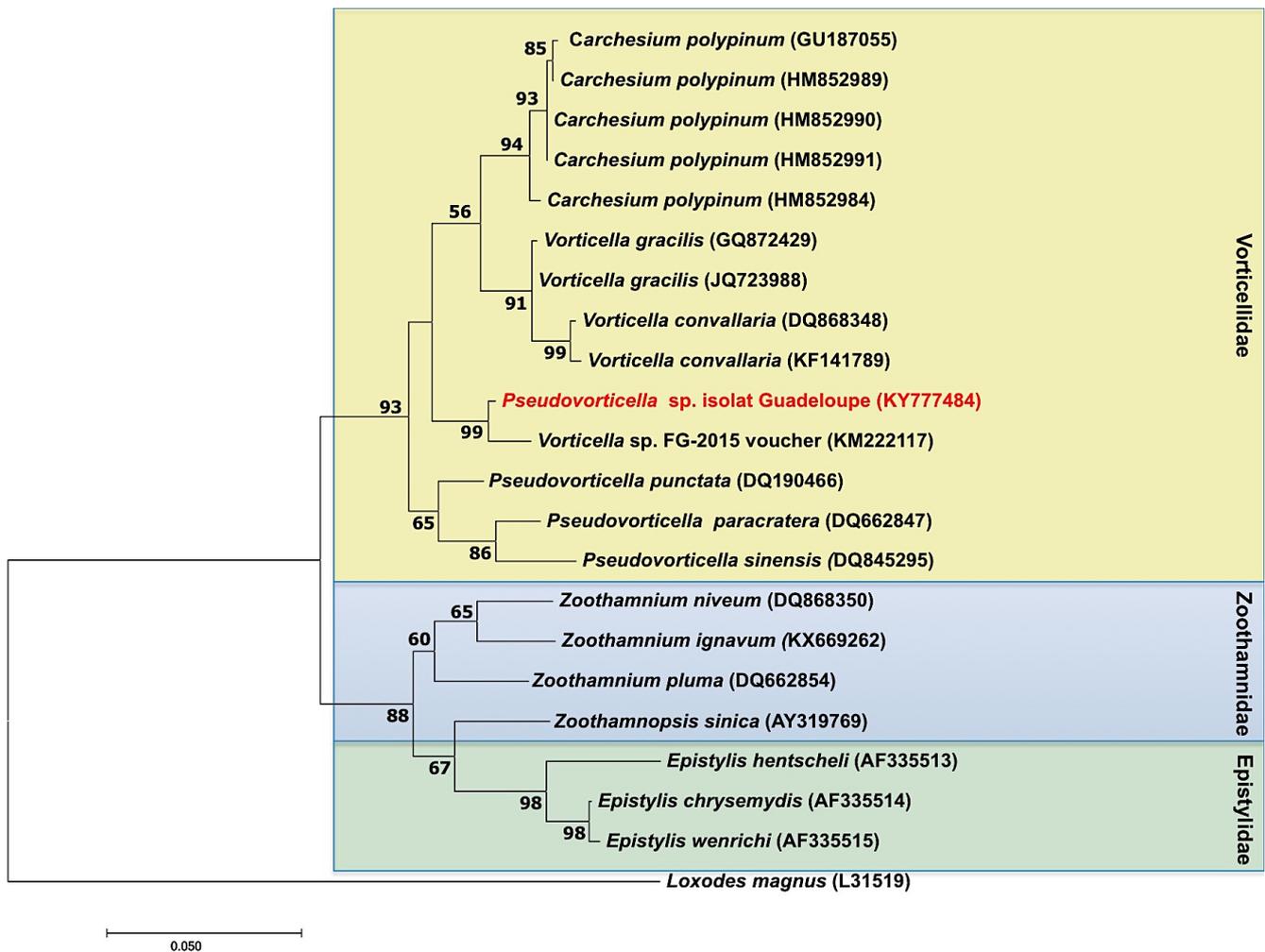


Figure 44. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de gène de l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de *Pseudovorticella* sp. Cet arbre montre les relations phylogénétiques entre *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe et d'autres espèces de ciliés. Cet arbre est basé sur l'alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 781 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 18S. *Loxodes magnus* a été utilisé comme extra groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 5 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences.

## f. Analyse phylogénétique des bactéries ectosymbiotiques

La séquence du gène codant pour l'ARNr 16S obtenue pour les bactéries ectosymbiotiques a une longueur totale de 1320 nucléotides (No. d'accèsion KY777480). L'arbre phylogénétique basé sur des séquences partielles codant pour le gène de l'ARNr 16S a révélé que le symbiote de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe appartient aux  $\gamma$ -protéobactéries déjà connues comme symbiotes de divers invertébrés marins présents dans les mangroves de Guadeloupe (Figure 45). La séquence obtenue ici à 97% d'identité avec la séquence la plus proche qui est celle d'une autre bactérie ectosymbiotique présente à la surface du cilié *Zoothamnium ignavum* nommé *Candidatus* Navis piranensis strain Slovenia (No. d'accèsion KX669263) dans l'arbre phylogénétique.

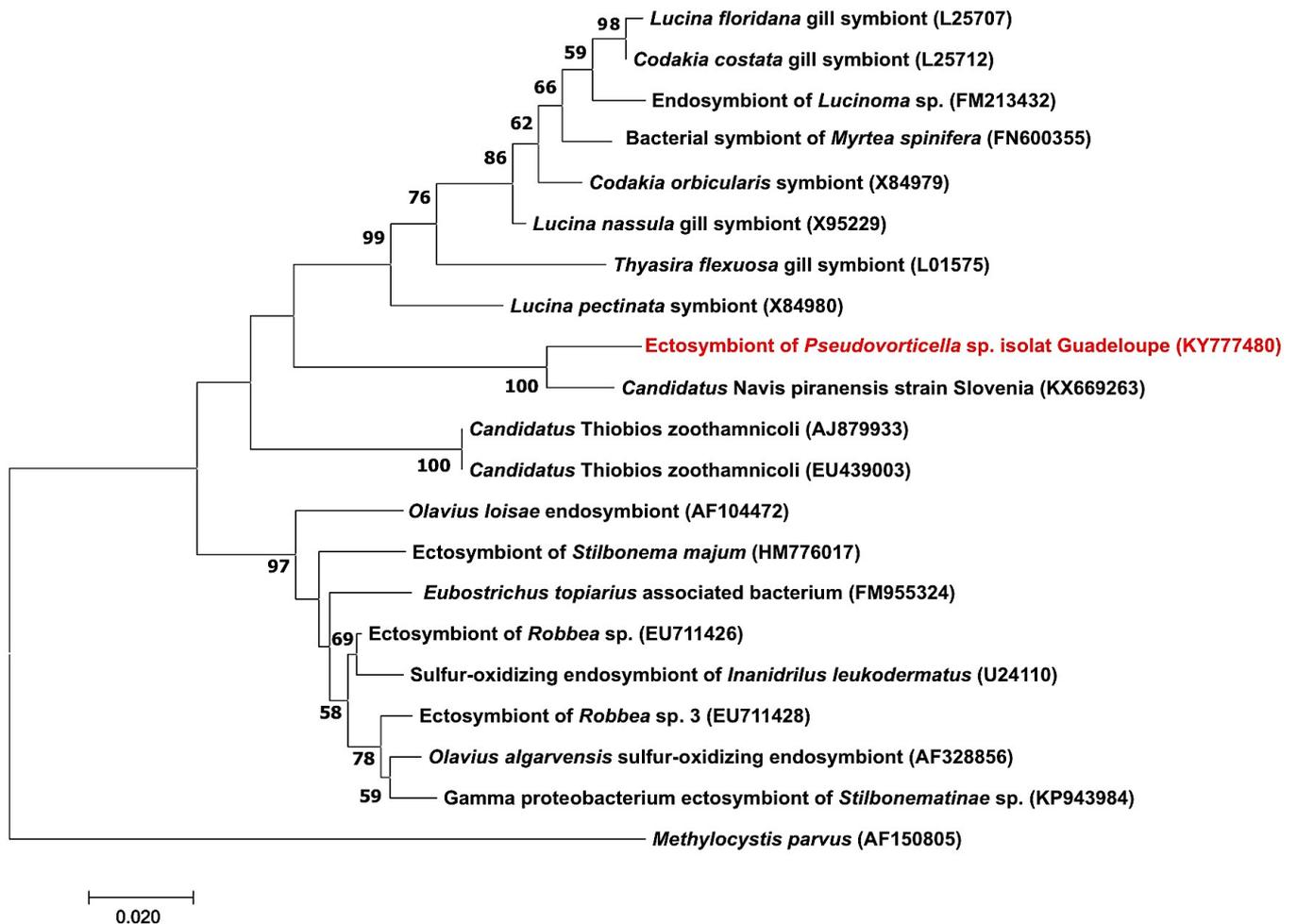


Figure 45. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique des bactéries ectosymbiotiques de *Pseudovorticella* sp. L'arbre présenté ici montre les relations phylogénétiques entre les bactéries ectosymbiotiques de *Pseudovorticella* et d'autres endo- et ectosymbiotes sulfo-oxydants. Cet arbre est basé sur un alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 1233 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 16S. *Methylocystis parvus* a été utilisé comme extra-groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 2 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences.

## g. Observations microscopiques des hybridations réalisées par

### FISH

Les observations réalisées après les hybridations avec les sondes spécifiques VO16B (Figures 46A, B) et VORTI (Figures 46D, F), conçues à partir de la séquence du gène codant pour l'ARNr 16S obtenue au cours de ce travail, ont confirmé que la séquence utilisée pour l'analyse phylogénétique provient bien des bactéries ectosymbiotiques de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe. La concentration optimale en formamide dans le tampon d'hybridation s'est avérée être de 20 % pour les deux sondes spécifiques. Selon les observations effectuées par microscopie confocale (Figures 46B, C), les bactéries ectosymbiotiques qui recouvrent le corps de *Pseudovorticella* sp. sont les mêmes que celles trouvées dans les vacuoles

alimentaires. Pour chaque sonde spécifique utilisée, le signal a été confirmé par le signal positif de la sonde EUB 338 (Figures 46C et G) et du marquage DAPI (H). Aucun signal de fluorescence n'a été détecté lors des observations effectuées après l'hybridation des sondes NON-EUB338 (complémentaire à la sonde bactérienne EUB 338) utilisé en tant que témoin négatif (Figure 46E), démontrant que les signaux de fluorescence détectés avec les sondes spécifiques n'étaient pas provoqués par autofluorescence ou par coloration non spécifique des bactéries mais bien par une liaison spécifique des sondes. D'après toutes ces observations, il semblerait donc que toutes les bactéries ectosymbiotiques observées à la surface de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe appartiennent à la même espèce. Les bactéries sont détachées de la surface du zoïde puis ingérées par l'hôte pendant le processus de nutrition, puis les bactéries sont stockées dans les vacuoles alimentaires où elles finiront par être digérées.

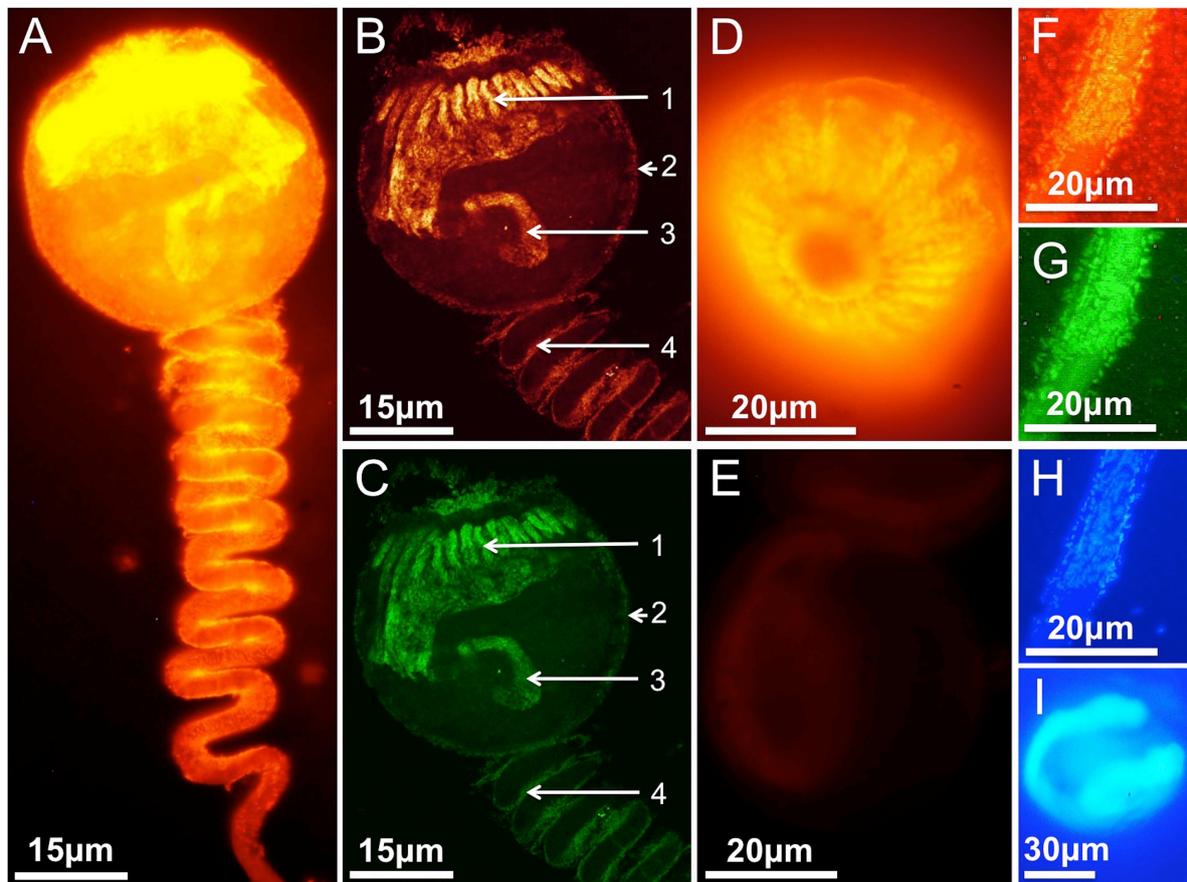


Figure 46. Observations des hybridations *in situ* (FISH) réalisées sur les ectosymbiotes de *Pseudovorticella* sp. (A) Hybridation de la sonde VO16B avec les bactéries ectosymbiotiques présentes à la surface du zoïde. (B et C) Observation au microscope confocal. La sonde spécifique VO16B (B) révèle la présence de bactéries ectosymbiotiques sur le péristome et dans la cavité buccale (1), à la surface du zoïde (2), à l'intérieur des vacuoles alimentaires (3) et sur le stolon (4). (C) Les hybridations ont été confirmées grâce à la superposition des signaux de la sonde EUB 338. (D) Les bactéries ectosymbiotiques présentes sur le zoïde et autour du péristome ont également été hybridées avec la sonde spécifique VORTI. (E) Aucun signal n'a été détecté chez les bactéries ectosymbiotiques présentes à la surface du zoïde de *Pseudovorticella* sp. en utilisant la sonde NON-EUB338. (F et G) Les sondes VORTI et EUB 338 se sont également hybridées avec les bactéries présentes sur le stolon de *Pseudovorticella* sp et le marquage est confirmé par le marquage au DAPI (H). Le macronoyau en forme de ruban est également révélé par le marquage au DAPI (I).

## 2. Morphotype sessile 2 : *Zoothamnium niveum* isolat

### Guadeloupe

Plusieurs autres morphotypes de protistes ciliés ont été observés fixés aux feuilles de palétuviers présentes à la surface des sédiments marins de mangrove. Alors que ces morphotypes semblent différents les uns des autres, il semblerait qu'ils appartiennent tous à la même espèce *Zoothamnium niveum*. *Zoothamnium niveum* est connu pour être l'un des protistes les plus étudiés à ce jour (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; 1996b ; Bright *et al.*, 2014 ; Volland *et al.*, 2018) et sa présence dans la lagune de la Manche-à-Eau en Guadeloupe a déjà été signalée plusieurs fois (Maurin *et al.*, 2010 ; Laurent *et al.*, 2013). Celui-ci se retrouve très souvent avec des individus de *Pseudovorticella* sp. sur les feuilles et branches de palétuviers rouges tombés à la surface du sédiment de mangrove. Alors que le cycle de vie a déjà été étudié en laboratoire (Rinke *et al.*, 2007), c'est la première fois que toutes les formes du cycle de vie sont retrouvées et étudiées en milieu naturel. On distingue deux stades principaux chez *Z. niveum*. Lors du premier stade dit « trophique », la colonie est fixée à son substrat, s'alimente et grandit. Le second stade dit « télotroche » sert à la dispersion. Ce stade correspond à la libération d'un macrozoïde de la colonie qui va chercher un nouveau substrat afin de fonder une nouvelle colonie. Durant le stade trophique, la colonie subit de nombreuses modifications au niveau morphologique, on peut distinguer 3 formes distinctes notées F1, F2, F3 dans cette étude et chacune caractérisée par la présence ou non de différents types de zoïdes.

#### a. Analyse phylogénétique de l'hôte

Les séquences du gène codant pour l'ARNr 18S obtenue pour les formes F1 (No. d'accession MH568688) et F2 (No. d'accession MH558261) du stade de *Zoothamnium* sp. ont respectivement une longueur totale de 895 et 865 nucléotides. Les analyses BLAST de ces deux séquences ont montré que ces deux stades partagent respectivement 99% et 98% d'identité avec la séquence de *Zoothamnium niveum* (No. d'accession DQ868350). La reconstruction phylogénétique (Figure 47) basée sur l'alignement multiple des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S de ces deux formes F1 et F2 de *Zoothamnium* sp. et d'autres ciliés confirme les résultats obtenus par BLAST en plaçant cet organisme parmi le genre *Zoothamnium*. Il semble que ces formes appartiennent à une seule espèce nommée *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe dans cette étude.

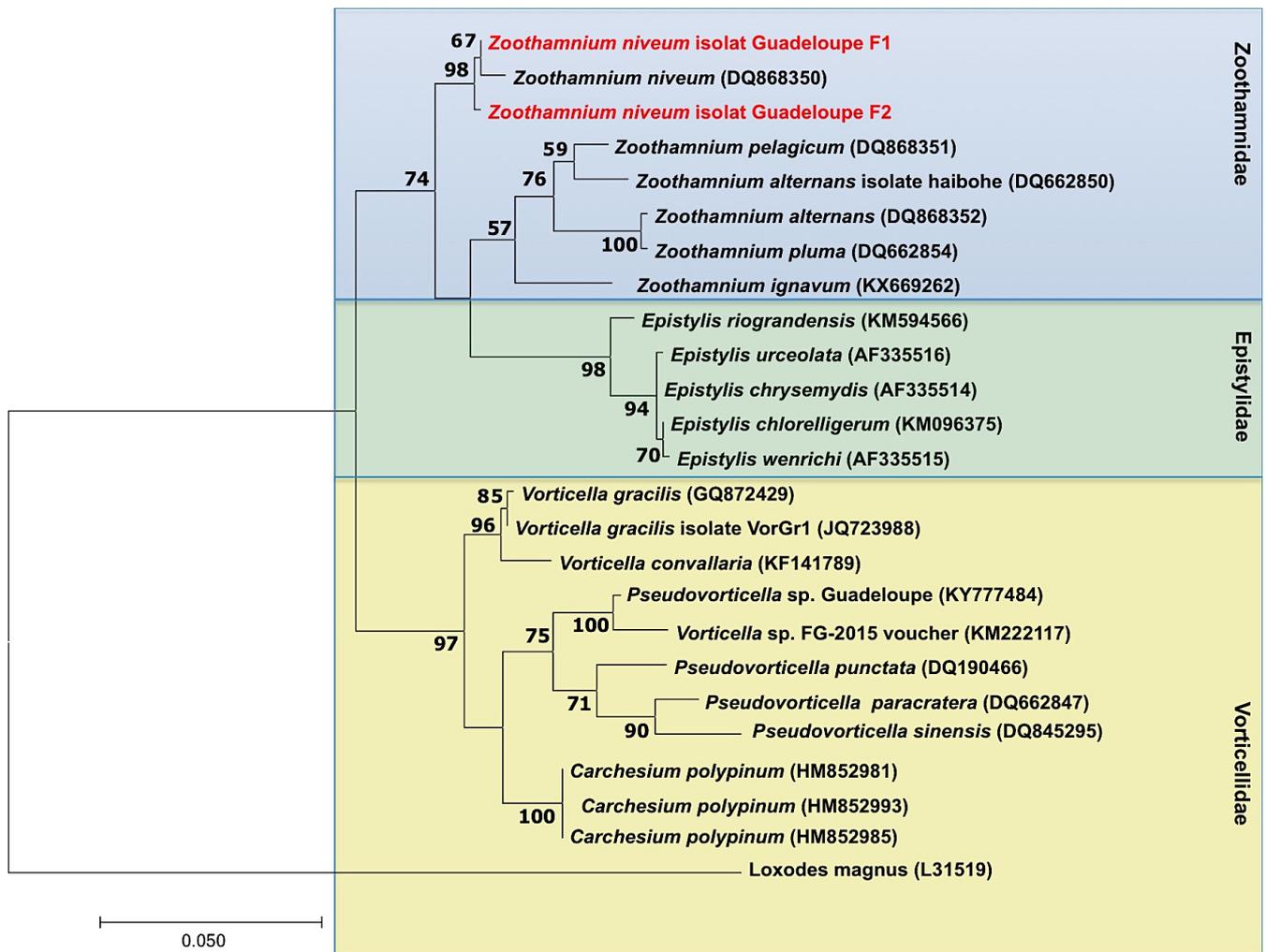


Figure 47. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe. Cet arbre montre les relations phylogénétiques entre les différentes formes trophiques de *Z. niveum* isolat Guadeloupe et d'autres espèces de ciliés. Cet arbre est basé sur l'alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 784 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 18S. *Loxodes magnus* a été utilisé comme extra groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 5 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences.

## b. Morphologie générale de *Zoothamnium niveum* et cycle de vie.

Les différentes formes du stade trophique de *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe sont représentées sur la figure 48. Ces observations effectuées au microscope optique permettent d'observer la morphologie générale de la colonie au cours de sa croissance. La colonie est composée d'un ou plusieurs zoïdes présents sur des branches alternées et reliées par un stolon commun. On distingue également différents types de zoïdes : les microzoïdes qui sont responsables de la nutrition de la colonie, les macrozoïdes qui permettent la dispersion de la colonie et les zooïdes terminaux qui assurent la croissance de la colonie. La première forme du stade trophique (Figure 48A), nommée F1 dans cette étude, est

caractérisée par un zoïde terminal en forme de « jarre » et d'un stolon, il permet à l'organisme de se fixer au substrat grâce au disque adhésif qui se trouve à son extrémité. Le zoïde apparaît blanc à l'observation tandis que le stolon est complètement transparent. Sur les stades suivants F2 (Figures 48B-D), on peut observer l'apparition de nouveaux zoïdes blancs reliés au stolon et situés sous le zoïde terminal, ce sont les premiers microzoïdes de la colonie. On note également une taille plus importante du stolon et de l'organisme en général, la partie supérieure du stolon où se trouve les microzoïdes, commence à devenir blanche également. Les stades suivants F3 (Figures 48E, F) sont caractérisés par l'apparition des macrozoïdes. Ce sont les zoïdes télotroches qui vont se détacher de la colonie mère afin de fonder une nouvelle colonie fille sur un nouveau substrat. On observe également que le stolon se ramifie, certaines branches sur lesquelles étaient présents des microzoïdes et un zoïde terminal commencent à s'allonger à partir de l'axe principal. Plusieurs macrozoïdes peuvent être présents sur une branche.

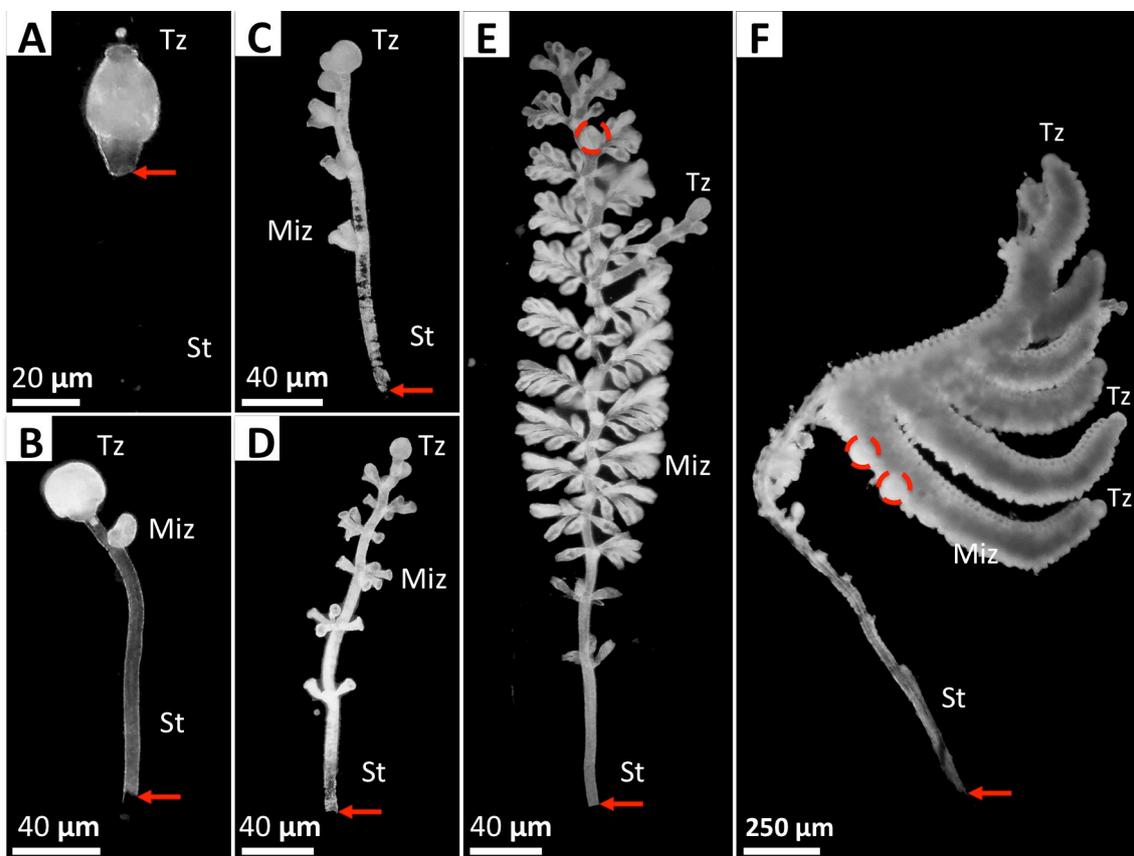
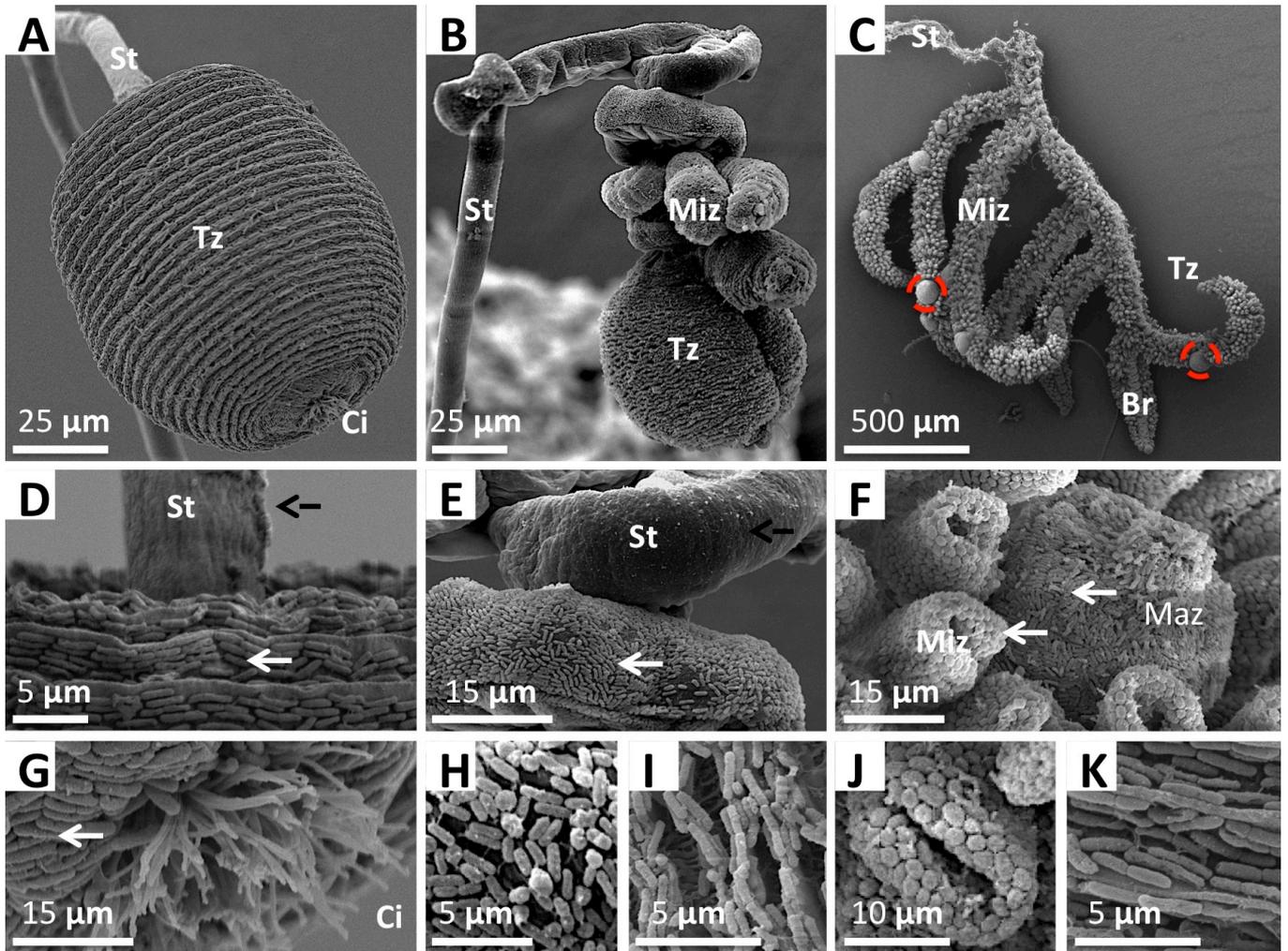


Figure 48. Transformation d'une colonie de *Zoothamnium niveum* durant sa croissance. La forme F1 du stade trophique de la colonie (A) se caractérise par la présence d'un zoïde terminal (Tz) et d'un stolon (St). La forme F2 du stade trophique de la colonie (B-D) se distingue par l'apparition des microzoïdes (Miz) tandis que la forme F3 (E-F) est caractérisée par l'apparition des macrozoïdes (cercles rouges ouverts). Les individus apparaissent blancs sous lumière incidente (A-F). Les flèches rouges représentent la zone de transition entre la partie aposymbiotique (transparente) et la zone symbiotique (blanche). Cette transition se fait à différents endroits sur le stolon en fonction de la forme étudiée. On remarque sur la photo A que le stolon est intégralement aposymbiotique tandis que sur les autres stades du développement, seule la partie inférieure du stolon (la plus basale) est aposymbiotique.

### c. Analyses au microscope électronique à balayage

Les observations effectuées au MEB ont permis d'étudier précisément les principales caractéristiques morphologiques des bactéries ectosymbiotiques et des différentes formes que peut prendre *Zoothamnium niveum* durant le stade trophique. Tous les individus observés sont encore une fois contractés. Comme chez *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe, il est très difficile d'observer des individus non contractés au microscope à balayage. Les individus de *Z. niveum* sont également sensibles aux perturbations de leur environnement, ce qui est problématique lors de la fixation. Les différentes formes F1, F2, F3 du stade trophique ont été observés durant cette analyse (Figures 49A-C). Le zoïde terminal prend une forme beaucoup plus arrondie lorsqu'il est contracté (Figure 49A), on peut également noter que le stolon est en forme de « zig zag » et que celui-ci est dépourvu de bactéries, ce qui confirme les observations faites au microscope optique. On observe de nombreuses bactéries alignées qui forment un manteau bactérien à la surface du zoïde tandis que le stolon est dépourvu de bactéries (Figures 49D, G). Les bactéries sont en forme de bâtonnets,  $\sim 2 \mu\text{m}$  de long et  $\sim 0.6 \mu\text{m}$  de large (Figures 49D-G). Les crêtes pelliculaires transverses qui forment le « Silverline system » sont nettement visibles (Figures 49A, D). On peut également observer la présence de cils qui dépassent du péristome du zoïde terminal (Figures 49A, G). Le stade suivant F2 est caractérisé par l'apparition de microzoïdes (Figure 49B). On observe que seule la partie proximale du stolon où se trouvent les microzoïdes et le zoïde terminal est couverte de bactéries (Figures 49B, E). On note également la présence de coccobacilles et de bacilles sur les microzoïdes et le zoïde terminal respectivement figures 49H et 49I. Les bactéries en forme de bâtonnets sont plus nombreuses et sont alignées sur le zoïde terminal tandis qu'elles semblent plus désorganisées sur les microzoïdes. Les coccobacilles et les bacilles sont équivalents en nombre. Le stade final F3 est caractérisé par l'apparition des macrozoïdes et des branches de la colonie (Figures 49C, F). Les macrozoïdes sont de forme sphérique à ellipsoïdale tandis que les microzoïdes sont en forme de jarre avec l'extrémité supérieure en forme de fer à cheval (Figure 49F). Les microzoïdes sont recouverts de coccobacille (Figure 49J) tandis que les macrozoïdes sont recouverts de bactéries en forme de bâtonnets (Figure 49K). Les bactéries ont tendance à être alignées le long des crêtes pelliculaires qui parcourent les zoïdes terminaux et les macrozoïdes. Il semblerait donc qu'en milieu naturel, la forme et la distribution des bactéries à la surface des zoïdes, dont notamment celles des bactéries présentes à la surface des microzoïdes, changent au fur et à mesure du développement de la

colonie. Il semblerait également que le stolon soit colonisé par les bactéries ectosymbiotiques lors de l'apparition des premiers microzoïdes.



**Figure 49.** Analyses morphologiques des différentes formes trophiques F1, F2, F3 de *Zoothamnium* sp. au MEB. On observe de nombreuses bactéries présentes à la surface des différents zoïdes (flèches blanches), le stolon de la forme F1 (A, D) ne possède pas de bactéries à sa surface (flèche noire) tandis que le stade F2 en possède sur sa partie proximale (E). Les zoïdes présentent de nombreux cils (Ci) qui forment l'infaciliature du zoïde et qui vont servir à l'alimentation de la colonie, ils sont visibles sur les figures A et G. Les microzoïdes présentent également une infaciliature bien que ceux-ci se replient dans le vestibule lors de la contraction (B, J). Les colonies de Guadeloupe produisent des ramifications du stolon sous forme de branches (C), chaque branche possède un ou plusieurs macrozoïdes (cercles rouges, Maz) visibles sur les images C et F. On observe différents morphotypes de bactéries ectosymbiotiques, certaines apparaissent sous formes de coccobacilles tandis que d'autres sont en forme de bâtonnets (Figures H, I, J, K).

#### d. Analyses ultrastructurales au microscope électronique à transmission

Les observations au MET ont confirmé que les bactéries sont organisées en une unique couche à la surface de la colonie (Figures 50A-C). Des bactéries sont également présentes dans le vestibule des microzoïdes (Figure 50C). Ces bactéries ont une double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatif (Figure 50B). Des inclusions blanches sont visibles

à l'intérieur du cytoplasme des bactéries (Figures 50A-C). Elles correspondent aux empreintes laissées par les granules de soufre après leur dissolution durant le processus de déshydratation à l'acétone. En ce qui concerne l'intérieur du stolon, une étude approfondie de son ultrastructure révèle qu'il est constitué essentiellement d'une paroi externe ou « gaine » renfermant une matrice fibrillaire qui supporte un cordon contractile. Le cordon se compose d'une couche liée à la membrane du cytoplasme et est excentré de l'axe du stolon. À l'intérieur de ce cordon se trouve le myonème contractile ou « spasmoneme ». Le plasma contient souvent de petits corps réfractiles appelés granules coplastiques qui se situent à côté du spasmoneme. Des inclusions noires sont également visibles à l'intérieur du cytoplasme des bactéries, cette couleur noire est caractéristique de structure riche en carbone, il s'agit probablement de réserves de carbone sous forme de glycogène (Figures 50A-C). De nombreux cils sont également visibles à l'intérieur des microzoïdes, ils constituent l'infaciliature du cilié (Figure 50C). La pellicule du zoïde terminale est constituée d'une membrane plasmique d'une membrane alvéolaire externe, et d'une membrane alvéolaire interne (Figures 50A, B).

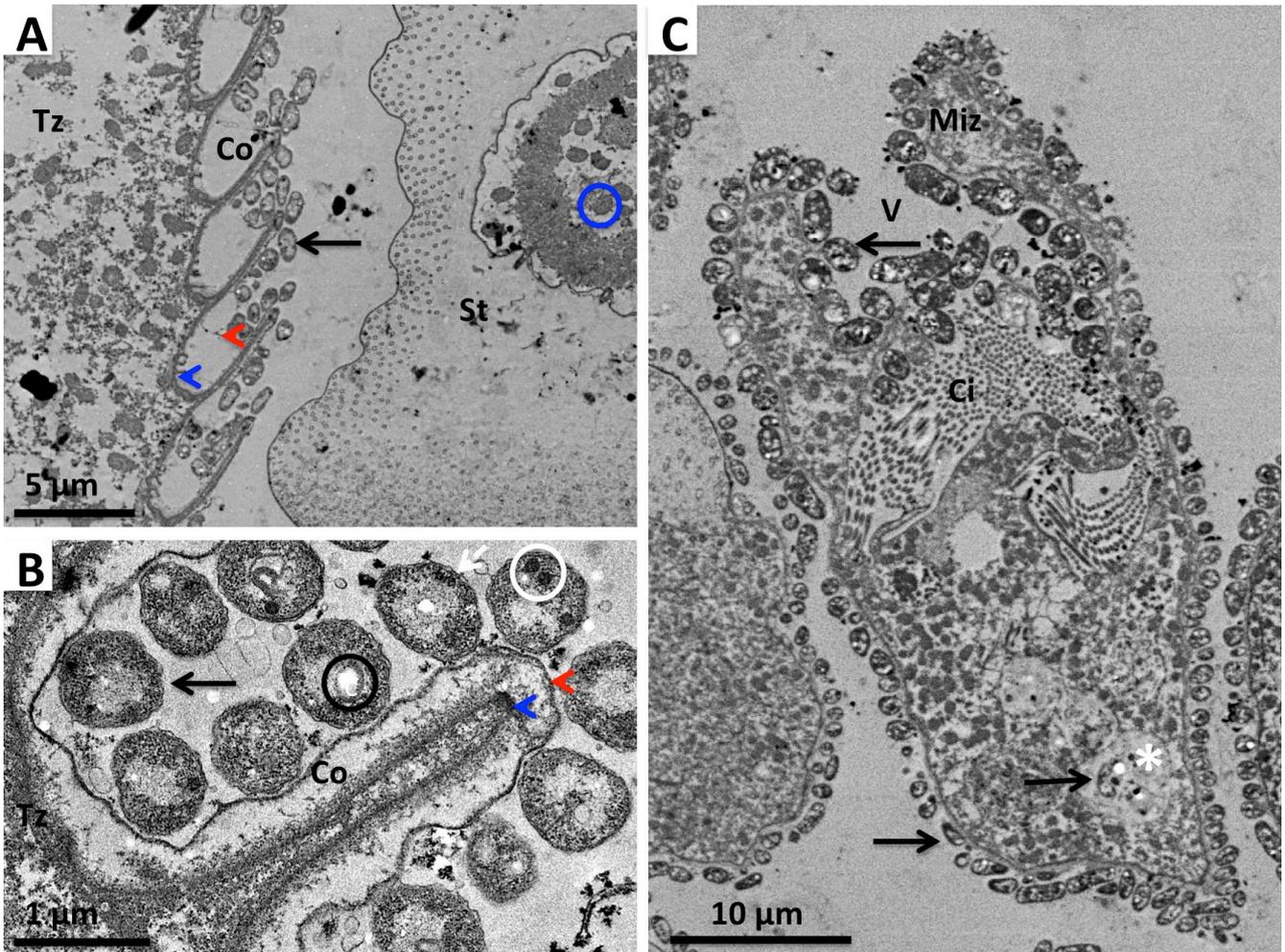


Figure 50. Analyses ultrastructurales de *Zoothamnium* sp. au MET. L'observation des coupes fines des formes F1 (A) et F2 (B), confirme la présence de bactéries (flèches noires) à la surface des zoïdes terminaux (Tz). Le stolon (St) ne présente pas de bactérie à sa surface (A), on retrouve cependant de nombreux granules thecoplastiques (cercle bleu). L'observation des coupes fines de la forme F3 (C) confirme la présence des bactéries sur les microzoïdes (Miz), on note également la présence de bactéries dans le vestibule (V) et dans les vacuoles digestives (astérisque). On peut également observer la présence des cils (Ci) non visibles au MEB. La pellicule des zoïdes terminaux (A, B) se compose d'une membrane plasmique reliée à une membrane alvéolaire externe (flèches rouges), et d'une membrane alvéolaire interne (flèches bleues). Les membranes alvéolaires interne et externe sont séparées par un cortex (Co). Les bactéries ectosymbiotiques présentent une double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatif (flèche blanche cassée) et présentent de nombreuses inclusions sous formes de réserve de carbone (cercle blanc) ou granulés de soufre (cercle noir).

### e. Analyse phylogénétique du symbiote de *Zoothamnium niveum*

#### isolat Guadeloupe

Les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S obtenues pour les bactéries ectosymbiotiques des différentes formes trophiques de *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe (F1 et F2) ont respectivement une longueur totale de 1382 (No. d'accèsion MH559278) et 1418 nucléotides (No. d'accèsion MH559280). L'arbre phylogénétique basé sur des séquences partielles codant pour le gène 16S de l'ARNr a révélé que le symbiote de *Z. niveum* isolat Guadeloupe est lié aux  $\gamma$ -protéobactéries déjà connues comme symbiotes de divers invertébrés marins présents dans la mangrove de Guadeloupe. Les séquences obtenues

ici ont toutes une identité de 99% avec les séquences les plus proches, qui sont celles d'une seule souche de bactéries ectosymbiotiques, déjà étudiées, présentes à la surface du cilié *Z. niveum* nommée Gamma proteobacterium ectosymbiont of *Zoothamnium niveum* (No. d'accession AB544415) ou encore *Candidatus Thiobios zoothamnicoli* (No. d'accession EU439003 et AJ879933) dans l'arbre phylogénétique (Figure 51). Il semblerait donc que les bactéries ectosymbiotiques de *Z. niveum* présentes chez les individus récoltés en Guadeloupe soient similaires à celles déjà étudiées chez d'autres individus de cette espèce prélevés au Bélize (AJ879933) et en Méditerranée (EU439003) (Rinke *et al.*, 2009).

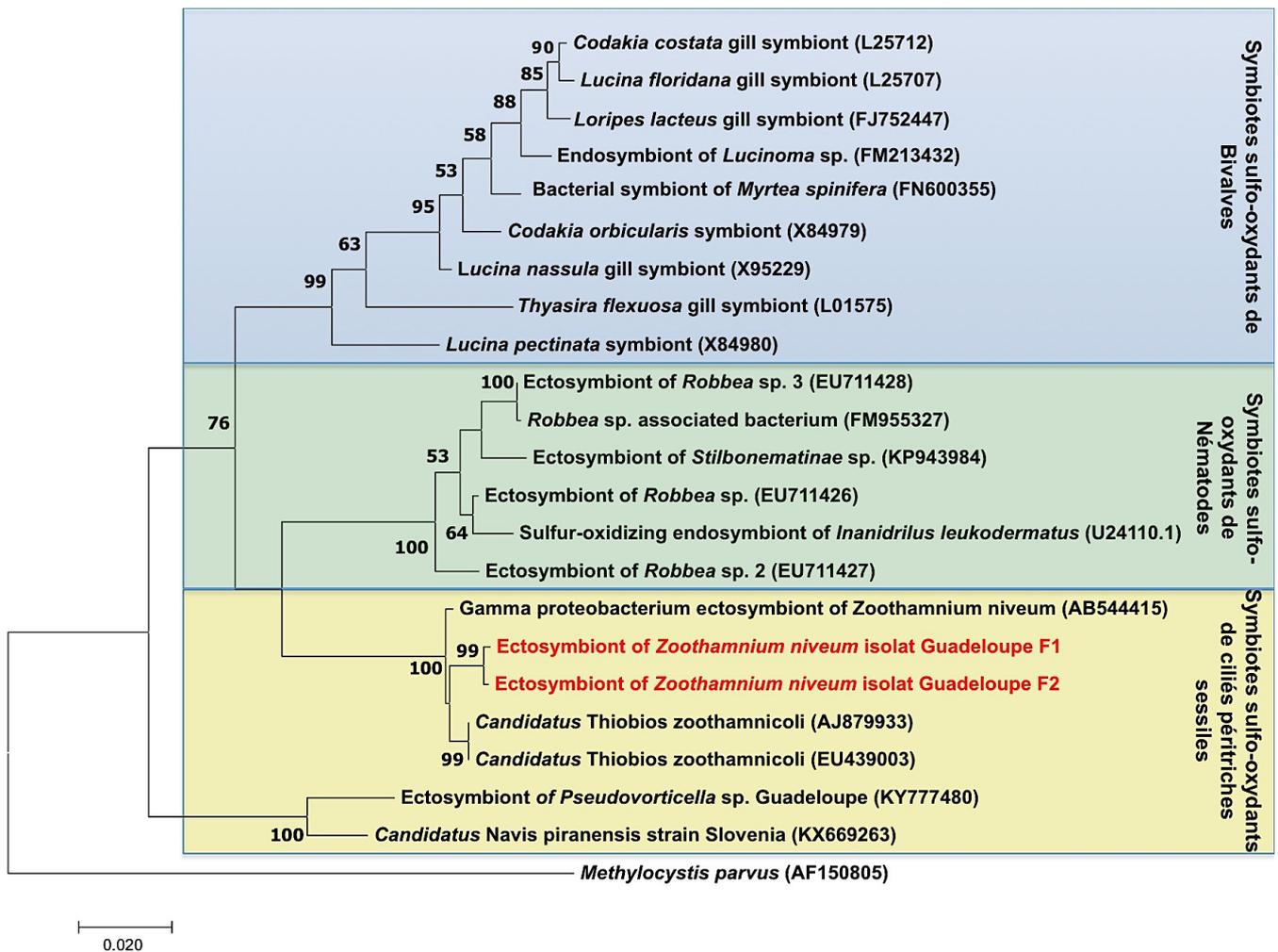
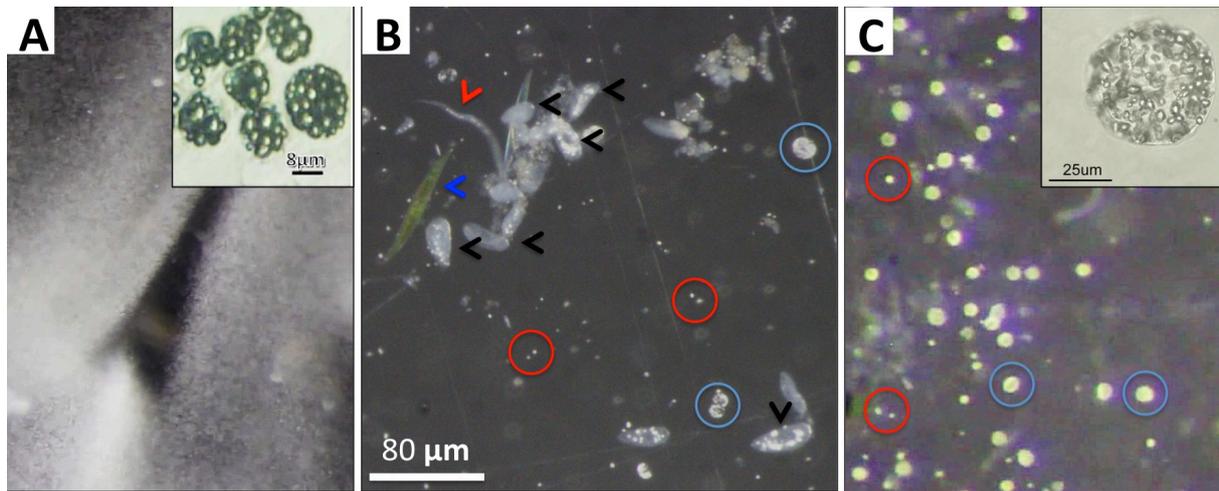


Figure 51. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique des bactéries ectosymbiotiques de *Z. niveum* isolat Guadeloupe. L'arbre présenté ici montre les relations phylogénétiques entre les bactéries ectosymbiotiques de *Z. niveum* isolat Guadeloupe et d'autres endo- et ectosymbiotes sulfo-oxydants de nématodes, bivalves et protistes. Cet arbre est basé sur un alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 1319 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 16S. *Methylocystis parvus* a été utilisé comme extra-groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 2 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences.

## **B. Les espèces benthiques mobiles**

### **1. Analyses par microscopie photonique des biofilms récupérés sur les substrats organiques déposés en mangrove**

Des observations au microscope optique des biofilms récupérés à différents intervalles de temps à la surface de substrats organiques déposés en mangrove ont été réalisées afin de suivre le processus de colonisation de ces substrats organiques par les protistes ciliés (Figure 52). Les observations ont montré que la composition de la communauté microbienne présente à l'intérieur des biofilms évoluait en fonction du temps. En effet, les biofilms présents à la surface des substrats récupérés après 2-4 jours d'immersion (Figure 52A) étaient principalement composés de bactéries sulfo-oxydantes appartenant au genre *Thiovolum*. Ces bactéries sont de formes ovoïdes et possèdent des granules de soufre à l'intérieur de leur cytoplasme qui leur donnent cette coloration blanche au microscope optique. Ces bactéries avaient déjà été décrites à l'intérieur des mattes présentes à la surface des sédiments marins de la Manche-à-Eau. Elles appartiennent aux  $\epsilon$ -protéobactéries et ont été nommées *Thiovolum* sp. strain karukerense (Gros, 2017). Les biofilms récupérés à la surface des substrats organiques immergés depuis 4 à 6 jours (Figure 52B) étaient composés de nombreux morphotypes de protistes ciliés (têtes de flèches noires), de nématodes (tête de flèche rouge), de crustacés, de diatomées (tête de flèche bleue) et de différentes bactéries sulfo-oxydantes du genre *Thiovolum* (cercles rouges et cercles bleus). Les bactéries décrites comme *Thiovolum* sp. strain karukerense (cercles rouges) semblent disparaître progressivement du biofilm et sont remplacées par des bactéries blanches plus grosses (cercles bleus). D'après les analyses phylogénétiques menées au laboratoire, ces bactéries, plus grosses (cercles bleus), semblent également appartenir au genre *Thiovolum* (article en cours de rédaction). Enfin, les biofilms récupérés à la surface des substrats organiques immergés depuis 6 à 8 jours (Figure 52C) étaient principalement composés par la deuxième espèce de *Thiovolum* (cercles bleus). Les protistes ciliés ainsi que les bactéries *Thiovolum* sp. strain karukerense ont presque tous disparus du biofilm.



**Figure 52.** Analyse par microscopie photonique de la composition microbienne des biofilms récupérés à différents intervalles de temps à la surface des substrats organiques. Les biofilms prélevés à la surface des substrats organiques immergés entre 2 et 4 jours (A) contiennent essentiellement des bactéries sulfo-oxydantes déjà décrites comme *Thiovolum* sp. strain karukerense. Entre 4 et 6 jours (B) le biofilm est colonisé par de nombreux morphotypes de protistes ciliés (têtes de flèches noires), des diatomées (tête de flèche bleue) et des nématodes (tête de flèche rouge). Les bactéries sulfo-oxydantes *Thiovolum* sp. strain karukerense (cercles rouges) sont toujours présentes tandis qu'une deuxième espèce de *Thiovolum* plus grosses (cercles bleus) commencent également à coloniser les biofilms. Après 6 à 8 jours d'immersion (C), les biofilms ne contiennent presque plus que la deuxième espèce de *Thiovolum*.

Après avoir triés et séparés en lots les différents morphotypes de protistes ciliés mobiles récupérés dans les biofilms, des observations au microscope à épifluorescence ont été réalisées sur des individus marqués au DAPI (Figure 53). Ces observations avaient pour but de détecter la présence de bactéries ectosymbiotiques et/ou endosymbiotiques associées à ces ciliés. Le marquage DAPI est intéressant car il permet de marquer l'ADN des organismes eucaryotes et procaryotes et donc de différencier la présence de bactéries à la surface cellulaire (Figure 53C), de celles présentes à l'intérieur du cytoplasme (Figure 53B) et de celles présentes à l'intérieur des vacuoles digestives des protistes ciliés (Figure 53A). Deux morphotypes mobiles potentiellement symbiotiques ont ainsi pu être sélectionnés. Le morphotype mobile 1 est l'une des espèces de ciliés les plus abondantes dans les biofilms récupérés en mangrove, il est caractérisé par la présence de nombreuses bactéries à l'intérieur de son cytoplasme (Figure 53B). Le morphotype mobile 2 (Figure 53C) est moins abondant dans les biofilms, il possède des bactéries ectosymbiotiques à la surface cellulaire.

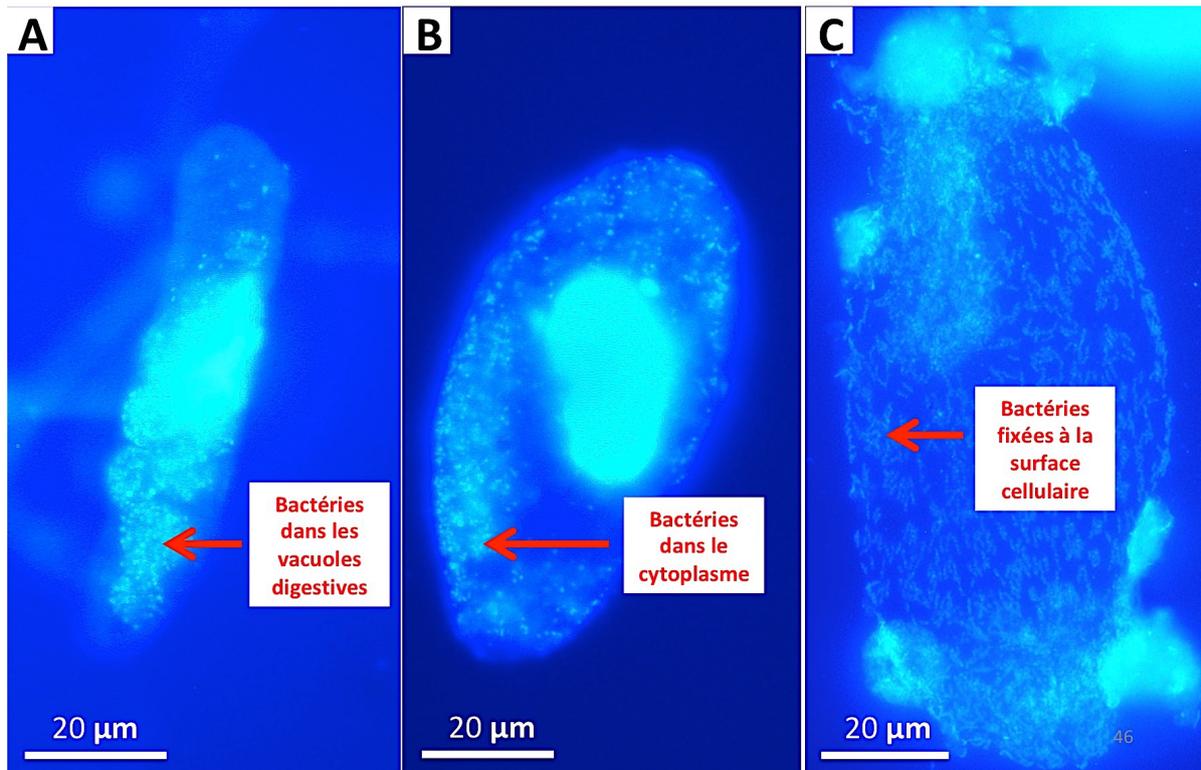


Figure 53. Détection des morphotypes de protistes ciliés symbiotiques par marquage des individus au DAPI et observation au microscope à épifluorescence. Certains des morphotypes de protistes ciliés analysés possèdent des bactéries à l'intérieur de vacuoles digestives présentes dans leurs cytoplasmes (A). Deux morphotypes symbiotiques ont été sélectionnés grâce à cette méthode : le morphotype mobile 1 (B) possède des bactéries libres dans son cytoplasme tandis que le morphotype mobile 2 (C) possède des bactéries fixées à la surface cellulaire.

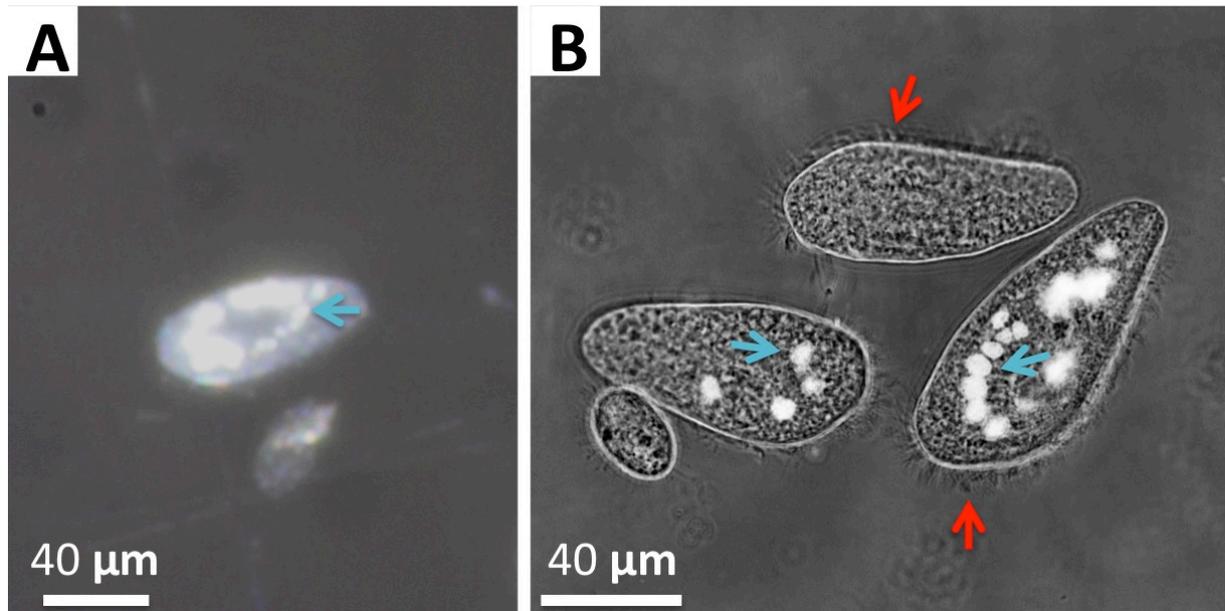
## 2. Morphotype mobile 1 : *Trochochilodon* sp. isolat

### Guadeloupe

#### a. Observations par microscopie photonique

Le morphotype mobile 1 (Figures 54A-B) est caractérisé par la présence de cils sur sa face ventrale (flèches rouges) tandis que sa face dorsale en est dépourvue (Figure 54B). Les inclusions blanches présentes à l'intérieur du cytoplasme se répartissent sur les contours de la cellule, de façon à former une ellipse à l'observation. Lorsque ces individus sont placés en stabulation, ils perdent progressivement leurs inclusions blanches qui sont excrétées au bout de 12 à 24h en fonction des individus et de la quantité d'inclusions présentes à l'intérieur du cytoplasme. Cette excrétion se traduit par l'apparition de petits grains blancs au fond du récipient. Cette espèce est également facilement reconnaissable de par son comportement atypique. En effet, les individus ont tendance à se positionner verticalement en effectuant des rotations sur eux-mêmes. Ce mouvement est facilement observable à la loupe binoculaire et

est caractéristique de cette espèce, ce qui en fait un bon critère d'identification lors du prélèvement.



**Figure 54.** Analyse au microscope photonique du morphotype mobile 1. Observation à la loupe binoculaire d'un individu fraîchement recueilli et observation au microscope photonique (D) d'individus placés en stabulation ayant perdu progressivement leurs inclusions. Des inclusions sous la forme de grains blancs (flèches bleues) sont présentes dans le cytoplasme de *Trochochilodon* sp. Elles forment une ellipse lorsque les grains blancs sont nombreux dans le cytoplasme. On note également la présence de cils (flèches rouges) sur la face ventrale de *Trochochilodon* sp. tandis que la partie dorsale en est dépourvue.

### **b. Analyses au microscope électronique à balayage**

Les observations effectuées au MEB ont permis d'étudier les principales caractéristiques morphologiques de cette espèce (Figures 55A-D). Les individus ont une forme de gouttière et présentent de nombreux cils sur leur face ventrale. Une dépression entourée de cils est visible sur la face ventrale de la cellule, elle constitue la bouche de ce cilié ou péristome (Figure 55A) qui constitue la porte d'entrée vers le cytopharynx. Les cellules sont de tailles variables, les individus mesurent entre 70 et 100 µm de long et font environ 40µm de largeur. La face dorsale est lisse et dépourvue de cils, mise à part au niveau d'une légère dépression présente sur la partie antérieure de la cellule (Figures 55B, E). Cette dépression peut également se refermer comme le montre la photo 51C. Sur la face ventrale, les cils sont insérés entre de nombreuses crêtes pelliculaires alignées de façon longitudinale sur la surface ventrale de la cellule (Figure 55D). Contrairement aux espèces péritriches étudiées préalablement, la cellule ne possède pas de bactérie à sa surface.

