Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais

Céline Lavergne

▶ **To cite this version:**

Céline Lavergne. Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais : Influence des facteurs biotiques et abiotiques par une approche multiéchelle. Biodiversité et Ecologie. Université de La Rochelle, 2014. Français. NNT : . tel-01175468

HAL Id: tel-01175468
https://hal.science/tel-01175468

Submitted on 15 Jul 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2014

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE (ED 523)
Sciences pour l'environnement, Gay-Lussac

UMR 7266 Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) – équipe DYFEA

Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais :

Influence des facteurs biotiques et abiotiques par une approche multi-échelle

---

THÈSE
présentée par
Céline LAVERGNE
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Spécialité : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Jury :

P. Bonin	Professeur, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
R. Duran	Professeur, Université de Pau et des pays de l'Adour	Rapporteur
C. Hubas	Maître de conférences, CNRS, BOREA, UMR 7208	Examinateur
R. De Wit	Directeur de recherche, CNRS, ECOSYM, UMR 5119	Examinateur
C. Smith	Maître de conférences, National University of Ireland, Galway	Examinatrice
C. Dupuy	Professeur, Université de La Rochelle	Directrice de thèse
H. Agogué	Chargée de recherche, CNRS, LIENSs, UMR 7266	Encadrante scientifique

Année 2014

UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE

ÉCOLE DOCTORALE (ED 523)
Sciences pour l'environnement, Gay-Lussac

UMR 7266 Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs) – équipe DYFEA

Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais :

Influence des facteurs biotiques et abiotiques par une approche multi-échelle

---

THÈSE
présentée par
Céline LAVERGNE
pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de La Rochelle
Spécialité : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

Jury :

P. Bonin	Professeur, Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
R. Duran	Professeur, Université de Pau et des pays de l'Adour	Rapporteur
C. Hubas	Maître de conférences, CNRS, BOREA, UMR 7208	Examinateur
R. De Wit	Directeur de recherche, CNRS, ECOSYM, UMR 5119	Examinateur
C. Smith	Maître de conférences, National University of Ireland, Galway	Examinatrice
C. Dupuy	Professeur, Université de La Rochelle	Directrice de thèse
H. Agogué	Chargée de recherche, CNRS, LIENSs, UMR 7266	Encadrante scientifique

Remerciements

J'adresse en premier lieu, mes remerciements à Patricia Bonin, Robert Duran, Rutger De Witt, Cédric Hubas et Cindy Smith d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail de thèse. Thank you.

Merci à Pierre Richard, Paco Bustamante et Olivier De Viron, de m'avoir accueilli au sein de l'UMR LIENSs (UMR 7266). Merci particulièrement à Paco, également directeur de l'école doctorale Gay Lussac, pour son investissement envers les doctorants, et sa confiance.

Parce ma thèse s'est faite en trio. Hélène et Christine, merci de m'avoir portée et supportée pendant ces 3 années. Têtue et maladroite, vous m'avez accepté telle que je suis et avez réussi à me canaliser, à me former et à me faire évoluer. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenue. Hélène, merci de m'avoir fait entrer dans le monde étrange et mystérieux de la biologie moléculaire, merci de ta confiance que tu as su exprimer aux moments adéquats pour me motiver et me faire aller de l'avant ! Merci pour toutes tes attentions et ton soutien. Christine, je tiens à te remercier d'avoir pris le temps de me connaître, tu as su trouver les mots et être disponible où que tu sois, même à l'autre bout du monde. Je pense qu'il me sera impossible d'oublier nos moments passés le nez dans ce mésocosme ! Alors pour tout cela, MERCI.

Je tiens à remercier chaleureusement, Valérie qui fut la première à me donner une chance dans le « Milieu de la Recherche ». Jamais je n'oublierai mes premiers pas dans les marais et toutes nos péripéties ! Et je te suis énormément reconnaissante de m'avoir lancé dans l'aventure. Merci infiniment à Seb qui a su me montrer que si on y croit, tout est possible. Tu m'avais dit : « Ne fais jamais de thèse !» mais tu as su me soutenir et me sauver le moral avec la découverte Statico de dernière minute !!!

J'aimerai destiner un merci tout particulier à mes frères Bogdanoff (nom français : Nicolas et Philippe), mes frères de vases qui ont été là du début à la fin : quels que soient le jour ou la météo, ils étaient là et ont supporté mes crises sur la vasière, mais ont bien su se venger aussi ! Hommes à tout faire, sur la vasière comme au labo, ils ont une part importante dans cette thèse, et dans la disparition progressive de mon stock de Saint-Nectaire ! Alors merci à vous…

Egalement, je ne peux que remercier vivement notre Martine. Merci pour ta patience à toute épreuve, ton énergie, et ton soutien pendant ces cinq ans ! Merci également à Françoise pour ces découvertes planctoniques et tes récits de campagnes ! Merci aussi à Hélène M. pour sa gentillesse et sa disponibilité. Merci à Benoît pour les discussions stats si significativement stimulantes. Un grand Merci à Eric qui a passé des heures à discuter phylogénie. Merci pour tes conseils autant pour les analyses que pour les papiers, l'anglais et j'en passe ! Merci également à Marie C , qui n'a de cesse de protéger les doctorants et de militer pour nous ! Un grand Merci à Armelle, pour la confiance que tu m'as accordée et pour m'avoir lancée dans la communication et la vulgarisation scientifique !!

Je tiens à adresser un grand Merci à Frédérique Deloffre-Vye pour ses conseils lors du NCT (Valorisation des compétences) qui vont au-delà d'un enseignement.

Je souhaite remercier sincèrement les membres de mon comité de thèse qui ont été d'excellents conseils, qui m'ont guidée dans le droit chemin et qui ont été très présents lorsque j'en ai eu besoin. Merci Clarisse de m'avoir accueillie et formée, Merci Jean-Christophe pour ta disponibilité et tes conseils avisés. Un grand Merci à Aude qui m'a beaucoup aidée tout au long de cette thèse, en comité, sur le terrain et pendant les mésocosmes, tu as toujours été là.

Sur le terrain, j'ai reçu beaucoup d'aide et nous étions nombreux sur la vasière entre le 18 et le 22 Avril 2012. Alors merci à tous ceux qui sont venus patauger avec moi et notamment Aude, Mélanie, Laïs, Katell, Sabrina, Vanessa, Jérôme, Laureen, Pierrick, Vona, Johann, Jean-luc, et Edouard. Ce fut une expérience riche. Merci aussi à Sophie, Isabelle, et Ibtissem pour leur aide lors des extractions des EPS. Je tiens à remercier Vona pour son accueil ces quelques jours à Nantes toujours dans la bonne humeur ! ! Et également Johann pour son aide régulière et son implication dans la mesure de la production primaire même tard le soir pendant les manips mésocosme ! Merci à Mélanie qui fut présente sur le terrain, et qui a permis d'améliorer grandement mon papier grâce à son expertise en biogéochimie, et en anglais !

Un clin d'œil tout particulier à Jérôme à qui j'ai donné du boulot au labo et à la maison et à Louise, ma petite mascotte qui a marché bien vite !

Les expérimentations n'auraient d'ailleurs pu être possibles sans Dany et son aéroglisseur ! Je tiens donc à remercier Dany et Hélène Prévostat pour leur service mais aussi leur gentillesse et leur bonne humeur sur chaque campagne terrain. Merci également à Vincent et Nathalie de nous avoir mis à disposition la grange Plaisance de la Ligue pour la Protection des Oiseaux (LPO), un laboratoire itinérant de luxe juste à côté de la plage.

J'ai également fait quelques apparitions au laboratoire LMGE de Clermont-Ferrand. A chaque passage, ce fut un vrai plaisir. Merci à Clarisse, Merci à l'équipe de Panam. Notamment, je tiens à remercier Najwa, Didier et surtout Jean-Christophe pour avoir été si réactifs ! Et oui nous avons réussi à faire planter Panam ! Un merci particulier à Mylène qui m'a plus qu'aidée tout au long de cette thèse. Merci d'avoir été là. Merci aussi à Magalie rencontrée par hasard au détour d'un bureau et dont la thèse m'a aidée (si si promis Magalie)! Merci à Stéph la chauve-souris pour sa bonne humeur et ses petits posts sur Facebook !

Lors de cette thèse, j'ai aussi reçu l'aide de Claire, Clément et Trystan. J'ai adoré travailler avec eux et j'espère avoir su les former et leur avoir transmis ma passion. Merci Claire pour ces moments de fous rires à tamiser la vase si froide et à faire des gâteaux de vase ! Merci Trystan pour m'avoir supportée dans mes moments de doute avec la FISH ! Merci beaucoup à Clément qui a beaucoup contribué à mes résultats et qui a eu le malheur de me supporter à longueur de journée en troisième année !! Bon courage à tous les trois pour la suite.

I'm also grateful to Yanjing for having some fun in the lab during the annoying CARD-FISH experiments ! See you in Yantaï perhaps ?!

Un grand Merci à celui qui fut mon collègue de bureau, mon collègue de thèse vaseuse, mon dico microphytobenthos, mon fournisseur de chocolat jamais en rupture de stock, mon créateur de rhum, mon monsieur réconfort dans les moments d'énervement et de doute, Merci Alex. Et comme le bureau 114 était un trio, Merci à toi Flo pour m'avoir accompagnée avec le sourire pendant mes trois ans et n'avoir même pas râlé alors que je faisais les allers-retours dans le bureau sans cesse pendant ta rédaction … Non je ne remercierais pas le poisson le plus solide du monde qui m'a bien occupée mais je vous signale que c'est le seul qui reste dans le bureau, il est si vide la bureau 114 ! Merci beaucoup à Alice pour avoir été toujours auprès de moi et avoir trouvé les mots pour me réconforter (une pensée positive par jour, n'oublies pas !). Un Grand Merci aussi à Aurélie pour ce peps et ce dynamisme, merci pour tous nos papotages utiles ou non qui m'ont toujours relancée !!! Merci beaucoup Méra d'avoir été si présente cette dernière année, année qui fut dure pour toi et malgré tout tu étais là, toujours prête à aller grimper pour se défouler !! Merci à toutes les trois pour avoir été mes confidentes et mes cuisinières en toute fin fin, merci pour m'avoir autant chouchoutée … Merci à tous les coupains :Joana, Benoît M, Benoît le démonteur de porte, Anne, Thomas, Arnaud, John, Alexia, Mathilde, Charlotte etc … Merci à toute l'équipe ADocs, Clément, Elodie, Christophe, Guillaume, et Romain, maintenant, nous allons pouvoir retourner au Scat pour un petit plateau de charcuterie ! et merci à tous les doctorants avec qui j'ai passé du temps, merci d'apporter autant de bonne humeur au quotidien !

Merci les amis !
Un merci immense aux amoureux,vous qui ne m'avez jamais lâchée, vous qui m'avez recueillie… Tiff & Pié, Merci ! Merci pour tous ces moments intenses et inoubliables. Merci à Mon Petit, grand rêveur, navigateur, merci Mathieu. Un énorme Merci au gang des poulettes pour toutes ces aventures depuis le master. Laura et Lulu, tous ces fous rires, ces incompréhensions, ces délires resteront gravés.

Parce que l'amitié est intemporelle, que même après des mois, voire des années c'est toujours pareil … mes pensées vont vers vous Sandra et Laura qui avez toujours été là.

La vie prend parfois des tournures auxquelles on ne s'attend pas. J'ai ainsi pu changer de vie, depuis plus de deux ans. Il fut ma plus grande surprise, merci de m'avoir propulsée jusque-là, merci Simon pour toutes ces découvertes, merci pour ce soutien si précieux. Tu as bercé ma vie, au rythme de nos découvertes et de tes photos. Merci de partager ma vie, merci d'avoir été là tout simplement.

J'adresse un dernier merci à tous les membres de ma famille qui ont su comprendre mon mutisme et mon absence pendant ces trois années. J'ai une pensée toute particulière à Elle, Elle qui fut mon modèle, Elle qui aurait été si fière de moi aujourd'hui.

Enfin, Papa, Maman, Loïc… Vous qui n'avez cessé de croire en moi, vous sans qui je n'en serai pas là… ça y est j'arrive au bout, j'y suis et c'est grâce à vous! Merci de m'avoir soutenue, merci de m'avoir tant protégé, merci de m'aimer.

Chaque thèse est un challenge et chaque challenge mérite son récit alors c'est ainsi que s'est construite cette thèse, une addition de défis à relever et un travail scientifique à la clé avec ses qualités et ses défauts.

Le défi principal a peut-être été de dompter ma maladresse et de passer outre mes mésaventures. Enfin rappelons-le, c'est une thèse sur de la vase ! La vase, sédiment fin ne laissant que très peu diffuser la lumière et autres éléments chimiques mais lieu de vie crucial pour de nombreuses espèces. La Vasière, écosystème clé dans les Pertuis Charentais. Oui, mais la vase, matériau irritant pour les mains, collant (voir qui ne lâche jamais), avec une odeur particulière (que l'on finit par oublier), impossible à extraire, fluorescent aux longueurs d'ondes non souhaitées …. Un vrai bonheur !

Céline

« *C’est dans l’insignifiant que se trouve ce qu’il y a de plus important* »

Gandhi

Avant-propos

Pour ce travail de thèse, ma rémunération a été financée par une allocation du Conseil Général de Charente-Maritime.

Cette thèse a bénéficié du soutien financier du programme EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière), CAPABIOC (Caractérisation fonctionnelle et rôle des Procaryotes Associés au Biofilm microphytobenthique des vasières intertidales dans les Cycles de l'azote et du carbone). Egalement, cette thèse a été soutenue financièrement par le Contrat de Projets Etat-Région (CPER 2007-2013), l'Université de la Rochelle et le CNRS.

Les analyses menées pendant cette thèse n'auraient pu être réalisées sans l'aide de nombreuses personnes :

- Martine Bréret : dosage de la chlorophylle *a*
- Christine Dupuy : comptage et identification de la méiofaune benthique et aide pour la production bactérienne
- Hélène Agogué : aide pour la biologie moléculaire
- Jérôme Jourde : comptage et identification de la macrofaune benthique
- Sophie Sablé, Isabelle Lanneluc, et Ibtissem Doghri, aide extraction des EPS
- Philippe Pineau : dosage des nutriments
- Laureen Beaugeard : aide au comptage des procaryotes (cytométrie en flux et microscopie à épiflurorescence)
- Jérémy Devesa (LEMAR, Brest) : dosage carbone et azote organique particulaire
- Claire Dussud : aide manip mésocosme et EPS
- Trystan Lefebvre : aide FISH et CARD-FISH
- Clément Chaigneau : aide dosage EPS et activité enzymatiques

J'ai réalisé les autres analyses : extraction et dosage des EPS glucidiques et protéiques, dosage des protéines totales du sédiment, mesure de la production bactérienne, mesure des activités enzymatiques bactériennes, comptage des procaryotes (cytométrie en flux et microscopie à épiflurorescence), quantification des gènes fonctionnels par qPCR, préparation de la libraire d'amplicons pour le pyroséquençage 454, CARD-FISH, FISH.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
AMA	activité aminopeptidase
AMO	ammonia mono-oxygénase
anammox	anaerobic ammonia oxidation
AOA	*ammonia oxidizing archaea*
AOB	*ammonia oxidizing bacteria*
ARN	acide ribonucléique
BGA	β-glucosidase activity
bsf	below sediment surface
CARD-FISH	catalysed
Chl*a*	chlorophylle *a*
CMF	cytométrie en flux
COP	carbone organique particulaire
DAPI	4', 6-diamidino-2-phenylindole
EPS	exopolymeric substances
FISH	fluorescent *in situ* hybridization
h	heures
ISME Journal	Journal of International Society for Microbial Ecology
MGI	Marine Group I (*Thaumarchaeota*)
min	minutes
NCBI	national center for biotechnology information
NIR	nitrite réductase
NOB	*nitrites oxidizing bacteria*
NOP	azote organique particulaire
NOS	nitrous oxide réductase
NXR	nitrite oxydo-réductase
PB	production bactérienne
pb	paire de bases
PCR	polymerase chain reaction
PFA	para-formaldhéhyde
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	reverse-transcriptase polymerase chain reaction
s	secondes
SIP	Stable isotopes probing

INTRODUCTION GENERALE **1**

1.1 Les vasières intertidales en milieu tempéré, un site atelier 3
1.2 Les procaryotes benthiques : diversité et fonction 10
1.3 De l'importance d'étudier le cycle de l'azote 19
1.4 Contexte général et objectifs scientifiques 34
1.5 Déroulement du manuscrit 38

PARTIE 1. DEVELOPPEMENT D'OUTILS INDISPENSABLES A L'ANALYSE DES PROCARYOTES DANS LES SEDIMENTS **39**

Chapitre 1. Stratégie d'échantillonnage et méthodes de conditionnement **45**
1.1 Stratégie d'échantillonnage 46
1.2 L'étape de conditionnement 53
1.3 La mesure des sels nutritifs dans l'eau interstitielle : la méthode des Rhizons 54

Chapitre 2. Développements et applications de techniques d'analyse à des sédiments vaseux **57**
2.1 Création de standards pour la quantification de gènes fonctionnels, exemple du gène *nirS* 58
2.2 Procédure de préparation des banques de fragment de gènes de l'ARNr et de l'ADNr 16S bactérien et archéen pour le pyroséquençage haut-débit 65
2.3 Tests d'application d'une technique de marquage par hybridation moléculaire : FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) et CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH) 70

Chapitre 3. Une méthode rapide et efficace pour le comptage des procaryotes hétérotrophes dans les sédiments côtiers par cytométrie en flux **77**
3.1 Contexte de l'étude 78
3.2 *An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry* 79
3.3 Conclusions 103

PARTIE 2. FONCTIONNEMENT DES COMMUNAUTES DE PROCARYOTES DANS UNE VASIERE INTERTIDALE : UN JEU D'ECHELLES TEMPORELLES ET SPATIALES 105

Chapitre 1. Fonctionnement écologique de la vasière intertidale : entre profondeurs et conditions météorologiques 109

1.1 Contexte de l'étude 110

1.2 *Sediment depth-related variations in prokaryotic communities' activity under different weather conditions in an intertidal mudflat* 112

1.3 Conclusion 148

Chapitre 2. Diversité des communautés de procaryotes et rôle fonctionnel dans le cycle de l'azote dans une vasière intertidale 151

2.1 Contexte de l'étude 152

2.2 *Bacterial and archaeal structure coupled to nitrogen-related functional traits highlighted the influence of fine sediment depth stratification in mudflat* 155

2.3 Conclusion 188

Chapitre 3. Impact du temps d'émersion sur le fonctionnement des vasières intertidales 193

3.1 Contexte de l'étude 194

3.2 Résultats 197

3.3 Discussion 218

3.4 Conclusion 223

Conclusion Partie 2 225

4.1 Un choix d'échantillonnage pertinent 226

4.2 « *Le jeu des échelles* », d'une échelle biannuelle à une échelle tidale 227

4.3 Une forte diversité de procaryotes 228

4.1 La vasière intertidale est un écosystème stratifié 229

4.2 Perspectives 230

PARTIE 3. SIMPLIFIER POUR MIEUX COMPRENDRE **233**

Chapitre 1. Développement d'un dispositif expérimental en conditions semi-contrôlées : la validation **237**

1.1 Contexte de l'étude 238

1.2 Mise en place 240

1.3 Stratégie d'échantillonnage 246

1.4 Résultats 249

1.5 Discussion 259

Chapitre 2. Effet du temps d'émersion au cours d'une marée basse de jour et de nuit sur les communautés procaryotes benthiques **265**

2.1 Contexte de l'étude 266

2.2 Résultats 270

2.3 Discussion 293

Chapitre 3. Diversité des procaryotes actifs liés au cycle de l'azote en conditions semi-contrôlées : impact d'un cycle jour/nuit **301**

3.1 Contexte de l'étude 302

3.2 *Active prokaryotic community structure in coastal muddy sediments during day and night low tide* 305

3.3 Conclusion 334

Conclusion Partie 3 **337**

DISCUSSION GENERALE **341**

1.1 Le développement d'outils pour l'analyse des environnements benthiques 343

1.2 Fonctions des procaryotes benthiques dans les vasières intertidales 345

1.3 Structure phylogénétique des communautés de procaryotes benthiques 350

1.4 Conclusions et perspectives 353

BIBLIOGRAPHIE **355**

ANNEXES **381**

Liste des tables

Table 1. Récapitulatif des différences majeures et des particularités connues des archées par rapport aux bactéries et aux eucaryotes, adapté de Cavicchioli (2010) et Bertrand *et al.* (2011)..... 11
Table 2. Classification physiologique des formes de vies basées sur les sources d'énergie et de carbone, issu de Madsen (2008) 17
Table 3. Enzymes majeurs impliqués dans le cycle de l'azote et détails des réactions qu'elles catalysent, issu de Jetten *et al.* (2009). 25
Table 4. Bilan des paramètres considérés dans ce travail (●), méthodes d'échantillonnage, de conservation, et d'analyse durant le suivi saisonnier (Partie 2) et le suivi en mésocosme (Partie 3).Les protocoles sont détaillés en annexe comme indiqué. Abbréviations : *in situ* : D = début, M = milieu, F = fin de marée basse, et *ex situ* : L1 = début, L2 = milieu , L3 = fin de marée basse de jour (LGT) et de nuit (NGT) 50
Table 5. Procédure de conditionnement des échantillons suite aux prélèvements. 53
Table 6. Liste des amorces testées avant le choix définitif en vue de préparer une librairie d'amplicons pour évaluer la diversité bactérienne et archéenne dans les sédiments. 66
Table 7. Dénomination, modification et séquences des sondes utilisées pour l'hybridation moléculaire des Bactéries et des Archées par FISH *(Fluorescent In Situ Hybridization)* et CARD-FISH *(CAtalyzed Reporter Deposition -FISH)*. 71
Table 8. Extraction, fixation and staining methods in literature 99
Table 9. Heterotrophic prokaryotic abundance (mean ± SE) in different sediments tested and cell recovery (% with mean ± SE, min and max) of the first extraction using the two-step extraction protocol analysed by flow cytometry (FCM). 101
Table 10. Récapitulatif des différents paramètres mesurés dans ce travail et précision des paramètres considérés pour les analyses dans ce chapitre (●)..... 111
Table 11. Environmental parameters (± SE). Grain size in µm, Temperature in °C, C:N is a ratio of PON and POC in µg g^{-1} sed DW,and Chl *a* (chlorophyll *a* content) in µg g^{-1} sed DW. D1 (0-0.5 cm); D2 (0.5-1 cm); D3 (1-2 cm); D4 (2-5 cm); D5 (5-10 cm). Note that no triplicates were available for grain size in February. 2-ways ANOVA revealed always significant differences between the two sampling dates for all parameters (p<0.05), letters in bold font indicated post hoc test of Tukey for each sampling date. 121
Table 12. Depth and sampling date impact on prokaryotic abundance, benthic bacterial production and enzymatic activities (2-way ANOVA parameters. n =3) 125
Table 13. Identification of prokaryotic community drivers by variation partitioning analysis based on ordination analyses. Matrix E contained environmental variables and resources for prokaryotic community, matrix C contained sampling dates and two principal depths (0-2 cm below sediment surface, and 2-10 cm bsf) and M matrix contained the abundance of meiofauna. Multivariate analysis, covariables, component of variation, eigenvalues and statistical p-values were reported. 133
Table 14. Complete dataset in g^{-1} sed DW, cm^{-3} and m^{-2} 144
Table 15. Récapitulatif des différents paramètres mesurés dans ce travail et précision des paramètres considérés pour les analyses dans ce chapitre (●)..... 153
Table 16. Spearman correlation coefficients of nitrogen-related functional genes and biotic and abiotic parameters (n= 30: two sampling dates, five depths in triplicates). Significant correlations were shown: p<0.05 in normal font, p<0.01 in bold font. 175
Table 17. Primers used for the quantification of Bacteria, Archaea and N-related genes in intertidal muddy sediments, conditions of qPCR assays. For each reaction, the standard curve was calculated using the MxPro software. The efficiency of the amplification was calculated using the equation $E = (10^{1/slope} -1)*100$. 182

Table 18. Diversity indicators for the bacterial and archaeal 16S rRNA gene in Marennes-Oleron coastal cohesive sediments in July 5th, 2012 (JUL) and February 11th, 2013 (FEB) across 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm. 184
Table 19. Bray-Curtis similarity matrix for Bacteria and Archaea at the phylum level. For Bacteria, only the first 1000 most abundant OTUs were considered 185
Table 20. Récapitulatif des différents paramètres mesurés dans ce travail et précision des paramètres considérés pour les analyses dans ce chapitre (●)..... 196
Table 21. Moyenne et erreurs standards pour chaque paramètre suivant les trois conditions contrastées (juillet, février et avril)..... 199
Table 22. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées *a posteriori* sur les composantes principales révélées par l'ACP (**Figure 67**). Les résultats des tests *post hoc* de Tukey à comparaisons multiples sont indiqués sous forme de groupes. 201
Table 23. Résumé des paramètres étant le plus en adéquation avec la représentation suivante (**Figure 68**) déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan » (Oksanen *et al.,* 2013) et significativité. 203
Table 24. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées à posteriori sur les composantes principales révélées par l'ACP (FIG). Les résultats des tests *post hoc* de Tukey à comparaisons multiples sont indiqués sous forme de groupes. 211
Table 25. Résumé des paramètres étant les plus en adéquation avec la représentation des figures suivantes (**Figure 73** et **Figure 74**) déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan » (Oksanen *et al.,* 2013) et significativité. 214
Table 26. Quantité de sédiment prélevé sur le terrain, le 11 Avril 2013, en vue de la mise en place des mésocosmes 242
Table 27. Procédure de conditionnement des échantillons suite aux prélèvements. 247
Table 28. Tableau récapitulatif des paramètres considérés dans le cas des mésocosmes, ● = paramètres utilisés dans ce chapitre..... 248
Table 29. Présentation des paramètres descriptifs des deux mésocosmes (LGT, jour et NGT, nuit) et durant le suivi *in situ*. 254
Table 30. Importance de la prédation par la méiofaune sur la production carbonée totale (primaire et secondaire bactérienne) dans les sédiments vaseux des mésocosmes 257
Table 31. Paramètres et significativité des ANOVA un facteur révélant l'effet de la réplicabilité, pour chaque ANOVA, $n = 5$. 258
Table 32. Tableau récapitulatif des paramètres considérés dans le cas des mésocosmes, ● = paramètres utilisés dans ce chapitre..... 269
Table 33. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées sur les valeurs brutes des différents paramètres mesurés. 273
Table 34. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées *a posteriori* sur les composantes principales révélées par l'ACP (**Figure 95**). Les résultats des tests *post hoc* de Tukey à comparaisons multiples sont indiqués sous forme de groupes. 284
Table 35. Paramètres et significativité de la sélection ascendante des variables influentes. En gras, les variables qui ont été retenues pour les analyses suivantes. $R^2ca = R^2$ cumulé et ajusté..... 290
Table 36. Paramètres de la partition de variance (**Figure 98**) permettant de décrire les communautés de procaryotes benthiques. Composants de la variation et somme des valeurs propres et significativité des ARD totales (ARD) et partielles (ARDp)..... 291
Table 37. Tableau récapitulatif des paramètres considérés dans le cas des mésocosmes, ● = paramètres utilisés dans ce chapitre..... 304
Table 38. Primers used for the quantification of Bacteria, Archaea and nitrogen-related genes 329

Table 39. Diversity indicators for the bacterial and archaeal 16S rRNA gene in sediments samples at day emersion (LGT) and night emersion (NGT) across 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm. 330
Table 40. Number of OTUs represented by the selected OTUs inserted in the tree (**Figure 106**) and relative abundance in each samples. 333

Liste des figures

Figure 1. A) Carte indiquant la situation de point d'échantillonnage au sein des Pertuis Charentais ; B) Photo illustrant le système de seillons-banquettes (photo : A. Barnett)..... 5
Figure 2. Diminution de l'irradiance dans des sédiments vaseux ou sableux selon un gradient de profondeur (Cartaxana *et al.,* 2011)..... 6
Figure 3. Hypothèse de rotation des diatomées épipéliques à la surface d'un sédiment vaseux, adapté de Consalvey *et al.* (2004). 7
Figure 4. Arbre du vivant en trois domaines, selon Woese *et al.* (1990) 12
Figure 5. Différents groupes bactériens retrouvés dans les sédiments côtiers et profonds, issu de Zinger *et al.* (2011) 15
Figure 6. Contrôle des communautés de procaryotes, incluant les contrôles latéraux entre les procaryotes qui peuvent être alternativement positifs (ex : syntrophie) ou négatifs (ex : prédation), selon Fuhrman and Hagström (2008)..... 16
Figure 7. Le catabolisme chez les procaryotes, selon Bertrand *et al.* (2011)..... 19
Figure 8. Représentation schématique de la production et de l'action des enzymes dans les cycles biogéochimiques. Un gène est transcrit en réponse à un signal en ARN messager (ARNm) qui est traduit dans le ribosome (R), synthétisant ainsi l'enzyme. Une enzyme transforme un substrat en un nouveau produit formé. 20
Figure 9. Etats métabolique des procaryotes (ex des bactéries) et leurs apports dans le fonctionnement de l'écosystème. Une cellule active est métaboliquement active mais n'est pas forcément en division, une cellule en dormance n'est ni en division ni métaboliquement active, selon Blazewicz *et al.* (2013). 22
Figure 10. Schéma général du cycle de l'azote dans les sédiments marins, les gènes (connus) codant les enzymes impliqués dans la réaction sont indiqués en italique. D'après Arrigo (2005), Francis *et al.* (2007), Thamdrup and Dalsgaard (2008), et Jetten *et al.* (2009)..... 24
Figure 11. Evolution du nombre de documents scientifiques publiés ayant attrait au cycle de l'azote dans les milieux marins et pourcentage de documents traitant du cycle de l'azote dans les sédiments marins utilisant la biologie moléculaire ou les gènes fonctionnels (source : Scopus®, Elseiver B.V., Oxford, R.U., au 28 Septembre 2014)..... 26
Figure 12. Réaction de réduction dissimilatrice des nitrites en ammonium (RDNA), selon Giblin *et al.* (2013) 31
Figure 13. Réactions enzymatiques menant à l'oxydation anaérobie du nitrite et de l'ammonium en diazote (anammox). D'après Kartal *et al.* (2011), Ryabenko (2013) et Jetten *et al.* (2009). 32
Figure 14. Morphologie des cellules réalisant l'anammox, selon Jetten *et al.* (2009) et Ryabenko (2013). 32
Figure 15. Bilan des réactions liées au cycle de l'azote ciblées par la quantification de gènes fonctionnels dans ce travail. 33
Figure 16. Conceptualisation des objectifs et des démarches conduites pendant ce travail..... 37
Figure 17. Carte situant la vasière de Brouage et le point d'échantillonnage (●) au Sud de La Rochelle (Charente-Maritime)..... 47
Figure 18. Représentation des périodes de prélèvement concernant ce travail (D = début, M = milieu et F = fin)..... 47
Figure 19. Représentation schématique des couches de sédiments prélevées lors de ce travail de terrain (*bsf* pour « *below sediment surface* »)..... 49
Figure 20. Méthodes de prélèvement des couches de sédiments successives..... 49
Figure 21. Schéma du dispositif de Rhizons (10 cm de longueur) et système de seringue permettant le prélèvement de l'eau interstitielle. Selon Seeberg-Elverfeldt *et al.* (2005) .. 54

Figure 22. Photos illustrant la procédure de prélèvement de l'eau interstitielle par la méthode des rhizons (crédit: M. Raimonet) 55
Figure 23. Procédure de mise au point de standards en vue de quantifier un gène fonctionnel dans un échantillon environnemental par PCR quantitative..... 59
Figure 24. Profil thermique permettant la réaction d'amplification du gène *nirS* par PCR quantitative (selon Throbäck *et al.* (2004)) 62
Figure 25. Exemple d'une courbe de dissociation lors de la création de standard pour la quantification du gène *nirS.* Ici, 10 standards potentiels ont été amplifiés ainsi que des échantillons environnementaux. 63
Figure 26. Arbre phylogénétique des séquences du gène *nirS* des clones C10-A15 et C11-A36 construit grâce à la méthode d'UPGMA (bootstrap=100) basé sur l'alignement des séquences de nucléotides (environ 400 pb) alignées avec le logiciel Muscle (itérations =10)..... 64
Figure 27. Protocole final permettant la préparation d'une librairie d'amplicons en vue d'une pyroséquençage 454 haut débit..... 69
Figure 28. Sonde oligonucléotidique marquée avec un fluorochrome (rond rouge) associée à un brin d'ARN ribosomal. Chaque entité de couleur est une nucléotide selon Amann and Fuchs (2008). 70
Figure 29. Schéma du principe de marquage moléculaire par CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH), selon Amann and Fuchs (2008). 72
Figure 30. Photo d'une portion de filtre observée au microscope à épifluorescence marquant les cellules de procaryotes en bleu (marquage DAPI [excitation : 340-380, émission 425]), et les bactéries en vert (FITC [excitation : 460-500, émission 512-542]),) (Miscroscope DMI 600-B, Leica, Ojectif 100x, Caméra : ORCA –R2). 74
Figure 31. Schéma du principe de marquage moléculaire par CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH), selon Amann and Fuchs (2008). 75
Figure 32. Photo d'une portion de filtre observée au microscope à épifluorescence (Axioskop2 mot *plus*, Caméra AxioCam MRm Zeiss, Oberkochen, Allemagne) marquant, en haut en bleu, les procaryotes (DAPI [excitation : 340-380, émission 425]) et en bas en rouge, les bactéries (Cy3 [excitation 530-560, émission 572-647]). 76
Figure 33. Effects of the addition of Tween 80 to sodium pyrophosphate (NaPp) on prokaryotic cell abundance in sediment samples (FCM counts from SYBRGreen: n = 55; EFM counts from DAPI: n= 36). Values for all the samples tested are presented. Crosses represented samples extracted with Tween 80 and NaPp, and circles represented samples extracted with NaPp alone. 88
Figure 34. Cumulative percentage of cell recovery using the final extraction protocol (extended to eight extractions), counting by flow cytometry (FCM) and percentage coefficient of variation (% CV) (n=15). Black dots represent cell recovery efficiency with standard errors and grey bars represent % CV, E = extraction number. 89
Figure 35. Linear regression between prokaryotic cell abundance determined by flow cytometry (FCM) and observed by epifluorescence microscopy (EFM). Samples come from the Moëze mudflat at different depths and sampling seasons (n=55), dot line corresponding to the regression line and envelopes represent 95% confidence intervals. Significant adjusted R-squared: 0.615 (t-test: F-stat : 87.3, df =53, p-value <0.001). 90
Figure 36. Effects of storage temperature and time on heterotrophic prokaryotic cell abundance obtained by flow cytometry (FCM) with the two-step protocol (mean values +/- standard errors from five samples in duplicate are shown). 91
Figure 37. Final protocol of the improved two-step separation method. FCM = Flow Cytometry ; NaPp = sodium pyrophosphate..... 93

Figure 38. A) Percentage of cells extracted after the first step by applying our two-step extraction method followed by FCM heterotrophic prokaryotic enumeration on sandy and muddy sediment samples from diverse locations with a range of sand percentages. B) Sand percentages for each sample. C) Sand/Silt/Clay diagram for each sample. 94
Figure 39. Searching for the best protocol for enumeration of heterotrophic prokaryotes in sediments 100
Figure 40. Schéma représentant la stratégie d'échantillonnage choisie. 110
Figure 41. Temperature at the surface, light conditions and light dose for the two sampling date during low tide: a) July 5th 2012 and b) February 11th 2013. Black points represented the time when the different replicates of sediment were sampled. Grey areas represented the sampling period and black arrows the low tide stall..... 122
Figure 42. Vertical profiles of nutrient concentrations and DIN:PO_4^{3-} ratio recorded in July 5th 2012 and in February 11th 2013 from 0 to 10 cm below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm). Silicates $Si(OH)_4$; phosphates PO_4^{3-}; nitrites NO_2^-; nitrates NO_3^- and NH_4^+ ammonium. Points represented triplicates, lines means and grey zone represented DIN:PO_4^{3-} ratio<16 (atomic ratio, Redfield, 1958). 124
Figure 43. Ratio of total EPS carbohydrates/proteins along a depth gradient below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm); a) in July, 5th 2012 (n=3); b) in February, 11th 2013 (n=3); and c) among the two sampling dates (n=15). July values were in dark grey, February in light- grey and lowercase letters a and b indicated significant differences (Wilcoxon test; W=225. p<0.001). The dash line was a ratio value of 1. 126
Figure 44. Ratio of colloidal EPS versus bound EPS (proteins + carbohydrates) along a depth gradient below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm); a) in July, 5th 2012 (n=3); b) in February, 11th 2013 (n=3); and c) among the two sampling dates (n=15). July values were in dark grey, February in light-grey. The dash line was a ratio value of 1. 127
Figure 45. a) Abundance of heterotrophic prokaryotes (PA); b) benthic bacterial production (bBP); c) Aminopeptidase (AMA) and d) Beta-glucosidase (BGA) activities along a depth gradient below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm). All points were represented in the middle of each layer. The coefficient of variation (CV) was displayed as the bubble size. Black bubbles represented values for July 5th 2012 sampling and grey bubbles represented values for February 11th 2013 sampling..... 129
Figure 46. Principal component analysis (PCA) ordination calculated using 30 samples (15 in July and 15 in February) and 17 variables (4 biotic and 13 abiotic parameters). a) Ordination of the variables and correlation circle, three additional variables were plotted in arrows (Chl a: algal biomass, T: temperature and S: salinity) but are not included in the analysis; and b) Position of the observations on the ordination, 95 % confidence ellipses were plotted showing the 2 horizons discrimination at the two sampling dates (surf = layers between 0 and 2 cm below sediment surface and deep = layers between 2 and 10 cm below sediment surface; J = July and F = February). Por: porosity; Prot: total protein content; BP: bound EPS-proteins; BC: bound EPS-carbohydrates; CP: colloidal EPS-proteins; CC: colloidal EPS-carbohydrates; Si(OH)4: silicate concentration; NO2-: nitrite concentration; NO3-: nitrate concentration; NH4+: ammonium concentration; PO43-: phosphate concentration; PA: prokaryotic abundance; bBP: benthic bacterial production; AMA: aminopeptidase activity; BGA: beta-glucosidase activity. 130
Figure 47. Venn diagram of variation partitioning of prokaryotic variables (i.e., PA: prokaryotic abundance; bBP: benthic bacterial production; AMA: aminopeptidase activity;

and BGA: β-glucosidase activity). Each part of the diagram represented the influence of other matrices on the variation of prokaryotic variables. Matrices contained: Environmental parameters matrix: Temperature, Chl *a*, POC:PON, nutrient content ($Si(OH)_4$, PO_4^{3-}, NO_2^-, NH_4^+),total protein content, porosity and bound EPS-proteins (BP); Conditions matrix: the two dates, and the two horizon depth; and Meiofauna matrix: abundances of gastropods, bivalves and foraminifera. Statistically significant pure fraction of variation of prokaryotes communities were presented as: 0.001 **; 0.01 * (Monte Carlo permutation test). Details were in **Table 13**. 132

Figure 48. Linear regression of prokaryotic biomass and benthic bacterial production (bBP) in July (dots, dark grey) ($F_{1,13}$=21.8, R^2=0.60, p<0.001) and in February (triangles, light-grey) ($F_{1,13}$=11.2, R^2=0.42, p=0.005) in Marennes-Oléron mudflat. Dot lines were linear regression and lines were 95% confidence limits. 135

Figure 49. Sediment depth-related structuration in European intertidal mudflats, conceptual assessments following the current study features. 137

Figure 50. Schéma conceptuel de la stratification verticale (*bsf* pour « *below sediment surface* ») révélée par l'analyse écologique des micro-organismes suivant deux conditions contrastées. En juillet, la forte production primaire (PP) est associée à une production de substances exopolymériques glucidiques (EPS G) constituant de la matière organique (MO) labile hydrolysable par les activités enzymatiques notamment l'aminopeptidase (AMA). Il en découle une plus forte production par les bactéries (PB) et une plus forte abondance de procaryotes (AP). Les communautés subissent deux types de contrôle : effet « *bottom-up* » = effet ressources (effet majoritaire) et effet « *top-down* » = effet prédation. 149

Figure 51. Schéma représentant la stratégie d'échantillonnage choisie 152

Figure 52. Profiles among depths (from 0 to 10 cm below sediment surface–bsf) of chlorophyll *a*, porosity (A, D), pore water nitrites + nitrates (NO_2^- + NO_3^-), ammonia (NH_4^+), (B, E), % of *Archaea* and prokaryotic abundance (PA) (C, F), in July 5th, 2012 (A-C) and in February 11th, 2013 (D-F). 164

Figure 53. Distribution of bacterial 16S rRNA gene diversity (number of operational taxonomic units –OTUs) and abundance (number of sequences, log_{10}-scaled) on the phylum level among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf) on the 1 000 most abundant bacterial OTUs. *Proteobacteria* (PB) were presented at the class level. 166

Figure 54. 16S rRNA gene relative abundance and affiliation of the 1 000 most abundant bacterial operational taxonomic units (OTUs) on the phylum level among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf). Pie charts are relative abundance of the *Proteobacteria* in each sample. 167

Figure 55. Distribution of 16S rRNA gene archaeal diversity (number of operational taxonomic units, OTUs) and abundance (number of sequences, log_{10}-scaled) at the phylum level among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf). 169

Figure 56. Relative abundance and affiliation of total archaeal operational taxonomic units (OTUs) among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf). 170

Figure 57. A) Non-metric multidimensional scaling (NMDS) and fitting environmental variables (grey arrows) and B) Hierarchical Ascendant Classification based on Bray-Curtis dissimilarity matrix of abundance of total archaeal operational taxonomic units (OTUs) among sampling dates (J = July 5th, 2012, F = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5

cm, D5 = 5-10 cm) showing a significant clustering in 3 groups among depths. For NMDS ordination, stress indicates the mismatch between original distance measures and distance in ordination space. 171
Figure 58. Boxplot of nitrogen-related genes abundance in sediment samples from July 5th, 2012 and February 11th, 2013 and all depths. AOB = ammonia oxidizing *Bacteria* (β-proteobacterial *amoA* gene); AOA= ammonia oxidizing *Archaea* (archaeal *amoA* gene); NZ = *nosZ* gene; NS+K = *nirS* + *nirK* gene; AMX = anammox. 173
Figure 59. Rarefaction curves for the bacterial 16S rRNA gene of 6 sediment samples of Marennes-Oleron Bay among sampling dates (July = July 5th, 2012, Feb = February 11th, 2013) and sediment layers (D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm). 186
Figure 60. Rarefaction curves for the archaeal 16S rRNA gene of 6 sediment samples of Marennes-Oleron Bay among sampling dates (July = July 5th, 2012, Feb = February 11th, 2013) and sediment layers (D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10. 186
Figure 61. Canonical correlation analysis (cca) ordination of N-related functional genes abundances (copies number, χ^2 transformed) constrained by 8 abiotic parameters among depths and sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013). AOB = ammonia oxidising *Bacteria* (bacterial *amoA* gene); AOA= ammonia oxidising *Archaea* (archaeal *amoA* gene); NZ = *nosZ* gene; NS = *nirS* gene; NK = *nirK* gene; AMX = anammox; T = temperature; S = salinity; NH4 = ammonia; Por = porosity. The cca analysis explained 67,2% of variance of the functional genes distribution. 187
Figure 62. Schéma conceptuel de la stratification révélée par l'étude de la composition des communautés archéennes suivant deux conditions contrastées (Thaum = *Thaumarchaeota,* Eury = *Euryarchaeota*). Les pourcentages correspondent aux abondances relatives par rapport au nombre de séquences totales d'archées. 189
Figure 63. Schéma conceptuel de la stratification révélée par l'étude de la diversité des communautés bactériennes suivant deux conditions météorologiques contrastées. Le séquençage des échantillons correspondant aux profondeurs de 2 à 10 cm en juillet et en février n'ayant pas abouti, les informations ne sont disponibles qu'entre 0 et 2 cm de profondeur. 190
Figure 64. Schéma conceptuel de la stratification révélée par l'étude de l'abondance des gènes fonctionnels suivant deux conditions contrastées. 191
Figure 65. Schéma représentant la stratégie d'échantillonnage choisie. Une nouvelle dimension temporelle a été ajoutée ici : le temps d'émersion, D = début, M = milieu, F=fin. 195
Figure 66. Dynamique de la température extérieure, irradiance et *light dose* mesurées à la surface du sédiment au cours de la marée basse et heures des différents prélèvements. Les trois points noirs pour chaque moment de marée correspondent aux triplicats, il y a donc trois points de prélèvements en triplicats (9 points noirs). La flèche indique l'heure de l'étale de basse mer. 197
Figure 67. Cercles des corrélations suivant les axes 1 et 2 (A) ou les axes 1 et 3 (D) d'une analyse en composante principale (ACP) réalisée avec une matrice contenant 15 paramètres : 10 paramètres abiotiques et 5 paramètres biotiques puis groupement des échantillons sur l'ordination par conditions météorologiques (B & E) ou par profondeurs (C & F) (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm). AP = abondance de procaryotes, AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase, PB = production bactérienne, Chla = chlorophylle a, EPS g = EPS glucidiques, EPS p = EPS protéiques, NH4 = ammonium, NO2 = nitrites, NO3 = nitrates, S = salinité, Temp = température du sédiment. 202