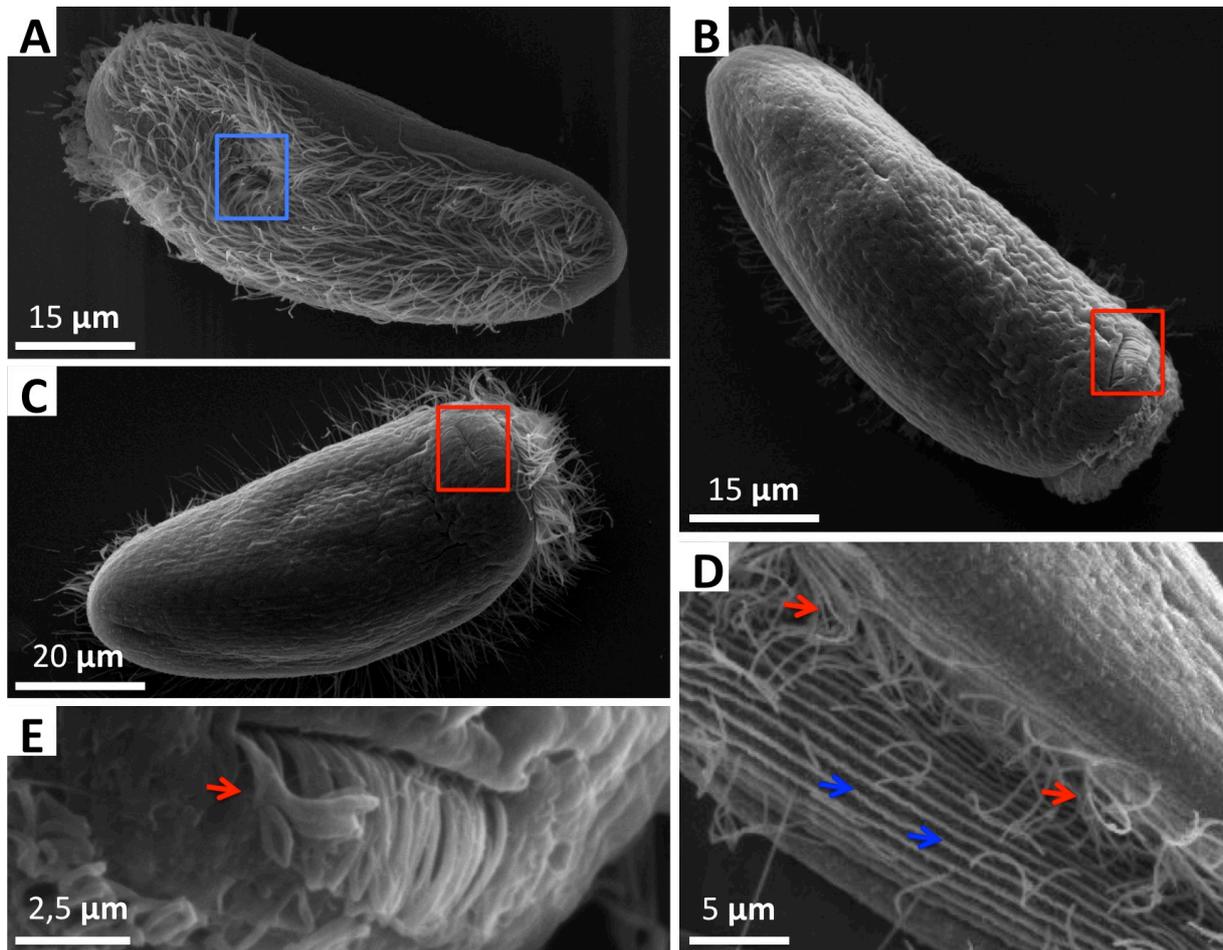


Figure 55. Analyse morphologique de *Trochochilodon* sp. au MEB. La face ventrale (A, D) présente de nombreux cils (flèches rouges) insérés au centre de replis membranaires (flèches bleues), un péristome est également visible (carré bleu). La face dorsale (B, C, E) est plutôt lisse et présente des cils au niveau d'une petite anfractuosité située sur la partie antérieure (carr es rouges), le reste de la surface dorsale en étant dépourvue.

### c. Analyses ultrastructurales au microscope électronique à transmission

La figure 56A présente une coupe longitudinale et transversale de cette espèce chez des individus pr elev es *in vitro* après 3 semaines de cultures. Ces observations confirment la présence de cils sur la face ventrale de la cellule ainsi que sur la partie antérieure de la face dorsale de la cellule (Figure 56A). De nombreuses vacuoles sont présentes à l'intérieur du cytoplasme tandis que d'autres sont présentes à l'intérieur des lysosomes secondaires (Figures 56A-C). Les vacuoles peuvent contenir soit des bactéries (Figures 56B) soit des inclusions blanches (Figure 56C). Certaines de ces vacuoles présentent de nombreuses microvilli qui peuvent provenir de la membrane plasmique lors du processus de formation des vacuoles (Figure 56B) ou encore de la digestion de mitochondries dégénérées. Les vacuoles qui contiennent des bactéries en cours de dégradation sont généralement à l'intérieur de lysosome secondaire (Figure 56B). Cependant très peu de bactéries ont été observées à l'intérieur des

vacuoles digestives du cilié aussi bien chez les individus prélevés *in vivo* que ceux prélevés *in vitro* après trois semaines de culture pure. Par ailleurs, plusieurs bactéries ont également été observées dans le cytoplasme de ce cilié mais uniquement chez les individus prélevés en milieu naturel. Ces bactéries sont libres ou enfermées à l'intérieur de vacuoles symbiotiques (Figure 56E). Des inclusions noires sont également visibles à l'intérieur du cytoplasme des bactéries, cette couleur noire est caractéristique de structure riche en carbone, il s'agit probablement de réserves de carbone sous forme de glycogène (Figure 56D, E). Les observations réalisées au STEM sur des individus récoltés après trois semaines de culture n'ont pas montré de bactéries endosymbiotiques à l'intérieur de leur cytoplasme.

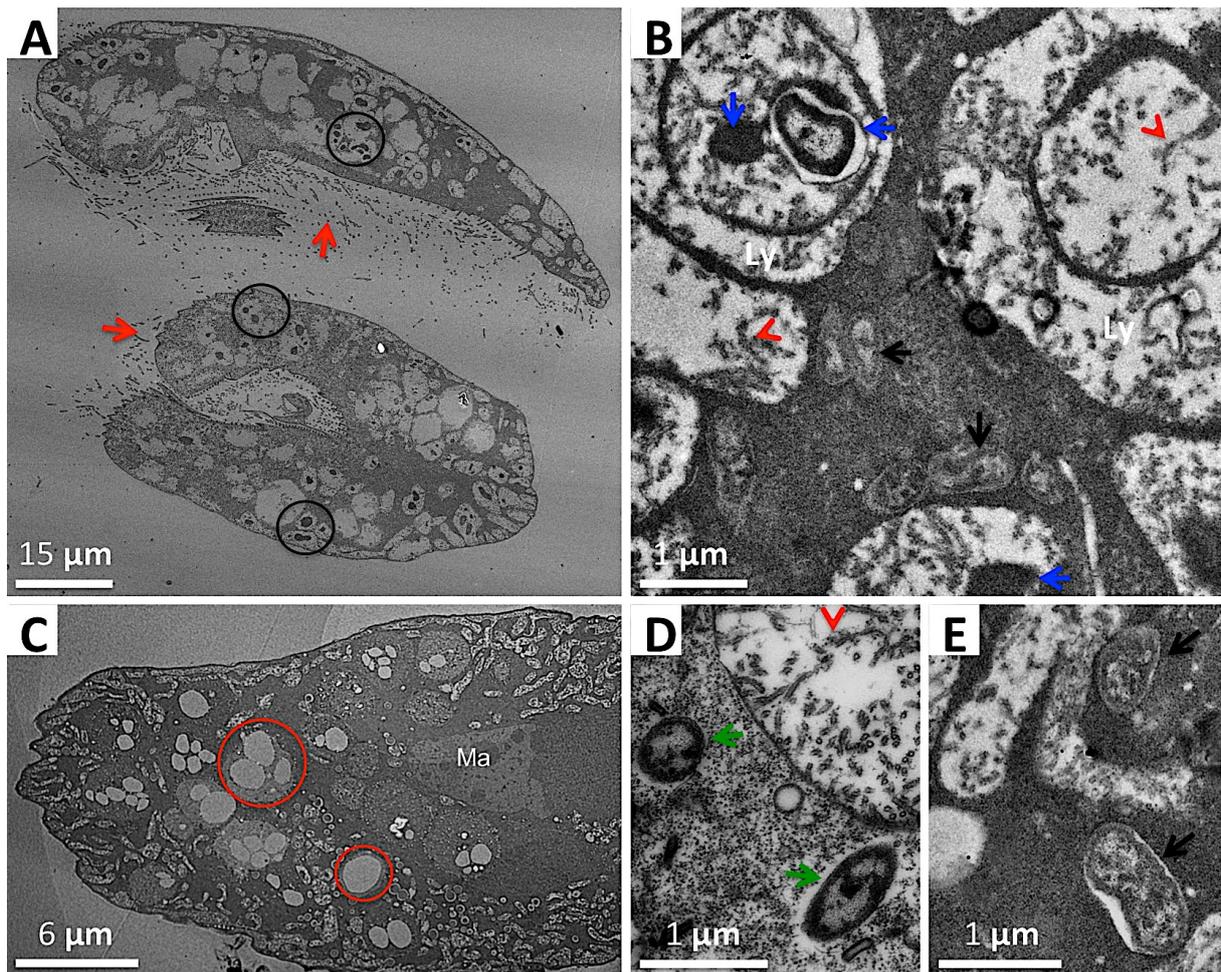


Figure 56. Analyse ultrastructurale de *Trochochilodon* sp. par MET. L'observation des coupes fines de *Trochochilodon* sp. (A-E) confirme la présence de cils qui ne sont présents que sur la face ventrale du cilié (flèches rouges). De nombreuses vacuoles contenant des granules blancs (cercles rouges) ou des bactéries (cercles noirs) sont présentes à l'intérieur du cytoplasme du cilié. À plus fort grossissement, on observe la présence de plusieurs bactéries (flèches noires et vertes) à l'aspect différent dans le cytoplasme de *Trochochilodon* sp. Certaines des vacuoles digestives ont fusionné avec des lysosomes (Ly), et présentent des bactéries à des stades plus ou moins avancés de digestion (flèches bleues). Le macronoyau (Ma) est visible dans le cytoplasme du cilié ainsi que des microvilli à l'intérieur des vacuoles digestives (têtes de flèches rouges).

#### d. Analyses par spectrométrie Raman

Les observations au microscope optique permettent d'observer la présence de taches blanches à l'intérieur du cytoplasme (Figure 57A). Les spectres enregistrés sur ces points ont révélé la présence de soufre élémentaire  $S_8$  dans la cellule alors qu'aucun élément soufré n'a été détecté dans l'eau environnante (Figure 57B). En se basant sur la cartographie du soufre réalisée sur la cellule (Figures 57C, D) et les résultats obtenus précédemment, le soufre est principalement concentré dans le cytoplasme du cilié et plus particulièrement à l'intérieur de certaines vacuoles qui jouent probablement un rôle d'excrétion.

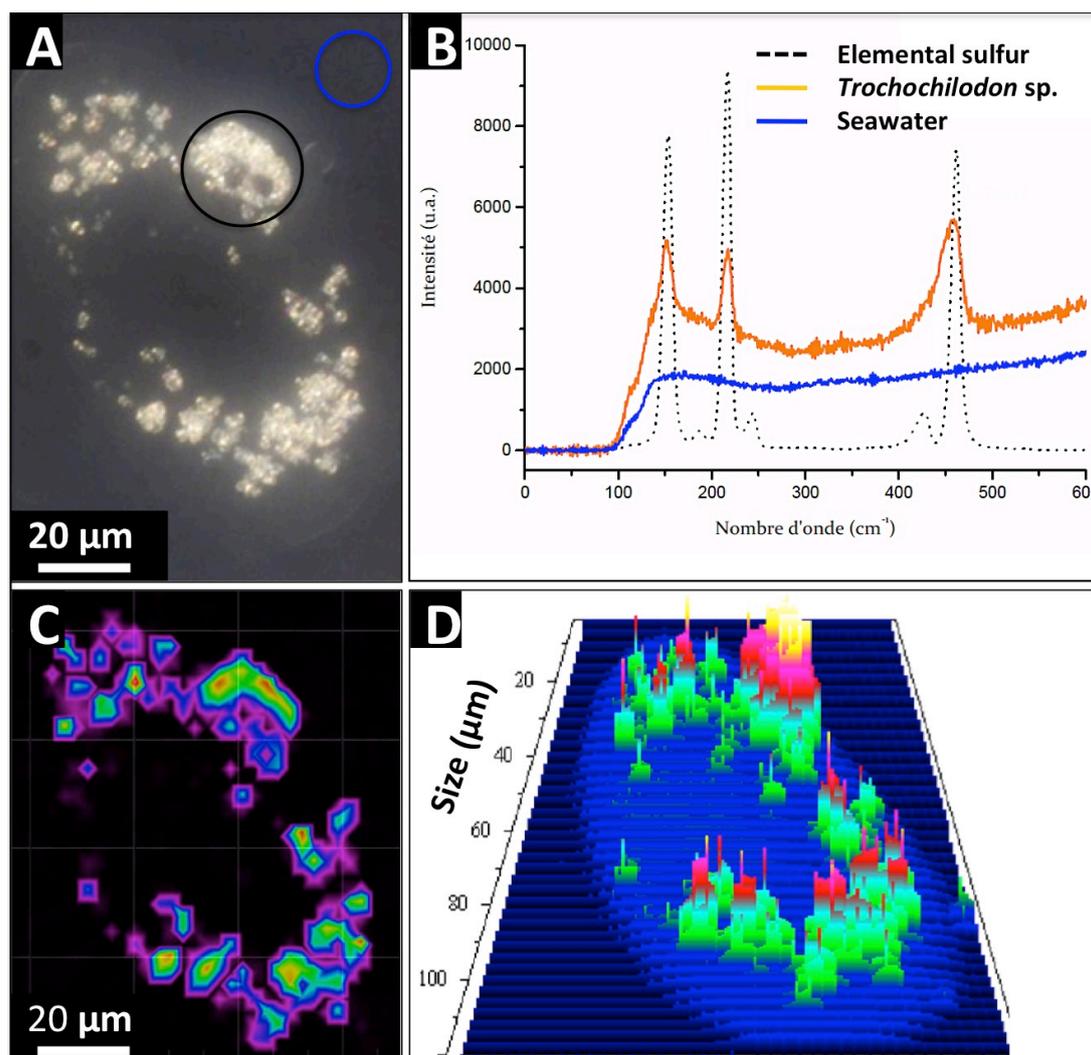


Figure 57. Analyse de *Trochochilodon* sp. par microspectrométrie Raman. En se basant sur les observations faites par microscopie optique (A), la cellule contient des zones blanches (cercles noirs) soupçonnées de contenir des composés élémentaires soufrés alors que d'autres zones semblent être dépourvues de ces composés. Le cercle bleu indique l'eau environnante. (B) Spectres Raman acquis sur cet individu. La ligne noire représente le soufre élémentaire pur  $S_8$  détecté dans les zones blanches décrites précédemment, elle se caractérise par deux pics à  $480\text{ cm}^{-1}$  et  $210\text{ cm}^{-1}$ . La ligne rouge confirme l'absence de soufre dans les autres zones de la cellule. L'eau de mer environnante (utilisée comme contrôle négatif) ainsi que la surface du protiste ne présente pas de soufre, aucun pic n'a été détecté (ligne bleue). (C) Les cartographies 2D et 3D montrent que le soufre est situé dans les zones blanches considérées comme étant les vacuoles alimentaires de *Trochochilodon* sp. L'intensité des pics représentée par leur couleur est directement liée à la quantité de soufre détecté dans l'échantillon.

### e. Analyse phylogénétique de l'hôte

Les séquences du gène codant pour l'ARNr 18S obtenue pour les individus prélevés sur le terrain et ceux prélevés après culture du cilié mobile étudié ont respectivement une longueur totale de 874 et 873 nucléotides. L'alignement des séquences issues des individus prélevés sur le terrain et de ceux provenant de culture a montré que les organismes prélevés dans les deux cas sont identiques génétiquement. Ces résultats prouvent que cette espèce peut être maintenue en culture en laboratoire en respectant le protocole de culture établie. Une séquence consensus de 870 nucléotides issue de l'alignement parfait des séquences précédentes a alors été établie (MH560052). Les analyses BLAST ont montré que la séquence consensus partage 88% d'identité avec la séquence de *Trochochilodon flavus* (JN867018). La reconstruction phylogénétique basée sur l'alignement multiple des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S de ce cilié et d'autres ciliés Phyllopharyngae confirme les résultats obtenus par BLAST en plaçant cet organisme parmi le genre *Trochochilodon* (Figure 58). La sous-classe des Cytrophoria est séparée en plusieurs familles, parmi lesquelles figure celle des Plesiotrichopidae auquel appartient *Trochochilodon* sp. Au regard des résultats phylogénétiques obtenus nous proposons d'appeler cet organisme *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe.

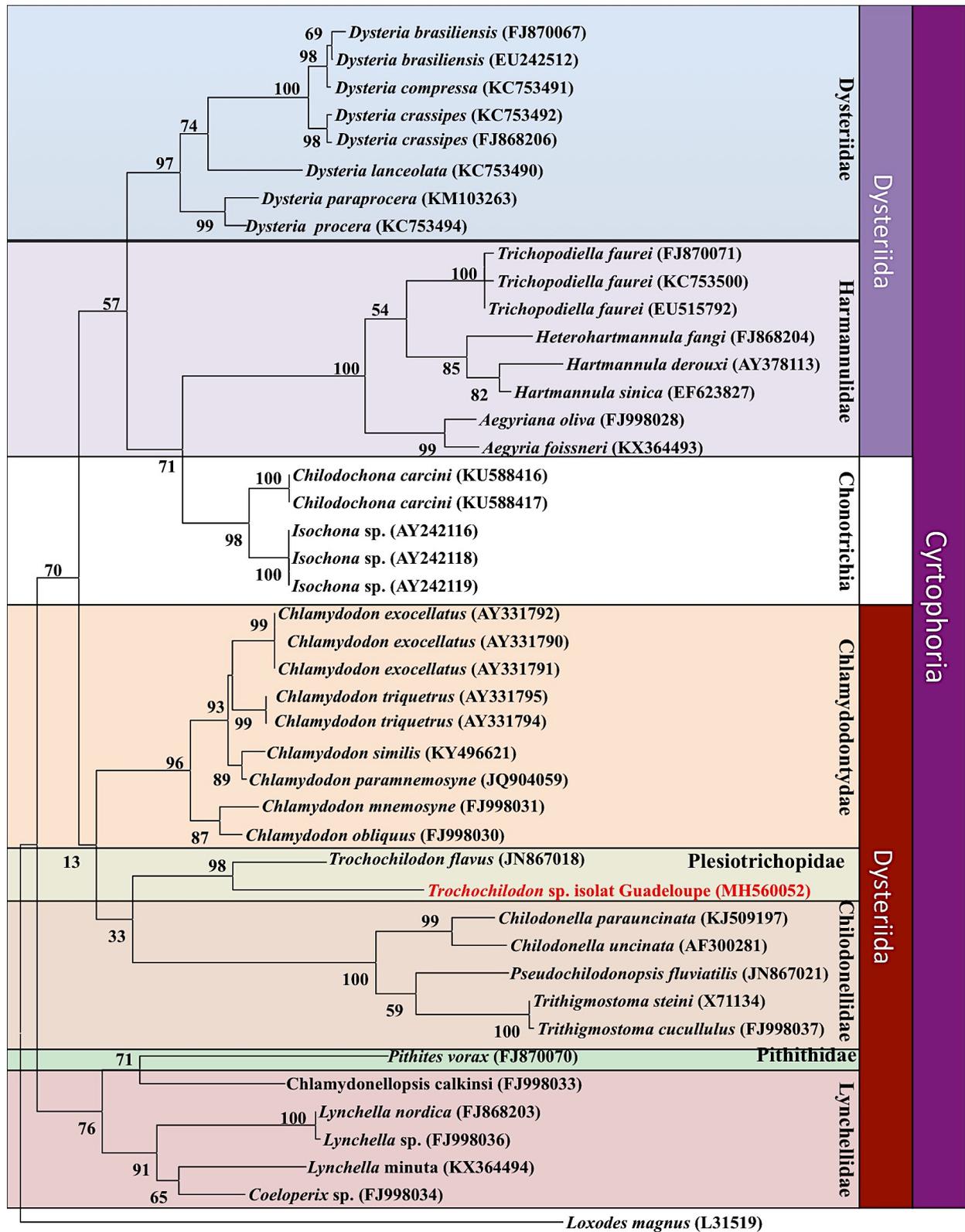


Figure 58. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. Cet arbre montre les relations phylogénétiques entre *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe et d'autres espèces de ciliés de la sous-classe des Cyrtophoria. Cet arbre est basé sur l'alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 833 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 18S. *Loxodes magnus* a été utilisé comme extra groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 2 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences.

## **f. Analyse phylogénétique du symbiote de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe**

Les constructions réalisées lors du clonage ont permis d'obtenir 40 séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries potentiellement présentes dans le cytoplasme de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. Parmi ces 40 séquences, 3 séquences n'ont pas pu être étudiées faute d'un mauvais chromatogramme. Sur les 37 séquences restantes, 18 séquences sont différentes les unes des autres et certaines séquences reviennent plusieurs fois (voir Annexes 1). Les analyses BLAST de ces séquences ont révélé la présence de nombreuses  $\gamma$ -protéobactéries potentiellement présentes à l'intérieur du cytoplasme de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. On peut citer la présence de séquences proches du symbiote d'*Osedax mucofloris*, et de bactéries libres des genres *Pseudomonas*, *Fusobacterium*, *Marinobacter*, *Aureimarina*, *Arcobacter* ou encore *Pseudospirillum*. Les analyses BLAST de ces séquences ont révélé également la présence de nombreuses bactéries non-cultivables ainsi que la présence de séquences proches de *Thiovolum* sp. strain karukerense. De plus, un groupe majoritaire comprenant 8 séquences ayant une identité de 99,2 % a été formé et la séquence consensus issue de l'alignement de ces 8 séquences a été analysée par BLAST. Cette analyse a révélée que la séquence consensus (No. d'accession MH558667) partage 99% d'identité avec la séquence d'une  $\gamma$ -protéobactérie appartenant au genre *Umboniibacter* (No. d'accession DQ285073). L'arbre phylogénétique basé sur l'alignement des séquences partielles codant pour le gène de l'ARNr 16S de bactéries symbiotiques sulfo-oxydantes et de bactéries hétérotrophes confirme les résultats obtenus par BLAST. Il semblerait donc que la bactérie majoritairement présente dans le cytoplasme de *Trochochilodon* sp. appartienne au genre *Umboniibacter* (Figure 59). Elle a été nommée *Umboniibacter* souche Guadeloupe dans cette étude.

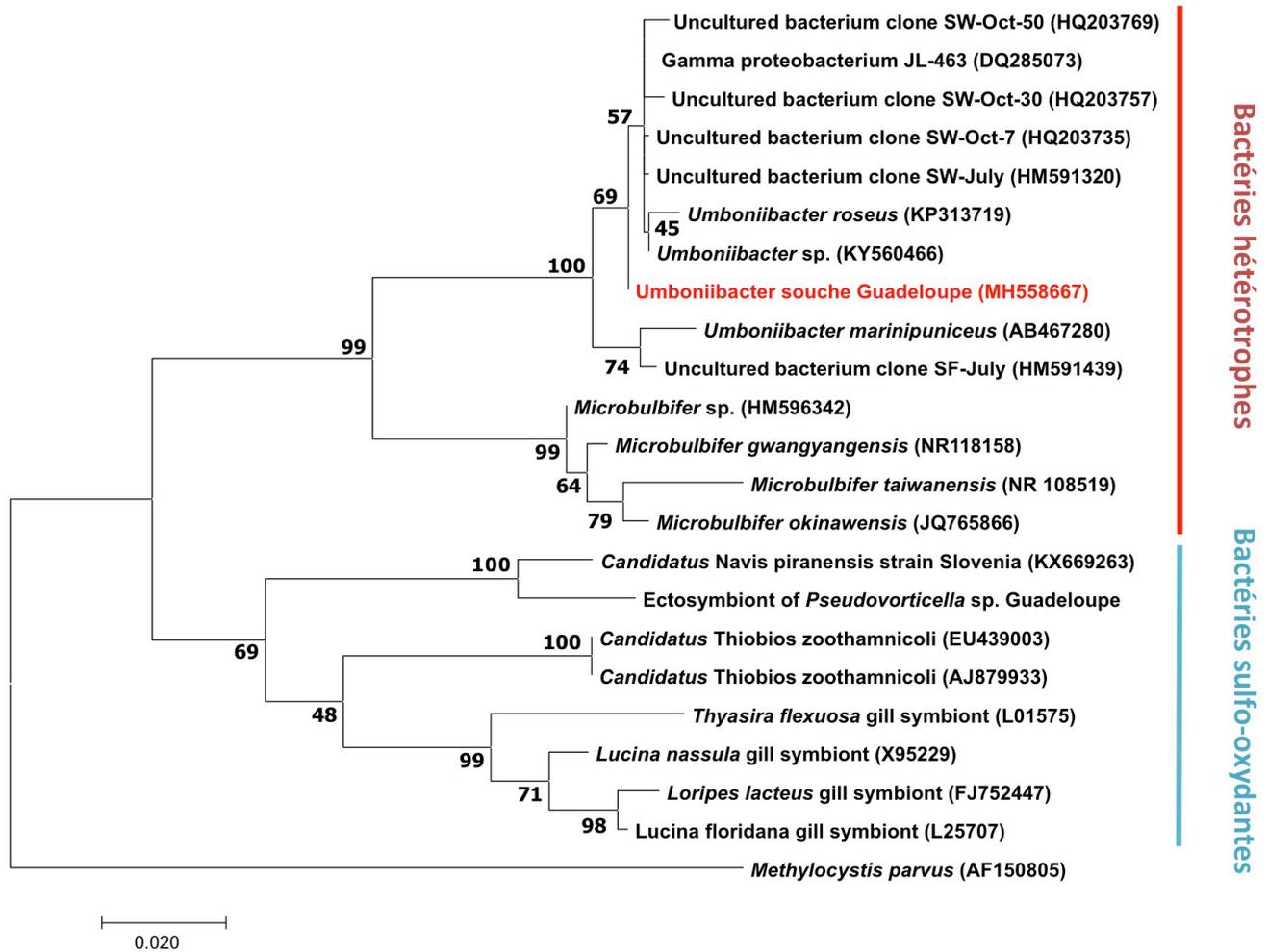


Figure 59. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique des bactéries endosymbiotiques de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. L'arbre présenté ici montre les relations phylogénétiques entre les bactéries endosymbiotiques de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe et d'autres endo- et ectosymbiotes sulfo-oxydants de bivalves et protistes. Cet arbre est basé sur un alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 1319 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 16S. *Methylocystis parvus* a été utilisé comme extra-groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 2 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences.

### g. Observations microscopiques des hybridations réalisées par

#### FISH

Les observations réalisées sur des individus provenant du milieu naturel après hybridations avec les sondes spécifiques UMB1 (Figure 60B) et UMB2 (Figure 60C), conçues à partir de la séquence consensus d'ARNr 16S d'*Umboniibacter* souche Guadeloupe, ont confirmé que la séquence utilisée pour l'analyse phylogénétique provient bien des bactéries présentes à l'intérieur du cytoplasme de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. La concentration optimale en formamide dans le tampon d'hybridation s'est avérée être de 20 % pour les deux sondes spécifiques. Pour chaque sonde spécifique utilisée, le signal a été confirmé par le signal positif de la sonde EUB 338 (Figures 60C et F) et du marquage DAPI

(Figure 60A). Aucun signal de fluorescence n'a été détecté lors des observations effectuées après l'hybridation des sondes NON-EUB338 (complémentaire à la sonde bactérienne EUB 338) utilisé en tant que témoin négatif (Figure 60F), démontrant que les signaux de fluorescence détectés avec les sondes spécifiques n'étaient pas provoqués par autofluorescence ou par une coloration non spécifique des bactéries mais bien par une liaison spécifique des sondes. Les hybridations menées avec la sonde spécifique UMB1 sur des individus provenant de cultures en laboratoire on révélés que les bactéries étaient encore présentes à l'intérieur du cytoplasme de certains individus de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe après 4 jours (Figure 60H) et après 1 semaine de culture (Figure 60J), bien que la majorité des individus semblaient en être dépourvus. Le signal a également été confirmé par l'utilisation de la sonde EUB 338. D'après toutes ces observations, il est fort probable qu'*Umboniibacter* souche Guadeloupe aient échappé au processus de digestion avant de se retrouver à l'intérieur du cytoplasme du cilié. Il semblerait également que les individus de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe placés en culture perdent progressivement leurs bactéries et que ces dernières ne soient pas transmises à la génération de cilié suivante. En effet, les individus aposymbiotiques analysés après 4 jours de culture sont probablement des descendants des individus du pool de départ.

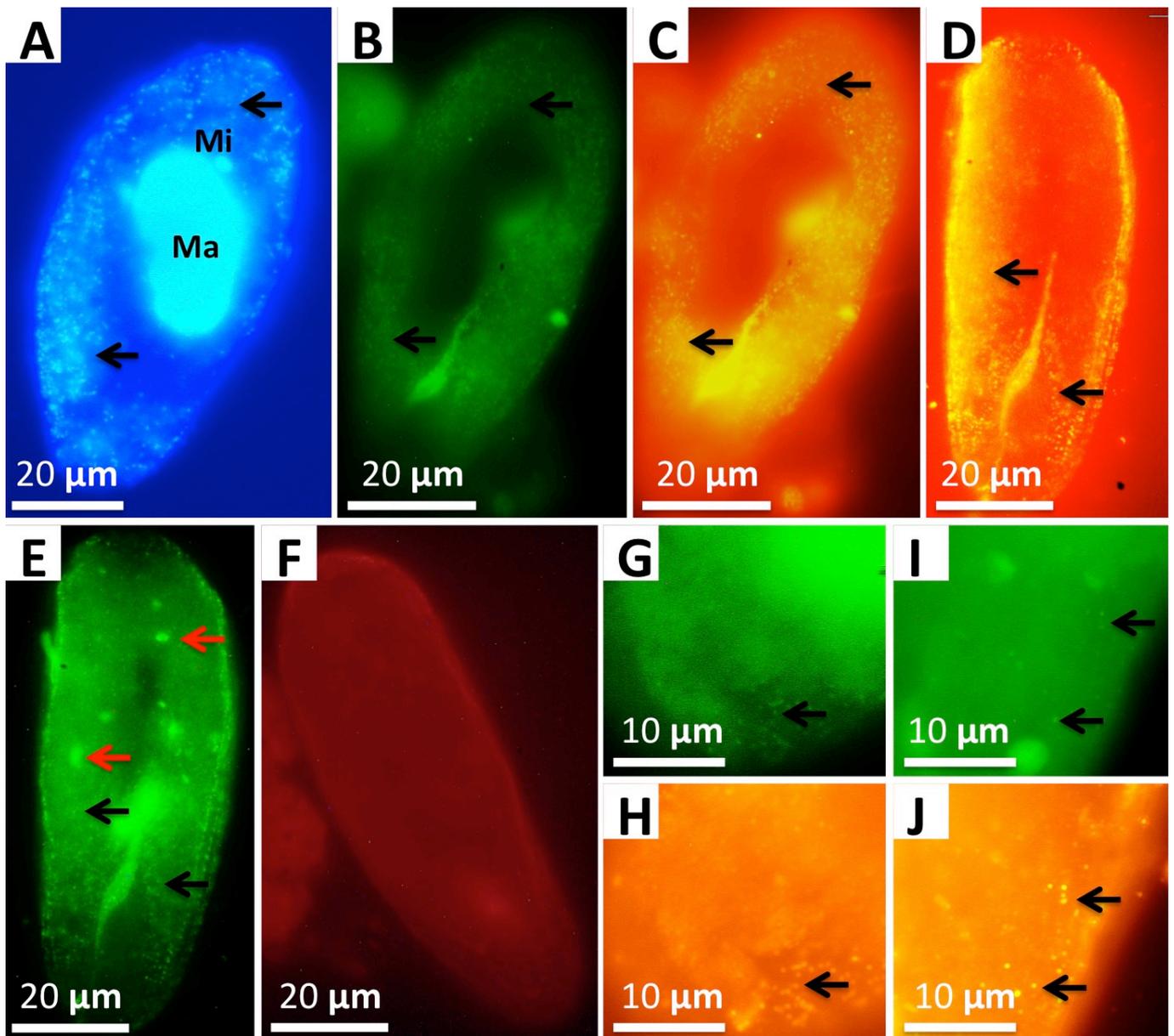


Figure 60. Observations des hybridations FISH réalisées sur les symbiotes d'individus de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe fraîchement récoltés en mangrove (A–F) et celles réalisées sur des individus provenant de cultures pures (G–J). (A) Marquage DAPI réalisé sur un individu de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe, les flèches noires indiquent les bactéries présentes dans le cytoplasme. Le macronoyau (Ma) et le micronoyau (Mi) sont également visibles grâce au marquage DAPI. De nombreuses bactéries sont également révélées à l'intérieur du cytoplasme du cilié grâce aux hybridations menées avec la sonde spécifique UMB1 (B, G, I) Les hybridations ont été confirmées grâce à la superposition des signaux de la sonde EUB 338 (C, H, J). (D) Les bactéries endosymbiotiques ont également été hybridées avec la sonde spécifique UMB2 (D) et confirmé grâce au signal de la sonde EUB 338 (E). Aucun signal n'a été détecté à l'intérieur de *Trochochilodon* sp. en utilisant la sonde NON-EUB338 (F). Les images G et H montrent des individus placés en culture durant 4 jours tandis que les images I et J montrent des individus après 1 semaine de culture. Les bactéries présentes dans le cytoplasme des individus issus de culture pure sont moins nombreuses que celles retrouvées chez les individus provenant du milieu naturel.

## **h. Culture *in vitro***

Plusieurs individus de *Trochochilodon* sp. ont été placés en culture afin d'étudier le cycle de vie du protiste cilié et l'évolution de la population bactérienne présente dans son cytoplasme (Figure 61). Les résultats obtenus ont permis de montrer que les grains de soufre observés au MET à l'intérieur des vacuoles digestives des individus fraîchement collectés en milieu naturel sont expulsés à l'extérieur du cytoplasme au bout de 24 heures. Tous les individus placés en culture et observés après ce délai étaient transparents et dépourvus de grains de soufre. Ces résultats suggèrent que les grains de soufre sont des déchets qui proviennent potentiellement de la consommation de bactéries sulfo-oxydantes par le cilié. Les observations ont également montrés que les individus du pool de départ placés en culture ne se divisent pas tout de suite après la mise en culture. En effet, les premières divisions n'ont été constatées qu'après 3 à 4 jours. Les divisions des individus du pool de départ provoquaient une forte augmentation de la population dans les boites de pétri nécessitant un repiquage de certains individus dans de nouvelles boites afin de ne pas épuiser le milieu et continuer la culture. La culture a ainsi pu être maintenue durant 3 semaines. Les observations au MET effectuées chez des individus récupérés en fin de culture ont montré que plus aucune bactérie n'était présente dans le cytoplasme des individus analysés. Les observations réalisées chez des individus prélevés toutes les 24 heures, après hybridation par technique FISH, ont montré que les bactéries disparaissent progressivement du cilié lorsque des individus sont placés en culture. Il semblerait donc que les bactéries ne soient pas transférées à la génération suivante lors des divisions (reproduction asexuée). Au regard de ces résultats, il semblerait donc que la relation entre *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe et *Umboniibacter* souche Guadeloupe ne soit pas une symbiose. L'interaction entre les partenaires ne semble pas obligatoire et le cycle de vie des ciliés ne semble pas être perturbé en l'absence des bactéries. L'interaction semble plus relever du commensalisme ou du parasitisme plutôt que d'une réelle symbiose au sens mutualiste du terme.

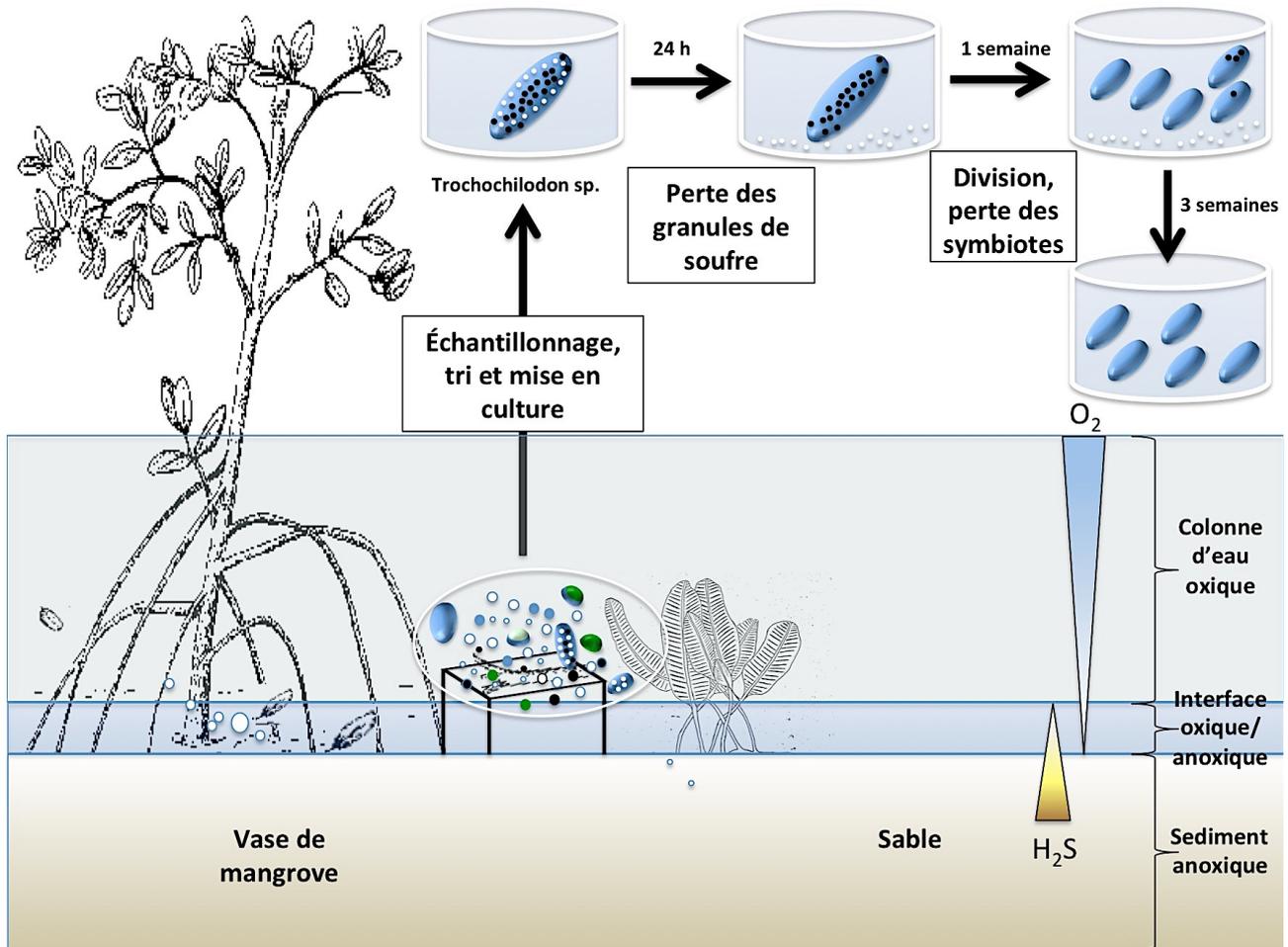


Figure 61. Schéma récapitulatif des résultats obtenus après la mise en culture de *Trochochilodon* sp. Les individus prélevés en mangrove possèdent des bactéries dans leur cytoplasme (points noirs) ainsi que de nombreux points blancs analysés comme étant des granules de sulfures dans des vacuoles. Lorsque l'on place ces individus en stabulation ou en culture, ils perdent rapidement leurs grains blancs (en moyenne après 24h) ce qui suggère que ces granules blancs sont excrétés comme déchets par l'organisme. Après une semaine de mise en culture, les individus se sont beaucoup divisés donnant naissance à de nombreux descendants. Les descendants analysés ne possèdent pas de bactéries endosymbiotiques et le nombre de bactéries présentes dans le cytoplasme des individus du pool de départ a beaucoup diminué. Au bout de 3 semaines, tous les individus analysés sont apossymbiotiques.

### 3. Morphotype mobile 2 : *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe

#### a. Analyses morphologiques au microscope photonique et au microscope électronique à balayage

Les observations effectuées au microscope MEB ont permis d'étudier les principales caractéristiques morphologiques de cette espèce (Figures 62A-C). Les individus ont une forme de gouttière au MEB et présentent de nombreux cils sur leur face ventrale (flèches bleues). Les cellules sont de tailles variables, les individus mesurent entre 70 et 100µm de long et font environ 20 µm de largeur. Des grains de sulfures (flèche noire) sont présents à l'intérieur du cytoplasme, et apparaissent blanc au microscope photonique, ils sont répartis le long de la partie dorsale du cilié (Figure 62A). La face dorsale est lisse et dépourvue de cils,

mais présente de nombreuses bactéries ectosymbiotiques (Figures 62A, B). Les bactéries sont en forme de bâtonnet et mesurent environ 3  $\mu\text{m}$  de long et 0,5  $\mu\text{m}$  de large. Sur la face ventrale, les cils sont insérés entre de nombreuses crêtes pelliculaires alignées de façon longitudinale.

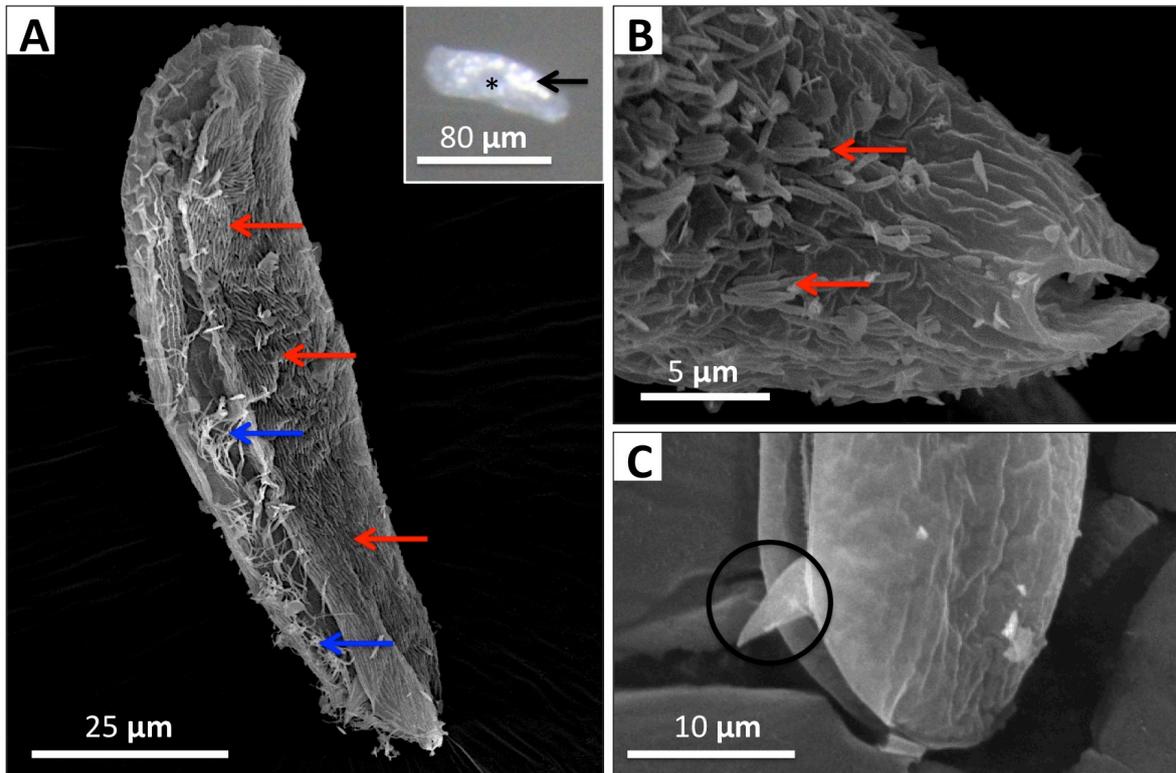


Figure 62. Analyse morphologique de *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe au microscope photonique et au MEB. La face ventrale (A) présente de nombreux cils (flèches bleues) insérés entre des replis membranaires. Les individus présentent des inclusions blanches (flèche noire) sur la partie dorsale du cilié ainsi qu'une vacuole contractile (astérisque) sur la face ventrale. La face dorsale (A, B, C) est plutôt lisse et présente de nombreuses bactéries ectosymbiotiques fixées à sa surface (flèches rouges). Un podite (cercle noir) est également visible sur la face ventrale postérieure du cilié.

### b. Analyses ultrastructurales au microscope électronique à transmission

La figure 58A présente une coupe transversale de cette espèce. De nombreuses vacuoles sont présentes à l'intérieur du cytoplasme (Figures 63B) et sont réparties le long de la membrane plasmique du cilié. De nombreuses bactéries sont présentes à la surface du cilié, ce qui confirme les résultats obtenus au MEB. Ces bactéries présentent des inclusions blanches dans leur cytoplasme qui rappellent beaucoup les grains de soufre trouvés à l'intérieur des bactéries sulfo-oxydantes. Cependant des observations de meilleure qualité et à plus fort grossissement sont nécessaires afin d'étudier l'ultrastructure des bactéries ainsi que celle du cilié.

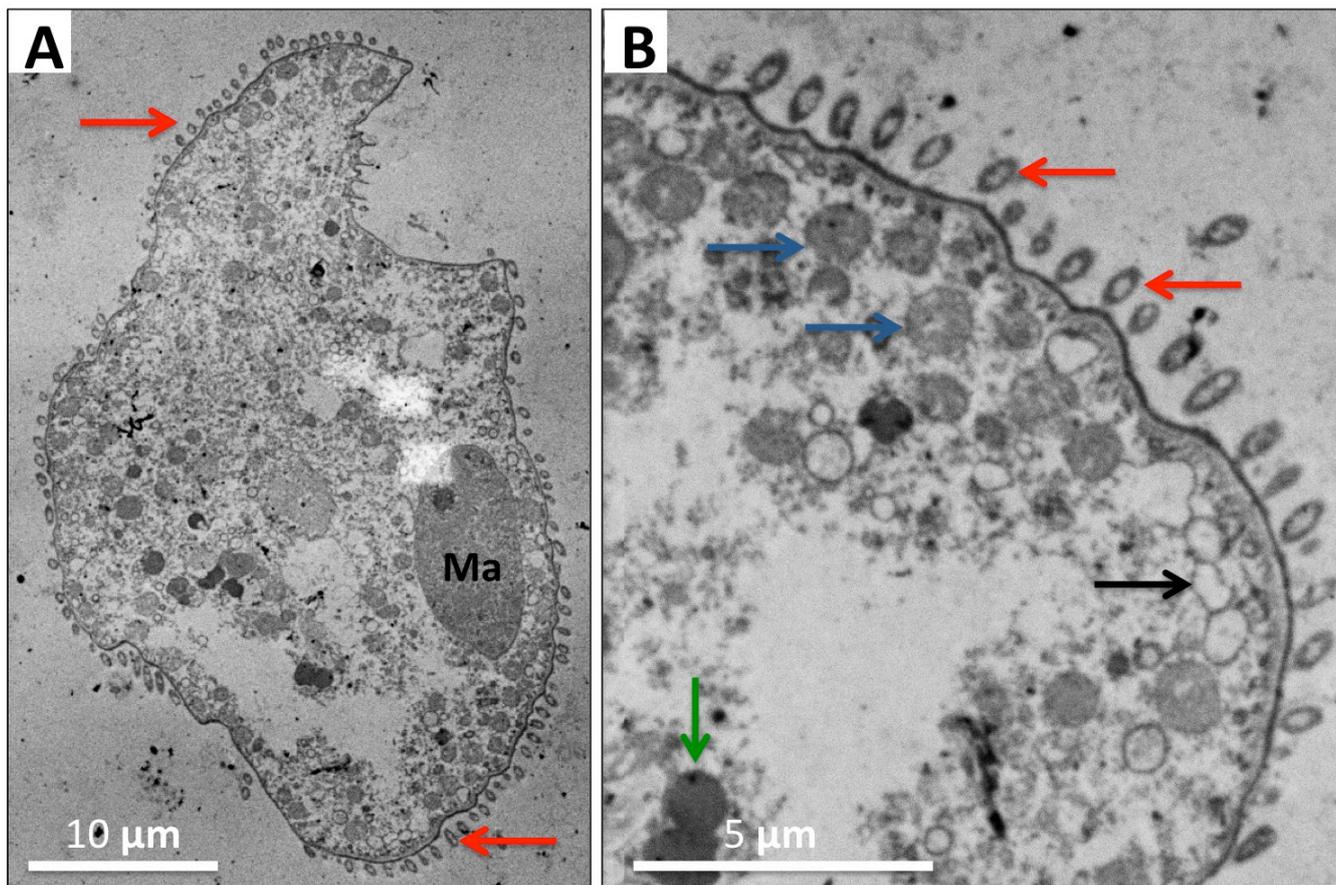


Figure 63. Analyse ultrastructurale de *Dysteria* sp. par STEM. L'observation des coupes fines de *Dysteria* sp. (A et B) confirme la présence de bactéries à la surface du cilié (flèches rouges), ainsi que de nombreuses vacuoles apparaissant plus ou moins denses aux électrons à l'intérieur du cytoplasme du cilié (flèches vertes et noires). De nombreuses mitochondries (flèches bleues) ainsi que le macronoyau (Ma) sont également visibles à l'intérieur du cytoplasme du cilié. Le cytoplasme des bactéries ectosymbiotiques contient des inclusions blanches qui rappellent beaucoup les grains de soufre des bactéries sulfo-oxydantes.

### **c. Analyse phylogénétique de l'hôte**

Les séquences du gène codant pour l'ARNr 18S obtenues pour les individus de ce morphotype de cilié mobile ont une longueur totale de 851 nucléotides (No. d'accession MH560051). Les analyses BLAST ont montré que la séquence consensus partage 99% d'identité avec la séquence de *Dysteria brasiliensis* (No. d'accession EU242512). La reconstruction phylogénétique basée sur l'alignement multiple des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S de ce cilié et de d'autres ciliés appartenant à la sous-classe des Cytrophia confirme les résultats obtenus par BLAST en plaçant cet organisme parmi le genre *Dysteria* (Figure 64). Au regard des résultats phylogénétiques obtenus nous proposons le nom de *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe pour cet organisme.

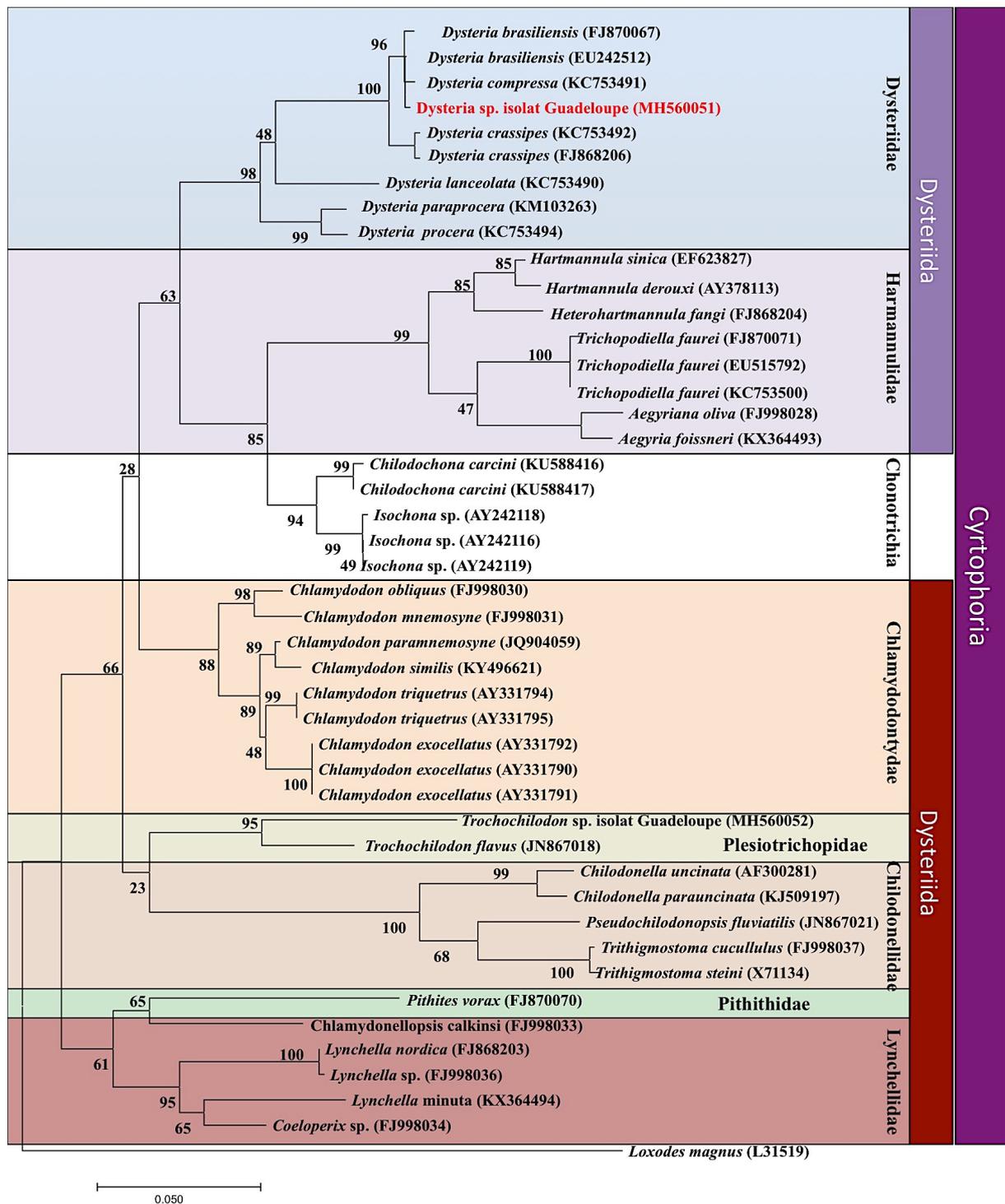


Figure 64. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 18S par la méthode du Maximum likelihood (ML) révélant la position phylogénétique de *Dysteria sp. isolat Guadeloupe*. Cet arbre montre les relations phylogénétiques entre *Dysteria sp. isolat Guadeloupe* et d'autres espèces de ciliés phyllopharyngés basées sur l'analyse de l'alignement multiple de séquences partielles, d'une longueur totale de 794 nucléotides, du gène codant pour l'ARNr 18S. *Loxodes magnus* a été utilisé comme extra groupe. Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50% sont affichées. La barre d'échelle correspond à 5 différences pour 100 nucléotides dans l'alignement des séquences.

#### d. Observations microscopiques des hybridations réalisées par

#### FISH

Les observations réalisées après le marquage au DAPI et les hybridations avec la sonde EUB 338 ont confirmé la présence de bactéries à la surface du cilié (Figures 65A-C). Le signal obtenu après hybridation de la sonde EUB 338 (Figure 65B) a été confirmé par le signal du marquage au DAPI (Figure 65C). Le marquage au DAPI a également permis de révéler un macronoyau de forme ovoïde ainsi que les deux micronoyaux présents dans le cytoplasme du cilié (Figure 65A).

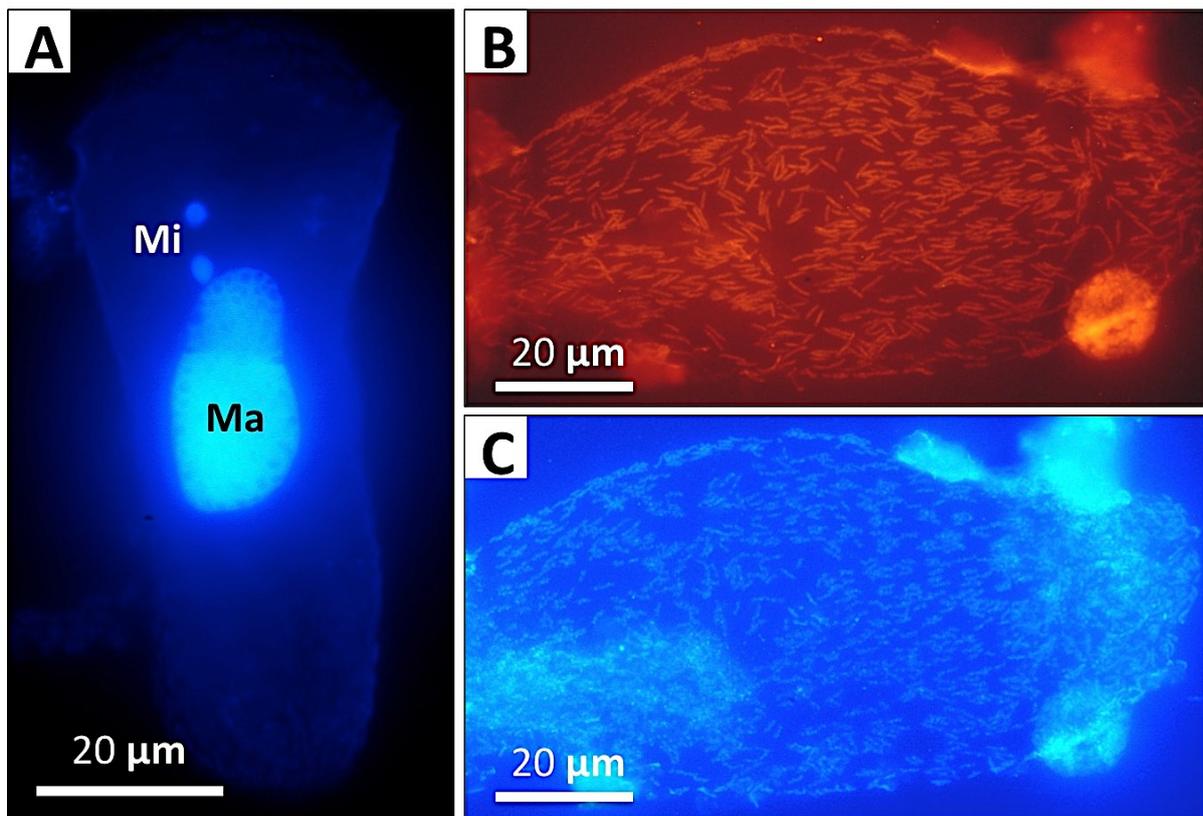


Figure 65. Observations des hybridations FISH réalisées sur les ectosymbiotes de *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe. (A) Marquage DAPI réalisé sur un individu de *Dysteria* sp. Guadeloupe, le macronoyau hétéromère (Ma) et les micronoyaux (Mi) sont également visibles grâce au marquage DAPI. De nombreuses bactéries sont également révélées à la surface du cilié grâce aux hybridations menées avec la sonde spécifique EUB 338 (B). Les hybridations ont été confirmées grâce à la superposition des signaux de la sonde EUB 338 et de ceux du marquage au DAPI (C).

## C. Etudes complémentaires

Plusieurs autres protistes ciliés et probablement des espèces de flagellés ont été récupérés à l'intérieur du biofilm généré par l'enrichissement en sulfure des os de cochons et des branches de palétuviers déposés sur la grille, ainsi qu'à la surface des débris végétaux marins récoltés sur le sédiment marin en mangrove. Ces ciliés n'ont malheureusement pas pu faire l'objet d'une étude plus approfondie. Cependant des analyses au microscope électronique à balayage ont permis de montrer la présence de bactéries ectosymbiotiques présentes à la surface de certains d'entre eux tandis que d'autres en sont complètement dépourvus. Des analyses plus approfondies de ces espèces au niveau ultrastructural et génétique pourraient apporter de plus amples informations sur la nature de la relation entre ces micro-organismes ainsi que sur le métabolisme des symbiotes. Des analyses au TEM permettraient également de détecter de potentielles bactéries endosymbiotiques chez ces différentes espèces. Parmi les espèces récoltées, on peut noter la présence d'une espèce symbiotique appartenant probablement aux Vorticellidae et plus particulièrement au genre *Vorticella* (Figures 66 A-B). Les individus analysés possèdent des bactéries ectosymbiotiques présentes à la surface du zoïde et du stolon. Le zoïde possède un « Silverline System » transversal caractéristique du genre *Vorticella* à la différence de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe dont le « Silverline system » est réticulé. D'autre part, des morphotypes plus petits que les protistes ciliés étudiés ont été récoltés dans le biofilm (Figures 66C-D). Ces morphotypes sont probablement des flagellés de par leur taille et l'organisation des flagelles à la surface de la cellule. Ces espèces possèdent des bactéries ectosymbiotiques en forme de bâtonnet à la surface de leur cellule. D'autres morphotypes de protistes ciliés ont également pu être observés au MEB mais ces espèces ne présentent pas de bactéries ectosymbiotiques sur leur surface cellulaire (Figures 66E-F).

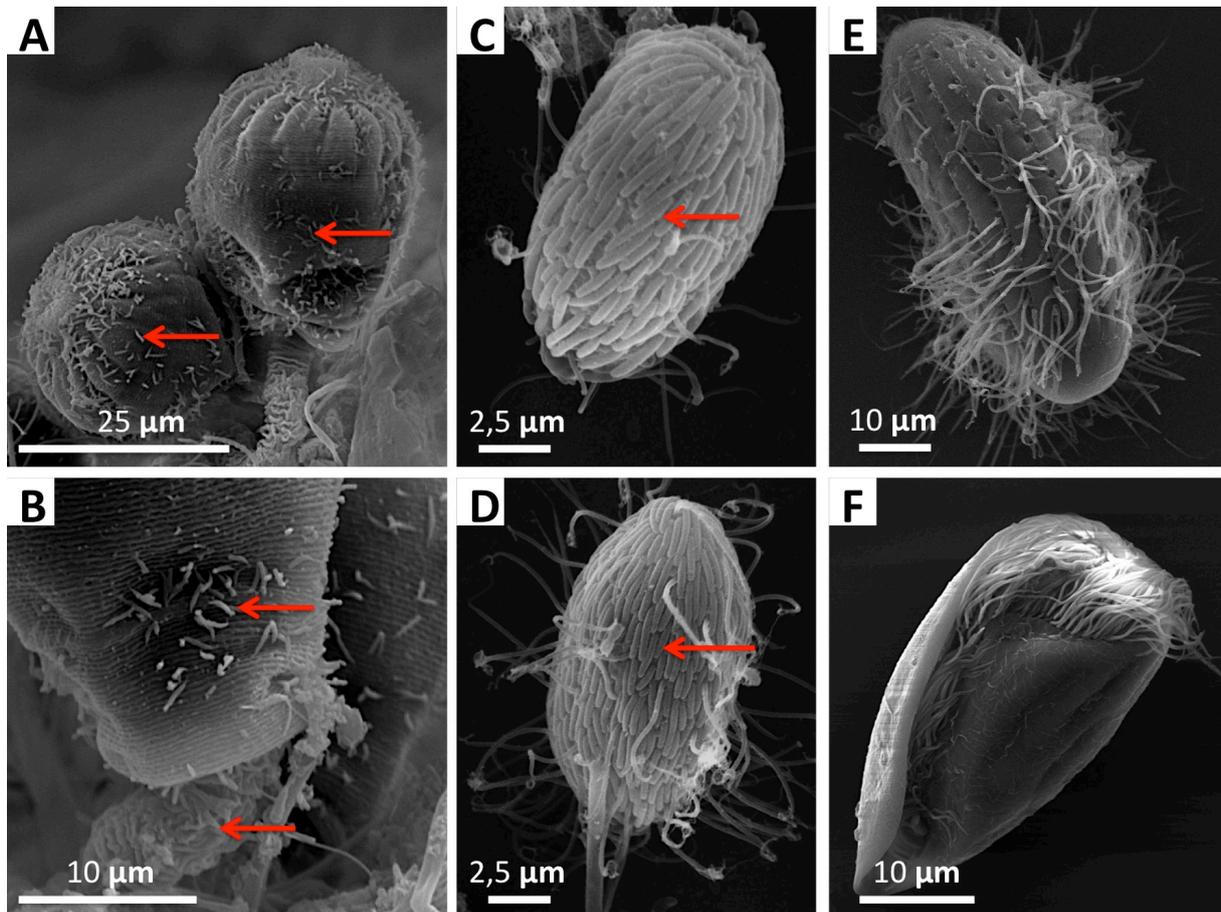


Figure 66. Analyse morphologique au MEB de plusieurs ciliés et flagellés récoltés dans les mangroves de Guadeloupe. Les photos A et B montrent plusieurs individus de la famille des Vorticellidae avec des bactéries (flèches rouges) posées à la surface du cilié ainsi que sur le stolon (B). Les bactéries sont peu nombreuses et ont une disposition irrégulière à la surface du corps du cilié. Les photos C et D montrent deux morphotypes de flagellés de forme ovoïde avec de nombreuses bactéries présentes à la surface du corps. Les photos E et F montrent d'autres morphotypes cette fois-ci de ciliés dépourvus de bactéries ectosymbiotiques, cependant il est possible que ces derniers possèdent des bactéries endosymbiotiques dans leur cytoplasme.

### Chapitre 3. Discussion

Afin de mieux comprendre le rôle et l'importance des associations symbiotiques, et plus particulièrement des symbioses entre protistes ciliés et bactéries dans les mangroves marines, il est nécessaire de comprendre le fonctionnement de cet écosystème et notamment les différents rôles joués par ces micro-organismes dans les cycles biogéochimiques et dans le réseau trophique. Les protistes occupent un large éventail de niches écologiques et peuvent se disperser sur de longues distances (Corliss, 2002 ; Germond et Nakajima, 2016). Ils vivent à tous les étages de la colonne d'eau, de la surface jusqu'au fond océanique. Certains sont benthiques et peuvent vivre fixés à la surface d'un substrat ou à l'intérieur des sédiments marins (Corliss, 2002). Ce succès écologique s'explique en partie par leur capacité à développer des associations symbiotiques facultatives ou permanentes avec d'autres espèces (Germond et Nakajima, 2016). En milieu marin, la majorité des protistes appartiennent soit au

phytoplancton autotrophe qui utilise la photosynthèse pour fixer le CO<sub>2</sub> et produire de l'oxygène, soit au microzooplancton hétérotrophe qui phagocyte des bactéries, du phytoplancton et des particules minérales et/ou organiques en suspension (Fasham *et al.*, 1990 ; Baretta *et al.*, 1995). Certains de ces protistes hétérotrophes, dont notamment les ciliés, sont également capables d'effectuer la photosynthèse, ce sont des mixotrophes. La mixotrophie est définie comme un mélange de nutrition hétérotrophique et auto- (photo-) trophiques, où la contribution de chaque mode nutritionnel peut varier en fonction des organismes associés ainsi que des facteurs environnementaux (Jones, 1994). En tant que producteurs et consommateurs, les ciliés sont donc des intermédiaires importants entre les décomposeurs (bactéries), les organismes phototrophes (phytoplancton, algues) et les métazoaires. La consommation du phytoplancton et des bactéries par les protistes phagotrophes produit des déchets sous forme de matières organiques dissoutes et particulaires, et de nutriments inorganiques dissous comme le fer, l'ammonium et le phosphate (Sherr et Sherr, 2002). Ces déchets vont servir par la suite de substrats pour la croissance de la génération suivante de bactéries et d'algues unicellulaires (Sherr et Sherr, 2002). Les protistes ciliés constituent donc un lien écologique dans les écosystèmes et jouent un rôle majeur dans les cycles biogéochimiques et les transferts trophiques dans tous les milieux aquatiques (Esteban *et al.*, 2010 ; Caron *et al.*, 2012). Les symbioses entre deux ou plusieurs partenaires sont décrites comme des associations à long terme où les échanges sont intégrés au niveau comportemental, métabolique et/ou génétique (Moya *et al.*, 2008). La mise en place de ces associations se déroule généralement quand les conditions du milieu menacent la survie et la reproduction de l'un des deux partenaires. Dans la plupart des cas ce sont les compétences spécifiques des symbiotes bactériens et généralement leur métabolisme qui suscitent un intérêt pour leur hôte (Hoffmeister et Martin, 2003 ; Nowack et Melkonian, 2010). Ainsi le symbiote peut être utilisé et cultivé comme source de nourriture, il peut aider à la défense de l'hôte ou encore permettre de lutter contre des conditions environnementales difficiles (Gast *et al.*, 2009). Bien que les associations symbiotiques entre protistes et procaryotes soient très répandues, c'est au sein de l'embranchement des ciliés (Ciliates ou Ciliophora) que l'on retrouve la plus grande diversité d'associations impliquant des symbiotes avec des métabolismes différents (Fokin et Sera, 2014). On y retrouve des symbiotes photoautotrophes, chimiosynthétiques (lithoautotrophes) ou encore organohétérotrophes (Dziallas *et al.*, 2012). Dans les milieux eutrophes et stables, il semblerait que la présence d'endosymbiotes bactériens chez les ciliés relève plus du parasitisme que d'une véritable relation mutualiste (Nowack et Melkonian, 2010 ; Dziallas *et al.*, 2012). En effet, dans ce genre d'écosystème les

protistes ciliés ont tendance à abriter préférentiellement des micro-algues phototrophes unicellulaires ou possèdent des plastes photosynthétiques fonctionnels obtenus par kleptoplastie comme endosymbiotes (Nowack et Melkonian, 2010 ; Dziallas *et al.*, 2012). Les protistes hétérotrophes et mixotrophes sont donc de bons modèles d'associations symbiotiques, qui fournissent des outils utiles pour analyser les processus physiologiques, écologiques et évolutifs des associations symbiotiques (Germond et Nakajima, 2016). Comme ils peuvent être facilement maintenus en culture dans des laboratoires, certaines espèces de ciliés peuvent également être utilisées comme organisme modèle ou comme outil pour tester les théories écologiques telles que les relations proies-prédateurs (Weisse, 2017).

## **A. Identification et caractérisation des partenaires symbiotiques**

Plusieurs espèces de protistes ciliés ont pu être observées et analysées grâce aux échantillons prélevés dans la lagune de la Manche-à-Eau. Les observations effectuées grâce aux différentes techniques d'analyses microscopiques ont permis de révéler la présence de bactéries ecto- ou endosymbiotiques chez quatre de ces ciliés. Ces quatre potentiels ciliés symbiotiques récoltés ont pu faire l'objet d'analyses phylogénétiques afin de caractériser et identifier aussi bien l'hôte que le, ou les, potentielles bactéries symbiotiques. Généralement, les bactéries ectosymbiotiques présentes à la surface des protistes ciliés sont identiques et spécifiques d'une espèce de cilié à l'autre (Vannini *et al.*, 2003 ; Ott *et al.*, 2004a ; Rosati, 2004 ; Cavanaugh *et al.*, 2006). À l'inverse, les bactéries endosymbiotiques peuvent cohabiter à l'intérieur de la cellule de leur hôte, colonisant parfois différents organites cellulaires de celui-ci et peuvent même favoriser l'interaction de son hôte avec d'autres bactéries. C'est notamment le cas de certaines bactéries endonucléaires (Fokin et Sera, 2014). De plus, les mêmes bactéries endosymbiotiques peuvent interagir avec plusieurs hôtes (Schweikert, 2013). D'autre part, l'identification morphologique des différents hôtes ciliés et leur classification reposent principalement sur des techniques de microscopie optique par imprégnation des échantillons au nitrate d'argent et/ou au protargol, ou encore par imprégnation au carbonate d'argent (Foissner, 2014). Ces imprégnations permettent de révéler les différentes structures cellulaires des protistes ciliés, dont l'infaciliature, qui est l'un des principaux critères d'identification pour le diagnostic et l'identification de nombreuses espèces. Tous les cils sont issus des cinétosomes ou granules basaux (appelés aussi blépharoplastes). Les cinétosomes ne sont pas isolés, mais réunis les uns aux autres, par le cinétodesme, ensemble fibrillaire à

orientation antéro-postérieure. L'ensemble constitue l'infaciliature. Dans de nombreux cas, les cinétosomes sont disposés en files longitudinales. Chaque rangée ciliaire porte le nom de cinétie et leur agencement est un des critères servant au diagnostic permettant l'identification des différentes espèces de ciliés. L'interprétation et la mise en place de ces analyses sont des tâches complexes qui nécessitent l'intervention de taxonomistes spécialisés. L'association de l'analyse des séquences du gène codant pour la sous-unité de l'ARNr 18S, et du diagnostic des individus de l'espèce via l'interprétation des différentes structures cellulaires est nécessaire afin de pouvoir nommer une espèce (Foissner, 2014). Bien que les études phylogénétiques aient été réalisées chez quatre hôtes ciliés, les analyses structurales nécessaires à une bonne identification morphologique n'ont pas pu être réalisées par manque d'expertise et de maîtrise des techniques nécessaires. Cependant, les observations réalisées au microscope électronique ont souvent été bien utiles au diagnostic et ont permis avec les analyses phylogénétiques d'identifier les protistes ciliés. En ce qui concerne leurs bactéries symbiotiques, certaines analyses complémentaires sont également nécessaires afin de pouvoir caractériser et identifier correctement leurs métabolismes ainsi que leurs interactions avec leur partenaire. À ce jour, il n'est pas possible de cultiver les bactéries ectosymbiotiques présentes chez les protistes (Radek, 2010). Cependant, des approches indirectes telles que la microscopie électronique, l'analyse d'enzymes clés et des produits de stockage résiduels du métabolisme des différentes bactéries symbiotiques ainsi que l'utilisation d'isotopes radioactifs et stables comme traceurs peuvent fournir des indications (Radek, 2010). Le développement de nouvelles techniques comme la single-cell PCR (Yoon *et al.*, 2011) ont également permis d'approfondir les études sur les interactions entre micro-organismes en permettant l'étude d'une seule cellule hôte isolée avec tous ces partenaires associés. Ceci permet une identification moléculaire de ces micro-organismes non cultivables, et des hypothèses quant à leurs fonctions métaboliques peuvent être faites par comparaison avec des séquences, par exemple, codant pour des enzymes spéciales (Radek, 2010). Jusqu'à présent, des membres de plusieurs phyla de bactéries et, plus rarement, d'archéobactéries méthanogènes, ont été identifiés comme symbiotes chez les protistes (Radek, 2010). Cependant, la plupart des efforts ont été consacrés à l'étude des associations bactériennes des ciliés intestinaux de moutons, chèvres, bovins, porcs et chevaux et des ciliés d'environnements micro-oxiques ou anoxiques (Radek, 2010).

## 1. Les ciliés péritriches sessiles

L'échantillonnage réalisé à la surface des feuilles de *Rhizophora mangle* et de débris végétaux a permis d'identifier deux espèces de ciliés péritriches sessiles (Peritrichia, Sessilida) appartenant aux familles des Vorticellidae et des Zoothamniidae. Les ciliés péritriches sont l'un des groupes de ciliés les plus abondants dans les environnements d'eau douce, estuariens, marins et même hypersalins (Kahl, 1935 ; Shen, 1980 ; Jankowski, 1985 ; Wbi-Bo, 1986 ; Sun *et al.*, 2016 ; Zhuang *et al.*, 2016 ; 2018). De nombreuses espèces péritriches se fixent également aux crustacés, aux poissons, aux amphibiens, aux plantes aquatiques, aux algues et à d'autres hôtes (Song, 2003a ; Utz et Eizirik, 2007 ; Visse, 2007 ; Abdallah *et al.*, 2011 ; Rajabunizal et Ramanibai, 2011 ; Azevedo *et al.*, 2014). Pour la plupart des espèces sessiles, ils sont définis morphologiquement par la présence d'une zone orale élargie (péristome) avec une inflexion orale en spirale composée de trois polycineties et d'une haplocinetie, une bande de cils aboraux (bande trochal) qui n'apparaît que pendant le stade de dispersion ou stade télotroche (Figure 67). Une scopule au pôle aboral sécrète un stolon permettant la fixation de ces organismes (Adl *et al.*, 2005 ; Zhuang *et al.*, 2018). Les zoïdes des péritriches coloniaux ont généralement des structures cellulaires similaires mais les colonies diffèrent en ce qui concerne la structure de la tige et le type de ramification. Les péritriches sont divisés en deux ordres : les Sessilida et les Mobilida. Les études taxonomiques et systématiques sur les ciliés péritriches sont traditionnellement basées sur des caractères morphologiques, tels que la présence ou l'absence d'une lorica, la distinction entre une forme coloniale *versus* une forme solitaire, la structure du disque adhésif, ou encore l'infaciliature orale. La présence ou l'absence d'un spasmonème, la contraction de la tige ainsi que l'étude du « Silverline system » sont largement utilisés dans la taxonomie des péritriches au niveau de la famille et/ou du genre (Zhuang *et al.*, 2018). Le « Silverline system », qui représente le profil des crêtes pelliculaires à la surface du zoïde, peut être transversal ou réticulé et a été suggéré comme critère d'identification lors du diagnostic permettant la classification des espèces dans les différents genres (Foissner et Schiffmann, 1974).

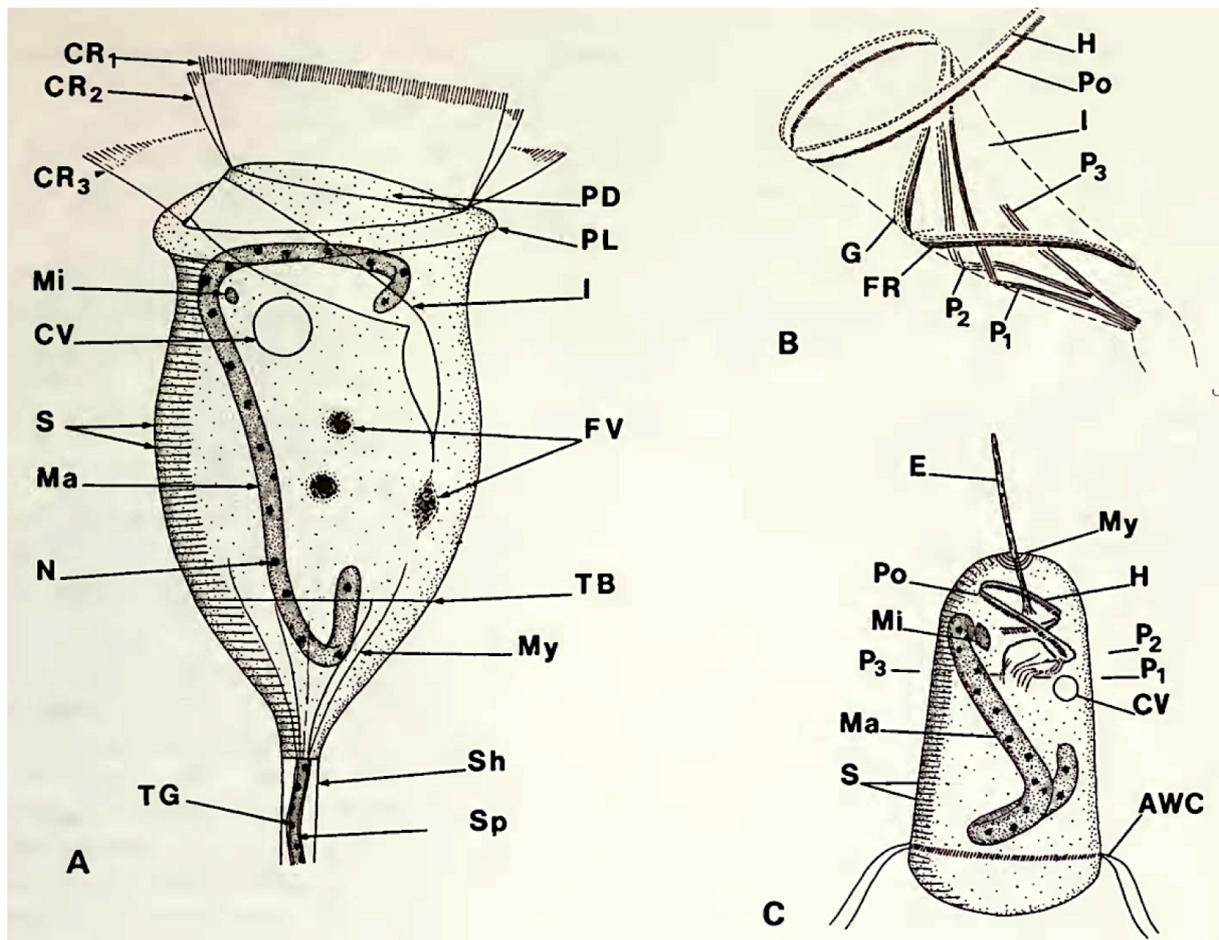


Figure 67. Caractères morphologiques du genre *Vorticella* (Warren, 1986) : (A) zoïde ; (B) infraciliature buccale ; (C) stade télotroche. (AWC) Couronne de cils aborale ; (CR 1-3) 1er, 2e et 3e rangs ciliaires ; (CV) vacuole contractile ; (E) membrane épistomiale ; (FR) réticulum filamenteux ; (FV) vacuole digestive ; (G) ligne germinale de la cinétie ; (H) haplocinétie ; (I) infundibulum ; (Ma) macronucleus ; (Mi) micronoyau ; (My) myonème ; (N) nucléolus ; (P 1-3) 1er, 2ème et 3ème peniculus ; (PD) disque péristomial ; (PL) Lèvre péristomiale ; (Po) Polycinétie ; (S) striations ou Silverline System ; (Sh) Stolon ; (Sp) spasmoneme ; (TB) bande télotroche ; (TG) granule thecoplasmique.

### a. *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe

D'après les analyses phylogénétiques effectuées sur *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe, les membres de la famille des Vorticellidae forment un groupe monophylétique comprenant les espèces *Pseudovorticella*, *Vorticella* et *Carchesium*. Les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus par Li *et al.*, 2008a. Tous les membres de ce groupe sont réunis par un caractère commun, ils ont un spasmonème qui se contracte en forme de spirale (Lynn, 2008). Le genre *Pseudovorticella* a été établi par Foissner et Schiffmann (1974) : « ce genre définit les espèces péritriches morphologiquement semblables à *Vorticella*, c'est-à-dire, possédant des zooïdes solitaires qui peuvent se contracter sur une tige non ramifiée (ou stolon) qui elle-même se contracte en spirale. Contrairement au *Vorticella* les *Pseudovorticella* possèdent un « Silverline system » réticulé ». Le « Silverline System », qui représente le profil des crêtes pelliculaires à la surface du zoïde, peut être transversal

(*Vorticella* spp.) ou réticulé (*Pseudovorticella* spp.). Il a été suggéré comme caractère pour l'identification et la classification taxonomique au niveau du genre pour les différentes espèces de ces organismes sessiles (Foissner et Schiffmann, 1974). D'après les observations effectuées au MEB, le zoïde présente un « Silverline system » réticulé, et donc, ce cilié est probablement un membre du genre *Pseudovorticella*. L'analyse phylogénétique utilisant la méthode du Maximum Likelihood (ML) a placé ce cilié dans un nouvel embranchement rattaché au groupe *Vorticella*. Cependant, la faible robustesse du nœud ne supporte pas cette affiliation. Par ailleurs, la méthode du Neighbor Joining (NJ) a placé ce cilié dans le groupe *Pseudovorticella*. Ces résultats traduisent bien la difficulté de classer ces protistes ciliés et souligne l'importance des analyses morphologiques qui sont souvent nécessaires pour l'identification de ces micro-organismes. Le genre *Pseudovorticella* comprend plus de 20 espèces, dont la plupart ont été transférées de *Vorticella* après une première identification erronée (Foissner et Schiffmann, 1974 ; Warren, 1986 ; 1987 ; Foissner et Berger, 1992 ; Leitner et Foissner, 1997 ; Song et Warren, 2000 ; Li *et al.*, 2008a). Bien que la scission soit maintenant supportée par des données moléculaires, il semblerait que le gène codant pour l'ARNr 18S ne soit pas toujours fiable pour séparer les taxons au niveau du genre (Li *et al.*, 2008a). Ainsi, cela suggère que le « Silverline system » est probablement plus informatif que le gène de l'ARNr 18S dans le diagnostic permettant la classification à adopter pour l'identification au niveau du genre chez les Vorticellidae. Une deuxième division utilisant le nombre de membranes épistomiales comme principale caractéristique a également été proposée par Foissner *et al.*, 2009.

### **b. *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe**

En ce qui concerne *Zoothamnium niveum*, il a été tout d'abord placé dans la famille des Vorticellidae par Ehrenberg (1838), avant que Sommer (1951) ne crée la famille des Zoothamniidae. Dans sa classification, les organismes appartenant à cette famille partagent tous comme caractères communs un spasmonème continu dans le stolon, des branches qui connectent tous les zoïdes des espèces coloniales, et un stolon qui se contracte en « Zig-zag ». La classification des *Zoothamnium* a par la suite variée en fonction des auteurs, passant tantôt chez les Vorticellidae (Corliss, 1979) puis chez les Zoothamniidae (Lynn et Small, 2002). Les résultats phylogénétiques obtenus dans cette étude confirment les résultats obtenus précédemment (Lynn et Small, 2002 ; Clamp et Williams, 2006 ; Bright *et al.*, 2014) en plaçant le genre *Zoothamnium* dans un clade séparé de celui des Vorticellidae. De plus, il semblerait que le genre *Zoothamnium* forme plusieurs clades dont l'un deux semble être

rattaché aux Epystilidae. Les résultats obtenus ici sont en accord avec l'étude phylogénétique récente des Zoothamniidae et des Epystilidae qui prouve qu'il existe bien un clade des Epystilidae qui s'insèrent au sein d'un des clades formé par le genre *Zoothamnium* (Zhuang *et al.*, 2018). Il semblerait par ailleurs que la famille des Zoothamnidae soit paraphylétique, elle comprend désormais 7 autres genres (Lynn, 2008) : *Craspedomyoschiston* (Precht, 1935), *Haplocaulus* (Warren, 1988), *Mesothamnium* (Jankowski, 1985), *Myoschiston* (Jankowski, 1985), *Pseudohaplocaulus* (Warren, 1988), *Zoothamnioides* (Schoedel, 2006) et *Zoothamnopsis* (Song, 1997). Plusieurs espèces ont par ailleurs été décrites avec des bactéries ectosymbiotiques à la surface de leurs zoïdes comme *Z. alternans* (Fauré-Fremiet, 1963), *Z. balticum* (Biernacka, 1963), *Z. pelagicum* (Dragesco, 1948 ; Laval, 1968 ; Hausmann et Walz, 2007) et *Z. penaei* (Song, 1992) ainsi que *Z. entzi*, *Z. ignavum*, *Z. niveum*, *Z. perlatum*, *Z. thiophilum*, *Z. urceolatum* qui ont été décrits dans des habitats sulfidiques (Stiller, 1946 ; Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; Schuster et Bright, 2016).

### **c. Identification des bactéries ectosymbiotiques des ciliés péritriches sessiles**

L'étude phylogénétique des bactéries ectosymbiotiques des espèces péritriches sessiles ont montré que les ectosymbiotes de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe et de *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe sont différents. Récemment, une symbiose apparaissant entre une autre espèce de protiste ciliée appelée *Zoothamnium ignavum* et un nouveau genre de bactérie proposée sous le nom de « *Candidatus Navis piranensis* » a été découverte grâce au prélèvement de bois immergé dans le nord de l'Adriatique (Schuster et Bright, 2016). Les analyses phylogénétiques effectuées sur les ectosymbiotes de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe ont montré que ces deux ciliés, bien que géographiquement éloignés, partageaient des bactéries ectosymbiotiques similaires. D'autre part, les analyses phylogénétique effectuées sur les bactéries ectosymbiotiques de *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe ont montré que ses bactéries ectosymbiotiques sont proches de celles retrouvées chez d'autres individus de *Zoothamnium niveum* provenant de la mer méditerranée ou du Belize, dénommées *Candidatus thiobos Zoothamnicoli* (Rinke *et al.*, 2009). Ces résultats montrent que même chez des espèces phylogénétiquement proches qui vivent dans le même environnement, les bactéries ectosymbiotiques sont différentes et spécifiques à leur hôte. Malheureusement, seule la souche bactérienne dominante associée à chaque hôte a été identifiée au cours de ces études sur les espèces péritriches sessiles. Ainsi,

l'hétérogénéité de la souche potentielle survenant dans ces épiboses n'a pas été étudiée ainsi que la présence potentielle d'autres bactéries sur la surface cellulaire des protistes ciliés. Malheureusement le métabolisme thiotrophique des bactéries ectosymbiotiques n'a également pas pu être complètement démontré, bien que les résultats obtenus au microscope électronique à transmission, au spectromètre Raman et les analyses phylogénétiques suggèrent un métabolisme basé sur l'oxydation des sulfures. En effet, le cytoplasme des bactéries possèdent les mêmes caractéristiques ultrastructurales retrouvées chez les symbiotes sulfo-oxydants décrits dans d'autres études (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; Ott *et al.*, 2004a ; Cavanaugh *et al.*, 2006 ; Dubilier *et al.*, 2008). L'étude au spectromètre Raman couplée à la microscopie électronique à transmission a été utilisée pour identifier la forme allotropique du soufre présente à l'intérieur du cytoplasme de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe et de ses bactéries ectosymbiotiques puis pour analyser sa distribution au sein de l'hôte d'après une méthode précédemment utilisée par Himmel *et al.* (2009) et Maurin *et al.* (2010). Les résultats ont montré que le soufre présent à l'intérieur de l'hôte et de son symbiote est sous la forme élémentaire S<sup>8</sup> (cyclo-octasoufre), il s'agit de la forme allotropique du soufre qui prédomine à température ambiante. Des résultats similaires avaient déjà été montrés lors de l'analyse de *Zoothamnium niveum* au spectromètre Raman (Maurin *et al.*, 2010). Cette technique semble être plus efficace et moins contraignante que les méthodes fréquemment utilisées (EDXS, EELS). En effet, ces techniques sont longues, coûteuses et nécessitent de fortes compétences techniques (Himmel *et al.*, 2009). De plus, le caractère non destructif de la microspectrométrie Raman permet de récupérer l'échantillon après les expériences pour réaliser des études complémentaires analytiques, enzymologiques et ultrastructurales (c'est-à-dire TEM, SEM, immunochimie) (Maurin *et al.*, 2010). Les résultats au MET ont montré que les granules de soufre S<sup>8</sup> sont concentrés dans le cytoplasme de bactéries ectosymbiotiques de *Pseudovorticella* sp. et de *Zoothamnium niveum*. Cependant, le soufre n'a pu être détecté au microspectromètre Raman que dans le cytoplasme des bactéries présentes dans les vacuoles digestives de ces ciliés. Ceci peut s'expliquer soit par une concentration en soufre S<sup>8</sup> inférieure à la limite de détection de l'appareil chez les bactéries présentes sur la surface des ciliés, soit par le fait que ces bactéries peuvent contenir du soufre élémentaire sous une forme différente de S<sup>8</sup>. Dans ce dernier cas, la précipitation du soufre sous forme solide S<sup>8</sup> peut se produire au cours du processus de digestion par le cilié, entraînant la présence d'agrégats S<sup>8</sup> détectés dans les vacuoles alimentaires. De plus, en raison de la résolution spatiale du microscope Raman (4 µm), il n'est pas possible de déterminer la localisation précise du soufre dans les bactéries au niveau ultrastructurale. L'emplacement du soufre nécessite une analyse

TEM (Himmel *et al.*, 2009). Néanmoins, même une résolution de 4 µm permet une détection et la caractérisation de la forme du soufre présente dans les échantillons ainsi que sa localisation à méso-échelle en très peu de temps. D'après les résultats obtenus par la spectrométrie Raman, les observations TEM et les analyses phylogénétiques du symbiote de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe et de *Zoothamnium niveum* isolat Guadeloupe, il est fort probable que les bactéries présentes à la surface de ces ciliés utilisent un métabolisme sulfo-oxydant mais ces résultats doivent être confirmés par l'analyse de l'APS réductase et du gène RubisCo. Ces deux enzymes interviennent respectivement dans la voie d'oxydation du soufre et dans le cycle de fixation du CO<sub>2</sub> de Calvin-Benson et sont généralement utilisées pour l'identification des symbiotes sulfo-oxydantes (Herry *et al.*, 1989 ; Duperron *et al.*, 2009).

## 2. Les protistes ciliés mobiles

La méthode d'échantillonnage mise en place lors de cette étude a permis d'identifier deux espèces de protistes ciliés mobiles symbiotiques appartenant au Cyrtophoridés présents dans les mangroves de Guadeloupe. Les ciliés Cyrtophoridés sont communs dans les habitats aquatiques, et certains d'entre eux sont des organismes commensaux ou parasites d'animaux aquatiques (Corliss, 1979 ; Hofmann, 1988). Les Cyrtophoridés représentent l'un des groupes les plus spécialisés des ciliés (Figure 68), ils sont caractérisés morphologiquement par un panier buccal denté, une ciliature somatique habituellement restreinte au côté ventral et des macronoyaux hétéromères (Deroux, 1994). La ciliature orale et les cinéties somatiques sont toutes deux d'une grande diversité morphologique, ce qui explique le nombre d'espèces de Cyrtophoridés recensées à ce jour (Pan *et al.*, 2013). Il existe plus de 40 genres dans ce groupe (Kahl, 1931 ; 1933 ; Fauré- Fremiet, 1965 ; Deroux, 1976a ; 1976b ; 1976c ; Corliss, 1979 ; Foissner, 1979 ; Carey, 1991 ; Song et Wilbert, 2002 ; Song, 2003b ; Gong et Song, 2006). L'une des deux espèces identifiées dans les mangroves de Guadeloupe, nommée *Trochochilon* sp. isolat Guadeloupe, appartient à la famille des Plésiotrichopidae (Cyrtophoria, Chlamidodontida) tandis que l'autre espèce découverte, nommée *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe, appartient à la famille des Dysteriidae (Cyrtophoria, Dysteriida).

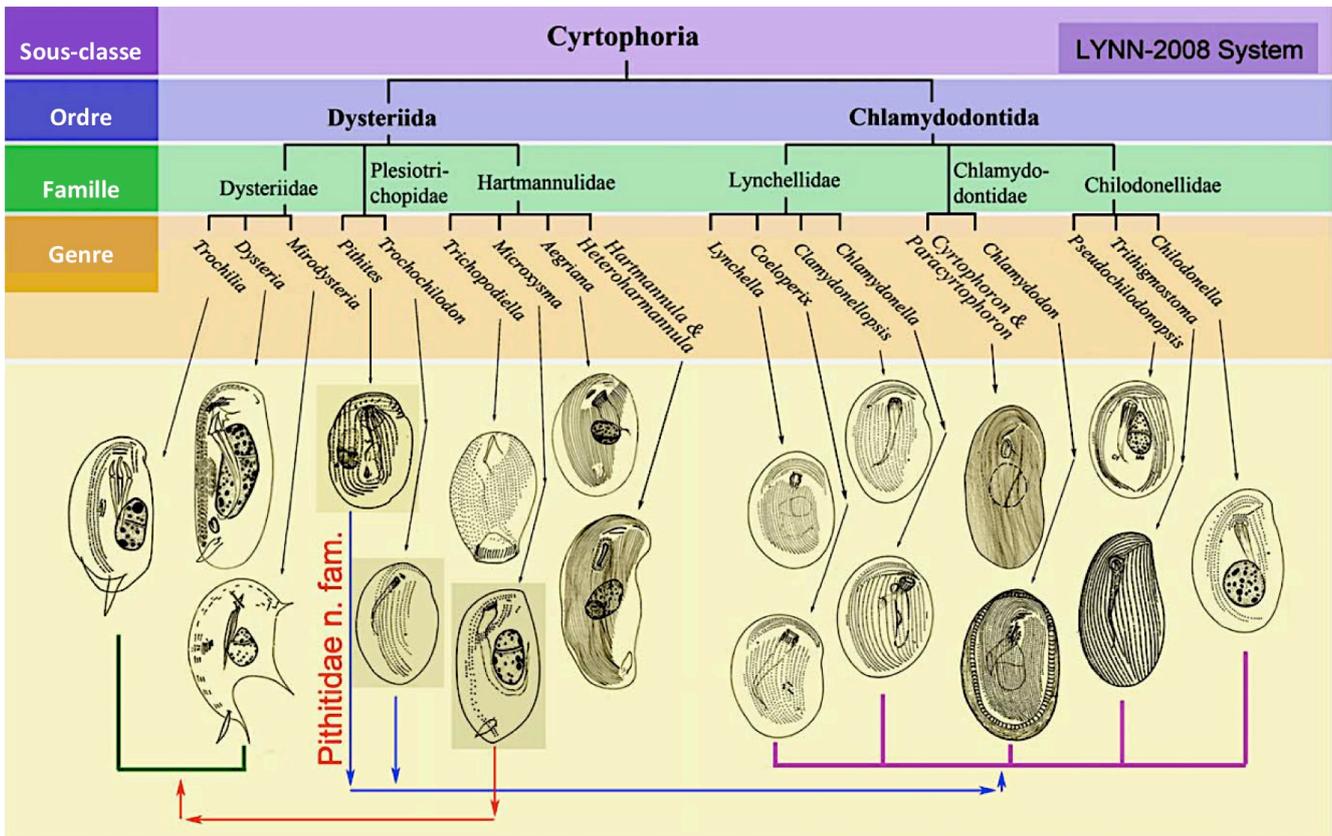


Figure 68. Classification schématique des morphotypes de chaque espèce représentant les différents genres de Cyrtophoridés. Les flèches indiquent le transfert récent de plusieurs espèces: *Microxysma* des Hartmannulidae vers les Dysteriidae; *Pithites* et *Trochochilodon* vers les Chlamyodontida (Gao *et al.*, 2012).

### a. *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe

La famille des Plésiotrichopidae a été érigée par Deroux (1976a), les taxons qui y figurent sont caractérisés par : « une infraciliature semblable à celle du genre *Chilodonella* et un appareil adhésif situé au centre de la dépression ventrale ». La famille des Plesiotrichopidae a été provisoirement assignée dans l'ordre des Dysteriida dans la plupart des schémas de classification (Jankowski, 1976 ; Corliss, 1979 ; Puytorac, 1994 ; Lynn et Small, 2002 ; Lynn, 2008). Les seules séquences disponibles du gène codant pour l'ARNr 18S appartiennent à deux genres différents, *Trochochilodon* et *Pithites* (Gao *et al.*, 2012). Les analyses phylogénétiques récentes suggèrent que ces deux genres sont éloignés l'un de l'autre et donc que la famille des Plesiotrichopidae est paraphylétique (Chen *et al.*, 2016). De ce fait, la famille des Pithidae a été établie pour le seul genre *Pithites* (Gao *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2016). Les analyses phylogénétiques menées sur *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe confirment ces résultats. Les résultats phylogénétiques sont également soutenus par des différences morphologiques et morphogénétiques entre les deux genres (Gao *et al.*, 2012). La structure de l'appareil buccal et le processus de formation au cours de la fission binaire sont considérablement différents chez les deux genres (Deroux, 1976b ; Wilbert et Song, 2005 ;

Pan *et al.*, 2011). Malheureusement, la position systématique et la définition de la famille Plesiotrichopidae restent encore non résolues au stade actuel. En effet, les données moléculaires pour le troisième genre de cette famille, *Plesiotrichopus* font totalement défaut et peu de caractères taxonomiques peuvent être utilisés pour caractériser les genres au sein de la famille (Gao *et al.*, 2012). Actuellement, la famille Plesiotrichopidae est donc un taxon *incertae sedis*, elle se compose de clades paraphylétiques dont la classification phylogénétique est incertaine. Selon les résultats obtenus lors des analyses phylogénétiques de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe, il semblerait que la famille des Plesiotrichopidae occupe une position intermédiaire entre les Chlamydomontidae et les Chilodonellidae mais la faible robustesse des nœuds ne supporte pas cette affiliation. Autrefois classé parmi les Dysteriida, le genre *Trochochilodon* occupe aujourd'hui une position intermédiaire entre les Chlamydomontidae et les Hartmannulidae (Chen *et al.*, 2016). Une relation plus étroite de *Trochochilodon* à l'ordre Chlamydomontida qu'à l'ordre Dysteriida est également soutenu morphologiquement car *Trochochilodon* n'affiche pas de podite (appareil adhésif), qui est l'un des caractères d'identification chez les Dysteriidae (Pan *et al.*, 2012). Par conséquent, il est plus probable que *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe et les autres espèces du genre appartiennent aux Chlamydomontida (Gao *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2016).

### **b. *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe**

La deuxième espèce de protistes ciliés mobiles analysée appartient aux Dysteriidae (Cyrtothoria, Dysteriida), ce groupe constitue avec celui des Hartmanniidae l'ordre des Dysteriida. La séparation nette de ces deux familles est basée sur des caractères morphologiques, notamment l'infaciliature ventrale. Des études phylogénétiques récentes ont montré que le genre *Dysteria* était paraphylétique (Gao *et al.*, 2012 ; Chen *et al.*, 2016). De ce fait, il devrait être divisé en plusieurs genres définis morphologiquement et ontogénétiquement (Gao *et al.*, 2012). Le genre *Dysteria* caractérise les espèces possédant des corps fortement comprimés dorso-ventralement, des cils restreints à la face ventrale de la cellule et possédant un podite sur la face ventrale postérieure de la cellule (Chen *et al.*, 2016) qui leur permettent d'adhérer au substrat (thigmotactisme). Les espèces appartenant au genre *Dysteria* ont été retrouvées dans le monde entier, soit à l'intérieur du périphyton ou comme parasites commensaux (Lepsi, 1927 ; Tucolesco, 1962 ; Dragesco, 1966 ; Jankowski, 1967 ; Deroux, 1976c ; Agamaliev, 1983 ; Qu *et al.*, 2015). Plus de 30 espèces nominales ont été signalées jusqu'à présent, avec des informations sur les infaciliatures disponibles pour 20 d'entre elles (Deroux, 1965 ; Fauré-Fremiet, 1965 ; Wilbert, 1971 ; Dragesco et Dragesco-

Kernéis, 1986 ; Petz *et al.*, 1995 ; Song et Packroff, 1997 ; Song et Wilbert, 2002 ; Gong *et al.*, 2002 ; 2003 ; 2007 ; Gong et Song, 2003 ; 2004 ; Wilbert et Song, 2005 ; Hu et Suzuki, 2005 ; Chen *et al.*, 2011 ; Pan *et al.*, 2011 ; Park et Min, 2014). Malheureusement les analyses morphologiques de l'infaciliature des espèces échantillonnées n'ont pas pu être réalisées par manque d'expertise et de maîtrise des techniques nécessaires. L'analyse de l'infaciliature, en particulier la structure ciliaire ventrale est cruciale pour l'identification de l'espèce étudiée car elle est spécifique à chaque espèce (Al-Rasheid, 1997 ; Gong *et al.*, 2003).

### **c. Les bactéries endosymbiotiques de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe**

Les analyses phylogénétiques des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries endosymbiotiques de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe ont révélé que la bactérie majoritairement présente à l'intérieur du cytoplasme de ce cilié est une bactérie appartenant au genre *Umboniibacter*, bien que d'autres séquences bactériennes aient également été retrouvées et identifiées chez cet hôte cilié. Le genre *Umboniibacter* a été proposé par Romanenko *et al.* (2010) pour décrire une bactérie marine en forme de bâtonnet, chimio-organohétérotrophique et strictement aérobie appartenant aux  $\gamma$ -protéobactéries. Aujourd'hui ce genre comprend trois espèces qui ont pu être isolées à partir d'un Mollusque Gastéropode marin *Umbonium costatum* (Romanenko *et al.*, 2010) et dans de l'eau de mer (Sung *et al.*, 2015 ; Park *et al.*, 2017). D'autre part, en comptant la séquence de la souche d'*Umboniibacter* isolée chez *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe, 18 séquences bactériennes différentes ont pu être extraites et amplifiées durant cette étude. Ces séquences peuvent provenir de bactéries ingérées par *Trochochilodon* sp. et présentes dans les vacuoles digestives du cilié, des bactéries libres présentes dans son cytoplasme ou encore des bactéries libres présentes dans l'eau de mer prélevée durant le processus d'échantillonnage de *Trochochilodon* sp. Il est en effet impossible de prélever les individus dans un environnement complètement stérile. D'où l'intérêt d'effectuer des analyses FISH avec des sondes spécifiques élaborées à partir des séquences majoritaires obtenues lors du clonage afin de vérifier qu'*Umboniibacter* souche Guadeloupe était bien présente dans le cytoplasme du cilié. Les observations réalisées après les hybridations FISH ont démontré que la bactérie *Umboniibacter* est bien présente en grand nombre dans le cytoplasme des individus de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe analysés provenant du milieu naturel. D'autres bactéries ont également été observées à l'intérieur du cytoplasme de certains individus de

cette espèce, ces observations étaient basées sur un non recouvrement des signaux des sondes spécifiques et EUB 338. Les observations réalisées après l'hybridation des bactéries *Umboniibacter* par FISH chez des individus provenant de culture *in vitro* ont montré que les endosymbiotes étaient parfois présents dans le cytoplasme de certains des individus analysés, même après 1 semaine en dehors de l'habitat naturel. Cependant la majorité des individus provenant de la culture semblait être aposymbiotique. Lorsqu'elles étaient présentes, ces bactéries se sont avérées être en moins grand nombre que chez des individus fraîchement collectés en milieu naturel. De plus, la perte des bactéries à l'intérieur du cytoplasme des individus provenant de culture semble coïncider avec le début des divisions des individus du pool départ. Il semblerait donc que les individus aposymbiotiques de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe issus des cultures soient des descendants des individus symbiotiques récoltés dans le milieu naturel. Le signal positif chez certains des individus échantillonnés durant la culture, après hybridation des bactéries avec les sondes spécifiques d'*Umboniibacter*, suggère que ces individus appartiennent probablement au pool de départ provenant du milieu naturel. La faible intensité du signal ainsi que sa faible fréquence laissent supposer que ces bactéries sont soit consommées par leur hôte à cause du stress alimentaire provoqué par le milieu de culture, soit qu'elles sont perdues lors des nombreuses divisions cellulaires effectuées par l'hôte. Il se peut également que les bactéries soient beaucoup moins actives dans le cytoplasme de leur hôte à cause du manque de substrat nécessaire au fonctionnement de leur métabolisme. Dans tous les cas, il semblerait donc qu'*Umboniibacter* souche Guadeloupe soit bien présente dans le cytoplasme de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. Cependant, la perte des symbiotes chez les individus de *Trochochilodon* sp. placés en culture suggère que les bactéries sont probablement acquises par voie environnementale. Les analyses au microscope électronique à transmission semblent également abonder dans ce sens. En effet, les observations effectuées démontrent la présence de plusieurs bactéries libres à l'intérieur du cytoplasme de ce cilié chez les individus fraîchement collectés en provenance du milieu naturel, alors qu'aucune bactérie n'a été observée dans le cytoplasme des individus récoltés après trois semaines de culture pure. L'absence de bactéries endosymbiotiques chez les descendants est totalement logique car ils n'ont jamais été exposés au milieu naturel et n'ont donc pas pu être infectés. De plus, la perte des bactéries ne semble pas avoir d'effet sur le cycle de vie de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. Les individus continuent de se diviser même après la perte d'*Umboniibacter*. Ces résultats suggèrent que l'association entre les deux partenaires n'est pas obligatoire. La présence d'*Umboniibacter* souche Guadeloupe dans le cytoplasme de *Trochochilodon* sp. semble plus relever du parasitisme ou du

commensalisme que d'une véritable symbiose au sens « mutualiste » du terme. En effet la symbiose est définie comme une association à long terme entre deux ou plusieurs organismes d'espèces différentes qui est intégrée au niveau comportemental, métabolique et/ou génétique (Moya *et al.*, 2008). Selon le niveau de dépendance vis-à-vis de l'hôte, la symbiose peut être obligatoire ou facultative mais dans tous les cas les protagonistes tirent un bénéfice à coexister l'un avec l'autre (Moya *et al.*, 2008). Or, aucune preuve de tels échanges n'a pu être démontrée entre *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe et *Umboniibacter* souche Guadeloupe. Des analyses supplémentaires sont donc nécessaires afin de pouvoir déterminer la nature des échanges qui se produisent lors de l'association entre ces deux partenaires.

#### **d. Les bactéries ectosymbiotiques de *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe**

Dans le cas de *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe, les observations effectuées au microscope électronique à balayage ont montré la présence de bactéries ectosymbiotiques à la surface des différents individus observés. Plusieurs tentatives ont été menées afin d'amplifier le gène codant pour l'ARNr 16S de ces bactéries, malheureusement elles n'ont pas été fructueuses. Les tentatives n'ont pas pu être renouvelées par manque de temps ce qui n'a pas permis de les identifier génétiquement. Cependant, les observations au STEM des coupes fines obtenues après inclusion en résine des individus de *Dysteria*, ont permis d'observer la présence de zones apparaissant blanches à l'intérieur du cytoplasme des bactéries ectosymbiotiques. Ces zones blanches rappellent fortement celles formées par les granules de soufre lorsqu'elles sont observées à plus fort grossissement. Des analyses au microscope électronique à transmission et des analyses par spectrométrie Raman ou à l'EDX devraient pouvoir venir confirmer ces résultats. La symbiose entre *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe et ses bactéries ectosymbiotiques a été détectée sur la fin de cette thèse, les résultats n'ont donc pas pu être approfondis par manque de temps.

### **3. Acquisition et transmission des bactéries symbiotiques chez les protistes ciliés**

Bien qu'il s'agisse d'un aspect crucial des associations mutualistes, on en sait très peu sur le processus de sélection en milieu naturel (c'est-à-dire la reconnaissance et les mécanismes d'acquisition) de nouvelles cellules symbiotiques par les hôtes potentiels (Montagnes *et al.*, 2008 ; Germond et Nakajima, 2016). L'acquisition du symbiote peut être

facilitée par des facteurs comportementaux et écologiques (Germond et Nakajima, 2016). Par exemple, les aptitudes de prédation des protistes ciliés et la proximité physique entre les différents partenaires potentiels encouragent les associations symbiotiques à émerger et à évoluer (Nakajima *et al.*, 2009 ; Germond et Nakajima, 2016). La taille des cellules des symbiotes, la présence de structures cellulaires défensives ou la capacité du symbiote à former des agrégats pour éviter la prédation sont d'autres facteurs importants qui peuvent augmenter ou diminuer la probabilité d'ingestion (Germond et Nakajima, 2016). Outre ces facteurs écologiques, les hôtes potentiels peuvent faire appel à la signalisation par communication moléculaire pour rechercher et acquérir des partenaires symbiotiques (Germond et Nakajima, 2016). Cependant, il n'existe que peu d'informations sur les processus de communication entre les symbiotes et les protistes ciliés (Germond et Nakajima, 2016). Le mode de transmission des symbiotes aux individus de la génération suivante peut être vertical ou environnemental chez les protistes ciliés (Bright et Bulgheresi, 2010 ; Germond et Nakajima, 2016). Chez les ciliés pérित्रiches comme *Z. niveum* la transmission des ectosymbiotes à la génération suivante est verticale. La culture des individus de *Z. niveum* en laboratoire a montré que les macrozoïdes qui quittent la colonie, appelés « swarmers » en anglais, emportent leurs bactéries ectosymbiotiques lors de la phase de migration (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; Rinke *et al.*, 2007). Il est fort probable qu'il en soit de même chez *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe. En effet, ces organismes se reproduisent par bourgeonnement, le nouvel individu se développant à partir du premier, il n'est pas rare de trouver des individus avec deux zoïdes sur le même stolon. Le nouvel individu se détache alors probablement en emportant les bactéries ectosymbiotiques provenant du parent lors de la phase de migration comme les « swarmers » de *Z. niveum*. Dans le cas des protistes ciliés *Métopus contortus*, *Trimyema* sp., et *Cyclidium porcatum*, les archées méthanogènes endosymbiotiques sont transférés verticalement à la descendance lors de la mitose de l'hôte (Germond et Nakajima, 2016). Cependant, il a été montré que *Methanobacterium formicicum*, l'endosymbiote de *Trimyema compressum* peut être perdu lorsque l'hôte est placé dans des conditions expérimentales de culture, puis être utilisés pour la réinfection des ciliés aposymbiotiques (Wagener *et al.*, 1990 ; Shinzato et Kamagata, 2010 ; Germond et Nakajima, 2016). Il en va de même chez les espèces symbiotiques du genre *Paramecium* placés en culture, les bactéries endosymbiotiques sont généralement perdues lorsque les divisions sont trop rapides (bloom). La multiplication entraîne généralement une dilution des symbiotes puis leur disparition. La perte des bactéries lors de la mise en culture des hôtes provenant du milieu naturel n'est pas un phénomène propre aux protistes, les bivalves Lucinidae comme

*Codakia orbicularis* perdent également leurs bactéries endosymbiotiques lorsqu'ils sont placés en stabulation (Gros *et al.*, 2012). En milieu naturel, l'acquisition de ces bactéries symbiotiques dans l'environnement est donc parfois nécessaire et peut jouer un rôle majeur aussi bien dans la survie de l'hôte que celle des symbiotes (Kusch *et al.*, 2002 ; Schweikert, 2013). Dans le cas de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe, il semblerait qu'*Umboniibacter* souche Guadeloupe soient perdues lorsque les individus sont placés en culture et que ces bactéries ne soient pas transmises à la génération suivante pendant la phase de culture en laboratoire. Il semblerait donc que l'acquisition d'*Umboniibacter* souche Guadeloupe ne se fasse qu'en milieu naturel. La bactérie est probablement ingérée lors de l'alimentation du protiste cilié et se retrouve alors dans les vacuoles digestives. *Umboniibacter* souche Guadeloupe doit pouvoir échapper au processus de digestion du protiste cilié afin de se retrouver à l'intérieur du cytoplasme du protiste cilié. Le manque de substrat nécessaire au développement des bactéries dans le cytoplasme des ciliés provenant du milieu naturel et placés en culture ou leur consommation par leur hôte sont des raisons qui peuvent expliquer la perte de ces bactéries durant la culture.

## **B. Les sédiments marins de mangroves : un environnement propice au développement des symbioses bactériennes**

La dégradation de la matière organique, principalement composée de débris végétaux en mangrove, se déroule aussi bien dans le sédiment marin qu'à la surface de celui-ci. Ces processus de dégradation permettent la mise en place de conditions favorables à l'établissement de symbioses thioautotrophes sulfo-oxydantes en mangrove (Laurent *et al.*, 2009 ; 2013) comme cela a été également montré dans d'autres environnements marins chimiosynthétiques (Ott *et al.*, 2004a ; Cavanaugh *et al.*, 2006 ; Dubilier *et al.*, 2008). Plusieurs interactions symbiotiques ont été décrites entre des bactéries chimiosynthétiques et des invertébrés marins ou ciliés vivant dans les mangroves de Guadeloupe. Les Mollusques bivalves *Lucina pectinata* et *Anodontia alba* vivent dans la vase de mangrove de la Manche-à-Eau et hébergent des bactéries endosymbiotiques sulfo-oxydantes dans leur branchies (Durand *et al.*, 1996 ; Frenkiel *et al.*, 1996 ; Gros *et al.*, 2003). Les ciliés péritriches sessiles ont plutôt tendance à présenter des bactéries ectosymbiotiques à la surface de leurs corps (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; Ott et Bright, 2004 ; Ott *et al.*, 2004a ; Schuster et Bright,

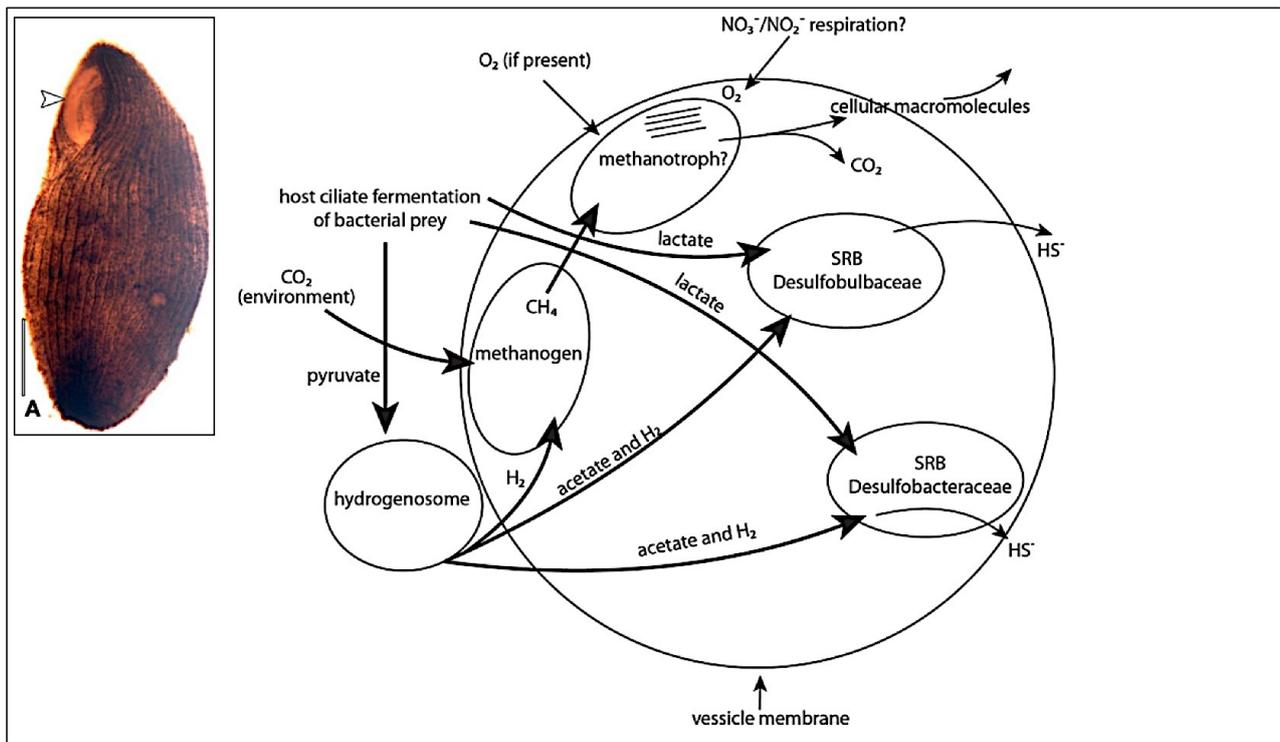
2016). Même les sédiments marins sableux ou poussent généralement les herbiers de phanérogames marines, plus facilement drainés et oxygénés que les autres types de sédiments, peuvent connaître des enrichissements en sulfures, avec des concentrations atteignant jusqu'à 22mM dans l'eau interstitielle (Fenchel et Riedl, 1970). Les sédiments marins sableux peuvent alors héberger des organismes symbiotiques tels que des bivalves Solemyidae (Krueger *et al.*, 1996), des nématodes Stilbonematinae, et des oligochètes Tubificidae dépourvus de tube digestif (Ott *et al.*, 2004b ; Dubilier *et al.*, 2008). De nombreuses symbioses entre protistes ciliés et bactéries ont été décrites dans des environnements présentant des conditions oxiques (Amann *et al.*, 1991 ; Springer *et al.*, 1993 ; Beier *et al.*, 2002 ; Vannini *et al.*, 2004), micro-oxiques ou anoxiques (Epstein *et al.*, 1998 ; Bernhard *et al.*, 2000 ; Edgcomb *et al.*, 2011b ; Orsi *et al.*, 2012). La quantité d'oxygène disponible et les concentrations de sulfure dans l'environnement semblent avoir une forte influence sur les distributions microbiennes dans ces environnements marins anoxiques, comme cela a pu être décrits au niveau du bassin de Cariaco (Taylor *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2008b ; Lin *et al.*, 2008 ; Edgcomb *et al.*, 2011a ; Orsi *et al.*, 2011), le fjord de Framvaren (Behnke *et al.*, 2006 ; Stoeck *et al.*, 2009) mais également au niveau des sédiments marins réduits anoxiques de mangrove (Holmer, 2009 ; Gontharet *et al.*, 2017).

## **1. Les ciliés anaérobies et micro-aérophiles sont souvent associés à des bactéries**

Parmi les protistes, c'est au sein du groupe des ciliés que les associations symbiotiques avec les procaryotes sont le mieux documentées (Fenchel et Finlay, 1995). Dans les environnements benthiques peu profonds, les ciliés peuvent abriter des bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; 1996b), des bactéries sulfato-réductrices (Fenchel et Ramsing, 1992) ainsi que des archées méthanogènes endosymbiotiques (Fenchel et Finlay, 1991b). Les ciliés anaérobies ne possèdent pas de mitochondries mais des organites spécifiques appelés hydrogénosomes, qui produisent de l'hydrogène et leur permet de s'adapter aux conditions anoxiques de l'environnement (Hackstein *et al.*, 2006 ; Hackstein, 2010). On pense que l'hydrogénosome a une origine symbiotique unique provenant des mitochondries (Hackstein *et al.*, 2006 ; Hackstein, 2010). Il a évolué à plusieurs reprises chez 7 des 22 taxons ciliés (Fenchel et Finlay, 1995). Les déchets d'hydrogène produits par l'hôte à travers les hydrogénosomes peuvent être utilisés comme ressources métaboliques par des bactéries endosymbiotiques photosynthétiques pourpres non

sulfureuses, des archées méthanogènes et des bactéries ectosymbiotiques sulfato-réductrices vivant à la surface de l'hôte (Fenchel et Finlay, 1991a ; Fenchel et Bernard, 1993). Les trois groupes consomment de l'hydrogène comme substrat. Ceci suggère que la production de H<sub>2</sub> par les ciliés au niveau des hydrogénosomes est significative dans le maintien de ces associations symbiotiques (Rosati, 2004). Les bactéries ectosymbiotiques sulfato-réductrices se trouvent presque exclusivement chez les espèces marines de ciliés, et certaines de ces espèces contiennent également des archées méthanogènes endosymbiotiques (Figure 69). Ces bactéries ectosymbiotiques ont des morphologies différentes même chez les espèces ciliées du même genre et s'attachent de différentes manières à leur hôte (Fenchel *et al.*, 1977 ; Fenchel et Finlay, 1991a). La possibilité que ces bactéries ectosymbiotiques puissent réduire le sulfate a d'abord été suggérée par Fenchel et Finlay (Fenchel et Finlay, 1991a). Cette hypothèse a ensuite été confirmée grâce à l'utilisation de sondes spécifiques hybridées aux bactéries en laboratoire par FISH (Fenchel et Ramsing, 1992). Chez ces ciliés, les ectosymbiotes peuvent entrer en compétition avec les méthanogènes intracellulaires pour l'utilisation de l'H<sub>2</sub>. Ainsi, les ectosymbiotes sont significativement plus abondants dans les espèces qui n'ont pas de méthanogènes endosymbiotiques. *Metopus contortus*, *Trimyema* sp. et *Cyclidium porcatum* sont des exemples bien connus d'hôtes ciliés hébergeant des archées méthanogènes symbiotiques (Fenchel et Finlay, 1991b ; Epstein *et al.*, 1998 ; Hackstein, 2010 ; Germond et Nakajima, 2016). Dans ces associations symbiotiques, il a été suggéré que l'hôte bénéficiait de ses partenaires symbiotiques en termes de taux de croissance et de survie, et contrôlait à son tour le cycle de vie des symbiotes. Les méthanogènes symbiotiques sont transmis verticalement pendant la mitose des hôtes (van Hoek *et al.*, 2000). Cependant, il existe une relation étroite entre les archées méthanogènes qui vivent librement dans l'environnement et les endosymbiotes présents dans le cytoplasme de ces ciliés, suggérant que la transmission horizontale a également eu lieu plusieurs fois dans l'histoire de l'évolution des ciliés anaérobies (van Hoek *et al.*, 2000 ; Hackstein, 2010). La majorité des associations symbiotiques entre ciliés et bactéries ont été décrites dans des habitats marins anoxiques réduits peu profond (Fenchel et Finlay, 1995 ; Ott, 1996). Des études plus récentes, menées au niveau du bassin de Santa Barbara, appauvri en oxygène, et des suintements froids de Monterey Bay (Buck *et al.*, 1998 ; 2000 ; Bernhard *et al.*, 2001), ont montré que la grande majorité des protistes du bassin de Santa Barbara et la plupart de ceux récupérés dans les suintements froids de Monterey Bay, possèdent des bactéries ecto et/ou endosymbiotiques (Edgcomb *et al.*, 2011b). L'une des espèces, proche du cilié *Parduzcia orbis* (Figure 69), possède deux bactéries sulfato-réductrices (Desulfobulbaceae, Desulfobacteraceae), une

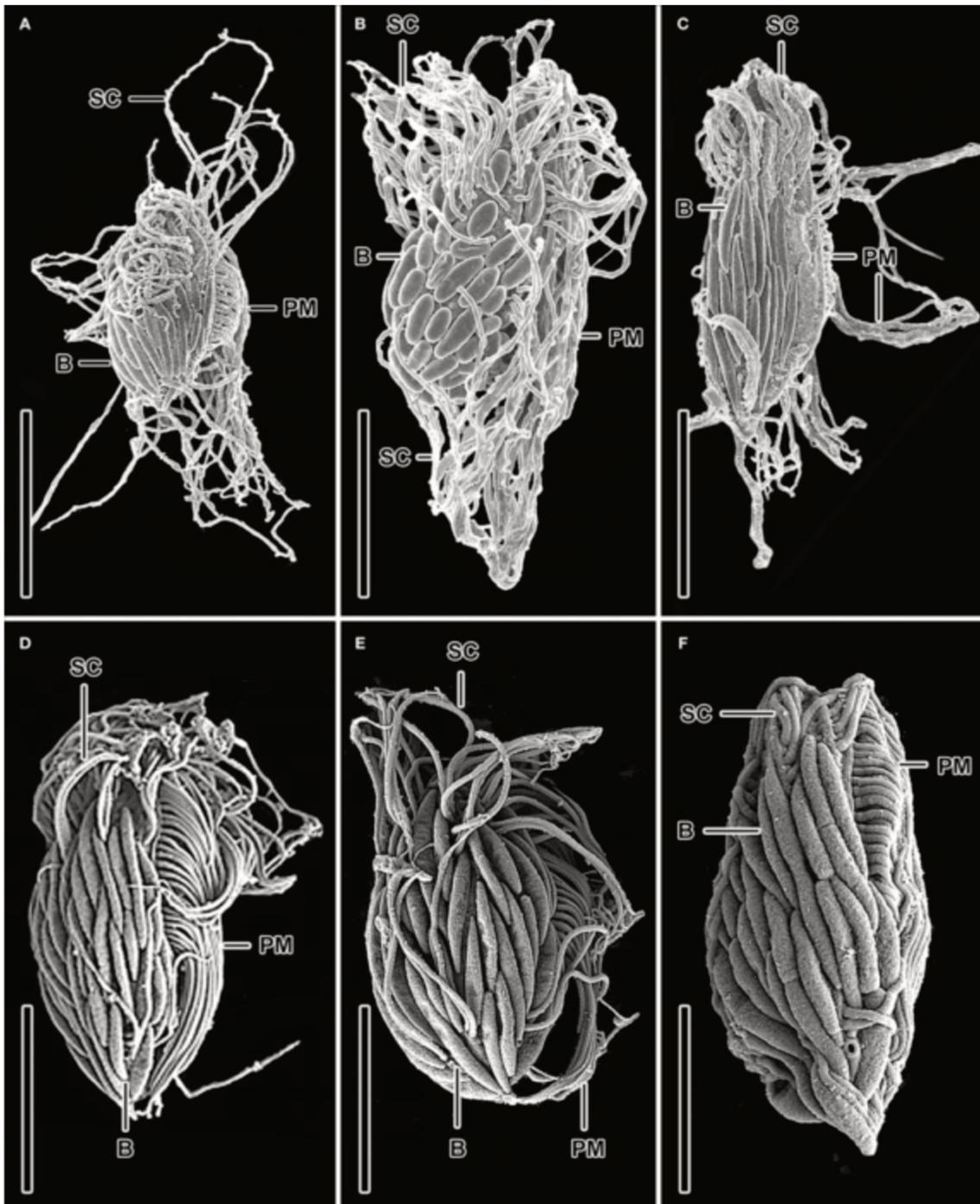
archée méthanogène (Methanobacteria), et éventuellement une bactérie appartenant aux Bacteroidetes (*Cytophaga*) et une archée méthanotrophe de type I comme endosymbiotes, suggérant des métabolismes synergiques dans cet environnement (Edgcomb *et al.*, 2011b). Il semblerait que ces symbiotes puissent subvenir aux besoins alimentaires de leur hôte, cependant des études sont encore nécessaires pour comprendre le rôle joué par chaque métabolisme dans les échanges trophiques (Figure 69). Ces deux environnements partagent plusieurs attributs en commun avec les sédiments peu profonds, des concentrations élevées de bactéries chimioautotrophes formant des mattes bactériennes constituées en partie de Beggiatoaceae, et des concentrations élevées de sulfure d'hydrogène (Edgcomb *et al.*, 2011b). Bien que les ciliés anaérobies présents dans le sédiment de mangrove n'aient pas été étudiés, il ne serait pas surprenant de retrouver ce genre d'association avec des archées méthanogènes, des bactéries sulfato-réductrices ou encore des bactéries pourpres non sulfureuses en mangrove. En effet, la dégradation de la matière organique par fermentation dans les couches profondes du sédiment de mangrove permet la production de méthane. Ce méthane peut diffuser vers les couches supérieures riches en sulfates. Cette production biogénique du méthane est réalisée grâce à des archées qui utilisent le dihydrogène H<sub>2</sub> (parfois le formate, le monoxyde de carbone ou certains alcools) comme donneur d'électrons et le dioxyde de carbone (parfois l'acétate ou des composés méthylés) comme accepteurs et comme source de carbone (Duperron, 2005). Dans la couche riche en sulfate, il peut alors être oxydé par oxydation anaérobie du méthane (AOM) grâce au consortium formé par des Archées méthanogène et des delta-protéobactéries sulfato-réductrices telles que *Desulfococcus* ou *Desulfosarcina*. Les Archées impliquées dans ce consortium appartiennent au groupe des ANME (Knittel *et al.*, 2005) et sont capables d'inverser la méthanogenèse afin d'oxyder le méthane en conditions anaérobies (Boetius *et al.*, 2000 ; Orphan *et al.*, 2001 ; Edgcomb *et al.*, 2011b). Les processus de réduction organoclastiques des sulfates (OSR) et l'oxydation anaérobie du méthane (AOM) sont donc tous les deux en concurrence pour la consommation des sulfates dans les sédiments (Jørgensen et Parkes, 2010). Cependant, l'AOM est généralement considérée comme un processus se limitant à un horizon distinct, la zone de transition sulfate-méthane (SMTZ) alors que l'OSR se produit dans toute la zone de réduction du sulfate (Crémière *et al.*, 2017).