Figure 68. Analyse de cadrage multidimensionnel non-métrique (nMDS) réalisé sur une matrice de distance de Bray-Curtis basée sur les abondances des gènes fonctionnels transformés en ln(*x*+1) (AOB = gène *amoA* β-protéobactérien (β-AOB), AMX = gène 16S des bactéries réalisant l'anammox, NS = gènes *nirS* ; NK = gènes *nirK*). Les paramètres environnementaux ont été contraints à l'ordination et ceux ayant une influence significative sont représentés avec des flèches (déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan », (Oksanen *et al.*, 2013)). Les détails des tests sont indiqués dans le tableau ci-dessus. S = salinité, TS = température du sédiment, AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase, AP = abondance de procaryotes, Chla = chlorophylle a, NH4 = ammonium. 204
Figure 69. Evolution des paramètres environnementaux au cours d'une période d'émersion (Début = D, Milieu = M, et Fin =F), suivant les profondeurs de prélèvement (10 avril 2013). 207
Figure 70. Profils des activités et production bactériennes et des abondances de procaryotes au cours d'une marée basse selon la profondeur de prélèvement (en cm) et le moment de marée (Début en noir, Milieu en rose et Fin en vert) (10 avril 2013)..... 208
Figure 71. Cercles des corrélations suivant les axes 1 et 2 (A) ou les axes 1 et 3 (D) d'une analyse en composante principale (ACP) réalisée avec une matrice contenant 15 paramètres : 10 paramètres abiotiques et 5 paramètres biotiques puis groupement des échantillons sur l'ordination par temps d'émersion (B & E) ou par profondeurs (C & F) (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm). AP = abondance de procaryotes, AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase, Chl*a* = chlorophylle *a*, EPS g = EPS glucidiques, EPS p = EPS protéiques, NH_4 = ammonium, NO_2 = nitrites, NO_3 = nitrates, PB = production bactérienne, S = salinité, Temp = température du sédiment. 210
Figure 72. Profils des nutriments azotés et des gènes fonctionnels liés au cycle de l'azote selon la profondeur de prélèvement (en cm) et le moment de marée (Début en noir, Milieu en rose et Fin en vert). 212
Figure 73. Analyse de cadrage multidimensionnel non-métrique (nMDS) réalisé sur une matrice de distance de Bray-Curtis basée sur les abondances des gènes fonctionnels transformés en ln(x+1) (AOB = gène *amoA* β-protéobactérien (β-AOB), AMX = gène 16S des bactéries réalisant l'anammox, NS = gènes *nirS* ; NK = gènes *nirK*). Les échantillons ont été regroupés suivant le moment d'émersion. Les étiquettes des échantillons suivent un code : D, M ou F pour Début, Milieu ou Fin de marée, P pour profondeur (de P1 à P5) et r pour réplicats (réplicats de 1 à 3). 215
Figure 74. Cadrage multidimensionnel non-métrique (nMDS) identique à la figure précédent. Les échantillons ont été regroupés suivant les profondeurs (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm). Les paramètres étant le plus en adéquation avec la représentation (déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan », (Oksanen *et al.*, 2013) sont représentés avec des flèches : TS = température du sédiment ; S= salinité, AP = abondance de procaryotes, Chla = chlorophylle *a*, BGA = activité β-glucosidase, AMA = activité aminopeptidase, NH4 = ammonium. 216
Figure 75. Schéma conceptuel du fonctionnement écologique dans un écosystème stratifié, apport d'une condition printanière en progression. 223
Figure 76. Schéma conceptuel illustrant les variations temporelles du fonctionnement écologique global (intégration de la profondeur) de la vasière révélé par nos études..... 227
Figure 77. Stratégie d'analyse adoptée dans ce chapitre. Dans ce chapitre, les valeurs des trois moments de marée ont été moyennés pour comparer uniquement les conditions jour (LGT)/nuit(NGT)..... 239

Figure 78. Dispositif expérimental développé en double à l'identique (LGT et NGT). Les pompes permettant les flux d'eau sont représentées par des carrés noirs, les carottes de vases par des cylindres bruns qui sont disposés sur un faux fond grisé. 241
Figure 79. Photo du bac principal du dispositif expérimental illustrant la **Figure 78**. Le bac réserve se trouve à gauche de la photo. 241
Figure 80. Procédure de mise en place des carottes dans le dispositif expérimental : stratégie de prélèvement par couches de la colonne sédimentaire de 0 à 10 cm de profondeur, puis tamisage par couche et reconstitution des carottes de sédiment. Dans ces carottes reconstituées, du microphytobenthos frais a été ajouté 5 jours avant les prélèvements, voir § 1.2.4. 243
Figure 81. Frise temporelle des tâches réalisées pour la mise en place du dispositif expérimental (en Avril et Mai 2013). 244
Figure 82. Stratégie de prélèvement sur une journée par mésocosme tidal, LGT (marée basse de jour) et NGT (marée basse de nuit). 246
Figure 83. Exemple de profils d'oxygène à marée basse et à marée haute sur des carottes issues des mésocosmes. 249
Figure 84. Profils des différents paramètres biotiques et abiotiques mesurés dans chaque mésocosme (moyennes des 3 temps d'émersion). 251
Figure 85. Profils comparatifs des concentrations en nutriments en milieu de marée, en juillet 2012, février 2013, avril 2013 et dans les mésocosmes de jour (LGT) et de nuit (NGT).253
Figure 86. Distribution et diversité de la méiofaune benthique (abondance relative), *ex situ* de jour (LGT) et de nuit (NGT) et *in situ* en Février et en Juillet, suivant les 5 profondeurs de prélèvement (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm) dans un dispositif expérimental. 256
Figure 87. Stratégie d'échantillonnage considérée dans ce chapitre. Il est ici question de comparer les processus de jour (LGT) et de nuit (NGT), et ce à 3 moments de marées, en début (L1), milieu (L2) et fin, de marée basse (L3). 268
Figure 88. Profils des paramètres physico-chimiques et biotiques du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse 271
Figure 89. Profils des paramètres physico-chimiques du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse. NB : l'échelle est differente de jour et de nuit pour les protéines totales 272
Figure 90. Profils des nutriments dans l'eau interstitielle des sédiments issus des mésocosmes de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée) au cours d'une marée basse (L1 = début, L2 = milieu et L3 = fin, de gauche à droite). NB : en L1, de jour (LGT, profils en haut à gauche), les concentrations en nitrates (en orange) sont à lire sur l'axe de l'ammonium..... 275
Figure 91. Profils des paramètres liés au procaryotes benthiques du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse. Comme précisé dans le § 2.1, les activités exo-enzymatiques n'ont pu être mesurées la nuit (NGT). 276
Figure 92. Profils des concentrations en EPS glucidiques et protéiques liés ou colloïdaux du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse. 278
Figure 93. Expression des gènes fonctionnels du cycle de l'azote (transcrits par gramme de sédiment sec) moyennés selon deux conditions, de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), dans le dispositif expérimental 279
Figure 94. Profils des expressions des gènes fonctionnels (*amoA* archéen, *nirS* et anammox) dans les sédiments des mésocosmes de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone

grisée) à trois moments de la marée basse (L1 = début, L2 = milieu, L3 = fin, de gauche à droite)..... 281
Figure 95. Analyse en composantes principales (ACP) réalisée 17 variables (6 variables biotiques, dont la chlorophylle *a*, les abondances totales de procaryotes – AP, la production bactérienne – PB, et les expressions des gènes fonctionnels de la nitrification archéenne – AOA, de la dénitrification – *nirS*, et de l'anammox – AMX ; et 11 variables abiotiques, dont Por = porosité, $NO_x = NO_2^- + NO3^-$, EPS g = EPS glucidiques colloïdaux + liés, EPS p = EPS protéiques colloïdaux + liés, Prot tot = Protéines totales). En haut : cercles des corrélations (à gauche, axe1/axe2, à droite : axe1/axe3), en dessous (de bas en haut) : analyses par groupes soit de profondeurs (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm), soit de conditions (LGT = jour, NGT = nuit) ou de période d'émersion (L1 = début, L2 = milieu, L3 = fin). Les flèches et les étoiles indiquent la significativité des groupes (**Table 34**), les crochets montrent les groupes dégagés par un test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,01..... 283
Figure 96. Des statistiques à l'écologie, la description des paramètres structurant les communautés de procaryotes benthiques, une démarche statistique. Matrice à expliquer : PR = procaryotes, matrices explicatives : C = conditions, P = paramètres biotiques et abiotiques..... 285
Figure 97. Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les variables caractérisant les communautés de procaryotes benthiques (5 variables, dont les abondances totales de procaryotes, la production bactérienne – Prod Bact, et les expressions des gènes fonctionnels de la nitrification archéenne – AOA, de la dénitrification – *nirS*, et de l'anammox – AMX). Cercles des corrélations (A & E) et diagramme de dispersion associés (B-D et F-H) suivant différents axes de l'ACP, A : axe1/axe2, E : axe1/axe3. Les diagrammes de dispersions sont représentés selon différents critères : de profondeurs (B et F : P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm), soit de période d'émersion (C et G : L1 = début, L2 = milieu, L3 = fin) ou par condition (D et H : LGT = jour, NGT = nuit)..... 289
Figure 98. Partition de variance expliquant la variabilité des communautés de procaryotes (abondance, production bactérienne et expression des gènes fonctionnels). Les communautés sont ici caractérisées par deux matrices : « Paramètres » : Chlorophylle *a*, pH, concentrations de nitrates et d'ammonium, EPS glucidiques liés, concentration en protéines totales du sédiment (13%), et « Conditions » : profondeurs (de 0 à 10 cm) et mésocosme (LGT, NGT) (26%). 12% de la variance reste inexpliquée par les paramètres choisis. La significativité de chaque part de variance expliquée a été testée par des ARD totales et partielles résumées dans la **Table 36**. 291
Figure 99. Analyse de redondances (ARD) (package « vegan », Oksanen *et al.* (2013)) totale représentant les variations des paramètres liés aux procaryotes en rouge (AOA = expression du gène *amoA* archéen, NS = expression du gène *nirS*, AMX = expression du gène de l'anammox, PB = production bactérienne, AP = abondance de procaryotes) contraints par les paramètres en bleu (biotiques et abiotiques, dont EPS gL = EPS glucidiques liés), et les conditions en vert (mésocosme et profondeur)..... 292
Figure 100. Schéma conceptuel représentant les interactions entre procaryotes et microphytobenthos en surface ainsi que les activités des procaryotes observées lors d'expérimentation en mésocosme suivant la profondeur du sédiment (*bsf* = « *below sediment surface* ») dans les 10 premiers cm de jour (LGT) et de nuit (NGT). AP = abondance de procaryotes, PB = production bactérienne, AMA = actvitié aminopeptidase, MO = matière organique, EPS p = protéiques, EPS g = EPS glucidiques 300
Figure 101. Stratégie d'analyse adoptée dans ce chapitre. Il est ici question de comparer les conditions de jour (LGT) et de nuit (NGT), uniquement en milieu de marée basse (L2). 303

Figure 102. Vertical profiles of archaeal *amoA* relative abundance to total archaeal 16S rRNA expression, relative abundance of total archaea (% total prokaryotic 16S rRNA) and pore water nitrates concentration [µM] during day (LGT) and night (NGT) emersion. 314
Figure 103. A) 16S rRNA relative abundance and affiliation of the total bacterial operational taxonomic units (OTUs) on the phylum level (except for *Proteobacteria*) between day (LGT) and night (NGT) emersion periods among 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm below sediment surface. B) Tag frequency and number of 16S rRNA bacterial OTUs within each phylogenetic group. 316
Figure 104. A) Relative abundance and affiliation of total archaeal 16S rRNA operational taxonomic units (OTUs) between day (LGT) and night (NGT) emersion periods among 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm below sediment surface. B) Tag frequency and number of 16S rRNA archaeal OTUs within each phylogenetic group. 317
Figure 105. Hierarchical ascendant classification dendrogram (unweighted arithmetic average clustering, UPGMA) based on Bray-Curtis dissimilarity matrix of abundance of total archaeal OTUs (Hellinger-transformed). 319
Figure 106. (preliminary tree) Phylogenetic tree of C3 group (*Thaumarchaeota*) constructed using selected 16S rRNA OTUs (max length = 400 pb) and related sequences from SILVA. The tree was built with the neighbour joining method by using the Kimura distance (ARB software). Values at nodes indicate bootstrap percentages for 1000 replicates. Values less than 50% are not reported. Scale bar indicates a Kimura distance of 2. Values in parentheses indicate the number of close OTUs in the dataset. The bubbles size was calculated by normalizing abundance. For each OTU, bubble size was maximal when abundance was maximal in the considered depth. The most abundant OTU was underlined. 321
Figure 107. Schematic view of the mesocosm used for day/night measurements. One mesocosm consisted in two tanks: main and overflows tank. A) mesocosm dedicated to light emersion sampling (LGT, shown in this figure), B) mesocosm dedicated to night emersion sampling (NGT, identical as LGT mesocosm, only automatic schedule changed). 328
Figure 108. Rarefaction curves from the bacterial 16S rRNA library (OTUs, 97% cutoff, normalized dataset at 13000 sequences per sample) in the 10 sediment samples (LGT = light exposures, NGT = night exposures; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm). 331
Figure 109. Rarefaction curves from the archaeal 16S rRNA library (OTUs, 97% cutoff, normalized dataset at 800 sequences per sample) in the 10 sediment samples (LGT = light exposures, NGT = night exposures; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm). 332
Figure 110. Venn diagram based on shared membership by presence/absence of archaeal OTUs, without and with singletons OTUs 332
Figure 111. Rôle (structure et fonction) des communautés de procaryotes dans une vasière intertidale : une approche multi-échelle. AMA= activité aminopeptidase, BGA = β-glucosidase, AP= abondance de procaryotes, PB= production bactérienne, Chl*a*= chlorophylle *a*, Temp= température, Nitrification : AOA = archée nitrifiantes et AOB= bactéries nitrifiantes, dénitrification : *nirS/K* et *nosZ*. 349

Liste des encarts

Encart méthodologique 1. La mesure des activités bactériennes dégradant les EPS 9
Encart méthodologique 2. L'extraction d'ADN et d'ARN dans les sédiments marins 14
Encart méthodologique 3. L'utilisation croissante de la biologie moléculaire et de l'utilisation des gènes fonctionnels comme marqueurs moléculaires 26
Encart méthodologique 4. Le choix des marqueurs moléculaires pour cibler le cycle de l'azote dans les sédiments côtiers vaseux 33

Boîte à outils 1. Identifier les paramètres structurant la variabilité des communautés de procaryotes par une démarche statistique 285

Introduction générale

1.1 Les vasières intertidales en milieu tempéré, un site atelier 3
1.1.1 Les zones côtières 3
1.1.2 Les vasières 4
1.1.3 Les vasières intertidales en zones tempérées 4
1.2 Les procaryotes benthiques : diversité et fonction 10
1.2.1 Structure des procaryotes benthiques 10
1.2.2 Fonctions des procaryotes benthiques 17
1.3 De l'importance d'étudier le cycle de l'azote 19
1.3.1 Rôle des micro-organismes dans les cycles biogéochimiques 19
1.3.2 L'étude du cycle de l'azote dans les sédiments marins 23
1.4 Contexte général et objectifs scientifiques 34
1.5 Déroulement du manuscrit 38
1.5.1 Articles scientifiques acceptés : 38
1.5.2 Articles scientifiques à soumettre : 38

1.1 Les vasières intertidales en milieu tempéré, un site atelier

1.1.1 Les zones côtières

Les zones côtières sont des interfaces entre terre et océan, qui subissent des perturbations anthropiques fortes et qui sont structurées par des influences tidales (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Elles sont définies par le Millennium Ecosystem Assessment (2005) comme des « *aires entre 50 mètres sous le niveau de la mer et 50 mètre au-dessus du niveau des plus hautes marées ou jusqu'à 100 mètres du rivage dans les terres, incluant les récifs coralliens, les zones intertidales, les estuaires, les zones d'aquaculture côtières et les herbiers* ». Les zones côtières rendent de nombreux services écosystémiques (ex : nourricerie, production primaire) et économiques (ex : aquaculture, tourisme). Elles concentrent également les pollutions anthropiques continentales acheminées par le bassin versant des rivières se jetant ensuite dans l'océan (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Elles sont donc considérées comme menacées et comme des zones à préserver.

Les zones intertidales représentent 7 % des zones côtières (Stutz and Pilkey, 2002) et sont le siège d'une reminéralisation intense de la matière. Ces écosystèmes très productifs (Underwood and Kromkamp, 1999; Forster *et al.*, 2006), sont à la fois source et puits de nutriments, en particulier d'éléments azotés (Joye *et al.*, 2009). De par leur position d'interface, ils reçoivent de nombreux apports allochtones provenant du milieu océanique et du bassin versant. La granulométrie des sédiments des zones intertidales est généralement de 2 à 250 µm et dépend fortement des conditions hydrodynamiques (Joye *et al.*, 2009).

Les Pertuis Charentais constituent une zone d'importance économique et sociale en Charente-Maritime (Heral *et al.*, 1986; Prou and Héral, 1998). Ces Pertuis constituent une mosaïque d'habitats très riches et cruciaux pour de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs (Bocher *et al.*, 2007; Saint-Béat *et al.*, 2013). Des plages de sables aux habitats rocheux, cette région est surtout connue pour la présence de vastes vasières nues très développées qui permettent le développement d'une aquaculture intense.

1.1.2 Les vasières

Selon la définition académique, les vasières sont des étendues côtières ou sous-marines recouvertes de vase. Ces zones sont caractérisées par un fort taux de sédimentation où la matière particulaire s'accumule à leur surface. Les classifications de Wentworth (1922) et Blott and Pye (2001), considèrent les vases comme des sédiments dont les grains ont une taille inférieure à 63 µm regroupant les silts (entre 63 et 2 µm) et les argiles (< 2µm). Ces sédiments sont dits cohésifs (Mehta and Li, 1997) et possèdent donc la capacité de s'agréger par des processus de floculation/défloculation. Ceci leur confère des propriétés peu perméables, entraînant une diffusion plus réduite des composés dissous (Huettel *et al.*, 2014).

Dans la baie de Marennes-Oléron, les îles d'Oléron, d'Aix et de Ré protègent la côte. L'embouchure de la Charente, à Port-des-Barques, apporte des sédiments vaseux en quantité, créant ainsi une zone de vasière intertidale de 110 km² (Riera and Richard, 1996). Dans sa partie Sud, la vasière de Brouage accumule par décantation, à marée haute, les sédiments apportés par les eaux très turbides des Pertuis et des fleuves (Charente et Seudre) (Verger and Ghirardi, 2009).

1.1.3 Les vasières intertidales en zones tempérées

Les vasières intertidales font partie des zones côtières et sont soumises au rythme tidal (c'est-à-dire soumises au balancement des marées). Il en existe trois types (Dyer *et al.*, 2000) :

- Les vasières de faible latitude correspondant à des zones arides ou tropicales, qui sont généralement colonisées par les mangroves
- Les vasières de latitude moyenne correspondant aux vasières en climat tempéré
- Les vasières se trouvant dans les latitudes élevées, proche des pôles souvent recouvertes de glace

Les vasières intertidales européennes correspondent aux vasières de latitudes moyennes et peuvent être 1) recouvertes de macrophytes, ou de macro-algues (ex : herbiers à zoostères - bassin d'Arcachon), ou 2) nues. Ces dernières comptent parmi les écosystèmes les plus productifs, puisqu'ils sont à l'origine de 50% de la production primaire[1] des estuaires (Underwood and Kromkamp, 1999). La production primaire est à la base des réseaux

[1] Production primaire : production de matière organique à partir de carbone minéral atmosphérique ou aquatique, par photosynthèse (énergie lumineuse).

trophiques entraînant donc par cascade, une forte productivité globale du système (Heip *et al.*, 1995).

La vasière de Brouage, est une vasière intertidale nue dont le marnage maximum peut atteindre 6 mètres et les marées sont semi-diurnes (2 marées basses et 2 marées hautes dans une journée). Cette vasière présente un faciès composé d'un système de seillons-banquettes fluctuant au cours de l'année (**Figure 1** B).

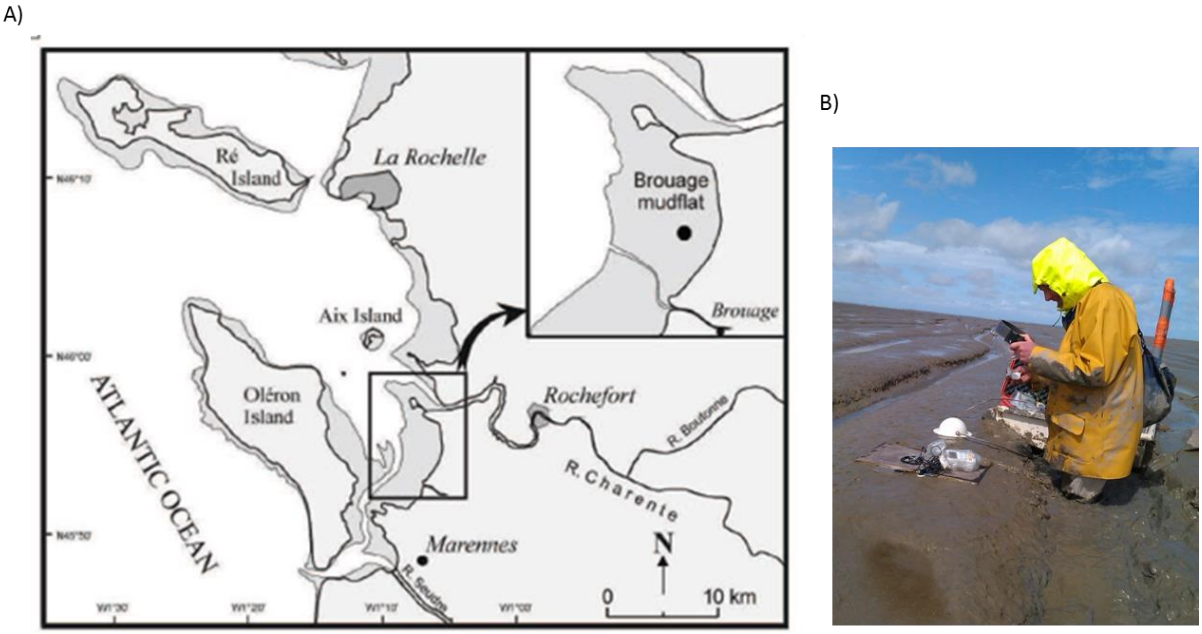


Figure 1. A) Carte indiquant la situation de point d'échantillonnage au sein des Pertuis Charentais ; B) Photo illustrant le système de seillons-banquettes (photo : A. Barnett).

Dans les vasières intertidales nues tempérées, les diatomées dominent souvent la communauté des micro-algues benthiques ou microphytobenthos qui assure la totalité de la production primaire benthique (Admiraal, 1984; MacIntyre *et al.*, 1996; Underwood and Kromkamp, 1999). De par ses propriétés cohésives, le sédiment vaseux présente un profil de pénétration de la lumière caractéristique qui diffère des sédiments sableux (**Figure 2**) (Cartaxana *et al.*, 2011). En effet, au-delà de 500 µm de profondeur, moins de 5% de l'irradiance pénètre dans un sédiment vaseux contre 50% dans les sables. Celle-ci conditionne donc la distribution verticale des micro-algues à marée basse, limitées par la lumière en profondeur.

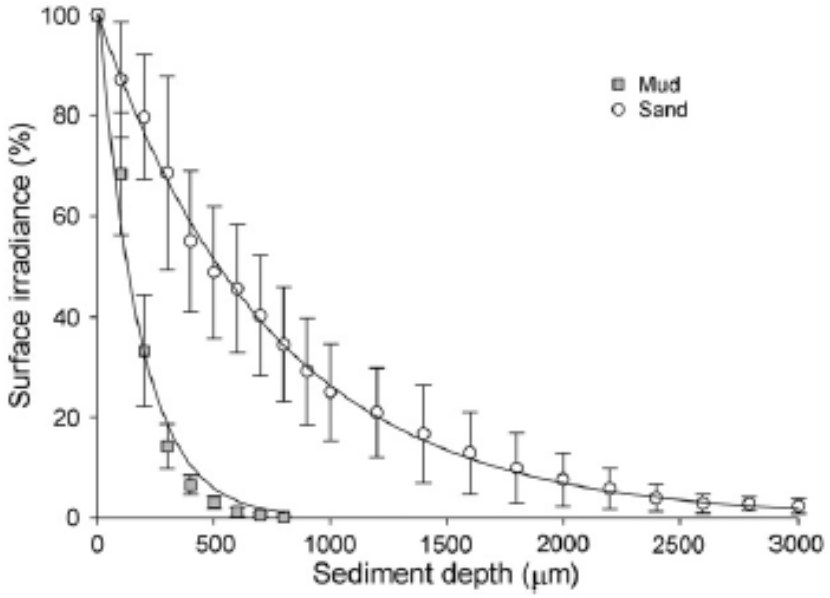


Figure 2. Diminution de l'irradiance dans des sédiments vaseux ou sableux selon un gradient de profondeur (Cartaxana *et al.*, 2011).

1.1.3.1 Le microphytobenthos, à l'origine de la production des vasières intertidales nues

Un biofilm microphytobenthique se compose d'organismes autotrophes qui synthétisent leur propre source de carbone organique, associés à des organismes hétérotrophes (qui ont besoin d'une source externe de carbone organique) et d'une matrice de substances exopolymériques (EPS, pour « *exopolymeric substances* ») (Decho, 2000; Flemming and Wingender, 2010). Les organismes autotrophes peuvent être des diatomées (Underwood and Kromkamp, 1999), des algues vertes, et/ou des procaryotes comme les cyanobactéries. Les organismes hétérotrophes sont des bactéries, des archées, des champignons ou des particules virales (Decho, 2000; van Duyl *et al.*, 2000). La majorité de ces organismes, autotrophes ou hétérotrophes, produisent des EPS qui ont des rôles variés et variables selon les études et les assemblages taxonomiques considérés (Decho, 2000).

Dans les vasières intertidales, le microphytobenthos (MPB) peut être dominé par les diatomées dites épipéliques (Admiraal, 1984; Underwood and Kromkamp, 1999), comme c'est le cas pour la vasière de Brouage (Blanchard *et al.*, 2001; Blanchard *et al.*, 2004; Haubois *et al.*, 2005). Ces diatomées épipéliques sont capables de migration au cours des périodes d'émersion pour capter la lumière (Consalvey *et al.*, 2004) et sont, pour la plupart des diatomées pennées (à symétrie axiale), par opposition aux diatomées centriques (à

symétrie radiale), plutôt planctoniques (Underwood and Smith, 1998; Haubois *et al.*, 2005; Forster *et al.*, 2006; Barnett *et al.*, 2014). Les espèces les plus fréquentes dans la vasière de Brouage sont : *Navicula phyllepta, Navicula digitoradiata, Navicula gregaria, Staurophora wislouchii, Gyrosigma fasciola* et *Nitzschia dissipata* (Haubois *et al.*, 2005).

Ces diatomées épipéliques réalisent une migration globale cyclique vers la surface lors de chaque marée basse. Egalement, au sein même du biofilm, elles sont capables de micro-migrations pour atteindre une zone où l'irradiance est optimale afin de maximiser l'absorption tout en minimisant la photo-inhibition due à de trop fortes radiations (Consalvey *et al.*, 2004). Ainsi, deux types de biomasses microphytobenthiques ont été définies (**Figure 3**):

- la biomasse totale est qualifiée de **biomasse photosynthétiquement compétente** (*photosynthetically competent biomass*, PCB). Cette biomasse présente le potentiel de réaliser la photosynthèse instantanément en présence de lumière (MacIntyre and Cullen, 1995; Herlory, 2005). Elle se trouverait dans le premier centimètre à la surface du sédiment.
- lorsque qu'une partie de cette biomasse migre dans une zone où la lumière est suffisante pour réaliser la photosynthèse, elle devient alors la **biomasse photosynthétiquement active** (*photosynthetically active biomass*, PAB).

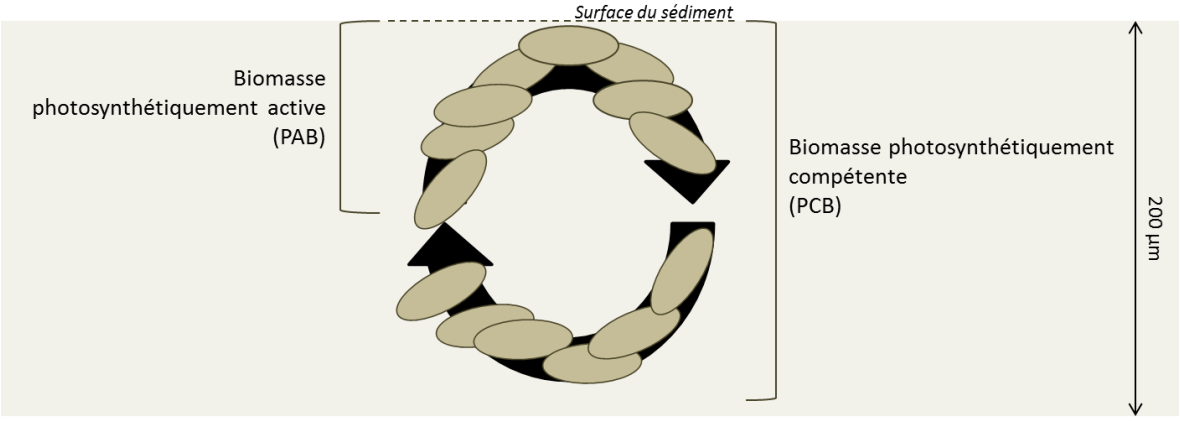


Figure 3. Hypothèse de rotation des diatomées épipéliques à la surface d'un sédiment vaseux, adapté de Consalvey *et al.* (2004).

Les diatomées épipéliques seraient peu limitées en nutriments dans les sédiments côtiers puisqu'elles les puiseraient dans le sédiment principalement lors des migrations tidales (Underwood and Kromkamp, 1999). Leur assimilation est intense à marée basse et le MPB est donc un facteur majeur influençant les processus bactériens et les flux d'azote dans les sédiments (Nedwell *et al.*, 1999). Elles forment un biofilm réparti en patchs rendant leur étude aléatoire et variable selon les sites, complexifiant les comparaisons inter-sites (Underwood and Kromkamp, 1999). La biomasse de chlorophylle *a* peut varier au sein d'une année entre 1 et 560 mg m^{-2} (MacIntyre *et al.*, 1996; Underwood, 1997) et le maximum enregistré à Brouage serait de 300 mg m^{-2} (Blanchard *et al.*, 2001).

1.1.3.2 Une forte production de substances exopolymériques

La migration de ces algues et le développement du biofilm s'accompagne d'une forte production d'EPS (Blanchard *et al.*, 2001; Underwood and Paterson, 2003; Herlory *et al.*, 2004). La production d'EPS à partir de composés carbonés issus de la photosynthèse dure environ 0,5 à 2 h jusqu'à l'excrétion (de Brouwer *et al.*, 2003; Bellinger *et al.*, 2005; Hanlon *et al.*, 2006; Haynes *et al.*, 2007). Cette production est conditionnée par des facteurs environnementaux comme la température ou la lumière ou encore la limitation en nutriments (Underwood and Paterson, 2003). D'après la littérature, les EPS glucidiques seraient sécrétés majoritairement par les micro-algues afin de réaliser leurs migrations tidales et se protéger face à la dessiccation ou aux fortes salinités (Orvain *et al.*, 2014b). Ces EPS sont également sécrétés en réponse à un excès de carbone dans la cellule qui est ainsi expulsé par sécrétion de glucides (Smith and Underwood, 2000). Par ailleurs, les EPS glucidiques stabiliseraient le biofilm et permettrait une diminution de la remise en suspension de la surface du sédiment lors des marées hautes (Underwood and Paterson, 2003; Lundkvist *et al.*, 2007; Lubarsky *et al.*, 2010; Orvain *et al.*, 2012). Ce rôle est largement énoncé et étudié dans la littérature mais une synthèse récente suggère que les diatomées elles-mêmes auraient un rôle dans cette stabilisation qui serait le résultat de la présence des cellules et de leur production d'EPS (Stal, 2010). Les protéines seraient produites en majorité par les procaryotes en réponse à un stress environnemental ou lors d'une première adhésion à un substrat (Lubarsky *et al.*, 2010). Les EPS produits par le microphytobenthos sont rapidement assimilés par les bactéries hétérotrophes puis par la méiofaune et la macrofaune (Middelburg *et al.*, 2000).

Les activités enzymatiques permettent aux bactéries de dégrader les EPS liés alors intégrés à la fraction colloïdale avant l'assimilation (Hanlon *et al.*, 2006). Parmi les enzymes les plus utilisées se trouve la β-glucosidase qui hydrolyse la partie terminale de β-D-glucose des EPS

(Boetius, 1995; Haynes *et al.*, 2007). Le lien entre les EPS issus des micro-algues et leur assimilation par les bactéries est encore peu connu et il reste difficile d'identifier les procaryotes capables spécifiquement de dégrader et/ou d'assimiler un certain type d'EPS (Haynes *et al.*, 2007). A l'heure actuelle, le développement des techniques de marquages par isotopes stables (SIP = *Stable Isotope Probing*) permettent de marquer les composés carbonés produits par les diatomées et de suivre leur assimilation par les bactéries. Par la suite, l'ADN ou l'ARN procaryotique est extrait puis séparé par ultra-centrifugation. Cette technique permet le traçage précis du devenir des EPS microphytobenthiques dans le compartiment microbien.

Encart méthodologique 1. La mesure des activités bactériennes dégradant les EPS

L'étude des interactions entre MPB et procaryotes est de plus en plus réalisée et semble complexe à la vue du nombre de relations positives ou négatives possibles. Dans ce travail, il s'agissait de mesurer *in situ* la dégradation des EPS glucidiques et protéiques par les procaryotes. Les enzymes à cibler peuvent être des chitobiases, des lipases ou des aminopeptidases selon les molécules à hydrolyser. Basé sur des études préalables (Agogué *et al.*, 2014; Mallet *et al.*, 2014), et sur la littérature (Boetius, 1995), notre choix s'est porté d'étudier les activités de la β-glucosidase et de l'aminopeptidase, respectivement responsables de l'hydrolyse des sucres (en glucose) et des protéines. Ces enzymes sont des exo-enzymes rendant leur étude possible même sur du sédiment congelé. La mesure de ces activités est réalisée grâce à l'addition d'un substrat qui une fois hydrolysé fluoresce et la fluorescence est proportionnelle à la quantité de substrat formé. Le principe de ces mesures est de replacer l'enzyme en conditions *in situ* afin d'évaluer l'activité maximale potentielle de la communauté. Ce dosage demande de réaliser des tests préalables afin d'ajouter à l'enzyme une quantité saturante de substrat pour éviter de biaiser la mesure. Ce protocole a été utilisé et optimisé pendant ce travail de thèse et se trouve en Annexe 17.

1.2 Les procaryotes benthiques : diversité et fonction

On estime aujourd'hui à 10^{29} le nombre total de procaryotes dans les écosystèmes aquatiques dont 1,7 x10^{28}, soit 14%, proviennent des 10 premiers centimètres des sédiments (Whitman *et al.*, 1998).

1.2.1 Structure des procaryotes benthiques

1.2.1.1 Description des procaryotes : les archées ont des caractéristiques qui leurs sont propres

Parmi les micro-organismes, les procaryotes sont des êtres-vivants unicellulaires sans noyau dont l'ADN est diffus dans la cellule. Longtemps représentés uniquement par le grand domaine des bactéries, il regroupe à l'heure actuelle les bactéries et les archées. En effet, les avancées des méthodes de biologie moléculaire et l'étude du gène de la petite sous-unité 16S du ribosome ont permis à l'équipe de Carl Woese (Woese and Fox, 1977; Woese *et al.*, 1990), de différencier formellement en 1990, les archées, des bactéries (**Figure 4**). Avant cette découverte, les archées, encore appelées « archaebactéries» (« arch » = ancien), étaient considérées comme des bactéries extrêmes peuplant uniquement les grands fonds marins ou les lacs acides ou salées. Depuis, les études ont montrées que les archées sont présentes partout (Robertson *et al.*, 2005; Hulcr *et al.*, 2012), tout comme les bactéries. Elles sont d'une importance capitale dans les milieux extrêmes et sont présentes en proportion non négligeables dans les sédiments marins (Knittel *et al.*, 2005).

Si leur différenciation formelle s'est faite grâce à des méthodes de biologie moléculaire, il est connu aujourd'hui que les archées présentent des caractéristiques métaboliques et physiologiques singulières. Morphologiquement similaires aux bactéries, leurs machineries métaboliques peuvent s'apparenter à celles des cellules eucaryotes. L'exemple le plus marquant concerne le mécanisme de transcription de l'ADN (hélicases, polymérases *etc*) et la traduction des facteurs d'élongation qui sont très similaires à ceux des cellules eucaryotes (Olsen and Woese, 1996). Les cellules archéennes possèdent également des caractéristiques propres liées à leur membrane phospholipidiques qui est composée d'isoprénoïdes à liaisons éthers associés à des glycerol-1-phosphate (Kates, 1993; Gribaldo and Brochier, 2009), s'opposant ainsi à la structure communément retrouvée chez les bactéries et les cellules eucaryotes (**Table 1**). De plus, les archées, jusqu'alors non pathogènes pour l'homme, seraient, pour certaines, capables de réaliser un processus biogéochimique fondamental : la méthanogenèse (Cavicchioli, 2010).

Table 1. Récapitulatif des différences majeures et des particularités connues des archées par rapport aux bactéries et aux eucaryotes, adapté de Cavicchioli (2010) et Bertrand *et al.* (2011)

Traits	**Bactéries**	**Archées**	Eucaryotes
Liaison carbone des lipides	Ester	**Ether**	Ester
Organisation tête phosphate des lipides	Glycerol-3-phosphate	**Glycerol-1-phosphate**	Glycerol-3-phosphate
Métabolisme	Bactérien	similaire aux bactéries	eucaryote
Mécanisme de transcription de l'ADN	Bactérien	similaire aux eucaryotes	eucaryote
Traduction des facteurs d'élongation	Bactérien	similaire aux eucaryotes	eucaryote
Ribosomes (taille de l'ARN)	16S	16S	18S
Noyau	non	non	oui
Organites cellulaires	non	non	oui
Méthanogénèse	non	**oui**	non
Chimiolithotrophie	présente	présente	absente
Photosynthèse chlorophyllienne	présente	**absente**	présente
Pathogènes	oui	**non**	oui

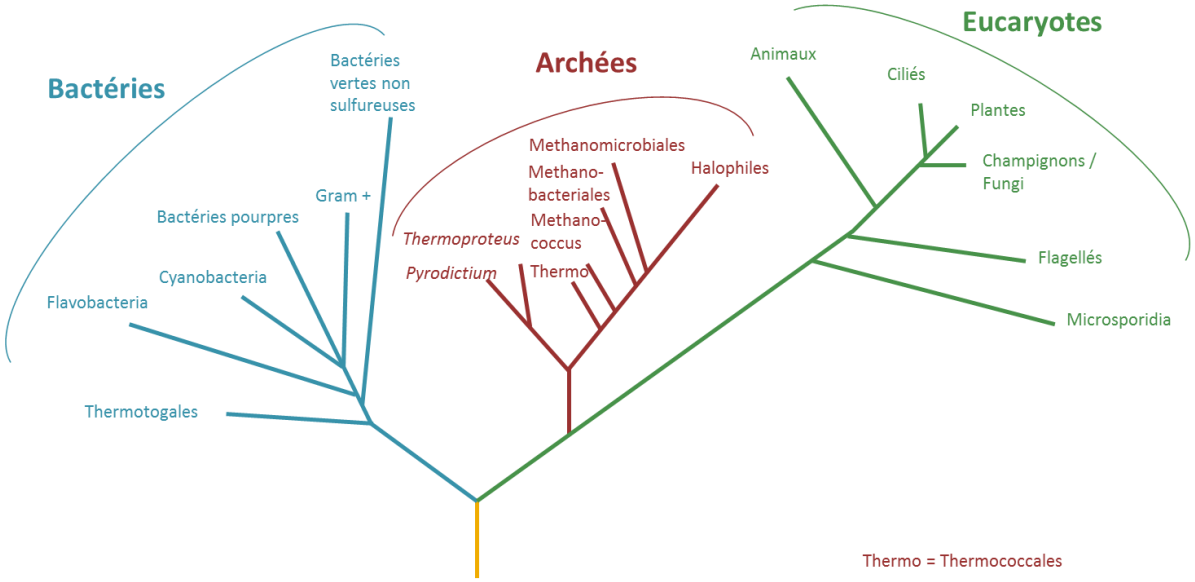


Figure 4. Arbre du vivant en trois domaines, selon Woese *et al.* (1990)

1.2.1.2 Diversité et distribution des procaryotes benthiques

L'étude de la diversité des procaryotes n'a longtemps été possible que via l'étude des bactéries et archées cultivables : 24 phyla bactériens soit 6 185 espèces et 3 archéens soit 281 espèces, en 2005 (Madsen, 2008). Seulement 0,25 % des procaryotes benthiques seraient cultivables (Amann *et al.*, 1995), ce paradoxe appelé «*The great plate-count anomaly*» limite la diversité connue et a longtemps biaisé la vision des écologistes et microbiologistes quant aux communautés de procaryotes en termes de diversité et de fonction.

Suite à l'engouement suscité par les découvertes du *Global Ocean Sampling* (Rusch *et al.*, 2007), les microbiologistes ont cherché à comparer les écosystèmes sur la base de la diversité des procaryotes via des techniques de séquençage en masse (Mardis, 2008; MacLean *et al.*, 2009; Shokralla *et al.*, 2012). Les bases de données se sont alors multipliées et les études sur la diversité des assemblages de procaryotes et leur biogéographie sont de plus en plus nombreuses. Ainsi, de nombreuses théories ont été confirmées ou au contraire réfutées. Mais à l'heure actuelle, il est difficile d'affirmer avec certitude qu'une théorie en particulier se vérifie. Baas Becking (1934) a énoncé « *Everything is everywhere, but, the environment selects* ». Cette théorie largement citée dans la littérature semble caractériser le paradoxe lié à l'infinie capacité des procaryotes à surprendre les scientifiques.

Cette théorie est largement acceptée aujourd'hui même si toute théorie connait des exceptions et des critiques. Selon ces auteurs, il doit être possible de retrouver toute espèce procaryotique existante partout, quel que soit l'écosystème ciblé. Mais, l'environnement définit les espèces qui dominent. Cette théorie s'accorde avec la potentielle présence d'un pool d'organismes en dormance dans les écosystèmes marins appelée « *seed bank* » ou banque de semences (Gibbons *et al.*, 2013). Mais ces théories sont à nuancer, en effet, les nouvelles technologies ont prouvé que ces organismes, dits rares, seraient également très actifs et donc potentiellement essentiels au fonctionnement des écosystèmes : ces organismes constituent la biosphère rare (Hugoni *et al.*, 2013).

Encart méthodologique 2. L'extraction d'ADN et d'ARN dans les sédiments marins

L'évaluation de la diversité des procaryotes non cultivables dans les sédiments nécessite des techniques adaptées pour extraire les acides nucléiques des procaryotes des sédiments. La difficulté de la matrice et la présence d'une forte quantité de sels, de protéines et d'acides humiques diminuent les rendements d'extraction des acides nucléiques. De nombreux kits sont fournis en biologie moléculaire mais beaucoup de microbiologistes sont obligés d'utiliser des protocoles « faits maisons » afin d'obtenir des résultats optimaux pour le sédiment. Certainement les kits les plus utilisés à l'heure actuelle pour l'analyse des sédiments marins et en particulier les sédiments côtiers sont les kits PowerSoil® RNA isolation kit ou PowerSoil® DNA isolation kit (MOBIO). Ces kits développés originellement pour les sols permettent d'extraire une quantité satisfaisante d'acides nucléiques tout en éliminant une grande proportion d'inhibiteurs tels que les sels, les acides humiques et les protéines.

Ainsi, les progrès technologiques réalisés à la fois dans le domaine de la biologie moléculaire et dans celui des prospections des fonds marins ont permis une description des assemblages taxonomiques procaryotiques de divers types de sédiments marins. Les sédiments constitueraient les écosystèmes les plus diversifiés sur Terre (Zinger *et al.*, 2011). Cette étude récente est une des premières permettant de comparer les diversités de bactéries dans des écosystèmes pélagiques et benthiques en milieu océanique et côtier avec une base de données de cette ampleur (séquençage haut débit). Les taxons majoritaires dans les sédiments sont les Protéobactéries (**Figure 5**) qui sont aussi les procaryotes les mieux décrits. Les sédiments côtiers se différencient des sédiments profonds par une plus grande quantité de séquences affiliées aux *Clostridia* et *Bacilli* et une plus faible quantité d'Acidobactéries et de Planctomycetes (Zinger *et al.*, 2011; Parkes *et al.*, 2014) (**Figure 5**). De même, des études antérieures avaient montrées que les sédiments intertidaux étaient dominés par les Sphingobactéries, Flavobactéries et Protéobactéries (Selje *et al.*, 2005; Stevens *et al.*, 2005; Bissett *et al.*, 2006). Finalement, l'étude de la dynamique de ces groupes présents a montré que, dans des sédiments côtiers sableux, seulement 3 à 5% des groupes bactériens sont présents toute l'année ce qui suggère l'importance de la fluctuation et de l'activité des groupes appartenant à la biosphère rare (Gobet *et al.*, 2012).

L'étude de la diversité archéenne atteste de la présence des trois grands groupes archéens dans les sédiments : les *Crenarchaeota*, les *Euryarchaeota* et les *Thaumarchaeota* (Knittel *et al.*, 2005; Kubo *et al.*, 2012) . Le groupe des MCG (Miscellaneous Crenarchaeotal Group) semble très important dans les sédiments anoxiques (Inagaki *et al.*, 2003; Inagaki *et al.*, 2006a; Kubo *et al.*, 2012) et est aussi beaucoup retrouvé dans des sédiments vaseux soumis à une pollution et/ou bioturbation en microcosme (Stauffert *et al.*, 2014).

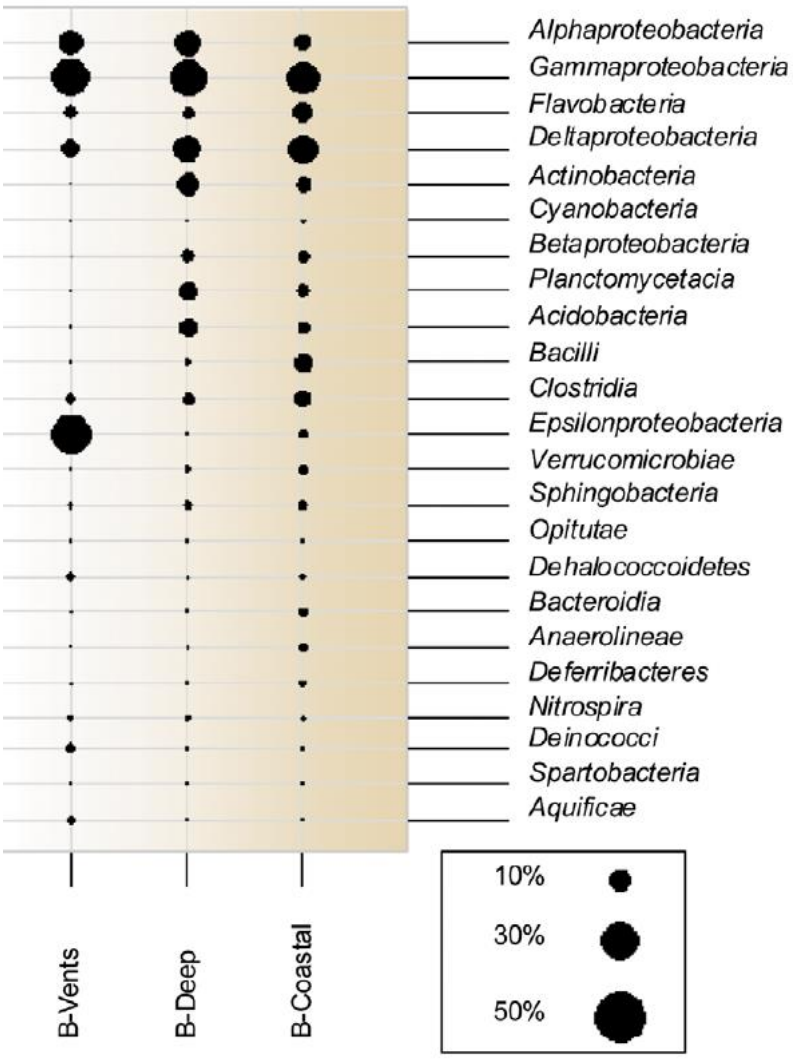


Figure 5. Différents groupes bactériens retrouvés dans les sédiments côtiers et profonds, issu de Zinger *et al.* (2011)

1.2.1.3 Facteurs influençant la structure des procaryotes

Comme discuté précédemment, la structure observée des communautés de procaryotes reflète les pressions auxquelles celles-ci sont soumises. Ces pressions sont regroupées en trois grandes catégories : la pression de prédation par des maillons supérieurs ou des virus (lyse virale) appelée « *top-down* », la disponibilité et l'apport en nutriments et en ressources appelée « *bottom-up* », et les interactions entre procaryotes considérée (**Figure 6**), comme une voie latérale de sélection appelée « *sideways* » (Fuhrman and Hagström, 2008). Ces relations entre procaryotes peuvent être des relations de prédation (ex : *Bdellovibrio*) ou des relations de coopération entre les organismes comme la syntrophie[2] par exemple. Cela peut également relever de la compétition entre organismes pour un même substrat. Ces relations affecteront la structure des communautés mais également leur fonction au sein de l'écosystème.

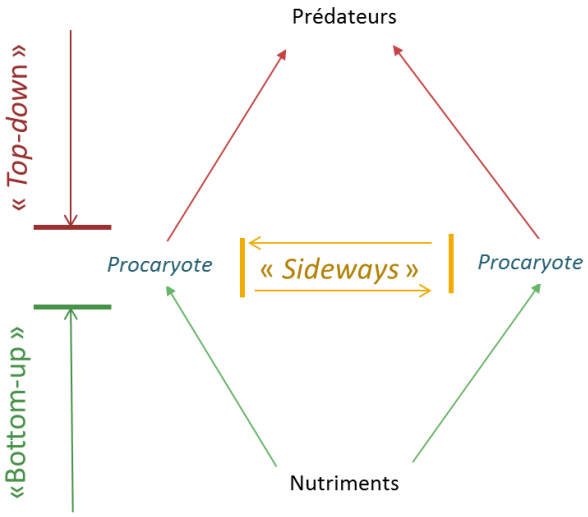


Figure 6. Contrôle des communautés de procaryotes, incluant les contrôles latéraux entre les procaryotes qui peuvent être alternativement positifs (ex : syntrophie[2]) ou négatifs (ex : prédation), selon Fuhrman and Hagström (2008).

[2] Syntrophie : aptitude de deux cellules à combiner leurs activités métaboliques pour leur croissance. Ce phénomène se déroule lorsque les cellules ne sont pas capables de dégrader seule leur substrat

1.2.2 Fonctions des procaryotes benthiques

1.2.2.1 Des organismes polyvalents

Les procaryotes ont des métabolismes très plastiques et leurs communautés peuvent ainsi assurer de nombreuses fonctions au sein d'un écosystème. Le rôle certainement le plus connu et le plus étudié reste leur capacité à reminéraliser la matière organique (ex : détritus), produite par tous les organismes vivants du réseau trophique, en matière inorganique de nouveau disponible pour le système. Ce rôle de « recycleur » est primordial pour le maintien des équilibres trophiques et le fonctionnement des écosystèmes.

La capacité des procaryotes à utiliser certains substrats permet de définir des classes trophiques fonctionnelles (**Table 2**). Toutes ces classes et donc ces capacités d'utilisation de la matière sont rencontrées dans les sédiments côtiers du fait de la forte diversité phylogénétique présente. Selon le type d'organisme, différents facteurs écologiques majeurs peuvent limiter l'énergie et la croissance (Madsen, 2008) :

- Photo-autotrophes : cycle jour/nuit, pénétration de la lumière
- Chimiolitotrophes : flux de matériel inorganique réduit tels que NH_3et H_2 (H_2, H_2S ou CH_4 pour les vents hydrothermaux)
- Chimio-organotrophes : flux de carbone organique des autotrophes et de la biomasse morte ; et flux de l'accepteur d'électrons final dans les couches anaérobiques riches en carbone.

Table 2. Classification physiologique des formes de vies basées sur les sources d'énergie et de carbone, issu de Madsen (2008)

	Source d'énergie		
Source de carbone	**Chimique, organique**	**Chimique, inorganique**	**Lumière**
Organique fixée	Chimio-organohétérotrophe	Chimiolithohétérotrophes (ex: *Beggiatoa, Thioploca*)	Hétérotrophes photosynthétiques (ex: bactéries pourpres)
Gazeuse (CO_2)		Chimiolithoautotrophes (ex: bactéries oxydant les sulfures)	Autotrophes photosynthétiques (ex: plantes, algues)

1.2.2.2 Le recours à la biologie moléculaire

Beaucoup de procaryotes sont mixotrophes et/ou polyvalents et peuvent adapter leur métabolisme selon les conditions environnementales (Madsen, 2008). Cette plasticité complexifie leur étude et notamment la classification des procaryotes en groupes fonctionnels (Bertrand *et al.*, 2011) puisqu'elles ont des systèmes métaboliques divers, qu'elles sont rarement cultivables, qu'elles échangent des gènes, *etc.* Dans la littérature, les analyses fonctionnelles se multiplient (Barnett *et al.*, 2007; Alves-de-Souza *et al.*, 2008; Miki *et al.*, 2014; Pusceddu *et al.*, 2014) et permettent de mieux décrire les systèmes écologiques (Tilman *et al.*, 1997). Ces approches appliquées à la microbiologie deviennent indispensables et de nouveaux outils ont été développés afin d'évaluer la fonctionnalité d'un pool d'organismes au sein d'un écosystème. Parce que trop peu d'espèces bactériennes ou archéennes ne sont cultivables et ne peuvent donc être décrites fonctionnellement, la biologie moléculaire s'est avérée être une source d'outils indispensables à l'analyse fonctionnelle des communautés de procaryotes (Braker *et al.*, 2000; Francis *et al.*, 2007). Depuis l'utilisation de la biologie moléculaire en microbiologie, les connaissances sur les procaryotes, leur diversité phylogénétique et fonctionnelle s'est accrue considérablement. Le séquençage haut débit a permis d'associer des séquences archéennes à des séquences de gènes impliqués dans la nitrification par exemple, modifiant la perception initiale selon laquelle seules les bactéries pouvaient oxyder l'ammonium (Konneke *et al.*, 2005). Grâce à ces méthodes, les cycles biogéochimiques ont été revus. Il a été prouvé notamment que non seulement les archées sont capables d'oxyder l'ammonium mais elles seraient capables de coupler la capacité à dégrader l'urée en ammonium pour ensuite réaliser le processus de nitrification (Alonso-Sáez *et al.*, 2012).

A présent, l'étude des gènes fonctionnels est une méthode extrêmement répandue. Elle permet une meilleure compréhension et une comparaison du fonctionnement biologique des cycles biogéochimiques de nombreux écosystèmes terrestres et marins. Ces approches seront donc utilisées pendant ce travail de thèse en ciblant le cycle de l'azote et les outils seront détaillés dans le §1.3.

1.3 De l'importance d'étudier le cycle de l'azote

1.3.1 Rôle des micro-organismes dans les cycles biogéochimiques

Il existe 6 éléments majeurs pour les être-vivants sur Terre : le Carbone (C), l'Hydrogène (H), l'Azote (N), l'Oxygène (O), le Soufre (S) et le Phosphore (P). Ces six éléments ont chacun un cycle biogéochimique qui leur est propre mais qui sont tous interconnectés. Ces cycles dépendent de réactions 1) géochimiques abiotiques : qui sont des transferts de protons (les électrons ne sont pas impliqués dans ce cas) et 2) biochimiques : qui sont des réactions d'oxydo-réduction correspondant à des transferts d'électrons et de protons provenant d'éléments chimiques (Falkowski *et al.*, 2008).

Les réactions biologiques ont un rôle prépondérant dans les cycles biogéochimiques et les micro-organismes en sont les principaux acteurs. En effet, via leur métabolisme, les micro-organismes consomment des composés, en produisent, et/ou minéralisent la matière organique détritique. Notamment, le catabolisme via des flux d'électrons, réduit des composés pour produire de l'énergie et former de nouveaux produits (Bertrand *et al.*, 2011) (**Figure 7**).

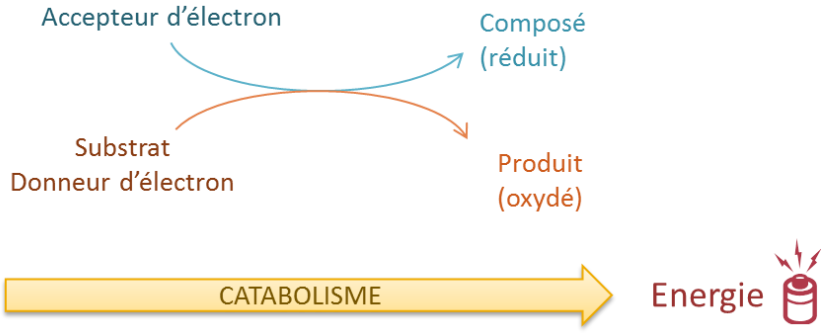


Figure 7. Le catabolisme chez les procaryotes, selon Bertrand *et al.* (2011).

Ces réactions impliquent l'intervention d'enzymes. Les enzymes sont des protéines qui catalysent des transformations biochimiques. Leur synthèse est codée par un gène parmi le génome procaryote. La transcription de ce gène génère tout d'abord une certaine quantité d'ARN messagers (ARNm, **Figure 8**). Puis cet ARNm est traduit par le ribosome qui synthétise une chaîne d'acides aminés (ou protéine). L'enzyme alors produite peut être intracellulaire dans le cytoplasme, membranaire ou extracellulaire. Quel que soit son devenir, son fonctionnement reste identique, une enzyme transforme un substrat pour former un nouveau produit (**Figure 8**).

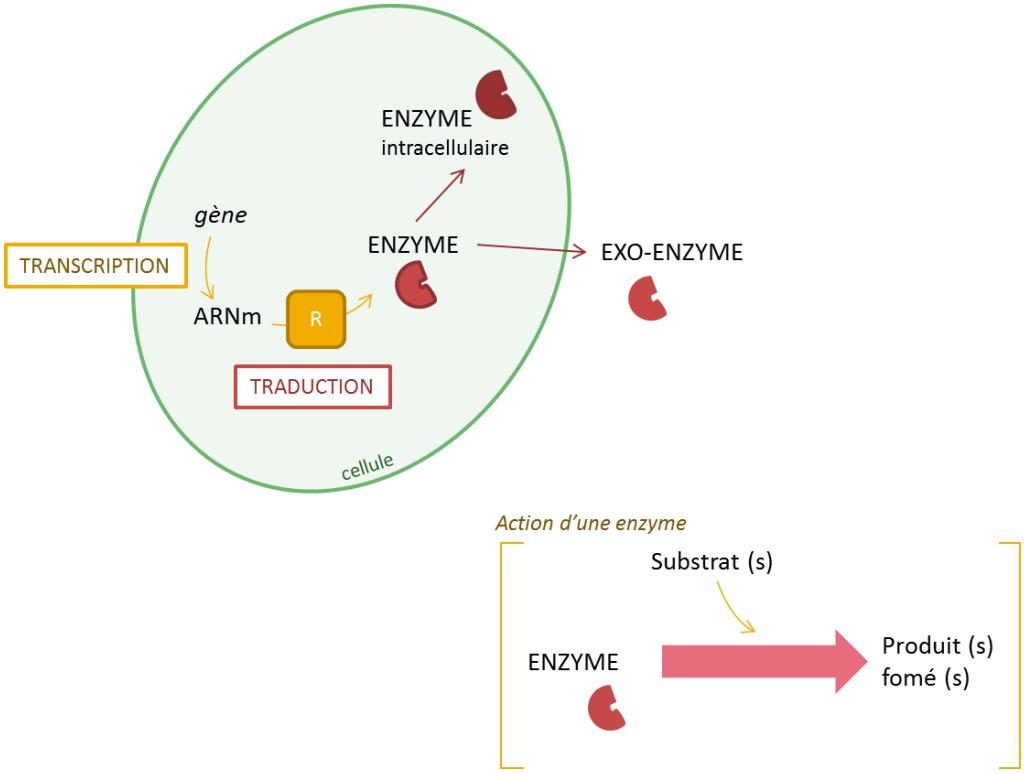


Figure 8. Représentation schématique de la production et de l'action des enzymes dans les cycles biogéochimiques. Un gène est transcrit en réponse à un signal en ARN messager (ARNm) qui est traduit dans le ribosome (R), synthétisant ainsi l'enzyme. Une enzyme transforme un substrat en un nouveau produit formé.

La présence et/ou l'activité d'une enzyme sont indicateurs du potentiel d'une transformation biochimique. Cet outil s'avère indispensable à l'étude des cycles biogéochimiques et peut être appréhendé de diverses façons.

La concentration d'une enzyme peut être évaluée par marquage immunologique à l'aide d'anticorps. Cette technique est largement utilisée mais peut manquer de spécificité dans le cas d'études dans des sédiments riches en protéines. Par ailleurs, l'activité d'une enzyme peut être directement mesurée par ajout du substrat puis dosage en spectrofluorimétrie du produit formé. Néanmoins, les nombreux mécanismes de régulation des enzymes sont à prendre en compte. En effet, des systèmes de régulations contrôlent l'activité ou la concentration en enzyme dans les cellules procaryotes (Madigan *et al.*, 2010) :

- **régulation de la quantité d'enzyme produite** : cette régulation est pre-transcriptionnelle. Une molécule inhibe ou active l'action de l'ARN polymérase, bloquant ou stimulant ainsi la transcription du gène. L'initiation de la polymérase diffère entre bactéries et archées ;
- **régulation au niveau de l'activité** :
    - rétro-inhibition : lorsque le produit formé est en excès, celui-ci se fixe sur le site *allostérique* (par opposition au site *actif* réservé au substrat) de l'enzyme ce qui modifie la conformation de la protéine et empêche la fixation du substrat sur le site *actif* de l'enzyme
    - isoenzymes : la même réaction est catalysée par plusieurs enzymes différentes qui sont régulées par rétro-inhibition
    - modifications covalentes : adhésion d'une petite molécule qui modifie la conformation de l'enzyme et la rend inactive.

La méthode de mesure d'activité de l'enzyme nécessite donc de savoir comment cette activité est régulée pour interpréter au mieux les résultats. Enfin, d'après Madigan *et al.* (2010), chez les procaryotes, les ARNm sont transcrits en réponse à un signal et ne sont pas ou peu stockés dans la cellule par opposition aux cellules eucaryotes. Cette propriété offrirait ainsi la possibilité d'estimer la concentration d'une enzyme, voire son activité par la quantification de l'abondance ou l'expression d'un gène cible via des techniques de biologie moléculaire. Ces techniques de biologie moléculaire s'appuient sur le mécanisme de synthèse des enzymes détaillé précédemment. Une enzyme est synthétisée à partir d'un ARNm qui est transcrit d'un gène qui code l'enzyme. Ainsi, la quantification d'un gène permet d'évaluer le potentiel de

production d'une enzyme. De même, la quantification du nombre de transcrits d'un gène (ARNm) peut être utilisé pour quantifier l'activité de l'enzyme et donc la réaction que catalyse l'enzyme. Ces concepts restent néanmoins à nuancer pour plusieurs raisons soulignées par Blazewicz *et al.* (2013). Ces auteurs suggèrent de considérer la quantification de l'expression des gènes comme un potentiel de production de l'enzyme ciblé, et non comme une activité certaine de cette enzyme, car les cellules de procaryotes entrant en dormance (**Figure 9**) seraient capable d'exprimer des gènes et de produire des ARNm en prévision du retour à l'état actif (Blazewicz *et al.*, 2013). Ainsi, dans ce travail, l'abondance des gènes fonctionnels sera considérée comme une capacité fonctionnelle du pool d'organisme considéré, à interpréter si possible avec des concentrations en nutriments associés. L'expression des gènes sera interprétée comme le potentiel de production de l'enzyme qui peut être active, si les conditions et les concentrations en nutriments sont cohérentes.

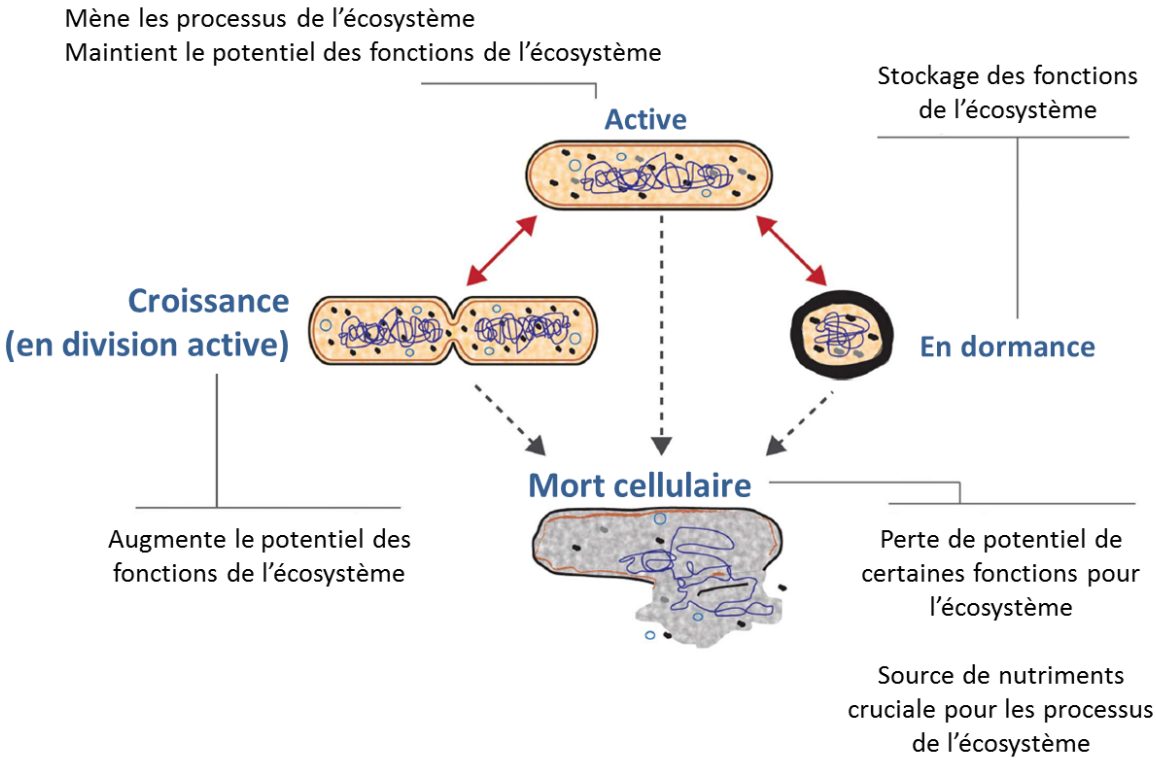


Figure 9. Etats métabolique des procaryotes (ex des bactéries) et leurs apports dans le fonctionnement de l'écosystème. Une cellule active est métaboliquement active mais n'est pas forcément en division, une cellule en dormance n'est ni en division ni métaboliquement active, selon Blazewicz *et al.* (2013).

1.3.2 L'étude du cycle de l'azote dans les sédiments marins

L'azote est un élément essentiel au développement de la vie puisqu'il est le composant principal des protéines et des acides nucléiques (Gruber and Galloway, 2008). Les micro-organismes l'utilisent comme donneur ou accepteur d'électrons ce qui renforce son rôle central dans les processus biogéochimiques.

L'azote reste considéré comme limitant pour la production primaire indispensable à tout le réseau trophique océanique (Falkowski *et al.*, 1998; Capone, 2000; Thamdrup and Dalsgaard, 2008). Le cycle de l'azote est caractérisé par deux processus majeurs s'opposant (**Figure 10**) : la nitrification et la dénitrification. Le premier se réalise en présence d'oxygène et correspond à une oxydation de l'ammonium en nitrates, le second est un processus réalisé en absence d'oxygène réduisant les nitrates en gaz : N_2O ou N_2 (**Figure 10**). Des études recensent à présent d'autres processus qui peuvent devenir majoritaires dans certains écosystèmes, notamment, l'oxydation anaérobie de l'ammonium (anammox) ou la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium (RDNA) (**Figure 10**).

Ce cycle dépend largement des conditions oxiques de l'écosystème considéré. Ainsi, en conditions oxiques, le processus de nitrification consomme fortement l'ammonium alors que ce dernier tend à s'accumuler dans les zones dépourvues en oxygène (Ward *et al.*, 2011). Dans les sédiments cohésifs, la couche oxique est très fine (Brotas *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1993) et la macrofaune crée des micro-niches oxygénées dans les zones anoxiques (Laverock *et al.*, 2011). Les sédiments cohésifs sont donc pourvus de micro-habitats propices à la coexistence de processus aérobies et anaérobies. Dans le cas du cycle de l'azote, ces micro-niches sont le siège d'un couplage nitrification-dénitrification intense (Laverock *et al.*, 2011).

La suite de cette partie détaillera ces réactions et les marqueurs moléculaires associés. Les voies métaboliques ainsi que les marqueurs utilisés jusqu'alors peuvent parfois être critiquables et la communauté scientifique reste encore très prudente sur les concepts utilisés. Notre savoir grandit mais de nombreuses voies métaboliques liées au cycle de l'azote restent inconnues ou peu comprises encore de nos jours. Ceci oblige donc à être prudent sur certains concepts et certaines réactions seront abordées avec beaucoup de précautions.

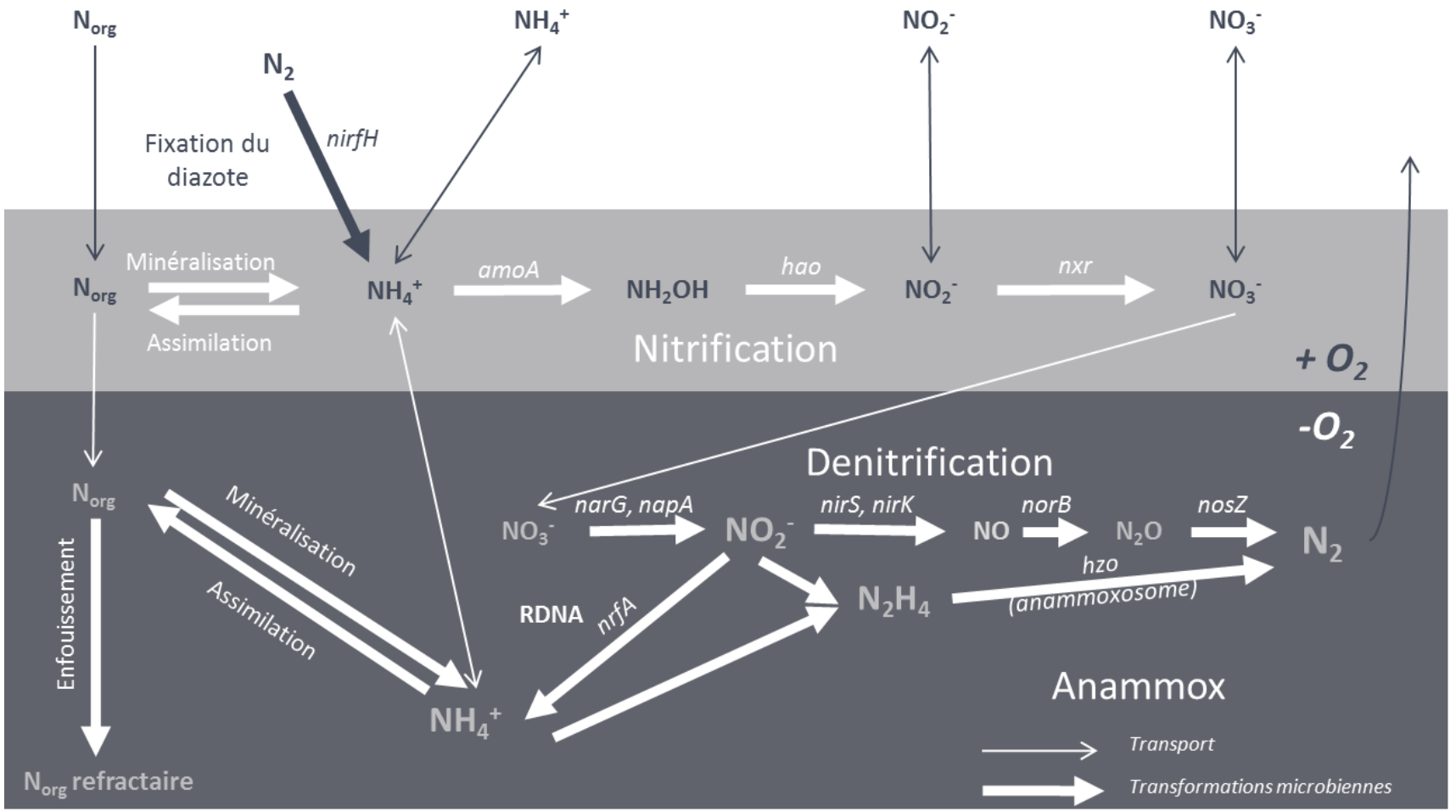


Figure 10. Schéma général du cycle de l'azote dans les sédiments marins, les gènes (connus) codant les enzymes impliqués dans la réaction sont indiqués en italique. D'après Arrigo (2005), Francis *et al.* (2007), Thamdrup and Dalsgaard (2008), et Jetten *et al.* (2009).

Table 3. Enzymes majeurs impliqués dans le cycle de l'azote et détails des réactions qu'elles catalysent, issu de Jetten *et al.* (2009).

Processus/ enzyme	Réaction			Localisation
Nitrification				
Ammonia monooxygénase	$NH_4^+ + O_2 + H^+ + 2e^-$	AMO →	$NH_2OH + H_2O$	transmembranaire
Hydroxylamine oxydoréductase	$NH_2OH + H_2O$	HAO →	$NO_2^- + 5H^+ + 4e^-$	périplasme
Nitratification/anammox				
Nitrite oxydoréductase	$NO_2^- + H_2O$	NXR →	$NO_3^- + 2\ H^+ + 2\ e^-$	associé à la membrane
Hydrazine hydrolase	$NH_4^+ + NO + 2H^+ + 3e-$	HH →	$N_2H_4 + H_2O$	anammoxosome
Hydrazine oxydoréductase	N_2H_4	HZO →	$N_2 + 4H^+ + 4e^-$	anammoxosome
Denitrification & RDNA				
Nitrate réductase	$NO_3^- + 2H^+ + 2e^-$	NAR/NAP →	NO2- + H2O	associé à la membrane, périplasme ou cytoplasme
Nitrite réductase	$NO_2^- + 2\ H^+ + 2e^-$	NIR →	$NO + H_2O$	périplasme
Oxyde nitrique réductase	$2NO + 2H^+ + 2e^-$	NOR →	$N_2O + H_2O$	transmembranaire
Oxyde nitreux réductase	$N_2O + 2H^+ + 2\ e^-$	NOS →	$N_2 + H_2O$	périplasme
Réductase dissimilatrice des nitrites	$NO_2^- + 8H^+ + 6e^-$	NRF →	$NH_4^+ + 2H_2O$	*

***** reporté à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane cytoplasmique

Encart méthodologique 3. L'utilisation croissante de la biologie moléculaire et de l'utilisation des gènes fonctionnels comme marqueurs moléculaires

Le nombre de publications scientifiques traitant du cycle de l'azote en milieu marin a été multiplié par 5 entre 1995 et 1996. Depuis, cet intérêt n'a cessé d'augmenté et le nombre de documents traitant du cycle de l'azote en milieu marin atteint à l'heure actuelle 5582 documents. Parmi ceux-ci, 2870 documents sont des articles traitant des sédiments en milieu marin. Ainsi, en 2013, 325 documents s'intéressant au cycle de l'azote en milieu benthique marin ont été publiés (source : Scopus®, Elseiver B.V., Oxford, R.U., au 28 Septembre 2014).

Au sein de ces articles, l'utilisation de la biologie moléculaire et de pair, celle des gènes fonctionnels augmente largement. En 2012, 42% des publications traitant du cycle de l'azote dans les sédiments marins utilisaient la biologie moléculaire.

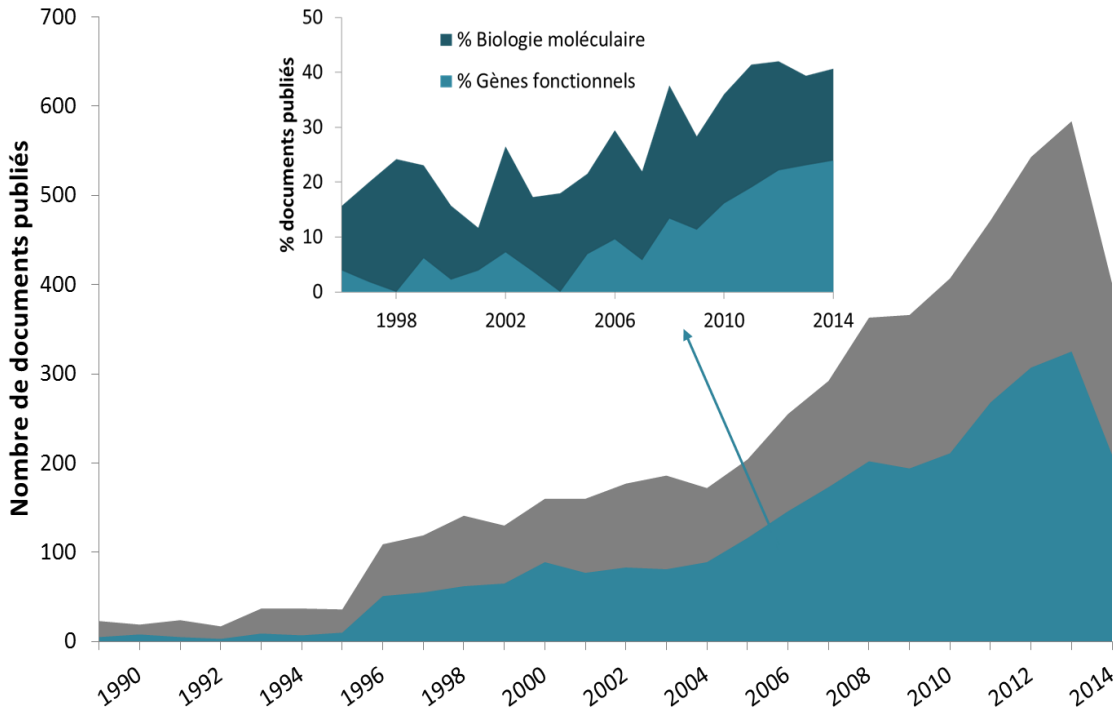


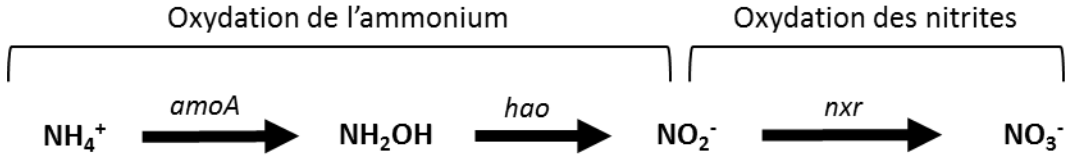
Figure 11. Evolution du nombre de documents scientifiques publiés ayant attrait au cycle de l'azote dans les milieux marins et pourcentage de documents traitant du cycle de l'azote dans les sédiments marins utilisant la biologie moléculaire ou les gènes fonctionnels (source : Scopus®, Elseiver B.V., Oxford, R.U., au 28 Septembre 2014).

1.3.2.1 Fixation du diazote

Le diazote est un élément clé sur Terre représentant 78% de l'air que l'on respire. Mais ce gaz n'est pas utilisable pour la plupart des organismes vivants. La fixation du diazote est le seul processus biologique permettant de rendre l'azote atmosphérique (sous forme de diazote (N_2)) disponible pour les organismes vivants sous forme d'ammonium (NH_4^+) (Mahaffey *et al.*, 2005; Gruber and Galloway, 2008). Ce processus anabolique (produit une nouvelle molécule en consommant de l'énergie, par opposition au catabolisme) est réalisé uniquement par des micro-organismes dits diazotrophes qui peuvent être des cyanobactéries, des protéobactéries (notamment *Rhodobacter capsulatus*) ou des archées (Young, 1992; Zumft, 1997). Cette réaction est catalysée par des nitrogénases (*nifH*) qui sont des enzymes inhibées en présence de dioxygène (Jetten, 2008). De plus, cette réaction est très couteuse en énergie (20 à 30 ATP), ce qui rend l'assimilation directe des nitrates et de l'ammonium préférentiellement choisie par les organismes (Bertrand *et al.*, 2011). De ce fait, la fixation du diazote est fortement influencée par les conditions environnementales qui déterminent la présence/absence d'oxygène, de nitrates ou d'ammonium.

1.3.2.2 Nitrification

La nitrification ou oxydation de l'ammonium en nitrites puis en nitrates est un processus aérobie divisé en deux grandes étapes (You *et al.*, 2009) et catalysé par trois enzymes codées par trois gènes différents :



1.3.2.2.1 L'oxydation de l'ammonium

La première étape, l'oxydation de l'ammonium est la plus étudiée jusqu'alors. Elle est réalisée par des organismes chimiolitho-autotrophes puisque l'énergie apportée par l'oxydation de l'ammonium est utilisée pour la réduction du dioxyde de carbone. Les bactéries oxydant l'ammonium dites «*ammonia oxidizing bacteria*» (AOB) sont représentées par les β-(*Nitrosomonas* et *Nitrospira*) et γ-protéobactéries (*Nitrosococcus*). Ce processus d'oxydation de l'ammonium a longtemps été considéré comme une réaction uniquement réalisée par les bactéries jusqu'à la découverte d'un gène homologue codant l'ammonia monooxygenase

(AMO) chez les archées et la confirmation via des mesures de terrain que des nitrifiants autres que les protéobactéries interviennent (Brochier-Armanet *et al.*, 2011; Pester *et al.*, 2011). Ces archées oxydant l'ammonium en conditions aérobies ou AOA seraient également, plus compétitives dans des environnements où l'oxygène est rare car elles oxydent l'ammonium (NH_4^+) en nitroxyl (HNO) et non en hydroxylamine (NH_2OH) comme les bactéries. Cette réaction demanderait moins d'oxygène et donc les rendrait plus compétitives lorsque l'oxygène est rare (Schleper and Nicol, 2010). De plus, certaines AOA affiliées au groupe phylogénétique des « *Marine Group I* » (MGI) auraient la capacité d'utiliser l'ammonium produit lors de la dégradation de l'urée pour réaliser la réaction de nitrification (Alonso-Sáez *et al.*, 2012).

Par ailleurs, il est connu que les AOB présentent des gènes codant pour des enzymes impliqués plutôt dans la dénitrification comme les nitrites réductases (abordées dans le paragraphe suivant). Récemment, Kozlowski *et al.* (2014) ont montré que le gène *nirK* communément utilisé comme marqueur génétique de la dénitrification serait exprimé par une AOB *Nitrosomonas europea* ATCC 19718 capable de dénitrification aérobie.

De nombreuses études ont recensé le ratio AOB/AOA afin de caractériser les communautés nitrifiantes (Francis *et al.*, 2003; Bernhard *et al.*, 2005; Santoro *et al.*, 2006; Bernhard *et al.*, 2007; Caffrey *et al.*, 2007; Santoro *et al.*, 2008; Bernhard *et al.*, 2010). Ces communautés seraient très dépendantes des écosystèmes étudiés et il est encore difficile à l'heure actuelle d'émettre des conclusions quant à leur distribution dans l'environnement marin.

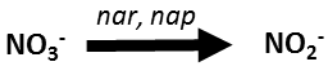
1.3.2.2.2 L'oxydation des nitrites

Ce processus est réalisé par les organismes nitratants dits « *nitrites oxidizing bacteria* » ou NOB. Cette réaction se déroule dans le cytoplasme des cellules et est catalysée par l'enzyme nitrite oxydoreductase (NXR) associée à la membrane. Parmi les groupes connus capables de catalyser cette réaction, on retrouve les espèces des genres (Daims *et al.*, 2011):

- *Nitrospina* (δ-protéobactérie),
- *Nitrosococcus* (γ-protéobactérie),
- *Nitrobacter* (α-protéobactérie),
- *Nitrospira* (Nitrospirae, dominant dans les écosystèmes étudiés jusqu'alors, (Starkenburg *et al.*, 2011))
- *Nitrotoga* (β-protéobactérie)

Nitrobacter pourrait également exprimer le gène *nirK* en cas de faibles teneurs en oxygène dans l'environnement (Starkenburg *et al.*, 2008).

1.3.2.3 Réduction du nitrate en nitrite



Cette réaction est catalysée par des nitrates réductases (NAP = localisé dans le périplasme[3] ou NAR lié à la membrane), elle est commune à deux processus anaérobies dans le cycle de l'azote : la dénitrification (§1.3.2.4) et la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium (§1.3.2.5). De ce fait, cette réaction est largement répandue chez de nombreux organismes, mais une étude réalisée dans l'estuaire de Colne a montré qu'elle était majoritairement réalisée par des α-, β-, et γ-protéobactéries (Smith *et al.*, 2007). Ce processus peut être extrêmement important dans les estuaires (Papaspyrou *et al.*, 2014), en particulier dans la zone en amont de l'embouchure (Smith *et al.*, 2007).

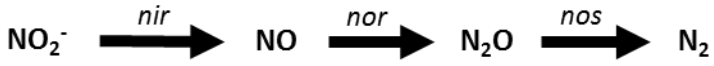
[3]le périplasme ou espace périplasmique correspond à l'espace entre la membrane externe et la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram-

1.3.2.4 Dénitrification

La dénitrification, la réduction anaérobie des nitrates et/ou des nitrites en oxyde nitrique et/ou diazote (Philippot, 2002), est considérée comme une perte d'azote pour le système puisque le diazote produit n'est plus disponible pour les organismes vivants. Ce processus est à l'origine de l'émission de 240 Tg N par an de diazote dans les océans (Gruber and Galloway, 2008). Dans les sédiments côtiers marins, le taux de dénitrification varie entre 50 et 250 µmol N m^{-2} h^{-1} et représente l'élimination de 20 à 50% de l'azote apporté dans ces écosystèmes (Seitzinger, 1988).

La dénitrification est un processus très répandu réalisé dans des zones pauvres en oxygène à anoxiques. Parmi, les procaryotes, les organismes dénitrifiants sont: chez les archées, les groupes *Haloarcula, Halobacterium* et *Haloferax* et chez les bactéries : *Rhizobium, Paracoccus, Alcaligenes, Neisseria, Pseudomonas, Bacillus, Thiobacillus, Thiosphaera, Nitrobacter* et *Nitrosomas* (Zumft, 1992; Bertrand *et al.*, 2011). Ce processus est également rencontré chez des eucaryotes tels que les foraminifères (Risgaard-Petersen *et al.*, 2006; Glud *et al.*, 2009).

Quatre étapes composent ce mécanisme et 3 groupes de gènes ont pu ainsi être identifiés :



Tous ces gènes sont largement étudiés dans la littérature (Philippot, 2002), les plus utilisés pour l'étude des processus de dénitrifications sont les gènes *nir* et *nos* notamment les *nirS/nirK* et *nosZ*. Les deux gènes *nir* correspondent à deux types de nitrite réductase structuralement différentes : *nirS* code une nitrite réductase à cytochrome cd1 et *nirK* code une nitrite réductase à cuivre (Philippot, 2002; Zhang *et al.*, 2013).

1.3.2.5 RDNA

La réduction dissimilatrice des nitrites en ammonium (RDNA) est un processus transformant directement les nitrites en ammonium via une nitrite réductase portant un cytochrome *c* (**Figure 12**). Aussi appelée ammonification du nitrate, cette réaction peut être respiratoire ou fermentative et il semblerait que la RDNA fermentative soit la plus répandue (Burgin and Hamilton, 2007).

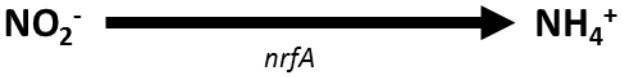


Figure 12. Réaction de réduction dissimilatrice des nitrites en ammonium (RDNA), selon Giblin *et al.* (2013)

De nombreuses espèces réalisent la RDNA parmi lesquelles : *Clostridia*, *Desulfovibrio*, *Vibrio*, et *Pseudomonas* (Tiedje, 1988). Le marqueur moléculaire de référence est le gène *nrfA* codant la seule enzyme (nitrite réductase) catalysant la réaction (Mohan *et al.*, 2004). Les données varient beaucoup puisque différentes études montrent que la RDNA peut être à l'origine de l'élimination de 0 à 90 % des nitrates dans les sédiments côtiers (Megonigal *et al.*, 2005; Burgin and Hamilton, 2007).

La RDNA pourrait être présente chez les bactéries oxydant l'ammonium en anaérobie (anammox, voir paragraphe suivant) afin de transformer une partie des nitrites en ammonium lors d'une limitation en ammonium et de réaliser la réaction d'anammox (Kartal *et al.*, 2007). De plus, un gène *nosZ* atypique pourrait être impliqué dans la RDNA (Sanford *et al.*, 2012).

1.3.2.6 Anammox

La réaction d'anammox ou oxydation anaérobie de l'ammonium, combine les nitrites (accepteur d'électron) et l'ammonium (donneur d'électrons) pour produire du diazote (Mulder *et al.*, 1995). Ce mécanisme suspecté depuis de nombreuses années (Richards, 1965) a été confirmé par la description de bactéries capables d'oxyder l'ammonium en conditions anaérobies par Strous *et al.* (1999).

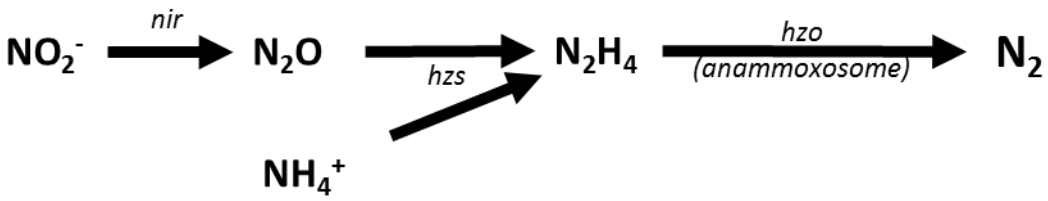


Figure 13. Réactions enzymatiques menant à l'oxydation anaérobie du nitrite et de l'ammonium en diazote (anammox). D'après Kartal *et al.* (2011), Ryabenko (2013) et Jetten *et al.* (2009).

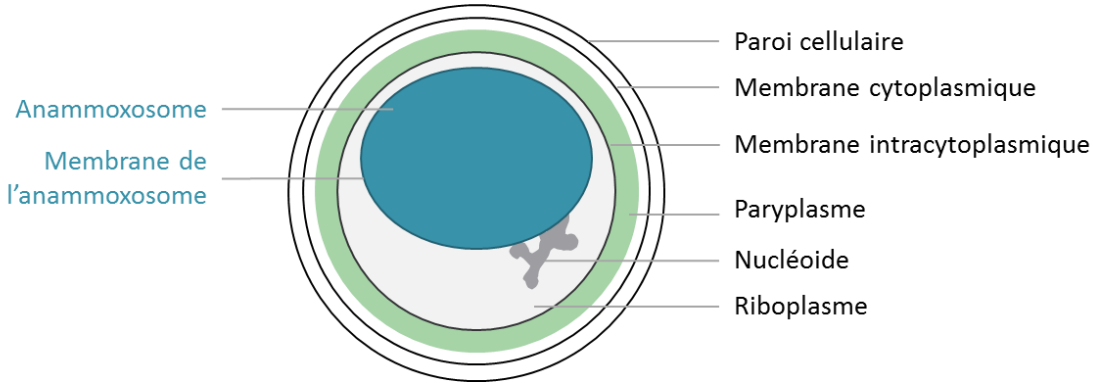


Figure 14. Morphologie des cellules réalisant l'anammox, selon Jetten *et al.* (2009) et Ryabenko (2013).