**Figure 69. Représentation schématique des divers métabolismes utilisés par les endosymbiotes et leur hôte ainsi que leurs interactions potentielles (Edgcomb *et al.*, 2011b). Les phénotypes majeurs comprennent la respiration des sulfates, la méthanogénèse, la méthanotrophie et l'activité des hydrogénosomes. D'autres activités pourraient inclure la respiration de nitrate et de nitrite. Les flèches en gras indiquent la source de carbone/donneur d'électrons.**

D'autre part, des bactéries ectosymbiotiques ont été décrites chez de nombreuses autres espèces de ciliés évoluant au niveau de l'interface oxygène-anoxique des sédiments et de la colonne d'eau. En mangrove, la couche sulfidique présente à la surface des sédiments est très fine (de l'ordre de 3mm) à cause de l'oxydation chimique des sulfures en contact avec l'oxygène présent dans l'eau de mer (Ott et Bright, 2004). Cependant dans certains habitats la colonne d'eau peut être fortement appauvrie en oxygène comme c'est le cas au niveau du bassin de Cariaco (mer des Caraïbes, Venezuela), le bassin Discovery (mer Méditerranée, Grèce) et le bassin Urania (Mer Méditerranée, Grèce). Les bassins Urania et Discovery contiennent respectivement des saumures sursaturées (~5 M) de chlorure de sodium et de magnésium (Van der Wielen *et al.*, 2005). Les deux bassins présentent une halocline et ont des niveaux détectables de sulfure, jusqu'à 16 mM dans la saumure du bassin d'Urania (Van der Wielen *et al.*, 2005). Les conditions environnementales de ces habitats les classent parmi les habitats les plus polyextrêmes sur Terre. De nombreuses associations ectosymbiotiques (Figure 70) entre ciliés et procaryotes ont été décrites au niveau de ces habitats et il semblerait que la répartition de ces espèces dans les différents sites soit liée aux conditions chimiques de la colonne d'eau (Orsi *et al.*, 2012). De plus la présence de bactéries dans le cytoplasme de ces ciliés suggère une alimentation par phagocytose et n'exclut pas la présence

d'endosymbiotes chez ces espèces (Orsi *et al.*, 2012). La prévalence de ciliés symbiotiques présentant des bactéries ectosymbiotiques suggère que ce genre d'association doit probablement favoriser le succès reproducteur de ces organismes (ou fitness) dans les environnements halocline et/ou oxycline.



**Figure 70.** Observation en MEB de plusieurs morphotypes de bactéries et de ciliés (Orsi *et al.*, 2012) provenant du Bassin de Cariaco dans la mer des Caraïbes (A-C) et de l'halocline du bassin d'Urania dans la mer Méditerranée (D-F). Vues dorsolatérale (A, B, D-F) et dorsale (C) d'éventuels scuticociliates présentant des bactéries ectosymbiotiques localisées sur leurs parties postérieure ou dorsale du corps des ciliés. Explications: B = bactéries; PM = membrane parorale, SC = cils somatiques. Barres d'échelle: (A) = 5µm; (B) = 9 µm; (C) = 7 µm; (D-F) = 3 µm.

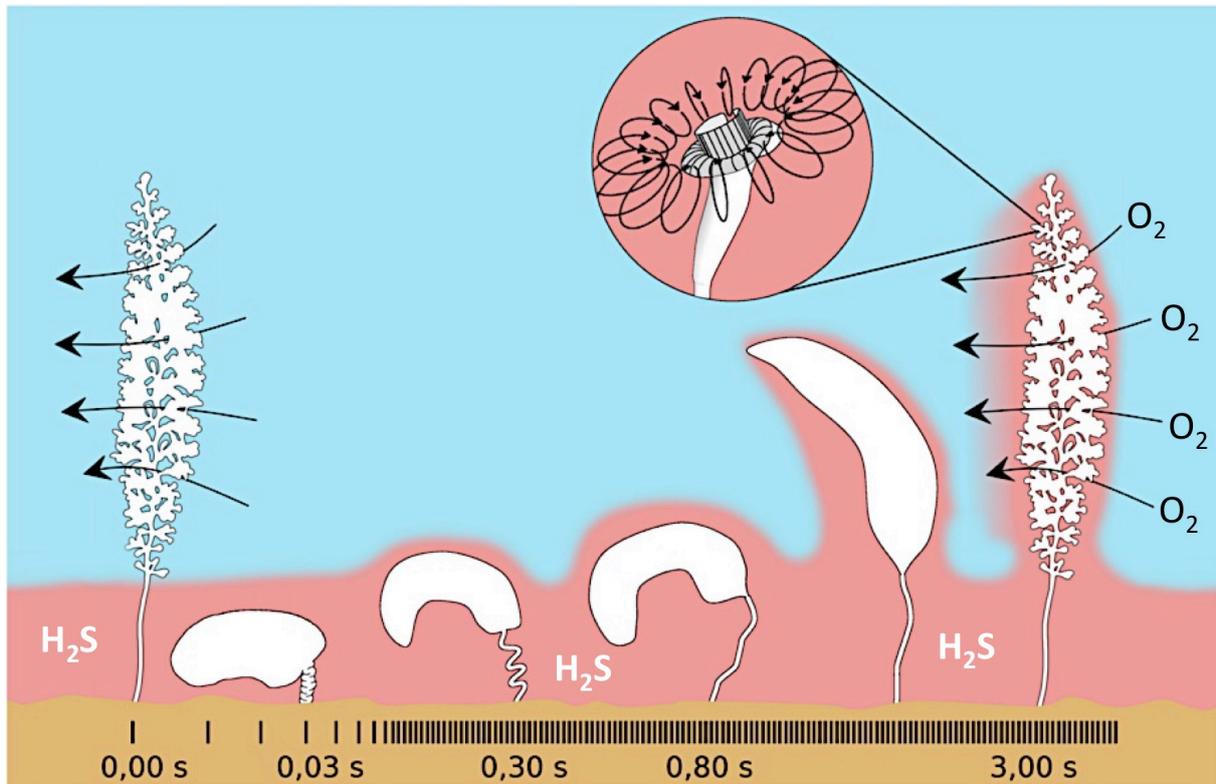
## **2. Les ciliés symbiotiques associés au périphyton des mangroves de Guadeloupe**

Les résultats obtenus par microscopie ont mis en évidence la présence de bactéries symbiotiques associées à plusieurs espèces de ciliés et autres protistes flagellés vivant au niveau des sédiments marins de la lagune de la Manche-à-Eau. Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier les partenaires et de mettre en avant le métabolisme potentiel utilisé par les bactéries symbiotiques. Les bactéries symbiotiques analysées appartiennent à différents groupes de  $\gamma$ -protéobactéries et leurs métabolismes sont basés sur des processus chimiosynthétiques et/ou chimio-organohétérotrophes. Ces micro-organismes vivent à l'interface eau-sédiment et sont donc exposés à la diffusion des sulfures provenant des débris végétaux et du sédiment. Ce dernier constitue également le lieu principal de reminéralisation de la matière organique dominé par des processus hétérotrophes (Bano *et al.*, 1997 ; Kristensen et Suraswadi, 2002 ; Holmer, 2009). Vu les conditions environnementales instables et contraignantes auxquelles sont confrontées ces micro-organismes, la mise en place d'association avec des bactéries pouvant utiliser différents types de métabolismes est un avantage significatif d'un point de vue nutritionnel pour ces espèces par rapport à d'autres espèces de ciliés libres. Ces bactéries peuvent subvenir aux besoins alimentaires de leur hôte et détoxifier l'environnement, permettant ainsi à leur hôte de coloniser de nouvelles niches écologiques (Gast *et al.*, 2009 ; Dziallas *et al.*, 2012). Toutes les espèces de protistes ciliés symbiotiques récoltées dans la lagune de la Manche-à-Eau sont liées au périphyton benthique de mangrove présent à l'interface oxiqne-anoxiqne du sédiment. Bien que seules certaines espèces aient été analysées, il est fort probable que de nombreuses autres associations symbiotiques existent entre des protistes ciliés et des algues unicellulaires, des bactéries ou des archées au sein du périphyton et dans les autres compartiments de l'écosystème comme la colonne d'eau ou les sédiments réduits anoxiques.

### **a. Les ciliés péritriches sessiles et leurs bactéries ectosymbiotiques sulfo-oxydantes**

Les ciliés péritriches sessiles *Zoothamnium niveum* et *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe colonisent la niche écologique située à l'interface oxiqne-anoxiqne des sédiments marins de mangroves, où les gradients de sulfures et d'oxygène évoluent sur quelques millimètres. En dépit de pouvoir se déplacer dans le sédiment comme les espèces du genre *Kentrophoros* (Fenchel et Finlay, 1989 ; Ott *et al.*, 2004a ; Cavanaugh *et al.*, 2006), le

battement des cils des zoïdes mélange efficacement l'eau sulfurée et l'eau oxygénée (Vopel *et al.*, 2001 ; 2002). Les colonies de *Z. niveum* ainsi que les individus de *Pseudovorticella* sp. se contractent à l'intérieur de la couche limite sulfidique (Figure 71) et se décontractent ensuite dans l'eau environnante contenant de l'oxygène (Ott *et al.*, 1998) apportant ainsi les sulfures et l'oxygène nécessaire au métabolisme des bactéries ectosymbiotiques (Polz *et al.*, 2000).



**Figure 71. Phénomène de contraction chez les ciliés péritriches sessiles (Bright *et al.*, 2014).** L'une des caractéristiques facilement observable chez les péritriches sessiles est liée à leur comportement. Dans le cas de *Z. niveum*, la colonie se contracte rapidement à l'intérieur de la couche d'eau sulfurée afin d'apporter les sulfures nécessaires au fonctionnement du métabolisme des ectosymbiotes. Par la suite, la colonie s'étend de nouveau pour apporter l'oxygène nécessaire à l'oxydation des sulfures par ses bactéries ectosymbiotiques. Lorsque la colonie est détendue, le battement des cils des zoïdes provoque des vortex qui vont détacher les bactéries ectosymbiotiques et les entrainer à l'intérieur du péristome des microzoïdes afin d'être ingérées et digérées par la colonie.

Le cycle biologique de *Z. niveum* a été étudié sur plusieurs générations en laboratoire (Ott *et al.*, 2004a ; Rinke *et al.*, 2007). Cependant, c'est la première fois que celui-ci est étudié en milieu naturel. En effet, les différentes formes que prend la colonie lors de sa croissance, après la fixation du swarmer sur son substrat, ont été retrouvés et étudiés durant cette thèse. Les analyses en laboratoire ont montré que lors de la sédimentation des swarmers, chaque individu se transforme en un zoïde terminal qui produit un stolon et commence à se diviser en microzoïdes et en zoïdes terminaux (Rinke *et al.*, 2007). Ces derniers vont par la suite former les ramifications alternées du stolon. Les études en laboratoire ont montré que les colonies peuvent vivre pendant environ 7 jours, avec la perte de microzoïdes des branches

proximales comme signes de sénescence (Figure 72). *Z. niveum* se trouve généralement par groupes de quelques dizaines à plusieurs centaines de colonies. Les petits groupes se composent généralement de jeunes colonies et de nouveaux essaims, tandis que les grands groupes sont composés principalement de colonies sénescentes. Un patch peut subsister pendant plus de 20 jours, comme cela a été déterminé pour une population de Twin Cayes, au Belize (Ott *et al.*, 1998).

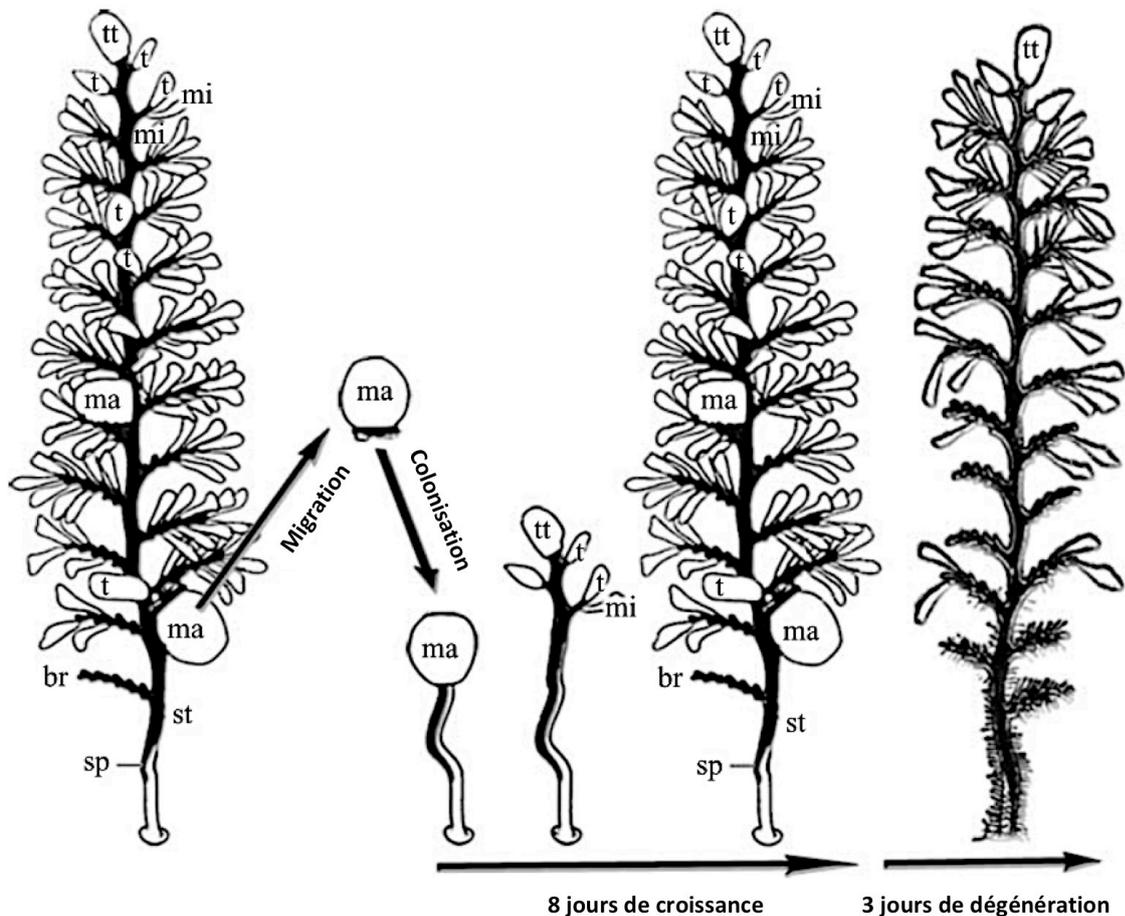


Figure 72. Cycle de vie du cilié colonial péritriche sessile *Zoothamnium niveum* (Rinke *et al.*, 2007). Un macrozoïde quitte la colonie comme un essaim et entre en phase de migration, jusqu'à ce qu'il trouve un substrat adéquat à la colonisation. La jeune colonie se développe rapidement au cours des 8 premiers jours, suivie d'une phase de dégénérescence de 3 jours. La colonie entière se compose d'une tige centrale (st) avec des branches alternatives (br) portant des cellules : macrozoïdes (ma) ; microzoïdes (mi) ; les zoïdes terminaux (t) ; et les zoïdes terminaux supérieurs (tt).

Le stolon contractile présent chez *Z. niveum* et *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe permet à ces organismes de se fixer au substrat et contribue au mélange d'eau de mer oxygène et anoxique au niveau de l'interface sédiment-eau de mer, grâce à des contractions rapides et des extensions lentes (Vopel *et al.*, 2002). L'autre extrémité du stolon soutient un ou plusieurs zoïdes. Le battement des cils péristomiaux des zoïdes va transporter l'eau de mer et permettre la filtration des particules en suspension (Vopel *et al.*, 2002). Les observations menées sur les

individus de *Z. niveum* isolat Guadeloupe récoltés en mangrove ont montré que les bactéries ne colonisaient pas directement le stolon après la fixation du swarmer sur son substrat. En effet, les bactéries ne colonisent le stolon qu'à partir de la formation des premiers microzoïdes. De plus il semblerait que la forme et la disposition des bactéries évoluent en fonction de la croissance de la colonie et de l'apparition de nouveaux zoïdes. Ces résultats suggèrent que le cycle de vie des bactéries est étroitement lié à celui de leur hôte. Le zoïde est le dispositif de filtration de l'organisme, le battement des cils péristomiaux crée un flux d'eau qui forme des vortex toroïdaux qui vont transporter la nourriture à l'intérieur du péristome qui représente la bouche chez ces organismes (Vopel *et al.*, 2001). Cependant chez *Z. niveum*, il semblerait que seules les microzoïdes possèdent un cytopharynx fonctionnel pour l'alimentation (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996a ; 1996b). Des observations microscopiques ont montré la présence de bactéries dans le vestibule correspondant à la cavité buccale et dans les vacuoles alimentaires de *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe et de *Z. niveum* isolat Guadeloupe. Les vacuoles digestives ont été observées au MET dans le zoïde de *Pseudovorticella* sp. et dans les microzoïdes de *Zoothamnium niveum*. La présence de bactéries dans ces différentes parties de ces organismes indique clairement la voie suivie par les bactéries lors de leur ingestion. Les ciliés se nourrissent principalement de bactéries ; les bactéries sont transportées dans le vestibule grâce au flux d'eau créé par les cils et sont ensuite stockées dans des vacuoles alimentaires après avoir traversées le cytostome et le cytopharynx. Le détachement des bactéries ectosymbiotiques se produit principalement pendant la contraction du zoïde et du stolon en raison de la vitesse élevée de l'eau autour du zoïde et du mouvement rapide de la cellule (Vopel *et al.*, 2002). De plus, la contraction du zoïde diminue la surface disponible pour les bactéries, ce qui entraîne un détachement (Vopel *et al.*, 2002). Les bactéries présentes dans les vacuoles alimentaires ne peuvent pas être qualifiées d'endosymbiotes mais sont plutôt le résultat du processus de nutrition dans lequel les bactéries ectosymbiotiques sont ingérées, stockées dans les vacuoles digestives avant d'être digérées. En dépit de leur petit nombre, d'autres bactéries ont été trouvées dans les vacuoles alimentaires de *Pseudovorticella* sp. au cours des observations FISH réalisées sur la base du non-recouvrement de la sonde universelle EUB 338 et des sondes spécifiques utilisées lors de cette étude. Des résultats similaires ont été observés pour *Z. niveum* (Rinke *et al.*, 2007) et *Z. ignavum* (Schuster et Bright, 2016). Ceci n'est pas surprenant car pendant le processus de nutrition, d'autres bactéries présentes dans l'eau environnante peuvent également être piégées dans le vortex produit par le battement des cils. La présence de bactéries ectosymbiotiques dans les vacuoles alimentaires et digestives a également été rapportée chez des protistes

appartenant au genre *Kentrophoros* (Fenchel et Finlay, 1989). La plupart des bactéries contenues dans les vacuoles alimentaires ont les mêmes caractéristiques ultrastructurales que les symbiotes (Bauer-Nebelsick *et al.*, 1996b ; Vopel *et al.*, 2002). Nous avons observé des résultats similaires chez *Pseudovorticella* sp. Les hybridations et observations FISH ont confirmé que les bactéries recouvrant la surface du zoïde et celles présentes dans les vacuoles alimentaires sont les mêmes. Les observations au MET ont montré la présence de granules de soufre situés dans les bactéries présentes dans les vacuoles alimentaires et sur le zoïde de *Pseudovorticella* sp., ainsi que la double membrane caractéristique des bactéries Gram-négatif. Les bactéries présentes dans les vacuoles digestives présentent donc toutes les caractéristiques des ectosymbiotes présents à la surface du zoïde. Bien que l'analyse du métabolisme de ces nouvelles bactéries ectosymbiotiques doit être approfondie, les résultats suggèrent un métabolisme chimiosynthétique sulfo-oxydant chez les ectosymbiotes de cette espèce. La symbiose est donc bénéfique pour les ciliés sessiles qui vivent en mangrove. La culture des ectosymbiotes comme source de nourriture réelle ou l'utilisation des produits dérivés du symbiote pour la nutrition leur assure une complète autonomie alimentaire (Gast *et al.*, 2009). D'après des études récentes effectuées sur *Zoothamium niveum* par radiomarquage au carbone  $^{13}\text{C}$  et  $^{14}\text{C}$  et visualisation du transfert de ce dernier par NanoSims, il semblerait que la digestion des bactéries ectosymbiotiques, le transfert et l'assimilation des molécules organiques produites par chimiosynthèse par les symbiotes soutiennent les besoins en carbone de l'hôte (Volland *et al.*, 2018). Les symbiotes bénéficient du comportement de l'hôte en accédant aux donneurs d'électrons et aux accepteurs pour la chimiosynthèse et l'hôte bénéficie du carbone organique libéré par les cellules symbiotiques (Bright *et al.*, 2014 ; Volland *et al.*, 2018). De plus il semblerait que la libération de carbone fixé à l'hôte ne soit contrôlée ni par le symbiote ni par l'hôte. En outre, la digestion des bactéries symbiotiques par les cellules hôtes contribue considérablement à l'alimentation de l'hôte et peut également aider à contrôler la densité de population des ectosymbiotes. Un tel contrôle pourrait être important pour l'hôte pour éviter d'être envahi par son symbiote et suffoquer (Volland *et al.*, 2018). La présence d'une monocouche symbiotique parfaite sur la surface du cilié indique un couplage étroit de la croissance de l'hôte et du symbiote (Bright *et al.*, 2014) alimenté par le comportement autotrophique du symbiote. Les analyses menées durant cette thèse sur la forme et la disposition des bactéries au cours de la croissance de leur hôte abondent également dans ce sens. La façon dont la symbiose est maintenue durant les différentes conditions environnementales et la contribution réelle de la digestion et du transfert de carbone aux besoins de l'hôte sont des sujets qui restent encore à étudier. Cela permettrait de comprendre

comment les swarmeres dépourvus de cytopharynx et de vacuoles digestives obtiennent l'énergie nécessaire pour la croissance de la colonie après leur fixation sur de nouveaux substrats. Etant dépourvus de microzoïdes et donc de système digestif fonctionnel, la croissance de la colonie doit être fortement tributaire du carbone organique libéré par les ectosymbiotes.

## **b. Les ciliés mobiles symbiotiques présents dans le périphyton des mangroves de Guadeloupe**

En ce qui concerne *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe et *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe, ils ont été récupérés à partir d'un biofilm constitué de nombreux micro-organismes qui a été obtenu grâce à la reconstitution de deux systèmes sulfidiques côtiers artificiels fonctionnant selon les mêmes principes que les whale- et wood falls. À la différence de ces derniers, nous avons essayé d'isoler nos systèmes artificiels de la production de sulfures provenant du sédiment. Ainsi la production et la diffusion des sulfures sont générées uniquement par les processus de dégradation de la matière organique (lipides et cellulose) des branches de *R. mangle* ou des os déposés sur les grilles de notre système artificiel. Cette production de sulfure est effectuée par des bactéries sulfato-réductrices vivant dans des conditions anaérobies à l'intérieur des os et des débris végétaux qui vont utiliser les sulfates présents dans l'eau de mer pour produire de l' $H_2S$ . Cet enrichissement en sulfures va permettre le développement d'une communauté de micro-organismes chimiosynthétiques qui, dans notre étude, va former un biofilm bactérien composés principalement d' $\epsilon$ -protéobactéries du genre *Thiovolum*, de d'autres bactéries sulfo-oxydantes libres dont certaines comme les *Beggiatoa* sont filamenteuses, et de plusieurs autres bactéries marines. Des diatomées, des crustacés ainsi que des nématodes étaient également présents à l'intérieur du biofilm.

Les ciliés appartenant à la sous classe des Cytrophia sont une composante importante du périphyton dans les milieux aquatiques (Pan *et al.*, 2013). Les analyses phylogénétiques effectuées sur les potentielles bactéries endosymbiotiques de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe ont montré que les bactéries présentes dans le cytoplasme du cilié appartiennent au genre *Umboniibacter*. Ce genre de bactéries appartient aux  $\gamma$ -protéobactéries chimio-organohétérotrophes strictement aérobies (Romanenko *et al.*, 2010 ; Sung *et al.*, 2015). Bien que certaines des souches ne soient pas capables de dégrader les polysaccharides les plus complexes, ces bactéries sont apparentées aux bactéries des genres *Endozoicomonas*, *Microbulbifer*, *Saccharophagus*, *Simiduia* et *Teredinibacter*, dont le métabolisme est basé sur

la dégradation des molécules carbonées (Romanenko *et al.*, 2010 ; Sung *et al.*, 2015). L'espèce bactérienne *Endozoicomonas elysicola* (Kurahashi et Yokota, 2007) a, comme l'espèce *Umboniibacter marinipuniceus* (Romanenko *et al.*, 2010), été isolée initialement à partir d'un mollusque gastéropode marin. Des bacilles sont également couramment détectées dans l'intestin postérieur des détritivores de mangrove (Harris, 1993). La bactérie cellulolytique endosymbiotique *Teredinibacter turnerae* (Distel *et al.*, 2002) a été prélevée dans le tissu des branchies des tarets (par exemple, de *Lyrodus pedicellatus*) qui dégradent les bois coulés en mangrove. Ces bactéries sont capables de croître avec la cellulose comme seule source de carbone et sont capables de fixer l'azote. Bien que les analyses réalisées ne permettent pas d'identifier complètement les différentes bactéries présentes à l'intérieur du cytoplasme de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe, la présence de bactéries organo-chimiohétérotrophiques du genre *Umbonnibacter* pouvant potentiellement dégrader des glucides comme la cellulose et/ou les lipides peut présenter des avantages importants dans ce milieu dominé par les processus hétérotrophes. Cependant les analyses menées durant cette thèse ne permettent pas de savoir si *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe peut tirer un bénéfice de ces bactéries. Très peu de bactéries ont pu être observées à l'intérieur des vacuoles digestives de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe. Pourtant, la présence de séquences proches des bactéries sulfo-oxydantes identifiées comme *Thiovolum* sp. strain karukerense parmi le lot de séquences obtenues par clonage, la forte densité de cette bactérie dans le biofilm ainsi que la présence de grains de soufre comme déchets dans certaines vacuoles digestives du cilié laissent suggérer que *Trochochilodon* sp. s'alimente de préférence sur les biofilms composés en grande partie de bactéries sulfo-oxydantes comme *Thiovolum* sp. strain karukerense mais également de d'autres bactéries présentes au sein du périphyton.

Dans le cas de *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe, la présence de zones blanches à l'intérieur du cytoplasme des bactéries ectosymbiotiques suggèrent que ces bactéries sont potentiellement des bactéries sulfo-oxydantes. Cependant, des analyses supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Ces bactéries ectosymbiotiques pourraient lui permettre de subvenir à ses besoins en carbone de la même façon que les bactéries ectosymbiotiques des ciliés péritriches sessiles ou de *Kentrophoros* sp. Ces bactéries peuvent également permettre la détoxification du milieu en H<sub>2</sub>S, conférant ainsi à *Dysteria* sp. isolat Guadeloupe un gros avantage par rapport aux espèces non symbiotiques. D'autres espèces appartenant au genre *Dysteria* ont été décrites en association symbiotique avec des bactéries (Figure 73), dont l'espèce la plus proche *D. brasiliensis* (Gong *et al.*, 2007). Cependant, les

symbioses impliquant ces espèces de ciliés et les bactéries ectosymbiotiques observées n'ont pas été étudiées. De plus, les séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries ectosymbiotiques n'ont jamais été amplifiées, ni analysées. De ce fait, les analyses microscopiques réalisées constituent une information non négligeable concernant le métabolisme potentiel de ces bactéries ectosymbiotiques.

Les ciliés Cyrtophoridés possèdent un panier cytopharyngé complexe (dans certains cas avec des capitules ressemblant à des dents) composé notamment de filaments de microtubules (Capriulo *et al.*, 2013). Ce panier est alternativement dilaté et resserré par torsion des individus, ce qui permet à ces ciliés de casser ou plier des morceaux de chaînes bactériennes, algales ou cyanobactériennes (Nisbet, 1984). Les espèces de ciliés Cyrtophoridés sont connues pour se nourrir de bactéries sulfo-oxydantes comme les bactéries filamenteuses du genre *Beggiatoa* et les bactéries du genre *Thiovolum* (Fenchel, 1968). D'autres organismes de la méiofaune s'alimentent également des bactéries filamenteuses du genre *Beggiatoa* qui forment des mattes à la surface des sédiments marins de mangrove (Pascal *et al.* en 2014). Cependant, il semblerait que chez les nématodes, les copépodes, les rotifères et les plathelminthes analysés, les bactéries sulfo-oxydantes du genre *Beggiatoa* ne contribuent que très peu à leur alimentation alors qu'elles semblent occuper une place importante dans celle des protistes ciliés Cyrtophoridés. Il semblerait également que les bactéries du genre *Beggiatoa* ne contribuent que très peu à l'alimentation de certaines espèces de protistes ciliés comme les vorticelles recueillies dans les mattes (Pascal *et al.*, 2014). D'après les analyses effectuées durant cette thèse, il semblerait que les ciliés péritriches sessiles ne se nourrissent presque exclusivement que de leurs bactéries ectosymbiotiques, ce qui peut expliquer les résultats obtenus par Pascal *et al.* en 2014. La consommation des bactéries filamenteuses est plus facile pour les ciliés Cyrtophoridés qui ont développé des structures buccales leur permettant de casser les filaments bactériens et qui sont donc plus adaptés que les vorticelles pour s'alimenter sur ces substrats (Capriulo *et al.*, 2013). Ces protistes ciliés peuvent servir par la suite de proies pour les organismes de la méiofaune présents dans ces mattes et biofilms, comme les copépodes ou les rotifères, permettant ainsi le transfert de la biomasse bactérienne au niveau trophique supérieur. Il semblerait donc que les protistes ciliés présents au niveau des biofilms et mattes en mangroves soient très bien adaptés aux conditions difficiles du milieu. Ces espèces ont développé des stratégies différentes pour pouvoir subvenir à leur besoin alimentaire. Certaines espèces ont développé des associations symbiotiques avec des bactéries sulfo-oxydantes afin de survivre aux conditions du milieu et

cultivent leurs symbiotes pour s'en nourrir. D'autres espèces ont développé des adaptations morphologiques qui leur permettent de se nourrir spécifiquement de bactéries sulfo-oxydantes libres qui ne font pas parties (ou très peu) du régime alimentaire des autres protistes et organismes de la méiofaune.

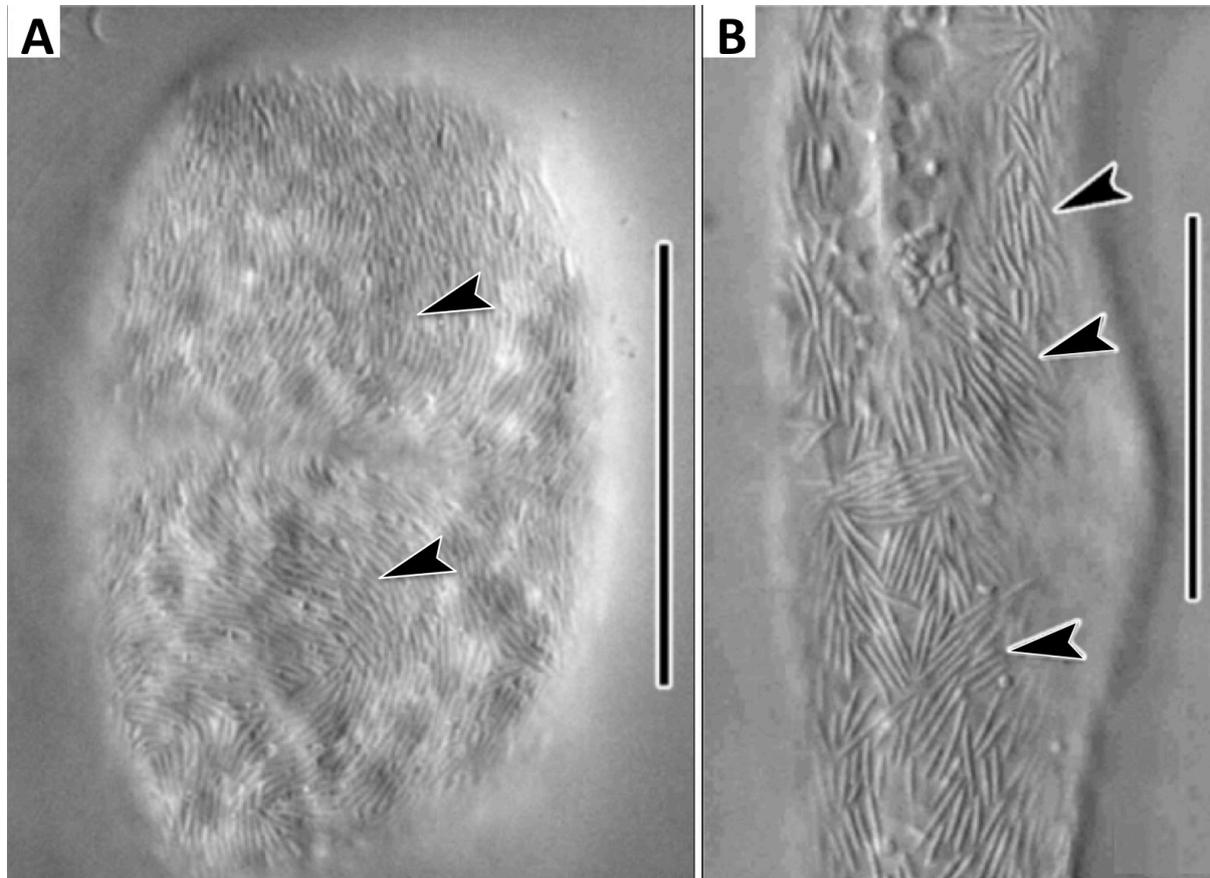
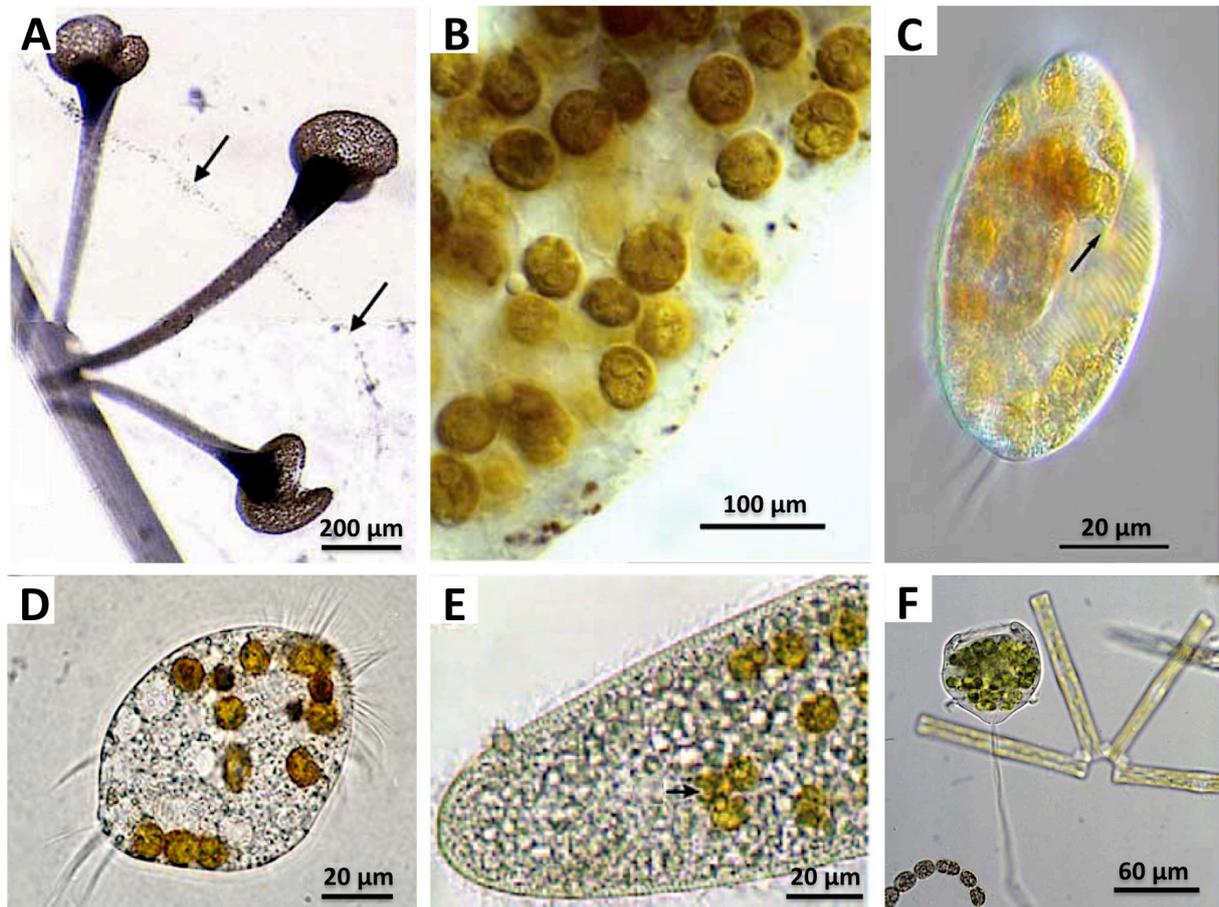


Figure 73. Observations microscopiques des espèces symbiotiques appartenant au genre *Dysteria* (Gong *et al.*, 2007). (A) *Dysteria crassipes* et (B) *Dysteria brasiliensis* deux espèces morphologiquement différentes appartenant au périphyton présentent également des bactéries ectosymbiotiques (têtes de flèches) généralement localisées sur la partie dorsale de leur cellule.

### C. D'autres symbiotes potentiels chez les protistes ciliés des mangroves de Guadeloupe ?

Grâce à leur alimentation basée sur la mixotrophie, les ciliés peuvent également réaliser la photosynthèse. Pour ce faire ils peuvent ingérer de potentiels symbiotes photosynthétiques ou alors séquestrer leurs chloroplastes par kleptoplastie et les utiliser pour fixer le CO<sub>2</sub> (Esteban *et al.*, 2010 ; Germond et Nakajima, 2016). Les symbioses algales sont moins fréquentes chez les ciliés marins comparativement aux ciliés d'eau douce (Anderson, 2014). Cependant, la kleptoplastie est plus largement documentée chez les ciliés marins (Lindholm et Mörk, 1989 ; Stoecker *et al.*, 2009 ; Anderson, 2014). La mixotrophie fournit aux ciliés des

sources de nutrition supplémentaires ce qui réduit leur dépendance à l'égard de la consommation de proies autotrophes (Anderson, 2014). Les endosymbiotes sont principalement eucaryotes et fournissent des nutriments à l'hôte par photosynthèse (Germond et Nakajima, 2016). Dans de nombreux cas, l'hôte dépend encore de l'absorption de nourriture pour vivre, cependant, lorsqu'il est en déficit nutritionnel, l'activité photosynthétique des cellules symbiotiques soutient et prolonge la survie des hôtes (Germond et Nakajima, 2016). Ceci explique en partie le succès écologique de telles associations mixotrophes dans des environnements aux ressources alimentaires limitées (Germond et Nakajima, 2016). Dans les environnements marins, les micro-algues endosymbiotiques sont largement représentées par les algues zooxanthelles (différents génotypes de *Symbiodinium*) qui habitent l'environnement intracellulaire des invertébrés, des radiolaires, des foraminifères et des ciliés (Germond et Nakajima, 2016). Cependant, seulement trois espèces de ciliées contenant des zooxanthelles endosymbiotiques ont été décrites à ce jour (Figure 74): *Maristentor dinoferus* (Lobban *et al.*, 2002), *Paraeuplotes tortugensis* (Wichterman, 1942) et *Euplotes uncinatus* (Lobban *et al.*, 2005). *Maristentor dinoferus* est un grand cilié, qui développe des associations mutualistes avec les coraux, et héberge de 500 à 800 symbiotes de *Symbiodinium* par cellule (Lobban *et al.*, 2002). Au contraire, certains ciliés comme *Euplotes* peuvent se nourrir des tissus coralliens et acquérir les dinoflagellés endosymbiotiques du corail. Les symbiotes dinoflagellés qui vivent habituellement dans les coraux sont également actifs sur le plan photosynthétique chez les organismes ciliés. D'autres symbiotes photosynthétiques associés à des ciliés marins ont également été décrits entre une bactérie pourpre capable de photosynthèse anoxygénique chez *Strombidium purpureum* (Fenchel et Bernard, 1993), et des cyanobactéries chez *Codonella* sp. (Foster *et al.*, 2006b ; Esteban *et al.*, 2010). De potentiels endosymbiotes cyanobactériens ont également été décrits à l'intérieur d'une colonie (tétraglucellose) inhabituelle de cercozoaires (*Auranticordis quadri verberis*) isolé à partir d'échantillons de sable interstitiel marin (Chantangsi *et al.*, 2008).



**Figure 74. Plusieurs protistes ciliés marins en association avec des micro-algues endosymbiotiques. (A) *Maristentor dinoferus* possède des zooxanthelles du genre *Symbiodinium* (B) dans son cytoplasme. Les flèches montrent le mucus libéré par les cellules du protozoaire (Lobban *et al.*, 2002). Le cilié *Euplotes uncinatus* (C) possède également des zooxanthelles dans son cytoplasme. Après 3 jours d'obscurité (D), le nombre d'algues endosymbiotiques dans le cytoplasme a fortement diminué. La flèche montre la cavité buccale du cilié qui se termine en forme d'hameçon (Lobban *et al.*, 2005). Alors que les ciliés des genres *Maristentor* et *Euplotes* sont relativement inoffensifs pour le corail, certaines espèces comme les scuticociliates (E) s'attaquent aux coraux et peuvent causer la maladie de la bande marron. La flèche indique la présence de micro-algues symbiotiques présentes dans le cytoplasme du cilié (Bourne *et al.*, 2008). (F) Les espèces appartenant au genre des Vorticellidae sont des ciliés mixotrophes qui peuvent s'associer aussi bien avec des micro-algues endosymbiotiques qu'avec des bactéries chimiosynthétiques (Esteban *et al.*, 2010).**

Les organismes protistes peuvent également avoir leurs propres chloroplastes fonctionnels. La kleptochloroplastie, également appelée «kleptoplastie», ou rétention des organites, est la capacité d'un organisme hétérotrophique à séquestrer des chloroplastes fonctionnels à partir de proies algales (Gustafson Jr *et al.*, 2000). Dans de nombreux cas, les chloroplastes fonctionnels proviennent de cryptophytes et d'haplophytes (Jones, 1994) et doivent être constamment renouvelés. La fréquence du renouvellement varie selon les espèces et les conditions environnementales, et le chloroplaste peut durer de quelques heures à quelques jours à l'intérieur du cytoplasme de l'hôte (Dolan, 1992). Souvent, les protistes porteurs de chloroplastes dépendent encore d'une autre source de nourriture en plus de la lumière, pour la croissance. Par conséquent, le régime mixotrophique varie de la phototrophie à l'hétérotrophie, selon la quantité de chloroplastes que l'organisme utilise (Jones, 1994). La

kleptochloroplastie est répandue parmi les ciliés marins planctoniques tels que *Strombidium* sp., *Prorodon* sp. et *Mesodinium rubrum*. *Mesodinium rubrum*, par exemple, est un cilié connu pour former des marées rouges côtières (Figure 75). Il acquiert des chloroplastes à partir de proies cryptophytes et les chloroplastes peuvent être conservés pendant au moins 12 mois (Gustafson *et al.*, 2000).

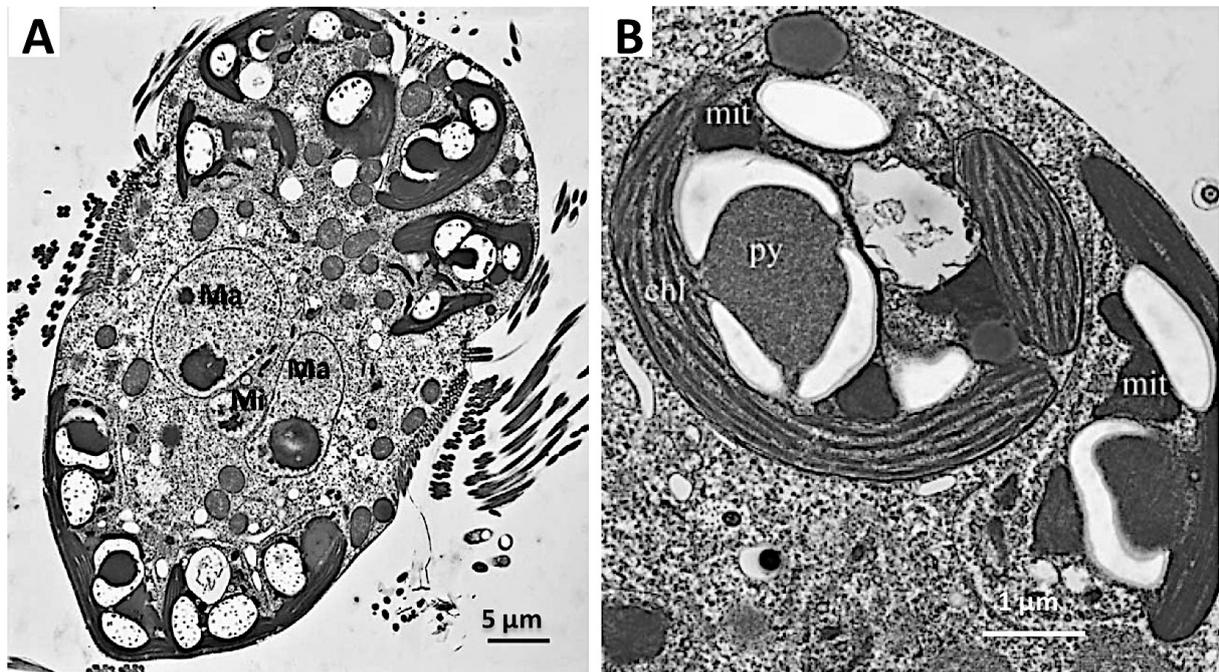


Figure 75. Observations au microscope électronique à transmission d'une cellule de *Mesodinium rubrum* (A et B) montrant le micronoyau (Mi) et les deux macronoyaux (Ma), les chloroplastes (Chl) obtenu par kleptochloroplastie ainsi que des granules d'amidon, des mitochondries (mit) et des pyrénoides (py) (Hansen et Fenchel, 2006)

La Manche-à-eau est une petite lagune au sein d'un écosystème complexe de mangrove associée au lagon et à la barrière de corail du Grand Cul de sac Marin. L'échantillonnage a été restreint aux ciliés symbiotiques présents à la surface des sédiments marins de la Manche-à-Eau. Cependant, la lagune est susceptible d'héberger plus de ciliés en association avec des symbiotes photosynthétiques que les environnements pélagiques. En effet, les mangroves sont des environnements dynamiques où les sédiments, l'eau de mer et l'eau douce provenant des bassins versants se mélangent. Les changements dans les propriétés physiques, chimiques, et microbiologiques entre l'eau douce et les environnements marins côtiers adjacents se produisent sur de courts laps de temps, poussés par les marées et les courants d'eau douce qui créent une pression abiotique intense qui influe sur la composition des communautés bacterio-planctoniques (Crump *et al.*, 1999 ; Bouchez *et al.*, 2013). Les communautés phytoplanctoniques sont composées d'espèces autochtones permanentes ou temporaires et allochtones issues des écosystèmes adjacents continentaux ou océaniques (Guiral, 1999). Les peuplements sont généralement dominés par le nanoplancton (le microplancton

principalement représenté par des diatomées ne constituant en général que 15 % du phytoplancton total), présentent des variations temporelles de biomasse très importantes (Guiral, 1999). Bien que les biomasses phytoplanctoniques et phytobenthiques soient généralement faibles et limitées par la disponibilité de l'énergie lumineuse. La colonne d'eau est homogène et bien mélangée dans la lagune de la Manche-à-Eau (Mantran *et al.*, 2008) ce qui favorise la pénétration de la lumière une grande partie de l'année. D'autres organismes comme la méduse *Cassiopea* que l'on peut observer en mangrove possèdent des zooxanthelles comme endosymbiotes dans ses tentacules. La présence de bactéries pourpres non sulfureuses (Gros *et al.*, 2018) et de nombreuses cyanobactéries dans le périphyton présent à la surface des sédiments marins, ainsi que d'espèces phytoplanctoniques provenant aussi bien d'écosystèmes d'eau douce que marins, est un des facteurs qui peut soutenir la présence de ce type d'association dans la lagune de la Manche-à-Eau. D'autre part, toutes les espèces de ciliés étudiées ici sont hétérotrophes et sont donc susceptibles d'ingérer du phytoplancton et/ou des bactéries. Enfin la pauvreté en nutriment et les contraintes que subissent les micro-organismes en mangrove ne peuvent que favoriser l'émergence d'associations symbiotiques entre des ciliés et des micro-organismes autotrophes dans cet écosystème.

## **Chapitre 4. Conclusion et perspectives**

Les analyses menées durant cette étude ont permis d'identifier 4 espèces de protistes ciliés vivant en association symbiotique avec des bactéries chimio-organohétérotrophes ou chimiosynthétiques dans l'écosystème de mangrove de Guadeloupe. De nombreuses autres espèces de protistes, dont majoritairement des ciliés et probablement des flagellés ont également pu être observées, mais n'ont malheureusement pas pu faire l'objet d'études plus poussées par manque de temps et/ou d'expertise. Dans tous les cas, une analyse plus approfondie des différents partenaires ainsi que le métabolisme des potentiels symbiotes bactériens est nécessaire pour pouvoir identifier et caractériser correctement les partenaires ainsi que les interactions symbiotiques ayant lieu entre les organismes récoltés. Les espèces péritriches sessiles vivent fixées à la surface des débris végétaux présents dans la couche d'eau oxygène-anoxique entre l'eau de mer et le sédiment et sont exposés à la diffusion de sulfures provenant de l'intérieur du sédiment de mangrove et des débris végétaux. Leurs bactéries symbiotiques sont différentes d'une espèce à l'autre, cependant dans tous les cas elles sont utilisées comme source de nutrition par leur hôte, qui en contrepartie leur apporte

les substrats nécessaires à leur métabolisme mais également un habitat dépourvu de compétition. Ces espèces de ciliés sessiles sont également décrites comme ectoparasites commensaux d'espèces de vertébrés et d'invertébrés marins. Plusieurs espèces du genre *Vorticella* ont également été décrites dans des environnements eutrophiques favorisant la photosynthèse. Dans ce cas ces ciliés péritriches sessiles se retrouvent alors associées à des algues unicellulaires photosynthétiques au lieu de bactéries ectosymbiotiques chimiosynthétiques. C'est également le cas chez la majorité des protistes ciliés mixotrophes évoluant dans la colonne d'eau et faisant partie du microzooplancton (Esteban *et al.*, 2010). Il semblerait donc que ces espèces et notamment les Vorticellidae soient capables de sélectionner leur symbiotes (eucaryotes ou procaryotes) en fonction du métabolisme le plus propice et adapté aux conditions environnementales. Ceci peut être un avantage intéressant de par leur mode de vie sessile. Cette capacité leur permet de coloniser de nouveaux habitats dont certains écosystèmes chimiosynthétiques comme les « wood falls » et les sédiments marins réduits de mangrove.

D'autres études portant sur l'identification des espèces de ciliées symbiotiques et libres présentes dans les différents compartiments de la partie marine des mangroves sont donc nécessaires et devrait permettre l'identification des espèces vivant dans les conditions oxiques de la colonne d'eau et anoxiques du sédiment, ainsi qu'à l'interface oxique-anoxique entre la colonne d'eau et le sédiment. Cet inventaire diagnostique devrait permettre de révéler la véritable diversité des ciliés symbiotiques présents dans les mangroves de Guadeloupe. Une solution existe pour pouvoir obtenir un maximum de séquences appartenant aux différentes espèces de protistes présents dans les différents compartiments (colonne d'eau, périphyton, et sédiment) de la lagune, dont les ciliés. Pour se faire, des études métagénomiques sont nécessaires. Les séquences obtenues grâce à cette technique pourraient permettre d'identifier rapidement les différentes espèces de protistes présentes dans le microzooplancton de la colonne d'eau, au niveau du périphyton et dans les sédiments, mais également de révéler leurs densités et leurs proportions relatives dans chaque compartiment. Cependant, cette technique ne permet pas de détecter les bactéries symbiotiques. Seules des analyses microscopiques associées à des techniques de génétiques et de biologie moléculaires permettent de détecter et de déterminer s'il y a réellement une symbiose entre deux partenaires. En ce qui concerne les protistes du périphyton, la mise en place de système artificiel recréant les conditions chimiosynthétiques comme ceux utilisés dans cette étude s'avèrent être une bonne stratégie d'échantillonnage. Ces systèmes artificiels permettent de concentrer et d'attirer de

nombreuses bactéries fortement concentrées au sein des biofilms qui vont attirer et faire figures de proies pour les prédateurs opportunistes comme les espèces de ciliés Cyrtophoria. Les ciliés Cyrtophoria ont été décrites dans la littérature comme faisant partie du périphyton, et sont donc, au même titre que les autres micro-organismes vivant à la surface du sédiment, confrontées aux émissions de sulfures toxiques pour la majorité des organismes. Cependant à l'inverse des ciliés péritriches sessiles, les espèces récoltées peuvent se déplacer et sont donc capables d'échapper à ces conditions extrêmes. Les analyses effectuées durant cette étude nous apportent un peu plus d'informations concernant le mode de vie de ces organismes. En effet, les échantillons de biofilms contenant ces espèces, ont été récupérés à plusieurs centimètres de la surface du sédiment ce qui prouve leur capacité à évoluer également dans la colonne d'eau. Les bactéries rassemblées à l'intérieur du biofilm semblent avoir servies d'appâts à ces prédateurs qui semblent être relativement opportunistes. La présence de bactéries endosymbiotiques chimio-organohétérotrophes du genre *Umbonnibacter* dans le cas de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe, pouvant potentiellement lui permettre de dégrader différents types de matière organique, peut être un avantage majeur dans cet environnement de mangrove. En ce qui concerne les ectosymbiotes de *Dysteria* sp., il semblerait que les bactéries qui recouvrent la partie dorsale du cilié soient des bactéries sulfoxydantes mais des études phylogénétiques sont encore nécessaires pour pouvoir s'en assurer. Bien que des bactéries ectosymbiotiques aient été détecté auparavant dans d'autres études, les relations symbiotiques pouvant intervenir entre ces partenaires n'avaient pas été plus approfondies. Les analyses effectuées dans cette étude permettent donc de mieux comprendre le mode de vie de cette espèce. Ces résultats viennent confirmer l'importance que représentent les symbioses, mais plus précisément les symbioses entre protistes ciliés et bactéries au sein de cet écosystème sulfidique côtier. Malheureusement seuls les protistes ciliés présents au sein du périphyton ou associés à celui-ci ont été étudiés. La mise en place d'échantillonnage dans d'autres compartiments de l'écosystème permettrait de détecter d'autres types de symbioses. Par exemple, des bactéries ectosymbiotiques sulfato-réductrices et/ou des archées méthanogènes ont déjà été détectées chez des espèces de ciliés vivant dans les sédiments marins anoxiques réduits. Les archéobactéries méthanogènes ont été décrites comme étant saisonnièrement abondante dans les sédiments où dominent les espèces d'*Avicennia*, qui sont localisées derrière la ceinture de *R. mangle* qui borde le littoral en Guadeloupe. Un échantillonnage des ciliés présents dans le sédiment et des études microscopiques approfondies pourraient révéler la présence de symbioses méthanogènes. D'autre part, grâce à l'hydrodynamisme de la Manche-à-Eau, la colonne d'eau est généralement homogène et bien

oxygénée. Ces conditions stables peuvent favoriser le développement de phytoplancton, il est donc fort probable de retrouver des espèces de protistes ciliés associées à des micro-algues dans la colonne d'eau ou faisant partie du Boestrichyum. Dans tous les cas, les conditions environnementales et les différents types de métabolismes utilisés par les micro-organismes dans les différents compartiments de cet écosystème sont des paramètres qui ne peuvent que favoriser la mise en place de symbioses mutualistes dont des symbioses entre protistes ciliés et bactéries.

## **Bibliographie**

- Abdallah, V. D., De Azevedo, R. K., and Da Silva, R. J. 2011. First record of an epibiont protozoan *Epistylis* sp. (Ciliophora, Peritrichia) attached to *Amplexibranchius bryconis* Thatcher & Paredes, 1985 (Copepoda, Ergasilidae) from Peixe's River, state of São Paulo, Brazil. *Crustaceana* 84:1139–1144.
- Abouna, S., Gonzalez-Rizzo, S., Grimonprez, A., and Gros, O. 2015. First Description of Sulphur-Oxidizing Bacterial Symbiosis in a Cnidarian (Medusozoa) Living in Sulphidic Shallow-Water Environments. *Plos One* 10:e0127625.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., Mccourt, R. M., Mendoza, L., Moestrup, Ø., Mozley-Standridge, S. E., Nerad, T. A., Shearer, C. A., Smirnov, A. V., Spiegel, F. W., and Taylor, M. F. J. R. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52:399–451.
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. Le, Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A., and Spiegel, F. W. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59:429–493.
- Agamaliyev, F. G. 1983. Ciliates of the Caspian Sea: systematics, ecology, zoogeography. Nauka, Leningrad (in Russian).
- Aharon, P. 2000. Microbial processes and products fueled by hydrocarbons at submarine

- seeps. Pages 270–281 *Microbial Sediments*. Springer.
- Al-Rasheid, K. A. S. 1997. Records of free-living ciliates in Saudi Arabia. III. Marine interstitial ciliates of the Arabian Gulf Island of Tarut. *Arab Gulf Journal of Scientific Research* 15:733–766.
- Alongi, D. M. 1988. Bacterial productivity and microbial biomass in tropical mangrove sediments. *Microbial ecology* 15:59–79.
- Alongi, D. M. 2002. Present state and future of the world's mangrove forests. *Environmental Conservation* 29:331–349.
- Alongi, D. M. 2008. Mangrove forests: Resilience, protection from tsunamis, and responses to global climate change. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76:1–13.
- Alongi, D. M., Christoffersen, P., and Tirendi, F. 1993. The influence of forest type on microbial-nutrient relationships in tropical mangrove sediments. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 171:201–223.
- Alongi, D. M., and Sasekumar, A. 1993. Benthic Communities. Pages 137–171 *Tropical mangrove ecosystems*.
- Alongi, D. M., Sasekumar, A., Tirendi, F., and Dixon, P. 1998. The influence of stand age on benthic decomposition and recycling of organic matter in managed mangrove forests of Malaysia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 225:197–218.
- Alonso, M. C., Rodriguez, V., Rodriguez, J., and Borrego, J. J. 2000. Role of ciliates, flagellates and bacteriophages on the mortality of marine bacteria and on dissolved-DNA concentration in laboratory experimental systems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 244:239–252.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devereux, R., and Stahl, D. A. 1990. Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Applied and Environmental Microbiology* 56:1919–1925.
- Amann, R., Springer, N., Ludwig, W., Görtz, H.-D., and Schleifer, K.-H. 1991. Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. *Nature* 351:161.
- Andersen, F. O., and Kristensen, E. 1988. Oxygen microgradients in the rhizosphere of the mangrove. *Marine Ecology* 44:201–204.