Ce mécanisme est pour l'instant connu uniquement chez les bactéries du phylum des *Planctomycetes*, ordre Planctomycetales et famille Planctomycetaceae (Kuenen, 2008; Ward *et al.*, 2011) : *Kuenenia*, *Brocadia*, *Jettenia*, *Scalindua*, et *Anammoxoglobus*. Ce sont des bactéries considérées comme chimiolitho-autotrophes anaérobies (Mulder *et al.*, 1995; Strous *et al.*, 1999) mais pouvant être relativement polyvalentes (Jetten *et al.*, 2009). Celles-ci possèdent un anammoxosome dans leur cellule (van Niftrik *et al.*, 2004) dont les lipides membranaires, les laddéranes (acides cyclobutyliques), permettraient la réaction d'anammox (Sinninghe Damste *et al.*, 2002). Ces lipides ont une structure unique dans le monde du vivant et leur présence dans un échantillon est utilisée comme marqueur du potentiel d'anammox (Jetten *et al.*, 2009). Par ailleurs, le gène (*hzo*) codant l'enzyme hydrazine oxydoréductase (HZO) et/ou le gène de l'hydrazine synthétase (HZS, *hzsA*) (Bale *et al.*, 2014) sont également des proxy permettant de quantifier la réaction d'anammox (Schmid *et al.*, 2008). Alternativement, le gène le plus ciblé dans la littérature reste une partie du gène de l'ARNr 16S, spécifique aux *Planctomycetes* (Jetten *et al.*, 2009).

Encart méthodologique 4. Le choix des marqueurs moléculaires pour cibler le cycle de l'azote dans les sédiments côtiers vaseux

Dans ce travail de thèse, des choix ont été faits concernant la quantification des processus liés au cycle de l'azote. Les processus majoritaires et les plus étudiés sont la nitrification et la dénitrification. Depuis environ 10 ans, les articles utilisant les gènes fonctionnels comme indicateurs du potentiel génétique des communautés à réaliser certains processus dans le cycle de l'azote se multiplient (Philippot, 2002; Francis *et al.*, 2007). Le choix a été fait en fonction des études disponibles afin d'obtenir des points de comparaisons. Afin de quantifier le potentiel de nitrification, le gène *amoA* codant l'enzyme responsable de l'oxydation de l'ammonium est le plus cité et a donc été retenu pour nos travaux (Francis *et al.*, 2003; Caffrey *et al.*, 2007; Agogué *et al.*, 2008; Abell *et al.*, 2010; Dang *et al.*, 2010b; Mussmann *et al.*, 2011; Beman *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014b). Concernant le proxy de la dénitrification, le couple *nirS/nirK* fait partie des indicateurs les plus utilisés. Mais, comme exposé précédemment, des études récentes révèlent la présence de *nirK* chez des espèces nitrifiantes remettant en question la robustesse de ce marqueur. Ainsi, l'étude du couple de gènes est renforcé par un troisième: le gène *nosZ* codant l'enzyme catalysant la dernière étape de la dénitrification connu pour être absent chez certains organismes (Braker *et al.*, 2012). Enfin, une troisième réaction a été ciblée : la réaction d'anammox qui a été recensée dans différents sédiments (Dale *et al.*, 2009; Minjeaud *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2012a).

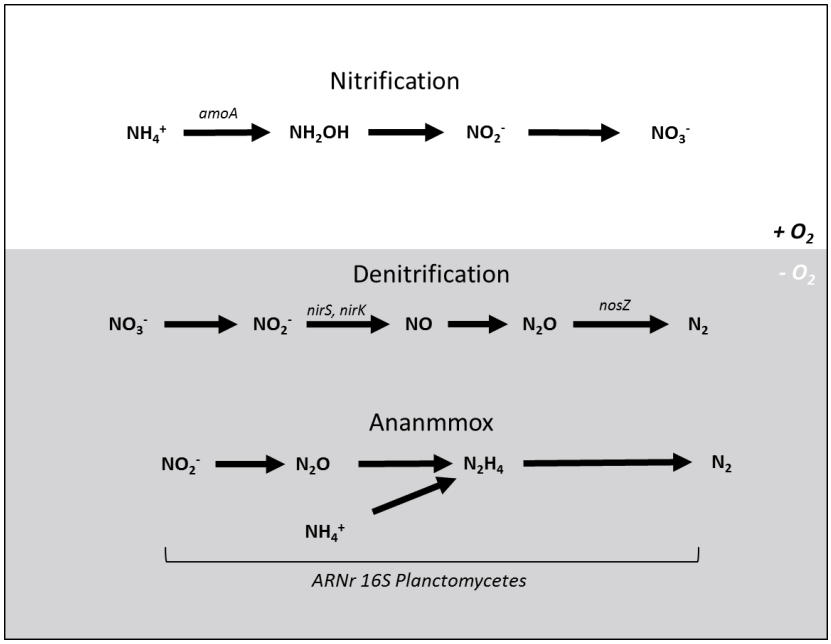


Figure 15. Bilan des réactions liées au cycle de l'azote ciblées par la quantification de gènes fonctionnels dans ce travail.

1.4 Contexte général et objectifs scientifiques

Les zones côtières sont des mosaïques d'écosystèmes très impactés par les activités anthropiques et il devient primordial de comprendre leur fonctionnement, afin de décrire l'impact des perturbations naturelles et humaines sur le milieu marin.

Le littoral charentais est constitué de divers écosystèmes interconnectés rendant de nombreux services économiques et écologiques. En particulier, les Pertuis Charentais sont le siège d'une aquaculture intense (Heral *et al.*, 1986; Prou and Héral, 1998) rendu en partie possible grâce à la présence de vasières intertidales nues. A la surface de ces vasières, se développe un biofilm, une couche brune correspondant à l'accumulation de MPB. Ces micro-algues sont à la base des réseaux trophiques, elles peuvent être remises en suspension dans la colonne d'eau et alimenter les huîtres permettant donc le maintenir le développement de l'aquaculture dans cette zone. Suite aux avancées scientifiques réalisées grâce à divers projets de recherche (ex : ANR blanche VASIREMI 2006-2010), de nouvelles questions apparaissent.

La disponibilité des nutriments souvent limitante pour les microalgues, peut être contrôlée par de plus petits organismes, **les procaryotes (bactéries et archées)**. Ces procaryotes sont présents partout sur Terre et ont pour rôle majeur de reminéraliser la matière organique rendant les nutriments à nouveau disponibles pour tous les êtres-vivants. Via ce rôle de **reminéralisation**, les procaryotes sont des acteurs clés dans tous les réseaux trophiques. Dans les vasières intertidales, ceux-ci sont connus pour être très diversifiés, abondants et actifs (Heip *et al.*, 1995). Ils ont un rôle fort dans le cycle de l'azote qui est souvent l'élément limitant la production primaire dans le milieu marin (Thamdrup and Dalsgaard, 2008). Comme de nombreux cycles biogéochimiques, le **cycle de l'azote** représente les transformations de la matière azotée qui peut être réalisée par voie géologique, chimique ou biologique. La composante biologique est majoritaire dans ce cycle et les principaux acteurs sont les procaryotes. Les processus de ce cycle sont dépendants des conditions d'oxydo-réduction et donc les réactions seront différentes selon la quantité d'oxygène et de substrat disponible. Dans les **sédiments marins**, il existe un fort gradient d'oxygène souvent perturbé par la macrofaune benthique creusant des galeries et apportant de l'oxygène en profondeur. Ainsi, le cycle de l'azote dans les sédiments serait très important et dynamique du fait d'un gradient d'oxygène et d'apports en éléments azotés très importants (Gruber and Galloway, 2008; Thamdrup and Dalsgaard, 2008). De nombreux groupes bactériens et archéens seraient

impliqués dans le cycle de l'azote dans les sédiments et leurs capacités sont très étudiées mais leur activité et leurs interactions *in situ* sont encore peu connues.

Ainsi, il apparaît indispensable d'apporter des éléments de réponse concernant le rôle des procaryotes liés au cycle de l'azote dans les vasières intertidales.

Ce travail de thèse vise à étudier les communautés de procaryotes benthiques selon différentes échelles temporelles et spatiales régies par la présence du **microphytobenthos en surface.** Ces algues ont besoin de lumière pour réaliser la photosynthèse indispensable à leur développement. Pour cela, dans les vasières intertidales, elles peuvent migrer à la surface du sédiment au sein du premier cm (Blanchard *et al.*, 2001; Consalvey *et al.*, 2004) à marée basse et s'enfouir lorsque la marée remonte. Ainsi, les algues vont structurer le sédiment 1) via la production primaire en consommant du dioxyde de carbone (CO_2) et produisant de l'oxygène (O_2) et des molécules organiques (**substances exopolymériques, EPS**), 2) via leur migration et 3) via l'assimilation de nutriments notamment de **nutriments azotés.** Afin de comprendre le fonctionnement des communautés de procaryotes dans un écosystème structuré par la présence de microphytobenthos en surface, il est important de comprendre les processus à différentes échelles (**Figure 16**) :

- **Saisonnières** : changement de biomasse algale (Partie 2)
- **Au cours d'une marée basse :** au cours d'un cycle de marée ascendante puis descendante (Partie 2 et 3)
- **Jour / Nuit** : avec et sans production primaire (Partie 3)

Une seule échelle spatiale sera abordée : la verticalité du sédiment de 0 à 10 cm découpée en 5 profondeurs choisies pour rendre compte de la stratification fine présente dans les sédiments cohésifs :

- P1 : 0-0,5 cm
- P2 : 0,5-1 cm
- P3 : 1-2 cm
- P4 : 2-5 cm
- P5 : 5-10 cm

La vasière est un écosystème complexe et afin de mieux comprendre son fonctionnement, sa simplification est nécessaire. En sciences, simplifier le système est une pratique courante qui se réalise en laboratoire sous conditions contrôlées. Le choix s'est porté pour cette thèse de réaliser un dispositif expérimental sous conditions semi-contrôlées recréant l'écosystème

vasière en laboratoire (Partie 3). Dans le cas de notre étude, les bioturbateurs ont été éliminés et la durée du cycle tidal et la lumière ont été régulées. Ainsi, ce dispositif a permis une étude précieuse sur les processus se réalisant de jour et de nuit au cours d'une marée basse ce qui n'est pas possible via des mesures *in situ*.

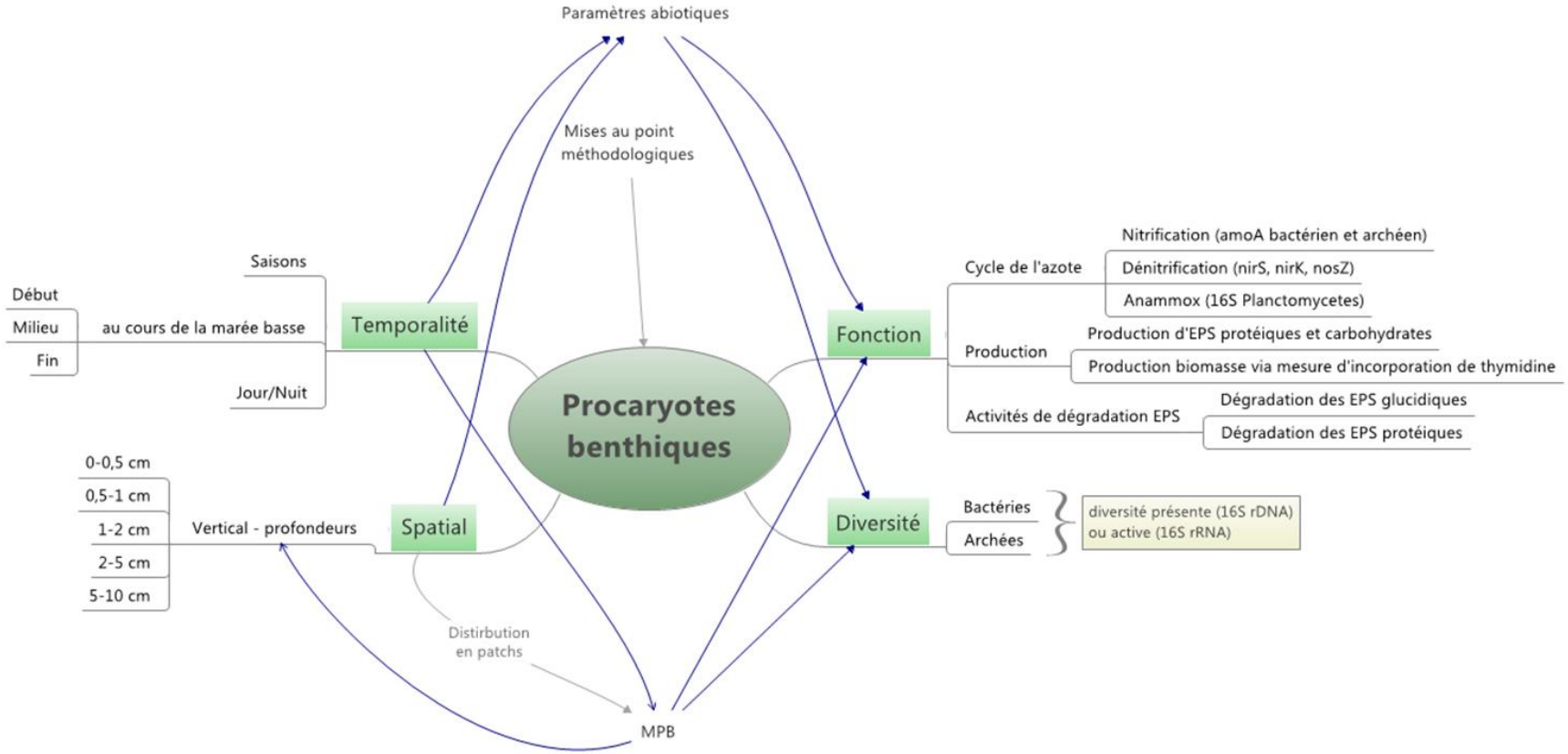


Figure 16. Conceptualisation des objectifs et des démarches conduites pendant ce travail

1.5 Déroulement du manuscrit

Ce manuscrit est construit sur la base d'études rédigées en français ou en anglais où chaque étude est un chapitre. Les articles rédigés en anglais, sont introduits et conclu en français. Ces chapitres s'articulent en 3 parties :

- Partie 1 : Développement d'outils indispensables à l'analyse des sédiments
- Partie 2 : Fonctionnement des communautés procaryotes dans une vasière intertidale : entre saisonnalité et profondeur
- Partie 3 : Simplifier pour mieux comprendre, influence d'un cycle jour/nuit sur les communautés de procaryotes benthiques

1.5.1 Articles scientifiques acceptés :

Lavergne, C., Beaugeard, L., Dupuy, C., Courties, C., and Agogué, H. (2014) An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. *J Microbiol Methods* **105**: 31-38. (IF: 2,16)

1.5.2 Articles scientifiques à soumettre :

Lavergne Céline, Agogué Hélène, Leynaert Aude, Raimonet Mélanie, Pineau Philippe, Bréret Martine, Lachaussée Nicolas, Dupuy Christine (en préparation) Sediment depth-related variations in prokaryotes communities activity with different weather conditions in an intertidal mudflat (Chapitre 1, Partie 2).

Lavergne C., Dupuy C., Hugoni M., Agogué H. (en préparation) Bacterial and archaeal structure coupled to nitrogen-related functional traits in mudflat highlighted the influence of fine sediment depth stratification (Chapitre 2, Partie 2).

Lavergne C., Agogué H., Dupuy C. (en préparation) Functional role of benthic prokaryotes assumptions for ecological relevance and ecosystem functioning. (Partie 2)

Lavergne C., Dupuy C., Leynaert A., Lavaud J., Chaigneau C., Prineau M., Lachaussée N., Agogué H. (en préparation) Tidal mesocosm allows night sampling of muddy intertidal sediments: what is changing during night emersion periods? (Chapitre 1 & 2, Partie 3)

Lavergne C., Hugoni M., Dupuy C., Debroas D., Agogué H. (en préparation) Active prokaryotic community structure in coastal muddy sediment during day and night emersion. (Chapitre 3, Partie 3).

Partie 1. Développement d'outils indispensables à l'analyse des procaryotes dans les sédiments

Partie 1

Cette partie vise à retranscrire les avancées méthodologiques appliquées aux sédiments vaseux qui ont été nécessaires à ce travail de thèse.

Un premier chapitre décrit les stratégies d'échantillonnages mises en œuvre ainsi que les techniques de prélèvement et de conditionnement des échantillons de sédiment.

Le second chapitre recense les améliorations et/ ou les développements de protocoles appliqués à l'analyse des sédiments. Ce chapitre ne vise pas à décrire les méthodologies adoptées au cours de cette thèse, le détail de chaque protocole est donc présenté sous forme de fiche pratique en annexe.

Enfin, le troisième chapitre présente un article publié dans «*Journal of Microbiological Methods*» exposant le développement d'un protocole de comptage des procaryotes par cytométrie en flux dans des sédiments côtiers.

La mise au point du protocole de comptage des procaryotes par cytométrie en flux a été possible grâce à la forte implication de Laureen Beaugeard. Ce travail a été réalisé en étroite collaboration avec Claude Courties (Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, Banyuls/Mer).

Chapitre 1. Stratégie d'échantillonnage et méthodes de conditionnement 45

1.1 Stratégie d'échantillonnage 46

1.2 L'étape de conditionnement 53

1.3 La mesure des sels nutritifs dans l'eau interstitielle : la méthode des Rhizons 54

Chapitre 2. Développements et applications de techniques d'analyse à des sédiments vaseux 57

2.1 Création de standards pour la quantification de gènes fonctionnels, exemple du gène *nirS* 58

2.2 Procédure de préparation des banques de fragment de gènes de l'ARNr et de l'ADNr 16S bactérien et archéen pour le pyroséquençage haut-débit 65

2.3 Tests d'application d'une technique de marquage par hybridation moléculaire : FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) et CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH) 70

Chapitre 3. Une méthode rapide et efficace pour le comptage des procaryotes hétérotrophes dans les sédiments côtiers par cytométrie en flux 77

3.1 Contexte de l'étude 78

3.2 *An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry* 79

3.3 Conclusions 103

Les problématiques liées au sédiment vaseux

Les sédiments et particulièrement les sédiments vaseux font partie des matrices dites complexes. Elles sont composées de diverses molécules, minéraux ou organismes qui complexifient leur étude et surtout celles des compartiments biologiques qui y vivent. Parmi ceux-ci, le sédiment vaseux côtier présente des propriétés très variables selon la profondeur de prélèvement considérée. En effet, en surface, au niveau du biofilm, l'analyse sera inhibée par la quantité élevée de substances exopolymériques. En profondeur, le sédiment est totalement anoxique ; il est moins concentré en eau interstitielle et riche en matière détritique. Les méthodes développées en microbiologie marine ont, pour beaucoup, été optimisées pour des analyses en milieu aqueux. Ainsi, afin d'analyser des échantillons de sédiment, il est toujours nécessaire d'extraire le compartiment cible de la matrice avant de l'analyser. Cependant, il est souvent difficile de s'affranchir totalement de cette matrice réduisant ainsi la facilité d'acquisition des résultats. Par exemple, l'évaluation des proportions d'archées et de bactéries via des méthodes de marquage à l'aide de sondes oligonucléotidiques demande une observation sur filtres au microscope. Or, le sédiment présente une fluorescence non négligeable et altère le comptage.

Pour l'analyse des sédiments, il est donc nécessaire de connaître l'impact de chaque composant de cette matrice qui peut inhiber son analyse et de réussir à s'en affranchir le plus possible lors de lectures, observations, comptages …etc. La problématique principale sera alors de développer des protocoles d'analyses convenant à la fois aux sédiments de surface et aux sédiments plus profonds.

Chapitre 1. Stratégie d’échantillonnage et méthodes de conditionnement

1.1 Stratégie d'échantillonnage

1.1.1 Le suivi *in situ*

Un suivi saisonnier sur 5 dates a été mené entre le 18 Avril 2012 et le 10 Avril 2013. La vasière de Brouage (N 45° 54', 53; O 01° 05', 23) se situe au Sud de La Rochelle près de la commune de Saint-Froult (**Figure 17**). Cette vasière intertidale nue présente un système de seillons-banquettes et de façon analogue au projet VASIREMI (ANR blanche), les échantillons de sédiments ont été prélevés à marée basse sur les banquettes. Le projet VASIREMI avait préalablement mis en évidence que le biofilm microphytobenthique se développe et arrive à maturation lors des coefficients de marée les plus forts. Lors du déclin des coefficients, le biofilm se déstructure, et le système est totalement modifié. Les campagnes de prélèvements ont donc été programmées aux périodes où le biofilm était le mieux constitué lorsque le taux de production bactérienne est connu pour être maximal (Yallop *et al.*, 2000).

La première campagne a eu lieu du 18 au 22 avril 2012 lors d'une période de coefficients croissants (de 68 soit un marnage de 3,80 m, le 18 avril à 84 soit un marnage de 4,45 m, le 22 avril 2012). Par la suite les prélèvements ont été concentrés sur une journée le 5 juillet 2012 (coefficient = 99, marnage = 5,10 m), le 14 novembre 2012 (coefficient = 104, marnage = 5,75 m), le 11 février 2013 (coefficient = 106, marnage = 5,65 m) et le 10 avril 2013 (coefficient = 94, marnage = 5,00 m). Chaque prélèvement a été réalisé en milieu de marée basse, lorsque le niveau de l'eau est au plus bas. Finalement, les prélèvements effectués lors du mois d'avril 2013 présentent une particularité : la variabilité temporelle à l'échelle de la marée a été appréhendée en prélevant à trois moments de marées (30 minutes après l'émersion (D-Début), 105 minutes (M-Milieu) et 220 minutes après l'émersion (F-Fin) (**Figure 18**).

Le point d'échantillonnage se trouvant à 1 km de la plage, il est donc possible d'y accéder à pied ou en aéroglisseur. Lorsque les échantillons devaient être conditionnés très rapidement, un aéroglisseur a été utilisé (aeroglisseurs.org) (avril 2012 et 2013). Les autres points de prélèvements ont été réalisés à pied.

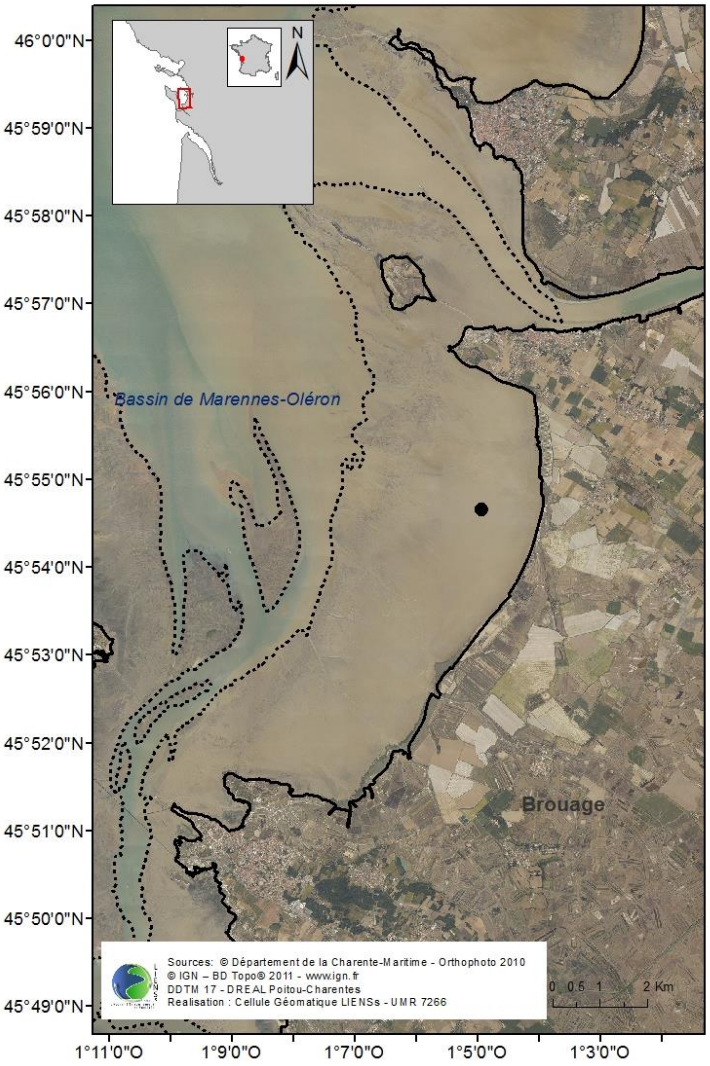


Figure 17. Carte situant la vasière de Brouage et le point d'échantillonnage (●) au Sud de La Rochelle (Charente-Maritime)

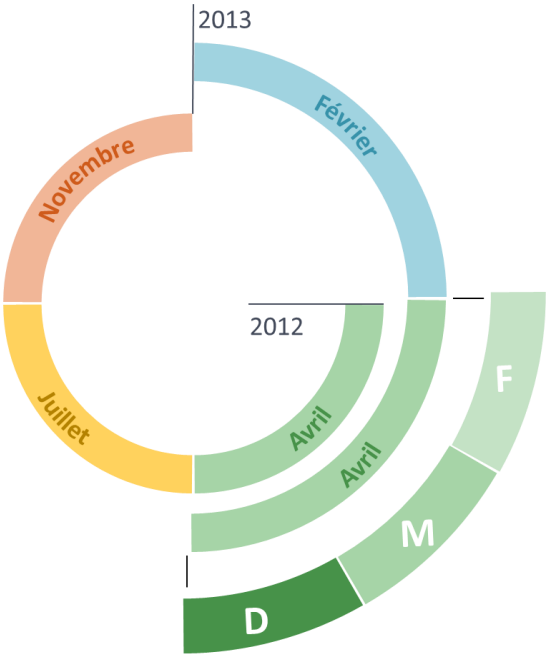


Figure 18. Représentation des périodes de prélèvement concernant ce travail (D = début, M = milieu et F = fin)

1.1.2 L'échantillonnage en vue du développement d'un dispositif *ex situ*

Le 11 avril 2013, 116 L de vase ont été prélevés afin de mettre en place un dispositif expérimental en laboratoire. Les sédiments ont été récoltés par couches et stockés au noir à 4°C, séparemment. Les méthodes de prélèvements étaient similaires à celles du terrain et la procédure sera détaillée dans la Partie 3 de ce manuscrit.

1.1.3 Prélèvements

Les échantillons de vase ont été prélevés à l'aide de carottiers en PolyChlorure de Vinyle (PVC) de 15 cm de diamètre et de 20 cm de hauteur. Cinq profondeurs d'intérêt ont été prélevées de façon systématique. Ces 5 couches, ont été choisies afin 1) d'améliorer la précision des mesures en surface par rapport aux études préalables et 2) de représenter un compromis entre l'exploration des processus en profondeur tout en prélevant une quantité d'échantillon analysable pendant la durée du projet.

Les études menées lors du projet précédent (ANR VASIREMI) s'était concentrées sur le premier centimètre. Or, la littérature suggère qu'au sein de cette couche, le microphytobenthos effectuerait des migrations et se concentrerait dans les 5 premiers millimètres du sédiment à marée basse (Consalvey *et al.*, 2004; Herlory *et al.*, 2004). Il est donc apparu important de prélever une première couche (P1, **Figure 19**) de 5 mm d'épaisseur de la surface à 0,5 cm *bsf* (pour « *below sediment surface* »), puis une deuxième couche (P2) également de 5 mm de 0,5 à 1 cm *bsf*. Ensuite les épaisseurs des couches augmentent de façon presque logarithmique avec une couche P3 de 1 cm d'épaisseur de 1 à 2 cm *bsf*, P4 de 3 cm d'épaisseur de 2 à 5 cm *bsf* et enfin, P5 de 5 cm d'épaisseur allant de 5 à 10 cm *bsf*.

La couche P1 a été récoltée grâce à des réglettes avec lesquelles la surface a été raclée (**Figure 20**). Les quatre profondeurs restantes ont été prélevées grâce à des anneaux dont la hauteur correspond précisément à l'épaisseur de la couche, positionnés sur le carottier. Un poussoir a permis de récupérer la hauteur de vase souhaitée. Puis le sédiment a été récolté dans des boîtes plastiques hermétiquement fermées jusqu'au conditionnement. Pour chaque profondeur de prélèvement, un volume de 1 L de sédiment a été récupéré.

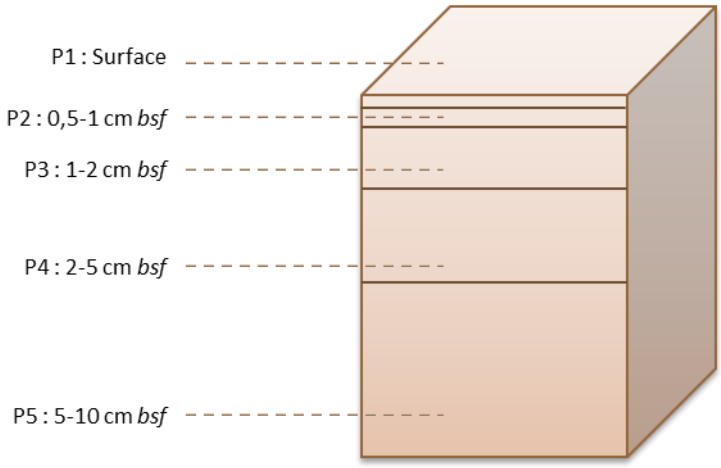


Figure 19. Représentation schématique des couches de sédiments prélevées lors de ce travail de terrain (*bsf* pour « *below sediment surface* »).

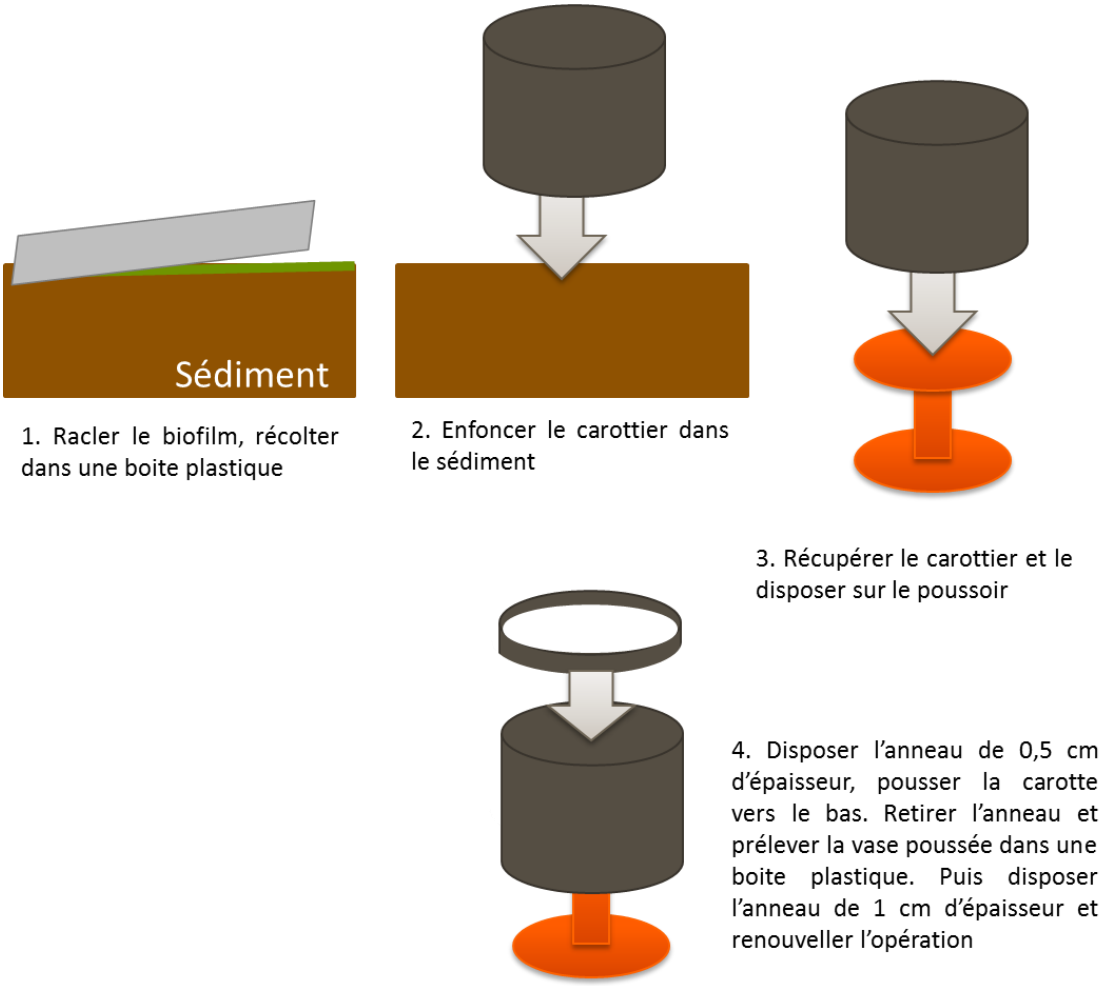


Figure 20. Méthodes de prélèvement des couches de sédiments successives

La lumière et la température ont été suivies en continu pendant la période d'échantillonnage. La lumière, en particulier les radiations actives pour la photosynthèse (PAR), a été mesurée toutes les 30 secondes (s) pendant la durée des prélèvements grâce à un capteur plat relié à un système d'acquisition des données (ULM-500, Walz, Allemagne). La température du sédiment a également été suivie toutes les 30 s grâce à des sondes HOBO (HOBO Pro v2, Onset, Massachusetts, USA, préalablement programmées à l'aide du logiciel HOBOware) insérées sur une réglette métallique conçue pour positionner les sondes aux différentes profondeurs souhaitées (0,5 cm, 1 cm, 2 cm, 5 cm et 10 cm). Les paramètres considérés pour chaque prélèvement sont récapitulés dans la **Table 4** ci-dessous. Les protocoles détaillés de chaque analyse effectuée sont présentés sous forme de fiches pratiques en annexe de ce manuscrit.

Table 4. Bilan des paramètres considérés dans ce travail (●), méthodes d'échantillonnage, de conservation, et d'analyse durant le suivi saisonnier (Partie 2) et le suivi en mésocosme (Partie 3).Les protocoles sont détaillés en annexe comme indiqué. Abbréviations : *in situ* : D = début, M = milieu, F = fin de marée basse, et *ex situ* : L1 = début, L2 = milieu , L3 = fin de marée basse de jour (LGT) et de nuit (NGT) .

►

Paramètres	Avril 2012	Juillet 2012	Novembre 2012	Février 2013	Avril 2013			LGT			NGT			Echantillonnage	Conservation	Méthode d'analyse	Annexe n°
	M	M	M	M	D	M	F	L1	L2	L3	L1	L2	L3				
Irradiance	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Capteur ULM-500			
Température extérieure	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	sonde HOBO			
Température sédiment	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	sonde HOBO			
pH	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement	8°C	pH mètre (Eutech PC150, Waltham, MA, États-Unis)	Annexe 11
Salinité	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement	8°C	conductimètre (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Weilheim, Allemagne)	Annexe 11
Teneur en eau	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement		séchage/pesée	Annexe 9
Granulométrie	●	●	●	●				●	●	●	●	●	●	prélèvement	température ambiante	mesure par diffraction laser (Mastersizer 2000, Malvern Instruments Ltd, Worcs, R.U.)	Annexe 14
COP/NOP	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement	lyophilisation	méthode par combustion (Strickland and Parsons, 1972) (Thermo Fischer Flash EA 1112)	Annexe 12
Chlorophylle *a*	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement	lyophilisation	extraction à l'acétone	Annexe 10
Sels nutritifs	●	●		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	rhizons	-20°C ou 4°C pour Si(OH)	autoanalyseur (Seal Analytical, Nordertedt, Allemagne)	Annexe 13
EPS	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	extraction du sédiment frais	-20°C	concentration/dosage BCA et Dubois	Annexe 16
Protéines totales	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement	-20°C	dosage Lowry	Annexe 15
Méiofaune	●	●	●	●	●	●	●	—	●	—	—	●	—	prélèvement	éthanol	comptage sous loupe binoculaire	Annexe 23
Macrofaune	●	●	●	●	—	●	—							prélèvement carotte entière	éthanol 60%	comptage et identification	
Production bactérienne	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement		incorporation ^{3}H-Thy (Garet and Moriarty, 1996)	Annexe 18
Activités enzymatiques	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●				prélèvement	-20°C	incubations/dosage spectro/fluo	Annexe 17
Abondance procaryotes	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	prélèvement	formol 2%, 4°C	voir Partie1- Chapitre 3	
Gènes fonctionnels (ADN)														prélèvement	-20°C	extraction ADN/PCR quantitative	Annexe 20
amoA bactérien	●	●	●	●	●	●	●										
amoA archéen		●		●													
nirS	●	●	●	●	●	●	●										
nirK	●	●	●	●	●	●	●										
nosZ		●		●													
Anammox*	●	●	●	●	●	●	●										
Gènes fonctionnels actifs (ADNc)														prélèvement	-80°C	extraction ARN/RT-q-PCR	
amoA bactérien																	
amoA archéen								●	●	●	●	●	●				
nirS								●	●	●	●	●	●				
nirK																	
nosZ																	
Anammox*								●	●	●	●	●	●				
Abondance bactéries (gène 16S ARNr)		●		●													
Abondance archées (gène 16S ARNr)		●		●													
Diversité bactérienne totale (gène 16S ARNr)		●		●										prélèvement	-20°C	extraction ADN/PCR/pyroséquençage	Annexe 21
Diversité archéenne totale (gène 16S ARNr)		●		●													Annexe 21
Diversité bactérienne active (16S ARNr)									●			●		prélèvement	-80°C	extraction ARN/RT-PCR/pyroséquençage	Annexe 22
Diversité archéenne active (16S ARNr)									●			●					Annexe 22

EPS = Substances ExoPolymériques ; PCR = "*Polymerase Chain Reaction*" amplification d'ADN; RT-q-PCR = reverse-transcriptase quantitative PCR, RT-PCR = reverse-transcriptase PCR, * 16S rRNA *Planctomycetes*

1.2 L'étape de conditionnement

Une fois rapporté sur la plage, chaque prélèvement a été stocké à 4°C avant d'être pris en charge par l'équipe de conditionnement. Chaque paramètre à analyser a demandé un conditionnement particulier qui a été amélioré tout au long de ce travail de thèse et la **Table 5** présente le conditionnement optimal.

Table 5. Procédure de conditionnement des échantillons suite aux prélèvements.

Paramètres	**Pot/Tube**	**Volume**		*P1*	*P2*	*P3*	*P4*	*P5*
Glacière A - 4°C (Destination Conservation)								
Chlorophylle *a*	Pot 60 ml	30 mL	-20°C					
Protéines totales	Falcon 15 ml	1 ml	-20°C					
ADN	Petit pot spéciaux	4 mL	-20°C					
AP*	Petit pot spéciaux	2 ml	4°C					
Glacière B - 4°C (Destination Laboratoire)								
Teneur en eau	Pot 40 ml	20 ml						
EPS	Falcon 15 ml	5 ml						
pH, Salinité	Falcon 175 ml	150 ml						
Production Bact	Eppendorf	0,5 ml						
Glacière C - Carbo (Destination conservation)								
ARN	Seringues	5 mL	N liq-80°C					
FISH	Falcon 15 ml	1 ml	-20°C					
AE	Falcon 15 ml	5 ml	- 20°C					
AE GE	2x Pots 60 ml	4 ml	-20°C					
Température ambiante								
Méiofaune**	Pot 100 ml	60 ml	RT					
Granulométrie	Falcon 15 ml	5 mL	RT					

*le pot AP (abondance de procaryotes) contient 2mL de Formol 4%

** ajouter 60 ml d'éthanol

Le COP/NOP peut être évalué à partir de l'échantillon prévu pour le dosage de chlorophylle a lyophilisé.

1.3 La mesure des sels nutritifs dans l'eau interstitielle : la méthode des Rhizons

Lors de ce travail de thèse, une méthode récente de prélèvement de l'eau interstitielle a été utilisée : les Rhizons (Seeberg-Elverfeldt *et al.*, 2005). Les Rhizons (Rhizosphere Research Products, Wageningen, Pays-Bas) sont des tubes entourés d'un filtre de 0,1 µm de porosité reliés à une seringue. La tige du Rhizon est insérée délicatement à l'horizontale dans le sédiment puis la seringue est ouverte afin d'appliquer une pression permettant à l'eau interstitielle du sédiment de passer au travers le filtre et d'être récoltée dans cette seringue (**Figure 21**).

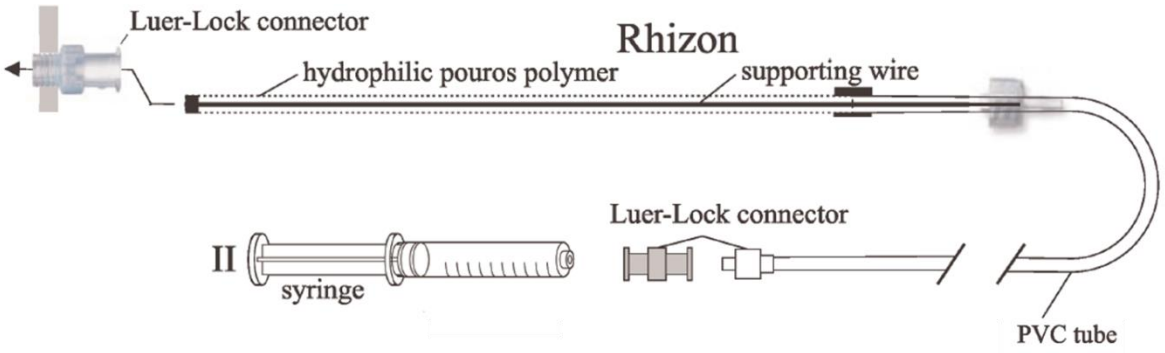


Figure 21. Schéma du dispositif de Rhizons (10 cm de longueur) et système de seringue permettant le prélèvement de l'eau interstitielle. Selon Seeberg-Elverfeldt *et al.* (2005)

Afin d'insérer ces Rhizons dans le sédiment, des carottiers spéciaux ont été (Brest Meca **Figure 22**, ou AG products et N. Lachaussée, LIENSs). Ces carottiers en PolyMéthAcrylate de Méthyle (PMMA) transparent de 11 cm de diamètre sont percés de trous de 3,8 mm de diamètre à 1 cm d'intervalle verticalement. Afin d'obtenir une précision suffisante, deux rangées de trous au minimum sont réalisées en décalant verticalement les positions des trous de 0,5 cm. Ainsi, il est possible de positionner les rhizons à des profondeurs de sédiment choisies tous les 0,5 cm. Dans notre cas, les rhizons ont été positionnés au milieu de chaque couche. Le premier rhizon est inséré juste sous la surface (P1, à environ 0,25 cm *bsf*), le deuxième, 0,5 cm plus bas (P2, à environ 1 cm *bsf*), le troisième, 1 cm plus bas (P3, à environ 1,5 cm *bsf*), le quatrième, 2 cm plus bas (P4, à environ 3,5 cm *bsf*) puis le cinquième, 4 cm plus bas (P5, à environ 7,5 cm *bsf*).

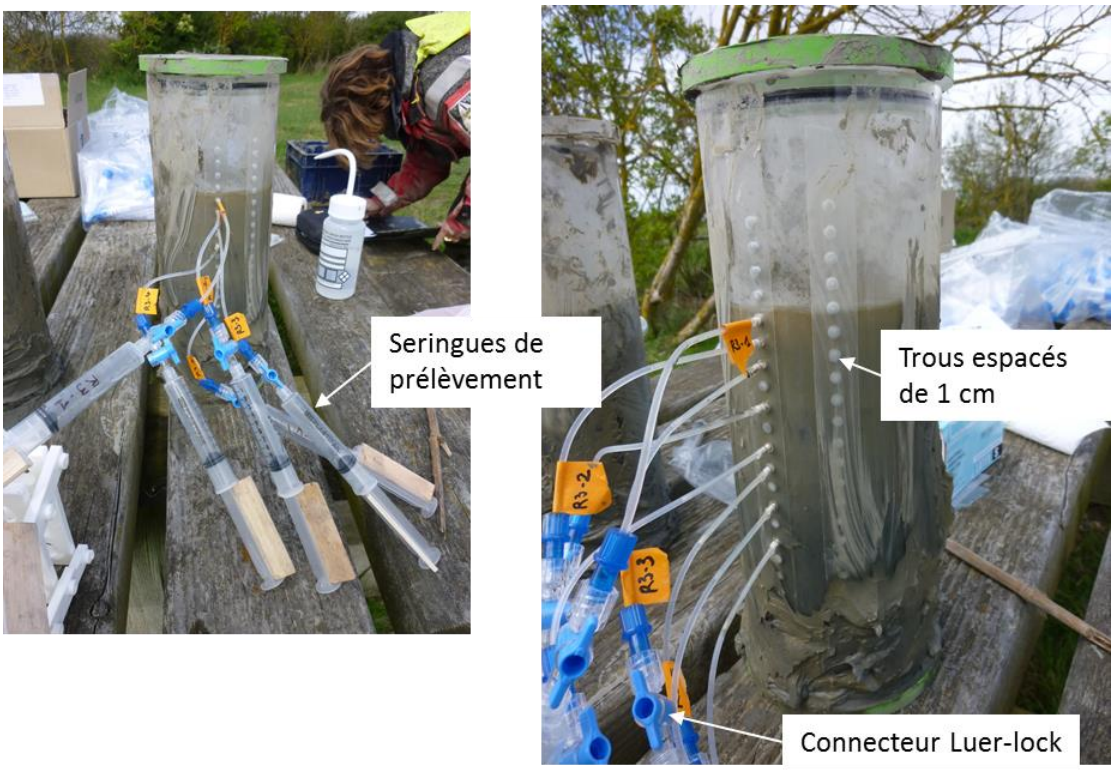


Figure 22. Photos illustrant la procédure de prélèvement de l'eau interstitielle par la méthode des rhizons (crédit: M. Raimonet)

Un support adapté a également été créé afin de maintenir les seringues horizontalement (non présenté sur l'illustration). Une fois le volume d'eau interstitielle suffisant pour l'analyse (si possible > 3 mL), le contenu de la seringue est transféré dans au moins deux tubes Falcon 15 mL : un tube est conservé à 4°C pour les dosages de silicates et un autre est conservé à -20°C pour l'analyse des autres sels nutritifs.

Chapitre 2. Développements et applications de techniques d'analyse à des sédiments vaseux

2.1 Création de standards pour la quantification de gènes fonctionnels, exemple du gène *nirS*

La quantification de gènes fonctionnels repose sur une technique d'amplification de l'ADN (PCR pour « *Polymerase Chain Reaction* »). Cette technique appelée, PCR quantitative (qPCR) consiste à suivre, en temps réel, la quantité d'ADN amplifié au cours d'une réaction. Notre méthode utilise les propriétés du fluorochrome SYBRGreenI s'intercalant spécifiquement dans les molécules d'ADN. La quantité de fluorochrome capté étant proportionnelle à la quantité d'ADN initial, la mesure de la fluorescence émise par le SYBRGreenI au cours d'une réaction de PCR (40-45 cycles d'amplification) permet indirectement d'évaluer la quantité d'ADN amplifié et donc la quantité d'ADN qui était présente initialement dans l'échantillon. Afin d'évaluer cette quantité en terme de copies des gènes, une gamme de standard est nécessaire. Cette gamme est à réaliser avec des standards spécifiques à chaque gène qui sont des solutions contenant une quantité connue du fragment du gène recherché à des dilutions différentes. Ces fragments de gène, ou séquences nucléotidiques, doivent être extraits de l'environnement ou obtenues à partir de cultures pures de procaryotes possédant le gène étudié. Dans le cas de préparation via des échantillons environnementaux, l'ADN est extrait, puis le gène cible est amplifié et cloné. Les clones sont ensuite purifiés pour ne conserver que les fragments du gène ciblé. Chaque fragment et ensuite testé en qPCR avec des échantillons environnementaux. Cette section décrit en détail la procédure de préparation de ces standards avec pour exemple, la création d'une banque de standard du gène *nirS*, proxy de la dénitrification, le protocole est également disponible en « fiches pratiques » en Annexe 20.

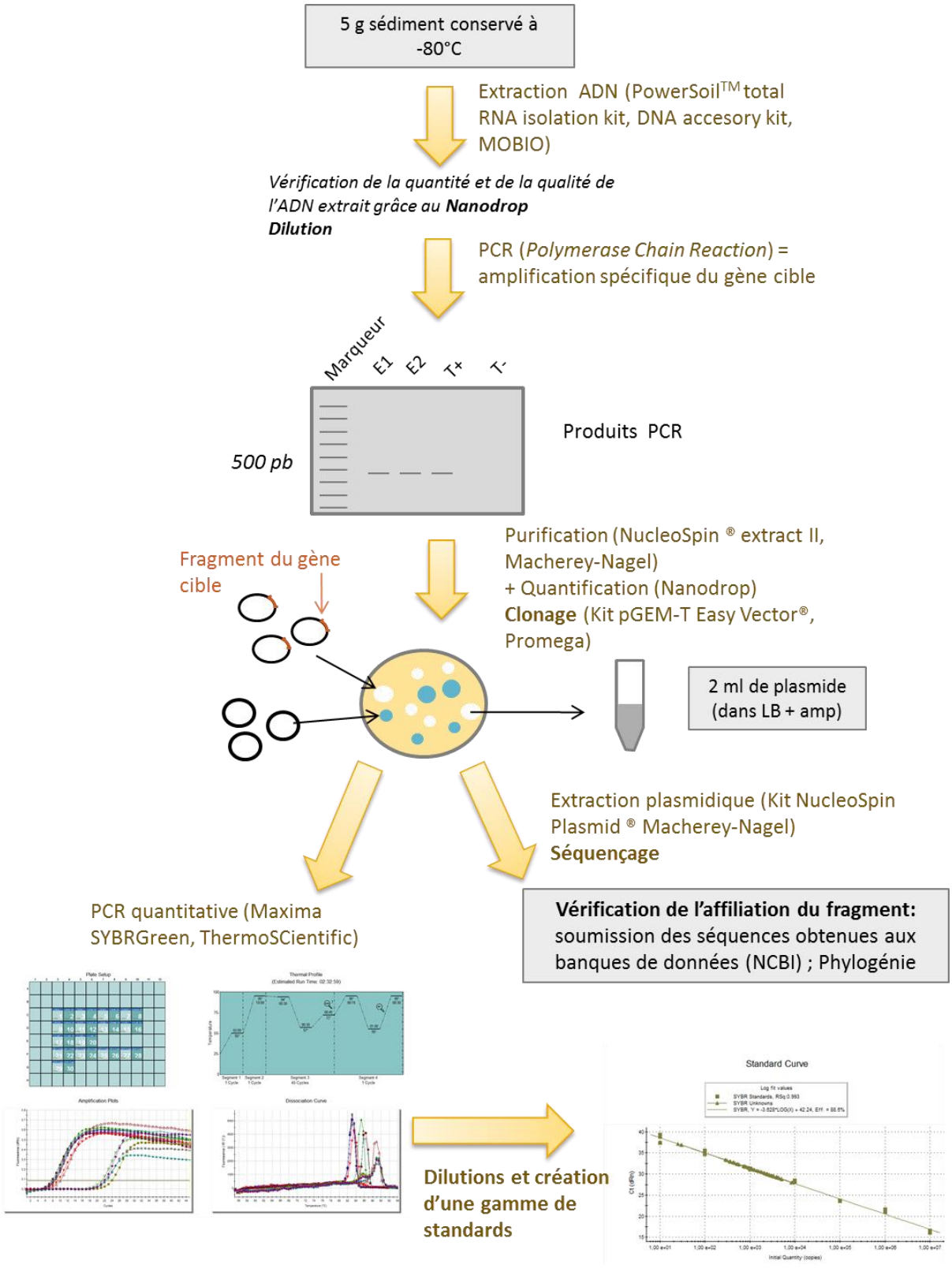


Figure 23. Procédure de mise au point de standards en vue de quantifier un gène fonctionnel dans un échantillon environnemental par PCR quantitative

Des échantillons de sédiment ont été prélevés sur la vasière de Brouage en Avril 2012 puis extraits avec le kit Power Soil™ Total RNA Isolation Kit, DNA Accessory kit (MOBIO, Carlsbad, CA, Etats-Unis). Etant donné la variabilité des communautés procaryotiques en fonction des profondeurs, les tests ont été menés avec deux types d'échantillons :

- Profondeur 1-2 cm (P3), prélevé le 20 Avril 2012
- Pool des 5 profondeurs, prélevé le 20 Avril 2012

Les échantillons ont été amplifiés par PCR selon un protocole adapté de Throbäck *et al.* (2004). Le mix réactionnel (50 µL) était composé de réactifs Promega (Madison, WI, Etats-Unis) de la façon suivante : 33,7 µl H_2O, Buffer 10x (5 µL), 10 mM de chaque dNTP's (1 µL), $MgCl_2$ 25 mM (2 µL), BSA 10 mg mL^{-1} (2 µL), 5U/µL GoTaq® HotStart Polymerase (0,3 µL) et chaque primer à 10 µM (2,5 µL). Le programme d'amplification se composait d'une étape de dénaturation initiale de l'ADN de 15 minutes à 95°C, suivi de 35 cycles de dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes, une hybridation de 1 minute à 57°C, une élongation de 1 minute à 72 °C puis une élongation terminale de 9 minutes à 72°C. Les résultats ont été visualisés sur gel d'agarose 1% en déposant 5µl de produit PCR.

Les produits PCR des échantillons dilués au dixième ont été purifiés via le kit NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) puis, l'ADN a été quantifié par mesure d'absorbance à 260 et 280 nm à l'aide du Nanodrop (ND-800, Thermo Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis) (concentration ADN [µg mL^{-1}] =(A260)*50). La pureté de l'ADN est donnée par le rapport (A260)/(A280) qui est considérée satisfaisant si proche de 1,80.

Le clonage a été réalisé à l'aide du kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, Etats-Unis), suivant les recommandations du fournisseur (les étapes sont détaillées en Annexe 20). Un clonage consiste à liguer d'abord chaque fragment du gène amplifié (insert) à un vecteur, puis ce vecteur, via un plasmide, est intégré dans des cellules bactériennes thermocompétentes (*Escherichia coli, JM109*). Ces cellules sont ensuite mises en culture sur un milieu nutritif gélosé en présence de substrats (IPTG et X-Gal) et d'un antibiotique (ampicilline). Les vecteurs utilisés pour le clonage possèdent un gène *lacZ*. Le produit de ce gène est capable, en présence d'IPTG, de transformer le substrat X-gal en produit bleu. Pendant l'étape de ligation, si l'ADN étudié (insert) est introduit dans le vecteur, il va se positionner au sein de ce gène

lacZ qui ne sera alors plus fonctionnel. Les colonies d'*E. coli* (résistantes à l'ampicilline) qui vont se développer seront alors de couleur blanche. Au contraire, si les vecteurs n'ont pas introduit les inserts, le gène *lacZ* sera fonctionnel et les colonies qui se développeront seront bleues. (**Figure 23**). Cette réaction permet ainsi un contrôle visuel afin de ne prélever que les colonies contenant des cellules portant le fragment ciblé. Les clones « blancs » récupérés ont à nouveau été mis en culture (1 nuit à 37°C). Dix colonies blanches ont été sélectionnées et mises en culture en milieu liquide (LB + ampicilline 50 µg mL^{-1}). La purification des clones a été réalisée à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid ® (Macheney-Nagel) pour n'obtenir que les plasmides ayant incorporé l'ADN (vecteur) que l'on souhaite étudier. L'ADN extrait a été ensuite dosé au Nanodrop.

Une qPCR a enfin été réalisée avec les clones obtenus et quelques échantillons environnementaux. Chaque mix de réaction (20 µL) a été préparée comme suit : 1x qPCR master Mix SybrGreen/ROX (Maxima, SYBRGreen/ROX, Fermentas) (10 µL), 0,3 µM de chaque primer (1 µL à 10µM), 1 µl d'échantillon et 7 µl d'eau ultra-pure (*i.e.* RNase et DNase-free). Le cycle d'aplification (**Figure 24**) a été réalisé dans un thermocycleur qPCR MxPro 3000P (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA, Etats-Unis) équipé du logiciel MxPro (Version 4.10).

Le choix des standards se fait par une vérification de leur température de fusion (« *melting temperature* » ou Tm). Lorsque cette température est supérieure à 80°C, cela atteste de la présence d'amplicons spécifiques (fragments amplifiés par le couple d'amorces choisi) et donc de l'amplification du fragment ciblé. De plus, afin de quantifier justement le nombre de copies des gènes, il est indispensable que cette valeur de Tm soit la même entre le standard et les échantillons.

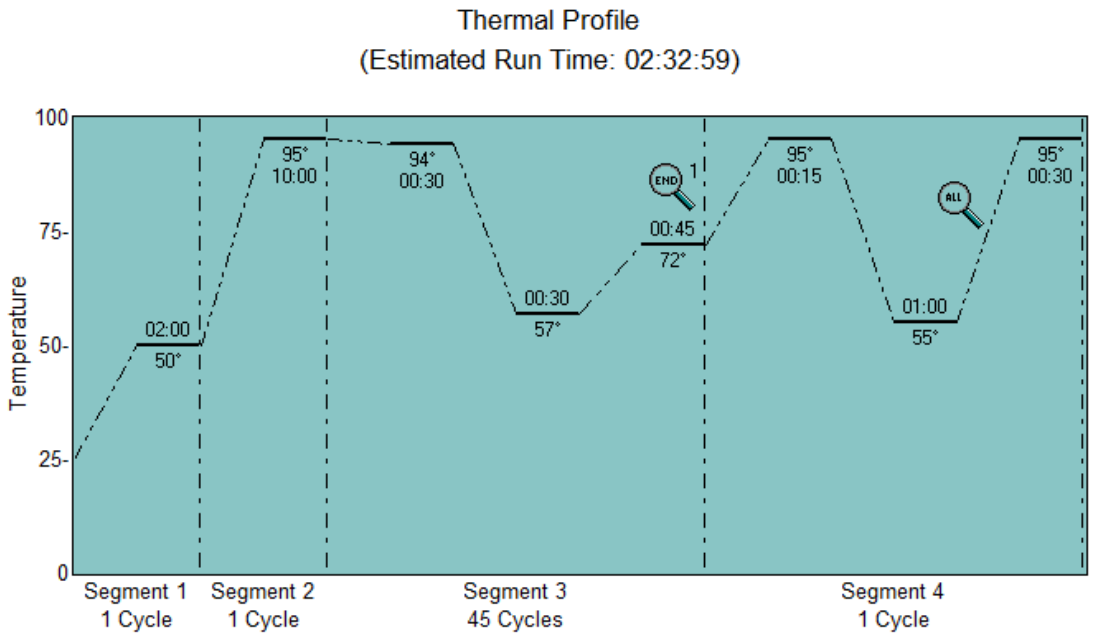


Figure 24. Profil thermique permettant la réaction d'amplification du gène *nirS* par PCR quantitative (selon Throbäck *et al.* (2004))

L'analyse des courbes de dissociation de la qPCR montre la répartition des amplicons pour chaque standard testé et pour les échantillons environnementaux (**Figure 25**). Dans ce cas, le standard le plus adapté est le C11-A36, il sera donc séquencé. Il possède une Tm de 89 °C (donc supérieure à 80°C), cette Tm est égale à celle des échantillons environnementaux (**Figure 25**). Les échantillons présentant un très léger pic à une Tm de 86°C, il est possible que deux versions du gène puissent s'exprimer dans la communauté. Le standard C10-A15 semblait correspondre à cette deuxième version et a donc également été séquencé.

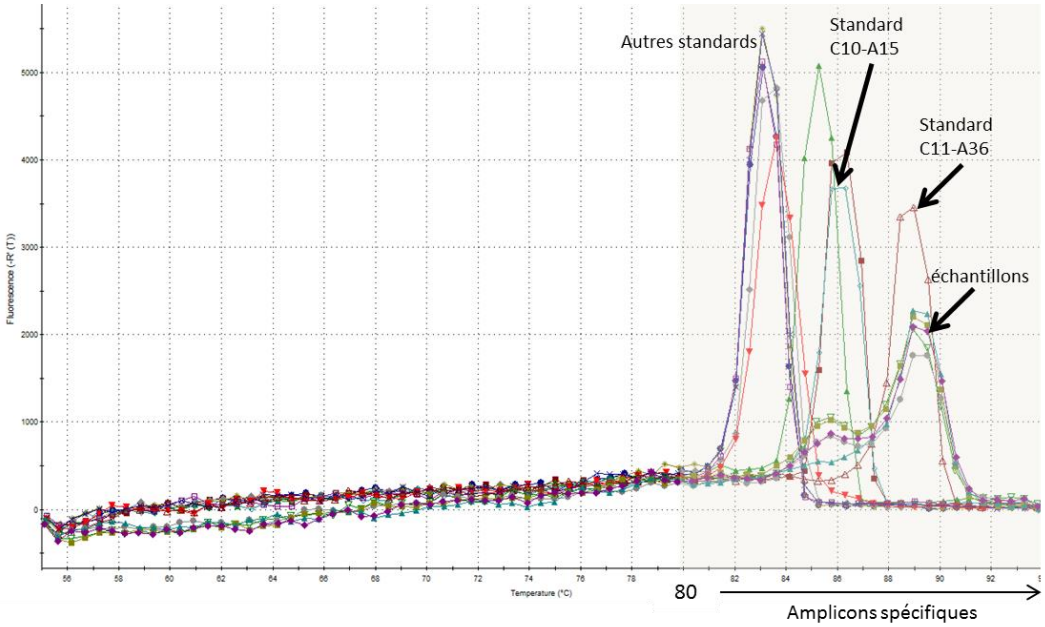


Figure 25. Exemple d'une courbe de dissociation lors de la création de standard pour la quantification du gène *nirS*. Ici, 10 standards potentiels ont été amplifiés ainsi que des échantillons environnementaux.

La construction d'un arbre phylogénétique (**Figure 26**) contenant les séquences des standards et des séquences connues du gène *nirS* confirme l'affiliation des standards C11-A36 et C10-A15 avec des séquences du gène *nirS* retrouvées dans les bases de données disponibles (NCBI, Bethesda, MD, Etats-Unis). Les séquences proches des standards sont issues de milieux côtiers et/ou anthropisés notamment retrouvés dans la baie de Chesapeake aux Etats-Unis (Hong *et al.*, 2014).

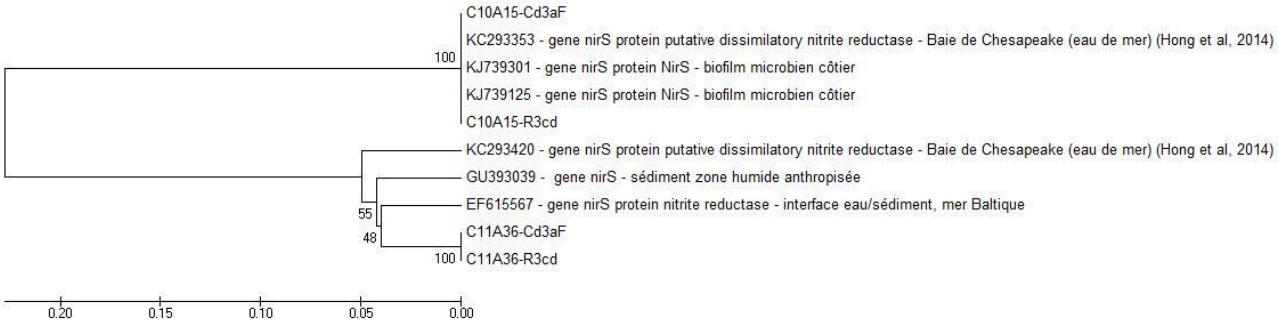


Figure 26. Arbre phylogénétique des séquences du gène *nirS* des clones C10-A15 et C11-A36 construit grâce à la méthode d'UPGMA (bootstrap=100) basé sur l'alignement des séquences de nucléotides (environ 400 pb) alignées avec le logiciel Muscle (itérations =10).

Une fois le standard validé, une gamme de dilution a été préparée (de 10^9 à 10^1 copies de *nirS*/µl). Les standards correspondent à des solutions aqueuses contenant les fragments du gène ainsi que le vecteur utilisé lors du clonage. Afin de déterminer la quantité de copies présentes dans la solution, un calcul tenant compte du poids moléculaire des bases nucléotidiques et du nombre de bases contenues dans le fragment et le vecteur a été effectué (Annexe 20). La gamme de concentration du standard est ensuite utilisée en duplicat lors de chaque qPCR afin d'évaluer la quantité absolue de copies de gènes présente dans les échantillons environnementaux.

2.2 Procédure de préparation des banques de fragment de gènes de l'ARNr et de l'ADNr 16S bactérien et archéen pour le pyroséquençage haut-débit

2.2.1 Objectif

La préparation des banques de fragments de gènes de l'ARN ribosomal (ARNr) et de l'ADNr 16S des bactéries et des archées peut être faite directement par le prestataire en charge de réaliser le pyroséquençage. Néanmoins, des problèmes surviennent souvent dans le cas d'échantillons environnementaux. En effet, les sédiments contiennent de nombreux inhibiteurs de l'enzyme lors de l'amplification de l'ADN (PCR) tels que les alcools ou les sels. Il convient donc en général, d'ajuster les conditions de PCR et d'optimiser les mix permettant la réaction d'amplification. De plus, le choix des amorces est crucial pour obtenir des résultats fiables. Il est donc nécessaire de réaliser des tests et de choisir des amorces 1) déjà largement utilisées et approuvésdans la littérature, 2) ciblant spécifiquement les organismes souhaités (ici bactéries d'une part et archées d'autre part) et 3) étant assez universelles pour ne pas sélectionner qu'un seul groupe taxonomique ; ceci, pour en justifier la robustesse.

La mise au point de cette procédure a donc nécessité un choix judicieux d'amorces (qui ciblent le fragment d'ADN ou d'ARN à amplifier) et des concentrations de chaque réactif lors de l'amplification. Elle a été réalisée en étroite collaboration avec Mylène Hugoni (LMGE, Clermont-Ferrand).

2.2.2 Procédure générale

L'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN) a été réalisée grâce aux kits UltraClean® Soil DNA isolation kit et RNA Power Soil® Total RNA Isolation Kit (MOBIO, Carlsbad, CA, Etats-Unis) suivant le protocole fournit par le fournisseur. Pour chaque échantillon, les acides nucléiques extraits ont été dosés au Nanodrop. Les ARN extraits ont été traités à la DNase (Turbo DNA-free, Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis) afin d'éliminer toute trace de contamination d'ADN, puis ont été transcrits en ADN complémentaires *via* la réaction de RT-PCR (« *reverse-transcriptase PCR* »). Cette transcription a été réalisée grâce

au kit SuperScript III (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, Etats-Unis) suivant la procédure détaillée en Annexe 22.

Comme l'indique le schéma récapitulatif de la **Figure 27**, le fragment de gène 16S a été amplifié (étape ayant demandé une optimisation particulière), et les amplicons obtenus (fragments cibles amplifiés) ont été purifiés puis dosés. Cette purification a également demandé des améliorations notamment dans le choix du kit à utiliser.

2.2.3 Procédure suivie et problèmes rencontrés

2.2.3.1 Le choix des amorces

Table 6. Liste des amorces testées avant le choix définitif en vue de préparer une librairie d'amplicons pour évaluer la diversité bactérienne et archéenne dans les sédiments.

	Amorces	Taille fragment (pb)	Séquence nucléotidique (5'->3')	Température hybridation (°C)	Référence
Bactéries					
	27F	492	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	55	Hongoh *et al.* (2003)
	519R		GTA TTA CCG CGG CKG CTG		
	b341F	177	CCT ACG BGG AGG CAG CAG	60	Juck *et al.* (2000)
	518R		ATT ACC GCG GCT GCT GCT GG		Muyzer *et al.* (1993)
	563F	344	AYT GGG YDT AAA GNG	52	
	907R		CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT		Muyzer *et al.* (1995)
Archées					
	519F	396	CAG CCG CCG CGG TAA	57	Herfort *et al.* (2007)
	915R		GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT		Casamayor *et al.* (2002)
	344F	571	ACG GGG YGC AGC AGG CGC GA	61	Raskin *et al.* (1994)
	915R		GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT		Casamayor *et al.* (2002)

D'après la littérature, divers couples d'amorces sont disponibles pour réaliser une analyse phylogénétique par pyroséquençage ciblant l'ARNr 16S des Bactéries et des Archées. Cependant, certains couples identifiés amplifient des fragments soit trop courts pour implémenter une phylogénie (ex : b341F-518R <200 pb) soit trop long pour être supportés par le séquençage à haut débit (ex : 344F-915R > 500 pb). Après des tests d'amplifications, les amorces ayant permis d'obtenir des amplicons pour un maximum d'échantillons étaient :

- Pour les bactéries : 563F-907R (Muyzer *et al.*, 1995)
- Pour les archées : 519F-915R (Casamayor *et al.*, 2002; Herfort *et al.*, 2007).

Les couplse d'amorces choisi pour séquencer les bactéries et les archées ciblent les régions V3-V5 de l'ARNr 16S qui est une région variable qui permet d'obtenir des informations phylogénétiques suffisantes pour l'étude de la diversité bactérienne et archéenne (Liu *et al.*, 2007; Wang and Qian, 2009; Kim *et al.*, 2011).

2.2.3.2 L'étape d'amplification

2.2.3.2.1 Amplification des ADN

Dans un premier temps, l'amplification a été réalisée avec une enzyme polymérase haute-fidélité (PicoMaxx High Fidelity PCR System, Agilent, Santa Clara, CA, Etats-Unis) limitant les biais dus à l'enzyme. Cependant, celle-ci n'a pas fonctionné avec tous les extraits d'ADN environnementaux. Cette absence d'amplification n'a pas pu être reliée à une profondeur de sédiment ou à des teneurs en protéines en particulier (inhibitrices de la réaction d'amplification). De nouveaux tests ont donc été réalisés avec l'enzyme GoTaq® HotStart Polymerase (Promega), une enzyme moins fidèle mais moins stricte concernant la présence d'inhibiteurs. Les tests se sont révélés plus concluant mais, pour certains réplicats, l'obtention d'amplicons n'a pas pu être possible. Les échantillons ont finalement été **dialysés** (Annexe 21). La dialyse a permis d'éliminer les sels inhibiteurs de l'enzyme polymérase utilisée et de concentrer les acides nucléiques (par 2). Néanmoins, cette étape concentre certainement les protéines présentes et une dilution a été nécessaire avant amplification. L'étape de dialyse a permis l'amplification de tous les échantillons.

2.2.3.2.2 Amplification des ADNc

L'amplification des ADNc n'a pas demandé d'optimisation particulière (Annexe 22). En effet, les échantillons sont plus pauvres en inhibiteurs car fortement dilués du fait des étapes de traitement à la DNase et de RT-PCR.

2.2.3.3 La purification des amplicons

Chaque amplification a été réalisée pour chacun des triplicats (ou duplicats pour les ARN) séparément. La migration des produits de PCR via électrophorèse a permis de vérifier l'amplification spécifique du fragment souhaité. A cette étape, chaque bande observée sur les gels correspond au pool d'amplicons, les bandes sont alors, découpées et purifiées. C'est à cette étape que les triplicats (ou duplicats, pour les échantillons d'ARNr) ont été regroupés.

Dans un premier temps, la purification a été réalisée avec le kit GeneClean® Turbo (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, Etats-Unis), sans résultats (concentration finale : moyenne = 1,43 ng/µL, qualité (ratio 260/280) <1). Ainsi, dans un deuxième temps, un kit permettant la purification dans un volume plus restreint a été préféré (MinElute Gel Extraction kit, Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Le protocole du fournisseur a été optimisé afin d'améliorer les rendements de purification et la procédure adoptée est détaillée en Annexe 22.

Ainsi, la préparation de banques d'amplicons s'est avérée délicate et il est conseillé, lors d'analyses d'échantillons environnementaux, de réaliser cette étape de préparation soit même.

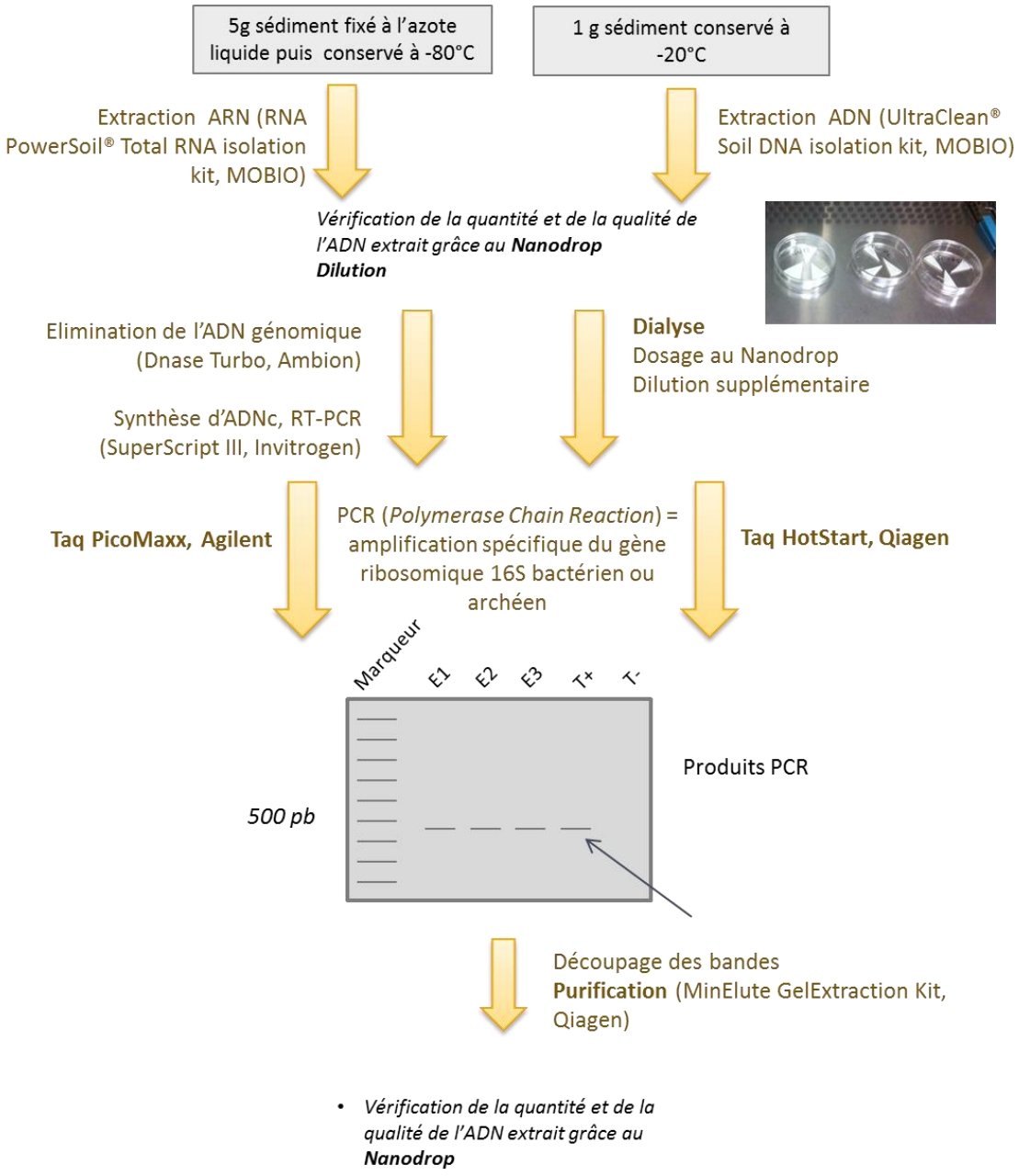


Figure 27. Protocole final permettant la préparation d'une librairie d'amplicons en vue d'une pyroséquençage 454 haut débit

2.3 Tests d'application d'une technique de marquage par hybridation moléculaire : FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) et CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH)

Cette mise au point a fait l'objet du stage de Trystan Lefebvre (BTS, Bionalyses et contrôles) d'Octobre à Décembre 2013.

Les techniques de marquage des cellules par hybridation moléculaire de sondes oligonucléotidiques sont de plus en plus étudiées en microbiologie (Glöckner *et al.*, 1996; Llobet-Brossa *et al.*, 1998; Lunau *et al.*, 2005). Elles permettent la quantification de différents groupes taxonomiques ciblés et ont été à l'origine d'avancées majeures en écologie microbienne (Boetius *et al.*, 2000). Ces techniques sont basées sur le principe suivant : l'ADN, porte l'information génétique, et chez les procaryotes, la séquence d'ADN du gène codant la petite sous-unité ribosomique 16S est parfaitement connue et permet de différencier les organismes selon leur affiliation taxonomique. A partir de ces différences en terme de séquence nucléotidique, des amorces complémentaires peuvent être générées représentant ainsi des marqueurs d'un groupe de procaryotes ciblés (**Figure 28**).

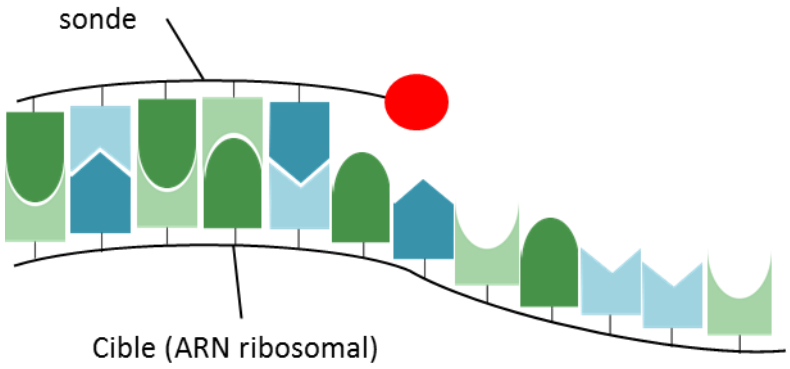


Figure 28. Sonde oligonucléotidique marquée avec un fluorochrome (rond rouge) associée à un brin d'ARN ribosomal. Chaque entité de couleur est une nucléotide selon Amann and Fuchs (2008).

Les deux méthodes : FISH (Fluorescent In Situ Hybridization) et CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH) sont basées sur les mêmes procédures. Le CARD-FISH présente en revanche, des étapes supplémentaires d'amplification du signal émis par la sonde et donc permet de faciliter le comptage notamment dans des milieux riches en argiles et en particules comme les sols ou les sédiments (Eickhorst and Tippkötter, 2008). Ces méthodes de

marquage peuvent être utilisées pour diverses applications. Dans notre cas, il s'agit de quantifier la proportion des procaryotes représentée par les Bactéries d'une part et par les Archées d'autre part. Pour cela, des sondes spécifiques utilisées dans la littérature ont été choisies (différentes pour le FISH ou le CARD-FISH). Chaque échantillon doit être marqué et compté 3 fois :

- un filtre marqué avec une sonde ciblant les bactéries : pour le CARD-FISH, la sonde EUB338-I, plus universelle a été choisie, pour le FISH, un mélange des trois sondes EUB338-I, II et III a été préféré pour plus de spécificité (**Table 7**).
- un filtre marqué avec une sonde ciblant les archées
- un filtre marqué avec une sonde non-sens EUB338, ciblant des organismes non bactériens marqués par erreurs par la sonde bactéries (NONEUB)

Table 7. Dénomination, modification et séquences des sondes utilisées pour l'hybridation moléculaire des Bactéries et des Archées par FISH *(Fluorescent In Situ Hybridization)* et CARD-FISH *(CAtalyzed Reporter Deposition -FISH).*

Organisme cible	Nom de la sonde	Modifi-cation	Séquence (5'->3')	Référence
FISH (Fluorescent In Situ Hybridization)				
Bactéries	EUB338 I	5'-Cy3	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Daims *et al.* (1999)
	EUB 338 II	5'-Cy3	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	
	EUB 338 III	5'-Cy3	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	
Archées	ARCH 915	5'-Cy3	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Stahl and Amann (1991)
Non bactérien	NON EUB	5'-Cy3	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Wallner *et al.* (1993)
CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH)				
Bactéries	EUB338 I	5'-HRP	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	Daims *et al.* (1999)
Archées	ARCH 915	5'-HRP	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	Stahl and Amann (1991)
Non bactérien	NON EUB	5'-HRP	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	Wallner *et al.* (1993)

Chaque filtre est doublement marqué avec la sonde spécifique et au DAPI ciblant l'ADN de tous les organismes ce qui constitue un témoin positif et un référentiel de comptage des cellules procaryotes. Ainsi, les comptages ne sont pas à exprimer en nombre de cellules mais en pourcentage de cellules comptées par rapport au comptage au DAPI.

2.3.1 L'application du CARD-FISH

Le protocole appliqué initialement a été développé au laboratoire LMGE (Clermont-Ferrand) par B. Kéraval pour le comptage des Archées dans les sédiments du lac Pavin (Auvergne, France).

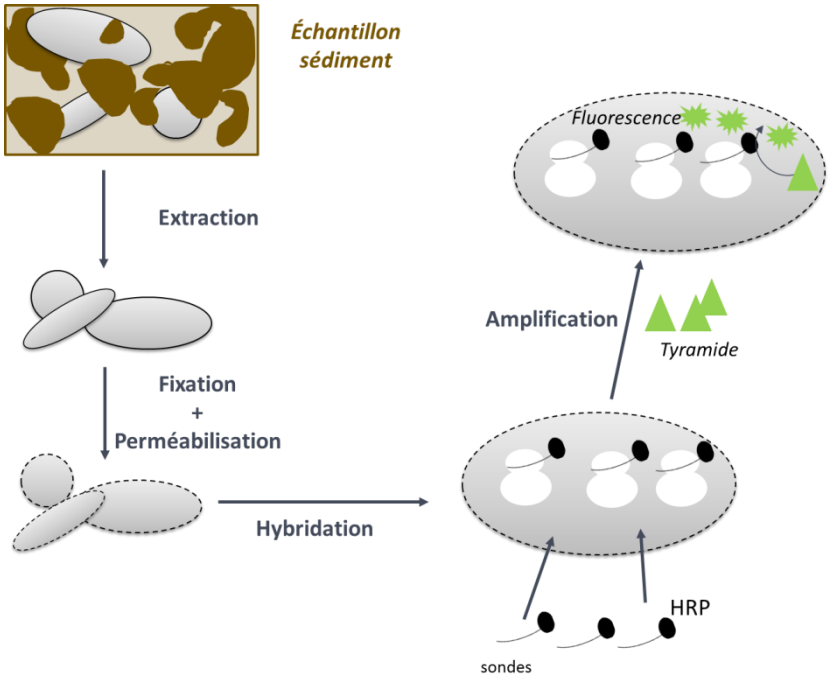


Figure 29. Schéma du principe de marquage moléculaire par CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH), selon Amann and Fuchs (2008).

Dans le cas du CARD-FISH, les sondes sont couplées avec une enzyme : la Horse Radish Peroxidase ou HRP. L'ajout de tyramine fluorescéine réagit avec les enzymes HRP en présence d'eau oxygénée et permet la libération d'un grand nombre de signaux fluorescents amplifiant le signal du fluorochrome et permettant ainsi de détecter les cellules de façon plus nette. Pour l'application de cette technique, les étapes d'extraction des cellules et de perméabilisation sont primordiales (Eickhorst and Tippkötter, 2008).

Tout d'abord, les cellules de procaryotes ont été extraites à partir d'échantillons de sédiment stocké à -20°C. Ceux-ci ont été décongelés, puis dilués au dixième dans du PBS 1x + 0,01 M pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$). Les échantillons ont ensuite subi une sonication (3 fois 40 sec, 50W avec 30 sec de repos dans la glace entre chaque), puis ont été centrifugés (1 min, 200g, 4°C) et enfin le surnageant a été fixé au para-formaldéhyde (PFA, 4% final) et filtré sur membrane GTTP (0,22 µm porosité). L'étape de perméabilisation a été appliquée pendant 1h à 37°C dans une solution de lysozyme (50 mg mL^{-1}) après une déshydratation du filtre à l'éthanol pur. Cette étape va permettre à la sonde de pénétrer plus facilement dans les cellules.

Ensuite, l'étape d'hybridation a permis la fixation de la sonde au niveau des ribosomes des cellules. L'hybridation a été réalisée dans une chambre d'incubation dans laquelle a été ajouté un tampon hybridation spécifique à chaque sonde pendant 2h (température spécifique à chaque sonde, 35°C pour les 3 sondes dans notre étude). Après différents lavages pour éliminer les hybridations non spécifiques, l'étape d'amplification a consisté en une mise en contact des filtres avec une solution de tyramine fluorescéine puis une incubation de 30 min à 55°C. Après différentes étapes de lavages, un second marquage au DAPI (1 µg mL^{-1}) a été appliqué pendant 15 minutes à température ambiante. Les filtres ont ensuite été montés entre lame et lamelles avec du Citifluor (Biovalley, France) puis conservées à -20°C avant observation.

Les premiers tests ont été assez encourageants, notamment le marquage au DAPI. En revanche, le marquage avec les sondes était plus aléatoire. Sur la **Figure 30**, le marquage spécifique des bactéries ne correspondait pas au marquage des cellules marquées au DAPI et n'apparaissait pas sur le même plan indiquant un marquage non spécifique.

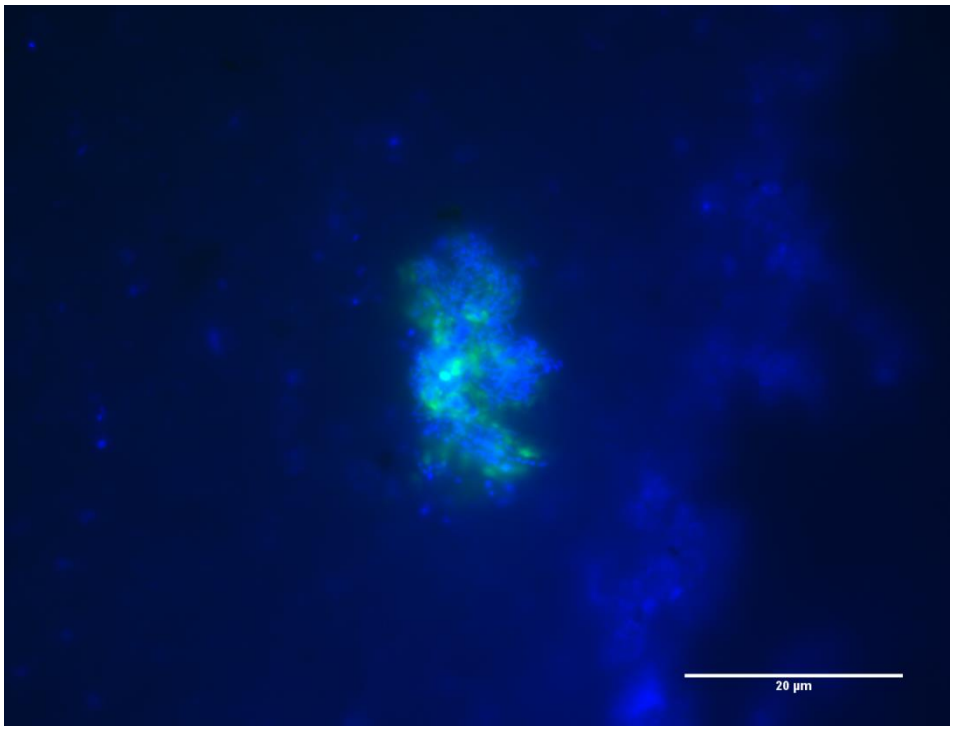


Figure 30. Photo d'une portion de filtre observée au microscope à épifluorescence marquant les cellules de procaryotes en bleu (marquage DAPI [excitation : 340-380, émission 425]), et les bactéries en vert (FITC [excitation : 460-500, émission 512-542]),) (Miscroscope DMI 600-B, Leica, Ojectif 100x, Caméra : ORCA –R2).

Différents essais, ont eu pour objectif d'améliorer l'extraction des cellules et le marquage avec les sondes afin de diminuer l'autofluorescence du sédiment biaisant les comptages. La validité des sondes a également été vérifiée à l'aide d'une culture pure de bactéries *Cellulophaga lytica.*

Suite à ces nombreux tests, modifiant les temps d'hybridation, les concentrations en tyramine fluorescéine et les types extractions, il a été difficile d'obtenir des préparations utilisables et exploitables. Le protocole de CARD-FISH présentant de nombreuses étapes, cela a complexifié l'identification des problèmes et une technique plus simple a donc été testée.

2.3.2 L'optimisation du FISH

Comme indiqué sur la **Figure 31**, la méthode de quantification par FISH présente moins d'étapes et de nombreux protocoles sont disponibles (Glöckner *et al.*, 1996; Llobet-Brossa *et al.*, 1998; Pernthaler *et al.*, 2001).

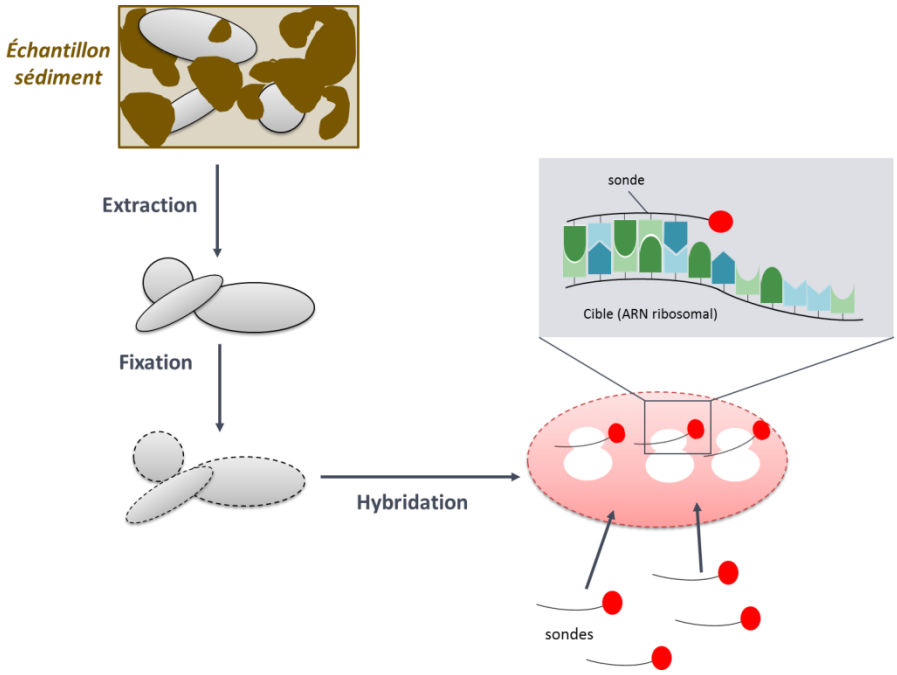


Figure 31. Schéma du principe de marquage moléculaire par CARD-FISH (CAtalyzed Reporter Deposition -FISH), selon Amann and Fuchs (2008).

Les premiers tests réalisés ont permis une meilleure observation des cellules marquées. L'optimisation semblait ainsi ne porter que sur le temps d'hybridation et les concentrations en DAPI. A la suite de différents essais non satisfaisants, le protocole établit par Glöckner *et al.* (1996) a été suivi à la lettre à partir d'échantillons préparés le jour de leur prélèvement (non congelés). En effet, ce protocole prévoit de fixer le sédiment avec du PFA 8% (4% final) pendant 1h à température ambiante ou une nuit à 4°C, puis de réaliser plusieurs lavages au PBS et à l'éthanol. Ces échantillons « pré-traités » ont donc été utilisés pour les tests suivants.