- Andersen, R. A. 1996. Algae. Pages 29–64 in Belt, A. B. T., editor. *Maintaining Cultures for Biotechnology and Industry*. Academic Press, New York, NY.
- Andersen, R. A. 1998. What to do with Protists? *Australian systematic botany society* 11:185–201.
- Anderson, A. E. 1995. Metabolic responses to sulfur in lucinid bivalves. *Integrative and Comparative Biology* 35:121–131.
- Anderson, O. R. 2005. Laboratory and Field - based Studies of Abundances, Small - scale Patchiness, and Diversity of Gymnamoebae in Soils of Varying Porosity and Organic Content: Evidence of Microbiocoenoses. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 49:17–23.
- Anderson, O. R. 2014. Living together in the plankton: A survey of marine protist symbioses. *Acta Protozoologica* 53:29–38.
- Arndt, C., Gaill, F., and Felbeck, H. 2001. Anaerobic sulfur metabolism in thiotrophic symbioses. *The Journal of experimental biology* 204:741–750.
- Arndt, H. 1993. A critical review of the importance of rhizopods (naked and testate amoebae) and actinopods (Heliozoa) in lake plankton. *Marine Microbial Food Webs* 7:3–29.
- Azam, F., Fenchel, T., Field, J. G., Gray, J. S., Meyer-Reil, L. A., and Thingstad, F. 1983. The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine ecology progress series* 10:257–263.
- Azevedo, R. K., Brandão, H., Abdallah, V. D., and Silva, R. J. da. 2014. First record of an epibiont protozoan *Epistylis* sp. (Ciliophora, Peritrichia) attached to *Ergasilus chelanguatus* (Ergasilidae) in Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 74:460–463.
- Bano, N., Nisa, M. U., Khan, N., Saleem, M., Harrison, P. J., Ahmed, S. I., and Azam, F. 1997. Significance of bacteria in the flux of organic matter in the tidal creeks of the mangrove ecosystem of the Indus River delta, Pakistan. *Marine Ecology Progress Series* 157:1–12.
- Baretta, J. W., Ebenhoh, W., and Ruardij, P. 1995. The european regional seas ecosystem model, a complex marine ecosystem model. *Netherlands Journal of Sea Research* 33:233–246.
- De Bary, A. 1879. *Die erscheinung der symbiose*. Verlag von Karl J. Trübner.
- Bauer-Nebelsick, M., Bardele, C. F., and Ott, J. A. 1996a. Redescription of *Zoothamnium*

- niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg, 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *European Journal of Protistology* 32:18–30.
- Bauer-Nebelsick, M., Bardele, C. F., and Ott, J. A. 1996b. Electron microscopic studies on *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *European Journal of Protistology* 32:202–215.
- Behnke, A., Bunge, J., Barger, K., Breiner, H., Alla, V., and Stoeck, T. 2006. Microeukaryote Community Patterns along an O<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>S Gradient in a Supersulfidic Anoxic Fjord (Framvaren, Norway)†. *Applied and Environmental Microbiology* 72:3626–3636.
- Beier, C. L., Horn, M., Michel, R., Schweikert, M., Görtz, H.-D., and Wagner, M. 2002. The genus *Caedibacter* comprises endosymbionts of *Paramecium* spp. related to the Rickettsiales (Alphaproteobacteria) and to *Francisella tularensis* (Gammaproteobacteria). *Applied and environmental microbiology* 68:6043–6050.
- Benner, R., and Hodson, R. E. 1985. Microbial degradation of the leachable and lignocellulosic components of leaves and wood from *Rhizophora mangle* in a tropical mangrove swamp Microbial degradation of the leachable and lignocellulosic components of leaves and wood swamp. *Marine Ecology Progress Series* 23:221–230.
- Berg, C. J., and Alatalo, P. 1984. Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture. *Aquaculture* 39:165–179.
- Bernhard, J. M., Buck, K. R., and Barry, J. P. 2001. Monterey Bay cold-seep biota: Assemblages, abundance, and ultrastructure of living foraminifera. *Deep-Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 48:2233–2249.
- Bernhard, J. M., Buck, K. R., Farmer, M. A., and Bowser, S. S. 2000. The Santa Barbara Basin is a symbiosis oasis. *Nature* 403:77–80.
- Bienhold, C., Pop Ristova, P., Wenzhöfer, F., Dittmar, T., and Boetius, A. 2013. How Deep-Sea Wood Falls Sustain Chemosynthetic Life. *PLoS ONE* 8:10–15.
- Biernacka, I. 1963. Die Protozoenfauna in der Danziger Bucht II. Die Charakteristik der Protozoen in untersuchten Biotopen der Seeküste. *Polskie Arch Hydrobiol.* 11:17–75.
- Blum, L. K., Mills, A. L., Zieman, J. C., and Zieman, R. T. 1988. Abundance of bacteria and fungi in seagrass and mangrove detritus. *Marine Ecology Progress Series* 42:73–78.

- Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C. J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A., Amann, R., Jørgensen, B. B., Witte, U., and Pfannkuche, O. 2000. A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* 407:623–626.
- Boscaro, V., Felletti, M., Vannini, C., Ackerman, M. S., Chain, P. S. G., Malfatti, S., Vergez, L. M., Shin, M., Doak, T. G., Lynch, M., and Petroni, G. 2013. *Polynucleobacter necessarius*, a model for genome reduction in both free-living and symbiotic bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:18590–18595.
- Boto, K., Alongi, D., and Nott, A. 1989. Dissolved organic carbon-bacteria interactions at sediment-water interface in a tropical mangrove system. *Marine Ecology Progress Series* 51:243–251.
- Bouchez, A., Pascault, N., Chardon, C., Bouvy, M., Cecchi, P., Lambs, L., Herteman, M., Fromard, F., Got, P., and Leboulanger, C. 2013. Mangrove microbial diversity and the impact of trophic contamination. *Marine pollution bulletin* 66:39–46.
- Bourne, D. G., Boyett, H. V., Henderson, M. E., Muirhead, A., and Willis, B. L. 2008. Identification of a ciliate (Oligohymenophorea: Scuticociliatia) associated with brown band disease on corals of the great barrier reef. *Applied and Environmental Microbiology* 74:883–888.
- Bright, M., and Bulgheresi, S. 2010. A complex journey: transmission of microbial symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 8:218–230.
- Bright, M., Espada-Hinojosa, S., Lagkouvardos, I., and Volland, J. M. 2014. The giant ciliate *Zoothamnium niveum* and its thiotrophic epibiont *Candidatus Thiobios zoothamnicoli*: A model system to study interspecies cooperation. *Frontiers in Microbiology* 5:1–13.
- Brown, M. W., Spiegel, F. W., and Silberman, J. D. 2009. Phylogeny of the “forgotten” cellular slime mold, *Fonticula alba*, reveals a key evolutionary branch within Opisthokonta. *Molecular Biology and Evolution* 26:2699–2709.
- Buck, K. R., Barry, J. P., Bay, M., Box, P. O., and Landing, M. 1998. Monterey Bay cold seep infauna: quantitative comparison of bacterial mat meiofauna with non-seep control sites. *Cahiers de Biologie Marine* 39:333–335.
- Buck, K. R., Barry, J. P., and Simpson, A. G. B. 2000. Monterey Bay cold seep biota: Euglenozoa with chemoautotrophic bacterial epibionts. *European Journal of Protistology* 36:117–126.

- Burger, G., Gray, M. W., Forget, L., and Lang, B. F. 2013. Strikingly bacteria-like and gene-rich mitochondrial genomes throughout jakobid protists. *Genome Biology and Evolution* 5:418–438.
- Burki, F., Alegado, R. A., King, N., Schlacht, A., Herman, E. K., Mary, J., and Cavalier-Smith, T. 2014. The Eukaryotic Tree of Life from a Global Phylogenomic Perspective. Cold Spring Harbor Laboratory Press:1–18.
- Camilleri, J. C., and Ribí, G. 1986. Leaching of dissolved organic carbon (DOC) from dead leaves, formation of flakes from DOC, and feeding on flakes by crustaceans in mangroves. *Marine Biology* 91:337–344.
- Canfield, D. E. 1993. Organic matter oxidation in marine sediments. Pages 333–363 *Interactions of C, N, P and S biogeochemical Cycles and Global Change*. Springer.
- Cao, H., Li, M., Hong, Y., and Gu, J. D. 2011. Diversity and abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in polluted mangrove sediment. *Systematic and Applied Microbiology* 34:513–523.
- Capriulo, G. M., Sherr, E. B., and Sherr, B. F. 2013. Trophic Behaviour and Related Community Feeding Activities of Heterotrophic Marine Protists. *Journal of Chemical Information and Modeling* 53:1689–1699.
- Carey, P. G. 1991. Marine interstitial ciliates. An illustrated key. London : Chapman and Hall Identification guide. 368 p.
- Caron, D. A., Countway, P. D., Jones, A. C., Kim, D. Y., and Schnetzer, A. 2012. Marine Protistan Diversity. *Annual Review of Marine Science* 4:467–493.
- Castillo-Romero, A., Leon-Avila, G., Rangel, A. P., Zarate, R. C., Tovar, C. G., and Hernandez, J. M. 2009. Participation of actin on *Giardia lamblia* growth and encystation. *PLoS ONE* 4:e7156.
- Cavalier-Smith, T. 2002. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification on protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:297–354.
- Cavalier-Smith, T. 2003. Protist phylogeny and the high-level classification of Protozoa. *European Journal of Protistology* 39:338–348.
- Cavanaugh, C., McKiness, Z., Newton, I., and Stewart, F. 2006. Marine chemosynthetic

- symbioses. *The prokaryotes*:475–507.
- Chale, F. M. M. 1993. Degradation of mangrove leaf litter under aerobic conditions. *Hydrobiologia* 257:177–183.
- Chantangsi, C., Esson, H. J., and Leander, B. S. 2008. Morphology and molecular phylogeny of a marine interstitial tetraflagellate with putative endosymbionts: *Auranticordis quadriverberis* n. gen. et sp.(Cercozoa). *BMC microbiology* 8:123.
- Chauvaud, S., Bouchon, C., Maniere, R., and Manière, R. 2001. Cartographie des biocénoses marines de Guadeloupe à partir de données SPOT (récifs coralliens, phanérogames marines, mangroves). *Oceanologica Acta* 24:3–16.
- Chen, X., Gong, J., Al-Rasheid, K. A. S., Farraj, S. A., and Song, W. 2011. New contribution to the morphological taxonomy of three marine cyrtophorid ciliates from the Yellow Sea, China (Ciliophora: Cyrtophorida). *Acta Protozoologica* 50:105–119.
- Chen, X., Pan, H., Huang, J., Warren, A., Al-Farraj, S. A., and Gao, S. 2016. New considerations on the phylogeny of cyrtophorian ciliates (Protozoa, Ciliophora): Expanded sampling to understand their evolutionary relationships. *Zoologica Scripta* 45:334–348.
- Cheon, S.-H., Kim, S. R., Song, H.-O., Ahn, M.-H., and Ryu, J.-S. 2013. The Dimension of *Trichomonas vaginalis* as Measured by Scanning Electron Microscopy. *Korean J Parasitol* 51:243–246.
- Clamp, J. C., and Williams, D. 2006. A molecular phylogenetic investigation of *Zoothamnium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53:494–498.
- Clausen, C. A. 1996. Bacterial Associations with Decaying Wood : a Review. *International Biodeterioration & Biodegradation*:101–107.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., McGarrell, D. M., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M. 2005. The Ribosomal Database Project (RDP-II): Sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Research* 33:294–296.
- Corliss, J. O. 1979. *The Ciliated Protozoa*. Page Pergamon Press, Oxford.
- Corliss, J. O. 1998. Haeckel's Kingdom Protista and Current Concepts in Systematic Protistology. *Stapfia* 131:85–104.
- Corliss, J. O. 2002. Biodiversity and biocomplexity of the protists and an overview of their

- significant roles in maintenance of our biosphere. *Acta Protozoologica* 41:199–219.
- Corliss, J. O. 2004. Why the World Needs Protists! *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51:8–22.
- Crémière, A., Strauss, H., Sebilo, M., Hong, W. L., Gros, O., Schmidt, S., Toczy, J., Henry, F., Gontharet, S., and Laverman, A. M. 2017. Sulfur diagenesis under rapid accumulation of organic-rich sediments in a marine mangrove from Guadeloupe (French West Indies). *Chemical Geology* 454:67–79.
- Crump, B. C., Armbrust, E. V, and Baross, J. A. 1999. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia river, its estuary, and the adjacent coastal ocean. *Applied and environmental microbiology* 65:3192–204.
- Dale, C., and Moran, N. A. 2006. Molecular Interactions between Bacterial Symbionts and Their Hosts. *Cell* 126:453–465.
- Von Damm, K. L. 1995. Controls on the chemistry and temporal variability of seafloor hydrothermal fluids. *Seafloor hydrothermal systems: physical, chemical, biological, and geological interactions*:222–247.
- Decho, A. W. 2000. Microbial biofilms in intertidal systems : an overview. *Continental Shelf Research* 20:1257–1273.
- Delfino, D. O., Wanderley, M. D. S., Silva, L. H., Feder, F., and Lopes, F. A. S. 2012. Sedimentology and temporal distribution of microbial mats from Brejo do Espinho, Rio de Janeiro, Brazil. *Sedimentary Geology* 263:85–95.
- Deming, J. W., Reysenbach, A. L., Macko, S. A., and Smith, C. R. 1997. Evidence for the microbial basis of a chemoautotrophic invertebrate community at a whale fall on the deep seafloor: bone-colonizing bacteria and invertebrate endosymbionts. *Microscopy research and technique* 37:162–70.
- Deroux, G. 1965. Origine des cinéties antérieures gauches et buccales dans le genre *Dysteria* Huxley. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de L'Académie des Sciences* 260:6689.
- Deroux, G. 1976a. Le plan cortical des Cyrtophorida unité d'expression et marges de variabilité. I.–Le cas des Plesiotrichopidae fam. nov., dans la nouvelle systématique. *Protistologica* 12:469–481.

- Deroux, G. 1976b. Le plan cortical des Cyrtophorida unité d'expression et marges de variabilité. II. Cyrtophorida à thigmotactisme ventral généralisé. *Protistologica* 12:483–500.
- Deroux, G. 1976c. Plan cortical des Cyrtophorida. III. – Les structures différenciatrices chez les Dysteriina. *Protistologica* 12:505–538.
- Deroux, G. 1994. Sous-Classe des Cyrtophorida Fauré-Fremiet in Corliss, 1956. *Traité de Zoologie* 2:401–431.
- Desbruyères, D. 2010. Les trésors des abysses. *Quae*.
- Desbruyères, D., Chevaldonné, P., Alayse, A.-M., Jollivet, D., Lallier, F. H., Jouin-Toulmond, C., Zal, F., Sarradin, P.-M., Cosson, R., and Caprais, J.-C. 1998. Biology and ecology of the “Pompeii worm” (*Alvinella pompejana* Desbruyères and Laubier), a normal dweller of an extreme deep-sea environment: a synthesis of current knowledge and recent developments. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 45:383–422.
- Diouris, M., Le Pennec, M., and Herry, A. 1989. Rôle des bactéries symbiotiques chimioautotrophes dans la nutrition de bivalves marins de milieux réducteurs. *Vie marine* 10:5–16.
- Distel, D. L., Morrill, W., MacLaren-Toussaint, N., Franks, D., and Waterbury, J. 2002. *Teredinibacter turnerae* gen. nov., sp. nov., a dinitrogen-fixing, cellulolytic, endosymbiotic  $\gamma$ -proteobacterium isolated from the gills of wood-boring molluscs (Bivalvia: Teredinidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52:2261–2269.
- Dolan, J. R. 1992. Mixotrophy in ciliates a review of *Chlorella* symbiosis and chloroplast retention. *Marine Microbial Food Webs* 6:115–132.
- Donato, D. C., Kauffman, J. B., Murdiyarso, D., Kurnianto, S., and Stidham, M. 2011. Mangroves among the most carbon-rich forests in the tropics. *Nature Geoscience* 4:1–5.
- Dor, I. 1984. Epiphytic blue-green algae (cyanobacteria) of the Sinai mangal: considerations on vertical zonation and morphological adaptations. *Hydrobiology of the mangal*. Edited by F. D. Por and I. Dor. Dr. W. Junk Publishers, The Hague, The Netherlands:35–53.
- Van Dover, C. L. 2000. *The Ecology of Deep-Sea Hydrothermal Vents*. Page Ecology. Princeton University Press.

- Dragesco, J. 1948. Sur la biologie du *Zoothamnium pelagicum* (du Plessis). Bull. Soc. Zool. Fr 73:130–134.
- Dragesco, J. 1966. Observations sur quelques ciliés libres. Arch. Protistenkd 109:155–206.
- Dragesco, J. 1980. Les protozoaires. Pages 153–192 Flore et faune aquatiques de l’Afrique Sahelo-Soudanienne. Orstom, Paris.
- Dragesco, J., and Dragesco-Kernéis, A. 1986. Ciliés libres de l’Afrique intertropicale: introduction à la connaissance et à l’étude des Ciliés. IRD Editions.
- Dubilier, N., Bergin, C., and Lott, C. 2008. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. Nature reviews. Microbiology 6:725–40.
- Duperron, S. 2005. Symbioses bactériennes de bivalves mytilidés associés aux sources de fluides en domaine océanique profond: diversité, rôle nutritionnel et influence de l’environnement. Université Paris 6-Pierre et Marie Curie.
- Duperron, S. 2017. Les symbioses microbiennes. Page (iSTE editions, Ed.). Collection.
- Duperron, S., Lorion, J., Samadi, S., Gros, O., and Gaill, F. 2009. Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. Comptes Rendus - Biologies 332:298–310.
- Durand, P., Gros, O., Frenkiel, L., and Prieur, D. 1996. Phylogenetic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three tropical Lucinidae by 16S rDNA sequence analysis. Molecular Marine Biology and Biotechnologie 5:37–42.
- Dziallas, C., Allgaier, M., Monaghan, M. T., and Grossart, H. P. 2012. Act together-implications of symbioses in aquatic ciliates. Frontiers in Microbiology 3:1–17.
- Edgcomb, V., Orsi, W., Bunge, J., Jeon, S., Christen, R., Leslin, C., Holder, M., Taylor, G. T., Suarez, P., Varela, R., and Epstein, S. 2011a. Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. I. Pyrosequencing vs Sanger insights into species richness. ISME Journal 5:1344–1356.
- Edgcomb, V. P., Leadbetter, E. R., Bourland, W., Beaudoin, D., and Bernhard, J. M. 2011b. Structured multiple endosymbiosis of bacteria and archaea in a ciliate from marine sulfidic sediments: A survival mechanism in low oxygen, sulfidic sediments? Frontiers in Microbiology 2:1–16.
- Ehrenberg, C. G. 1838. Die Infusionstierchen als vollkommene Organismen: ein Blick in das

- tiefere organische Leben der Natur.[1].[Hauptband]. Voss.
- Ekelund, F., and Rønn, R. 1994. Notes on protozoa in agricultural soil with emphasis on heterotrophic flagellates and naked amoebae and their ecology. *FEMS Microbiology Reviews* 15:321–353.
- Epstein, S. S., Bazylinski, D. A., and Fowle, W. H. 1998. Epibiotic Bacteria on Several Ciliates from Marine Sediments. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45:64–70.
- Esteban, G. F., Fenchel, T., and Finlay, B. J. 2010. Mixotrophy in Ciliates. *Protist* 161:621–641.
- Fagervold, S. K., Galand, P. E., Zbinden, M., Gaill, F., Lebaron, P., and Palacios, C. 2012. Sunken woods on the ocean floor provide diverse specialized habitats for microorganisms. *FEMS Microbiology Ecology* 82:616–628.
- Fasham, M. J. R., Ducklow, H. W., and McKelvie, S. M. 1990. A nitrogen-based model of plankton dynamics in the oceanic mixed layer. *Journal of Marine Research* 48:591–639.
- Fauré-Fremiet, E. 1965. Morphologie des Dysteriidæ (Ciliata Cyrtophorina). *Comptes rendus hebdomadaires des séances de L'Académie des Sciences* 260:6679–6684.
- Fauré-Fremiet, E. 1950a. Écologie des ciliés psammophiles littoraux. *Bull. Biol. Fr. Belg* 84:35–75.
- Fauré-Fremiet, E. 1950b. Caulobactéries épizoïques associées aux *Centrophorella* (Cilies holotriches). *Bull. Soc. Zool. France* 75:134–137.
- Fauré-Fremiet, E. 1951. The marine sand-dwelling ciliates of Cape Cod. *The Biological Bulletin* 100:59–70.
- Fauré-Fremiet, E. 1963. Images électroniques d'une microbiocène marine. *Cahiers de Biologie marine* 4:61–64.
- Felbeck, H., Childress, J. J., and Somero, G. N. 1981. Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. *Nature* 293:291.
- Feller, I. C., Lovelock, C. E., Berger, U., McKee, K. L., Joye, S. B., and Ball, M. C. 2010. Biocomplexity in Mangrove Ecosystems. *Annual Review of Marine Science* 2:395–417.
- Feller, I. C., Whigham, D. F., O'Neill, J. P., and McKee, K. L. 1999. Effects of nutrient enrichment on within-stand cycling in a mangrove forest. *Ecology* 80:2193–2205.
- Fenchel, T. 1968. The ecology of marine microbenthos III. The reproductive potential of

- ciliates. *Ophelia* 5:123–136.
- Fenchel, T. 1970. Studies on the decomposition of organic detritus derived from the turtle grass *Thalassia testudinum*. *Limnology and Oceanography* 15:14–20.
- Fenchel, T. 1994. Motility and chemosensory behaviour of the sulphur bacterium *Thiovulum majus*. *Microbiology* 140:3109–3116.
- Fenchel, T., and Bernard, C. 1993. Endosymbiotic purple non-sulphur bacteria in an anaerobic ciliated protozoon. *FEMS Microbiology Letters* 110:21–25.
- Fenchel, T., and Finlay, B. J. 1989. *Kentrophoros*: a mouthless ciliate with a symbiotic kitchen garden. *Ophelia* 30:75–93.
- Fenchel, T., and Finlay, B. J. 1991a. The biology of free-living anaerobic ciliates. *European Journal of Protistology* 26:201–215.
- Fenchel, T., and Finlay, B. J. 1991b. Endosymbiotic Methanogenic Bacteria In Anaerobic Ciliates: Significance For the Growth Efficiency of the Host. *The Journal of Protozoology* 38:18–22.
- Fenchel, T., and Finlay, B. J. 1995. Ecology and evolution in anoxic worlds. Oxford; New York: Oxford University Press, 1995.
- Fenchel, T., and Riedl, R. J. 1970. The sulfide system: a new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. *Marine Biology* 7:255–268.
- Fenchel, T., Perry, T., and Thane, A. 1977. Anaerobiosis and Symbiosis with Bacteria in Free - living Ciliates. *The Journal of Protozoology* 24:154–163.
- Fenchel, T., and Ramsing, N. B. 1992. Identification of sulphate-reducing ectosymbiotic bacteria from anaerobic ciliates using 16S rRNA binding oligonucleotide probes. *Archives of Microbiology* 158:394–397.
- Fiala-Médioni, A. 2000. Écosystèmes À Base Chimiosynthétique:237–244.
- Finlay, B. J., Corliss, J. O., Esteban, G., and Fenchel, T. 1996. Biodiversity at the Microbial Level: The Number of Free-Living Ciliates in the Biosphere. *The Quarterly Review of Biology* 71:221.
- Finlay, B. J., Esteban, G. F., Clarke, K. J., Williams, A. G., Embley, T. M., and Hirt, R. P. 1994. Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* 117:157–161.

- Finlay, B. J., Esteban, G. F., Clarke, K. J., and Olmo, J. L. 2001. Biodiversity of terrestrial protozoa appears homogeneous across local and global spatial scales. *Protist* 152:355–366.
- Finlay, B. J., Esteban, G. F., and Fenchel, T. 1998. Protozoan diversity: Converging estimates of the global number of free-living ciliate species. *Protist* 149:29–37.
- Fisher, C. R., and Childress, J. J. 1992. Organic carbon transfer from methanotrophic symbionts to the host hydrocarbon-seep mussel. *Symbiosis* 12:221–235.
- Foissner, W. 1979. Morphology, Infraciliature and Silverline System of *Phascolodon-Vorticella* Stein, *Chlamydonella-Alpestris* Nsp and *Trochilia-Minuta* (Roux) (Ciliophora Cytrophorida). *Protistologica* 15:557–563.
- Foissner, W. 1987. Soil protozoa: fundamental problems, ecological significance, adaptations in ciliates and testaceans, bioindicators and guide to the literature. *Prog. Protistol.* 2:69–212.
- Foissner, W. 1994. Soil Protozoa as Bioindicators in Ecosystems Under Human Influence. *Soil Protozoa*:147–193.
- Foissner, W. 1995. *Kentrophoros* (Ciliophora, Karyorelictea) has Oral Vestiges: a Reinvestigation of *K. fistulosus* (FaurÉ-Fremiet, 1950) Using Protargol Impregnation. *Archiv für Protistenkunde* 146:165–179.
- Foissner, W. 2008. Protist diversity and distribution: Some basic considerations. *Biodiversity and Conservation* 17:235–242.
- Foissner, W. 2014. An update of basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:271–292.
- Foissner, W., and Berger, H. 1992. F. KOHMANN (1992): Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiensystems-Band II: Peritrichia, Heterotrichida, Odontostomatida. *Informationsberichte Bayer. Landesamt für Wasserwirtschaft, München* 5:1–502.
- Foissner, W., and Berger, H. 1996. A user - friendly guide to the ciliates (Protozoa, Ciliophora) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology* 35:375–482.

- Foissner, W., Blake, N., Wolf, K., Breiner, H. W., and Stoeck, T. 2009. Morphological and molecular characterization of some peritrichs (Ciliophora: Peritrichida) from tank bromeliads, including two new genera: *Orborhabdostyla* and *Vorticellides*. *Acta Protozoologica* 48:291–319.
- Foissner, W., and Schiffmann, H. 1974. Vergleichende Studien an argyrophilen Strukturen von vierzehn peritrichen Ciliaten. *Protistologica* 10:489–508.
- Fok, A. K., and Allen, R. D. 1988. The Lysosome System. Pages 301–324 in Görtz, H.-D., editor. *Paramecium*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Fokin, S. I. 2003. Bacterial endocytobionts of Ciliophora and their interactions with the host cell. *International Review of Cytology* 236:181–249.
- Fokin, S. I. 2012. Frequency and biodiversity of symbionts in representatives of the main classes of Ciliophora. *European journal of protistology* 48:138–48.
- Fokin, S. I., and Sera, V. 2014. The Hidden Biodiversity of Ciliate-Endosymbionts Systems. *JSM Microbiology* 2:23–25.
- Fokin, S. I., Skovorodkin, I. N., and Schweikert, M. 2004. Co-infection of the Macronucleus of *Paramecium caudatum* by Free-Living Bacteria Together with the Infectious *Holospora obtusa*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51:417–424.
- Fokin, S., and Karpov, S. 1995. Bacterial endocytobionts inhabiting the perinuclear space of protista. *Endocytobiosis and Cell Research* 11:81–94.
- Foster, R. A., Carpenter, E. J., and Bergman, B. 2006a. Unicellular cyanobionts in open ocean dinoflagellates, radiolarians, and tintinnids: Ultrastructural characterization and immunolocalization of phycoerythrin and nitrogenase. *Journal of Phycology* 42:453–463.
- Foster, R. A., Collier, J. L., and Carpenter, E. J. 2006b. Reverse transcription PCR amplification of cyanobacterial symbiont 16S rRNA sequences from single non-photosynthetic eukaryotic marine planktonic host cells. *Journal of Phycology* 42:243–250.
- Frank, B. 1885. Ueber die auf Wurzelsymbiose beruhende Ernährung gewisser Baume durch unterirdische Pilze. *Ber. Dt. Bot. Ges.*(3):128–145.
- Frenkiel, L., Gros, O., and Mouëza, M. 1996. Gill structure in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae) with reference to hemoglobin in bivalves with symbiotic sulphur-oxidizing

- bacteria. *Marine Biology* 125:511–524.
- Froelich, P., Klinkhammer, G. P., Bender, M. L., Luedtke, N. A., Heath, G. R., Cullen, D., Dauphin, P., Hammond, D., Hartman, B., and Maynard, V. 1979. Early oxidation of organic matter in pelagic sediments of the eastern equatorial Atlantic: suboxic diagenesis. *Geochimica et cosmochimica acta* 43:1075–1090.
- Fujishima, M., Kawai, M., and Yamamoto, R. 2005. *Paramecium caudatum* acquires heat-shock resistance in ciliary movement by infection with the endonuclear symbiotic bacterium *Holospora obtusa*. *FEMS Microbiology Letters* 243:101–105.
- Fujiwara, Y., Kawato, M., Yamamoto, T., Yamanaka, T., and Sato-okoshi, W. 2007. Three-year investigations into sperm whale-fall ecosystems in Japan. *Marine Ecology* 28:219–232.
- Fujiwara, Y., Takai, K., Uematsu, K., Tsuchida, S., Hunt, J. C., and Hashimoto, J. 2000. Phylogenetic characterization of endosymbionts in three hydrothermal vent mussels: influence on host distributions. *Marine Ecology Progress Series* 208:147–155.
- Gaill, F., and Hunt, S. 1991. The biology of annelid worms from high temperature hydrothermal vent regions. *Reviews in Aquatic Sciences* 4:107–137.
- Gao, S., Huang, J., Li, J., and Song, W. 2012. Molecular phylogeny of the ciliophorid ciliates (Protozoa, Ciliophora, Phyllopharyngea). *PloS one* 7:e33198.
- Gast, R. J., Sanders, R. W., and Caron, D. A. 2009. Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. *Trends in microbiology* 17:563–9.
- van Gemerden, H. 1993. Microbial mats: A joint venture. *Marine Geology Elsevier Science Publishers B.V* 113:3–25.
- Germond, A., and Nakajima, T. 2016. Symbiotic associations in ciliates: Ecological and evolutionary perspectives. *Biocommunication of Ciliates*:253–275.
- Giambelluca, A., and Rosati, G. 1996. Behavior of epixenosomes and the epixenosomal band during divisional morphogenesis in *Euplotidium itoi* (Ciliata, Hypotrichida). *European Journal of Protistology* 32:77–80.
- Giribet, G., Carranza, S., Bagaña, J., Riutort, M., and Ribera, C. 1996. First molecular evidence for the existence of a Tardigrada+Arthropoda clade. *Molecular Biology and Evolution* 13:76–84.

- Goffredi, S. K., and Orphan, J. V. 2010. Bacterial community shifts in taxa and diversity in response to localized organic loading in the deep sea. *Environmental Microbiology* 12:344–363.
- Goffredi, S. K., Wilpiseski, R., Lee, R., and Orphan, V. J. 2008. Temporal evolution of methane cycling and phylogenetic diversity of archaea in sediments from a deep-sea whale-fall in Monterey Canyon, California:204–220.
- Goldfarb, M. S. 1983. The genesis of hot spring deposits on the East Pacific Rise 21 °N. The Kuroko and Related Volcanogenetic Massive Deposits. *Econ. Geol. Monograph* 5:184–197.
- Gomes, N. C. M., Cleary, D. F. R., Pinto, F. N., Smalla, K., Cunha, A., and Mendonc, L. C. S. 2010. Taking Root: Enduring Effect of Rhizosphere Bacterial Colonization in Mangroves 5:1–10.
- Gong, J., Lin, X., and Song, W. 2003. Redescription of a Poorly-known Marine Cyrtophorid Ciliate, *Dysteria pusilla* (Claparède et Lachmann, 1859) (Protozoa: Ciliophora: Cyrtophorida) from. *Acta Protozoologica* 42:215–221.
- Gong, J., and Song, W. 2003. Morphology and infraciliature of two marine benthic ciliates, *Dysteria procera* Kahl, 1931 and *Dysteria magna* nov. spec. (Protozoa, Ciliophora, Cyrtophorida), from China. *European Journal of Protistology* 39:301–309.
- Gong, J., and Song, W. 2004. Description of a new marine cyrtophorid ciliate, *Dysteria derouxi* nov. spec., with an updated key to 12 well-investigated *Dysteria* species (Ciliophora, Cyrtophorida). *European Journal of Protistology* 40:13–19.
- Gong, J., and Song, W. 2006. Description of a new marine cyrtophorid ciliate, *Brooklynella sinensis* n. sp. from China Sea with a new definition of the genus *Brooklynella* (Protozoa, Ciliophora, Cyrtophorida). *Zootaxa* 1113:41–49.
- Gong, J., Song, W., and Warren, A. 2002. Redescriptions of two marine cyrtophorid ciliates, *Dysteria cristata* (Gourret and Roeser, 1888) Kahl, 1931 and *Dysteria monostyla* (Ehrenberg, 1838) Kahl, 1931 (Protozoa, Ciliophora, Cyrtophorida), from China. *European Journal of Protistology* 38:213–222.
- Gong, J., Song, W., Warren, A., Lin, X., and Roberts, D. M. L. 2007. Microscopical observations on four marine *Dysteria* species (Ciliophora, Cyrtophorida). *European Journal of Protistology* 43:147–161.

- Gontharet, S., Crémière, A., Blanc-Valleron, M. M., Sebilo, M., Gros, O., Laverman, A. M., and Dessailly, D. 2017. Sediment characteristics and microbial mats in a marine mangrove, Manche-à-eau lagoon (Guadeloupe). *Journal of Soils and Sediments* 17:1999–2010.
- Gordon, R., Losic, D., Tiffany, M. A., Nagy, S. S., and Sterrenburg, F. A. S. 2008. The Glass Menagerie: diatoms for novel applications in nanotechnology.
- Görtz, H.-D. 2006. Symbiotic Associations Between Ciliates and Prokaryotes. Pages 364–402 in Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., and Stackebrandt, E., editors. *The Prokaryotes: Volume 1: Symbiotic associations, Biotechnology, Applied Microbiology*. Springer New York, New York, NY.
- Görtz, H.-D., and Brigge, T. 1998. Intracellular bacteria in protozoa. *The Science of Nature* 85:359–368.
- Görtz, H.-D., and Fokin, S. I. 2009. Diversity of Endosymbiotic Bacteria in *Paramecium*. Pages 131–160 *Endosymbionts in Paramecium*. Springer.
- Gray, M. W., Lang, B. F., and Burger, G. 2004. Mitochondria of Protists. *Annual Review of Genetics* 38:477–524.
- Gros, O. 2017. First description of a new uncultured epsilon sulfur bacterium colonizing marine mangrove sediment in the caribbean: *Thiovulum* sp. strain karukerense. *FEMS Microbiology Letters* 364:1–24.
- Gros, O., Bisqué, L., Sadjan, M., Azede, C., Jean-Louis, P., and Guidi-Rontani, C. 2018. First description of a new uncultured purple sulfur bacterium colonizing marine mangrove sediment in the Caribbean: *Halochromatium*-like PSB from Guadeloupe. *Comptes Rendus Biologies*:1–11.
- Gros, O., Darrasse, A., Durand, P., and Frenkiel, L. 1996. Environmental Transmission of a Sulfur-Oxidizing Bacterial Gill Endosymbiont in the Tropical Lucinid Bivalve *Codakia orbicularis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2324–2330.
- Gros, O., Elisabeth, N. H., Gustave, S. D. D., Caro, A., and Dubilier, N. 2012. Plasticity of symbiont acquisition throughout the life cycle of the shallow-water tropical lucinid *Codakia orbiculata* (Mollusca: Bivalvia). *Environmental Microbiology* 14:1584–1595.
- Gros, O., Liberge, M., and Felbeck, H. 2003. Interspecific infection of aposymbiotic juveniles of *Codakia orbicularis* by various tropical lucinid gill-endosymbionts. *Marine Biology*.

- Guidi-Rontani, C., Jean, M. R. N., Gonzalez-Rizzo, S., Bolte-Kluge, S., and Gros, O. 2014. Description of new filamentous toxic Cyanobacteria (Oscillatoriales) colonizing the sulfidic periphyton mat in marine mangroves. *FEMS Microbiology Letters* 359:173–181.
- Guilcher, A., and Marec, A. 1978. Le récif-barrière et le lagon du Grand Cul-de-Sac Marin (Guadeloupe, Antilles françaises). Géomorphologie et sédiments. *Oceanologica Acta* 1:435–444.
- Guiral, D. 1999. Les écosystèmes à mangrove. Rivières du Sud. Sociétés et mangroves ouest-africaines. Cormier-Salem MC, IRD Éditions, Paris.
- Guiral, D., Albaret, J. J., Baran, E., Bertrand, F., Debenay, J. P., Diouf, P. S., Guillou, J. J., Le Loeuff, P., Montoroi, P., and Sow, M. 1999. Les écosystèmes à mangrove. Rivières du Sud. Sociétés et mangroves ouest-africaines. Cormier-Salem MC, IRD Éditions, Paris:65–130.
- Gustafson Jr, D. E., Stoecker, D. K., Johnson, M. D., Van Heukelem, W. F., and Sneider, K. 2000. Cryptophyte algae are robbed of their organelles by the marine ciliate *Mesodinium rubrum*. *Nature* 405:1049.
- Hackstein, J. H. P. 2010. Anaerobic Ciliates and Their Methanogenic Endosymbionts. Pages 13–24 (Endo) symbiotic Methanogenic Archaea. Springer Berlin Heidelberg.
- Hackstein, J. H. P., Akhmanova, A., Voncken, F., Hoek, A. Van, Alen, T. Van, Boxma, B., Staay, S. Y. M. Der, Staay, G. Van Der, Leunissen, J., Huynen, M., Rosenberg, J., and Veenhuis, M. 2006. Hydrogenosomes: convergent adaptations of mitochondria to anaerobic environments \*\*. *Zoology* 104:290–302.
- Haeckel, E. 1866. *Generelle Morphologie der Organismen allgemeine Grundzuge der organischen Formen-Wissenschaft, mechanisch begründet durch die von Charles Darwin reformirte Descendenz-Theorie von Ernst Haeckel: Allgemeine Entwicklungsgeschichte der Organismen kritische G.* Verlag von Georg Reimer.
- Hahn, M. W., Lang, E., Brandt, U., Wu, Q. L., and Scheuerl, T. 2009. Emended description of the genus *Polynucleobacter* and the species *Polynucleobacter necessarius* and proposal of two subspecies, *P. necessarius* subsp. *necessarius* subsp. nov. and *P. necessarius* subsp. *asymbioticus* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59:2002–2009.
- Hamilton, L. S., and Snedaker, S. C. 1984. Handbook for mangrove area management.

Honolulu: East-West Environment and Policy Institute.

- Hampl, V., Hug, L., Leigh, J. W., Dacks, J. B., Lang, B. F., Simpson, A. G. B., and Roger, A. J. 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:3859–3864.
- Hansen, P. J., and Fenchel, T. 2006. The bloom-forming ciliate *Mesodinium rubrum* harbours a single permanent endosymbiont. *Marine Biology Research* 2:169–177.
- Harris, J. M. 1993. Widespread occurrence of extensive epimural rod bacteria in the hindguts of marine Thalassinidae and Brachyura (Crustacea: Decapoda). *Marine Biology* 116:615–629.
- Harrison, P. J., Khan, N., Yin, K., Saleem, M., Bani, N., Nisa, M., Ahmed, S. I., Rizvi, N., and Azam, F. 1997. Nutrient and phytoplankton dynamics in two mangrove tidal creeks of the Indus River delta, Pakistan. *Marine Ecology Progress Series*:13–19.
- Harrison, P. J., Snedaker, S. C., Ahmed, S. I., and Azam, F. 1994. Primary producers of the arid climate mangrove ecosystem of the Indus River Delta, Pakistan: An overview. *Tropical Ecology* 35:155–184.
- Hausmann, K., and Bradbury, P. C. 1996. *Ciliates: cells as organisms*. Gustav Fischer Verlag.
- Hausmann, K., and Walz, B. 2007. *Zoothamnium pelagicum*: Ein sessiler, kolonialer Ciliat lebt vereint zu Gruppen. *Mikrokosmos* 96:217–222.
- Heckmann, K. 1975. Omikron, ein essentieller Endosymbiont von *Euplotes aediculatus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 22:97–104.
- Heckmann, K., ten Hagen, R., and Görtz, H. 1983. Species with a 9 Type 1 Cirrus Pattern Depend upon Endosymbionts. *The Journal of Protozoology* 30:284–289.
- Heckmann, K., and Schmidt, H. J. 1987. *Polynucleobacter necessarius* gen. nov. sp. nov. an Obligately Endosymbiotic Bacterium Living in the Cytoplasm of *Euplotes aediculatus*. *International journal of systematic bacteriology*:1–2.
- Heckmann, K., Schmidt, H. J., and Fujishima, M. 1986. Omikron and Omikron-Like Endosymbionts of *Euplotes*. *Extrachromosomal Elements in Lower Eukaryotes*. Pages 327–335 in Wickner, R. B., Hinnebusch, A., Lambowitz, A. M., Gunsalus, I. C., Hollaender, A., Preer, J. R., Mets, L., Gumport, R. I., Wilson, C. M., and Kuny, G.,

- editors. Springer US, Boston, MA.
- Hemprich, F. W., and Ehrenberg, C. G. 1831. *Symbolae physicae. Evertebrata. I. Phytozoa.* Abh. Akad. Wiss. Berl.
- Herry, A., Diouris, M., and Le Pennec, M. 1989. Chemoautotrophic symbionts and translocation of fixed carbon from bacteria to host tissues in the littoral bivalve *Loripes lucinalis* (Lucinidae). *Marine Biology* 101:305–312.
- Himmel, D., Maurin, L. C., Gros, O., and Mansot, J.-L. 2009. Raman microspectrometry sulfur detection and characterization in the marine ectosymbiotic nematode *Eubostrichus diana* (Desmodoridae, Stilbonematidae). *Biology of the Cell* 101:43–54.
- van Hoek, A. H. A. M., van Alen, T. A., Sprakel, V. S. I., Leunissen, J. A. M., Brigge, T., Vogels, G. D., and Hackstein, J. H. P. 2000. Multiple acquisition of methanogenic archaeal symbionts by anaerobic ciliates. *Molecular Biology and Evolution* 17:251–258.
- Hoffmeister, M., and Martin, W. 2003. Interspecific evolution: Microbial symbiosis, endosymbiosis and gene transfer. *Environmental Microbiology* 5:641–649.
- Hofmann, A. H. 1988. Stomatogenesis in cyrtophorid ciliates: II. *Chilodonella cyprini* (Moroff, 1902): The kinetofragment as an anlagen-complex. *European journal of protistology* 23:165–184.
- Holguin, G., Vazquez, P., and Bashan, Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: An overview. *Biology and Fertility of Soils* 33:265–278.
- Holmer, M. 2009. Mangrove forest of Southeast Asia. Pages 1–40 in Black, K. D. and Shimmiel, G. B., editors. *Biogeochemistry of Marine Systems*. John Wiley.
- Hu, X. 2014. Ciliates in extreme environments. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 61:410–418.
- Hu, X., and Suzuki, T. 2005. Light microscopical observations on two marine dysteriid ciliates from Japan, including a description of *Dysteria yagiui* nov. spec. (Ciliophora, Cyrtophorida). *European journal of protistology* 41:29–36.
- Jankowski, A. W. 1967. Ciliates from the mantle cavity of *Balanus* in Barents Sea. *Parazitologiya* 1:82–93.
- Jankowski, A. W. 1976. A revision of the order Sessilida (Peritricha). Pages 168–170

- Materials of the II All-Union Conference of Protozoologists. Part I. General Protozoology. Naukova Dumka Kiev.
- Jankowski, A. W. 1985. Life cycles and taxonomy of generic groups *Scyphidia*, *Heteropolaria*, *Zoothamnium* and *Cothurnia* (class Peritricha). Trudy Zool. Inst., Leningr 129:74–100.
- Jannasch, H. W. 1995. Microbial interactions with hydrothermal fluids. Seafloor Hydrothermal Systems: Physical, chemical, biological, and geological interactions:273–296.
- Jean, M. R. N., Gonzalez-Rizzo, S., Gauffre-Autelin, P., Lengger, S. K., Schouten, S., and Gros, O. 2015. Two new *Beggiatoa* species inhabiting marine mangrove sediments in the Caribbean. PloS one 10:e0117832.
- Ji, D., Lin, X., and Song, W. 2004. Complementary notes on a ‘well-known’ marine heterotrichous ciliate, *Folliculinopsis producta* (Wright, 1859) Frauré-Fremiet, 1936 (Protozoa, ciliophora). Journal of Ocean University of China (English Edition) 3:65–69.
- Jones, R. I. 1994. Mixotrophy in planktonic protists as a spectrum of nutritional strategies. Marine Microbial Food Webs 8:87–96.
- Jones, R. I. 2000. Mixotrophy in planktonic protists: an overview. Freshwater Biology 45:219–226.
- Jørgensen, B. B. 1989. Biogeochemistry of chemoautotrophic bacteria. Autotrophic bacteria.
- Jørgensen, B. B., and Boetius, A. 2007. Feast and famine — microbial life in the deep-sea bed. Nature Reviews Microbiology 5:770–781.
- Jørgensen, B. B., and Parkes, R. J. 2010. Role of sulfate reduction and methane production by organic carbon degradation in eutrophic fjord sediments (Limfjorden, Denmark). Limnology and Oceanography 55:1338–1352.
- Jørgensen, B. B., and Revsbech, N. P. 1982. Microoxic-Anoxic Niche of *Beggiatoa* spp.: Microelectrode Survey of Marine and Freshwater Strains. Applied and Environmental Microbiology 45:1261–1270.
- Kahl, A. 1931. Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). 2. Holotricha. Die Tierwelt und der angrenzenden Meeresteile 21:181–398.
- Kahl, A. 1933. Ciliata libera et ectocommensalia.-Leipzig. Grimpe’s Tierwelt der Nord-und

- Ostsee Leipzig Lfg 23:29–146.
- Kahl, A. 1935. Urtiere oder Protozoa. I. Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). 4. Peritricha und Chonotricha. Die Tierwelt der angrenzenden Meeresteile 30:651–886.
- Kathiresan, K., and Bingham, B. L. 2001. Biology of mangroves and mangrove ecosystems. *Advances in Marine Biology* 40:81–251.
- Keeling, P. J., Burger, G., Durnford, D. G., Lang, B. F., Lee, R. W., Pearlman, R. E., Roger, A. J., and Gray, M. W. 2005. The tree of eukaryotes. *Trends in Ecology and Evolution* 20:670–676.
- Kelley, D. S., Baross, J. A., and Delaney, J. R. 2002. Volcanoes, fluids, and life at mid-ocean ridge spreading centers. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 30:385–491.
- Knittel, K., Lo, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. 2005. Diversity and Distribution of Methanotrophic Archaea at Cold Seeps †. *Applied and Environmental Microbiology* 71:467–479.
- König, S., Gros, O., Heiden, S. E., Hinzke, T., Thürmer, A., Poehlein, A., Meyer, S., Vatin, M., Mbégué-A-Mbégué, D., Tocny, J., Ponnudurai, R., Daniel, R., Becher, D., Schweder, T., and Markert, S. 2016. Nitrogen fixation in a chemoautotrophic lucinid symbiosis. *Nature Microbiology* 2:16193.
- Kouris, A., Kim Juniper, S., Frébourg, G., and Gaill, F. 2007. Protozoan-bacterial symbiosis in a deep-sea hydrothermal vent folliculinid ciliate (*Folliculinopsis* sp.) from the Juan de Fuca Ridge. *Marine Ecology* 28:63–71.
- Krishnamurty, K., Naidu, D. W., Godhantaraman, N., Kannan, L., and Kathiresan, K. 1995. Microzooplankton with special reference to Tintinnida (Protozoa: Ciliata: Tintinnida). Plankton of Pangipettai (Porto Novo), India. Fascicle No1, New Series: Memoirs of the centre for advanced study in Marine Biology,(Annamalai University), Parangipettai, Tamilnadu, India 27.
- Kristensen, E., Andersen, F. Ø., Holmboe, N., Holmer, M., and Thongtham, N. 2000. Carbon and nitrogen mineralization in sediments of the Bangrong mangrove area, Phuket, Thailand. *Aquatic Microbial Ecology* 22:199–213.
- Kristensen, E., Devol, A. H., Ahmed, S. I., and Saleem, M. 1992. Preliminary study of benthic metabolism and sulfate reduction in a mangrove swamp of the Indus Delta, Pakistan. *Marine Ecology Progress Series*:287–297.

- Kristensen, E., Holmer, M., Banta, G. T., Jensen, M. H., and Hansen, K. 1995. Carbon, nitrogen and sulfur cycling in sediments of the Ao Nam Bor mangrove forest, Phuket, Thailand: a review. *Phuket Mar. Biol. Cent. Res. Bull* 60:37–64.
- Kristensen, E., Holmer, M., and Bussarawit, N. 1991. Benthic metabolism and sulfate reduction in a southeast Asian mangrove swamp. *Marine Ecology Progress Series*:93–103.
- Kristensen, E., Jensen, M. H., Banta, G. T., Hansen, K., Holmer, M., and King, G. M. 1998. Transformation and transport of inorganic nitrogen in sediments of a southeast Asian mangrove forest. *Aquatic microbial ecology* 15:165–175.
- Kristensen, E., and Suraswadi, P. 2002. Carbon, nitrogen and phosphorus dynamics in creek water of a southeast Asian mangrove forest. *Hydrobiologia*:197–211.
- Krueger, D. M., Dubilier, N., and Cavanaugh, C. M. 1996. Chemoautotrophic symbiosis in the tropical clam *Solemya occidentalis* (Bivalvia: Protobranchia): ultrastructural and phylogenetic analysis. *Marine Biology* 126:55–64.
- Kurahashi, M., and Yokota, A. 2007. *Endozoicomonils elysicola* gen. nov., sp. nov., a  $\gamma$ -proteobacterium isolated from the sea slug *Elysia ornata*. *Systematic and Applied Microbiology* 30:202–206.
- Kusch, J., Czubatinski, L., Wegmann, S., Hubner, M., Alter, M., and Albrecht, P. 2002. Competitive advantages of *Caedibacter*-infected Paramecia. *Protist* 153:47–58.
- Lams, L., Léopold, A., Zeller, B., Herteman, M., and Fromard, F. 2011. Tracing sewage water by  $^{15}\text{N}$  in a mangrove ecosystem to test its bioremediation ability. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 25:2777–2784.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. Pages 115–175 *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*.
- Lane, J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., Pace, N. R., Lane, D. J., Pace, B., Olsen, G. J., Stahl, D. A., Sogin, M. L., and Pace, N. R. 1986. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:4972.
- Laubier, L. 1990. Ecosystemes benthiques profonds et chimiosynthese bacterienne: Sources hydrothermales et suintements. Page Intervention Sous-Marine ISM 90, Toulon (France), 3-5 Dec 1990.

- Laurent, M. C. Z., Le Bris, N., Gaill, F., and Gros, O. 2013. Dynamics of wood fall colonization in relation to sulfide concentration in a mangrove swamp. *Marine Environmental Research* 87–88:85–96.
- Laurent, M. C. Z., Gros, O., Brulport, J. P., Gaill, F., and Bris, N. L. 2009. Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. *Marine Environmental Research* 67:83–88.
- Laval, M. 1968. *Zoothamnium pelagicum* du Plessis. Cilié péritricheplanctonique: morphologie, croissance et comportement. *Protistologica* 4:333–363.
- Lee, S. Y. 1990. Primary productivity and particulate organic matter flow in an estuarine mangrove-wetland in Hong Kong. *Marine Biology* 106:453–463.
- Leitner, A. R., and Foissner, W. 1997. Taxonomic characterization of *Epicarchesium granulatum* (Kellicott, 1887) Jankowski, 1985 and *Pseudovorticella elongata* (Fromentel, 1876) nov. comb., two peritrichs (Protozoa, Ciliophora) from activated sludge. *European Journal of Protistology* 33:13–29.
- Lembi, C. A., and Waaland, J. R. 1988. *Algae and human affairs*. Cambridge University Press.
- Lepsi, J. 1927. Studii faunistice, morfologice si fiziologice asupra infuzoriilor din Romania (Studien betreffend die Infusorien Rumäniens.) rum. *Cultura nat.*
- Leschine, S. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Reviews in Microbiology*.
- Leveille, R. J., and Juniper, S. K. 2003. Deep-sea hydrothermal vents and cold seeps. *Biogeochemistry of Marine Systems*:238.
- Levin, L. A., Baco, A. R., Bowden, D. A., Colaco, A., Cordes, E. E., Cunha, M. R., Demopoulos, A. W. J., Gobin, J., Grupe, B. M., Le, J., Metaxas, A., Netburn, A. N., Rouse, G. W., Thurber, A. R., Tunnicliffe, V., Van Dover, C. L., Vanreusel, A., and Watling, L. 2016. Hydrothermal Vents and Methane Seeps: Rethinking the Sphere of Influence. *Frontiers in Marine Science* 3:1–23.
- Lewis, M., Pryor, R., and Wilking, L. 2011. Fate and effects of anthropogenic chemicals in mangrove ecosystems: A review. *Environmental Pollution* 159:2328–2346.
- Lewis, W. 1974. Primary production in the plankton community of a tropical lake. *Ecological*

Monographs 44:377–409.

- Li, L., Song, W., Warren, A., Shin, M. K., Chen, Z., Ji, D., and Sun, P. 2008a. Reconsideration of the phylogenetic positions of five peritrich genera, *Vorticella*, *Pseudovorticella*, *Zoothamnopsis*, *Zoothamnium*, and *Epicarchesium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida), based on small subunit rRNA gene sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 55:448–456.
- Li, X., Taylor, G. T., Astor, Y., and Scranton, M. I. 2008b. Relationship of sulfur speciation to hydrographic conditions and chemoautotrophic production in the Cariaco Basin. *Marine Chemistry* 112:53–64.
- Lin, X., Scranton, M. I., Chistoserdov, A. Y., Varela, R., and Taylor, G. T. 2008. Spatiotemporal dynamics of bacterial populations in the anoxic Cariaco Basin. *Limnology and Oceanography* 53:37–51.
- Lindholm, T., and Mörk, A. C. 1989. Symbiotic algae and plastids in planktonic ciliates. *Mem. Soc. Fauna Flora Fennica* 65:17–22.
- Linnaeus, C. 1767. *Systema Naturae* ed. 12. vol. 1. Laurentii Salvii, Holmiae.
- Little, C. T. S. 2010. The Prolific Afterlife of Whales. *Scientific American* 302:78–85.
- Liu, Y., Steenkamp, E. T., Brinkmann, H., Forget, L., Philippe, H., and Lang, B. F. 2009. Phylogenomic analyses predict sistergroup relationship of nucleariids and Fungi and paraphyly of zygomycetes with significant support. *BMC Evolutionary Biology* 9:1–11.
- Lobban, C. S., Modeo, L., Verni, F., and Rosati, G. 2005. *Euplotes uncinatus* (Ciliophora, Hypotrichia), a new species with zooxanthellae. *Marine Biology* 147:1055–1061.
- Lobban, C. S., Schefter, M., Simpson, A. G. B., Pochon, X., Pawlowski, J., and Foissner, W. 2002. *Maristentor dinoferus* n. gen., n. sp., a giant heterotrich ciliate (Spirotrichea: Heterotrichida) with zooxanthellae, from coral reefs on Guam, Mariana Islands. *Marine Biology* 140:411–423.
- Logares, R., Bråte, J., Bertilsson, S., Clasen, J. L., Shalchian-Tabrizi, K., and Rengefors, K. 2009. Infrequent marine–freshwater transitions in the microbial world. *Trends in microbiology* 17:414–422.
- López-garcía, P., and Moreira, D. 2015. Open Questions on the Origin of Eukaryotes xx:1–12.

- Lorion, J., Duperron, S., Gros, O., Cruaud, C., and Samadi, S. 2009. Several deep-sea mussels and their associated symbionts are able to live both on wood and on whale falls. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276:177–185.
- Lynn, D. H. 2008. *The Ciliated Protozoa: Characterization, Classification, and Guide to the Literature*. Springer Netherlands.
- Lynn, D. H. 2017. *Handbook of the Protists*. Springer.
- Lynn, D. H., and Small, E. B. 2002. Phylum Ciliophora In: Lee JJ, Bradbury PC, Leedale GF (eds.). *An Illustrated Guide to the Protozoa*. Society of edn. Society of Protozoologists, Lawrence, KS:994–1022.
- MacDonald, I. R. 1992. *Chemosynthetic Ecosystems Study Chemosynthetic Ecosystems Study Literature Review and Data Synthesis*. Group I:30.
- Macintosh, D. J., and Ashton, E. C. 2004. *Principles for a code of conduct for the management and sustainable use of mangrove ecosystems*. Washington (DC): The World Bank.
- Mani, P. 1994. *Phytoplankton in Pichavaram mangroves, east coast of India*.
- Mann, K. H. 1976. *Decomposition of marine macrophytes*. Page Symposium of the British Ecological Society.
- Mantran, M., Hamparian, R., and Bouchereau, J. 2008. Évolution Morphologique de le Lagune à Mangrove de la Manche-à-Eau (Guadeloupe, Antilles Françaises) de 1950-2004, et sa Bathymétrie et sa Courantologie en 2007. Pages 287–297 61st Gulf and Caribbean Fisheries Institute.
- Mantran, M., Hamparian, R., and Bouchereau, J. 2009. Géomorphologie et hydrologie de la lagune de la Manche-à-Eau (Guadeloupe, Antilles françaises). *Geomorphology and hydrology of the Manche-à-Eau lagoon (Guadeloupe, French West Indies)*. *Géomorphologie : relief, processus, environnement* 15:199–210.
- Marchant, H., Van den Hoff, J., and Burton, H. 1987. Loricated choanoflagellates from Ellis Fjord, Antarctica including the description of *Acanthocorbis tintinnabulum* sp. nov. Page *Proceedings of the NIPR Symposium on Polar Biology*.
- Margulis, L., and Fester, R. 1991. *Symbiosis as a source of evolutionary innovation: speciation and morphogenesis*. Mit Press.

- Margulis, L., Matthews, C., and Haselton, A. 2000. Environmental evolution: effects of the origin and evolution of life on planet earth. MIT Press.
- Maurin, L. C., Himmel, D., Mansot, J.-L., and Gros, O. 2010. Raman microspectrometry as a powerful tool for a quick screening of thiotrophy: an application on mangrove swamp meiofauna of Guadeloupe (F.W.I.). *Marine environmental research* 69:382–9.
- McCollom, T. M., and Shock, E. L. 1997. Geochemical constraints on chemolithoautotrophic metabolism by microorganisms in seafloor hydrothermal systems. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 61:4375–4391.
- McKee, K. L. 1993. Soil physicochemical patterns and mangrove species distribution--reciprocal effects? *Journal of ecology*:477–487.
- Meysman, F. J. R., Risgaard-petersen, N., Malkin, S. Y., and Peter, L. 2015. ScienceDirect The geochemical fingerprint of microbial long-distance electron transport in the seafloor. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 152:122–142.
- Mitra, A., Flynn, K. J., Tillmann, U., Raven, J. A., Caron, D., Stoecker, D. K., Not, F., Hansen, P. J., Hallegraeff, G., Sanders, R., Wilken, S., McManus, G., Johnson, M., Pitta, P., Våge, S., Berge, T., Calbet, A., Thingstad, F., Jeong, H. J., Burkholder, J. A., Glibert, P. M., Granéli, E., and Lundgren, V. 2016. Defining Planktonic Protist Functional Groups on Mechanisms for Energy and Nutrient Acquisition: Incorporation of Diverse Mixotrophic Strategies. *Protist* 167:106–120.
- Montagnes, D. J. S., Barbosa, A. B., Boenigk, J., Davidson, K., Jürgens, K., Macek, M., Parry, J. D., Roberts, E. C., and Šimek, K. 2008. Selective feeding behaviour of key free-living protists: Avenues for continued study. *Aquatic Microbial Ecology* 53:83–98.
- Morga, B., and Bastin, P. 2013. Getting to the heart of intraflagellar transport using *Trypanosoma* and *Chlamydomonas* models: The strength is in their differences. *Cilia* 2.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., and Latorre, A. 2008. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics* 9:218–229.
- Mushegian, A. A., and Ebert, D. 2016. Rethinking “mutualism” in diverse host-symbiont communities. *BioEssays* 38:100–108.
- Nagelkerken, I., Blaber, S. J. M., Bouillon, S., Green, P., Haywood, M., Kirton, L. G., Meynecke, J. O., Pawlik, J., Penrose, H. M., Sasekumar, A., and Somerfield, P. J. 2008. The habitat function of mangroves for terrestrial and marine fauna: A review. *Aquatic*

Botany 89:155–185.