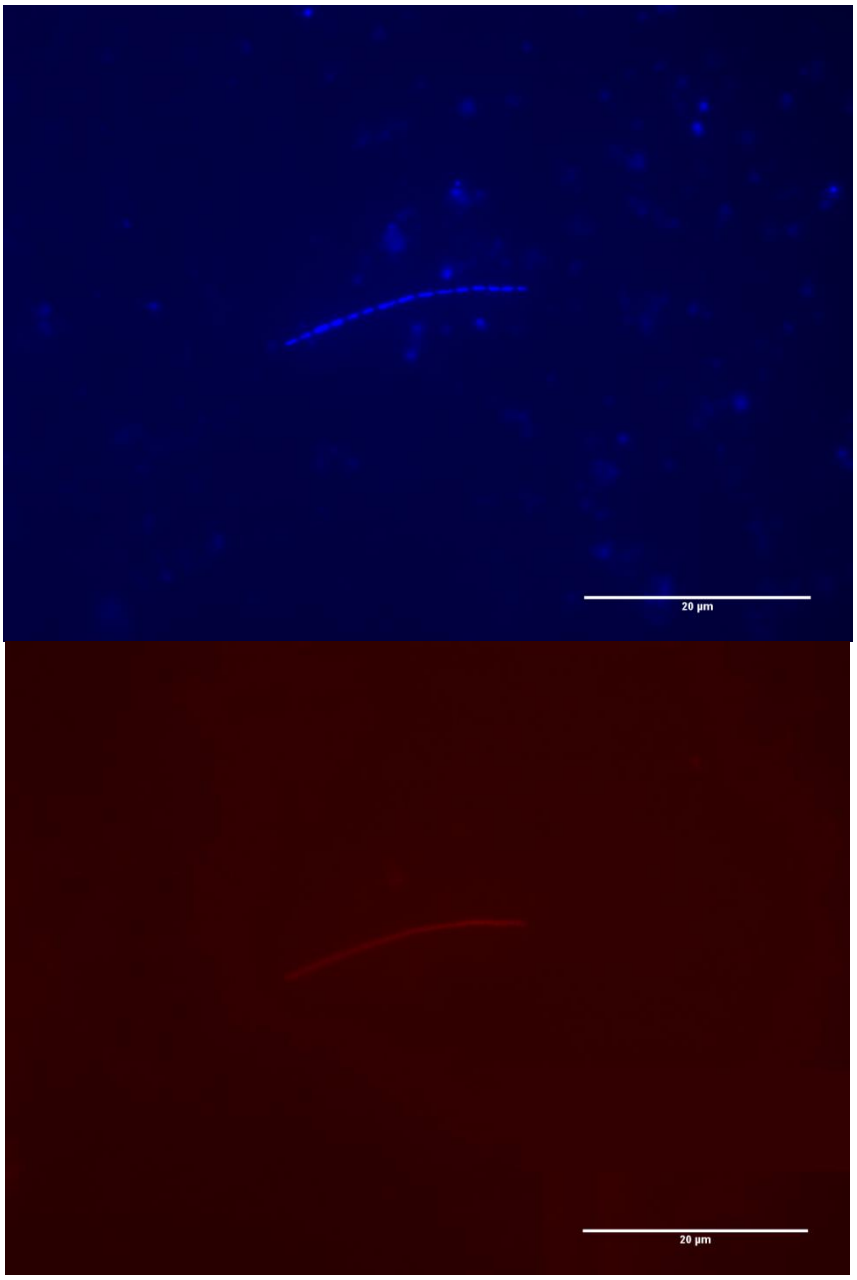


Figure 32. Photo d'une portion de filtre observée au microscope à épifluorescence (Axioskop2 mot *plus*, Caméra AxioCam MRm Zeiss, Oberkochen, Allemagne) marquant, en haut en bleu, les procaryotes (DAPI [excitation : 340-380, émission 425]) et en bas en rouge, les bactéries (Cy3 [excitation 530-560, émission 572-647]).

Finalement, il semblerait que les résultats obtenus permettent de quantifier les Bactéries dans les échantillons et que la méthode de fixation et d'extraction soit cruciale, en particulier dans les sédiments vaseux (**Figure 32**). Cependant cette technique n'a pas encore montré de résultats réplicables et n'a donc pas été poursuivie dans cette thèse puisque nécessitant encore de nombreuses améliorations, notamment pour le comptage des archées.

Chapitre 3. Une méthode rapide et efficace pour le comptage des procaryotes hétérotrophes dans les sédiments côtiers par cytométrie en flux

3.1 Contexte de l'étude

L'abondance des procaryotes hétérotrophes est un paramètre clé dans l'étude des écosystèmes. L'importance de ces procaryotes dans les écosystèmes n'est plus à démontrer et un des premiers paramètres à analyser est l'abondance de ces micro-organismes détermine leur importance au sein des écosystèmes. Jusqu'alors la méthode encore la plus utilisée est une méthode de comptage au microscope à épifluorescence (MEF) développée par Porter and Feig (1980). L'ADN des micro-organismes est marqué grâce à un fluorochrome intercalant de l'ADN, le DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Depuis, Robertson and Button (1989) ont proposé d'utiliser non plus une technique de comptage au microscope à épifluorescence mais une nouvelle technique de comptage via l'utilisation d'un cytométre en flux (CMF). Cette technique permet d'analyser un échantillon aqueux qui traverse une chambre d'analyse dans laquelle des lasers soumettent l'échantillon à différentes longueurs d'ondes (fixées par l'utilisateur), les cellules contenues dans l'échantillon, marquées par un fluorochrome sépcifique, renvoient une fluorescence dont les caractéristiques sont numérisées et exploitées par un logiciel. Cette technique permet non seulement de compter des particules marquées mais également d'enregistrer différents paramètres tels que leur complexité (angle formé avec le laser, proxy de la taille). L'utilisation de cette technique est de plus en plus généralisée pour de nombreuses applications mais dans le cas des sédiments, la problématique reste la nécessité de l'analyse en phase liquide. Ceci va donc demander des étapes 1) de fixation et conservation, 2) de dilution, 3) d'extraction/séparation des cellules de la matrice sédimentaire, et 4) de marquage, adaptées.

3.2 *An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry*

Lavergne Céline[1], Beaugeard Laureen[1], Dupuy Christine[1], Courties Claude[2], Agogué Hélène[1]

[1] LIENSs, UMR 7266 Université de La Rochelle – CNRS, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

[2] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

Journal of Microbiological Methods 105 (2014) 31–38

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry

Céline Lavergne [a,*], Laureen Beaugeard [a], Christine Dupuy [a], Claude Courties [b], Hélène Agogué [a]

[a] LIENSs, UMR 7266 Université de La Rochelle, CNRS, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France
[b] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

article info

Article history:
Received 25 March 2014
Received in revised form 1 July 2014
Accepted 1 July 2014
Available online 10 July 2014

Keywords:
Prokaryotes
Cell enumeration
Flow cytometry
Coastal sediments

abstract

Flow cytometry offers an easy and powerful way to assess multi-parametric data in different domains, notably in the environmental sciences. Because evaluating heterotrophic prokaryotic abundance is crucial to understand an ecosystem's functioning, we propose a quick and efficient protocol for (1) cell's detachment in muddy coastal sediments followed by (2) enumeration of prokaryotes by flow cytometry compared to epifluorescence microscopy and (3) a type of storage adapted for benthic samples. First, sample preparation by incubation in a detergent mix containing sodium pyrophosphate (0.01 M final concentration) and Tween 80 (0.1%final concentration) drastically increased cell detachment from sediment particles (+ 130.40%) compared to extraction with sodium pyrophosphate only. Cell sorting allowed to control the efficiency of the extraction as few cells were found attached to sediment particles in epifluorescence microscopy after sorting. Flow cytometry gave consistent results with strong reliability by counting 1.81 times more cells compared to epifluorescence microscopy. Thirdly, results revealed that sediment samples fixed with formaldehyde and then liquid-N_2 frozen and directly stored at − 80 °C can be analyzed within 3 months. In routine, our method of extraction and counting allowed to evaluate 83.67%of the real abundance in a sediment sample. Finally, this optimized technique was applied on sandy and muddy coastal and freshwater sediments and allowed us to prove the high efficiency of this new method. Flow cytometry is a fast, replicable and low-cost method for counting heterotrophic prokaryotes, even for sediment samples. The two-step method that we developed enables high frequency analyses (30 samples in less than 4 h).
© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microorganisms dominate marine ecosystems (DeLong et al., 2006) and were often considered as a "Black Box" by scientists (Fuhrman et al., 2002). To investigate this "Black Box," many studies have focused on new technologies and advances in molecular biology methods, allowing researchers to acquire a huge quantity of phylogenetic and potential physiologic information from oceans and marine coastal ecosystems. But these revolutionary "omics" data need to be completed by single-cell analysis, metabolic studies, and basic determination of prokaryotic abundances. Prokaryotes (Bacteria and Archaea) are key organisms in biogeochemical cycles in all marine environments (Azam and Malfatti, 2007; DeLong, 2009) and the first step to study these communities is to estimate their abundance within the microbial assemblage. Estimations of abundance showed that prokaryotes are as abundant as 10^6 cells mL^{-1} in ocean water (Whitman et al., 1998) and more than 10^8 cells mL^{-1} in marine surface sediments (Jørgensen and Boetius, 2007). In sediments, prokaryotes play a crucial role in the food web as they remineralize organic matter and lead major cycles such as nitrogen and carbon cycles. Most specifically, heterotrophic prokaryotes are a majority throughout the whole sediment depth and can be present until almost 2 km below the surface (Ciobanu et al., 2014).

The first advances in heterotrophic prokaryotic enumeration were made using epifluorescence microscopy (EFM) (Porter and Feig, 1980). Fluorochromes combined with EFM have been used to develop standardized methods to successfully count bacteria in freshwater and marine water columns (Daley, 1979). The most widespread way of staining cells is to target DNA with a fluorescent dye such as DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole), currently used in microscopy (Porter and Feig, 1980). Montagna (1982) showed under acridine orange (AO)–EFM observation that bacteria in muddy sediments occur at levels two orders of magnitude greater than in sandy sediments. Nowadays, EFM is still the most widespread technique for estimating the abundance of prokaryotes (see Supplementary Information Table 1 for references). Nevertheless, Robertson and Button (1989) were the first to use flow cytometry (FCM) to enumerate heterotrophic prokaryotic cells by DAPI-staining in marine and freshwater samples. Even if FCM seemed to be an accurate and rapid method for determining heterotrophic prokaryotic cells, advances were needed in storage conditions or fixative effects on benthic samples. These fixatives were known to permeate cells (Troussellier et al., 1995); consequently, the interactions between dyes

* Corresponding author. Tel.: + 33 5 46 50 76 44; fax: + 33 5 46 50 76 63.
E-mail address: celine.lavergne@univ-lr.fr (C. Lavergne).

http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.002
0167-7012/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

3.2.1 Abstract

Flow cytometry offers an easy and powerful way to assess multi-parametric data in different domains, notably in the environmental sciences. Because evaluating heterotrophic prokaryotic abundance is crucial to understand an ecosystem's functioning, we propose a quick and efficient protocol for 1) cell's detachment in muddy coastal sediments followed by 2) enumeration of prokaryotes by flow cytometry compared to epifluorescence microscopy and 3) a type of storage adapted for benthic samples. First, samples preparation by incubation in a detergent mix containing sodium pyrophosphate (0.01 M final concentration) and Tween 80 (0.1% final concentration) drastically increased cell detachment from sediment particles (+130.40 %) compared to extraction with sodium pyrophosphate only. Cell sorting allowed to control the efficiency of the extraction as few cells were found attached to sediment particles in epifluorescence microscopy after sorting. Flow cytometry gave consistent results with strong reliability by counting 1.81 times more cells compared to epifluorescence microscopy. Thirdly, results revealed that sediment samples fixed with formaldehyde and then liquid-N_2 frozen and directly stored at -80°C can be analysed within 3 months. In routine, our method of extraction and counting allowed to evaluate 83.67% of the real abundance in a sediment sample. Finally, this optimized technique was applied on sandy and muddy coastal and freshwater sediments and allowed us to prove the high efficiency of this new method. Flow cytometry is a fast, replicable and low-cost method for counting heterotrophic prokaryotes, even for sediment samples. The two-step method that we developed enables high frequency analyses (30 samples in less than 4 hours).

3.2.2 Introduction

Microorganisms dominate marine ecosystems (DeLong *et al.*, 2006) and were often considered as a "Black Box" by scientists (Fuhrman *et al.*, 2002). To investigate this "Black Box", many studies have focused on new technologies and advances in molecular biology methods, allowing researchers to acquire a huge quantity of phylogenetic and potential physiologic information from oceans and marine coastal ecosystems. But these revolutionary "omics" data need to be completed by single-cell analysis, metabolic studies, and basic determination of prokaryotic abundances. Prokaryotes (Bacteria and Archaea) are key organisms in biogeochemical cycles in all marine environments (Azam and Malfatti, 2007; DeLong, 2009) and the first step to study these communities is to estimate their abundance within the microbial assemblage. Estimations of abundance showed that prokaryotes are as abundant as 10^6 cells.mL^{-1} in ocean water (Whitman *et al.*, 1998) and more than 10^8 cells.mL^{-1} in marine surface sediments (Jorgensen and Boetius, 2007). In sediments, prokaryotes play a crucial role in the food web as they remineralize organic matter and lead major cycles such as nitrogen and carbon cycles. Most specifically, heterotrophic prokaryotes are a majority throughout the whole sediment depth and can be present until almost 2 km below the surface (Ciobanu *et al.*, 2014).

The first advances in heterotrophic prokaryotic enumeration were made using epifluorescence microscopy (EFM) (Porter and Feig, 1980). Fluorochromes combined with EFM have been used to develop standardized methods to successfully count bacteria in freshwater and marine water columns (Daley, 1979). The most widespread way of staining cells is to target DNA with a fluorescent dye such as DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole), currently used in microscopy (Porter and Feig, 1980). Montagna (1982) showed under Acridine Orange (AO)-EFM observation that bacteria in muddy sediments occur at levels two orders of magnitude greater than in sandy sediments. Nowadays, EFM is still the most widespread technique for estimating the abundance of prokaryotes (see Supplementary Information Table 1 for references). Nevertheless, Robertson and Button (1989) were the first to use flow cytometry (FCM) to enumerate heterotrophic prokaryotic cells by DAPI-staining in marine and freshwater samples. Even if FCM seemed to be an accurate and rapid method for determining heterotrophic prokaryotic cells, advances were needed in storage conditions or fixative effects on benthic samples. These fixatives were known to permeate cells (Troussellier *et al.*, 1995); consequently, the interactions between dyes and fixatives needed to

be taken into account when choosing dyes. During the exponential phase of FCM utilization for environmental marine samples, many dyes have been reported in the literature such as DAPI, Hoechst 33342, TO-PRO-1, SYBRGreen (I or II), SYTO13 etc… (details are reviewed in Gasol and Del Giorgio (2000)). With technological advances, FCM became more and more useful in marine microbiology and offered new challenges to scientists, such as the prokaryotic enumeration in soils and sediments and the use of specific probes (Fluorescence in situ hybridization - FISH) (Llobet-Brossa *et al.*, 1998). For sediment and soil analysis, the dye mostly used to stain DNA is SYBRGreen I (Kallmeyer *et al.*, 2008), and many authors fixed cells with formaldehyde (Epstein and Rossel, 1995) preferentially, but the best temperature for long time storage is still unclear.

FCM is now widely used for water column samples, but sediment samples carry the difficulties of a solid matrix rich in detritus, minerals and exopolymeric substances (EPS). Indeed, sediments are particularly hard to study because dyes (e.g. AO or DAPI) can produce a high fluorescence background with clay and silt-rich sediments containing a high quantity of detritus and EPS (Kuwae and Hosokawa, 1999). Additionally, in such environments, prokaryotic cells are often attached to sediment particles by EPS (Decho, 2000), creating a complex with organic and mineral particles (Epstein and Rossel, 1995; Kallmeyer *et al.*, 2008). The point of divergence between microbiologists remains the separation method to detach cells from the solid matrix. In order to improve counting yield in sediment, chemical dispersion and physical detachment should be applied. Physical detachment can be achieved by isoelectric method (Jaspers and Overmann, 1997), capillary electrophoresis (Schneiderheinze *et al.*, 2000), sonication bath (Ellery and Schleyer, 1984; Gasol, 1993; Duhamel and Jacquet, 2006), or probes (Albright *et al.*, 1986; Epstein and Rossel, 1995; Kallmeyer *et al.*, 2008), vortexing (Frischer *et al.*, 2000; Whiteley *et al.*, 2003), or by blender homogenization (Yamamoto and Lopez, 1985; Lindahl and Bakken, 1995; Maron *et al.*, 2006). The sonication probes appear to be the best way to mechanically detach prokaryotic cells from sediment particles, and applying it with an intensity of 60W for 30 seconds has been shown to be a good compromise between high counting yield and avoiding lysing cells (Garet, 1996; Lei *et al.*, 2010). Concerning the chemical dispersion solution, the most cited is the sodium pyrophosphate (NaPp), which is often found in detergent solutions in combination with Tween 20 (Amalfitano and Puddu, 2009) or Tween 80 (Epstein and Rossel, 1995; Duhamel and Jacquet, 2006), the phosphate buffer saline (PBS) solution (Barra Caracciolo *et al.*, 2005), the sodium chloride (Fazi *et al.*, 2005), or methanol (Lunau *et al.*, 2005; Kallmeyer

et al., 2008). Moreover, it is possible to apply a density gradient (Kallmeyer *et al.*, 2008; Morono *et al.*, 2013) after the chemical separation in order to improve the time and reliability of the counting (Fazi *et al.*, 2005). However, in the literature, it remains unclear which best dilution and detergent mix need to be applied to sediment samples in order to detach the maximum of aggregates and cells adsorbed on particles.

Nowadays, no simple and standardize method existed to study microorganisms in different type of sediments. On that basis, this study aims at optimizing sediments fixation and storage, cells separation and comparing two analysis methods (EFM and FCM) to count benthic heterotrophic prokaryotes.

3.2.3 Materials and Procedures

3.2.3.1 Sample collection, fixation and storage

Muddy sediments from the French Atlantic coast were sampled in the Moëze Bay and the Aiguillon Bay from the surface to 10 cm-deep. The sediment samples were collected in 2012 and 2013 at low tide using cores (15 cm diameter). Back in the laboratory (less than one hour), the sediments were homogenized, and sub-samples were put in containers using sterile 50 mL syringes with cutoff tips. Finally, subsamples were fixed with 0.2 µm-filtered formaldehyde solution (vol/vol, 2% final concentration) and kept according two conditions: at +4°C in the dark or frozen in liquid-N_2 directly followed by storage at -80°C. Different storage times were tested on five different muddy samples in duplicates: 1 week, 1 month, 3 months, and 6 months after sampling.

3.2.3.2 Protocol development

Here, we described the proceedings of the protocol development. Different steps of the procedure were investigated in order to improve the enumeration of prokaryotes in sediment: 1) sample preparation before mechanical extraction; 2) utility of centrifugation to remove sediment particles; 3) repetitive steps of extraction to improve cell counting yield (**Figure 39**).

3.2.3.2.1 Sample preparation before mechanical extraction

First tests were achieved by preparing sediment slurries with a solution of NaPp 0.01M (Tso and Taghon, 1997; Pascal *et al.*, 2009). Then, in order to disaggregate the attached cells, Tween 80 (0.1% final concentration) was added to the NaPp solution (0.01 M). Indeed, Tween 80 is a non-ionic surfactant known to decrease particle aggregates and to enhance

detachment of cells from particles in sediment samples (Velji and Albright, 1986; Yoon and Rosson, 1990). The influence of Tween 80 addition on the cell recovery efficiency was evaluated on 55 samples. According to preliminary tests, using NaPp solution or NaPp+Tween 80 mixture, slurries were prepared by processing to successive dilutions until 1:2,000 (1:10; 1:100; 1:500; 1:1,000 and 1:2,000) to reduce sediment background (dos Santos Furtado and Casper, 2000; Duhamel and Jacquet, 2006). A vortexing step of 5 sec was applied before and after each successive dilution.

According to Epstein and Rossel (1995) and Velji and Albright (1986) recommendations, 30 minutes of incubation at +4°C was used to detach cells from sediment particles. Then, mechanical extraction consisted of sonicating samples 30 s at 60W in ice with a sonicator probe (Branson, SLPE-150, 1/8" or 3 mm microtip, 40KHz) (Lei *et al.*, 2010).

3.2.3.2.2 Utility of centrifugation to remove sediment particles

The impact of a centrifugation step was tested by applying or not a low speed centrifugation. A first part of extracted samples was centrifuged at 1 000 g at +4°C during 1 min, after which supernatant was transferred and then stained for EFM and FCM analysis (see below for staining settings). On the second part of extracted samples, a proportion was mixed, transferred and then stained for EFM and FCM analysis and centrifugation was applied on the remaining proportion to collect sediment and attached cells for a second extraction step.

In any case, after centrifugation step, the remaining supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in the detergent mix [0.01 M NaPp and Tween 80 (0.1% final conc.)] with the same volume of supernatant. By this way, the cells remaining attached to the sediment particles in the pellet can be detached and counted in a second step.

3.2.3.2.3 Repetitive steps of extraction to improve cell counting

Because cells can be still attached to sediment particles even after the first extraction, we evaluated the number of repetitive extraction steps needed to improve cell counting yield. The second step was processed as the first one, by incubating the samples in the detergent mix [0.01 M NaPp and Tween 80 (0.1% final conc.)] for 30 min at +4°C. Then, sonication was repeated (same settings as above) before the analysis.

Aiming at evaluating how many steps were needed, extraction process was repeated until cells recovery reaches a plateau on 15 different samples. Thus, the total prokaryotic cell

abundance corresponded to the sum of all the counting values obtained in each extraction step.

3.2.3.3 Microscopic count

Extracted samples were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 250 $\mu g.ml^{-1}$, 15 min, +4°C) and filtered through black polycarbonate membrane (0.2 µm pore size, 25 mm, Nucleopore) (Porter and Feig, 1980). Next, filters were mounted on slides using anti-fading oil type F (Olympus, Japan), and conserved at -20°C until counting. Finally, counts were made with an epifluorescence microscope (Axioskop2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, United-States) at 1,000 x magnification under UV excitation (Filter set 01, 397 nm – Zeiss). For each sample, a minimum of 20 fields (> 600 cells) were counted and averaged (Lebaron *et al.*, 1994).

3.2.3.4 Flow cytometric and cell sorting analysis

For each extraction step, the flow cytometric analysis consisted of SYBRGreen I-stained (1:10,000 final concentration) extracted sample during 15 min in the dark at room temperature. Fluorescent beads (Fluoresbrite Multi fluorescent microsphere 1.0 µm, Polysciences, Germany) were added simultaneously to each sample in order to analyze cell fluorescence and scatter properties of samples. Each sample was analyzed for 30 s at low flow speed with FacsCanto II cytometer (3-laser, 8-color (4-2-2), BD Biosciences) equipped with a 20-mW 488-nm coherent sapphire solid state blue laser. Data were acquired using DIVA software provided by BD-Biosciences.

A cell sorter (FACSAria BF-Biosciences) was used to control extraction yield on prokaryotic population. Then, sorted fraction were observed using EFM (BX300, Olympus) to take pictures.

Stained cells were discriminated according to green fluorescence (FL1) from SYBRGreen staining and side scatter properties (SSC). Picophytoplanktonic cells are also discriminated based on their red fluorescence (FL3) and SSC properties and excluded from final prokaryotic counts measured on a gate SSC-FL1 (Marie *et al.*, 2001).

Accurate cell concentrations were performed using TruCount beads from BD-Biosciences (excitation: red laser 633 nm; emission: FL5 660/20 nm).

3.2.3.5 Statistical analysis

All statistical analysis was performed using R software (R core Team, 2013). The effect of the addition of Tween 80 was tested with a Paired t-test. The influence of the

parameters tested or percentage of sand in samples was evaluated by applying a Kruskal-Wallis rank sum test for one sample and Wilcoxon test for two paired samples on cell abundance values. The relationship between FCM and EFM was shown by fitting a significant linear regression. Effects of storage conditions were tested with a 2-way analysis of variance (ANOVA), residuals were tested for application validation and a TukeyHSD post-hoc test was used.

3.2.4 Results

Hereby, we described the results of the protocol development proceedings and then the final protocol that we succeed to establish.

3.2.4.1 Sample preparation

First, slurries were prepared with NaPp 0.01M alone and cell sorting flow cytometry followed by EFM observations were used to visualize the extracted populations. Two populations were observed: free prokaryotic cells population and attached-prokaryotic cells population. The NaPp alone at 0.01 M was apparently not efficient enough to separate cells from sediment particles, because attached prokaryotic cells were still present in the samples and represented 27.7% of the total abundance. On this basis, the effect of adding Tween 80 was evaluated to minimize cell aggregation (Yoon and Rosson, 1990). Both FCM and EFM counting revealed a higher cell counting yield (**Figure 33**), with an increase of 130.40 % ± 12.49 SE and 176.79 % ± 14.25 SE respectively, compared to the treatment without Tween 80. Adding Tween 80 to NaPp in the mixture significantly improve the number of cells counted in FCM (Paired t-test: t = -9.6127, df = 54, *p*-value <0.001) and EFM (Paired t-test: t = -27.1056, df = 35, *p*-value <0.001). After two repetitive steps, cell recovery efficiency rose from 43.3 % ± 2.0 SE without Tween to 92.5% ± 2.0 SE with addition of Tween 80. Moreover, microscopic analysis on sorted populations confirmed that the counted cells were free cells, clearly separated from sediment particles when Tween 80 was added to the mixture. Consequently, it appears that Tween 80 disaggregated efficiently benthic cells and therefore improved the cell counting results (**Figure 33**). The recommended protocol is thus to use sodium pyrophosphate (NaPp) and Tween 80 treatment to prepare sediment samples for heterotrophic prokaryotes enumeration by FCM (**Figure 37**).

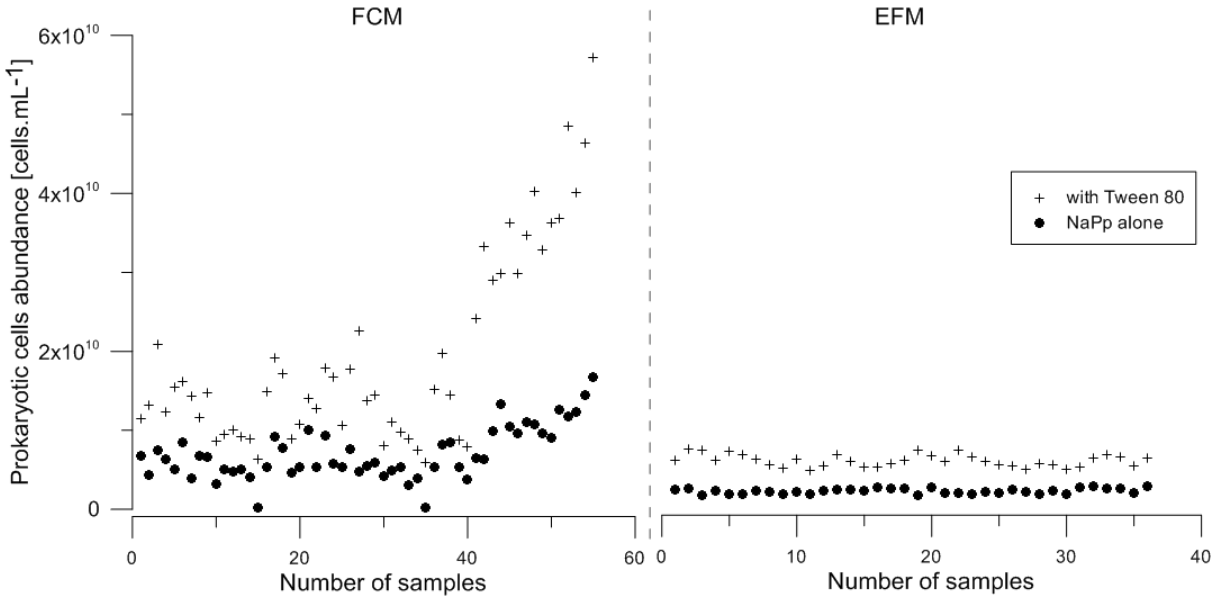


Figure 33. Effects of the addition of Tween 80 to sodium pyrophosphate (NaPp) on prokaryotic cell abundance in sediment samples (FCM counts from SYBRGreen: n = 55; EFM counts from DAPI: n= 36). Values for all the samples tested are presented. Crosses represented samples extracted with Tween 80 and NaPp, and circles represented samples extracted with NaPp alone.

3.2.4.2 Utility of centrifugation

The utility of a centrifugation step before counting analysis was tested by performing an experiment with and without low speed centrifugation (1,000 g, 1 min, +4°C). Experiments showed that centrifugation moderately decreased cell counts (-1.71%) in FCM and EFM because cells that remained attached to the particles were removed (data not shown). Settling velocities of sands have been calculated according to Soulsby (1997), and we evaluated that the settling time of particles is inferior to the standing step applying on cytometer to acquire data before recording. Indeed, particles of 62 µm will take 4.8 seconds to settle in the tube and the cytometer takes 5 seconds to acquire and 10 seconds to record. The particles cannot collapse the flow cell chamber. Thus, we proposed to analyse samples without the centrifugation step and then to centrifuge samples afterward to proceed to a second cells extraction on the pellet.

3.2.4.3 Repetitive steps of extraction

After the first extraction, 57.04 % ± 2.58 SE of cells were extracted and counted. The cumulative cell recovery increased strongly and reached a plateau after the fourth extraction (**Figure 34**), showing that in routine analysis it will not be necessary to do more than four extractions. The coefficient of variation of the first extraction was the highest, reaching 17.52 %. The strongest decrease in CV was observed between the first and the second extraction (**Figure 34**) showing that the second extraction allowed counting a higher number of cells (83.67% ± 0.94 SE) with a lower imprecision (CV < 5%). After that, the CV continued to decrease with lower range values. Doing eight extractions can be time consuming and expensive. In our case, with sediment samples, eight extractions were not necessary. Thus, for routine analysis of benthic samples by FCM, we propose a 2-step extraction as a good compromise among 1) cell recovery efficiency (83.67% ± 0.94 SE) and accuracy (CV = 4.34); and 2) analysis time (4 hours for 30 samples) and cost.

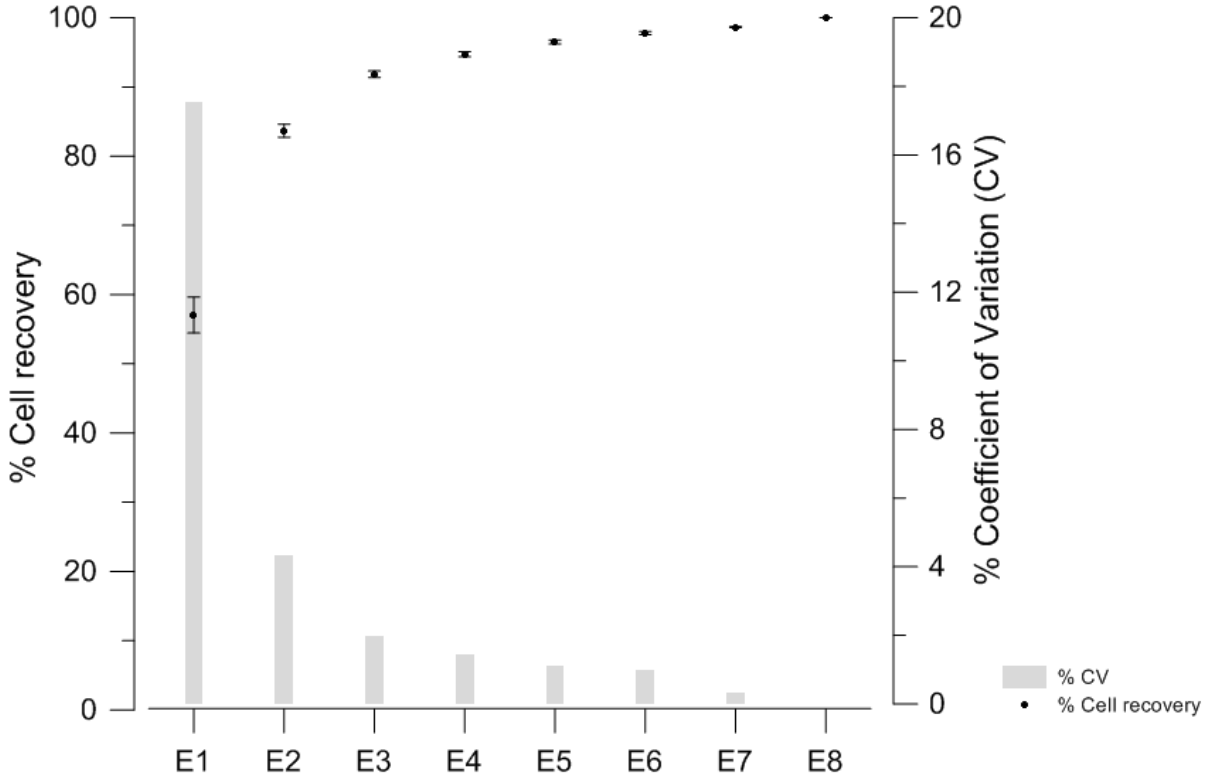


Figure 34. Cumulative percentage of cell recovery using the final extraction protocol (extended to eight extractions), counting by flow cytometry (FCM) and percentage coefficient of variation (% CV) (n=15). Black dots represent cell recovery efficiency with standard errors and grey bars represent % CV, E = extraction number.

3.2.4.4 Microscopy versus flow cytometry

Fifty five muddy samples were tested and highly significant correlations were found between EFM and FCM counts (**Figure 35**; t-test: R^2= 0.615, df =53, p-value <0.001). Moreover, cell abundance estimated by FCM was always higher than cell abundance counted by EFM, by a factor of 1.81. Thus, EFM and FCM results followed the same trends but FCM always allowed detecting more cells than EFM. We prove by this way that the traditional method by EFM need to be re-evaluated and that FCM can be a better method to assess the heterotrophic prokaryotic abundance.

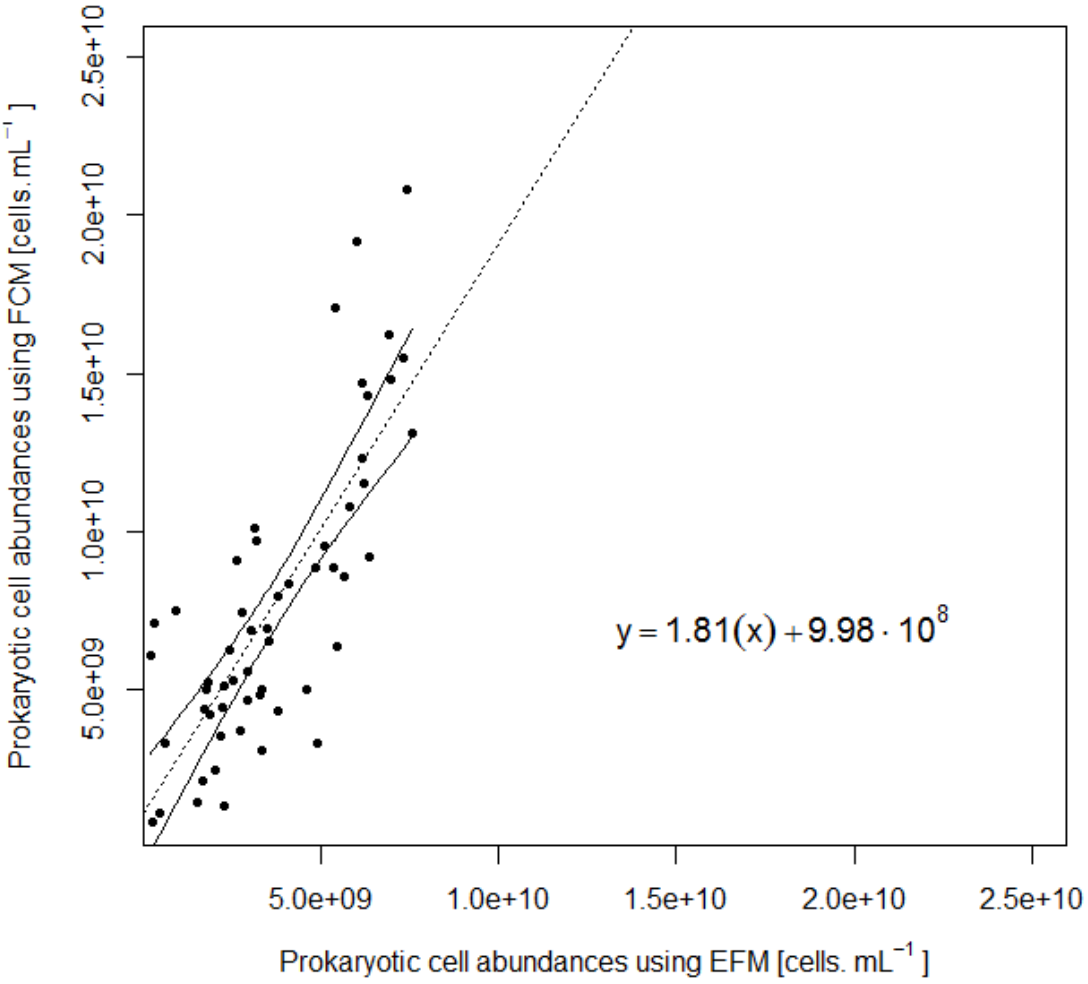


Figure 35. Linear regression between prokaryotic cell abundance determined by flow cytometry (FCM) and observed by epifluorescence microscopy (EFM). Samples come from the Moëze mudflat at different depths and sampling seasons (n=55), dot line corresponding to the regression line and envelopes represent 95% confidence intervals. Significant adjusted R-squared: 0.615 (t-test: F-stat : 87.3, df =53, p-value <0.001).

3.2.4.5 Which type of storage?

The influence of storage conditions on prokaryotic cells was studied. After the first month of storage, a loss of 24.46 % ± 4.5 SE of cells was observed under the two storage conditions (-80°C and +4°C). After that, prokaryotic abundances remained stable until 6 months (-4%; **Figure 36**). High standard error bars on Fig. 4 were due to the differences in prokaryotic abundances between sample depths, but the results brought out that prokaryotic abundances in samples stored at -80°C tend to be higher than in those conserved at +4°C. A significant difference was detected between T0 and 12 weeks after sampling (Tukey HSD; *p*-value<0.05), nevertheless, neither the temperature of storage nor the interaction with time influenced the abundance of prokaryotes counted (2-way ANOVA, *p*-value > 0.05). After 3 months, the abundances measured with the final protocol were more variable. The recommended protocol is to store fixed sediment samples at -80°C (as for water samples, (Marie *et al.*, 1997)) and to analyse samples within 3 months after sampling.

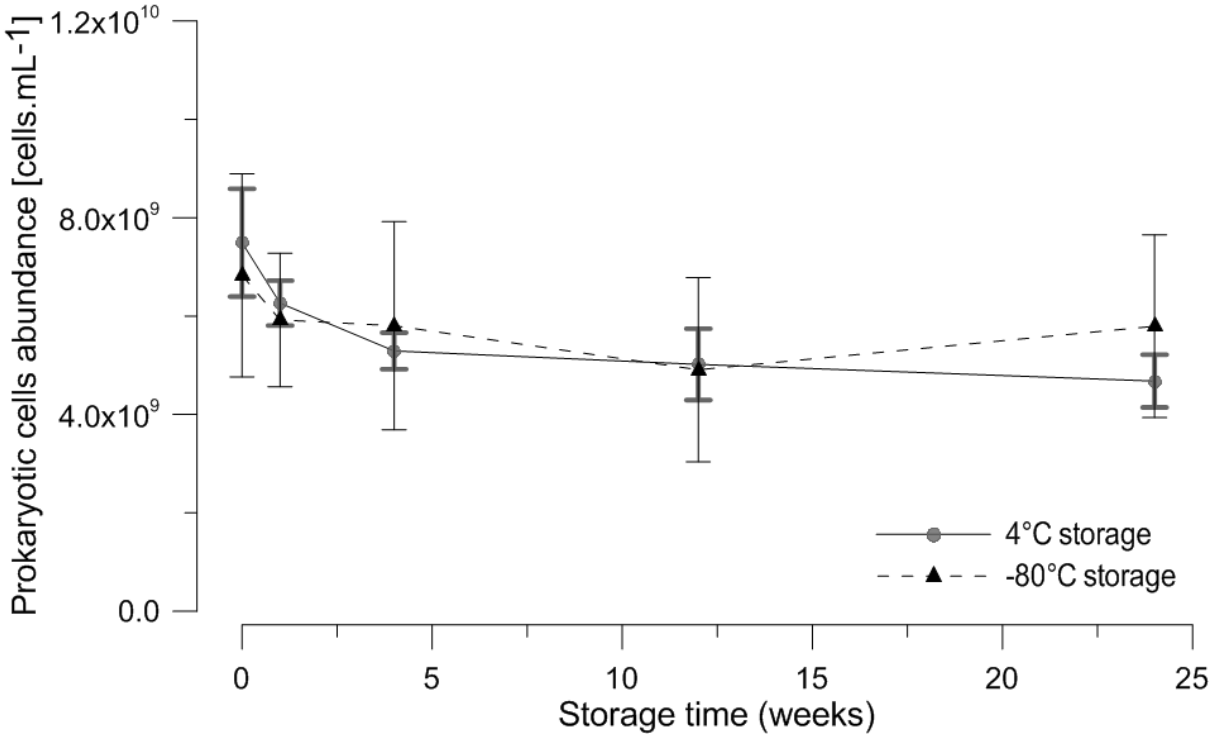


Figure 36. Effects of storage temperature and time on heterotrophic prokaryotic cell abundance obtained by flow cytometry (FCM) with the two-step protocol (mean values +/- standard errors from five samples in duplicate are shown).

3.2.4.6 Final protocol

All the assessments above resulted in a final protocol. This final protocol (**Figure 37**) detached and homogenized cells in sediment samples thanks to 2 successive extractions (§3.2.4.3) and allowed to count the prokaryotic cells using FCM.

1) Samples were prepared and extracted using: a dilution (1:1,000 to 1:2,000) in a detergent mix (§ 3.2.4.1) [sodium pyrophosphate (0.01 M) + Tween 80 (0.1%)] and a vortexing step and 30 min of incubation at +4°C. After the vortexing step, a sonication separation for 30 sec (60W) in ice with a sonication probe (3 mm) was applied. Without any centrifugation step (§ 3.2.4.2), an aliquot of the sample was stained with SYBRGreen I (1:10,000) 15 min in the dark and analyzed by flow cytometry (FCM).

2) the remaining part of the sample was centrifuged at low speed (1 min at 1,000 g at +4°C); the pellet was then resuspended in the detergent mix and step 1 was repeated once more.

Using this two-step protocol, 83.67% ± 3.63 SD (§3.2.4.3) of total cells can be extracted from a solid matrix and counted by SYBRGreenI-stained FCM.

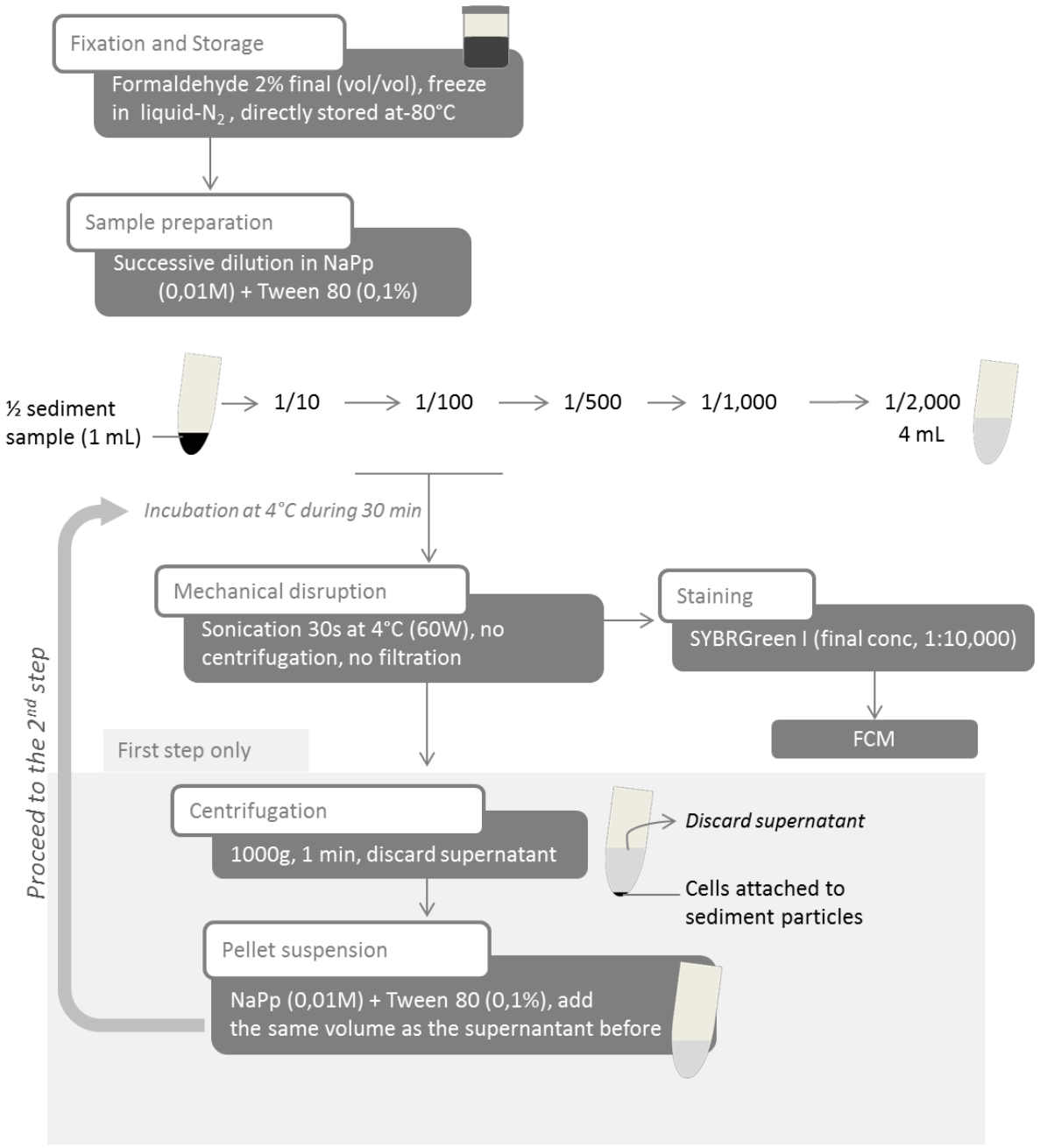


Figure 37. Final protocol of the improved two-step separation method. FCM = Flow Cytometry ; NaPp = sodium pyrophosphate.

3.2.4.7 Application on different types of sample

To validate the protocol, the method for FCM analysis was applied to sandy, sandy-mud and muddy sediments from different locations with different values of sand contents (from 0 to 90%) following a range of silt/sand content. For each sample, the cell recovery percentages of the first step extraction were high, by mean 61% ranging from 55% to 68% (**Figure 38** &**Table 9**). The cell recovery efficiencies of these samples were in the same range and there were no significant effects of the sand content on the cell recovery of the first extraction (Kruskal-Wallis test; $\chi^2 = 5$; df = 5; *p*-value = 0.4159). These results showed that our developed method is efficient for sandy, sandy-mud and muddy sediments tested whatever the location and sand content or composition.

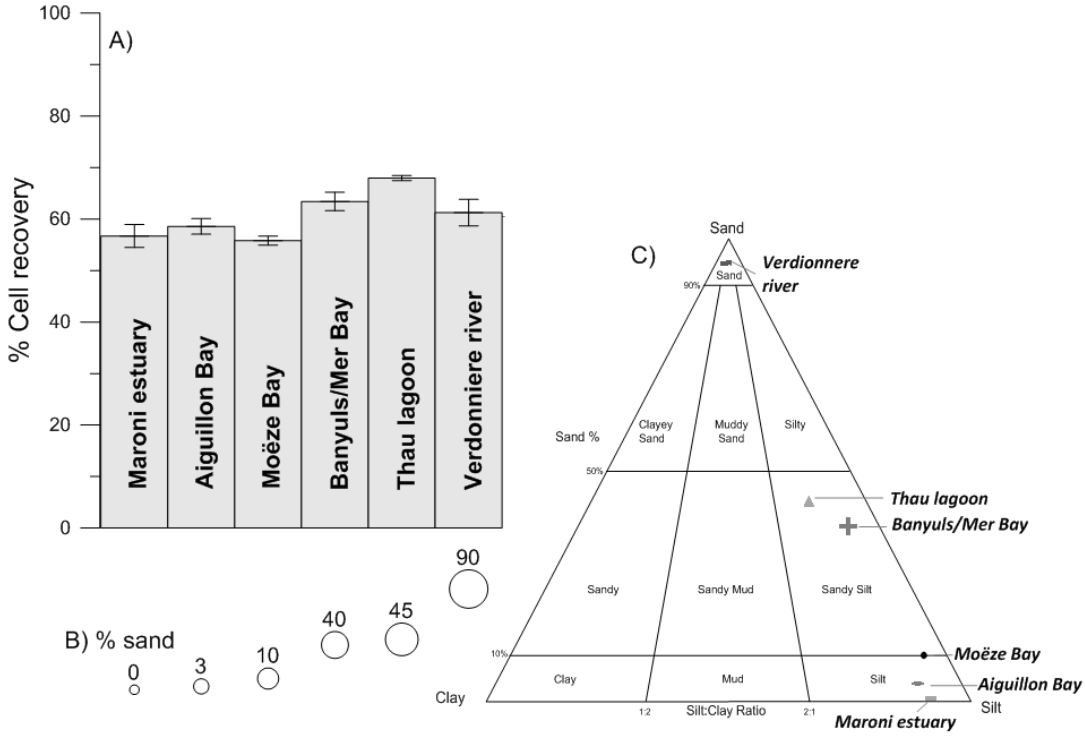


Figure 38. A) Percentage of cells extracted after the first step by applying our two-step extraction method followed by FCM heterotrophic prokaryotic enumeration on sandy and muddy sediment samples from diverse locations with a range of sand percentages. B) Sand percentages for each sample. C) Sand/Silt/Clay diagram for each sample.

3.2.5 Discussion and Conclusions

Flow cytometry (FCM) is now widely used for water column analysis in order to estimate autotrophic diversity and abundance, and to enumerate heterotrophic prokaryotes (Legendre *et al.*, 2001). For sediment analysis, technical advances have been made but not well optimized to get an efficient and rapid method for FCM. The main difficulty remains the necessary step of cell preparation and separation from sediment which need to be adapted for each sediment type (Duhamel and Jacquet, 2006). Many authors have tried to find the best protocol for separating prokaryotic cells from a solid matrix. One particularly powerful way seems to be the density gradient application on various sediments (Aakra *et al.*, 2000; Whiteley *et al.*, 2003; Lunau *et al.*, 2005; Amalfitano and Fazi, 2008; Kallmeyer *et al.*, 2008; Morono *et al.*, 2013), but these techniques are relatively time-consuming and expensive. The present study demonstrates a quick and efficient protocol for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments.

Since EFM is the classic method of counting heterotrophic prokaryotic cells in sediment, our protocol of extraction followed by FCM analysis needs to be validated by EFM. We compared the cell abundance obtained by EFM (DAPI-stained cells) and FCM (SYBRGreenI-stained cells). The staining protocol used was different with the two methods (i.e. DAPI preferentially bind on A and T bases). The choice was to compare the traditional protocol (DAPI-stained cells) and the most used protocol in FCM (SYBRGreenI-stained cells). It is known that the two dyes may differ in terms of binding and affinity on DNA and RNA (simple and double-stranded) (Marie *et al.*, 1997; Troussellier *et al.*, 1999) and thus can produce different results. Nevertheless, DAPI-stained samples (sorted and non-sorted sediment samples) were counted using FCM equipped with a violet laser (407 nm). Cytograms were weakly exploitable because DAPI fluorescence yield was not optimal at 407 nm (optimal wave length = 375 nm) resulting in a low signal resolution and thus high fluorescence background of DAPI (data not shown). Moreover, observations of SYBRGreenI-stained cells under EFM were not satisfactory.

Finally, FCM appeared to be a consistent method to count benthic prokaryotes as it allows the detection of 1.81 times more cells than EFM with a significant correlation. The explanation could be that EFM is human-dependent and biased by the cell location of the filter (can be hidden by sediment particles). FCM allows assessment of particle count as well as multi-parameters analysis for each cell (Porter *et al.*, 1997; Bouvier *et al.*, 2001). The use of FCM increases counting efficiency as compared to the classic EFM method, and the estimation of prokaryotic abundance is consistent.

Liquid N_2 storage is the most widely used method of conserving prokaryotic cells in water samples for FCM analysis (Vaulot *et al.*, 1989), but in the case of benthic prokaryotic cells, samples are usually directly counted or stored at +4°C before EFM counting (Ellery and Schleyer, 1984; Epstein and Rossel, 1995). We then propose to fix the sediment samples with 2% formaldehyde solution and after liquid-N_2 fixation, store them immediately at -80°C and then count within 3 months after sampling.

Many authors had proposed protocols for FCM analysis including a centrifugation step and/or a filtration through 5 µm because it can limit detritus clogging in the cytometer nozzle (Duhamel and Jacquet, 2006). The present study brings out that without centrifugation, the sediment particles can settle in the tube and did not accumulate in the flow cytometer nozzle, and FCM analysis was possible. To develop a rapid and easy protocol, we proposed to analyse samples without the centrifugation step and then to centrifuge samples afterward to proceed to the second extraction (on the pellet).

Taking into considerations all these features, the development of the protocol focused on a method of cell separation to define a simple, inexpensive, and rapid method to enumerate prokaryotes in sediment.

Kallmeyer *et al.* (2008) extracted between 65 and 100% of prokaryotic cells in deep subsurface sediments by applying a bilayer density gradient. In soil, Barra Caracciolo *et al.* (2005) also used a bilayer gradient density as well, and were able to extract up to 77% of total prokaryotic cells. More recently, Morono *et al.* (2013) applied a multilayer density gradient on samples from marine subsurface and obtained from 50 to 80% cell recovery. Lunau *et al.* (2005) worked on muddy and sandy sediments and opted for a low-speed centrifugation method combined with a methanol purification step; by an EFM analysis, they achieved 54 to 114% cell recovery. Even if the cell recovery had been found to be variable among the physico-chemical parameters of a solid matrix (Maron *et al.*, 2006), we confirmed that our method is consistent and quicker, and can be applied to different kind of benthic samples. It allows the extraction of a large quantity of prokaryotic cells (between 10^8 and 10^{10} cells.mL^{-1}) and the possibility of determining prokaryotic abundances (83.67% mean cell recovery).

Nevertheless, it is clear that some optimization details must be done for each type of samples. We suggest staining cells with more concentrated SYBRGreen I (1:5,000 final concentration) if the prokaryotic population is not easily distinguishable from background noise due to organic and mineral matter. Obviously, during the FCM analysis, threshold and fluorescent parameters must be adapted to population characteristics as well as the dilution of the sample.

Our two-step extraction method is simple to apply, as it allows the estimation of heterotrophic prokaryotic abundance of 30 sediment samples within 4 hours. This method was applied successfully on different types of sediments (muddy and sandy, coastal marine sediments and freshwater sediment) and among the different types of sediments, our method was reproducible. Moreover, these applications showed that our method was suitable not only for coastal sediments but also for freshwater sediment (from the Verdonniere river streambed, France). Aiming at finding a method suitable for a large range of sediments samples, this study prove that our optimized method offers a better efficiency for different marine sediment types even for freshwater sediments. In soils, Williamson *et al.* (2013), showed a strong influence of clay content and recommended testing the influence of the extraction mixture prior to analyse the samples. Further analyses remain possible to establish whether our two-step protocol is efficient on clay-containing sediments.

This fast protocol using FCM is a methodological issue but is also crucial for ecological studies by allowing in the end a better understanding of marine benthic ecosystems. Finally, we can confirm that our protocol worked well for turbid water with high organic matter content in a study on prokaryotic community distribution among a salinity gradient in the Charente River (France). For this study, the dilution was adapted because prokaryotic abundance was between two and three orders of magnitude less than in the sediment samples.

In the future, we are convinced that our study can be useful for assessing activity, productivity or diversity analysis in sediments. Although, the abundance of prokaryotes is a central parameter to measure in all ecosystems, the next step to understand the functioning is evaluating the unknown genetic diversity (Karl, 2007; DeLong, 2009). And activity and productivity are powerful indices to characterize the community and are needed to show the key role of prokaryotic community in biogeochemical cycles. The combinations of our protocol and cell sorting (Wang *et al.*, 2010) can be a great progress for sediment analysis. With cell sorting, it will be possible to sort cells according to their average side-angle-scattered (SSC) light (Bernard *et al.*, 2000) (proxy of size-class) for example and then do diverse analysis on different population of the prokaryotic community.

3.2.6 Supplementary Information

Table 8. Extraction, fixation and staining methods in literature

Sample type	Fixation (final concentration)	Chemical separation	physical disruption	Centrifugation	Additional step	% recovery efficiency	Organisms	Staining (method)	References
Turbid seawater	Glutaraldehyde (2%)	Sterile seawater + 0.001% Tween 80	Sonication probe 10W 30s + blending 5 min at 22000 rpm	-			Prokaryotes	DAPI (EFM)	Yoon and Rosson (1990)
Lake sediments	Formaldehyde (2%)	10 mM NaPp + 10% Tween 80 + MilliQ Water	Sonication 3 min stopped for 30s every minute+ shaking	800g 1 min RT	Filtration through 5-µm filter	-	Prokaryotes, Viruses	SYBRGreen II (EFM + FCM)	Duhamel and Jacquet (2006)
	Formalin (3%) 4°C	-	-	750g 10 min 4°C	-	-	Prokaryotes	DAPI (EFM)	dos Santos Furtado and Casper (2000)
	Paraformaldehyde (4%) 4°C	10 mM NaPp + 120 mM NaCl + 10 mM NaPO4	Sonication bath 15 min	-	-	-	Prokaryotes	DAPI (EFM)	Gough and Stahl (2003)
Streambed sand	Formaldehyde (2%)	0.1 % NaPp + 0,5% Tween 20	Shaking 30 min, 720 rpm + sonication 1 min 20W	14000 g 90 min 4°C	NGD[b]	93%	Prokaryotes	DAPI (EFM) SYTO13 (FCM)	Amalfitano and Fazi (2008)
Marine Sediments									
- *Sands and muddy sediments*	Glutaraldehyde (2%)	10 mM P2O7	3 min sonication	800g 1 min RT		60%	Virus	SYBRGreen I	Danovaro *et al.* (2001)
- *Sandy sediments*	Formaldehyde (4%)	1:1 PBS/Ethanol	Sonication min power 20s	-	3 washes before storage	-	Prokaryotes	DAPI (CARD-FISH)	Ishii *et al.* (2004)
	Formaldehyde	Sterile seawater + 0.0001 % Tween80	Sonication bath 200W 2.5 min	-	-	-	Prokaryotes	AO (EFM)	Ellery and Schleyer (1984)
	Formaldehyde (4%) 4°C	0.1 mM NaPp + 0.0001% Tween80	Sonication probe 3x60s 109µm	500g 5min RT	8 washes		Prokaryotes	DAPI (EFM)	Epstein and Rossel (1995)
- *Deep subsurface sediments*	Formaldehyde (2%) 6h 4°C + washing steps	DT[a]	Shaking 60 min 500 rpm + sonication probe 20 W 1 min	4500g 15 min and 15000 300 min	MlGD[c]		Prokaryotes	SYBRGreen I (FCM)	Morono *et al.* (2013)
	Formaldehyde (2%) 4°C	DT[a]	Vortexing 60 min + sonication probe 5x10 s	3000g 10 min RT	Carbohydrates dissolution + 2 NGD[b] steps	65 to 100%	Prokaryotes	SYBRGreen I + 0.1% *p*-phenylenediamine (EFM)	Kallmeyer *et al.* (2008)
- *Muddy sediments*	-	10% methanol	Sonication bath 320W 15 min 35°C	190g 1min	-	54-114%	Prokaryotes	SYBRGreen I (EFM)	Lunau *et al.* (2005)
Soil	no fixation	0.2% NaP2O7	0.5h intensive shaking	600g 5 min RT		45%	Bacteria, fungi	DAPI (EFM)	Riis *et al.* (1998)
	Formaldehyde (2%)	PBS+Tween20 + NaPp	Shaking 15 min at 400 rpm (orbital shaker)	14000g 90 min 4°C	NGD[b] + filtration through 0,2-µm filter	77%	Prokaryotes	DAPI (FISH)	Barra Caracciolo *et al.* (2005)
Aquifere	Formaldehyde (0,5 %)	0.1% NaP2O7	Shaking 60 min at 155 rpm at 25°C	-	-	-	-	Propidium iodide (EFM)	DeLeo and Baveye (1996)
	Formaldehyde (2%)	PBS+ 0,5% Tween20	Shaking 15 min at 400 rpm (orbital shaker)	14000g 90 min 4°C	NGD[b] + filtration through 0,2-µm filter	78%	Prokaryotes	DAPI +(FISH)	Barra Caracciolo *et al.* (2005)

[a]DI-H2O + 100mM EDTA + 100mM NaPp+ 1% Tween80 + NaCl + MeOH

[b]Nicodenz gradient density

[c]Multilayer Gradient density

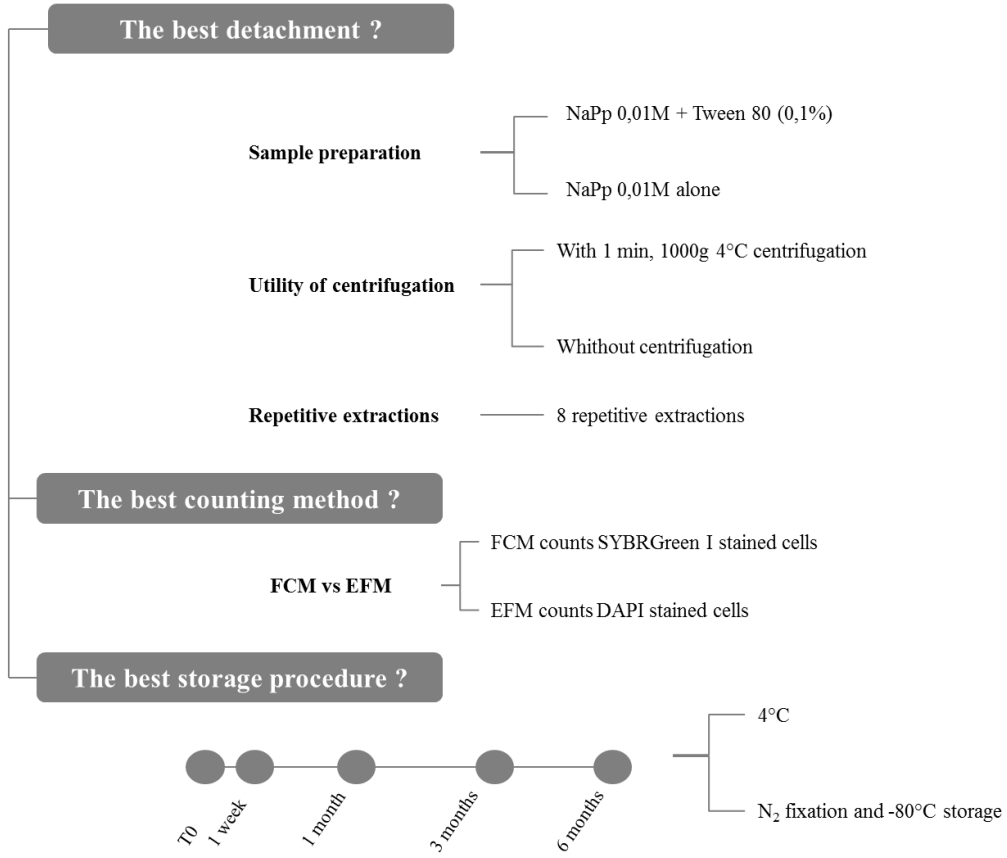


Figure 39. Searching for the best protocol for enumeration of heterotrophic prokaryotes in sediments

Table 9. Heterotrophic prokaryotic abundance (mean ± SE) in different sediments tested and cell recovery (% with mean ± SE, min and max) of the first extraction using the two-step extraction protocol analysed by flow cytometry (FCM).

	Prokaryotes abundance [cells.mL^{-1}] mean +/- SE			% sand	Cell recovery [%]				
					Mean (+/- SE)			Min	Max
Salt Lagoon sediment									
Thau lagoon (n=48), France	$1.53.10^{9}$	+/-	*$4.46.10^{7}$*	45 [a]	67.98	+/-	*0.49*	60.72	75.06
Intertidal Mudflat sediment									
Moëze Bay (n=45), France	$7.31.10^{9}$	+/-	*$2.92.10^{8}$*	10	55.81	+/-	*0.87*	40.77	65.96
Aiguillon Bay (n=42), France	$1.40.10^{10}$	+/-	*$4.34.10^{8}$*	3 [b]	58.57	+/-	*1.51*	32.31	69.35
Maroni estuary (n=9), Surinam	$3.99.10^{9}$	+/-	*$3.37.10^{8}$*	0	56.70	+/-	*2.23*	38.16	68.72
Sandy muddy coastal sediment									
Banyuls s/ mer Bay, France Proteic enrichment (n=32)	$2.81.10^{10}$	+/-	*$5.52.10^{8}$*	40	62.81	+/-	*1.29*	38.14	72.90
Banyuls s/ mer Bay, France Glucidic enrichment (n=60)	$1.46.10^{10}$	+/-	*$3.47.10^{8}$*	40	64.03	+/-	*0.88*	41.56	72.75
Sandy streambed sediment									
Verdonniere River (n=11)	$6.75.10^{9}$	+/-	*$1.41.10^{9}$*	90	61.25	+/-	*2.57*	48.86	81.59
				TOT	**61.02**	+/-	***1.40***		

[a] Ifremer (2008)

[b] Bocher *et al.* (2007); Compton *et al.* (2008)

3.3 Conclusions

Dans cette étude, un protocole optimisé a été décrit permettant d'extraire les cellules procaryotiques du sédiment et de les compter via la méthode de cytométrie en flux (CMF).

Ce protocole a été développé afin d'extraire un maximum de cellules tout en étant rapide pour une analyse en routine. Il est divisé en deux étapes :

(1) les échantillons préalablement fixés au formol (1/2 vol:vol) sont diluées par dilution successives entre 1000 et 2000 fois dans un mélange de détergents composé de pyrophosphate de sodium (0.01 M) et de Tween 80% (0,1% final). Entre chaque dilution, l'échantillon est vortexé afin d'homogénéiser le mélange. Après une incubation de 30 minutes à 4°C, une étape de sonication 30 secondes à 60W est nécessaire afin de séparer physiquement les cellules des particules sédimentaires. Un aliquot de l'échantillon est alors prélevé pour un premier comptage en cytométrie en flux. Cet aliquot est incubé avec du SYBRGreen I (1:10 000) pendant 15 min au noir afin de marquer l'ADN des cellules de procaryotes puis compté en CMF.

(2) le reste de l'échantillon non marqué est alors centrifugé (1 minute à 1000 g, 4°C). Le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans du mélange de détergents (décrit en (1)). Le volume de resupension doit correspondre au volume du surnageant jeté. L'étape (1) est alors reprise à partir de l'incubation pendant 30 minutes et un deuxième comptage est réalisé.

Ce protocole en deux extractions successives permet d'extraire en moyenne 83,67% (± 3.63) des cellules totales.

Partie 2. Fonctionnement des communautés de procaryotes dans une vasière intertidale : un jeu d'échelles temporelles et spatiales

---

« Le microbe n'a pas le temps d'examiner le biologiste »

Henri Michaud
Extrait de Face aux verrous

Partie 2

Cette partie a pour but de décrire et d'analyser le fonctionnement des **communautés de procaryotes benthiques** par une approche **multi-échelles :** 1) temporelle, via l'analyse de la saisonnalité et du temps d'émersion ; et 2) spatiale, *via* l'analyse d'un gradient de profondeur dans le sédiment. Cette partie propose également une approche originale de **couplage diversité/activité/fonction** qui cible spécifiquement le cycle de l'azote. Dans cette partie, la saisonnalité sera abordée comme une variation en termes de conditions météorologiques et non en termes de suivi saisonnier dynamique puisque les échantillonnages ont été ponctuels et réalisés sur un seul jour par saison.

Le premier chapitre correspond à un article soumis au journal «*Limnology & Oceanography*». Il permet de comprendre quels sont les facteurs principaux conditionnant les communautés de procaryotes (*c-à-d.* leur activité, leur production et leur abondance) lors de deux conditions météorologiques contrastées (température élevée ou basse) et suivant un gradient de profondeur dans le sédiment.

Le second chapitre correspond à un article soumis au journal « *Molecular Ecology* ». Il introduit une dimension structurelle et fonctionnelle à travers l'étude de la diversité et des potentiels métaboliques (gènes fonctionnels) liés au cycle de l'azote dans ces communautés. Ceci, dans le but de mettre en avant le lien entre le potentiel fonctionnel et les assemblages des communautés de procaryotes benthiques (relation diversité/fonction dans le système).

Enfin, le troisième chapitre intègre ces approches selon une échelle temporelle plus réduite, correspondant à une période d'exondation, afin d'analyser la dynamique des communautés de procaryotes au cours d'une marée basse de jour.

Ces études sont toutes issues de prélèvements *in situ* sur la vasière de Brouage au cours des années 2012 et 2013 et n'auraient pu être réalisées sans l'aide de Dany Prévostat (aéroglisseurs.org) ainsi que nos collègues du laboratoire LIENSs

.

Chapitre 1. Fonctionnement écologique de la vasière intertidale : entre profondeurs et conditions météorologiques 109

1.1 Contexte de l'étude 110

1.2 *Sediment depth-related variations in prokaryotic communities' activity under different weather conditions in an intertidal mudflat* 112

1.3 Conclusion 148

Chapitre 2. Diversité des communautés de procaryotes et rôle fonctionnel dans le cycle de l'azote dans une vasière intertidale 151

2.1 Contexte de l'étude 152

2.2 *Bacterial and archaeal structure coupled to nitrogen-related functional traits highlighted the influence of fine sediment depth stratification in mudflat* 155

2.3 Conclusion 188

Chapitre 3. Impact du temps d'émersion sur le fonctionnement des vasières intertidales 193

3.1 Contexte de l'étude 194

3.2 Résultats 197

3.3 Discussion 218

3.4 Conclusion 223

Conclusion Partie 2 225

4.1 Un choix d'échantillonnage pertinent 226

4.2 « *Le jeu des échelles* », d'une échelle biannuelle à une échelle tidale 227

4.3 Une forte diversité de procaryotes 228

4.1 La vasière intertidale est un écosystème stratifié 229

4.2 Perspectives 230

Chapitre 1. Fonctionnement écologique de la vasière intertidale : entre profondeurs et conditions météorologiques

1.1 Contexte de l'étude

Les vasières intertidales nues sont souvent utilisées comme « zone atelier » pour les études focalisées sur l'activité du principal producteur primaire des vasières : le microphytobenthos (MPB). Ce MPB constitue l'un des principaux éléments du biofilm microbenthique des vasières avec les procaryotes et les substances exopolymériques (EPS) (Decho, 2000; Underwood and Paterson, 2003; Flemming and Wingender, 2010) qui sont composés de protéines et de sucres simples ou complexes. Ces EPS, produites par le couple MPB/procaryotes, forment une matrice liant le biofilm, utilisable et hydrolysable par les bactéries. Dans les sédiments sableux, ces EPS sont produites et diffusées plus profondément (Böer *et al.*, 2009; Oakes *et al.*, 2010). A l'opposé, la diffusion reste faible dans les sédiments vaseux à cause de leur caractère cohésif. Ainsi, l'irradiance de surface ne pénètre pas ou peu, au-delà de 0,5 mm (Cartaxana *et al.*, 2011) et l'oxygène pas au-delà de 10 mm (Brotas *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1993) sous la surface du sédiment. En parallèle, les organismes de la méiofaune et de la macrofaune perturbent ces écosystèmes relativement structurés *via* 1) une bioturbation parfois intense (Alkemade *et al.*, 1992; Goñi-Urriza *et al.*, 1999), et 2) une pression de prédation sur les micro-organismes (Kemp *et al.*, 1990). Il apparaît donc nécessaire de comprendre quels facteurs déterminent la distribution, l'activité et la production des procaryotes selon un gradient de fines couches sédimentaires de 0 à 10 cm de profondeur, et suivant deux conditions météorologiques contrastées (5 juillet 2012 = températures élevées et 11 février 2013 = températures basses, **Figure 40**).

Les paramètres considérés sont résumés dans la **Table 10**.

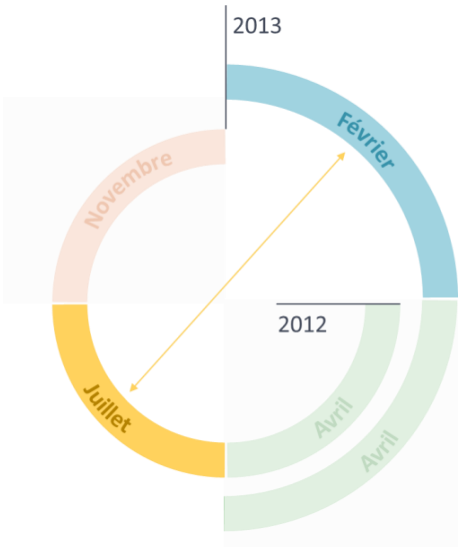


Figure 40. Schéma représentant la stratégie d'échantillonnage choisie.

Table 10. Récapitulatif des différents paramètres mesurés dans ce travail et précision des paramètres considérés pour les analyses dans ce chapitre (●).

Paramètres	**Juillet 2012** **Milieu**	**Février 2013** **Milieu**
Irradiance	●	●
Température extérieure	●	●
Température sédiment	●	●
pH	●	●
Salinité	●	●
Teneur en eau	●	●
Granulométrie	●	●
COP/NOP	●	●
Chlorophylle *a*	●	●
Sels nutritifs	●	●
EPS	●	●
Protéines totales	●	●
Méiofaune	●	●
Macrofaune		
Production bactérienne	●	●
Activités enzymatiques	●	●
Abondance procaryotes	●	●
Gènes fonctionnels (ADN)		
amoA bactérien		
amoA archéen		
nirS		
nirK		
nosZ		
anammox*		
Gènes fonctionnels actifs (ADNc)		
amoA bactérien		
amoA archéen		
nirS		
nirK		
nosZ		
anammox*		
Abondance bactéries (gène 16S ARNr)		
Abondance archées (gène 16S ARNr)		
Diversité bactérienne totale (gène 16S ARNr)		
Diversité archéenne totale (gène 16S ARNr)		
Diversité bactérienne active (16S ARNr)		
Diversité archéenne active (16S ARNr)		

*16S rRNA *Planctomycetes*

1.2 *Sediment depth-related variations in prokaryotic communities' activity under different weather conditions in an intertidal mudflat*

Lavergne Céline[1], Agogué Hélène[1], Leynaert Aude[2], Raimonet Mélanie[2], Pineau Philippe[1], Bréret Martine[1], Lachaussée Nicolas[1], Dupuy Christine[1]

[1] LIENSs, UMR 7266 ULR – CNRS, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

[2] LEMAR, UMR 6539 CNRS – UBO – IRD - Ifremer, Institut Universitaire Européen de la Mer, 29280 Plouzané, France

Corresponding author : Lavergne Céline LIENSs, UMR 7266 Université de La Rochelle – CNRS, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.
Tel : +33 (0)5 46 50 76 44
Fax : +33 (0)5 46 50 76 63
E-Mail : celine.lavergne@univ-lr.fr

Running title: Prokaryotes drivers in mudflats

1.2.1 Abstract

Heterotrophic prokaryotes can be present throughout the whole sediment depth in intertidal mudflats and play a pivotal role in biogeochemical cycles as organic matter remineralizers and exopolymeric substances producers. This study aims at investigating the vertical distribution (from 0 to 10 cm below sediment surface) and the environmental drivers of prokaryotic production and activity in two contrasted weather conditions. Prokaryotic abundance, benthic bacterial production and aminopeptidase activity were significantly correlated. A significant linear regression was found between bacterial production and prokaryotic biomass indicating low predation impact but high control of prokaryotic biomass by resources (e.g. EPS, nutrients, particular organic matter, etc.). Bottom-up control and weather conditions mainly affected the layers between 0 and 2 cm below sediment surface as prokaryotes were represented by high growing populations in July and by virtually non-growing populations in February. Deeper throughout the sediment (from 2 to 10 cm below sediment surface), environmental parameters were more stable and prokaryotic communities exhibited a low growing rate regardless of the sampling date. Yet, prokaryotic communities were able to react actively in response to a sudden change and were recorded as being reactive cells. These features brought out a bottom-up major effect and a clear depth-related structuration, of prokaryotic communities of intertidal mudflats at low tide, in two horizons: 0-2 cm and 2-10 cm below sediment surface separated by a transitional zone.

1.2.2 Introduction

Although coastal zones (as defined in the Millennium Ecosystem Assessment (2005)) cover a small surface area on Earth, they are disproportionally among the most productive systems in the world (Admiraal, 1984; Heip *et al.*, 1995). They provide a source of biodiversity and ecosystem services for humans (Costanza *et al.*, 1998) and are considered as highly threatened (Millennium Ecosystem Assessment, 2005). Coastal areas receive a wide range of organic matter inputs that originate from both terrestrial and marine systems and 80% of total carbon is deposited in the surface of coastal sediments (Reeburgh, 1997). In European intertidal mudflats, the high primary production of the microphytobenthos (MPB) (Underwood and Kromkamp, 1999) sustains important ecosystem services such as nursery or shorebird stopover sites (Saint-Béat *et al.*, 2013).

The primary production of intertidal mudflats is carried out by MPB, which is composed primarily of epipelic (i.e. migration competent) diatoms. The MPB constitutes a complex biofilm in association with prokaryotic communities and is embedded in an exopolymeric matrix (colloidal and bound exopolymeric substances—EPS) (Decho, 2000; Flemming and Wingender, 2010). EPS represent labile molecules for prokaryotes and play different roles in sediments according to their nature and structure (Flemming and Wingender, 2010). These molecules can be secreted by MPB or heterotrophic prokaryotes for different functions including 1) light and salinity protection (Smith and Underwood, 1998), 2) locomotion (MPB) (Underwood and Paterson, 2003), 3) attachment (bacteria) (Lubarsky *et al.*, 2010), 4) stabilization of the sediment surface (Paterson and Black, 1999), and 5) as an overflow metabolism in response to an excess of fixed carbon in the cell (Smith and Underwood, 2000).

MPB activity (i.e. photosynthesis and EPS production) is the dominant source of carbon for heterotrophic micro-organisms in coastal sediments (Herman *et al.*, 1999; Middelburg *et al.*, 2000). The products of photosynthesis (i.e. oxygen, dissolved organic matter, or EPS) are quickly transferred to heterotrophic prokaryotes and remineralized (Middelburg *et al.*, 2000; McKew *et al.*, 2013). In sandy flats, this carbon source can be exported by diffusion and therefore be available deeply throughout the sediment (Böer *et al.*, 2009; Oakes *et al.*, 2010).

In intertidal flats, oxygen and light penetration drive the biochemical processes in the sediments. Less than 5% of surface irradiance penetrates below 0.5 mm of cohesive sediment surface (Cartaxana *et al.*, 2011) inducing the presence of MPB only in this thin layer. In mudflats, the thickness of the oxic layer can vary between 1 and 10 mm (Brotas *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1993) and is strongly controlled by the presence of MPB. However, macrofauna can disturb the oxic anoxic transition zone by bioturbation (Alkemade *et al.*, 1992) by supplying oxygen into deeper sediment layers and by enhancing anoxic processes by mixing other electron accepters downward into the sediment (Goñi-Urriza *et al.*, 1999).

This phenomenon can create micro-niches of high productivity throughout the whole sediment and prokaryotes might be adapted to the presence or absence of oxygen and to the changing conditions in this microenvironment. Therefore, the prokaryotic community is affected by the presence of "ecosystems engineers" (Jones *et al.*, 1996; Gilbertson *et al.*,

2012). Moreover, macrofauna, meiofauna, gastropods, or foraminifera might impact prokaryotic communities by variable predation pressure (Kemp *et al.*, 1990).

Many studies have investigated depth-related distribution of benthic prokaryotic communities, mainly focusing on coastal sub-tidal or deep-sea sediments (Böer *et al.*, 2009). Most of these studies investigated the first 15 cm below sediment surface (bsf) divided in 5 to 14 layers (Boetius and Damm, 1998; Mussmann *et al.*, 2005). Depth-related variations have been recorded in the literature and for instance the prokaryotic abundance notably reached a maximum until 3 cm bsf both in deep-sea (Deming and Carpenter, 2008) or in intertidal sandy sediments (Musat *et al.*, 2006). Böer *et al.* (2009) showed that in a sub-tidal sand flat, the bacterial diversity and community structure varied both with time and depth. Nevertheless, so far, the impact of different factors including overall resources availability, environmental parameters, and meiofauna grazing pressure, on shaping the microbial depth distribution patterns in intertidal mudflats is poorly known. This study aims 1) at describing the fine vertical distribution (from 0 to 10 cm bsf) of prokaryotic production and activity in two contrasted weather conditions (i.e. high and low temperature and incident irradiance) and 2) at determining which environmental parameters explain depth-related patterns and temporal changes in prokaryotic communities, in the Marennes-Oléron intertidal sediments.

1.2.3 Materials and Methods

1.2.3.1 Study site

The Marennes-Oleron Bay is located in the middle of the Atlantic French coast (N 45° 54′ 53″; W 01° 05′ 23″) in the South of La Rochelle. This bay exhibits a tidal range up to 6 meters resulting in a high turbidity and 60% of the 170 km² area of the bay are intertidal mudflats (Riera and Richard, 1996). The bay is surrounded by salt marshes and is under shellfish production influence as it supports a large biomass of cultured molluscs, mainly the oyster *Crassostrea gigas* .The sampling area is located in the central part of the middle mudflat (1km from the shore) (Station 2, Pascal *et al.*, 2009) and is characterized by the presence of parallel ridges and runnels.

1.2.3.2 Sampling

Sampling was performed in the ridges at low tide. Two contrasted weather conditions were compared at similar tidal range (5.5 +/- 0.2 m): high temperature and irradiance (July 5th 2012) and low temperature and irradiance (February 11th 2013) (**Figure 41**). In this study we did not consider the two sampling dates as two seasons because we sampled one day that might not be reflective of the entire season. For each sampling date, triplicate 15-cm diameter cores were sliced in five layers from 0 to 10 cm below sediment surface (bsf) (D1 = 0 to 0.5 cm; D2 = 0.5 to 1 cm; D3 = 1 to 2 cm; D4 = 2 to 5 cm and D5 = 5 to 10 cm). Each sediment layer from each replicate was homogenized directly in a sterile box on the field and brought back to the beach in the dark in a cool box (4°C). Samples were subdivided using 50 ml sterile syringes with cut-off tips for further analysis (storage conditions differ according to parameter). In parallel, triplicate 12-cm cores were recovered for the determination of pore water nutrient concentrations. These 12-cm cores were pre-drilled vertically at each 0.5 cm, and sampling was performed at 0.5 cm, 1 cm, 1.5 cm, 3.5 cm and 7.5 cm bsf, corresponding to the center of each layer sampled with 15-cm cores.

1.2.3.3 Abiotic parameters

Light intensity and temperature at the surface of the sediment were assessed every 30 seconds with a universal light-meter and data logger (ULM-500, Walz Effeltrich, Germany) equipped with a plane light/temperature sensor (accessory of the ULM-500) and a plane cosine quantum sensor (Li-COR). The light dose received by the microphytobenthos (MPB) was calculated as the cumulative values of the integrated irradiance between each 30s

measurement interval (Perkins *et al.*, 2010). Depth temperature profiles were measured with 3.1 cm-length Hobo sensors (Hobo Pro V2, Massachusetts, USA) fixed on a homemade stick that was vertically pushed into the sediment to stabilize the sensors at the 5 depths (0.5 cm, 1 cm, 2 cm, 5 cm and 10 cm bsf).

Pore water pH and salinity were measured on supernatant after sediment centrifugation (15 min, 3000 g at 8°C) with a pH probe (Eutech Instruments PC150, Waltham, MA, USA) and a conductivity meter (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Germany) respectively. Pore water content was quantified by weighing 50 ml of fresh sediment before and after drying (48h at 60 °C). Porosity was calculated as the ratio of the volume of water divided by the total volume of sediment. For grain size analysis, salts and organic matter were removed from sediments stored at room temperature and samples were homogenized. Grain size was determined by a laser granulometer Mastersizer 2000 (Malvern Instruments Ltd, Worcs, U.K.). Mean grain size was evaluated using the GRADISTAT program (Blott and Pye, 2001) according to the Folk and Ward theory (Folk and Ward, 1957). For particulate organic matter (POM), samples were analysed by the combustion method (Strickland and Parsons, 1972) using a CHN elemental analyzer (Thermo Fischer Flash EA 1112, Waltham, MA, USA). One sub-sample, was lyophilized before particulate organic carbon (POC) analysis and the other sub-sample was lyophilized and decarbonated (in chlorhydric acid, HCl 1N) before particulate organic nitrogen (PON) analysis.

For nutrient concentration analyses, pore water was immediately sampled from the 12-cm diameter cores on the site for the 5 depths, using the Rhizons® (Rhizosphere Research Products, NL-6706, Wageningen) method (Seeberg-Elverfeldt *et al.*, 2005). Interstitial water was stored at -20°C for further measurements of nitrite NO_2^-, nitrate NO_3^-, ammonium NH_4^+, and phosphate PO_4^{3-}, and at +4°C for silicate $Si(OH)_4$. Nutrient concentrations were determined with an autoanalyzer (Seal Analytical, Nordertedt, Germany) equipped with an XY-2 sampler according to the Aminot and Kérouel (2007) method.

The two exopolymeric (EPS) fractions (colloidal and bound) were extracted in two steps: fresh sediment was mixed with equal volume of artificial seawater (ASW) for colloidal EPS and Dowex resin was used for bound EPS extraction (Takahashi *et al.*, 2009). Before quantification of proteins and carbohydrates EPS, samples were vacuum-evaporated over 6h (Maxi Dry plus, Heto, Denmark). Colloidal and bound EPS-proteins concentration was determined using BCA assay (Smith *et al.*, 1985) following manufacturer instructions using

BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich) as a standard. Colloidal and bound EPS-carbohydrates concentration was determined according to the phenol-sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956) using glucose as a standard.

Total protein content was determined on sediment (stored at -20°C) after an extraction (30 min, in the dark, +4°C in 0.2-µm-filtered seawater) using the Lowry Peterson's modification assay (kit ref TP 0300, Sigma-Aldrich).

1.2.3.4 Biotic parameters

Chlorophyll *a* (Chl *a*), used as a proxy of algal biomass, was assessed by fluorimetry (640 nm, Turner TD 700, Turner Desigs, USA) using 50 mg of freeze-dried sediment extracted at night in the dark at +4°C with 90%-acetone (mixed by repeatedly turning) and centrifuged (10 min, 3500 g, +8°C). Chl *a* concentrations were expressed as µg μg^{-1} dry weight (DW) according to Lorenzen (1966).

Prokaryotic abundance (PA) was evaluated by flow cytometry after a cell extraction procedure according to Lavergne *et al.* (2014). Briefly, the extraction was based on successive dilutions in a detergent mix, a mechanical separation followed by counting the extracted cells stained with SYBRGreen I through flow cytometry.

Analyses of bacterial extracellular enzymatic activities (β-glucosidase—BGA—and aminopeptidase—AMA) were determined by spectrofluorimetry (Boetius, 1995). Thawed samples (stored at -20°C) were diluted (1:15 vol/vol in sterile 0.2-µm-seawater). For BGA, slurry sediment samples were incubated in triplicate with 4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside (Muf, 500 µmol L^{-1} final conc.) as a substrate at three different incubation times: 15, 45, and 75 min. For AMA, slurry sediment samples were incubated in triplicate with L-leucine β-naphthylamide hydrochloride (Leu, 300 µmol L^{-1}, final conc.) as a substrate at three different incubation times: 10, 30, and 60 min. Final concentrations of Muf and Leu were determined previously to represent saturation levels and maximum yield velocities (V_{max}) (Boetius and Lochte, 1996). Reactions were stopped by centrifugation (14,000 g, 2 min, +4°C) and the fluorescence of the supernatants was measured using a spectrofluorometer (Monaco, SAFAS) [BGA: 365 nm / 460 nm; and AMA: 340 nm / 410 nm].

Benthic bacterial production (bBP) was evaluated by the method of Garet and Moriarty (1996) modified by Pascal *et al.* (2009). Briefly, 30 µl of fresh slurry sediment (1:1 vol/vol; 0.2-µm-filtered seawater) was incubated with ^{3}H-Thymidine 0.74 x10^{6}Bq for 1h at in situ

temperature. Blank controls were stopped just after the addition of labelled ^{3}H-thymidine with 8 ml of cold 80% ethanol. After incubation, samples were stopped with 8 ml of cold ethanol (80%). After two washes with 80% cold ethanol by mixing and centrifugation (15 min, 4,500 g, +4°C), slurries were transferred with 2 mL of ice-cold TCA (5%, trichloroacetic acid) onto a polycarbonate filter (Nuclepore 0.2 µm, 25 mm, Millipore). Subsequently, the filters were washed four times with 5% ice-cold TCA. Afterwards, the filters were transferred into scintillation vials containing 2 ml 0.5N chlorhydric acid and DNA was extracted 16 h at +95°C. Supernatant (0.5 mL) was transferred in a new scintillation vial with 5 mL of scintillation fluid (Ultima Gold, Perkin-Elmer). The amount of radioactivity in each vial was evaluated using a scintillation counter (Perkin-Elmer). Benthic bacterial production was calculated using the following equation:

$$Benthic\ Bacterial\ Production\ (bBP)\ \left(pmol\ \ ^{3}H-Thy\ g^{-1}sed\ DW\ h^{-1}\right) = \frac{DPM \times F1 \times D}{V \times T \times SA}$$

where DPM is the number of disintegration per minutes, F1 a conversion factor 4.51x10^{-13} [dpm Ci^{-1}] evaluated experimentally to account for counter efficiency, D the sediment density [g^{-1} sed DW mL^{-1}], V the analysed volume of sediment [mL], T the incubation period [h], and SA the specific activity (= 25000 Ci mol ^{3}H-Thymidine^{-1}).

For meiofauna, samples from each depth (60 mL) were stored directly after sampling at room temperature in absolute ethanol. Samples were sieved through 50 µm before staining with rose Bengal and observation under binocular loupe (Zeiss). Foraminifera were enumerated in all the sediment samples, and for other meiofauna organisms (e.g. nematodes), samples were diluted (sometimes to x 164) to enumerate under binocular loupe (Zeiss). Abundances were expressed as individuals (ind.) per cm^{3}.