- Nakajima, T., Sano, A., and Matsuoka, H. 2009. Auto-/heterotrophic endosymbiosis evolves in a mature stage of ecosystem development in a microcosm composed of an alga, a bacterium and a ciliate. *BioSystems* 96:127–135.
- Nedwell, D. B., Blackburn, T. H., and Wiebe, W. 1994. Dynamic nature of the turnover of organic carbon, nitrogen and sulphur in the sediments of a Jamaican mangrove forest 110:223–231.
- Nisbet, B. 1984. *Nutrition and Feeding Strategies in Protozoa*. Springer.
- Nowack, E. C. M., and Melkonian, M. 2010. Endosymbiotic associations within protists. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365:699–712.
- Orphan, V. J., Hinrichs, K., Iii, W. U., Paull, C. K., Taylor, L. T., Sylva, S. P., Hayes, J. M., and Delong, E. F. 2001. Comparative Analysis of Methane-Oxidizing Archaea and Sulfate-Reducing Bacteria in Anoxic Marine Sediments. *Applied and Environmental Microbiology* 67:1922–1934.
- Orsi, W., Charvet, S., Vd'áčný, P., Bernhard, J. M., and Edgcomb, V. P. 2012. Prevalence of partnerships between bacteria and ciliates in oxygen-depleted marine water columns. *Frontiers in Microbiology* 3:1–8.
- Orsi, W., Edgcomb, V., Jeon, S., Leslin, C., Bunge, J., Taylor, G. T., Varela, R., and Epstein, S. 2011. Protistan microbial observatory in the Cariaco Basin, Caribbean. II. Habitat specialization. *ISME Journal* 5:1357–1373.
- Othman, M. A. 1994. Value of mangroves in coastal protection. *Hydrobiologia* 285:277–282.
- Ott, J. 1996. Sulphide ectosymbioses in shallow marine habitats. *Biosystematics and Ecology* 11:369–382.
- Ott, J., and Bright, M. 2004. Sessile Ciliates With Bacterial Ectosymbionts From Twin Cays, Belize. *Atoll Research Bulletin* 516:1–7.
- Ott, J., Bright, M., and Bulgheresi, S. 2004a. Marine Microbial Thiotrophic Ectosymbioses. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev* 42:95–118.
- Ott, J., Bright, M., and Bulgheresi, S. 2004b. Symbioses between marine nematodes and sulfur-oxidizing chemoautotrophic bacteria. *Symbiosis* 36:103–126.
- Ott, J., Bright, M., and Schiemer, F. 1998. The ecology of a novel symbiosis between a

- marine peritrich ciliate and chemoautotrophic bacteria. *Marine Ecology* 19:229–243.
- Ott, J., Novak, R., Schiemer, F., Hentschel, U., Nebelsick, M., and Polz, M. 1991. Tackling the Sulfide Gradient: A Novel Strategy Involving Marine Nematodes and Chemoautotrophic Ectosymbionts. *Marine Ecology* 12:261–279.
- Palacios, C., Zbinden, M., Pailleret, M., Gaill, F., and Lebaron, P. 2009. Highly similar Prokaryotic communities of sunken wood at shallow and deep-sea sites across the oceans. *Microbial Ecology* 58:737–752.
- Pan, H., Hu, X., Gong, J., Lin, X., Al-Rasheid, K. A. S., Al-Farraj, S. A., and Warren, A. 2011. Morphological redescription of four marine ciliates (Ciliophora: Cyrtophorida: Dysteriidae) from Qingdao, China. *European journal of protistology* 47:197–207.
- Pan, H., Lin, X., Gong, J., Al-Rasheid, K. A. S., and Song, W. 2012. Taxonomy of five species of cyrtophorids (Protozoa: Ciliophora) including consideration of the phylogeny of two new genera. *Zoological Journal of the Linnean Society* 164:1–17.
- Pan, H., Ma, H., Hu, X., Al-Rasheid, K. A. S., and Al-Farraj, S. A. 2013. Taxonomic studies on three marine ciliates from China, including a new species (Ciliophora, Cyrtophorida). *Acta Protozoologica* 52:25–33.
- Park, M.-H., and Min, G.-S. 2014. A new marine cyrtophorid ciliate, *Dysteria nabia* nov. spec. (Ciliophora: Phyllopharyngea: Cyrtophorida: Dysteriidae), from South Korea. *Acta Protozoologica* 2014:257268.
- Park, S., Choi, S. J., Park, J.-M., and Yoon, J.-H. 2017. *Umboniibacter caenipelagi* sp. nov., isolated from a tidal flat. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 67:2959–2963.
- Pascal, P. Y., Dubois, S., Boschker, H. T. S., and Gros, O. 2014. Trophic role of large benthic sulfur bacteria in mangrove sediment. *Marine Ecology Progress Series* 516:127–138.
- Pawlowski, J., and Burki, F. 2009. Untangling the phylogeny of amoeboid protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56:16–25.
- Peixoto, R., Chaer, G. M., Carmo, F. L., Araújo, F. V., Paes, J. E., Volpon, A., Santiago, G. A., and Rosado, A. S. 2011. Bacterial communities reflect the spatial variation in pollutant levels in Brazilian mangrove sediment. *Antonie van Leeuwenhoek* 99:341–354.
- Penha-Lopes, G., Torres, P., Cannicci, S., Narciso, L., and Paula, J. 2011. Monitoring

- anthropogenic sewage pollution on mangrove creeks in southern Mozambique: A test of *Palaemon concinnus* Dana, 1852 (Palaemonidae) as a biological indicator. *Environmental Pollution* 159:636–645.
- Petroni, G., Spring, S., Schleifer, K. H., Verni, F., and Rosati, G. 2000. Defensive extrusive ectosymbionts of *Euplotidium* (Ciliophora) that contain microtubule-like structures are bacteria related to Verrucomicrobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:1813–1817.
- Petz, W., Song, W., and Wilbert, N. 1995. Taxonomy and ecology of the ciliate fauna (Protozoa, Ciliophora) in the endopagial and pelagial of the Weddell Sea, Antarctica. Land Oberösterreich, OÖ Landesmuseum.
- Polz, M. F., Distel, D. L., Zarda, B., Amann, R., Felbeck, H., Ott, J. A., and Cavanaugh, C. M. 1994. Phylogenetic Analysis of a Highly Specific Association between Ectosymbiotic, Sulfur-Oxidizing Bacteria and a Marine Nematode. *Applied and Environmental Microbiology* 60:4461–4467.
- Polz, M. F., Felbeck, H., Novak, R., Nebelsick, M., and Ott, J. A. 1992. Chemoautotrophic, Sulfur-Oxidizing Symbiotic Bacteria on Marine Nematodes: Morphological and Biochemical Characterization. *Microbial Ecology* 24:313–329.
- Polz, M. F., Ott, J. A., Bregut, M., and Cavanaugh, C. M. 2000. When Bacteria Hitch a Ride Associations between sulfur-oxidizing bacteria and eukaryotes represent spectacular adaptations to environmental gradients. *ASM News-American Society for Microbiology* 66:531–539.
- Pomeroy, L. R. 2007. Microbial Loop. *Oceanography* 20:28–33.
- Precht, H. 1935. Epizoen der Kieler Bucht. *Kaiserl. Leopoldinisch-Carolinisch Dt. Akad. d. Naturforscher*.
- Preer, J. R., and Preer, L. B. 1984. Endosymbionts of protozoa. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 1:795–811.
- Preer, L. B. 1969. Alpha, an Infectious Macronuclear Symbiont of *Paramecium aurelia*. *The Journal of Protozoology* 16:570–578.
- Puytorac, P. 1994. *Traité de zoologie. Anatomie, systématique et biologie. Tome 2 Fasc. 2 Infusoires ciliés: systématique.* Paris: Masson.

- Qu, Z., Wang, C., Gao, F., Li, J., Al-Rasheid, K. A. S., and Hu, X. 2015. Taxonomic studies on seven species of *Dysteria* (Ciliophora, Cyrtophoria), including a description of *Dysteria paraprocera* sp. n. *European Journal of Protistology* 51:241–258.
- Radek, R. 2010. Adhesion of Bacteria to Protists. *Prokaryotic Cell Wall Compounds: Structure and Biochemistry*:429–456.
- Raikov, I. B. 1971. Bactéries épizoïques et mode de nutrition du cilié psammophile *Kentrophoros fistulosum* Fauré-Fremiet (étude au microscope électronique). *Protistologica* 7:365–378.
- Raikov, I. B. 1974. Étude ultrastructurale des Bactéries épizoïques et endozoïques de *Kentrophoros latum* Raikov, Cilié holotriche mésopsammique. *Cahiers de Biologie Marine* 3:379–393.
- Rajabunizal, K., and Ramanibai, R. 2011. Presence of an epibiont *Epistylis niagarae* (Protozoa, Ciliophora) on *Mesocyclops aspericornis* in Velachery Lake, Chennai, India. *J. Biol. Sci* 11:189–195.
- Ramirez-Llodra, E., Brandt, A., Danovaro, R., De Mol, B., Escobar, E., German, C. R., Levin, L. A., Martinez Arbizu, P., Menot, L., Buhl-Mortensen, P., Narayanaswamy, B. E., Smith, C. R., Tittensor, D. P., Tyler, P. A., Vanreusel, A., and Vecchione, M. 2010. Deep, diverse and definitely different: Unique attributes of the world's largest ecosystem. *Biogeosciences* 7:2851–2899.
- Raven, P. H., Mason, K. A., Johnson, G. B., Losos, J. B., Singer, S. R., Bouharmont, J., Masson, P. L., and Van Hove, C. 2017. *Biologie*. De Boeck supérieur.
- Revsbech, N. P., Madsen, B., and Barker Jmgensen, B. 1986. Oxygen production and consumption in sediments determined at high spatial resolution by computer simulation of oxygen microelectrode data I. *Limnol. Oceanogr* 31:293–304.
- Ricard, M. 1984. Primary production in mangrove lagoon waters. *Hydrobiology of the Mangal*:163–178.
- Rinke, C. 2002. Carbon fixation, incorporation and transfer in the chemoautotrophic *Zoothamnium niveum* symbioses with <sup>14</sup>C bicarbonate autoradiography. University of Vienna.
- Rinke, C., Lee, R., Katz, S., and Bright, M. 2007. The effects of sulphide on growth and behaviour of the thiotrophic *Zoothamnium niveum* symbiosis. *Proceedings. Biological*

sciences / The Royal Society 274:2259–2269.

- Rinke, C., Schmitz-Esser, S., Loy, A., Horn, M., Wagner, M., and Bright, M. 2009. High genetic similarity between two geographically distinct strains of the sulfur-oxidizing symbiont "*Candidatus Thiobios zoothamnicoli*." FEMS Microbiology Ecology 67:229–241.
- Rinke, C., Schmitz-Esser, S., Stoecker, K., Nussbaumer, A. D., Molnár, D. A., Vanura, K., Wagner, M., Horn, M., Ott, J. A., and Bright, M. 2006. "*Candidatus thiobios zoothamnicoli*," an ectosymbiotic bacterium covering the giant marine ciliate *Zoothamnium niveum*. Applied and Environmental Microbiology 72:2014–2021.
- Rivera-Monroy, V. H., Day, J. W., Twilley, R. R., Vera-Herrera, F., and Coronado-Molina, C. 1995. Flux of nitrogen and sediment in a fringe mangrove forest in Terminos Lagoon, Mexico. Estuarine, Coastal and Shelf Science 40:139–160.
- Rivera - Monroy, V. H., and Twilley, R. R. 1996. The relative role of denitrification and immobilization in the fate of inorganic nitrogen in mangrove sediments (Terminos Lagoon, Mexico). Limnology and Oceanography 41:284–296.
- Robertson, A. I., and Blaber, S. J. M. 1993. Plankton, epibenthos and fish communities. Tropical mangrove ecosystems:173–224.
- Roger, A. J., and Simpson, A. G. B. 2009. Evolution: Revisiting the Root of the Eukaryote Tree. Current Biology 19:R165–R167.
- Rojas, A., Holguin, G., Glick, B. R., and Bashan, Y. 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N<sub>2</sub>-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. FEMS Microbiology Ecology 35:181–187.
- Romanenko, L. A., Tanaka, N., and Frolova, G. M. 2010. *Umboniibacter marinipuniceus* gen. nov., sp. nov., a marine gammaproteobacterium isolated from the mollusc *Umbonium costatum* from the Sea of Japan. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 60:603–609.
- Rosati, G. 2004. Ectosymbiosis in ciliated protozoa. Symbiosis: Mechanisms and Model Systems:477–488.
- Rosati, G. 2005. Extrusive Bacterial Ectosymbiosis of Ciliates. Progress in Molecular and Subcellular Biology:98–115.

- Rosati, G., Petroni, G., Quochi, S., Modeo, L., and Verni, F. 1999. Epixenosomes: Peculiar epibionts of the hypotrich ciliate *Euplotidium itoi* defend their host against predators. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 46:278–282.
- Rothschild, L. J., and Mancinelli, R. L. 2001. Life in extreme environments (nature).PDF. *Nature* 409:1092–1101.
- Ruggiero, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoign, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., and Kirk, P. M. 2015. A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE* 10:1–60.
- Saifullah, A. S. M., Kamal, A. H. M., Idris, M. H., Rajae, A. H., and Bhuiyan, M. K. A. 2016. Phytoplankton in tropical mangrove estuaries: role and interdependency. *Forest Science and Technology* 12:104–113.
- Sauerbrey, E. 1928. Beobachtungen über einige neue oder wenig bekannte marine Ciliaten. *na*.
- Sauvadet, A. 2015. Interactions entre ciliés et métazoaires dans deux environnements marins contrastés : les sources hydrothermales et les sédiments anoxiques. Paris 6.
- Schoedel. 2006. Epizoic *Zoothamnium* species on gammarids, including a description of a new genus with heteropolar swarmer: *Zoothamnioides femoralis* n. g., n. sp. (Ciliophora, Peritrichia). *Lauterbornia* 56:99–140.
- Schrallhammer, M. 2010. The killer trait of *Paramecium* and its causative agents. *Palaeodiversity* 3:79–88.
- Schuster, L., and Bright, M. 2016. A novel colonial ciliate *Zoothamnium ignavum* sp. nov. (Ciliophora, Oligohymenophorea) and its ectosymbiont *Candidatus Navis piranensis* gen. nov., sp. nov. from shallow-water wood falls. *PLoS ONE* 11:1–24.
- Schweikert, M. 2013. Symbiotic Associations Between Ciliates and Prokaryotes. *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*:427–463.
- Shen, Y. 1980. Ecological studies on the periphytic protozoa in Lake Dong Hu, Wuhan. *Acta Hydrobiologica Sinica* 7:8–40.
- Sherr, B. F., and Sherr, E. B. 2008. Understanding roles of microbes in marine pelagic food webs : a brief history. *Microbial Ecology of the Oceans*:1–24.
- Sherr, E. B., and Sherr, B. F. 1994. Bacterivory and herbivory: Key roles of phagotrophic

- protists in pelagic food webs. *Microbial Ecology* 28:223–235.
- Sherr, E. B., and Sherr, B. F. 2002. Significance of predation by protists. *Antonie van Leeuwenhoek* 81:293–308.
- Shinzato, N., and Kamagata, Y. 2010. The Methanogenic and Eubacterial Endosymbionts of *Trimyema*. Pages 35–53 in Hackstein, J. H. P., editor. (Endo)symbiotic Methanogenic Archaea. Springer Science & Business Media, 2010.
- Sibbald, S. J., and Archibald, J. M. 2017. More protist genomes needed. *Nature Ecology & Evolution* 1:0145.
- Silar, P. 2016. Protistes Eucaryotes.
- Silver, M. W., Gowing, M. M., Brownlee, D. C., and Corliss, J. O. 1984. Ciliated protozoa associated with oceanic sinking detritus. *Nature* 309:246–248.
- Simpson, A. G. B. 2003. Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:1759–1777.
- Smith, C. R., and Baco, A. R. 2003. Ecology of whale falls at the deep-sea floor. *Oceanography and Marine Biology*, Vol 41 41:311–354.
- Smith, D. C., and Douglas, A. E. 1987. *The biology of symbiosis*. Edward Arnold (Publishers) Ltd.
- Smith, H., and Coupe, S. 2002. Testate amoebae-past, present and future. *European journal of protistology* 37:367–370.
- Smurov, A. O., and Fokin, S. I. 1999. Resistance of *Paramecium* Species ( Ciliophora , Peniculia ) to Salinity of Environment. *Protistology* 1:43–53.
- Sommer, G. 1951. Die peritrichen Ciliaten des Großen Plöner Sees. *Archives of hydrobiology* 44:349–440.
- Song, W. 1992. A new marine ciliate, *Zoothamnium penaei* sp. nov.(Ciliophora, Peritrichida). *Oceanol. Limnol. Sin* 23:90–94.
- Song, W. 1997. A new genus and two new species of marine peritrichous ciliates (Protozoa, Ciliophora, Peritrichida) from Qingdao, China. *Ophelia* 47:203–214.
- Song, W. 2003a. Ectocommensal peritrichs on the cultured shrimps. *Pathogenic Protozoa in Mariculture*. Science Press, Beijing:13–48.

- Song, W. 2003b. On two marine cyrtophorid ciliates from China, with description of *Chlamydonella derouxi* nov. spec. and *Orthotrochilia pilula* (Deroux, 1976) nov. comb., and reestablishment of the genus *Orthotrochilia* nov. gen. (Protozoa, Ciliophora, Cyrtophorida). *Hydrobiologia* 499:169–177.
- Song, W., and Packroff, G. 1997. Taxonomische untersuchungen an marinen ciliaten aus China mit beschreibungen von zwei neuen arten, *Strombidium globosaneum* nov. spec. and *S. platum* nov. spec. (Protozoa, Ciliophora). *Archiv für Protistenkunde* 147:331–360.
- Song, W., and Warren, A. 2000. A redescription of *Pseudovorticella patellina* (OF Muller, 1776) nov. comb., a peritrichous ciliate (Protozoa: Ciliophora: Peritrichida) isolated from mariculture biotopes in north China. *Acta Protozoologica* 39:43–50.
- Song, W., and Wilbert, N. 2002. Faunistic studies on marine ciliates from the Antarctic benthic area, including descriptions of one epizoic form, 6 new species and, 2 new genera (Protozoa: Ciliophora). *Acta Protozoologica* 41:23–62.
- Sonneborn, T. M. 1959. Kappa and Related Particles in *Paramecium*. Pages 229–356 *Advances in virus research*. Elsevier.
- Spalding, M. D., Blasco, F., and Field, C. D. 1997. World Mangrove Atlas. Page (Spalding, M. D., Blasco, F., and Field, C. D., Eds.) *The international Society for Mangrove Ecosystems*. Okinawa, Japan.
- Speijer, D., Lukeš, J., and Eliáš, M. 2015. Sex is a ubiquitous, ancient, and inherent attribute of eukaryotic life. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112:8827–8834.
- Springer, N., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., and Schmidt, H. 1996. *Polynucleobacter necessarius*, an obligate bacterial endosymbiont of the hypotrichous ciliate *Euplotes aediculatus*, is a member of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *FEMS Microbiology Letters* 135:333–336.
- Springer, N., Ludwig, W., Amann, R., Schmidt, H. J., Görtz, H. D., and Schleifer, K.-H. 1993. Occurrence of fragmented 16S rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of *Paramecium caudatum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:9892–9895.
- Stanley, S. O., Boto, K. G., Alongi, D. M., and Gillan, F. T. 1987. Composition and bacterial utilization of free amino acids in tropical mangrove sediments. *Marine Chemistry* 22:13–30.

- Stewart, F. J., Newton, I. L. G., and Cavanaugh, C. M. 2005. Chemosynthetic endosymbioses: Adaptations to oxic-anoxic interfaces. *Trends in Microbiology* 13:439–448.
- Stiller, J. 1946. Beitrag zur Kenntnis der Peritrichenfauna der Schwefelthermen von Split. *Annl's hist-nat Mus nat hung* 39:19–56.
- Stocker, R., and Seymour, J. R. 2012. Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean. *Microbiology and molecular biology reviews* 76:792.
- Stoeck, T., Behnke, A., Christen, R., Amaral-Zettler, L., Rodriguez-Mora, M. J., Chistoserdov, A., Orsi, W., and Edgcomb, V. P. 2009. Massively parallel tag sequencing reveals the complexity of anaerobic marine protistan communities. *BMC biology* 7:72.
- Stoecker, D. K., Johnson, M. D., de Vargas, C., and Not, F. 2009. Acquired phototrophy in aquatic protists. *Aquatic Microbial Ecology* 57:279–310.
- Stolz, J. F. 2000. Structure of microbial mats and biofilms. Pages 1–8 *Microbial sediments*. Springer.
- Stump, W. T., and Hall, K. B. 1993. SP6 RNA polymerase efficiently synthesizes RNA from short double-stranded DNA templates. *Nucleic Acids Research* 21:5480–5484.
- Sun, P., Clamp, J., Xu, D., Huang, B., and Shin, M. K. 2016. An integrative approach to phylogeny reveals patterns of environmental distribution and novel evolutionary relationships in a major group of ciliates. *Nature Publishing Group*:1–12.
- Sung, H.-R., Kim, M., and Shin, K.-S. 2015. *Umboniibacter roseus* sp. nov., isolated from coastal seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 65:4221–4226.
- Tam, N. F., Vrijmoed, L. L. P., and Wong, Y. S. 1990. Nutrient dynamics associated with leaf decomposition in a small subtropical mangrove community in Hong Kong. *Bulletin of Marine Science* 47:68–78.
- Taylor, G. T., Iabichella, M., Ho, T., Scranton, M. I., Thunell, R. C., Muller-karger, F., and Varela, R. 2001. Chemoautotrophy in the redox transition zone of the Cariaco Basin : A significant midwater source of organic carbon production. *Limnology and Oceanography* 46:148–163.
- Taylor, G. T., and Sullivan, C. W. 1984. The use of <sup>14</sup>C-labeled bacteria as a tracer of ingestion and metabolism of bacterial biomass by microbial grazers. *Journal of*

- Microbiological Methods 3:101–124.
- Taylor, W. D., and Sanders, R. W. 2010. Protozoa. Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates:49–90.
- Thong, K. L., Sasekumar, A., and Marshall, N. 1993. Nitrogen concentrations in a mangrove creek with a large tidal range, Peninsular Malaysia. *Hydrobiologia* 254:125–132.
- Toledo, G., Bashan, Y., and Soeldner, A. 1995. Cyanobacteria and black mangroves in Northwestern Mexico: colonization, and diurnal and seasonal nitrogen fixation on aerial roots. *Canadian Journal of Microbiology* 41:999–1011.
- Tucolesco, J. 1962. Études protozoologiques sur les eaux roumaines I. Espèces nouvelles d'infusoires de la Mer Noire et des bassins salés paramarins. *Arch. Protistenkd* 106:1–36.
- Tunnicliffe, V., Juniper, S. K., and Sibuet, M. 2003. Reducing Environments of the Deep-Sea Floor. *Ecosystems of the world: The Deep-Sea*:81–110.
- Ulloa, O., and Grob, C. 2013. Marine Pelagic Ecosystems. *Surface Ocean-Lower Atmosphere Processes*:119–137.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M., and Rozen, S. G. 2012. Primer3-new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40:1–12.
- Utz, L. R. P., and Eizirik, E. 2007. Molecular phylogenetics of subclass Peritrichia (Ciliophora: Oligohymenophorea) based on expanded analyses of 18S rRNA sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54:303–305.
- Vannini, C., Ferrantini, F., Ristori, A., Verni, F., and Petroni, G. 2012. Betaproteobacterial symbionts of the ciliate *Euplotes*: Origin and tangled evolutionary path of an obligate microbial association. *Environmental Microbiology* 14:2553–2563.
- Vannini, C., Ferrantini, F., Verni, F., and Petroni, G. 2013. A new obligate bacterial symbiont colonizing the ciliate *Euplotes* in brackish and freshwater: “*Candidatus* Protistobacter heckmanni.” *Aquatic Microbial Ecology* 70:233–243.
- Vannini, C., Lucchesi, S., and Rosati, G. 2007. *Polynucleobacter*: symbiotic bacteria in ciliates compensate for a genetic disorder in glycogenolysis. *Symbiosis (Rehovot)* 44:85–91.
- Vannini, C., Petroni, G., Schena, A., Verni, F., and Rosati, G. 2003. Well-established

- mutualistic associations between ciliates and prokaryotes might be more widespread and diversified than so far supposed. *European Journal of Protistology* 39:481–485.
- Vannini, C., Petroni, G., Verni, F., and Rosati, G. 2005. *Polynucleobacter* bacteria in the brackish-water species *Euplotes harpa* (ciliata hypotrichia). *Journal of Eukaryotic Microbiology* 52:116–122.
- Vannini, C., Rosati, G., Verni, F., and Petroni, G. 2004. Identification of the bacterial endosymbionts of the marine ciliate *Euplotes magnicirratu*s (Ciliophora, Hypotrichia) and proposal of ‘*Candidatus Devosia euplotis*.’ *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54:1151–1156.
- Vannini, C., Sigona, C., Hahn, M., Petroni, G., and Fujishima, M. 2017. High degree of specificity in the association between symbiotic betaproteobacteria and the host *Euplotes* (Ciliophora, Euplotia). *European Journal of Protistology* 59:124–132.
- Vazquez, P., Holguin, G., Puente, M. E., Lopez-Cortes, A., and Bashan, Y. 2000. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal lagoon. *Biology and Fertility of Soils* 30:460–468.
- Verna, C., Ramette, A., Wiklund, H., Dahlgren, T. G., Glover, A. G., Gaill, F., and Dubilier, N. 2010. High symbiont diversity in the bone-eating worm *Osedax mucofloris* from shallow whale-falls in the North Atlantic. *Environmental Microbiology* 12:2355–2370.
- Verni, F., and Rosati, G. 1990. Peculiar Epibionts in *Euplotidium itoi* (Ciliata, Hypotrichida). *The Journal of Protozoology* 37:337–343.
- Visse, M. 2007. Detrimental effect of peritrich ciliates (*Epistylis* sp.) as epibionts on the survival of the copepod *Acartia biflosa*. *Proc. Estonian Acad. Sci. Biol. Ecol* 56:173–178.
- Volland, J. M., Schintlmeister, A., Zambalos, H., Reipert, S., Mozetič, P., Espada-Hinojosa, S., Turk, V., Wagner, M., and Bright, M. 2018. NanoSIMS and tissue autoradiography reveal symbiont carbon fixation and organic carbon transfer to giant ciliate host. *ISME Journal*:1–14.
- Vopel, K., Pöhn, M., Sorgo, A., and Ott, J. 2001. Ciliate-generated advective seawater transport supplies chemoautotrophic ectosymbionts. *Marine Ecology Progress Series* 210:93–99.
- Vopel, K., Reick, C. H., Arlt, G., Pöhn, M., and Ott, J. a. 2002. Flow microenvironment of

- two marine peritrich ciliates with ectobiotic chemoautotrophic bacteria. *Aquatic Microbial Ecology* 29:19–28.
- Wagener, S., Bardele, C. F., and Pfennig, N. 1990. Functional integration of *Methanobacterium formicicum* into the anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. *Archives of Microbiology* 153:496–501.
- Wallner, G., Amann, R., and Beisker, W. 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14:136–143.
- Warren, A. 1986. A revision of the genus *Vorticella* (Ciliophora, Peritrichida). *Bulletin of the British Museum, Natural History. Zoology* 50:1–57.
- Warren, A. 1987. A revision of the genus *Pseudovorticella* Foissner & Schiffmann, 1974 (Ciliophora: Peritrichida). *Bulletin of the British Museum, Natural History. Zoology* 52:1–12.
- Warren, A. 1988. A revision of *Haplocaulus* Precht, 1935 (Ciliophora: Peritrichida) and its morphological relatives. *British Museum (Natural History)*.
- Waterbury, J. B., Calloway, C. B., and Turner, R. D. 1983. A cellulolytic nitrogen-fixing bacterium cultured from the gland of Deshayes in shipworms (Bivalvia: Teredinidae). *Science* 221:1401–1403.
- Wattayakorn, G., Ayukai, T., and Sojisuporn, P. 2000. Material transport and biogeochemical processes in Sawi Bay, Southern Thailand. *Phuket marine biological Center Special Publication* 22:63–77.
- Wbi-Bo, S. 1986. Descriptions of seven new species of peritrichs on *Penaeus orientalis* (Peritrichia: Zoothamnidae, Epistylidae). *Acta Zootaxonomica Sinica* 3:0.
- Weisse, T. 2017. Functional diversity of aquatic ciliates. *European Journal of Protistology*.
- Wetzel, R. G. 2001a. *Limnology: Lake and River Ecosystems*. Academic Press.
- Wetzel, R. G. 2001b. Protists: Key Ecosystem Regulators. *BioScience* 51:997.
- Whittaker, R. H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. *Science* 163:150–160.
- Whittaker, R. H., and Margulis, L. 1978. Protist classification and the kingdoms of organisms. *BioSystems* 10:3–18.
- Wichterman, R. 1942. A new ciliate from a coral of Tortugas and its symbiotic algae. *Pap*

- Tortugas Lab 33:107–111.
- Van der Wielen, P. W. J. J., Bolhuis, H., Borin, S., Daffonchio, D., Corselli, C., Giuliano, L., D'auria, G., de Lange, G. J., Huebner, A., and Varnavas, S. P. 2005. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science* 307:121–123.
- Wilbert, N. 1971. Morphologie und Ökologie einiger neuer Ciliaten (Holotricha, Cyrtophorina) des Aufwuchses. *Protistologica* 7:357–363.
- Wilbert, N., and Song, W. 2005. New contributions to the marine benthic ciliates from the Antarctic area, including description of seven new species (Protozoa, Ciliophora). *Journal of Natural History* 39:935–973.
- Woese, C. R., and Fox, G. E. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 74:5088–5090.
- Wolanski, E., Mazda, Y., and Ridd, P. 1993. Mangrove hydrodynamics. *Tropical mangrove ecosystems*:43–62.
- Woodroffe, C. 1992. Mangrove sediments and geomorphology. *Tropical mangrove ecosystems*:7–41.
- Woodroffe, C. D., Bardsley, K. N., Ward, P. J., and Hanley, J. R. 1988. Production of mangrove litter in a macrotidal embayment, Darwin Harbour, NT, Australia. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 26:581–598.
- Yoon, H. S., Price, D. C., Stepanauskas, R., Rajah, V. D., Sieracki, M. E., Wilson, W. H., Yang, E. C., Duffy, S., and Bhattacharya, D. 2011. Single-cell genomics reveals organismal interactions in uncultivated marine protists. *Science* 332:714–717.
- Yoshida, M., Nakayama, T., and Inouye, I. 2009. *Nuclearia thermophila* sp. nov. (Nucleariidae), a new nucleariid species isolated from Yunoko Lake in Nikko (Japan). *European Journal of Protistology* 45:147–155.
- Zhao, S., Burki, F., Brte, J., Keeling, P. J., Klaveness, D., and Shalchian-Tabrizi, K. 2012. *Collodictyon* an ancient lineage in the tree of eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 29:1557–1568.
- Zhuang, Y., Clamp, J. C., Yi, Z., and Ji, D. 2016. A new Peritrich Ciliate from a Hypersaline Habitat in Northern China. *Zootaxa*; Vol 4169, No 1: 19 Sept. 2016.
- Zhuang, Y., Clamp, J. C., Yi, Z., and Ji, D. 2018. Phylogeny of the families Zoothamniidae

and Epistylididae (Protozoa: Ciliophora: Peritrichia) based on analyses of three rRNA-coding regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 118:99–107.

Zinder, S. H., and Dworkin, M. 2006. Morphological and physiological diversity. Pages 185–220 *The Prokaryotes*. Springer.

## ANNEXES

### Annexe 1 : Liste des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries présentes dans le cytoplasme de *Trochochilodon* sp. isolat Guadeloupe obtenues après clonage

Nom	Nombre de séquences issues de constructions différentes	Séquence consensus	Longueur de la séquence	Séquence la plus proche d'après les analyses BLAST	Pourcentage d'identité
<i>Umboniibacter</i> sp. souche Guadeloupe	8	MH558667	1458	DQ285073	99,6%
Uncultured bacteria clone	4	GGATCCAGACTTTGATTMTGGCTCAGAACAAACGCTGACGGCAGTCA TAATACATGCAAGTCAACGAGAATAAAAATAAAAGTTATTTTGCTTGC AAAATAATGGATAGGATATTCTAGTGCGAACGGGTGAGTAATGCAC AGGAACGTGCCCTTTAGTGGGGGATAAAAATACCGCATGATTCGTAAC ATTAAGTTGACGACAAAAGGTAATGTTAAAGTTATCGCTAAAAGGATCG GCCTGTGTCCAGTAAGTTAAGTGGGGTAACGGCCTACTTATTTAAC GTGGGTAGCTGGTCTGGGAGGACGATCAGCCACAGTGGGATTGAGAT AAGGCCATACTTCTTTTGAAGGCAGCAGTAGGGAATTTTGGACAATG AAGGAACTTTGATCCAGACATGCCGTGTGAGTGATGAAGGCATTTTT GTTGTA AAACTCTTCCAATGGGAAATAAAAAAATGAAGGTACCCATA TAACTTTGGTTTATGTAAGAAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAG CCGCGGTAAGACGGGGGTGCGAGTGTTGTTTCGGAATTATTGGGCGT AAAGCGCGTGTAGATGGAATAACAAGTCTATAATTAATACCGGGGC TCAACTCCGGAGGTGTTATGAAAAGTGTCTTAGAGATCGGGAGAG GTAGGCAGAATTCCTGTAGTATTAGGGTAAAAATCTATAGATAGCAGG AGGAATACCAAAGGCGAAAGCAGCCTACTGGAACGTTTCTGACATTA AGACGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC CACGCCGTAACGATGAGAGCTAAGACATTGGACATTTGTTTCAGTTTA CGAAGCTAACGCGATAAGCTCTCCGCTTGAAGTATAGACGCAAGT CCGAAACTTAAAGGAATTGACGGGACCCGCACAAGCGGTGGAACAT GTGGTTTAATTCAATGGTACACGATAAACCTTACCAGTCTTGACATG TTTTTTATAGATTCGTCTATAGATTTACAGGTGTGTCATGACCGTCGT CAGTTTCGTGTCGTGAGATGTCTGGTTAAGTCCAGGAACGAACGCAAC CCTTATCCTTAGTTGCCTATTTTTATAAATAGGTTCTTTAAGGAGACTG	1493	JF948160	90,1%

		CCAATGATGAATTGGAGGAAGGAGAGGATAATGTCAGGTAGCATGAC CCTTATGGACTGGGCTACACATGTGTTACAATGGTAAATACAATAAGA GCAATGGAGTGATCCTGAGCTAAATCTTTAAAGTTTATCCTAATTCGG ATTGGTCCCTGCAACTCGGGATCATGAAGTAGGAATCGCTAGTAATCG CAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCTCGGTCTTGTACACACCG CCCGTCGCGTCAGGGGAATTGATTGACTTAAGGCCGTAAGCCCTAACC AGTTTTACTGGATGGGAGCGGCGCACGGAATATTGATGACCAGGACT AAGTCGTAACAAGGTAACG			
<i>Marinobacterium</i> clone	3	GGATCCAGACTTTGATTCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCT AACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCATTTCAGCTTGCTGGAAGATGA CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACCGTAGGAATCTACCGAGTAGTGG GGGACAACCAGTGGAAACGCTGGCTAATACCGCATACGCCCTACGGG GGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTATTGATGAGCCTGCGTG AGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAGGCTCACCAAGGCAACGATCTCT AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTCGGGTTG TAAAGCACTTTCAGCAGTGAGGAAAGGTTAGTCGTTAATACCGGCTA GCTGTGACGTTAACTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC AGCCCGGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC GTAAAGCGCGCTAGGTGGATTGGTCAGTCAGATGTGAAAGCCCCGG GCTCAACCTGGGAAGTGCACCTGATACTGCCAGTCTTGAGTACGGTAG AGGGCAGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGACTGATACTGACACTG AGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTC CACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTTGTTGGGAGGCTTGACCTCTAG TAACGAAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG CATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGTCTTGAC ATCCTGCGAACTTGCCAGAGATGGCTTGGTGCCTTCGGGAGCGCAGA GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGT TAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCCCTATTYGCCAGCACTTCG GGTGGGAACTCTAGGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTG GGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGRCCAGGGCTACACACG TGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCTGCGAACTCGCGAGGGTAAGCA AATCTCAGAAAACCGGTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACT GCGTGAAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTG AATACGTTCCCGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTG GGTTGCACCAGAAGTAGCTAGACTAACCTTCGGGGGGTTCGGTTACCA CGGTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACG	1507	FJ202983	98,5%
<i>Pseudomonas</i> sp. clone	5	CGTTACCTTGTTACGACTTACCCAGTCATGAATCACTCCGTGGTAA CCGTCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTGGAGCAACCCACTCCC ATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGATTACCGT GACATTCTGATTCACGATTACTAGCGATTCCGACTTACGCAGTCGAG TTGCAGACTGCGATCCGGACTACGATCGGTTTTATGGGATTAGCTCCA CCTCGCGGCTTGGAACCCCTTGTACCGACCATTGTAGCACGTGTGTA GCCCAGGCCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCT CCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATTAYGTGCTG	1505	KR012212	99,9%

		<p>GTAAC TAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACAT  CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTGAGAGCT  CCCCAAGGCACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGCATGTCAAGGCC  TGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTTCGAATTAACACATGCTCCACCGC  TTGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTAAACCTTGCGGCCGTA  CTCCCCAGGCGGTGACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGATCTCA  AGGATCCCAACGGCTAGTCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGG  GTATCTAATCCTGTTTCTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTAT  TAGCCCAGGTGGTGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGC  ANTTTCACCGCTACACAGGAAATCCACCACCCTCTGCCATACTCTAG  CTTGCCAGTTTGGATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCGGGCTTTCACA  TTCAACTTAACAAACCACCTACGCGCGCTTACGCCCAGTAATCCGA  TTAACGCTTGACCCCTTCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGAAGTTAG  CCGGTGCTTATTCTGTGCGTAACGTCAAAACACTAACGTATTAGATTA  ATGCCCTTCCTCCCAACTTAAAGTGCTTACAATCCGAAGACCTTCTTC  ACACACGCGGCATGGCTGGATCAGGCTTTCGCCATTGTCCAATATTC  CCCCTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTG  TGACTGATCATCTCTCAGACCAGTTACGGATCGTCGCCTTGGTGAGC  CATTACCTACCAACTAGCTAATCCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGC  AAGGCCGAAGGTCCCCTGCTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTATTA  GCGTTCTTTCGAAACGTTGTCCTCCACTACCAGGCAGATTCCTAGGC  ATTACTCACCCGTCGCCGCTGAATCATGGAGCAAGCTCCACTCATCC  GCTCGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCA  TAATCAAAGTCTGGATCC</p>			
<i>Thiovolum</i> sp. strain karukerense clone	2	<p>GGATCCAGACTTTGATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCGTGCCT  AACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGCCTCTTCGGAGGGCTGACGAG  TGGCGAACGGGTGAGTAATGGATAGTTACATGCCCTTGGAGAGGGA  CACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCTCATACTCCGAAACGGGAA  ACGATTTTTCGCCAAGGGATTGGGCTATCTCCTATCAGCTAGTTGGTA  AGGTAAGGCTTACCAAGGCTATGACGGGTAGCTGGTTTGAGAGGAT  GATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTACGGGAGG  CAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGCAACCCTGACGCAGCAAC  GCCGCGTGGAGGATGACGCATTTCCGGTGTGTAACCTCTTTTATCAGA  GAAGATTATGACGGTACCTGATGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGC  CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTACTCGGAATCACT  GGGCGTAAAGAGAATGTAGGCGGATTATTAAGTTCTGAGTGAAAGCC  TGTGGCTCAACCATGGAAGTCTTGAAAACCTGATAATCTTGAGTTCG  GAAGGGGCAGATGGAATTTCCAGTGTAGGGGTAATAATCCGTAGATAT  TGGAAGGAATACCAAAAAGCGAAGGCGATCTGCTGGGACGATACTGAC  GCTGAGATTGCAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT  AGTCCACGCCCTAAACGATGAATGCTAGTCGTCGGGGAGCTAATGTCT  CTTCGGTGATGCACTTAACAGATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGG  TCGCAAGATTAATAACTCAAAGGAATAGACGGGGACCCGCACAAGTGG  TGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGATACGCGAAAAACCTTACCTACCC  TTGACATTGATAGAAATTCGACAGAGATGTGGAAGTGCCTTCGGGGA  GCTTGAAAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGAT  GTTGGGTTAAGTCCGCAACGAGCGCAACCCTTGCTCTATGTTGCCAG  CACATAATGGTGGGAACCTCATGGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAG  GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCT</p>	1470	KX641474	87,3%

		ACACACGTGCTACAATGGTCGGTACAAAAGGTTGCCAAGCCGCGAGG TGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCA ACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATG TCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCA TGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGAC GGTTACCACGGAGTTATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA ACG			
<b>Uncultured gamma- protéobacteria clone</b>	2	GGATCCAGACTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTT AACACATGCAAGTCGAGCGGAAACGATGGGAGCTTGCTCCCAGGCGT CGAGCGGGCAGGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTACCCAGTAGAGG GGGATAGCCCCGGGAAACCCGGATTAATACCGCATACGCCCTAAGGG GGAAAGCCGGGATCTTCGGACCGGTCCTATTGGATRAGCCTGCGT AAGRITAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTT TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGT CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCG CARGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTCTAGGGTT GTAAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAGGCCAGAGGCTTAATAAGCCTT TGGATTGACGTTACCTACAGAAGCAGCACCGGCTAACCTCCGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG CGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTGTAAAGTGTGATGTGAAAAGCCAG GGCTCAACCYTGAACTGCATCACATACTAGCAGGCTAGAGTACGGT AGAGGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGT GGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCCTGGATCGATACTGACGC TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGCCGTTGGGAGGGTAATCCTTTT AGTGGCGCAGCTAACGCTCTAAGTTGACCGCTGGGGAGTACGGTCG CAAGATTA AAACTCAAATGAATTGACGGGGCCCGCACAAGCGGTGG AGCATGTGGTTTAATTGACGCAACGCRAAGAACCTTACCTGGTCTTG ACATCCTGCGAACTTTCTAGAGATAGATTGGTGCCTTCGGGAACGCAG TGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGG TTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTATTTGCCATCATTYA GTTGGGCACTCTAGGGAGACTGCCGTTGACAAACCGGAGGAAGGTGG GGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGT GCTACAATGGAGCGTACAAAGGGTTGCAACCCCGGAGGGTGAAGTA ATCCATAAAAACGTTTCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTG CGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGA ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCCGTCACACCATGGGAGTGG GTTGCAAAAAGAAGTGGGTAGCATAACCTTCGGGAGTGCCTCACCAC TTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACG	1506	AB262376	99,7%
<b>Endosymbiont of <i>Osedax mucofloris</i> clone</b>	1	ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACA GGAGTAGCTTGCTACTCGCTGACGAGCGGGCAGGGGTGAGTAACGC GTAGGAATCTACCGGGTAGTGGGGGACAACCAGTGGAAACGCTGGCT AATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTT GCGCTATTCGATGAGCCTGCGTGAGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAG GCTACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCC ACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG GGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTG TGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCAGTGAGGAAA	1482	FJ202983	95,5%

		<p>GGCGTGTAGTTAATACCTGCATGCTGTGACGTTAACTGCAGAAGAGG  CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAGGGTGCAA  GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGATTGGT  CAGTCAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCACCTGAT  ACTGCCAGTCTCGAGTACGGTAGAGGGCAGTGGAAATTCCTGTGTAGC  GGTAAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACT  GCCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAC  AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCTACTAGTT  GTTGGGAGGCTTGACCTCTTAGTAACGAAGCTAACGCGATAAGTAGA  CCGCCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTAAAACTCAAATGAATTGACG  GGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGC  GAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCTGCGAACTTGCTAGAGATAGC  TTGGTGCCTTCGGGAGCGCAGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTA  GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCT  TGTCCTATGTTGCCAGCACATAATGGTGGAACTCATGGGAGACTGCC  GGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC  CTTACGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGGGGATACAAAACGGT  TGCGAAGCAGTGATGTGGAGCTAATCTGAGAAAGTCTCTCGTAGTCC  GGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  CGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACAC  CGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTGGCTAGTCTA  ACCTTCGGGGGACGGTCACCACGGAGTGATTCATGACTGGGGTGAA  GTCGTAACAAGGTAACG</p>			
<p><b>Uncultured  symbiont of <i>Osedax  mucofloris</i> clone</b></p>	1	<p>GGATCCAGACTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCT  AACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCATTTCAGCTTGCTGAAAGATGA  CGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTACCGAGTAGTGG  GGGACAACCAGTGGAAACGCTGGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGG  GGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTATTTGATGAGCCTGCGTG  AGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAGGCTACCAAGGCAACGATCTCT  AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCC  CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC  AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTAAGAAGGCCCTTCGGGTTG  TAAAGCACTTTCAGCAGTGAGGAAAGGTTAGTCGTTAATACCGGCTA  GCTGTGACGTTAACTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC  AGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGC  GTAAAGCGCGCTAGGTGGATTGGTCAGTCAGATGTGAAAGCCCCGG  GCTCAACCTGGGAACTGCACCTGATACTGCCAGTCTTGAGTACGGTAG  AGGGCAGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA  AGGAACACCAGTGGCGAAAAGGCGACTGCCTGGACTGATACTGACACT  GAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT  CCACGCCGTAACGATGTCTACTAGTTGTTGGGAGGCTTGACCTCTTA  GTAACGAAGCTAACGCGATAAGTAGACCGCTGGGGAGTACGGCCGC  AAGGTTAAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGA  GCATGTGGTTAATTCGAAGCAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGA  CATCCAGAGAACTTACTAGAGATAGTTTGGTGCCTTCGGGAACTCTGA  GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGT  TAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTATGTTGCCAGCACATAA  TGGTGGGAACTCATGGGAGACTGCCGCTGATAAACCGGAGGAAGGTG  GGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCTGGGCTACACACG</p>	1508	FJ202983	94,8%

		TGCTACAATGGGGGATACAAACGGTTGCGAAGCAGTGATGTGGAGCT AATCTGAGAAAGTCTCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCAACT CCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTG AATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTG GGTTGCTCCAGAAGTGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTCACCA CGGAGTGATTCATGACTGGAGGAAGTCGTAACAAGGTAACG			
<i>Arcobacter</i> clone	1	GGATCCAGACTTTGATCCTGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCGTGCTT AACACATGCAAGTCGAACGAGAACGGGTTATAGCCTGCTATAACTGT CAGCTAAGTGGCGCACGGGTGAGTAATATATAGGTAATGTGCCCTAG AGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAACACCCCATATGCCTT TAAAACATAAGTTTGCAAGGAAATATTTATAGCTCTAGGATCGGCCT GTACGGTATCAGTTAGTTGGTGAGTAATGGCTCACCAAGACGATGA CGCCTAACTGGTTTGGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGGAGACA CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATG GGGAAACCCTGATGCAGCAACGCCGCTGGAGGATGACACATTCG GTGCGTAAACTCCTTTTATATAGGAAGATAATGACGGTACTATATGAA TAAGCGCCGGTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGC GCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAGCGTGTAGCGGGT GAATAAGTTTGAAGTGAATCCTATAGCTCAACTATAGAAGTGGTTG AAAAGTGTTCACCTAGAATATGGGAGAGGTAGATGGAATTTCTGGTG TAGGGGTAAAATCCGTAGAGATCAGAAGGAATACCGATTGCGAAGGC GATCTACTGGAACATTATTGACGCTGAGACGCGAAAGCGTGGGGAGC AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTACAC TAGTTGTTGTGAGGCTAGACCTTCAGTAATGCAGTAAACACATTAAG TGTACCGCCTGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAGTCAAAGGAACA GACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGACGAT ACGCGAAGAACCTTACCTGGACTTGACATAGTAAGAAGTCTTAGAG ATAGATTGGTGTCTGCTGCAGAAGCTTATATACAGGTGCTGCACGGC TGTCGTGAGTCTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGC GCAACCCTCGTCGTTAGTTGCTAACAGTTCGGCTGAGAAGTCTAACGA GACTGCCTGGGTAACCAGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAGTCATC ATGGCCCTTACGTCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGGTATACA AAGAGCAGCGATACGGTGACGTGGAGCAAATCTCAAAAATATCTCCC AGTTCGGATAGTAGTCTGCAACTCGACTACTTGAAGTTGGAATCGCTA GTAATCGTAGATCAGCAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGT ACTCACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGAACTCATTCGAAGCGGGG ACGCTAAGATAGCTACCCTCCACAGTGGATTACGCGACTGGGGTGAA GTCGTAACAAGGTAACG	1484	HM057798	98,6%
<i>Fusobacteria</i> clone		GGATCCAGACTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGACAGAATGCTT AACACATGCAAGTCTACTCGAAAGCTCTTCGGAGTGATTAGGGTGGC GGACGGGTGAGTAACCGTAAAGAACTTGCCTCAGACTGGGACAA CTGTTGGAAACGGCAGCTAATACCGGATATTATGAGACCTTGGCATCA AGGACTTATGAAAGCTATATGCGCTGAGGGAGAGCTTTGCGTCTATT AGCTAGTTGGTGAGTAATGGCTACCAAGGCGACGATAGGTAGCCG GCCTGAGAGGGTGAACGGCCACAAGGAGACTGAGACACGGCCCTTAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGACCAAAGT CTGATCCAGCAATTCTGTGTGTTGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAAG AACTTCAATGGGGAAGAAGCAAGTGACGGTACCCATAGAAGAAGCG	1484	JQ738941	97,9%

		<p>ACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCGCAAGC  GTTATCCGGAATTATTGGGCATAAAGGGCGTCTAGGCGGTTTAATAAG  TCTGATGTGAAAATGCGGGGCTCAACTCCGTATTGCGTTGGAACTGT  TAGACTAGAGTTTTGGAGAGGTAGGCGGAACTACAAGTGTAGAGGTG  AAATTCGTAGAGATTGTAGGAATGCCGATGACGAAGGTAGCTTACT  GGACAAATACTGACGCTAAAGCGCGAAAGCTAGGGGAGCAAACAGG  ATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCTGTAAACGATGATCACTGGGTGTG  GGGGTTCGAACCCCTGTGCCGAAGTTAATGCGATAAGTGATCCGCCT  GGGGAGTACGTTTCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC  CGACAAGTGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAGGAA  CCTTACCAGTCTTGACATCCTCTAAACTTTCTGGAGACAGATTGGTG  CCCCTTCGGGGGAATAGAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGC  TCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTA  TCGTTAGTTACCATCATTAAGTTGGGGACTCTAGCGAGACTGCCTGCG  ACGAGCAGGAGGAAGGTGGGAACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTA  TGAACTGGGCTACACACGTGCTACAATGAAAAGTACAAAGAGTTGCT  AACCGGTGACGGCAAGCGAATCTCATAAAGCTTTTCTCAGTTCGGATT  GGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTTGGAATCACTAGTAATCGCG  AATCAGCAATGTCGCGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGACACACCGC  CCGTACACCACGAGAGTTGGTTGCACCTGAAGTAGCAGGCCTAACC  CGTAAGGGAGGGATGTTCCAAAGGTGTGATTAGCGATTGGGGTGAAG  TCGTAACAAGGTAACG</p>			
<p><i>Fusobacterium</i> clone</p>		<p>GGATCCAGACTTTGATTATGGCTCAGGATGAGCGCTGACAGAATGCTT  AACACATGCAAGTCTACTTGAATTCACCTCGGTGATAGTAAGGTGGCG  GACGGGTGAGTAACACGTAAAGAAGTGCCTTACAGTCTGGGACAAC  TATTGGAAACGATAGCTAATACCGGATATTATGATTTTCTCGCATGGG  AAGATTATGAAAGCTATATGCGCTGTAAGAGAGCTTTGCGTCCCATTA  GCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACAAGGCGACGATGGGTAGCCGG  CCTGAGAGGGTGAACGGCCACAAGGGGACTGAGACACGGCCCTTACT  CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGACCAAAAAGTC  TGATCCAGCAATTCTGTGTGACGATGACGGTCTTCGGATTGTAAAGT  GCTTTCAGTTGGGAAGAAAGAAATGACGGTACCAACAGAAGAAGCGA  CGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGTCGCAAGCG  TTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGCGTCTAGGTGGTTTGATAAGT  CTGATGTGAAGATGCGGGGCTCAACTCCGTATTGCGTTGGAACTGTC  AAACTAGAGTATCGGAGAGGTGGGCGGAACTACAAGTGTAGAGGTGA  AATTCGTAGATATTTGTAGGAATGCCGATAGAGAAGTCAGCTCACTG  GACGAATACTGACTGAAGCGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGA  TTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGATTAAGCGTCG  GGGGTTCGAACCTCGGCACTCAAGCTAACGCGATAAGTAATCCGCCTG  GGGAGTACGTACGCAAGTATGAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCC  GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGGAAGAAC  CTTACCAGGCCTTGACATGCAGAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGC  CTTCGGGAGCTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGT  CGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCTTGTCTTA  GTTACCAGCACATAATGGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACA  AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGG  CCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGTACAAAGGGTTGCCAAG  CCGCGAGGTGGAGCTAATCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGC</p>	<p>1479</p>	<p>KU533800</p>	<p>92,3%</p>

		AGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAAT CAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGT CACACCATGGGAGTGGGTTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGG GAGGACGGTTACCACGGAGTGATTATGACTGGGGTGAAGTCGTAAC AAGGTAACG			
<b>Gamma protéobactéria- <i>Arilytica</i> clone</b>	1	CGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACTCCGTGGTAA CCGTCCTCCCGAAGGTTAGACTAGCTACTTCTTTGCAACCCACTCCC ATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATCACCGT GACATTCTGATTACGATTAAGTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAG TTGCAGACTCCAATCCGGACTACGAGAAGTTTTATGGGATTAGCTACA CCTCGCGGGCTTGCAACCCCTTTGACTCCCCATTGTAGCACGTGTGTA GCCCAGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTGCTCCACCTTCTCT CCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTTCAGCATAACCTGATG GCAACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACAT CTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACCGAGTT CCCGAAGGCACTAATCTATTCTAGAAAAATTCTCGGGATGTCAAGACC TGGTAAGGTTCTCGCGTTGCTTCAATTAACCAACATGCTCCACCGC TTGTGCGGGCCCCGTCATTTGAGTTTTAACCTTTCGCGCCGTA CTCCCCAGGCGGTCTACTTATTGCGTTAGCTGCGCCACTAAGGCCTCA AGGACCCCAACGGCTAGTAGACATCGTTACGGCGTGGACTACCAGG GTATCTAATCCTGTTTGTCCCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTAT CAACCCAGAGTGTGCGCTTCGCCACTGATGTTCCCTCAGATCTCTACG CATTTACCCGCTACACCTGAAATTCCACACTCCTCTGCTGTACTCTAGT TGCCAGTTCTAAATGCAGTTCAGGTTGAGCCCGGGGCTTTCACAT CTAGCTTAGACAACCGCCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATCCGAT TAACGCTTGCACCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGC CGGTGCTTCTCTGTGGGTAACGTACAGATATATGCTATTAACATA ACCCTTCTCCCCACTGAAAGTGCTTTACAACCCTAGAGCCTTCTTCA CACACGCGGCATGGCTGCATCAGGGTTTCCCCATTGTGCAATATTCC CCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCGGTGCTCAGTCCCAATGT GGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTAAAGATCGTCGCTTGGTGAGCC TTTACCTACCAACTAGCTAATCTTACGCGGGCTCATCGAATAGCGCG AGGTCCATAAATGGAGCCCCACTTTCTCCCGTAGGACGTATGCGGTA TTAGCAGTCGTTCCGACTGTTGTCCCCACTACTCGGTAGATTCCAC GCGTACTCACCCGTCGCGCTTACTCACCCGAAGGCTTTCAGCT CGACTTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATA TCAAAGTCTGGATCC	1503	JF317347	97,7%
<b><i>Pseudospirillum</i> clone</b>	1	CGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTGA GCGCACTCCCGAAGGTTATGCTACCCACTTCTTTGCAACCCACTCCC ATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATCACCGT AGCATTCTGATCTACGATTAAGTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAG TTGCAGACTGCGATCCGGACTACGAAAACGTTTTATGGGATTAGCTCAC CCTCGCGGGGTTGCAACCCCTTTGACTGCTCCATTGTAGCACGTGTGTA GCCCTGGTAGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTGCTCCACCTTCTCT CCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCACTAAATGATGGC AAATAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAACATCT CACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCACTGCGTTCC CGAAGGCACCAATCTATCTCTAGAAAAGTTTCGAGGATGTCAAGACCA	1499	JX530489	94,7%

		<p>GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCT  TGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGACCGTACT  CCCCAGGCGGTCAACTTAGAGCGTTAGCTGCGCCACTAAAAGGATTA  CCCTCCCAACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT  ATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGCGTCAGTATCG  ATCCAGGGGGCCGCTTCGCCACTGGTATTCTCCACATCTCTACTCA  TTTCACTGCTACACGGGAAATCCACTCACCTCTCCAATACTCTAGCC  TGCCAGTTCTGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCGGGGCTTTCACATC  CAGCTTAACAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATT  AACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCC  GGTGCTTCTTCTGCAGGTAACGTACAGCTGCAAAGTATTAATTTACA  ACCTTTCCTCCCTGCTGAAAGTGCTTTACAACCCTAGAGCCTTCTTAC  ACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTTCCC  CACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTG  GCCGATCATCTCTCAGACCAGCTAAGGATCGTCGCCATGGTAGGCCT  TTACCCACCATCTAGCTAATCCTACGCAGGCTCATCTAATAGCACGA  GGTCCGAAGATCCCCGCTTTCCTCCCTCAGGGCGTATGCGGTATTAGC  ATGCGTTTCCACATGTGTCCCCACTACTAGGTAGATTCTACGCGTT  ACTACCCGTCGCCACTCTACTACTCCGAAGAGCTTACGCGTTTGA  CTTGATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCAGGATCA  AAGTCTGGATCC</p>			
<i>Umboniibacter</i> clone		<p>CGTTACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATGAATCACACCGTGGTAA  CCGACCCCCGGAAGGTTAGTCTAGCTACTTCTGGTGCAACCCACTCCC  ATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTACCCGC  GACATTCTGATTTCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCACGCAGTCGAG  TTGCAGACTGCGATCCGGACTACGACCGGTTTTCTGAGATTTGCTTAC  CCTCGCGAGTTTGACGCCCTCTGTACCGGCCATTGTAGCACGTGTGTA  GCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCT  CCGGTTTGTACCCGGCAGTCTCCCTAGAGTCCCACCCGAAGTGCTGG  CAAATAGGGACAAGGGATGCGCTCGTTACGGGACTTAACCCAAACATT  TCACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCTGCGCTCC  CGAAGGCACCAAGCTATCTCTAGCAAGTTCGCAGGATGTCAAGACCA  GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTGAATTAACCACATGCTCCACCGCT  TGTGCGGGCCCCGTC AATTCATTTGAGTTTAACTTTCGCGCCGTAC  TCCCCAGGCGGTCTACTTATCGCGTTAGCTTCGTTACTAAGAGGTCAA  GCCTCCCAACAAC TAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGT  ATCTAATCCTGTTTGTCTCCACGCTTTCGCACCTCAGTGTACAGTATCA  GTCCAGGCAGTCGCCCTTCGCCACTGGTGTTCCTTCTATATCTACGCAT  TTCACCGCTACACAGGAAATCCACTGCCCTTACCGTACTCGAGACT  GGCAGTATGTGATGCAGTTCCAAGGTTGAGCCCTGGGCTTTCACATCA  CACTTAACAAACCGCTACGCGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTA  ACGCTTGACCCCTCCGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCG  GTGCTTCTTCTGCAGGTAACGTACAGCTGCAAAGTATTAATTTACAA  CCTTTCCTCCCTGCTGAAAGTGCTTTACAACCCTAGAGCCTTCTTACA  CACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTTCGCCATTGTGCAATATTTCCC  ACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGG  CTGATCATCTCTCAGACCAGCTAAGGATCGTCGCCATGGTAGGCCTT  TACCCACCATCTAGCTAATCCTACGCAGGCTCATCTAATAGCACGAG  GTCCGAAGATCCCCGCTTTCCTCCCTCAGGGCGTATGCGGTATTAGCA</p>	1500	FJ202983	94,9%

		TGCGTTTCCACATGTTGTCCCCACTACTAGGTAGATTCTACGCGTTA CTCACCCGTCGCCACTCTACTCACTCCGAAGAGCTTTCGCGTTCGAC TTGCATGTGTTAGGCCTGCCGCCAGCGTTCAATCTGAGCCATGATCAA AGTCTGGATCC			
<b>Uncultured bacterium clone</b>		GGATCCAGACTTTGATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGTGGCAGGCCT AACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCATTTCAGCTTGCTGGAAGATGA CGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTGCCGAGTAGTGG GGGACAACCAGTGGAAACGCTGGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGG GGAAAGCAGGGGATCTTCGACCTTGCCTATTGATGAGCCTGCGTG AGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAACGATCTCT AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACTGGGACTGAGACACGGCC CAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGC AAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTG TAAAGCACTTTCAGCAGTGAGGAAAGGTTAGTCGTTAATACCGGCTA GCTGTGACGTTAACTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGC AGCCGCGTAATACGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGC GTAAAGCGCGCTAGGTGGATTGGTCAGTCAGATGTGAAAGCCCCGG GCTCAACCTGGGAACCTGCACCTGATACTGCCAGTCTTGAGTACGGTAG AGGGCAGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGA AGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGGCTAATACTGACACTG AGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTC CACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGATCTTAG TGGCGCAGCTAACGCATTAAGTCGACCGCTGGGGAGTACGGCCGCA AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAG CATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCTTGAC ATGCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAGCTCTGAC ACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGTGAGATGTTGGGTT AAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACATAAT GGTGGGCACTTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGG GGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGTG CTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAA TCCCATAAAACCGATCGTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTGACTGC GTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAA TACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCTCACACCATGGGAGTGGG TTGCTCCAGAAGTAGCTAGTCTAACCTTCGGGAGGACGGTTACCACGG AGTGATTCATGACTGGNGTGAAGTCGTAACAAGGTAACG	1508	FJ202983	94,2%
<b>Uncultured <i>Oleibacter</i> clone</b>		GGATCCAGACTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCT AACACATGCAAGTCGAGCGGTAACATTTCTAGCTTGCTAGAAGATGA CGAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGAATCTACCCAGTAGTGG GGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGG GGAAAGGGGGCTTCGGCTCTCGCTATTGGATGAGCCTGCGTGAGATT AGCTAGTTGGTAAGTAATGGCTTACCAAGGCAACGATCTCTAGCTG GTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGAC TCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATCGCACAATGGGCGCAAGCC TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAG CACTTTCAGCAGTGAGGAAAGGTCAGTAGTTAATACCTGCTGGCTGTG ACGTTAACTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGC	1501	JN018730	96,1%

		GGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG CGCGCGTAGGTTGTCTGTGTTAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAA CCTGGGAACTGCATTTTGAAGTGGCAGACTAGAGTACAGTAGAGGGT GGCGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGGGAAGGAA CATCAGTGGCGAAGGCGGCCACCTGGACTGATACTGACACTGAGGGT CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC CGTAAACGATGTCTACTAGTTGTCGGGGGACTTGATCCTTTGGTAAACG AAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTT AAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGT GGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCT GCGAACTTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTTCGGGAACGCAGTGACAG GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTTGTGAAGTGTGGGTTAAGT CCCGTAAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCATCATTAGTTGGG GACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACG ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACA ATGGGCAGTACAGAGGGTTGCGAAAGCGGAGCTGGAGCTAATCTCT TAAAGCTGTTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAA GTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGAATGTCGCGGTGAATACGT TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCT CCAGAAGTGGCTAGCTTAACCTTCGGGGGAGCGGTCACCACGGAGTG ATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACGA			
<b>Uncultured</b> <i>Thalassolituus</i> clone		GGATCCAGACTTTGATTCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCT AACACATGCAAGTCGGGCGGAAACGATGATAGCTTGCTATCAGGCGT CGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGG GGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACTCCTACGGG GGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCCTATTAGATGAGCCTGCGT GAGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGATCTC TAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGGGCG AAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCTCTAGGGTT GTAAAGCACTTCAGAAGGGAGGAAAGGTTGTAAGTTAATACCTTGC AACTGTGACGTTACCTTCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAG CAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG CGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGCGGAATGTGAAAGCCCCG GGCTCATCCTGGGAACTGCATTGCGAACTGGCAGACTAGAGTACAGT AGAGGGTAGTGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGG GAAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTGCCTGGACTGATACTGACAC TGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG TCCACGCCGTAAACGATGTCTACTAGTTGTTGGGAGACTTGATCTCTT AGTAACGAAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG CAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGG AGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTG ACATCCTGCGAACTTGGTAGAGATACCTTGGTGCCTTCGGGAACGCAG TGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGTCTGTTGTGAAATGTTGGG TTAAGTCCCCTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCATCATTAA GTTGGGGACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGG GGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGT GCTACAATGGCCGGTACAGACGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTA ATCTGAGAAAGCCGGTCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTC	1506	KC527511	99,4%

		CATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGA ATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTGG GTTGCTCCAGAAGTGGCTAGCTTAACCTTCGGGAGAGCGGTACCAC GGAGTGATTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACG			
<i>Aureimarina clone</i>	2	GGATCCAGACTTTGATTATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCC TAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAATTAGCTTGCTAATTTGCT GACGAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATAACAATCTACCTTTTGGT AAGGGATAGCCCAGAGAAAATTTGGATTAATACCTTATAGTATTATTT ATGGCATCATTAATAATTAAGGCTACGGCAAAGATGAGTATGCG TCCCATTAGCTAGTTGGCGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGG GTAGGGTCTGAGAGGGAGATCCCCCACTGGTACTGAGACACGG ACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGACAATGGGC GCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGG TTGTAAACTGCTTTTATACAGGAAGAATAAGCCTTACGTGTAAGGTGA TGACGGTACTGTAAGAATAAGGACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCC GCGGTAATACGGAGGGTCCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGTTTAA AGGGTCCGTAGGTGGATAATTAAGTCAGGGGTGAAAAGTTTGCAGCTC AACTGTAAAATTGCCTTTGATACTGGTTATCTTGAATTGTATTGAAGT AGGCGGAATATGTAGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATTACATAGA ACACCAATTGCGAAGGCAGCTTACTAAGTACCAATTGACACTGATGG ACGAAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG CCGTAAACGATGGATACTAGCTGTTCGGAATTTATTCTGAGCGGCCCA GCGAAAAGTGATAAGTATCCACCTGGGGAGTACGTTCCGCAAGAATGA AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGG TTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCAGGGCTTAAATGTAGTC TGACAGCTTTAGAGATAGAGTTTTCTTCGGACAGATTACAAGGTGCTG CATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCAGGTTAAGTCCTATA ACGAGCGCAACCCTGTCGTTAGTTGCCAGCGAGTCATGTCCGGGACT CTAACGAGACTGCCGGTGCAAACCGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTC AAATCATCACGGCCCTTACGTCCTGGGCCACACACGTGCTACAATGGT CAGTACAGAGAGCAGCCAGCATGCGAATGCGAGCGAATCTATAAAGC TGATCACAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGA ATCGCTAGTAATCGGATATCAGCCATGATCCGGTGAATACGTTCCCGG GCCTTGACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGTTGGGAGTACCTGA AGTCCGTCACCGCAAGGAGCGGCCTAGGGTAAGATCGATAACTAGGG CTAAGTCGTAACAAGGTAACG	1491	EF108215	99,9

## Annexe 2 : Article sur la symbiose entre *Pseudovorticella* sp. isolat Guadeloupe et des bactéries sulfo-oxydantes accepté dans EJOP



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

European Journal of Protistology 62 (2018) 43–55

European Journal of  
PROTISTOLOGY

[www.elsevier.com/locate/ejop](http://www.elsevier.com/locate/ejop)

### Thioautotrophic ectosymbiosis in *Pseudovorticella* sp., a peritrich ciliate species colonizing wood falls in marine mangrove

Adrien Grimonprez<sup>a,\*</sup>, Audrey Molza<sup>b</sup>, Mélina C.Z. Laurent<sup>a</sup>,  
Jean-Louis Mansot<sup>b,c</sup>, Olivier Gros<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup>Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Univ Antilles Guyane, Univ Nice Sophia Antipolis, CNRS, Evolution Paris Seine—Institut de Biologie Paris Seine (EPS—IBPS), 75005 Paris, France

<sup>b</sup>GTSI, département de physique, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre Cedex, Guadeloupe, France

<sup>c</sup>C3MAG, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles, BP 592, 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe (French West Indies), France

Received 24 April 2017; received in revised form 13 November 2017; accepted 15 November 2017  
Available online 22 November 2017

#### Abstract

Ciliates represent a diversified group of protists known to establish symbioses with prokaryotic micro-organisms. They are mainly phagotrophs and symbiotic relationships with bacteria can give them an important advantage in chemosynthetic environments. The aim of this study is to describe the thiotrophic association that occurs between the peritrich ciliate *Pseudovorticella* sp. and potential sulfur-oxidizing bacteria. Investigations at microscopic scale (LM, SEM, TEM) showed ectosymbiotic bacteria covering the surface of the body of *Pseudovorticella* sp. According to 16S rDNA phylogenetic analysis, these ectosymbiotic bacteria belong to  $\gamma$ -proteobacteria and are phylogenetically close to the symbiont of the recently described *Zoothamnium ignavum*, which inhabits shallow-water wood falls. FISH experiments, using symbiont specific probes, clearly indicate that these ectosymbiotic bacteria are also ingested into food vacuoles. Electron lucent granules observed in TEM in the cytoplasm of the ectosymbiotic bacteria have been identified as sulfur granules by Raman microspectrometry analyses. Raman microspectrometry analyses confirmed the thiotrophic nature of this relationship already suggested by the results obtained by TEM and phylogeny. A complete sulfur map was then performed to investigate the sulfur distribution in the zooid. Results show that the relationship between this protist and its bacterial partner is a thiotrophic ectosymbiosis.

© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

**Keywords:** Protist; Raman; Sulfidic environment; Symbiosis; Ultrastructural analysis

**Abbreviations:** BLAST, basic local alignment search tool; FISH, fluorescent in situ hybridization; LM, light microscopy; MUSCLE, Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation; PCR, polymerase chain reaction; rRNA, ribosomal ribonucleic acid; SEM, scanning electron microscopy; TEM, transmission electron microscopy.

\*Corresponding author.

E-mail addresses: [Adrien.Grimonprez@etu.univ-antilles.fr](mailto:Adrien.Grimonprez@etu.univ-antilles.fr) (A. Grimonprez), [audrey.molza@univ-antilles.fr](mailto:audrey.molza@univ-antilles.fr) (A. Molza), [melina.laurent@developpement-durable.gouv.fr](mailto:melina.laurent@developpement-durable.gouv.fr) (M.C.Z. Laurent), [jlmansot@univ-ag.fr](mailto:jlmansot@univ-ag.fr) (J.-L. Mansot), [olivier.gros@univ-antilles.fr](mailto:olivier.gros@univ-antilles.fr) (O. Gros).

<https://doi.org/10.1016/j.ejop.2017.11.002>

0932-4739/© 2017 Elsevier GmbH. All rights reserved.

## Introduction

Ciliates represent an extraordinarily widespread group of protists (single celled eukaryotic organisms) occurring in almost all aquatic environments (Dziallas et al. 2012; Lynn 2008). These organisms are abundant phagotrophs (grazers of algae, bacteria, and other micro-organisms) in the biosphere and can form extensive blooms (Dziallas et al. 2012; Gast et al. 2009; Taylor and Sullivan 1984). Thus, they promote the re-mineralization of microbial biomass, thereby increasing the transfer of nutrients to other organisms (Dziallas et al. 2012). Ciliates can also harbor bacteria and/or algae in the frame of both endosymbiotic and ectosymbiotic relationships either in aerobic or anaerobic environments (Gast et al. 2009; Rosati 2004). All mutualistic symbioses between prokaryotes and eukaryotes are related to nutrition, protection and catabolism (Moya et al. 2008; Sauvadet 2015). Some protists, as *Kentrophoros* sp. or *Zoothamnium niveum*, cultivate and use their ectosymbionts as food sources (Ott et al. 2004). Ectosymbionts of *Euplotidium* sp. protect the ciliates ingestion by predators by changing the ciliate surface preventing its identification (Rosati et al. 1999). Whereas, *Caedibacter* bacterial endosymbionts of *Paramecium* promote the growth of their host by giving them the ability to kill *Paramecium* individuals lacking these bacteria (Kusch et al. 2002). Unlike the diversity of function held by prokaryotic symbionts, eukaryotic photosynthetic organisms are more common as symbionts in protists (Sauvadet 2015). This is particularly the case with the freshwater ciliate *Paramecium bursaria* that contains green algae of the genus *Chlorella* (Esteban et al. 2010).

Mangroves represent thiotrophic environments known to offer a variety of habitats for symbioses (Laurent et al. 2009; Ott et al. 2004) as well as hydrothermal vents, cold seeps and whale falls (Cavanaugh et al. 2013; Dubilier et al. 2008). However, the predominance of photoautotrophic organisms restricts these thiotrophic symbioses to a cryptic existence in highly localized zones (Ott et al. 2004). The process by which sulfides are produced in mangroves occurs both on and in the sediment, by the plant material degradation involving the microbial activities of cellulolytic bacteria and sulfate reducing bacteria (SRB) in anaerobic conditions (Bienhold et al. 2013; Fors et al. 2008; Palacios et al. 2009). Conversely to geothermal process (Dubilier et al. 2008), the debris derived from mangrove plants, algae, or sea grass may accumulate and the decomposition of this organic matter creates sulphidic habitats of various spatial and temporal extents (Ott et al. 2004). This sulfur production allows the development of free-living thiotrophic bacteria (Fenchel 1994; Jean et al. 2015; Jorgensen et al. 2013; Stocker and Seymour 2012) or bacterial symbionts that are associated with invertebrates and ciliates both in and on the sediment (Ott et al. 2004). In Guadeloupe's mangrove, endosymbiotic sulfur-oxidizing bacteria were previously described inside

the gills of *Phacoides pectinatus* living in the sediment (Frenkiel et al. 1996). On the other hand, ectosymbiosis occurs between sulfur-oxidizing bacteria and ciliates (Laurent et al. 2009; Maurin et al. 2010), nematoda (Himmel et al. 2009; Maurin et al. 2010) and polypes of medusozoa (Abouina et al. 2015). To our knowledge, the only thiotrophic relationship involving ciliates described from mangrove wood falls ecosystem concerns the peritrich ciliate *Zoothamnium niveum* and sulfur oxidizing bacteria (Bauer-Nebelsick et al. 1996b; Laurent et al. 2009; Maurin et al. 2010; Ott et al. 2004). However, naturally sunken wood (including leaves) might constitute substantial habitats for organisms relying on thiotrophic symbiosis (Bienhold et al. 2013; Fagervold et al. 2012; Laurent et al. 2009). The aim of this study was to characterize the symbiosis between a ciliate belonging to Vorticellidae, colonizing sunken leaves, and its potential new thioautotrophic symbionts in marine tropical mangrove environment from Guadeloupe. Phylogenetic analyses of 16S and 18S rRNA gene sequences allowed identifying both partners and revealed that these symbiotic bacteria are close to *Candidatus Navis piranensis*, a novel genus of bacteria living in symbiosis with the ciliate species *Zoothamnium ignavum* (Schuster and Bright 2016). The symbionts were detected with ultrastructural analyses (SEM and TEM) and FISH experiments. Raman microspectrometry was used in order to detect elemental sulfur within the samples and, by extrapolation, the involvement of thiotrophic organisms in this symbiosis.

## Materials and Methods

### Sampling site

Individuals of *Pseudovorticella* sp. were collected from different sunken leaves of *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) covering the marine sediment in the mangrove lagoon "Manche à Eau" (16°16'33.61"N, 61°33'18.09"W) in Guadeloupe, French West Indies. The samples were collected on the same day and were prepared for the different analyses.

### Light microscopy

Several pseudovorticellid individuals were collected from the same sunken leaf and observed with a stereomicroscope and an Eclipse 80i Nikon microscope. Photographs were taken using respectively a Canon EOS 70D and a Nikon DXM 1200F.

### Ultrastructural analyses

Small fragments of sunken leaves presenting several pseudovorticellid individuals fixed on the surface were observed,

and collected using a scalpel blade under the light of a stereomicroscope before preparation for scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) investigations.

Samples for SEM were fixed in 0.22  $\mu\text{m}$ -filtered 4% paraformaldehyde solution in seawater at 4 °C. They were then dehydrated in graded concentrations of acetone, critical point dried in  $\text{CO}_2$  and sputter-coated with gold before observation with a FEI Quanta 250 running at 20kV (Abouma et al. 2015; Jean et al. 2015).

For TEM observations, individuals of *Pseudovorticella* sp. were prefixed at 4 °C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M pH 7.2 cacodylate buffer adjusted to 900mOsm. After a brief rinse in the same buffer, they were fixed for 45 min at room temperature in 1% osmium tetroxide in the same buffer, rinsed in distilled water and post-fixed with 2% aqueous uranyl acetate for 1 h at room temperature. Samples were dehydrated in graded concentration of acetone before embedding in epoxy resin and observation in a FEI Tecnai F20 running at 200kV (Abouma et al. 2015; Gros et al. 2012).

### Raman spectrometry analyses

10 individuals were deposited on a circled section of a slide and were directly analyzed in seawater. The samples were preliminary fixed in 2% paraformaldehyde in filtered seawater (0.22  $\mu\text{m}$ ) and washed in sterile seawater before analysis. Seawater constitutes both an isotonic medium for marine ciliates and a good cooling medium to avoid irradiation damages of the samples during Raman analyses. Spectra were recorded using a Raman microspectrometer HRevo Horiba using a 514.5nm exciting line delivered by an argon ion laser. The samples were deposited on a silanized slide to prevent the movement of organisms during the analysis. After detection of specific bands of elemental sulfur  $\text{S}_8$  in spectra recorded on the sample, a complete mapping of the studied individual was acquired following the method developed in previous works by Himmel et al. (2009), in order to investigate the sulfur distribution in the zooid. The laser power at the sample surface was 105  $\mu\text{W}$  and spectra acquisition time 10s.

### DNA extraction and amplification

A total of 100 individuals were collected on the same day directly from a couple of sunken leaves. DNA from protists was extracted using DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. The genes encoding for 16S rRNA and 18S rRNA were amplified using respectively universal primer sets 8F/1492R (Lane 1991; Lane et al. 1986) and 1F/5R (Giribet et al. 1996). PCR amplifications were performed as follows: 94 °C for 5 min, 30 cycles of 94 °C 1 min, 55 °C 30s, 72 °C 90s and finally 72 °C for 7 min. PCR products were purified using QIAquick PCR purifica-

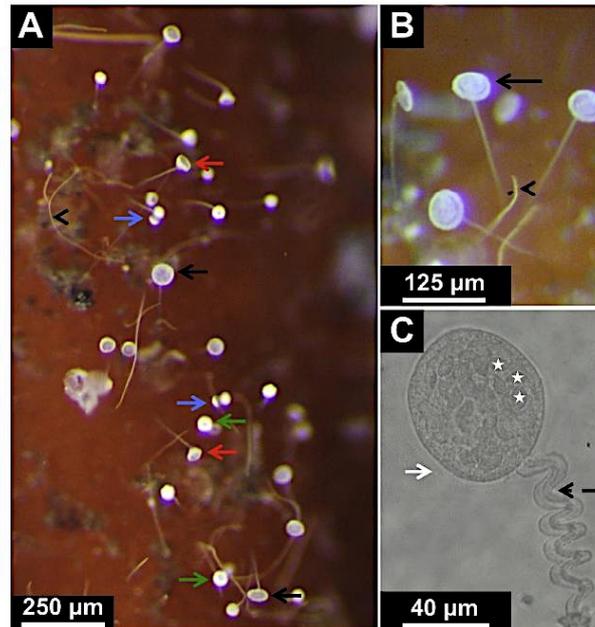
tion Kit (Qiagen) and were fully sequenced by Genoscreen (<http://www.genoscreen.com>).

### Phylogenetic analysis of 16S rRNA and 18S rRNA gene sequences

Phylogenetic analyses of 16S rRNA and 18S rRNA gene sequences were obtained directly from PCR amplification products. Then, the sequences were compared with the National Center of Biotechnology information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database using BLAST. Best hits were included in phylogenetic analyses. Sequences were aligned using MUSCLE and alignments were checked manually. Regions of ambiguous or uncertain alignment were eliminated from consideration (Abouma et al. 2015). Phylogenetic analyses were performed using the programs MEGA version 7 (Kumar et al. 2016). The phylogenetic tree was constructed from the multiple-aligned data using the Maximum Likelihood (ML) method with Tamura-Nei as genetic distance model. Nodes robustness was assessed by performing 1000 bootstrap replicates, and only bootstrap values above 50% are indicated at the nodes of the trees (Abouma et al. 2015). Following analysis, the 18S rRNA and 16S rRNA gene sequences obtained in this study were then deposited in the GenBank database under no. KY777484 and KY777480 respectively.

### Fluorescent in situ hybridization (FISH) experiments

*Pseudovorticella* sp. samples were fixed for FISH in 4% paraformaldehyde in sterile seawater at 4 °C. After two washes in sterile seawater, samples were dehydrated in graded concentration of ethanol (10min per bath). Dehydration of samples with pure ethanol is very important because of the presence of sulfur in the samples that may generate autofluorescence. Sulfur is dissolved by ethanol during dehydration process. Before hybridization experiments, samples were partially rehydrated in a reverse ethanol series to ethanol 70% in distilled water and deposited on silanized slides. After drying, the slides were incubated for 12min in 0.2 M HCl, rinsed for 10min in prehybridization buffer (20mM Tris-HCl [pH 8.0]), incubated for 5min at 37 °C in 0.5mg ml<sup>-1</sup> of proteinase K (Sigma) in prehybridization buffer and rinsed in the same prehybridization buffer. Hybridizations were carried out all night long at 46 °C in hybridization buffer (0.9 M NaCl, 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.8), 0.01% SDS). Positive and negative hybridization controls were respectively EUB338 (Amann et al. 1990), targeting most members of the *Bacteria* and NON-EUB338 (Wallner et al. 1993). Two specific pseudovorticellid symbiont probes (labelled with Cya3) were designed according to 16S rRNA bacterial sequence obtained in this



**Fig. 1.** Light micrograph of *Pseudovorticella* sp. (A–B) Individuals attached to sunken leaf of *Rhizophora mangle* (stereomicroscope). Black arrows mark fully extended zooids, red arrows mark zooids during extension and green arrows mark contracted zooids. Blue arrows indicate individuals exhibiting two zooids attached to the stalk (asexual reproduction) and arrowheads denote free-living filamentous bacteria. These organisms appeared white under incident light. (C) Stars indicate vacuoles in the cytoplasm, black broken arrow shows the stalk with the spasmoneme and white arrow denotes bacteria (microscope).

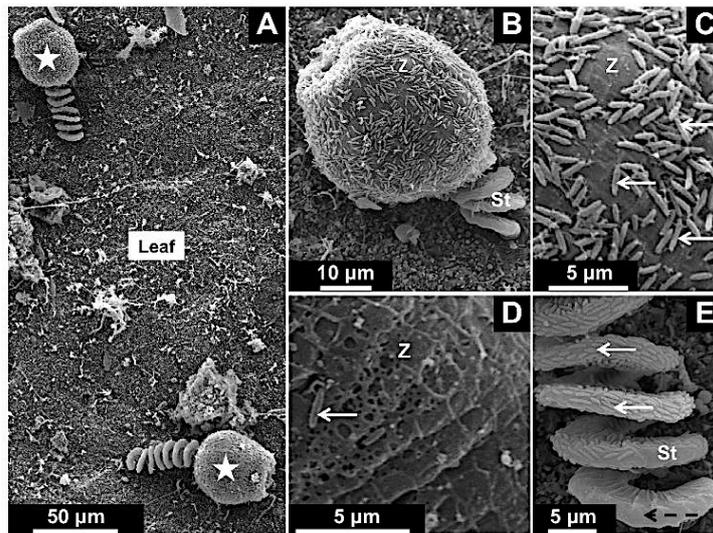
study. VO16 B (5'-CGTCATCATCTTCCCAACTGAAAG-3') was designed using the online Primer3 internet based interface (Rozen and Skaletsky 2000) and VORTI (5'-ASCAGACTCTAGTCAGCCA-3') was modified from ZIS645 probe (Schuster and Bright 2016). Probe 16S ss-rRNA localization was optimized according to Fuchs et al. (1998). The probe's specificity was further tested with the online Probes Match tool provided by the Ribosomal Database Project (Cole et al. 2005) and have shown that VO16 B probe is less specific than VORTI probe (respectively 356 hits and 0 hit without mismatch allowed and 1624 hits and 70 hits with 1 mismatch allowed). Optimal hybridization conditions for the newly designed specific probes VO16B and VORTI were determined by applying a series of formamide concentrations (0–40%) in the hybridization buffer in order to reach the best signal intensity, directly related to bound probes. Slides were mounted with VECTASHIELD® fluorescent mounting medium with DAPI (VECTOR, USA) and visualized under an epifluorescence microscope Eclipse 80i (Nikon, France) and a confocal microscope Leica SPE II.

## Results

### The host *Pseudovorticella* sp.

#### Morphology

According to microscopic observations, individuals appeared white under incident light. Zooid disc-shaped when fully extended, bell-shaped during extension (Fig. 1A, B) and roundish to ellipsoidal when contracted (Fig. 1C), about 40–50 µm in diameter. Peristomial lip wide, flattened, with a falling edge when zooid fully extended (Fig. 1A, B). Helicoidal stalk with variable length, usually about 100 µm long when contracted, and 200 µm when extended, 6 µm in diameter (Fig. 1A–C). Spasmoneme approximately 2–3 µm in diameter (Fig. 1C). Macronucleus J-shaped and band like, extended in spiral through whole cell (pers. obs. based on DAPI staining). Micronucleus not observed. Cytoplasm colourless or greyish with many spherical vacuoles, about 5 µm in diameter, containing bacteria (Fig. 1C). Ciliature has not been investigated.



**Fig. 2.** Scanning electron micrographs of *Pseudovorticella* sp. (A) Stars mark individuals attached to sunken leaf of *Rhizophora mangle*. (B–E) White arrows show bacteria covering the entire surface of the zooid (Z) and only partially the stalk (St). The reticulate silverline system is partially hidden by bacteria on the images C and clearly visible on the image D. Black broken arrow shows the basal part of the stalk free of bacteria.

### Scanning electron microscopy (SEM)

This organism consists of a roundish to ellipsoidal zooid when contracted and a helically contracted stalk with smooth surface (Fig. 2A, B). The reticulate silverline system is partially hidden by the bacteria coat (Fig. 2A, B), but visible in Fig. 2C, D. The reticulate silverline system, which represents the pattern of pellicular ridges on the surface of the zooid, is characteristic of the *Pseudovorticella* genus. The basal part of the stalk is anchored into the leaves (Fig. 2A, E).

### Molecular identification and phylogenetic analyses of the host

The 18S rRNA gene sequence obtained for the host had a total length of 1005 nucleotides. The most closely related sequence which is recovered from *Vorticella* sp. FG-2015 voucher (Accession number: KM222117) displayed 98% identical positions with the sequence obtained in this study. The phylogenetic reconstruction based on partial sequences of the gene coding for 18S rRNA placed this mangrove ciliate colonizing sunken woods within the Peritrichia and more specifically within the *Vorticella* group which is close to other ciliates that have a stalk that contracts in a spiral fashion (Fig. 3). However, this ciliate and *Vorticella* sp. FG-2015 clustered in a clade with a low-robustness node separated

from the other *Vorticella* sequences. Regarding to morphological features and phylogenetic analysis, the peritrich is very likely a member of the genus *Pseudovorticella*.

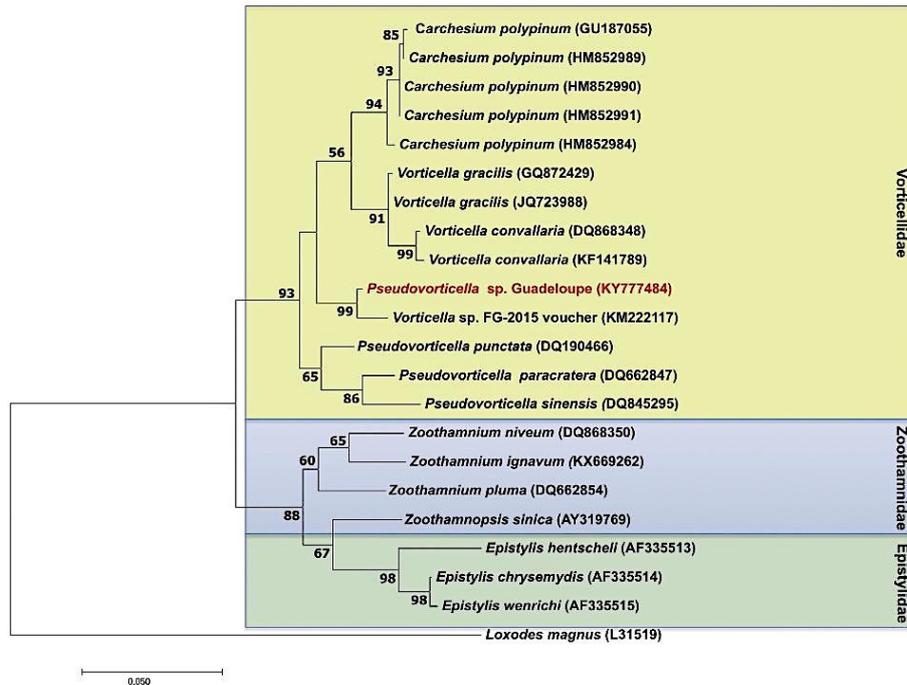
### Ectosymbiont of *Pseudovorticella* sp.

#### Scanning electron microscopy

Bacteria largely cover the body of *Pseudovorticella* sp. forming a single layer like a bacterial coat (Fig. 2B). Bacteria on stalk and zooid rod shaped, ~2 μm long and ~0.6 μm wide (Fig. 2B–E), irregularly arranged on the zooid and aligned on the stalk. Only adhesive disc and basal, noncontractile part of the stalk are devoid of bacteria (Fig. 2E).

### Molecular identification and phylogenetic analyses of the associated ectosymbiont

The 16S rRNA gene sequence obtained for the ectosymbiont had a total length of 1320 nucleotides. The phylogenetic tree based on partial sequences coding for 16S rRNA gene, revealed that the symbiont of the peritrich *Pseudovorticella* sp. is related to  $\gamma$ -proteobacteria already known as symbionts of various marine invertebrates (Fig. 4). The most closely related sequence which is recovered from the ectosymbiont



**Fig. 3.** Phylogeny based on 18S rRNA gene sequences from pseudovorticellid colonizing sunken woods in mangrove. Maximum likelihood (ML) tree displaying the phylogenetic relationships between *Pseudovorticella* sp. with other ciliate species based on the analysis of partial 18S rRNA gene sequences of 781 nucleotides. *Loxodes magnus* was used as outgroup. Only bootstrap values higher than 50% are shown. The scale bar corresponds to 5 changes per 100 nucleotides.

of *Zoothamnium ignavum* named *Candidatus Navis piranensis* (Accession number: KX669263), displays 97% identical positions with the sequence obtained in this study.

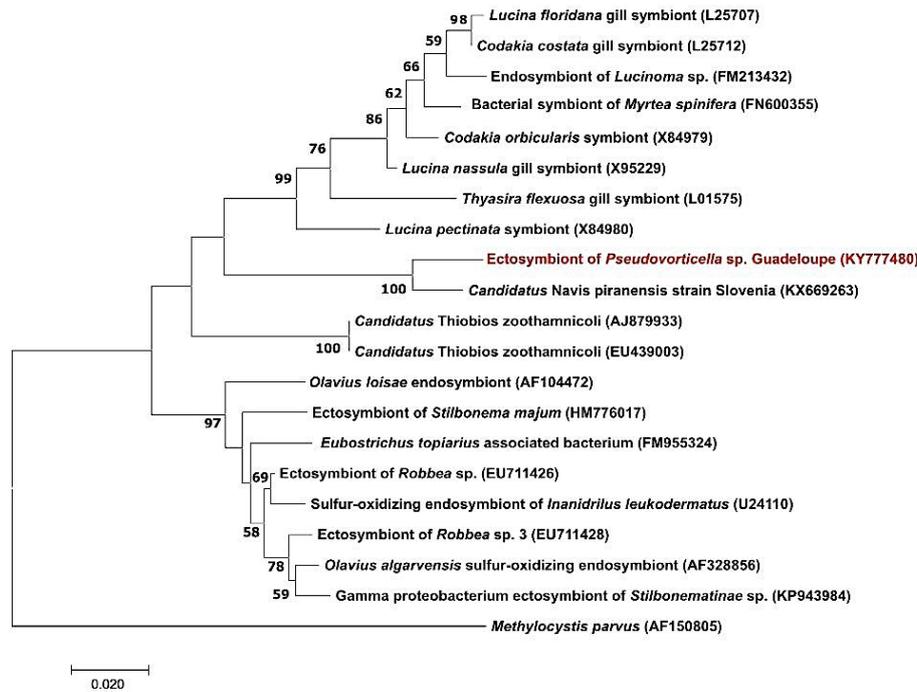
#### Fluorescent *in situ* hybridization analyses

The Fluorescent *in situ* Hybridization experiment with the specific probes VO16B (Fig. 5A, B) and VORTI (Fig. 5D, F) designed from 16S rRNA sequence confirmed that the sequence used for the phylogenetic analysis came from the ectosymbionts. The optimal formamide concentration in the hybridization buffer was found to be 20% for both specific probes. At a concentration of 40% formamide the amount of bound probe was slightly decreased resulting in a decrease of the signal. According to confocal observations (Fig. 5B, C), bacterial ectosymbionts that cover the entire body of *Pseudovorticella* sp. are the same as those found in the food vacuoles. For each specific probe used, the FISH signal was confirmed by the positive signal of EUB338 probe (Fig. 5C, G). The application of probe NON-EUB338 (complementary

to bacterial probe EUB338) as a negative control yielded no detectable fluorescence signal (Fig. 5E), demonstrating that signals were not caused by autofluorescence or unspecific staining of the bacteria but rather by specific binding of the probes. According to FISH observations, ectosymbiotic bacteria are detached from the surface of zooid and are ingested by the host during the nutrition process. Bacteria are stored in the food vacuoles where they should be digested.

#### Transmission electron microscopy

Bacteria found on the surface of the zooid and the stalk organized in a single layer (Fig. 6A). Food vacuoles contain bacteria (Fig. 6A, B). Bacteria also present in the vestibule of the protist (Fig. 6A). These bacteria are similar to those observed on zooid and stalk surface and have the double membrane characteristic of Gram-negative bacteria (Fig. 6B). White spots within bacterial's cytoplasm (Fig. 6B) correspond to the print left by sulfur granules.



**Fig. 4.** Phylogeny based on 16S rRNA gene sequences from bacterial symbionts associated with pseudovorticellid colonizing sunken woods in mangrove. Maximum likelihood (ML) tree displaying the phylogenetic relationships between the *Pseudovorticella* sp. ectosymbiont with other endo- and ecto-symbionts sulfur-oxidizing bacteria based on the analysis of 16S rRNA gene sequences of 1233 nucleotides. *Methylocystis parvus* was used as outgroup. Only bootstrap values higher than 50% are shown. The scale bar corresponds to 2 changes per 100 nucleotides.

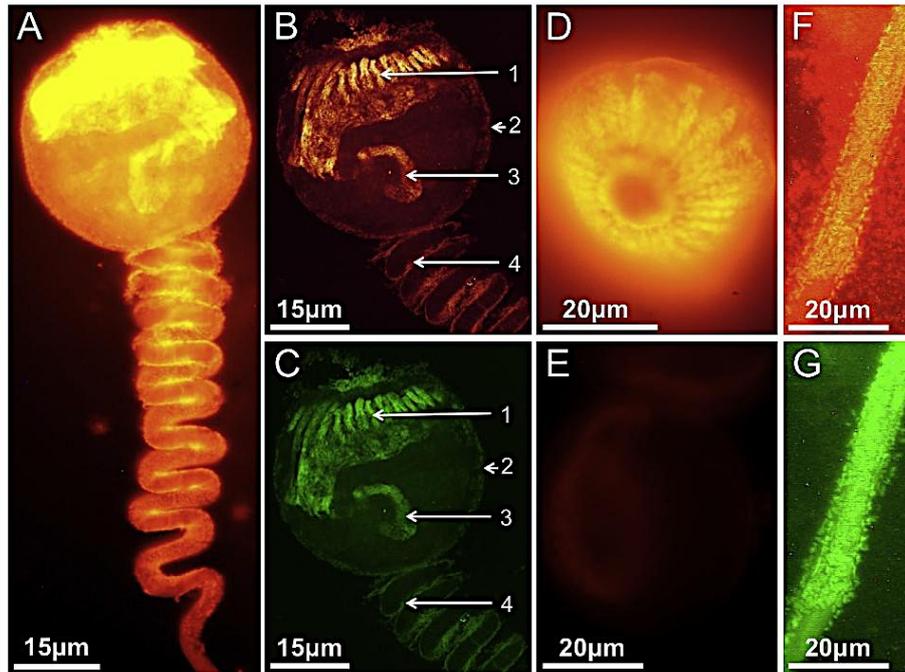
### Raman spectrometry analyses

Observations of *Pseudovorticella* sp. with the light microscope show the presence of white spots (Fig. 7A). The spectra recorded onto these spots revealed the presence of elemental sulfur  $S_8$  in the zooid whereas no sulfur was detected in the surrounding water and on the stalk (Fig. 7B). According to sulfur mapping realized on the zooid (Fig. 7C) and previous results, the sulfur is mainly concentrated in the cytoplasm of bacteria contained in the food vacuoles of the ciliate whereas no sulfur was detected on its surface.

### Discussion

Many species of the genus *Pseudovorticella* are common ciliates living in marine ecosystems (Ji et al. 2003, 2006; Sun et al. 2006, 2013, 2017). *Pseudovorticella* sp. was observed several times in Guadeloupe's mangrove, but despite a suspicion of symbiosis based on ultrastructural analyses (Laurent et al. 2009, 2013; Maurin et al. 2010) the relationship has

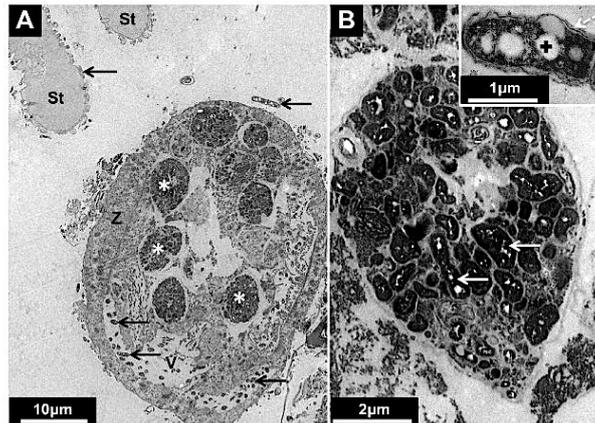
never been clearly defined. SEM and TEM observations have already shown the presence of ectosymbiotic bacteria covering the body surface of *Pseudovorticella* sp. colonizing mangrove wood falls (Laurent et al. 2009, 2013; Maurin et al. 2010). Similar results were observed in the solitary *Vorticella* sp. and the colonial *Zoothamnium niveum* growing at point sources of  $H_2S$  from mangrove peat in the Belize Barrier Reef system and leaf debris in the western Mediterranean (Ott et al. 2004). This can be explained by genetic proximity of these organisms but also by their lifestyle. Indeed, being already phylogenetically related, these organisms grow on the same substratum and it is not uncommon to find them together on the same sunken leaves. Recently, a symbiosis occurring between a ciliate species of *Zoothamnium*, and a novel genus of bacteria proposed as "*Candidatus Navis piranensis*" was found from shallow-water sunken wood in the North Adriatic Sea (Schuster and Bright 2016). The phylogenetic analyses carried on present *Pseudovorticella* sp. have shown that these two ciliates, although geographically distant, shared similar ectosymbiotic bacteria. However, only the dominant bacterium has been identified during this study. Thus, the



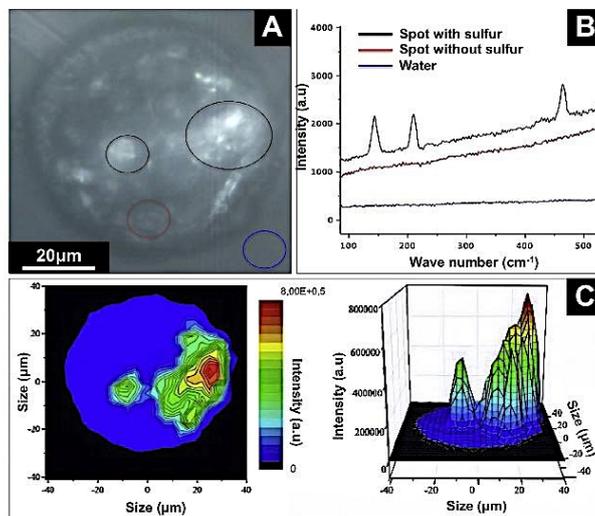
**Fig. 5.** Fluorescent in situ hybridization analysis. (A) Hybridization of ectosymbionts using the probe VO16B showing hybridized bacteria covering the entire body of *Pseudovorticella* sp. (B) According to confocal microscopy, the ectosymbiont specific probe VO16B strongly hybridized the bacteria present on the peristome and in the buccal cavity (1), at the surface of the zooid (2), within the food vacuoles (3), and on the stalk (4). (C) Signals were confirmed thanks to EUB338 probe. (D) Ectosymbionts on the zooid and around the peristome of *Pseudovorticella* sp. were strongly hybridized with the specific probe VORTI. (E) No signal was detected from ectosymbionts on the zooid of *Pseudovorticella* sp. using NON-EUB338 probe. (F, G) Ectosymbionts on the stalk of *Pseudovorticella* sp. were strongly hybridized with the respective VORTI and EUB338 probes.

potential strain heterogeneity occurring in this epibiosis was not investigated. According to phylogenetic analysis of the host, members of the family Vorticellidae form a monophyletic group, including *Pseudovorticella*, *Vorticella* and *Carchesium* species. Similar results were obtained by Li et al. (2008). All members of this group have a helically twisted contracted spasmoneme (Lynn 2008). The genus *Pseudovorticella* was established by Foissner and Schiffmann (1974) for peritrichs that are morphologically similar to *Vorticella* (i.e. solitary zooids that are borne upon a non-branching stalk that contracts in a spiral fashion), but that have a reticulate silverline system. The silverline system, which represents the pattern of pellicular ridges on the surface of the zooid, may be either transverse (i.e. *Vorticella* spp.) or reticulate (i.e. *Pseudovorticella* spp.) and was suggested to be a genus-level character for sessilids (Foissner and Schiffmann 1974). According to SEM observations, the zooid has a reticulate silverline system, and thus, this ciliate is likely a member of the genus *Pseudovorticella*. However, phylogenetic

analysis using ML method placed this ciliate within the *Vorticella* group, while NJ method placed this ciliate within the *Pseudovorticella* group (data not shown). The genus *Pseudovorticella* comprises more than 20 species, most of which have been transferred from *Vorticella* after a first misidentification (Foissner 1979; Foissner and Schiffmann 1974; Foissner et al. 1992; Leitner and Foissner 1997; Song and Warren 2000; Warren 1986, 1987). Although the split is now supported by molecular data, SSU rRNA gene is not always reliable in separating taxa at specie-genus level of Vorticellidae (Li et al. 2008). Thus, this suggests that the silverline system is probably more informative than SSU rRNA gene for determining genus-level phylogenetic relationships among vorticellids. A second split using the number of epistomial membranes as a main distinguishing feature was proposed then by Foissner et al. (2009). Some analyses still have to be performed in order to characterize more precisely the host, although the results suggest that this organism belongs to *Pseudovorticella*. Good descriptions usually demand at



**Fig. 6.** Ultrastructural analysis of *Pseudovorticella* sp. by TEM. (A) Black arrows denote the bacteria at the surface of the zooid (Z), on the stalk (St) and in the vestibule (V). In the cytoplasm, food vacuoles indicated by asterisks, contain ingested bacteria. (B) Food vacuole at high magnification containing similar bacteria in shape to those observed at the surface of the protist. Black cross indicates white granules located within the bacteria whereas white broken arrow shows the double membrane characteristic of Gram-negative bacteria.



**Fig. 7.** Analysis of *Pseudovorticella* sp. by Raman microspectrometry. (A) Light micrograph of the zooid. Black circles indicate few white spots suspected to contain elemental compounds whereas other spots indicated by red circle seem to be free of those compounds. Blue circle corresponds to the surrounding water. (B) Raman spectra acquired from this individual. Black line represents pure elemental sulfur  $S_8$  detected in the white spot, which is characterized by two peaks at  $480\text{ cm}^{-1}$  and  $210\text{ cm}^{-1}$ . Red line confirms the absence of sulfur in the spot suspected to be free of sulfur. Blue line shows that the surrounding seawater (used as negative control) as well as the periphery of the protist remain free of sulfur, the Raman spectrum showing no peak. (C) 2D and 3D mapping (respectively left and right pictures) show that sulfur is located within the white spots observed in *Pseudovorticella* sp. individual. A high intensity corresponds to a detection of a high sulfur spot. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

least live observations, silver nitrate and protargol or silver carbonate impregnation (Foissner 2014).

The contractile stalk allows these organisms to remain fixed in the substratum and contribute to the mixing of oxygenated and deoxygenated H<sub>2</sub>S-containing seawater within the substrate-seawater boundary layer, thanks to rapid contractions and slow extensions (Vöpel et al. 2002). The stalk elevates the zooid whose peristomial cilia transport seawater, which is filtered for suspended particles (Vöpel et al. 2002). The zooid is the filtration device of the organism, the beating of peristomial cilia creates a flow of water which forms toroidal vortices that carry the food inside the body (Vöpel et al. 2001). Microscopic observations have also shown the presence of bacteria in the vestibule corresponding to the buccal cavity and in the food vacuoles. The presence of bacteria in these different parts of this organism clearly indicates the way followed by bacteria during their ingestion. Ciliates feed primarily on bacteria; bacteria are transported in the vestibule thanks to the flow of water created by the cilia and are then stored in food vacuoles after crossing the cytostome and the cytopharynx. Detachment of the bacteria occurs mostly during contraction because of the high water velocity around the zooid and the rapid movement of the cells (Vöpel et al. 2002). Moreover, the contraction of the zooid decreases the surface available to bacteria which result in detachment (Vöpel et al. 2002). Bacteria found in the food vacuoles are probably not a symbiosis but rather the result of the nutrition process in which ectosymbiotic bacteria are ingested, stored in the digestive vacuoles before to be potentially digested. Despite their small numbers, other bacteria were found in the food vacuoles during FISH observations based on non-overlapping of EUB 338 and specific probes (pers. obs.). Similar results were observed for *Z. niveum* (Rinke et al. 2007) and *Z. ignavum* (Schuster and Bright 2016). This is not surprising because during the process of nutrition, other bacteria present in the surrounding water may also be trapped in the vortex produced by the beating of cilia. The presence of ectosymbiotic bacteria in feeding and digestive vacuoles has also been reported for protist belonging to the genus *Kentrophoros* (Fenchel and Finlay 1989) and *Zoothamnium* (Bauer-Nebelsick et al. 1996a; Schuster and Bright 2016). However, most of bacteria contained in food vacuoles have the same characteristic ultrastructure as the symbionts (Bauer-Nebelsick et al. 1996b; Vöpel et al. 2002). We observed similar results in *Pseudovorticella* sp. Fish experiments have confirmed that bacteria covering the surface of the zooid and those found in food vacuoles are the same. TEM observations have shown the presence of sulfur granules located within the bacteria found in the food vacuoles and on the zooid, as well as the double membrane characteristic of Gram-negative bacteria. The same results were found from *Candidatus Thiobios zoothamnicoli* (Bauer-Nebelsick et al. 1996b) and *Cladonema* sp. ectosymbiont (Abouna et al. 2015). Although the metabolic abilities of these new ectosymbiotic bacteria have to be further studied, the results suggest a thiotrophic metabolism.

One of the ways in which symbiosis benefits to protists is to ensure the presence of food for the protist, either by cultivation of the symbiont as an actual food source, or by using products derived from the symbiont for nutrition (Gast et al. 2009). Digestion of ectosymbiotic bacteria and assimilation of organic molecules produced by chemosynthesis sustain the host's needs in carbon (Völland, pers. comm). The transfer of labelled carbon from the C fixation by the symbionts to the host has already been shown for *Z. niveum* by Rinke (2002). Mangrove sediment and wood falls are able to sustain development of thiotrophic symbioses thanks to production of sulfur due to organic matter degradation (Laurent et al. 2013; Ott et al. 2004). Sulfidic concentration from wood falls degradation in mangrove has been measured in the past by Laurent et al. (2009). This production of sulfur ensures the presence of sulfur-oxidizing bacteria that constitute an important food source in some shallow continental shelf systems (Montagna and Spies 1985; Pascal et al. 2014; Powell et al. 1983). In mangrove ecosystems, trophic resource constituted by *Beggiatoa* mats (Jean et al. 2015) does not affect the general food web structure, meio- and macrofaunal abundances or the contribution of bacteria to their diet (Pascal et al. 2014). Ectosymbiosis could be an excellent process for the host to ensure its nutrition while being able to colonize new habitats. In this study, Raman spectrometry was used to identify sulfur S<sub>8</sub> species and investigate its distribution in *Pseudovorticella* sp. according to a method previously used (Himmel et al. 2009; Maurin et al. 2010). This technique, particularly efficient for sulfur detection, is applied in order to detect a thiotrophic metabolism in the symbiotic organisms. This technique looks to be more effective and less restrictive than methods frequently used (EDXS, EELS). Indeed, these techniques are time consuming, expensive and require technical skills (Himmel et al. 2009). Moreover, the non destructive character of Raman microspectrometry allows us to recover the sample after Raman experiments in order to carry out complementary analytical, enzymological, and ultrastructural (i.e. TEM, SEM, immunochemistry) studies (Maurin et al. 2010). The spots appearing white under light microscopy are targeted primarily due to their nature and sizes, S<sub>8</sub> aggregates scatter light. Our results have shown the presence of S<sub>8</sub> sulfur granules in the cytoplasm of ectosymbiotic bacteria stored in food vacuoles of *Pseudovorticella* sp. However, due to the spatial resolution of the Raman microscope (4 µm), it is not possible to determine the precise location of sulfur in the bacteria at the ultrastructural level. Sulfur location requires TEM analysis (Himmel et al. 2009). Nevertheless even a 4 µm resolution allow detection and characterization of the speciation of sulfur and its location at mesoscale within a very short time. Raman spectra acquired on the bacteria present at the surface of the zooid do not reveal the presence of S<sub>3</sub> species. This can be explained either by a S<sub>3</sub> concentration inferior to the detection limit or more probably by the fact that those bacteria can contain elemental sulfur in a different form than S<sub>8</sub> (highly Raman active). In the latter case, the precipitation of sulfur into S<sub>8</sub> phase will

occur during the digestion process by the ciliate resulting in the presence of S<sub>8</sub> aggregates detected in the food vacuoles. According to Raman spectrometry, TEM observations and phylogenetic analyses the symbiont of *Pseudovorticella* sp. likely oxidizes sulfur like many other thiotrophic organisms present in this environment but these results need to be confirmed by the analysis of APS reductase and RubisCo gene. These two enzymes are involved respectively in sulfur-oxidizing pathway and Calvin-Benson cycle of CO<sub>2</sub> fixation and could be used for the identification of sulfur-oxidizing symbiont (Duperron et al. 2009; Herry et al. 1989).

## Conclusion

This study uncovers a new potential sulfur-oxidizing symbiosis involving a peritrich ciliate and ectosymbiotic sulfur-oxidizing bacteria. This is the second case of ectosymbiosis involving a peritrich ciliate in mangrove ecosystem. *Pseudovorticella* sp. Guadeloupe and *Zoothamnium niveum* are found frequently attached on the same substrate and have very similar behaviors regarding their lifestyle and nutrition. Despite, the fact that these ciliates harbour different ectosymbiotic bacteria, the two relationships are clearly ectosymbiotic associations in which the symbionts are cultivated by their host for nutritional purposes. The symbiont may also be involved in a detoxification mechanism, oxidizing sulfides into elemental sulfur and finally to sulphate. Because of the high sulfides concentration recorded in this environment. The present study sheds light on a diversity of microorganisms living in symbiosis still underestimated in these mangrove ecosystems.

## Acknowledgements

A.G. is funded as PhD Student by the Region Guadeloupe grant and the society Hygiene Outremer.

## References

- Abouma, S., Gonzalez-Rizzo, S., Grimonprez, A., Gros, O., 2015. First description of sulphur-oxidizing bacterial symbiosis in a cnidarian (Medusozoa) living in sulphidic shallow-water environments. *PLoS One* 10, e0127625.
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A., 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919–1925.
- Bauer-Nebelsick, M., Bardele, C.F., Ott, J.A., 1996a. Electron microscopic studies on *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Eur. J. Protistol.* 32, 202–215.
- Bauer-Nebelsick, M., Bardele, C.F., Ott, J.A., 1996b. Redescription of *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg, 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Eur. J. Protistol.* 32, 18–30.
- Bienhold, C., Pop Ristova, P., Wenzhöfer, F., Dittmar, T., Boetius, A., 2013. How deep-sea wood falls sustain chemosynthetic life. *PLoS One* 8, 10–15.
- Cavanaugh, C.M., McKiness, Z.P., Newton, I.L.G., Stewart, F.J., 2013. Marine chemosynthetic symbioses. In: Rosenberg, E., DeLong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F. (Eds.), *The Prokaryotes: Prokaryotic Biology and Symbiotic Associations*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 579–607.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., McGarrell, D.M., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., 2005. The ribosomal database project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 33, 294–296.
- Dubilier, N., Bergin, C., Lott, C., 2008. Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 725–740.
- Duperron, S., Lorion, J., Samadi, S., Gros, O., Gaill, F., 2009. Symbioses between deep-sea mussels (Mytilidae: Bathymodiolinae) and chemosynthetic bacteria: diversity, function and evolution. *C. R. Biol.* 332, 298–310.
- Dziallas, C., Allgaier, M., Monaghan, M.T., Grossart, H.P., 2012. Act together—implications of symbioses in aquatic ciliates. *Front. Microbiol.* 3, 1–17.
- Esteban, G.F., Fenchel, T., Finlay, B.J., 2010. Mixotrophy in ciliates. *Protist* 161, 621–641.
- Fagervold, S.K., Galand, P.E., Zbinden, M., Gaill, F., Lebaron, P., Palacios, C., 2012. Sunken woods on the ocean floor provide diverse specialized habitats for microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 82, 616–628.
- Fenchel, T., 1994. Motility and chemosensory behaviour of the sulphur bacterium *Thiovulum majus*. *Microbiology* 140, 3109–3116.
- Fenchel, T., Finlay, B.J., 1989. *Kentrophoros*: a mouthless ciliate with a symbiotic kitchen garden. *Ophelia* 30, 75–93.
- Foissner, W., 1979. Peritriche Ciliaten (Protozoa: Ciliophora) aus alpinen Kleingewässern. *Zool. Jahrb. Syst.* 106, 529–558.
- Foissner, W., 2014. An update of basic light and scanning electron microscopic methods for taxonomic studies of ciliated protozoa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 271–292.
- Foissner, W., Schiffmann, H., 1974. Vergleichende Studien an argyrophilen Strukturen von vierzehn peritrichen Ciliaten. *Protistologica* 10, 489–508.
- Foissner, W., Berger, H., Köhmann, F., 1992. Taxonomische und Ökologische revision der Ciliaten des Saprobien systems—Band II: Peritrichida, Heterotrichida Odontostomtida. *Informationsberichte des Bayer, 5/92. Landesamtes Wasserwirtschaft*, pp. 1–502.
- Foissner, W., Blake, N., Wolf, K., Breiner, H.W., Stoeck, T., 2009. Morphological and molecular characterization of some peritrichs (Ciliophora: Peritrichida) from tank bromeliads, including two new genera: *Orborhabdostyla* and *vorticellides*. *Acta Protozool.* 48, 291–319.
- Fors, Y., Nilsson, T., Risberg, E.D., Sandström, M., Torssander, P., 2008. Sulfur accumulation in pinewood (*Pinus sylvestris*) induced by bacteria in a simulated seabed environment: impli-

- cations for marine archaeological wood and fossil fuels. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 62, 336–347.
- 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, 511–524.
- Fuchs, B.M., Wällner, G.N., Beisker, W., Schwippl, I., Ludwig, W., Amann, R., 1998. Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of *Escherichia coli* 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4973–4982.
- Gast, R.J., Sanders, R.W., Caron, D.A., 2009. Ecological strategies of protists and their symbiotic relationships with prokaryotic microbes. *Trends Microbiol.* 17, 563–569.
- Giribet, G., Caranza, S., Baguña, J., Riutort, M., Ribera, C., 1996. First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Mol. Biol. Evol.* 13, 76–84.
- Gros, O., Elisabeth, N.H., Gustave, S.D.D., Caro, A., Dubilier, N., 2012. Plasticity of symbiont acquisition throughout the life cycle of the shallow-water tropical lucinid *Codakia orbiculata* (Mollusca: Bivalvia). *Environ. Microbiol.* 14, 1584–1595.
- Hery, A., Diouris, M., Le Pennec, M., 1989. Chemoautotrophic symbionts and translocation of fixed carbon from bacteria to host tissues in the littoral bivalve, *Loripes lucinalis* (Lucinidae). *Mar. Biol.* 101, 305–312.
- Himmel, D., Maurin, L.C., Gros, O., Mansot, J.-L., 2009. Raman microspectrometry sulfur detection and characterization in the marine ectosymbiotic nematode *Eubostriechus dianae* (Desmodoridae, Stilbonematidae). *Biol. Cell* 101, 43–54.
- Jean, M.R.N., Gonzalez-Rizzo, S., Gauffre-Autelin, P., Lengger, S.K., Schouten, S., Gros, O., 2015. Two new *Beggiatoa* species inhabiting marine mangrove sediments in the Caribbean. *PLoS One* 10, e0117832.
- Ji, D., Song, W., Al-Rasheid, K.A.S., 2003. Description of a marine peritrichous ciliate, *Pseudovorticella sinensis* n. sp. (Ciliophora, Peritrichia) from China. *J. Eukaryot. Micro Biol.* 50, 360–365.
- Ji, D., Song, W., Clamp, J., 2006. *Pseudovorticella zhengae* n. sp., *P. difficilis* (Kahl, 1933) Jankowski, 1976, and *P. punctata* (Dons, 1918) Warren, 1987, three marine peritrichous ciliates from north China. *Eur. J. Protistol.* 42, 269–279.
- Jørgensen, B.B., Revsbech, N.P., Mølyzer, G., Dynamics, E., Nelson, D.C., Revsbech, N.P., Jørgensen, B.B., Russ, L., Speth, D.R., Jørgensen, M.S.M., Op den Camp, H.J.M., Kartal, B., Shao, M.F., Zhang, T., Fang, H.H.P., Thar, R., Kühl, M., 2013. Microoxic-anoxic niche of *Beggiatoa* spp.: microelectrode survey of marine and freshwater strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 161–168.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874.
- Kusch, J., Czubatiniski, L., Wegmann, S., Hubner, M., Alter, M., Albrecht, P., 2002. Competitive advantages of *Caedibacter*-infected Paramecia. *Protist* 153, 47–58.
- Lane, D.J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, New York, pp. 115–175.
- Lane, J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L., Pace, N.R., 1986. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 6955–6959.
- Laurent, M.C.Z., Gros, O., Brulport, J.P., Gaill, F., Bris, N.L., 2009. Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. *Mar. Environ. Res.* 67, 83–88.
- Laurent, M.C.Z., Le Bris, N., Gaill, F., Gros, O., 2013. Dynamics of wood fall colonization in relation to sulfide concentration in a mangrove swamp. *Mar. Environ. Res.* 87–88, 85–96.
- Leimer, A.R., Foissner, W., 1997. Taxonomic characterization of *Epicarchesium granularum* (Kellicott 1887) Jankowski, 1985 and *Pseudovorticella elongata* (Frumentel, 1876) nov. comb., two peritrichs (Protozoa, Ciliophora) from activated sludge. *Eur. J. Protistol.* 33, 13–29.
- Li, L., Song, W., Warren, A., Shin, M.K., Chen, Z., Ji, D., Sun, P., 2008. Reconsideration of the phylogenetic positions of five peritrich genera, *Vorticella*, *Pseudovorticella*, *Zoothamnopsis*, *Zoothamnium*, and *Epicarchesium* (Ciliophora, Peritrichia, Sessilida), based on small subunit rRNA gene sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 55, 448–456.
- Lynn, D.H., 2008. *The Ciliated Protozoa. Characterization, Classification and Guide to the Literature*, 3rd ed. Springer, Dordrecht.
- Maurin, L.C., Himmel, D., Mansot, J.-L., Gros, O., 2010. Raman microspectrometry as a powerful tool for a quick screening of thiotrophy: an application on mangrove swamp meiofauna of Guadeloupe (FWI). *Mar. Environ. Res.* 69, 382–389.
- Montagna, P.A., Spies, R.B., 1985. Meiofauna and chlorophyll associated with *Beggiatoa* mats of a natural submarine petroleum seep. *Mar. Environ. Res.* 16, 231–242.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., Latorre, A., 2008. Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat. Rev. Genet.* 9, 218–229.
- Ott, J., Bright, M., Bulgheresi, S., 2004. Marine microbial thiotrophic ectosymbioses. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 42, 95–118.
- Palacios, C., Zbinden, M., Pailleret, M., Gaill, F., Lebaron, P., 2009. Highly similar Prokaryotic communities of sunken wood at shallow and deep-sea sites across the oceans. *Microb. Ecol.* 58, 737–752.
- Pascal, P.Y., Dubois, S., Boschker, H.T.S., Gros, O., 2014. Trophic role of large benthic sulfur bacteria in mangrove sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 516, 127–138.
- Powell, E.N., Bright, T.J., Woods, A., Gittings, S., 1983. Meiofauna and the thibios in the east flower garden brine seep. *Mar. Biol.* 73, 269–283.
- Rinke, C., 2002. Carbon Fixation, Incorporation and Transfer in the Chemoautotrophic *Zoothamnium Niveum* Symbioses with <sup>14</sup>C Bicarbonate Autoradiography. Diploma Thesis. University of Vienna.
- Rinke, C., Lee, R., Katz, S., Bright, M., 2007. The effects of sulphide on growth and behaviour of the thiotrophic *Zoothamnium niveum* symbiosis. *Proc. Biol. Sci.* 274, 2259–2269.
- Rosati, G., 2004. Ectosymbiosis in ciliated protozoa. *Symbiosis Mech. Model Syst.* 477–488.
- Rosati, G., Petroni, G., Quochi, S., Modeo, L., Verni, F., 1999. Epixenosomes: Peculiar epibionts of the hypotrich ciliate *Euplodium itoi* defend their host against predators. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46, 278–282.
- Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S., Misener, S. (Eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386.
- Sarvadet, A., 2015. Interactions entre ciliés et métazoaires dans deux environnements marins contrastés: les sources hydrother-

- males et les sédiments anoxiques. Thèse de Doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, spécialité Biologie marine. Ecole Doctorale Diversité du Vivant, 197 p.
- Schuster, L., Bright, M., 2016. A novel colonial ciliate *Zoothamnium ignavum* sp. nov. (Ciliophora, Oligohymenophorea) and its ectosymbiont *Candidatus Navis piranensis* gen. nov., sp. nov. from shallow-water wood falls. *PLoS One* 11, 1–24.
- Song, W., Warren, A., 2000. A redescription of *Pseudovorticella patellina* (O. F. Müller, 1776) nov. comb., a peritrichous ciliate (Protozoa: Ciliophora: Peritrichida) isolated from mariculture biotopes in north China. *Acta Protozool.* 39, 43–50.
- Stocker, R., Seymour, J.R., 2012. Ecology and physics of bacterial chemotaxis in the ocean. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 76, 792–812.
- Sun, P., Al-Farraj, S.A., Warren, A., Ma, H., 2017. Morphology of four new solitary sessile peritrich ciliates from the Yellow Sea, China, with description of an unidentified species of *Paravorticella* (Ciliophora, Peritrichia). *Eur. J. Protistol.* 57, 73–84.
- Sun, P., Ma, H., Shin, M.K., Al-Rasheid, K.A.S., 2013. Morphology of two new marine peritrich ciliates from Yellow Sea, *Pseudovorticella dingi* nov. spec. and *P. wangi* nov. spec., with supplementary descriptions of *P. plicata*, *P. banatica* and *P. anomala* (Ciliophora, Peritrichia). *Eur. J. Protistol.* 49, 467–476.
- Sun, P., Song, W., Warren, A., 2006. Taxonomic characterization of two marine peritrichous ciliates, *Epicarchesium corlissi* n. sp. and *Pseudovorticella jiangi* n. sp. (Ciliophora: Peritrichia), from northern China. *Eur. J. Protistol.* 42, 281–289.
- Taylor, G.T., Sullivan, C.W., 1984. The use of <sup>14</sup>C-labeled bacteria as a tracer of ingestion and metabolism of bacterial biomass by microbial grazers. *J. Microbiol. Methods* 3, 101–124.
- Vopel, K., Pöhl, M., Sorgo, A., Otto, J., 2001. Ciliate-generated advective seawater transport supplies chemoautotrophic ectosymbionts. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 210, 93–99.
- Vopel, K., Reick, C.H., Arlt, G., Pöhl, M., Ott, J.a., 2002. Flow microenvironment of two marine peritrich ciliates with ectobiotic chemoautotrophic bacteria. *Aquat. Microb. Ecol.* 29, 19–28.
- Wallner, G., Amann, R., Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry* 14, 136–143.
- Warren, A., 1986. A revision of the genus *Vorticella* (Ciliophora: Peritrichida). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 50, 1–57.
- Warren, A., 1987. A revision of the genus *Pseudovorticella* Foissner & Schiffmann, 1974 (Ciliophora: Peritrichida). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)* 52, 1–12.

# Annexe 3 : Article sur la symbiose entre *Cladodema* sp. et des bactéries sulfo-oxydantes accepté dans PLOS One



## RESEARCH ARTICLE

# First Description of Sulphur-Oxidizing Bacterial Symbiosis in a Cnidarian (Medusozoa) Living in Sulphidic Shallow-Water Environments

Sylvie Abouna<sup>1</sup>, Silvina Gonzalez-Rizzo<sup>1</sup>, Adrien Grimonprez<sup>1</sup>, Olivier Gros<sup>1,2\*</sup>

**1** Institut de Biologie Paris-Seine, UMR 7138—Evolution Paris-Seine, Equipe Biologie de la Mangrove, Université des Antilles et de la Guyane, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Département de Biologie, BP 592. 97159 Pointe-à-Pitre cedex, Guadeloupe, France, **2** C<sub>3</sub>MAG, UFR des Sciences Exactes et Naturelles, Université des Antilles et de la Guyane, BP 592. 97159 Pointe-à-Pitre, Guadeloupe (French West Indies)

\* [olivier.gros@univ-ag.fr](mailto:olivier.gros@univ-ag.fr)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Abouna S, Gonzalez-Rizzo S, Grimonprez A, Gros O (2015) First Description of Sulphur-Oxidizing Bacterial Symbiosis in a Cnidarian (Medusozoa) Living in Sulphidic Shallow-Water Environments. PLoS ONE 10(5): e0127625. doi:10.1371/journal.pone.0127625

**Academic Editor:** Sebastian Duperron, Université Pierre et Marie Curie, FRANCE

**Received:** December 7, 2014

**Accepted:** April 17, 2015

**Published:** May 26, 2015

**Copyright:** © 2015 Abouna et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** Relevant data are available within the paper and its Supporting Information files. The 16S and 18S rDNA sequences are available via GenBank under accession numbers KJ493944 and KJ493943 respectively.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

### Background

Since the discovery of thioautotrophic bacterial symbiosis in the giant tubeworm *Riftia pachyptila*, there has been great impetus to investigate such partnerships in other invertebrates. In this study, we present the occurrence of a sulphur-oxidizing symbiosis in a metazoan belonging to the phylum Cnidaria in which this event has never been described previously.

### Methodology/Principal Findings

Scanning Electron Microscope (SEM), Transmission Electron Microscope (TEM) observations and Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXs) analysis, were employed to unveil the presence of prokaryotes population bearing elemental sulphur granules, growing on the body surface of the metazoan. Phylogenetic assessments were also undertaken to identify this invertebrate and microorganisms in thiotrophic symbiosis. Our results showed the occurrence of a thiotrophic symbiosis in a cnidarian identified as *Cladonema* sp.

### Conclusions/Significance

This is the first report describing the occurrence of a sulphur-oxidizing symbiosis in a cnidarian. Furthermore, of the two adult morphologies, the polyp and medusa, this mutualistic association was found restricted to the polyp form of *Cladonema* sp.

## Introduction

With over 13,000 living species of cnidarians identified, they are vast groups of marine invertebrates belonging to the phylum Cnidaria living mostly in marine shallow water ecosystems [1–3]. The phylum of Cnidaria is subdivided into six classes: Anthozoa that comes in the polyp form (such as anemones, corals), the recently reclassified Myxozoa (parasitic animals), Cubozoa, Hydrozoa, Scyphozoa, and Staurozoa [2–6].

The production of two adult morphologies, either in the shape of polyps or medusae (such as jellyfish), is intrinsic features of cnidarians. Furthermore, in many invertebrates belonging to this phylum, both forms are generated alternately during their life history [1, 7–9]. A typical life cycle in colonial or solitary cnidarians begins with a planula, a pear-shaped ciliated larva developing from gamete fusion, upon spawning of male and female medusae freely in the water column. The planula after anchorage on a hard substratum, metamorphoses into a primary polyp which gives rise, asexually to new polyps and so forth [10–11]. Once conditions are favourable, the polyp via metagenesis will then generate and release a multitude of medusae, that will adopt later a pelagic mode of life and a new cycle starts, invariably [1, 8, 9, 12–15].

Generally, cnidarians are carnivorous creatures that prey to meet their nutritional demands. Nevertheless, some members of this phylum can take advantage of symbiosis, to complement their nutrient intake. Corals and sea anemones in close partnership with endosymbiotic dinoflagellate algae (genus *Symbiodinium*, commonly termed zooxanthellae), illustrate perfectly this alternative, whereby symbionts can provide via transfer, up to 60% of their photosynthate to their hosts [2, 16–26]. Other authors have also reported comparable processes in the green *Hydra* sp. with their endosymbiotic photosynthetic algae of genus *Chlorella*. [22, 27–29] and in the jellyfish *Cassiopea xamachana* residing in the mangrove [30], in which the dinoflagellate symbionts met up to 169% of the jellyfish's nutritional requirements.

Like photosynthetic symbiosis, sulphur-oxidizing symbiosis has also been proven to play a substantial role in the nutrition (ranging from 100% in organisms without digestive tract as for *Riftia pachyptila*, to lower in other marine invertebrates possessing a reduced digestive tract) of their hosts by providing them with organic compounds biosynthesized from inorganic carbon [31]. Symbiotic sulphur-oxidizing bacteria are chemoautotrophs that possess the ability to make use of sulphide or other inorganic reduced sulphur as electron donors to generate energy in the form of ATP via oxidative phosphorylation. This serves to fuel carbon dioxide fixation, via Calvin cycle or reverse tricarboxylic acid cycle, into organic compounds, ultimately providing the host with metabolites essential for its own needs. Usually, oxygen is the final electron acceptor of this electron transport chain system [32–38]. Protection against sulphide poisoning has also been suggested as an alternative role of sulphur-oxidizing bacteria to their hosts [39–41]. Hydrogen sulphide is a strong cytochrome c oxidase inhibitor which hinders the functioning of the respiratory chain. However, whether these bacteria truly detoxify host's microenvironment, remains contentious [42].

In various sulphidic environments, thioautotrophic bacteria can organize as free-living organisms in bacterial mats [43–46], or in chemosynthetic symbioses with diverse marine invertebrates colonizing those habitats [34]. This kind of mutualistic relationship was described later in other reducing habitats, namely shallow waters, cold seeps [47, 48], sea-grass beds [49], whale falls [43] sunken woods [50, 51], and organic rich mud or mangrove peat [36]. Investigations of these extreme environments have also revealed their unexpected biodiversity. Importantly, a common denominator to all these dissimilar extreme environments, is the presence of an inverse gradient of oxygen and sulphide (or methane), so-called chemocline. It is at its oxic-anoxic interface that chemosynthetic symbioses prosper [32, 33, 37].

In marine mangrove, comparable chemoclines exist due to a steady production of biogenic sulfidic molecules from the sediment or wood falls [51]. In this habitat, sulphur-oxidizing microorganisms were found in symbiosis with the lucinid bivalve *Lucina pectinata* [52], the ciliate *Zoothamnium niveum* [36, 50, 53], the nematode *Eubostrichus diana* [54] and pseudovorticellids [50]. Recently, we observed in this same aquatic biotope, a kind of mutualism involving sulphur-oxidizing bacteria that had not been reported before [55]. Here we describe for the first time, the occurrence of a symbiosis between thioautotrophic bacteria and a cnidarian (Medusozoa), *Cladonema* sp. living in sulphidic shallow-water environments.

## Materials and Methods

### Sampling site

Individuals of *Cladonema* sp. were collected by hand from the marine sediment of the mangrove lagoon "Manche à Eau" (61°33'24"W-16°16'36"N) in Guadeloupe, French West Indies, Caribbean. Only seven polyps were found at 3 years interval close to sunken leaves of *Rhizophora mangle* covering the sediment. The first two individuals collected in 2008 were used for SEM and TEM studies. The five other individuals collected in July 2011, were used for EDXs analysis and SEM observations, DNA extraction and phylogenetic analyses (including the bacterial phylogeny). Three medusa individuals were collected from sea grass beds of *Caulerpa racemosa* from the same lagoon in January 2013.

No specific permissions were required from these locations/activities. Our study did not involve endangered or protected species.

### Ultrastructural analyses

Samples collected were observed and photographed with a stereomicroscope before preparation for Scanning Electron Microscope (SEM) and Transmission Electron Microscope (TEM) observations in order to detect possible symbiosis.

Samples for SEM observations were fixed 2 hours at 4°C in 2% glutaraldehyde solution in cacodylate buffer (900mOsm, pH 7.2). They were then dehydrated in graded concentrations of acetone, critical point dried in CO<sub>2</sub> and sputter-coated with gold before observation with a FEI Quanta 250 at 20kV. For TEM observations, samples were prefixed for one hour at 4°C in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M pH 7.2 cacodylate buffer adjusted to 900mOsm. After a brief rinse in the same buffer, they were fixed for 45 minutes at room temperature in 1% osmium tetroxide in the same buffer with a final osmolarity adjusted to 1000mOsm, then rinsed in distilled water and post-fixed with 2% aqueous uranyl acetate for one more hour at RT before embedding in epoxy resin and observation in a Leo 912 TEM at 120Kv.

### Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDXs) analysis

In order to detect elemental compounds from individuals analyzed (such as sulphur), freshly fixed samples (as described for SEM preparation samples above) were observed using an Environmental Scanning Electron Microscope (FEI Quanta 250) operating at 5 kV under an environmental pressure of 7 Torr at 5°C. EDX spectra were obtained using a M-max 500 mm<sup>2</sup> Oxford detector.

### DNA extraction and amplification

DNA from Polyps was extracted by disrupting cells via three repeated cycles of freezing (5min at -80°C) and thawing (5min at 90°C) to release DNA. DNA from medusa stage was extracted using DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions.

The genes coding for 16S rRNA and 18S rRNA were amplified using universal primer set: 8F/907R (~907bp) for bacterial 16S rRNA gene (8F: 5'agagtttgatcctggctcag3' and 907R: 5'ccgtcaattcmtttagttt3') [56] and 1F/5R primer set (~950bp) (1F: 5'tacctgggtgatcctgccagtag3' and 5R: 5'cttggcaaatgcttgc3') [57] for eukaryotic 18S rRNA gene. PCR amplifications were performed as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 90 s and finally 72°C for 10 min.

Specific primers targeting the 16S bacterial sequences obtained from polyp DNA were designed manually (16S\_polyp\_ectosym\_1F: 5'ggactgagaggtcgaacagc3' and 16S\_polyp\_ectosym1R: 5'gcgtcagtattggctcaggt3') in order to verify the presence of polyp sulphur-oxidizing symbiont in medusa's DNA. For this set of specific primers, the PCR conditions were performed as follows: 94°C for 5 min, 30 cycles of 94°C 30 s, 58°C 30 s, 72°C 1min and finally 72°C for 7 min.

### Gene cloning and sequencing

Amplicons of 18S rRNA gene of medusa and polyp were directly sequenced by Genoscreen (<http://www.genoscreen.com>).

On the other hand, the prokaryotic 16S rRNA gene sequences were first purified using QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and then cloned with pGEM-T cloning kit (promega) according to manufacturer's instruction. Inserts from 13 positive clones were isolated and sequenced by Genoscreen (<http://www.genoscreen.com>) using the vector primers T7 and SP6. Following analysis, the 18S rRNA and 16S rRNA gene sequences obtained in this study were then deposited in the GenBank database under no. KJ493943 and KJ493944 respectively.

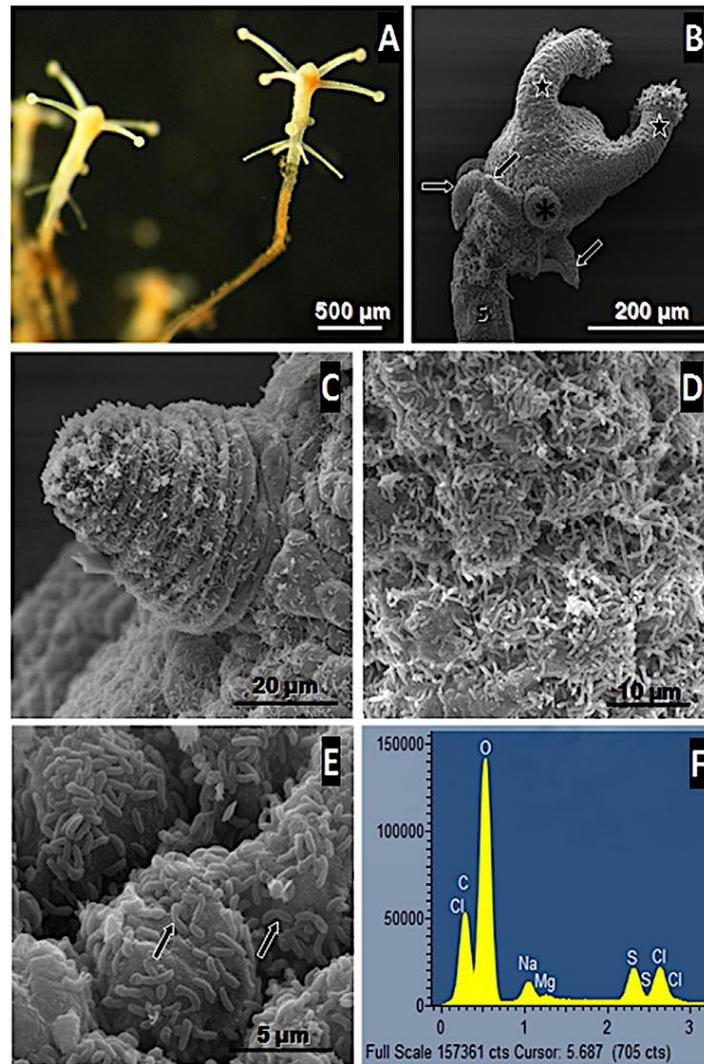
### Phylogenetic analysis of 16S rRNA and 18S rRNA gene sequences

The gene sequences encoding 18S and 16S rRNA obtained (926 bp and 895 bp respectively) from polyps following analysis, were compared with the National Center of Biotechnology information NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database using BLAST [58]. Best hits were included in phylogenetic analyses. The phylogenetic analyses were conducted using MEGA version 5 [59]. Sequences aligned using MUSCLE and alignments were checked manually. The phylogenetic trees were constructed from multiple-aligned data using the Maximum Likelihood (ML) method with Tamurai-Nei as genetic distance model. Nodes robustness was assessed by performing 1000 bootstrap replicates, and only bootstrap values above 50% are indicated at the nodes of the trees.

## Results

### Morphological and ultrastructural analysis of the benthic polypoid phase

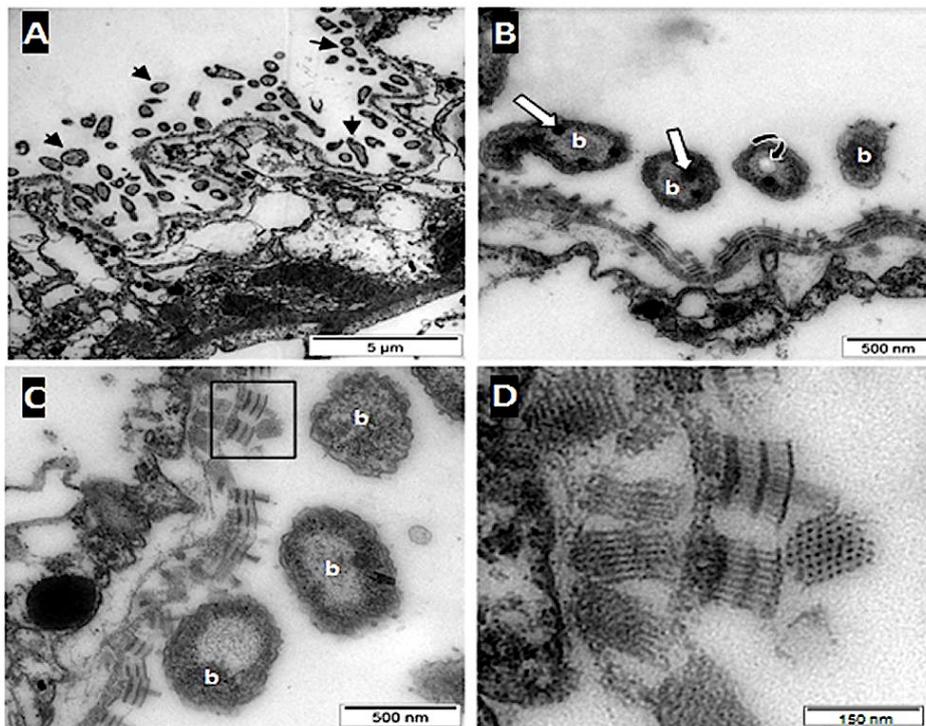
The individuals collected, formed delicate branched colonies containing few polyps (up to five for the sample collected in 2011) and were connected by tube-like hydrocauli (Fig 1A). The latter was connected by a small horizontal root-like stolon that anchored the colony into the sediment. Such structure was found between numerous sunken leaves of *Rhizophora mangle* covering the marine mangrove sediment. The colony was small and the polyps themselves were tiny and characterized by a white color (Fig 1A). These polyps are roughly cylindrical surrounded by four tentacles at the terminal end (Fig 1A and 1B). According to SEM views, the whole body of each polyp appeared to be covered by small bacteria (up to 1µm in length) forming a bacterial coat that sometimes seemed relatively dense (Fig 1C and 1D). These ectosymbiotic bacteria could divide at the surface of the polyps suggesting that they were in a productive environment allowing bacterial growth (Fig 1E). In order to characterize the metabolic type of



**Fig 1. Structural analysis of polyp stage of *Cladonema* sp.** (A) light micrograph of freshly collected polyps connected by a tube-like hydrocauli. The polyps appear white in colour especially for the tentacles. SEM image (B) shows that the polyp is composed of an entocodon (asterisk), a stalk (S), capitate (star) and filiform tentacles (arrows). A higher magnification of the polyp displays a filiform tentacle and small bacteria that can be clearly distinguished at the surface of the polyp (C). D and E show ectosymbiotic rod-shaped bacteria covering the polyp. Some of these are dividing (arrows) suggesting a high metabolism. The EDX spectrum obtained from the polyp (F) shows a peak of elemental sulphur suggesting that such bacteria are thioautotrophic (Cl: chloride, Na: sodium, Mg: magnesium, C: carbon, O: oxygen, S: elemental sulphur).

doi:10.1371/journal.pone.0127625.g001

the bacterial symbionts involved in such association, two polyps were analyzed in EDXs using an environmental SEM searching for elemental compound [46, 60]. The analysis showed that sulphur was one of the main elements detected from the bacteria (Fig 1E), thus suggesting that these prokaryotic cells contained elemental sulphur granules which are a typical feature of sulphur-oxidizing bacteria. Sulphur was also detected using Raman spectrometry (55) from the same polyp-type. So both techniques allowed the detection of elemental sulphur from the polyps. Furthermore, analyses of thin sections of the specimen observed by TEM, showed that bacteria were localized only outside the host tissue and no intracellular bacteria or endosymbiosis could be observed in *Cladonema* sp. (Fig 2A). The bacteria were only distributed at the surface of the polyp body and presented the typical double membrane of gram negative bacteria. Moreover, the bacterial cytoplasm contained membrane-bound empty vesicles which corresponded in fact to sulphur granules located within the periplasmic space (Fig 2B). The bacterial



**Fig 2. Ultrastructural analysis of polyp by TEM.** Thin sections clearly show that the bacteria (arrows) are distributed exclusively on the body surface of polyps. No intracellular bacteria could be observed suggesting that there is no endosymbiosis in *Cladonema* sp. Higher magnification of the ectosymbionts (B) shows that the cytoplasm of the bacteria located outside the host tissue (b) contained two kinds of inclusions. The non-membrane-bound inclusions correspond to glycogen-like granules (white arrows) distributed throughout the cytoplasm while empty membrane-bound inclusions (curved arrow) correspond to sulphur granules probably located within the periplasm. The ectosymbionts appear to be fixed to the host cytoplasmic membrane (C) through atypical structures (see inset). Fig D displays a higher magnification of an atypical structure which is organized on two levels of "tubes" with a central tuft in contact with the bacteria. The nature of such "tubes" is unknown.

doi:10.1371/journal.pone.0127625.g002

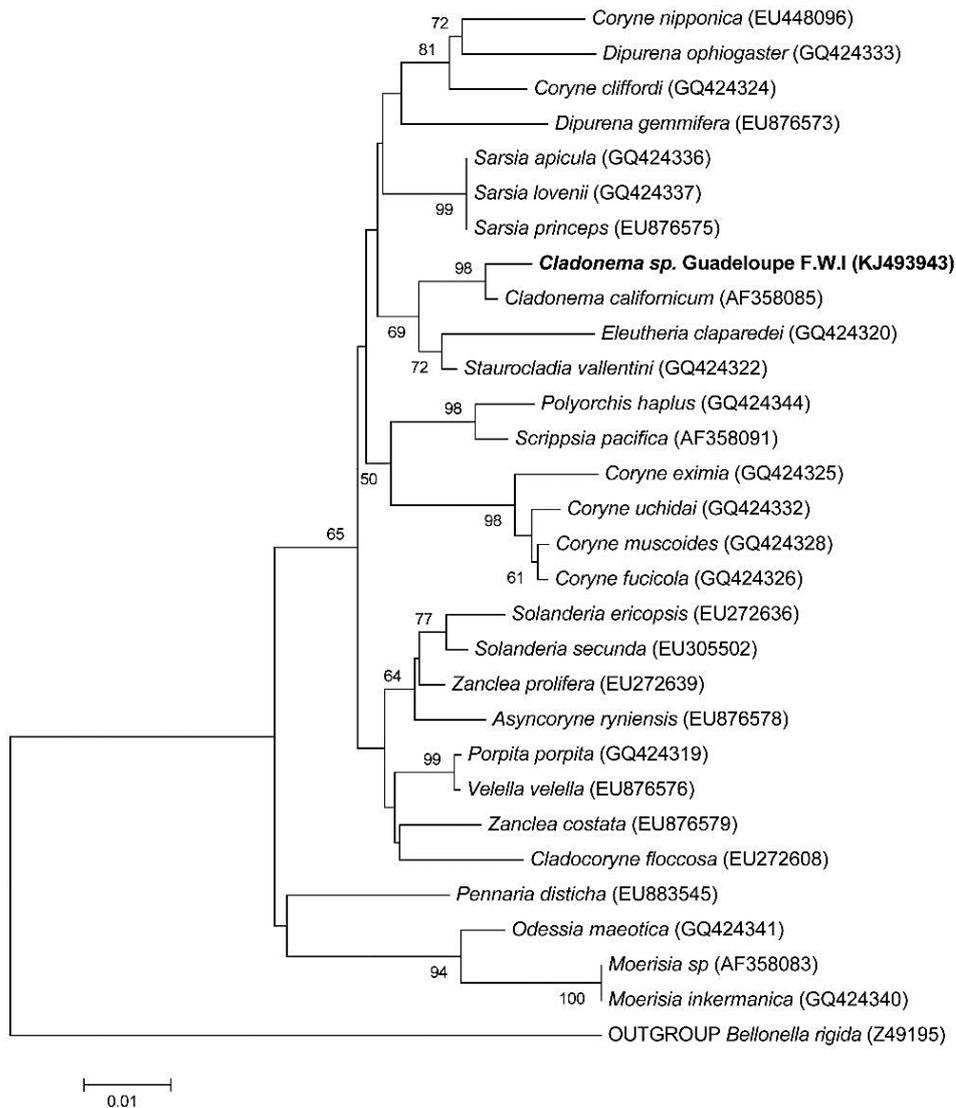
cytoplasm also contained numerous non membrane-bound irregular inclusions that are considered to be glycogenic storage granules. Most of the bacterial cell volume was occupied by the nucleoid area characterized by tenuous DNA filaments while the ribosomes were close to the internal membrane (Fig 2B). Ectosymbionts appeared to be attached to the host cytoplasmic membrane via a particular structure (Fig 2C). The structure seemed to be composed of three layers of dense tubules (30 nm in length) with an external central brush (Fig 2D) in contact with the outer membrane of the ectosymbiont (Fig 2C).

### Phylogenetic analysis

**Polyp *Cladonema* sp.** The phylogenetic reconstruction based on partial sequences of the genes coding for 18S rRNA, placed this organism on a capitata group of hydrozoan class (phylum Cnidaria). Maximum Likelihood (ML) tree revealed that this organism formed a distinct clade with the closest relative *Cladonema californicum* (Phylum: Cnidaria; class: Hydrozoa, order: Anthoathecata, suborder: Capitata, Family Cladonematidae, Genus: *Cladonema* sp.) (Fig 3) [7]. The sister group was supported by robust branch of the phylogenetic tree (98% bootstrap support from 1000 replicates). The sequences of the genes coding for 18S rRNA of these two *Cladonema* spp. differed by four bases and shared 99% pairwise identity suggesting that they could be the same species. However, the partial sequences obtained, and the lack of other sequences of the genes encoding 18S rRNA from *Cladonema* sp., did not allow us to confirm the relationship between these two hydrozoans. Further molecular investigations involving additional marker genes (i.e. COI, 28S rDNA and ITS) are needed in order to resolve in depth the phylogeny of these species.

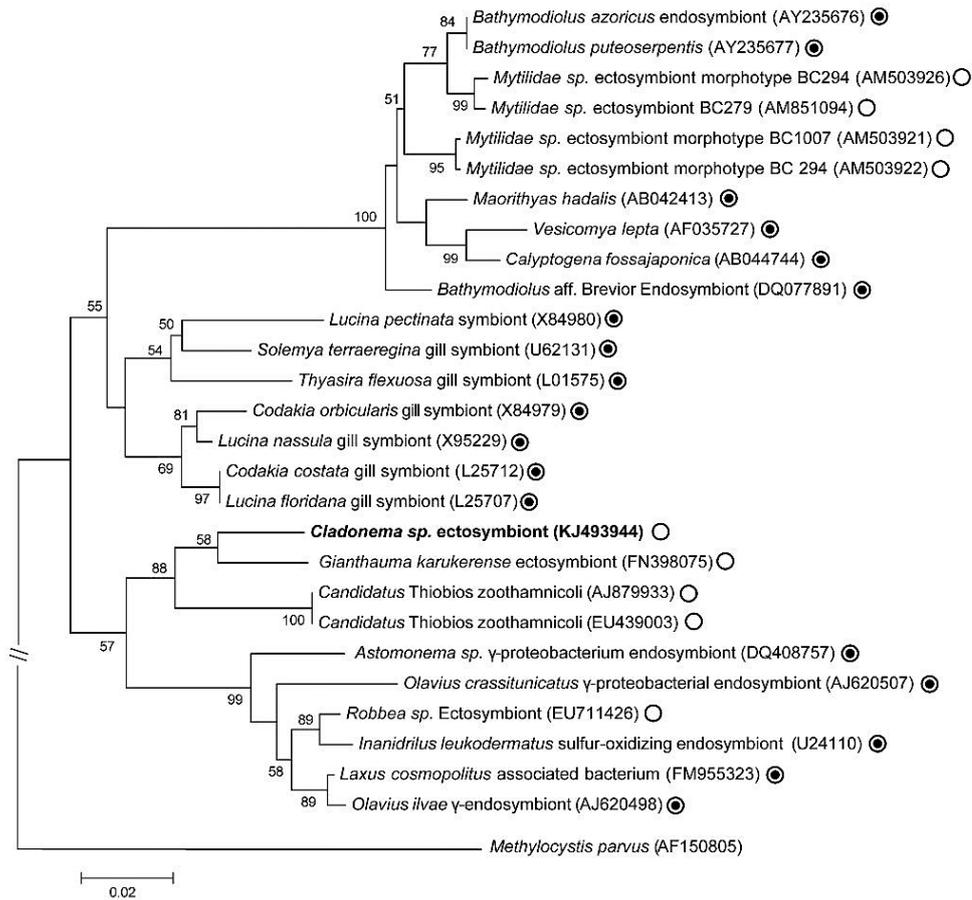
**Polyp *Cladonema* sp. Ectosymbionts.** A phylogenetic tree based on partial sequences coding for 16S rRNA genes, revealed that these bacteria belong to gamma-proteobacteria (Fig 4). Maximum likelihood (ML) tree showed that they were in a monophyletic group formed by other ectosymbiotic thioautotrophic bacteria retrieved from sulfide-rich environment. However, the percentage pairwise identity between *Cladonema* ectosymbiont and its closest relatives bacterial ectosymbiont species colonizing the giant archaea *Giganthauma karukerense* [61] is 95.3%, shows that it could be two different bacterial species. On the other hand, due to the very low individuals available for this study, it was unfortunately not possible to preserve polyps in PFA for *Fluorescent In Situ Hybridization* experiment with a specific probe designed from this sequence in order to check that such sequence corresponded to the ectosymbionts. However, the 16S rRNA gene sequence obtained allow to design two specific primers in order to amplify more specifically the ectosymbiont rRNA gene sequences from other polyps or from medusa.

**Identification of *Cladonema* sp. medusa.** Single medusa collected from the sea grass beds was small (around 3 mm length) and moving by pulsating the bell (Fig 5A). The sequence of partial 18S rRNA gene from medusa, showed 100% identity with the partial 18S rRNA gene sequence of the current polyps suggesting that the medusa and the polyps were the same animals but at two different stages. Conversely to the polyp stage, no bacteria were detected on the surface of the medusa either on the bell or on the tentacles (Fig 5B–5D). The surface of the tentacle contained few short cilia (Fig 5C) which are not to be confused with bacterial symbionts (Fig 1E) was taken at the same magnification as Fig 5C). Thus, no bacterial ectosymbiont was observed on the medusa. Furthermore, the sulphur-oxidizing bacterial symbiont 16S rRNA gene could not be amplified by PCR from the medusa DNA using the specific primer set designed in this study (S1 Fig). Only a non-specific band (above the expected size) was obtained from the medusa DNA template confirming that no ectosymbiont was present in/on *Cladonema* sp. medusa. This PCR reaction result was consistent with the analysis of the medusa ultrastructure described above. Consequently, both results appear to indicate that the *Cladonema* sp. medusa was free of sulphur-oxidizing bacterial ectosymbionts.



**Fig 3. Phylogenetic tree.** Maximum Likelihood tree displaying the phylogenetic relationships between *Cladonema sp. Guadeloupe F.W.I.* (in bold) with other capitata hydrozoans based on the analysis of partial 18S rRNA gene sequences of 895 nucleotides. *Bellonella rigida* was used as the outgroup. Only bootstrap values of more than 60% are shown at each node. The scale bar corresponds to 0.01 changes per nucleotide.

doi:10.1371/journal.pone.0127625.g003

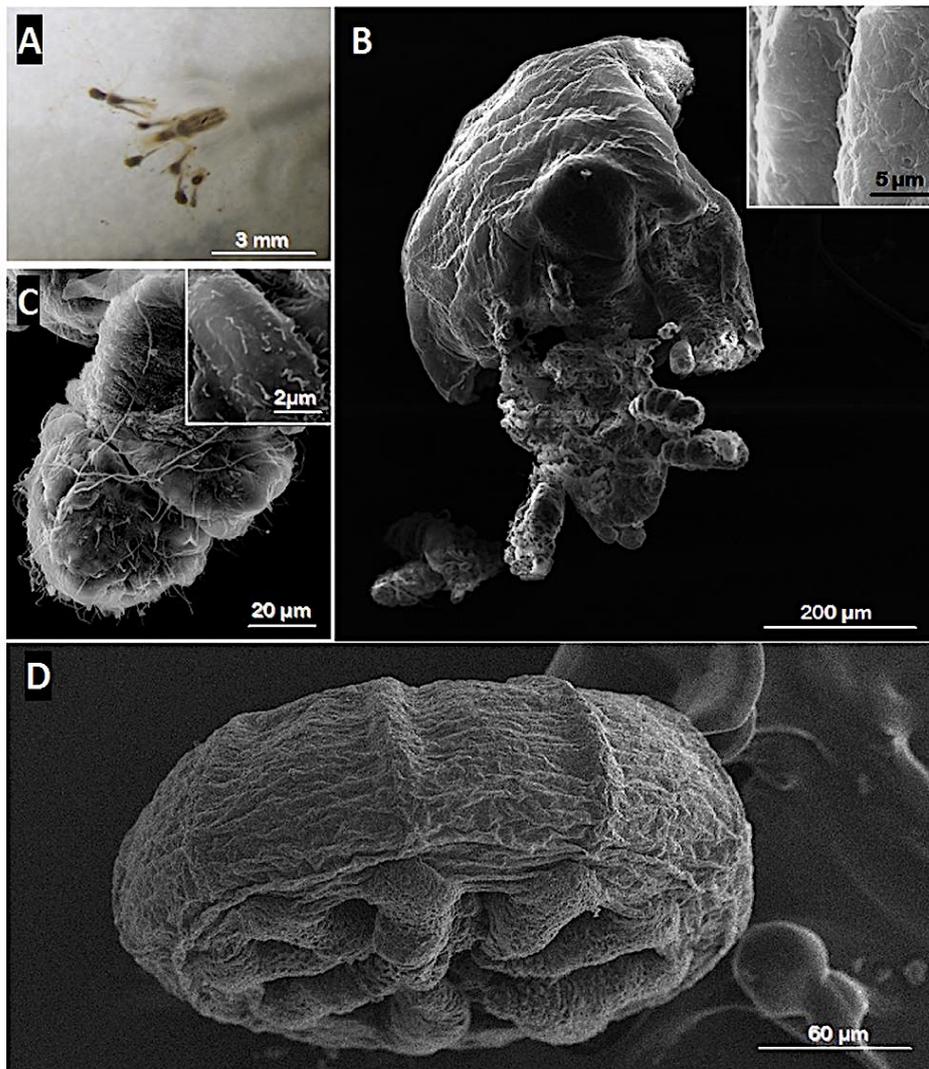


**Fig 4. Phylogenetic tree.** Maximum Likelihood tree displaying the phylogenetic relationships between the *Cladonema* sp. ectosymbiont (in bold) with other endo and ectosymbionts sulphur-oxidizing bacteria based on the analysis of 16S rRNA gene sequences of 926 nucleotides. *Methylocystis parvus* was used as the outgroup. Only bootstrap values of more than 50% are shown at each node. The white circles with or without black dot indicate whether symbionts are intra- or extracellular respectively. The scale bar corresponds to 0.02 changes per nucleotide.

doi:10.1371/journal.pone.0127625.g004

### Discussion

Here we report on a thiotrophic symbiosis occurring between a cnidarian and sulphur-oxidizing bacteria in the sulfidic mangrove of Guadeloupe. Primary inspections, through closer morphological and ultrastructural examinations, unveiled the presence of prokaryote populations bearing elemental sulphur granules, thriving on the body surface of the metazoan species. Phylogenetic assessments were undertaken in order to identify the nature of the invertebrate and microorganisms involved in thiotrophic symbiosis. The results showed, with strong support, that this animal was closely related to the hydrozoan *Cladonema californicum* belonging to the



**Fig 5. Ultrastructural analysis of a Medusa.** Light micrograph of the medusoid stage of *Cladonema* sp. (A) shows that the tentacles extended around the bell while SEM image (D) shows that the tentacles were retracted due to the chemical fixation artefact. No bacterium was observed on the bell surface of the medusa (B, D) or on its tentacles (C-D). The two insets clearly confirmed the absence of ectosymbiotic bacteria on the bell surface (B) and on the tentacles (C) of the medusa.

doi:10.1371/journal.pone.0127625.g005

class Hydrozoa and to the genus *Cladonema*, hence this metazoan species is named *Cladonema* sp. Phylogenetic analysis of the symbiotic bacteria attached to the cnidarian, assigned them within a well-supported clade formed by the sulphur-oxidizing epibionts, *Candidatus Giganthauma karukerense* [61] and *Candidatus Thiobios zoothamnicoli* [62] bacteria. Therefore, the *Cladonema* sp. bacterial ectosymbionts were sulphur-oxidizers, confirming previous observations made by ultrastructural analysis. It should be stressed that both ectosymbiotic bacteria mentioned above [61, 62], similar to the *Cladonema* sp. bacterial symbionts, were also found in the sulfidic mangrove of Guadeloupe. Taken together, the results from an attentive examination of this metazoan specimen, brought to light a novel kind of invertebrate-bacterial symbiosis, occurring between the hydrozoan *Cladonema* sp. belonging to the phylum Cnidaria and thioautotrophic bacteria.

### Why is this unique?

In the literature, articles describe cnidarians mostly as marine invertebrates harbouring photoautotrophic endosymbionts [2, 16–30]. Those that do mention the occurrence of thiobacteria in association with some members of the phylum Cnidaria, do not demonstrate the existence of mutualistic relationship [23, 29, 63–70]. More importantly, we have never come across any description of sulphur-oxidizers in ectosymbiosis with a cnidarian, after reviewing published literature on this subject.

### Polyps and medusa are two stages of the same animal

We could not attest via phylogenetic assessment that the polyp specimen was from the same species as *C. californicum*. However information collected on the latter has enabled us to better define the metazoan *Cladonema* sp. Indeed, *C. californicum* has been reported to exhibit two adult morphologies, the polyp and semi benthic medusa during its life cycle [7, 71–74]. Moreover, Rees [75] studied *C. californicum* in greater details and represented it on a sketch with four capitate tentacles around the oral end of hydranths and four to five filiform tentacles located at the mature polyp base. Importantly, the author also indicated, the occurrence of nascent medusa through budding at the mid-region of hydroids, between the two rings of tentacles, a tissue mass area so-called entocodon. Surprisingly, similar features were observed on the SEM microphotographs taken from the polyps collected in sulphidic shallow-water environments of marine mangrove. Particularly, one could picture on these micrographs, entocodons budding laterally from the hydranth, a region between the two crowns of tentacles [9]. From this observation, we reasoned that *Cladonema* sp. collected, could equally exhibit two adult morphologies in its life cycle, namely medusae and polyps. Consequently, to find out whether this mangrove cnidarian produced the medusa adult form, we inspected areas close to the location where *Cladonema* sp. polyps were harvested. The analysis of the partial 18S rRNA gene sequences extracted from medusae, showed 100% identity with the polyp sequence, confirming our hypothesis. Hence, the polyp and the medusa were two distinct stages of the same animal, *Cladonema* sp., the latter cycling between these two adult forms.

### Distinct symbiotic status between medusae and polyps

The examinations of the polyp form of *Cladonema* sp. showed the occurrence of a symbiosis with sulphur-oxidizing bacteria. To determine the symbiotic status of the medusa, we looked through ultrastructural observations and via 16S rRNA gene sequence analysis of the *Cladonema* sp. symbiont from DNA extracted from the medusa sample. Both analyses were negative; no sulphur-oxidizing bacteria were present on the body of the medusa. Consistent with this observation, partial 16S rRNA *Cladonema* sp. symbiont gene sequences from the mixture of

medusa, also failed to amplify. Interestingly, only the polyp stage of *Cladonema* sp. harboured the thioautotrophic ectosymbionts.

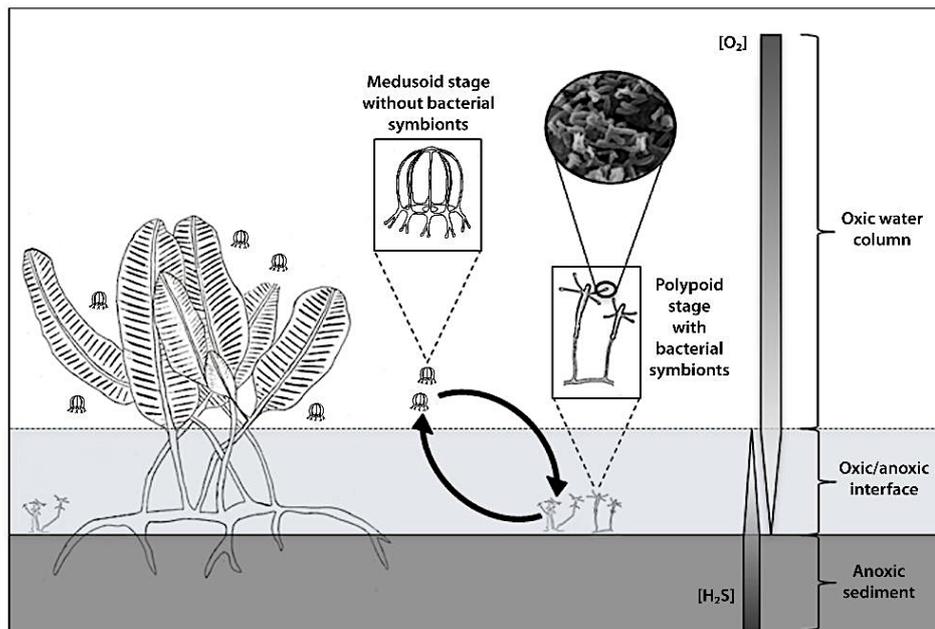
To understand this behavioural dissimilarity between medusa and polyps in the face of the sulphur-oxidizing symbionts, we looked into the sulphur-oxidizer requirements. A fundamental requirement is the presence of an inverse gradient of hydrogen sulphide and oxygen, so-called chemocline [36]. More precisely, it is at this anoxic-oxic interface which is enriched in sulphides that thioautotrophic symbioses develop [32–34]. Sulphidic concentration in the mangrove swamp in which our samples were collected, has been measured in the past by Laurent *et al.* and Muller *et al.* [50, 61]. They showed that the sulphide concentration was lower in the mangrove water column with a concentration of 0.1  $\mu\text{M}$  while in the mangrove sediment, it could reach up to 1mM, thus, validating the high content of sulphide in the mangrove sediment. When we analysed with caution the locations in which medusa and polyps were harvested, it was clear-cut that the sulphidic status of these two sites were divergent. The polyps were found tethered on mangle leaves lying on the mangrove sediment rich in sulphide. In stark contrast, the medusae were living in the sea grass bed of the mangrove water column depleted in sulphide. Thus, only the polypoid stage of the cnidarian, could harbour the thioautotrophic ectosymbionts as they live in a sulphidic rich environment. Fig 6 illustrates the distinctive symbiotic status existing between these two forms that clearly relies on an inverse gradient of sulphur and oxygen present in the mangrove ecosystem. It is possible that the immature medusae can actually shelter thioautotrophic ectosymbionts when still attached to the hydroid, but we did not observe such association on the surface of the polyp entocodon.

### Benefit of such symbiosis

Symbiosis when beneficial to both partners (mutualism) can provide them with new capabilities. In this respect, nourishment either through metabolic exchanges [2, 16–30] or digestion of symbiotic microorganisms by the host [76–78] has been proven to be an effective way to sustain organisms in environment deprived in nutrients. Yet, symbiosis also takes part in a range of processes very diverse such as defence against predator as reported in bioluminescent symbiosis in the squid *Euprymna scolopes* and *Vibrio fischeri* [79, 80] or animal ontogeny and reproduction, in biology, as reviewed by McFall-Ngai *et al.* [81].

In the case of sulphur-oxidizing bacterial symbiosis, in addition to nutritional exchanges occurring between these symbionts and marine invertebrates inhabiting sulfidic habitats, other important roles have been documented. One involves the putative detoxification of the host environment by these thiobacteria. Indeed, chemoautotrophic symbionts use reduced compounds (such as  $\text{HS}^-$  in the environment) to yield energy in order to supply organic carbon to their metazoan hosts [32, 34]. This process may contribute to reducing the amount of these toxic compounds in the vicinity of the host. Minimizing sulfide toxicity, has been proposed for some symbiotic sulfide-oxidizing microorganisms [82, 83] enabling the hosts to colonize ecological niches which are in fact toxic for most of the sessile eukaryotic organisms.

With regards to *Cladonema* sp., only its benthic form, the polyp living in rich sulfidic environment, harbours sulphur-oxidizing bacteria. These findings, in the light of what is known about sulphur-oxidizing symbioses [82–84], suggests that sulphur-oxidizing ectosymbionts could assist the host *Cladonema* sp. polyp in this extreme environment, in terms of both nutrition and detoxification of the milieu. For example, it is well-known that  $\text{HS}^-$  is an inhibitor of the respiratory chain, so it is plausible that the ectosymbionts might assist the polyp to reduce the sulphide toxic effect in its microenvironment. However, in *N. ictus* and *N. frassianus* amphipods, sulfide-oxidizing thiothrix ectosymbionts do not play an active role in sulfide detoxification of the host environment [42]. Other possibilities that could explain such symbiosis,



**Fig 6. Symbiotic status model in *Cladonema* sp.** The diagram depicts a model to explain the distinctive symbiotic status existing between polyps and medusae of *Cladonema* sp. which seems to rely on an inverse gradient of sulphur and oxygen in the environment. The drawing shows that only the polypoid stage of the cnidarian living in a sulphide rich environment (at the oxidic/anoxic interface) bears symbiotic sulphur-oxidizing bacteria while the medusoid stage located in the water column depleted in sulphide, is free of such ectosymbiosis. Such medusa were usually observed closed to sea grasses of *Caulerpa taxifolia* within the mangrove lagoon.

doi:10.1371/journal.pone.0127625.g006

could relate to nutrition such as nutritional exchanges between these two partners, or simply grazing. Metabolic transfers were suggested between chemosynthetic epibionts and the shrimp *Rimicaris exoculata*, but the identity of such organic compounds transferred remains elusive [84]. More studies need to be carried out to determine the role that these sulphur-oxidizing ectosymbionts play in *Cladonema* sp. polyps such as amplification of functional genes involved in sulphur metabolism (as *aprA*, *sox*, etc.) or nanosims experiments using  $^{13}\text{C}$  labelled  $\text{CO}_2$  in order to clarify the carbon transfer to the host tissues via bacterial  $\text{CO}_2$  fixation. The main problem for such additional experiments will be to find more polyps as they are difficult to collect and consequently quite rare to investigate.

In summary, to the best of our knowledge, this is the first report to date on a thiotrophic symbiosis involving a cnidarian. This study is a jump-start to carry out more investigations in order to decipher the molecular pathways involved in the sulphide rich habitat adaptations in sulphur-oxidizing ectosymbioses.

### Supporting Information

**S1 Fig. PCR amplifications of *Cladonema* sp. polyp ectosymbiont.** The PCR amplifications of *Cladonema* sp. polyp ectosymbiont were done using the specific primer set designed in this

study. The gel shows specific DNA bands representing a 440bp region of sulphur-oxidizing symbiont 16S rRNA gene in lanes 5 and 8 accordingly to phylogenetic analysis. Lane 1: ladder, lane 2: negative control (H<sub>2</sub>O), lane 3: *Escherichia coli* DNA, lane 4: *Cyanobacterium* sp. DNA, lane 5: *Zoothamnium* sp. DNA, lane 6: *Zoothamnium* sp. DNA dilution 1/10, lane 7: *Cladonema* sp. medusa DNA, and lane 8: *Cladonema* sp. polyp DNA. (TIF)

## Acknowledgments

We sincerely thank Dr Linda Cheung for reading the manuscript and her helpful comments.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OG SG-R SA. Performed the experiments: OG SG-R SA AG. Analyzed the data: OG SG-R SA. Contributed reagents/materials/analysis tools: OG SG-R SA AG. Wrote the paper: OG SG-R SA.

## References

1. Young CM, Sewell MA, Rice ME (2002) Atlas of marine invertebrate larvae: Academic Press: San Diego. ISBN 0-12-773141-5. XIV, 626 pp.
2. Turk T, Kem WR (2009) The phylum Cnidaria and investigations of its toxins and venoms until 1990. *Toxicon* 54: 1031–1037. doi: [10.1016/j.toxicon.2009.06.031](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.031) PMID: [19576920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19576920/)
3. Collins AG, Schuchert P, Marques AC, Jankowski T, Medina M, Schierwater B. (2006) Medusozoan phylogeny and character evolution clarified by new large and small subunit rDNA data and an assessment of the utility of phylogenetic mixture models. *Syst Biol* 55: 97–115. PMID: [16507527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507527/)
4. Miranda LS, Collins AG, Marques AC (2010) Molecules clarify a cnidarian life cycle—the “hydrozoan” *Microhydrula limopsicola* is an early life stage of the Staurozoan *Halicyclystus antarcticus*. *PLoS ONE* 5 (4): e10182. doi: [10.1371/journal.pone.0010182](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010182) PMID: [20418959](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20418959/)
5. Marques AC, Haddad V Jr, Esteves Migotto A (2002) Envenomation by a benthic Hydrozoa (Cnidaria): the case of *Nemalécium ighti* (Haleciidae). *Toxicon* 40: 213–215. PMID: [11689243](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11689243/)
6. Collins AG (2002) Phylogeny of Medusozoa and the evolution of cnidarian life cycles. *J Evolution Biol* 15: 418–432.
7. Aeme B, Gröger H, Schuchert P, Spring J, Schmid V (1996) The polyp and its medusa: a molecular approach. *Sci Mar* 60: 7–16.
8. Daly M, Brugler MR, Cartwright P, Collins AG, Dawson MN, Fautin DG, et al. (2007) The phylum Cnidaria: A review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after *Linnaeus*. *Zootaxa* 1668: 127–182
9. Lucas CH, Graham WM, Widmer C, Michael L (2012) Chapter Three—Jellyfish life histories: Role of polyps in forming and maintaining *Scyphomedusa* populations. *Advances in Marine Biology*: Academic Press. pp. 133–196. doi: [10.1016/B978-0-12-394282-1.00003-X](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394282-1.00003-X) PMID: [22877612](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22877612/)
10. Galliot B, Schmid V (2002) Cnidarians as a model system for understanding evolution and regeneration. *Int. J. Dev. Biol.* 46: 39–48. PMID: [11902686](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11902686/)
11. Technau U, Steele RE (2011) Evolutionary crossroads in developmental biology: Cnidaria *Development* 138, 1447–1458. doi: [10.1242/dev.048959](https://doi.org/10.1242/dev.048959) PMID: [21389047](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21389047/)
12. Cartwright P, Nawrocki AM (2010) Character evolution in Hydrozoa (phylum Cnidaria). *Integr Comp Biol* 50: 456–472. doi: [10.1093/icb/icq089](https://doi.org/10.1093/icb/icq089) PMID: [21558215](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21558215/)
13. Gravier-Bonnet N, Lebon M-L (2002) Swimming medusoid gonophores in two species of Sertularella (Cnidaria, Hydrozoa, Sertulariidae) from Réunion Island, Indian Ocean. *Invertebr Reprod Dev* 41: 101–108.
14. Boero F, Gravier-Bonnet N (1995) The life cycle of *Pteroclava krempfi* (Cnidaria, Hydrozoa, Cladocorynidae), with notes on *Asyncoryne philippina* (Asyncorynidae). *Sci Mar* 56: 65–76.
15. Bouillon J, Boero F (2000) Phylogeny and classification of Hydroidomedusae. *Amaltea edizioni*, issue 24 of *Thalassia Salentina*, 296 pages.

16. Suescún-Bolívar LP, Iglesias-Prieto R, Thome PE (2012) Induction of glycerol synthesis and release in cultured *Symbiodinium*. PLoS ONE 7(10): e47182 doi: [10.1371/journal.pone.0047182](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047182) PMID: [23071753](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23071753/)
17. Ganot P, Moya A, Magnone V, Allemand D, Furla P, Sabourault C. (2011) Adaptations to endosymbiosis in a cnidarian-dinoflagellate association: differential gene expression and specific gene duplications. PLoS Genet 7(7): e1002187. doi: [10.1371/journal.pgen.1002187](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002187) PMID: [21811417](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21811417/)
18. Davy SK, Allemand D, Weis VM (2012) Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. Microbiol Mol Biol R 76: 229–261. doi: [10.1128/MMBR.05014-11](https://doi.org/10.1128/MMBR.05014-11) PMID: [22688813](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22688813/)
19. Meyer E, Weis VM (2012) Study of cnidarian-algal symbiosis in the “omics” age. Biol Bull 223: 44–65. PMID: [22983032](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22983032/)
20. Goodson MS, Whitehead LF, Douglas AE (2001) Symbiotic dinoflagellates in marine Cnidaria: diversity and function. Hydrobiologia 461: 79–82.
21. Ferrier-Pages C, Gattuso J, Cauwet G, Jaubert J, Allemand D (1998) Release of dissolved organic carbon and nitrogen by the zooxanthellate coral *Galaxea fascicularis*. Mar Ecol Prog Ser 172: 265–274.
22. Venn A, Loram J, Douglas A (2008) Photosynthetic symbioses in animals. J Exp Bot 59: 1069–1080. doi: [10.1093/jxb/erm328](https://doi.org/10.1093/jxb/erm328) PMID: [18267943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18267943/)
23. Krediet CJ, Ritchie KB, Paul VJ, Teplitski M (2013) Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. P Roy Soc Lond B: Bio 280: 20122328. doi: [10.1098/rspb.2012.2328](https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2328)
24. Bumiesci MS, Raab TK, Pringle JR (2012) Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate—cnidarian symbiosis. J Exp Biol 215: 3467–3477. doi: [10.1242/jeb.070946](https://doi.org/10.1242/jeb.070946) PMID: [22956249](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22956249/)
25. Fautin DG (2009) Structural diversity, systematics, and evolution of cnidae. Toxicon 54: 1054–1064. doi: [10.1016/j.toxicon.2009.02.024](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.02.024) PMID: [19268491](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19268491/)
26. Stachowicz JJ, Lindquist N (2000) Hydroid defenses against predators: the importance of secondary metabolites versus nematocysts. Oecologia 124: 280–288.
27. Bosch TC (2012) What Hydra has to say about the role and origin of symbiotic interactions. Biol Bull 223: 78–84. PMID: [22983034](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22983034/)
28. Kawaida H, Ohba K, Koutake Y, Shimizu H, Tachida H, Kobayakawa Y (2013) Symbiosis between hydra and chlorella: molecular phylogenetic analysis and experimental study provide insight into its origin and evolution. Mol Phylogenet Evol 66: 906–914. doi: [10.1016/j.ympev.2012.11.018](https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.11.018) PMID: [23219706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23219706/)
29. Wilkerson F (1980) Bacterial symbionts on green hydra and their effect on phosphate uptake. Microbiol Ecol 6: 85–92. doi: [10.1007/BF02020377](https://doi.org/10.1007/BF02020377) PMID: [24226837](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24226837/)
30. Verde EA, McCloskey L (1998) Production, respiration, and photophysiology of the mangrove jellyfish *Cassiopea xamachana* symbiotic with zooxanthellae: effect of jellyfish size and season. Mar Ecol Prog Ser 168: 147–162.
31. Felbeck H, Childress JJ, Somero GN (1981) Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats. Nature 293: 291–293.
32. Cavanaugh CM, McKiness ZP, Newton IL, Stewart FJ (2006) Marine chemosynthetic symbioses. The prokaryotes: Springer. pp. 475–507.
33. Stewart FJ, Newton IL, Cavanaugh CM (2005) Chemosynthetic endosymbioses: adaptations to oxic—anoxic interfaces. Trend Microbiol 13: 439–448. PMID: [16054816](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16054816/)
34. Dubilier N, Bergin C, Lott C (2008) Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. Nat Rev Microbiol 6: 725–740. doi: [10.1038/nrmicro1992](https://doi.org/10.1038/nrmicro1992) PMID: [18794911](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18794911/)
35. Yamamoto M, Takai K (2011) Sulfur metabolisms in epsilon-and gamma-Proteobacteria in deep-sea hydrothermal fields. Front Microbiol 2: 192 doi: [10.3389/fmicb.2011.00192](https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00192) PMID: [21960986](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21960986/)
36. Vopel K, Thistle D, Ott J, Bright M, Roy H (2005) Wave-induced H<sub>2</sub>S flux sustains a chemoautotrophic symbiosis. Limnol Oceanogr 50: 128–133.
37. Fenchel T, Riedl R (1970) The sulfide system: a new biotic community underneath the oxidized layer of marine sand bottoms. Mar Biol 7: 255–268.
38. Woyke T, Teeling H, Ivanova NN, Huntemann M, Richter M, Gloeckner FO, et al. (2006) Symbiosis insights through metagenomic analysis of a microbial consortium. Nature 443: 950–955. PMID: [16980956](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16980956/)
39. Edgcomb VP, Breglia S, Yubuki N, Beaudoin D, Patterson DJ, Leander BS, et al. (2011) Identity of epibiotic bacteria on symbiont euglenozoans in O<sub>2</sub>-depleted marine sediments: evidence for symbiont and host co-evolution. ISME J 5: 231–243. doi: [10.1038/ismej.2010.121](https://doi.org/10.1038/ismej.2010.121) PMID: [20686514](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20686514/)
40. Hentschel U, Berger E, Bright M, Felbeck H, Ott J (1999) Metabolism of nitrogen and sulfur in ectosymbiotic bacteria of marine nematodes (Nematoda, Stilbonematinae). Mar Ecol Prog Ser 183: 149–158.

41. Tokuda G, Yamada A, Nakano K, Arita NO, Yamasaki H (2008) Colonization of *Sulfurovum* sp. on the gill surfaces of *Alvinocaris longirostris*, a deep-sea hydrothermal vent shrimp. *Mar Ecol* 29: 106–114.
42. Bauemeister J, Assig K, Dattagupta S (2013) Exploring the sulfide tolerance of ectosymbiotic *Niphargus* amphipods from the Frasassi caves, central Italy. *Int J Speleol* 42: 6.
43. Deming JW, Reysenbach AL, 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 Techniq* 37: 162–170. PMID: 9145396
44. Girmth AC, Grünke S, Lichtschlag A, Felden J, Knittel K, Wenzhofer F, et al. (2011) A novel, mat-forming *Thiomargarita* population associated with a sulfidic fluid flow from a deep-sea mud volcano. *Environ Microbiol* 13: 495–505. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02353.x PMID: 20946529
45. Schauer R, Røy H, Augustin N, Gennerich HH, Peters M, Wenzhofer F, et al. (2011) Bacterial sulfur cycling shapes microbial communities in surface sediments of an ultramafic hydrothermal vent field. *Environ Microbiol* 13: 2633–2648. doi: 10.1111/j.1462-2920.2011.02530.x PMID: 21895907
46. Jean MNR, Gonzalez-Rizzo S, Gauffre-Autelin P, Lengger SK, Schouten S, Gros O (2015) Description of two new *Beggiatoa* species in inhabiting marine mangrove sediments from Caribbean. PLoS ONE doi: 10.1371/journal.pone.0117832
47. Fisher C (1990) Chemoautotrophic and methanotrophic symbioses in marine-invertebrates. *Rev Aquat Sci* 2: 399–436. PMID: 11652060
48. Tarasov V, Gebruk A, Mironov A, Moskalov L (2005) Deep-sea and shallow-water hydrothermal vent communities: two different phenomena? *Chem Geol* 224: 5–39.
49. Berg CJ, Alatalo P (1984) Potential of chemosynthesis in molluscan mariculture. *Aquaculture* 39: 165–179.
50. Laurent MCZ, Gros O, Brulpot J-P, Gaill F, Bris NL (2009) Sunken wood habitat for thiotrophic symbiosis in mangrove swamps. *Mar Environ Res* 67: 83–88. doi: 10.1016/j.marenvres.2008.11.006 PMID: 19131100
51. Laurent MCZ, Le Bris N, Gaill F, Gros O (2013) Dynamics of wood fall colonization in relation to sulfide concentration in a mangrove swamp. *Mar Environ Res* 87: 85–95. doi: 10.1016/j.marenvres.2013.03.007 PMID: 23623161
52. Frenkiel L, Gros O, Mouéza M (1996) Gill structure in *Lucina pectinata* (Bivalvia: Lucinidae) with reference to hemoglobin in bivalves with symbiotic sulphur-oxidizing bacteria. *Mar Biol* 125: 511–524.
53. Bauer-Nebelsick M, Bardele CF, Ott JA (1996) Redescription of *Zoothamnium niveum* (Hemprich & Ehrenberg, 1831) Ehrenberg, 1838 (Oligohymenophora, Peritrichida), a ciliate with ectosymbiotic, chemoautotrophic bacteria. *Eur J Protistol* 32: 18–30.
54. Himmel D, Maurin LC, Gros O, Mansot JL (2009) Raman microspectrometry sulfur detection and characterization in the marine ectosymbiotic nematode *Eubostrichus diana* (Desmodoridae, Stilbonematidae). *Biol Cell* 101: 43–54. doi: 10.1042/BC20080051 PMID: 18598237
55. Maurin LC, Himmel D, Mansot J-L, Gros O (2010) Raman microspectrometry as a powerful tool for a quick screening of thiotrophy: An application on mangrove swamp meiofauna of Guadeloupe (FWI). *Mar Environ Res* 69: 382–389. doi: 10.1016/j.marenvres.2010.02.001 PMID: 20202680
56. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR (1985) Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci*, 82: 6955–6959. PMID: 2413450
57. Giribet G, Carranza S, Baguña J, Riutort M, Ribera C (1996) First molecular evidence for the existence of a Tardigrada + Arthropoda clade. *Mol Biol Evol* 13(1):76–84 PMID: 8583909
58. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local Alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410. PMID: 2231712
59. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 28: 2731–2739. doi: 10.1093/molbev/msr121 PMID: 21546353
60. Novo M, Gayoso CM, Pomar F, Lucas MM, Ros Barcelo A, Merino F (2007) Sulphur accumulation after *Verticillium dahliae* infection of two pepper cultivars differing in degree of resistance. *Plant Pathol* 56: 998–1004.
61. Muller F, Brissac T, Le Bris N, Felbeck H, Gros O (2010) First description of giant Archaea (Thaumarchaeota) associated with putative bacterial ectosymbionts in a sulfidic marine habitat. *Environ Microbiol* 12: 2371–2383. doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02309.x PMID: 21966926
62. Rinke C, Schmitz-Esser S, Stoecker K, Nussbaumer AD, Molnár DA, Vanura K, et al. (2006) "Candidatus *Thiobios zoothamnicolii*," an ectosymbiotic bacterium covering the giant marine ciliate *Zoothamnium niveum*. *Appl Environ Microb* 72: 2014–2021.

63. Fraune S, Bosch TC (2007) Long-term maintenance of species-specific bacterial microbiota in the basal metazoan Hydra. *P Natl Acad Sci USA* 104: 13146–13151. PMID: [17664430](#)
64. Schuett C, Doepke H (2012) Endobiotic bacteria and their pathogenic potential in cnidarian tentacles. *Helgoland Marine Research* 64: 205–212.
65. Di Camillo CG, Luna GM, Bo M, Giordano G, Corinaldesi C, Bavestrello G (2012) Biodiversity of prokaryotic communities associated with the ectoderm of *Ectopleura crocea* (Cnidaria, Hydrozoa). *PLoS ONE* 7(6): e39926. doi: [10.1371/journal.pone.0039926](#) PMID: [22768172](#)
66. Forest R, Victor S, Farooq A, Nancy K (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 243: 1–10.
67. Reshef L, Koren O, Loya Y, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E (2006) The coral probiotic hypothesis. *Environ Microbiol* 8: 2068–2073. PMID: [17107548](#)
68. Koren O, Rosenberg E (2006) Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Appl Environ Microb* 72: 5254. PMID: [16885273](#)
69. Ducklow HW, Mitchell R (1979) Bacterial populations and adaptations in the mucus layers on living corals. *Limnol Oceanogr* 24: 715–725.
70. Carlos C, Torres TT, Ottoboni LM (2013) Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. *Scientific Reports* 3.
71. Costello J (1988) Laboratory culture and feeding of the hydromedusa *Cladonema californicum* Hyman (Anthomedusa: Cladonemidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 123: 177–188.
72. Costello J (1991) Complete carbon and nitrogen budgets for the hydromedusa *Cladonema californicum* (Anthomedusa: Cladonemidae). *Mar Biol* 108: 119–128.
73. Costello J (1998) Physiological response of the hydromedusa *Cladonema californicum* Hyman (Anthomedusa: Cladonemidae) to starvation and renewed feeding. *J Exp Mar Biol Ecol* 225: 13–28.
74. Rees JT (1982) The hydrozoan *Cladonema* in California: a possible introduction from East Asia. *Pac Sci* 36: 439–444.
75. Rees JT (1979) The poly and immature medusa stages of *Cladonema californicum*, Hyman, 1947 (Anthomedusae: Cladonemidae) with biological notes and a discussion of the taxonomy of the genus *Cladonema*. *J Nat Hist* 13: 295–302.
76. Grzymalski JJ, Murray AE, Campbell BJ, Kaplarevic M, Gao GR, Lee C, et al. (2008) Metagenome analysis of an extreme microbial symbiosis reveals eurythermal adaptation and metabolic flexibility. *P Natl Acad Sci USA* 105: 17516–17521. doi: [10.1073/pnas.0802782105](#) PMID: [18987310](#)
77. Bates AE, Hamer TL, Roeselers G, Cavanaugh CM (2011) Phylogenetic characterization of epibiotic bacteria hosted by a hydrothermal vent limpet (lepetodrilidae, vetigastropoda). *Biol Bull* 220: 118–127. PMID: [21551448](#)
78. Moya A, Peretó J, Gil R, Latorre A (2008) Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Genet* 9: 218–229. doi: [10.1038/nrg2319](#) PMID: [18268509](#)
79. Chaston J, Goodrich-Blair H (2010) Common trends in mutualism revealed by model associations between invertebrates and bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34: 41–58. doi: [10.1111/j.1574-6976.2009.00193.x](#) PMID: [19909347](#)
80. Kimbell JR, McFall-Ngai MJ (2003) The squid-vibrio symbioses: from demes to genes. *Integr Comp Biol* 43: 254–260. doi: [10.1093/icb/43.2.254](#) PMID: [21680430](#)
81. McFall-Ngai MJ (2002) Unseen forces: the influence of bacteria on animal development. *Dev Biol* 242: 1–14. PMID: [11795936](#)
82. Ruehlend C, Dubilier N (2010) Gamma- and epsilonproteobacterial ectosymbionts of a shallow-water marine worm are related to deep-sea hydrothermal vent ectosymbionts. *Environ Microbiol* 12: 2312–2326. doi: [10.1111/j.1462-2920.2010.02256.x](#) PMID: [21966922](#)
83. Dattagupta S, Schaperdorth I, Montanari A, Mariani S, Kita N, Valley JW et al. (2009) A novel symbiosis between chemoautotrophic bacteria and a freshwater cave amphipod. *ISME J* 3: 935–943. doi: [10.1038/ismej.2009.34](#) PMID: [19360027](#)
84. Ponsard J, Cambon-Bonavita M-A, Zbinden M, Lepoint G, Joassin A, Corbari L, et al. (2013) Inorganic carbon fixation by chemosynthetic ectosymbionts and nutritional transfers to the hydrothermal vent host-shrimp *Rimicaris exoculata*. *ISME J* 7: 96–109. doi: [10.1038/ismej.2012.87](#) PMID: [22914596](#)