1.2.3.5 Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R software (R Core Team, 2013). In figures, the coefficients of variation (CV) were used for highly variable factors such as prokaryotic variables, and other results were presented as mean and standard error (SE) for better readability. Wilcoxon tests were used to test whether the two sets of data belonged to the same population. Two-way ANOVA was performed and residuals normality and homogeneity were tested for application. Multivariate PCA analysis was performed with the 'FactoMineR'

package (Husson *et al.*, 2013). Variation partitioning ('vegan' and 'ade4' packages; (Dray and Dufour, 2007; Oksanen *et al.*, 2013)) was used to analyse the influence of resources, environmental parameters, and meiofauna on the prokaryotic abundance, production, and activity. The variation partitioning evaluated diverse components of variation (**Table 13**): 1) the pure effect of each individual matrix; 2) the redundancy of the three explicative matrices; and 3) the residual effects unexplained by the chosen variables (Borcard *et al.*, 1992; Volis *et al.*, 2011). RDA, pRDA, and Monte Carlo permutations tests were used to test significances of canonical axis (Volis *et al.*, 2011). Four matrices were created: the "prokaryotic" matrix (P matrix) containing prokaryotic abundance (PA), benthic bacterial production (bBP), aminopeptidase activity (AMA), and β-glucosidase activity (BGA); the matrix of the "environmental parameters" (E matrix) (normalized) containing temperature, salinity, pH, nutrient content ($Si(OH)_4$, PO_4^{3-}, NO_2^-, NO_3^-, NH_4^+), POC:PON, total protein content, algal biomass (Chl *a*), porosity and EPS content; the "conditions" matrix (C matrix) containing the dates (two levels: July and February) and the horizons (two levels: 0-2 cm bsf and 2-10 cm bsf); and "meiofauna" matrix (M matrix) (log (x+1) transformed) containing abundances of small gastropods, copepods, ostracods, nematoda, foraminifera, and small bivalves. After a preliminary analysis, correlated variables were removed; thus E and M matrices contained: E matrix: Temperature, Chl *a*, POC:PON, nutrient content ($Si(OH)_4$, PO_4^{3-}, NO_2^-, NH_4^+), total protein content, porosity, and bound EPS-proteins (BP); and M matrix: abundances of small gastropods, small bivalves, and foraminifera.

Table 11. Environmental parameters (± SE). Grain size in µm, Temperature in °C, C:N is a ratio of PON and POC in µg g^{-1} sed DW,and Chl *a* (chlorophyll *a* content) in µg g^{-1} sed DW. D1 (0-0.5 cm); D2 (0.5-1 cm); D3 (1-2 cm); D4 (2-5 cm); D5 (5-10 cm). Note that no triplicates were available for grain size in February. 2-ways ANOVA revealed always significant differences between the two sampling dates for all parameters (p<0.05), letters in bold font indicated post hoc test of Tukey for each sampling date.

	Grain size		Porosity			Salinity			pH			Temperature			C:N			Chl *a*		
	Mean	*SE*	Mean	*SE*		Mean	*SE*		Mean	*SE*		Mean	*SE*		Mean	*SE*		Mean	*SE*	
July 5th 2012																				
D1	9.1	*+/- 0.27*	0.78	*+/- 0.019*	**a**	45.4	*+/- 2.32*	**a**	7.5	*+/- 0.10*	**a**	22.2	*+/- 2.88*	**a**	6.06	*+/- 0.026*		69.5	*+/- 2.35*	**a**
D2	8.7	*+/- 0.47*	0.72	*+/- 0.014*	**ab**	37.5	*+/- 0.15*	**b**	7.0	*+/- 0.03*	**b**	22.2	*+/- 0.83*	**a**	6.27	*+/- 0.028*		16.2	*+/- 0.68*	**b**
D3	9.3	*+/- 0.14*	0.69	*+/- 0.026*	**ab**	34.3	*+/- 0.12*	**b**	6.7	*+/- 0.07*	**b**	21.9	*+/- 0.61*	**a**	6.45	*+/- 0.026*		6.2	*+/- 0.50*	**c**
D4	10.7	*+/- 0.16*	0.69	*+/- 0.002*	**b**	33.5	*+/- 0.76*	**b**	6.6	*+/- 0.03*	**c**	21.5	*+/- 0.28*	**ab**	6.62	*+/- 0.085*		2.7	*+/- 0.23*	**d**
D5	11.0	*+/- 0.39*	0.68	*+/- 0.020*	**b**	33.4	*+/- 0.46*	**b**	6.9	*+/- 0.05*	**b**	20.8	*+/- 0.20*	**b**	6.59	*+/- 0.041*		1.5	*+/- 0.16*	**e**
February 11th 2013																				
D1	14.4		0.77	*+/- 0.026*	**a**	24.3	*+/- 0.23*	**ab**	7.9	*+/- 0.03*	**a**	9.5	*+/- 2.10*	**a**	6.75	*+/- 0.169*	**a**	59.4	*+/- 1.72*	**a**
D2	13.2		0.75	*+/- 0.003*	**ab**	23.5	*+/- 0.84*	**a**	7.2	*+/- 0.05*	**b**	8.8	*+/- 1.16*	**ab**	7.20	*+/- 0.076*	**a**	10.7	*+/- 0.95*	**b**
D3	10.5		0.79	*+/- 0.027*	**ab**	23.6	*+/- 1.02*	**ab**	7.2	*+/- 0.05*	**b**	9.2	*+/- 0.52*	**ab**	7.35	*+/- 0.131*	**b**	6.9	*+/- 0.42*	**b**
D4	11.9		0.71	*+/- 0.018*	**b**	26.3	*+/- 1.80*	**ab**	7.0	*+/- 0.14*	**b**	8.8	*+/- 0.66*	**ab**	7.47	*+/- 0.133*	**b**	6.3	*+/- 0.54*	**b**
D5	13.0		0.69	*+/- 0.014*	**b**	29.5	*+/- 1.66*	**b**	7.0	*+/- 0.09*	**b**	8.4	*+/- 0.23*	**b**	8.00	*+/- 0.155*	**b**	2.9	*+/- 0.18*	**c**

1.2.4 Results

1.2.4.1 Environmental conditions

The mean grain size of the sediment in the sampling site was 9.76 ±0.27 µm (SE, standard error) in July (5th, 2013) and 12.58 ±0.35 µm in February (11th, 2012). Whatever the sampling dates, the sediment was prevalently silt-clay (91.2% mean). The porosity of the sediment significantly decreased with depth (**Table 11**) from 0.78 ±0.02 to 0.68 ±0.02 in July and from 0.77 ±0.03 to 0.69 ±0.01 in February.

The in situ temperature at the surface of the mudflat was 28 ± 0.9 °C in July and 10.5 ± 1.1 °C in February. Surface temperature and incident irradiance were variable and influenced by weather conditions due to cloud passing (**Figure 41**). The mean incident irradiance was 1800 ±156 µmol photons m^{-2} s^{-1} in July and 611 ±292 µmol photons m^{-2} s^{-1} in February. The incident irradiance was clearly lower in February, as expected. In July, the light dose received (cumulative irradiance) by MPB until the beginning of the emersion was 6.8 µmol photons m^{-2} (**Figure 41**). The light dose available for MPB in February was 3.8 µmol photons m^{-2}.

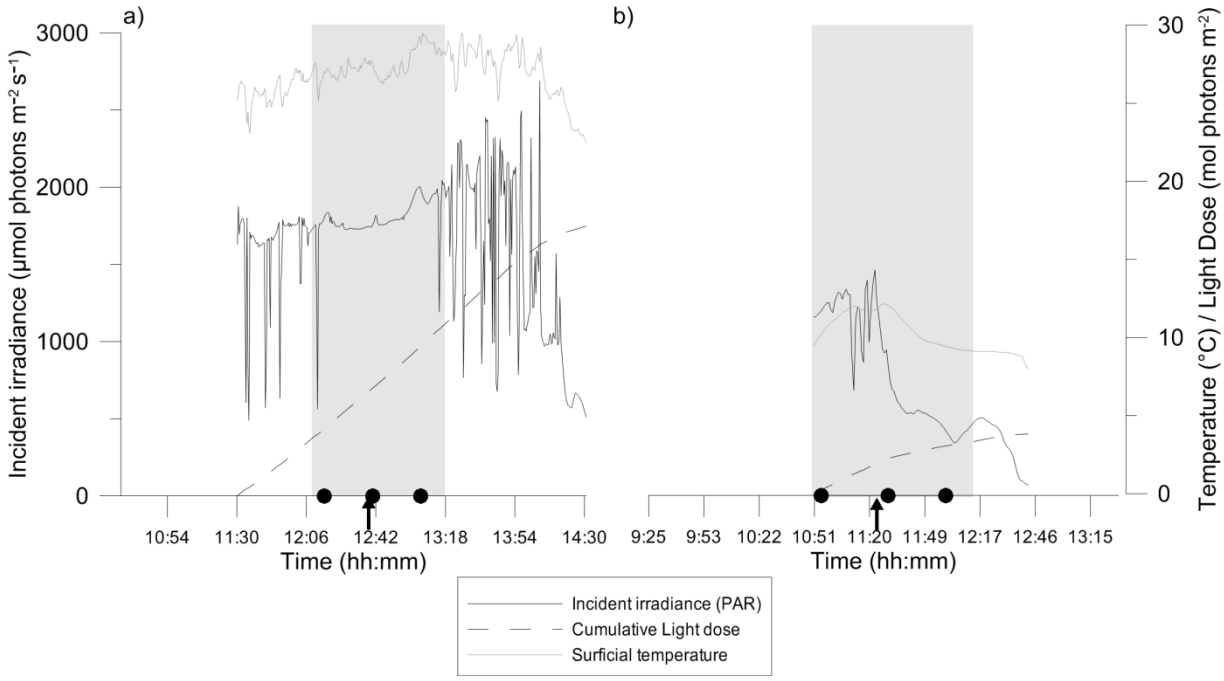


Figure 41. Temperature at the surface, light conditions and light dose for the two sampling date during low tide: a) July 5th 2012 and b) February 11th 2013. Black points represented the time when the different replicates of sediment were sampled. Grey areas represented the sampling period and black arrows the low tide stall.

Different environmental parameters exhibited a clear pattern in the sediment showing clear gradients with depth. In July, salinity was high in surficial sediments (45.37 ±2.32,**Table 11**) and decreased with depth. In February, salinity was low and significantly different between D2 (23.5 ±0.84) and D5 (29.5 ±1.66) (Post hoc Tukey test; $p<0.05$). Pore water content and pH were relatively stable between the two sampling dates (**Table 11**) and showed maximum values in surficial sediments. In July, temperature fluctuated between 22.2 ±2.88°C in D1 and 20.8 ±0.20°C in D5 and was more variable in the surficial sediment (i.e. SE = 2.88). In February, the temperature of the sediment was lower than in July and varied from 9.5 ±2.10 °C in D1 to 8.4 ±0.23 °C in D5. The algal biomass on the surface (D1) was 69.5 ±2.35 µg Chl *a* g^{-1} sed DW in July and 59.4 ±1.72 µg Chl *a* g^{-1} sed DW in February. The highest standard errors were recorded in D1, suggesting the patchiness distribution of the MPB observed in the field. The algal biomass showed an exponential decrease with values never exceeding 17.40 µg Chl *a* g^{-1} sed DW under 0.5 cm bsf. The POC:PON ratio ranged from 6.06 ±0.05 (July) to 7.99 ±0.27 (February) and exhibited an increase in February with depth decrease.

Concerning pore water nutrient concentration, $Si(OH)_4$ and NH_4^+concentrations were respectively 9 and 2 times higher in February than in July (**Figure 42**) and were always higher in deeper layers (48-498 µmol L^{-1} for $Si(OH)_4$ and 5-225 µmol L^{-1} for NH_4^+). Phosphate was almost absent in July (< 0.30 µmol L^{-1}). In February, PO_4^{3-} concentrations were low in surface and increased until 2 cm bsf (34.6 ±1.3 µmol L^{-1}). NO_2^- and NO_3^- concentrations tended to be higher in July between 1 and 2 cm bsf (1.8 ±0.7 and 6.5 ±0.7 µmol L^{-1} respectively, **Figure 42**). In contrast, NO_3^- concentrations in February decreased between D1 and D2 from 16.0 ±5.9 to 5.6 ±1.1 µmol L^{-1} and were stable below 1 cm (**Figure 42**). Nitrite concentrations were low and stable in February (< 1.3 ± 0.2 µmol L^{-1}). Finally, DIN:PO_4^{3-} ratio showed values always higher than the atomic ratio (N:P = 16:1, Redfield (1958)) except in surface (P1) in July were values of the DIN:PO_4^{3-} ratio was 9.10 ±6.69.

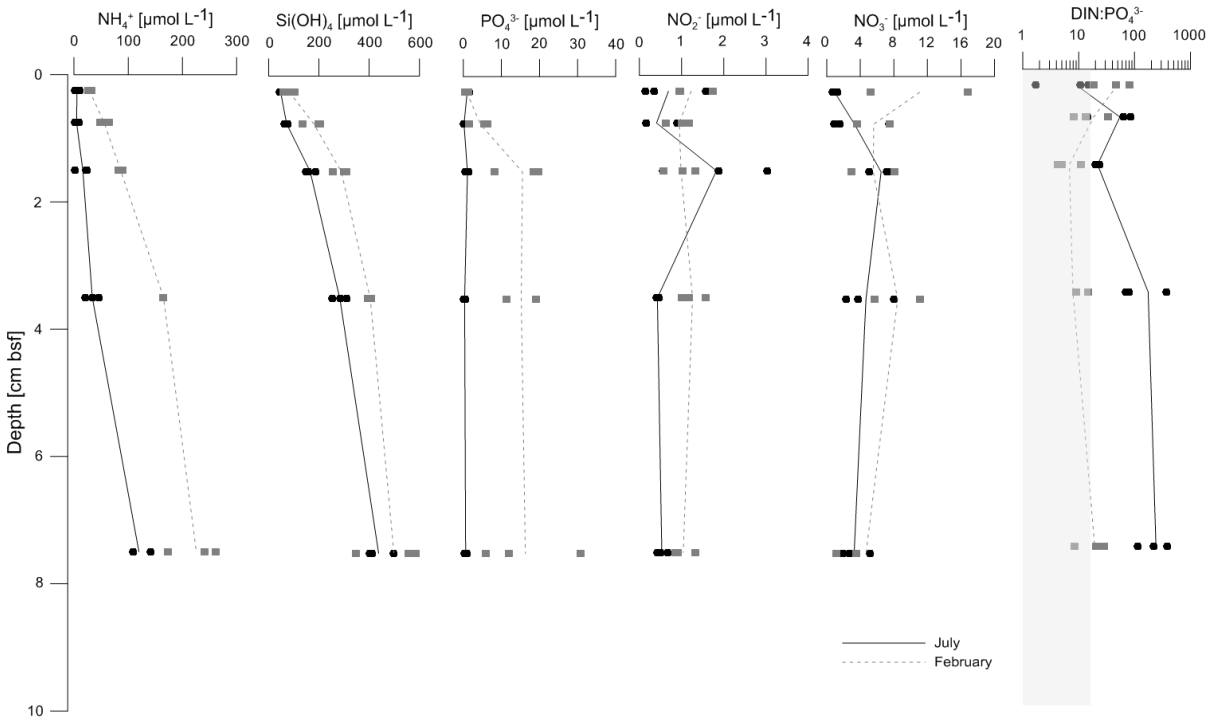


Figure 42. Vertical profiles of nutrient concentrations and DIN:PO_4^{3-} ratio recorded in July 5th 2012 and in February 11th 2013 from 0 to 10 cm below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm). Silicates $Si(OH)_4$; phosphates PO_4^{3-}; nitrites NO_2^-; nitrates NO_3^- and NH_4^+ ammonium. Points represented triplicates, lines means and grey zone represented DIN:PO_4^{3-} ratio<16 (atomic ratio, Redfield, 1958).

1.2.4.2 Exoplymeric substances

EPS fractions of proteins and carbohydrates were strongly different between the two sampling dates. In July, carbohydrates dominated and represented 62 ±7.8% of total EPS content with a range from 50% at 10-cm depth (191.80 ±53.81 µg g^{-1} sed DW) to 69% (414.29 ±52.08 µg g^{-1} sed DW) in surficial sediments. In contrast, EPS-proteins were dominant in February and represented 79 ±3.1% resulting in a low EPS carbohydrates/EPS protein (EPS-C/EPS-P) ratio (<1,**Figure 43**). The EPS-C/EPS-P ratio was significantly higher in July than in February (Wilcoxon test; W=225, p<0.001, **Figure 43**C), indicating a shift from EPS-carbohydrates in July to EPS-proteins in February. In February, colloidal and bound EPS did not exhibit any depth gradient (**Figure 44**), bound EPS ranged from 57.96 ±7.19 to 63.53 ±8.88 µg g^{-1} sed

DW, and colloidal EPS were between 132.86 ±6.18 and 184.99 ±37.59 µg g^{-1} sed DW. Colloidal EPS/bound EPS ratio was not significantly different between the two sampling dates (2-way ANOVA, df=*1*, F=0.618, *p*= 0.4376, **Figure 44**C). Both EPS-C/EPS-P and colloidal/bound EPS ratios exhibited a high value in D2 in July (4.38 ±2.92) (**Figure 43**A & **Figure 44**A).

Table 12. Depth and sampling date impact on prokaryotic abundance, benthic bacterial production and enzymatic activities (2-way ANOVA parameters. n =3)

	df	**F value**	***p***
Prokaryotic abundance			
Depth	4	7.26	***
Sampling date	1	24.16	***
Depth x Sampling date	4	4.09	*
Benthic bacterial production			
Depth	4	14.32	***
Sampling date	1	29.71	***
Depth x Sampling date	4	16.14	***
Aminopeptidase activity			
Depth	4	16.57	***
Sampling date	1	75.29	***
Depth x Sampling date	4	8.81	***
Beta-glucosidase activity			
Depth	4	7.17	***
Sampling date	1	0.10	
Depth x Sampling date	4	9.60	***
Signif. Codes:	0 ***;	0.001 **;	0.01 *

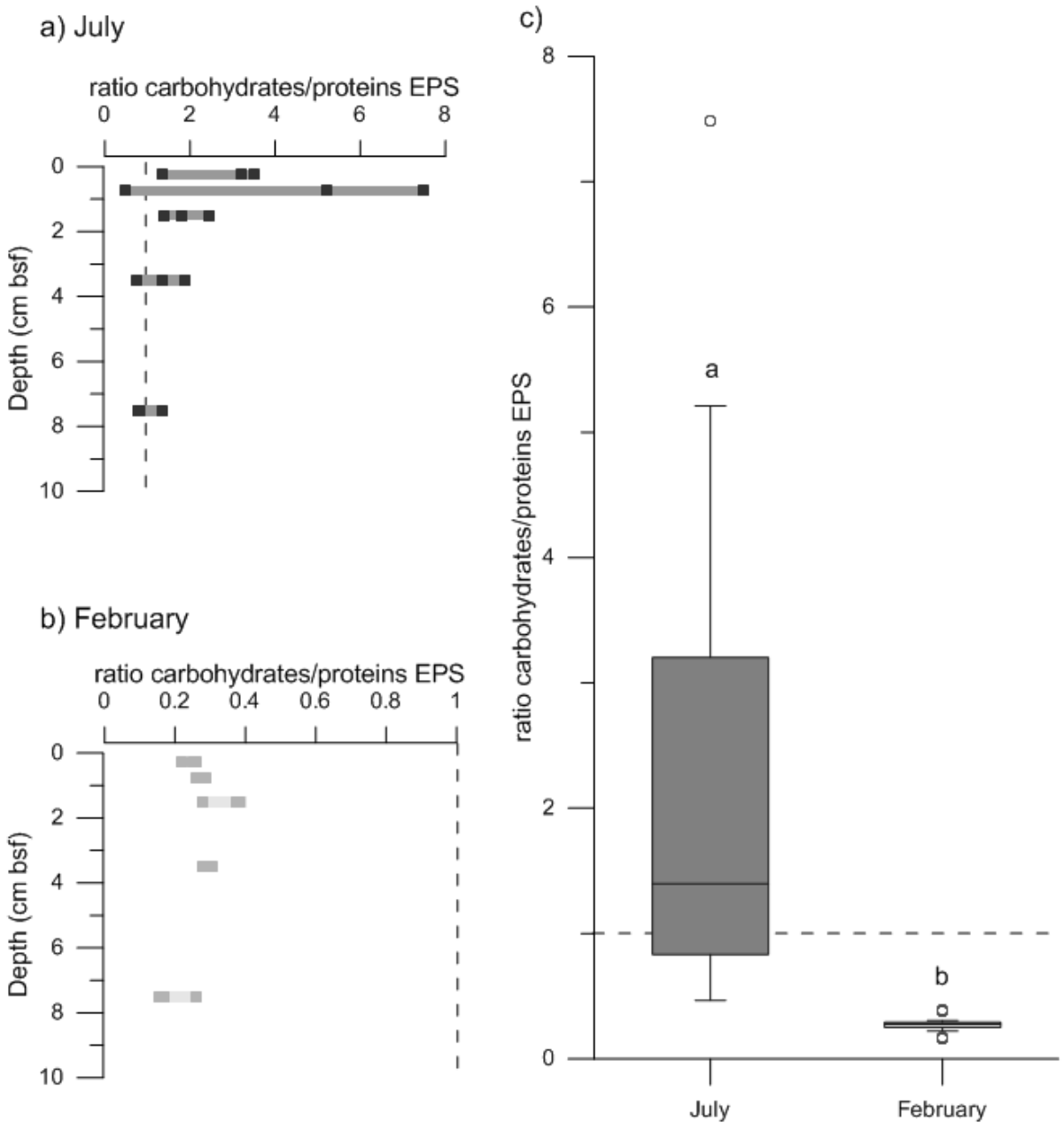


Figure 43. Ratio of total EPS carbohydrates/proteins along a depth gradient below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm); a) in July, 5th 2012 (n=3); b) in February, 11th 2013 (n=3); and c) among the two sampling dates (n=15). July values were in dark grey, February in light- grey and lowercase letters a and b indicated significant differences (Wilcoxon test; W=225. p<0.001). The dash line was a ratio value of 1.

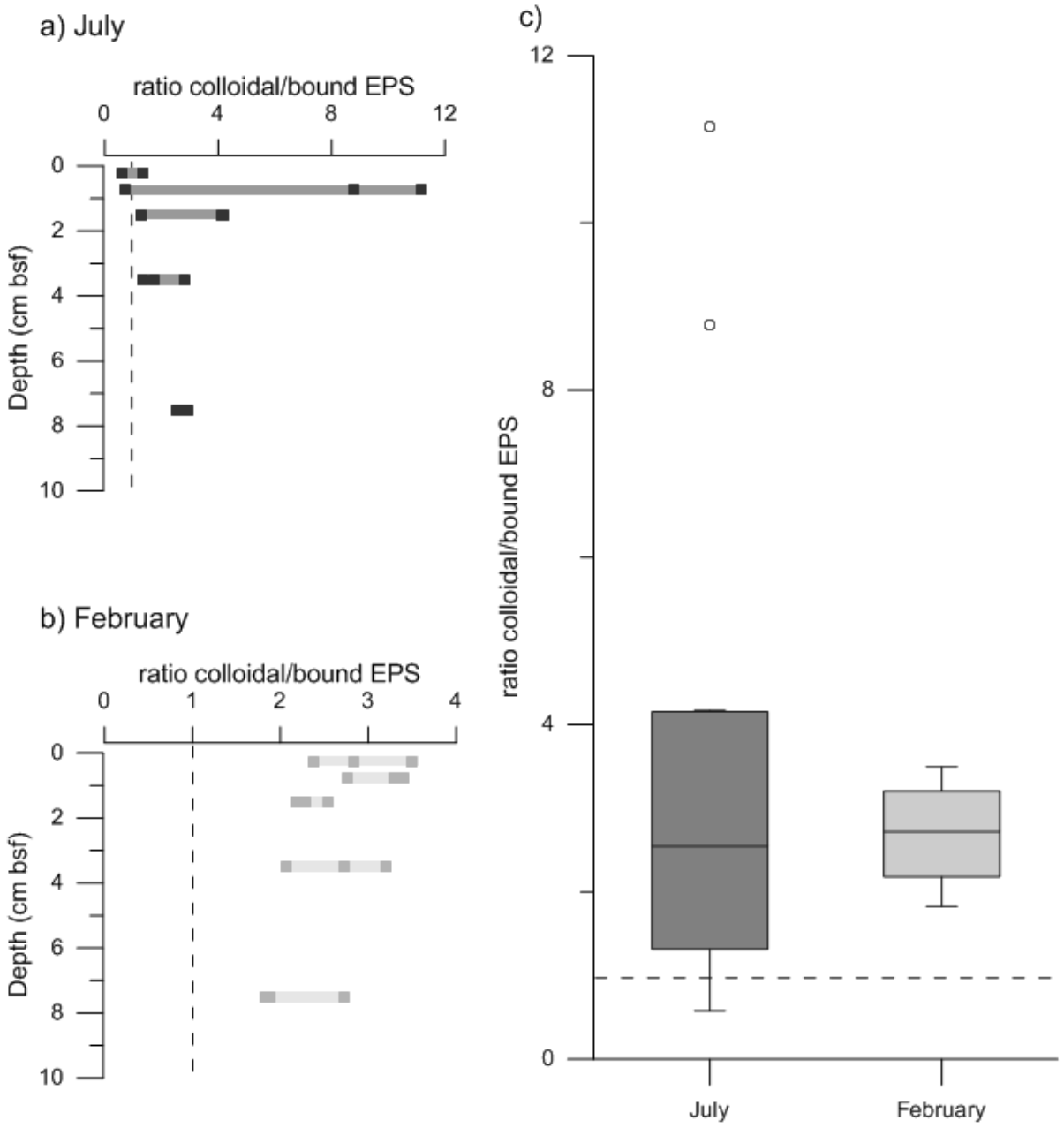


Figure 44. Ratio of colloidal EPS versus bound EPS (proteins + carbohydrates) along a depth gradient below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm); a) in July, 5th 2012 (n=3); b) in February, 11th 2013 (n=3); and c) among the two sampling dates (n=15). July values were in dark grey, February in light-grey. The dash line was a ratio value of 1.

1.2.4.3 Prokaryotic communities

Heterotrophic prokaryotic abundance (PA) ranged from 1.18 ±0.2 $x10^{10}$ to 3.45 ±1.05 $x10^{10}$ cells g^{-1} sed DW in July with maximum values at surficial sediment (D1). In February, PA was clearly lower than in July (Tukey HSD test, $p< 0.001$) and values were between 1.08 ±0.75 $x10^{10}$ and 1.72 ±0.50 $x10^{10}$ cells g^{-1} sed DW, with the highest PA recorded in D2. In July, benthic bacterial production (bBP) decreased with depth from 189.69 ±8.15 to 46.31 ±9.93 pmol ^{3}H-Thy g^{-1} sed DW h^{-1}. Whatever the sampling date, bBP and PA distribution profiles were very similar (Pearson test, cor = 0.719, $p<0.001$) (**Figure 45**A&B). In July, aminopeptidase activity (AMA) raised up to 860.74 ±213.81 nmol g^{-1} sed DW h^{-1} (**Figure 45**C). Values were always higher than in February when the AMA profile seemed relatively stable throughout the 10-cm depth sediment. A significant effect of sediment depth and sampling date was found on AMA (2-way ANOVA, df = *4*, F = 8.81, $p<0.001$). Post-hoc multiple analyses showed that AMA was significantly lower in February than in July (Tukey HSD test, $p< 0.001$), and AMA in surficial sediment (D1) was significantly different from the others (D2 to D5) in July (Tukey HSD test, $p< 0.01$). β-glucosidase activity (BGA) was generally low. Values ranged from 6.71 ±1.09 to 18.14 ±1.42 nmol g^{-1} sed DW h^{-1} in July (**Figure 45**D). In February, the BGA profile was slightly different, ranging from 3.49 ±1.21 to 41.59 ±8.32 nmol g^{-1} sed DW h^{-1} with a maximum recorded in D4 (between 2 and 5 cm) (**Figure 45**D).

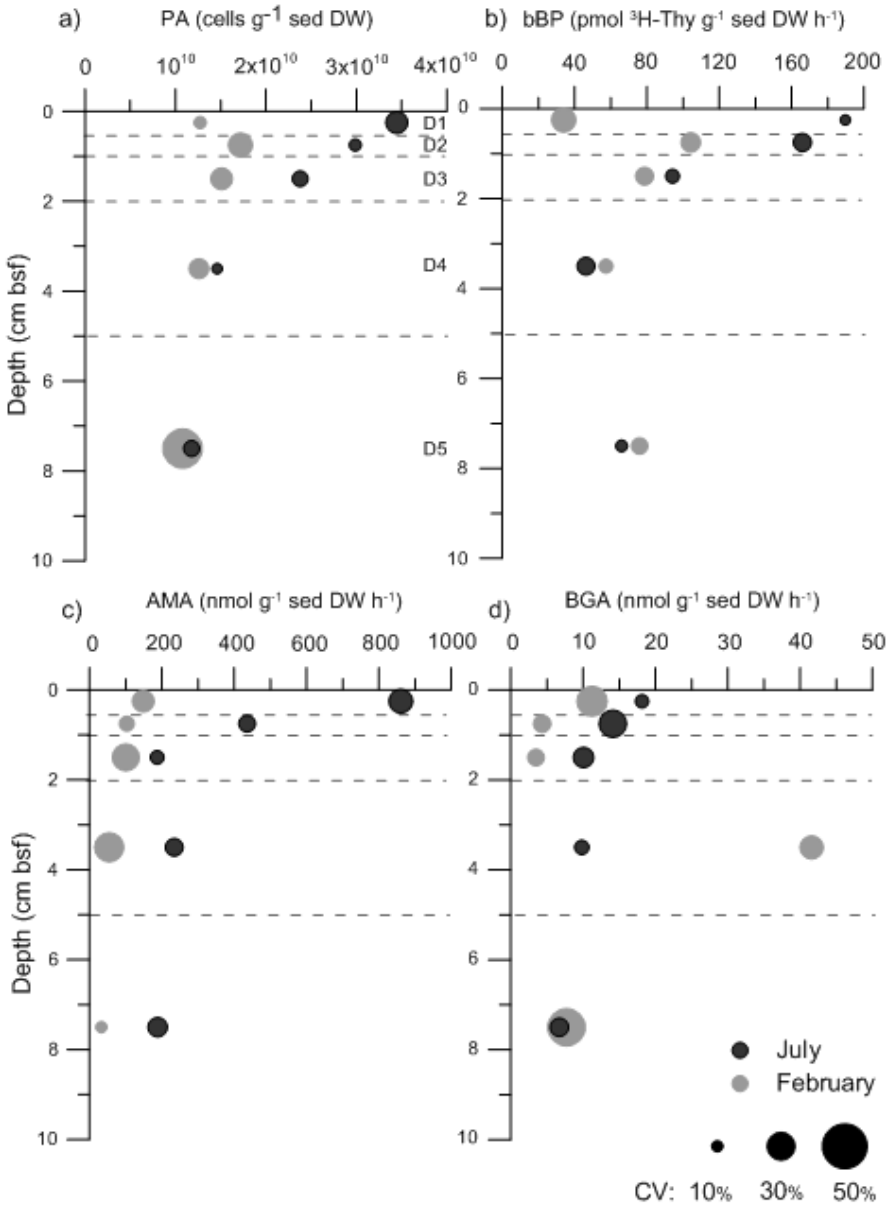


Figure 45. a) Abundance of heterotrophic prokaryotes (PA); b) benthic bacterial production (bBP); c) Aminopeptidase (AMA) and d) Beta-glucosidase (BGA) activities along a depth gradient below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm). All points were represented in the middle of each layer. The coefficient of variation (CV) was displayed as the bubble size. Black bubbles represented values for July 5th 2012 sampling and grey bubbles represented values for February 11th 2013 sampling.

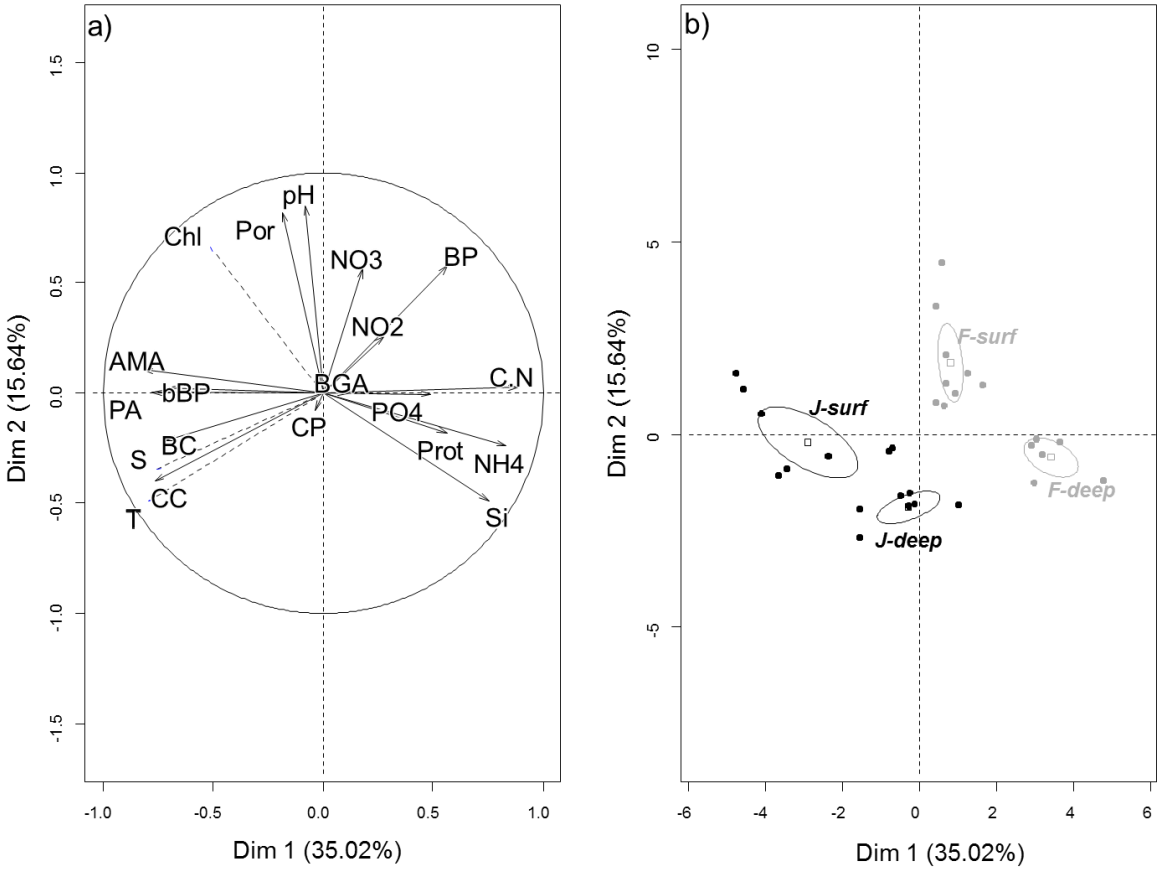


Figure 46. Principal component analysis (PCA) ordination calculated using 30 samples (15 in July and 15 in February) and 17 variables (4 biotic and 13 abiotic parameters). a) Ordination of the variables and correlation circle, three additional variables were plotted in arrows (Chl a: algal biomass, T: temperature and S: salinity) but are not included in the analysis; and b) Position of the observations on the ordination, 95 % confidence ellipses were plotted showing the 2 horizons discrimination at the two sampling dates (surf = layers between 0 and 2 cm below sediment surface and deep = layers between 2 and 10 cm below sediment surface; J = July and F = February). Por: porosity; Prot: total protein content; BP: bound EPS-proteins; BC: bound EPS-carbohydrates; CP: colloidal EPS-proteins; CC: colloidal EPS-carbohydrates; Si(OH)4: silicate concentration; NO2-: nitrite concentration; NO3-: nitrate concentration; NH4+: ammonium concentration; PO43-: phosphate concentration; PA: prokaryotic abundance; bBP: benthic bacterial production; AMA: aminopeptidase activity; BGA: beta-glucosidase activity.

1.2.4.4 Relation between biotic and abiotic parameters in samples

The dimension 1 and 2 of the principal component analysis (PCA) together explained 51% of the observed variability in each sample (**Figure 46**). Most of the variables were represented by dimension 1 and, particularly, all prokaryotic-related variables (i.e. activities, production, and abundance) were positively correlated with colloidal and bound EPS-carbohydrates, salinity, and temperature and negatively correlated with the POC:PON ratio, protein content, silicate, ammonium, and phosphate concentrations (**Figure 46**). The PCA brought out a clear separation of two clusters corresponding to the two sampling dates driven by their own temperatures, carbohydrates content, and major biotic parameters of the first dimension. In July, the prokaryotic parameters were high with higher temperature and salinity and lower POC:PON ratio. Whatever the sampling dates, the analysis highlighted that depths can be gathered in two horizons: 1) from 0 to 2 cm bsf, and 2) from 2 to 10 cm bsf (**Figure 46**).

1.2.4.5 Which abiotic and biotic parameters drove prokaryotic communities?

All the influences tested had a significant effect on prokaryotic activity and abundance (**Table 13**). The biotic and abiotic parameters (E matrix) explained globally 51% of prokaryotic variation and 18.12% without the component variation shared with meiofauna and conditions (M and C matrix). The sampling dates and depth explained 6% of prokaryotic variations. The shared effect of E and M matrices was high (67%), showing an important relation between resources, environmental parameters, and meiofauna (**Figure 47**). Weather condition, horizon, environmental parameters, and meiofauna explained globally 73% of prokaryotic variation.

1.2.5 Discussion

This study provides an important first step in the understanding of the prokaryotic roles from 0 to 10 cm below sediment surface in an intertidal mudflat. The layer thickness has been chosen to investigate fine-scale processes and to determine a potential buffer zone of influence of abiotic and biotic parameters throughout the 10-cm depth sediment. Fine scale studies can provide new knowledge on muddy benthic ecosystem functioning compared to more-studied marine ecosystems such as deep sea sediments (Deming and Carpenter, 2008), sub-tidal flats (Sahm and Berninger, 1998), and sandy flats (Wilms *et al.*, 2006; Böer *et al.*, 2009). In addition, we described the influence of two contrasted weather conditions on prokaryotic communities.

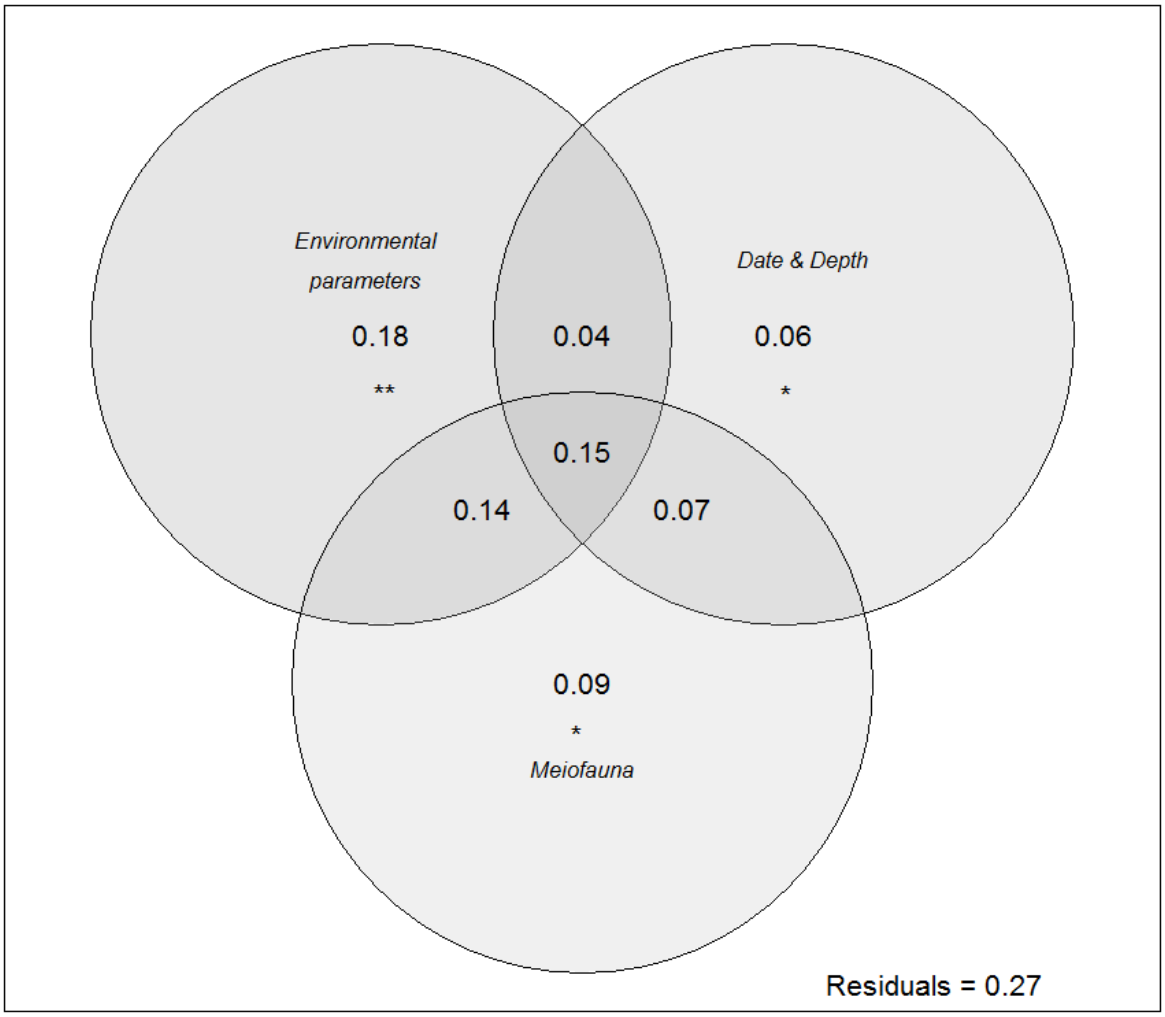


Figure 47. Venn diagram of variation partitioning of prokaryotic variables (i.e., PA: prokaryotic abundance; bBP: benthic bacterial production; AMA: aminopeptidase activity; and BGA: β-glucosidase activity). Each part of the diagram represented the influence of other matrices on the variation of prokaryotic variables. Matrices contained: Environmental parameters matrix: Temperature, Chl *a*, POC:PON, nutrient content ($Si(OH)_4$, PO_4^{3-}, NO_2^-, NH_4^+),total protein content, porosity and bound EPS-proteins (BP); Conditions matrix: the two dates, and the two horizon depth; and Meiofauna matrix: abundances of gastropods, bivalves and foraminifera. Statistically significant pure fraction of variation of prokaryotes communities were presented as: 0.001 **; 0.01 * (Monte Carlo permutation test). Details were in **Table 13**.

Table 13. Identification of prokaryotic community drivers by variation partitioning analysis based on ordination analyses. Matrix E contained environmental variables and resources for prokaryotic community, matrix C contained sampling dates and two principal depths (0-2 cm below sediment surface, and 2-10 cm bsf) and M matrix contained the abundance of meiofauna. Multivariate analysis, covariables, component of variation, eigenvalues and statistical p-values were reported.

Analysis	Constraining variable	Covariable	Component of variation	Sum of canonical eigen values	*p*	
PCA	-	-	-			
RDA	E	-	e + ec + em + ecm	0.5019	*0.002*	**
RDA	C	-	c + ce + cm + ecm	0.3228	*0.001*	***
RDA	M	-	m + me + mc + ecm	0.4484	*0.001*	***
RDA	E + C	-	e + c + ec + em + cm + ecm	0.6393	*0.001*	***
RDA	E + M	-	e + m + em + ec + cm + ecm	0.6638	*0.001*	***
RDA	C + M	-	c + m + cm + ec + em + ecm	0.5462	*0.001*	***
pRDA	E	C + M	e	0.1800	*0.009*	**
pRDA	C	E + M	c	0.0624	*0.026*	*
pRDA	M	E + C	m	0.0869	*0.016*	*
pRDA	E + C	M	e + c + ec	0.0354	*0.001*	***
pRDA	E + M	C	e + m + em	0.0750	*<0.001*	***
pRDA	C +M	E	c + m + cm	0.1501	*<0.001*	***

Signif. codes: 0 ***; 0.001 **; 0.01 *

1.2.5.1 Methodological considerations

The variability between triplicates, which is reflected by their coefficient of variation (CV), can be explained by 1) method inherent variability and 2) high spatial variability in the mudflat. For example, for prokaryotic abundance (PA), most of the CVs observed in July were low (ranging from 5 to 30%) highlighting the variability of the method rather than spatial variability. In contrast, the higher CVs in February (ranging from 8.5 to 70%) compared to July indicated a major spatial variability in addition to method inherent variability (except for D1). If possible, this is important to evaluate the part of spatial variability before analysing the data. In our study, variance was significantly higher between depth and date than between triplicates allowing pooling the triplicates.

A typical problem in sediment studies is the standardisation of measurement that can be either gravimetrically, volumetrically or based on areal basis reflected by use of the units g^{-1} sed dry weight or fresh weight, cm^{-3} and m^{-2}, respectively. Our choice was to express values in g^{-1} sed DW to remove the high variability due to water content differences because water content varied with depth and can play a crucial role in sediments. For the expression of benthic bacterial production (bBP), no universal standard units were found and many author use different conversion factors that impact the values directly and thus bias the comparisons. To avoid the use of conversions factors, we expressed bBP in pmol ^{3}H-Thy g^{-1} sed DW h^{-1}. Nevertheless, in this study, to infer whether bottom-up or top-down effects prevailed for impacting prokaryotic communities (**Figure 48**), bBP was expressed in µgC g^{-1} sed DW h^{-1} using $1.96x10^{17}$ cells $moles^{-1}$ Thy and 79 fgC $cells^{-1}$ conversions (Saint-Béat *et al.*, 2014). Depending on the aim of each study, we consider that the standardisation chosen can be different but it is important to propose additional dataset with all the units to allow studies comparisons. Our dataset thus comprises both the areal (m^{-2}) and volumetric (cm^{-3}) values to allow comparison with other studies in different environments (**Table 14**; Supplementary information).

1.2.5.2 Bottom-up or top-down effects throughout the 10-cm depth sediment?

The relation between prokaryotic biomass and benthic bacterial production (bBP) is a proxy to evaluate whether prokaryotic communities are driven by bottom-up or top-down effect (Pace and Cole, 1994). If the prokaryotic biomass/bBP relation is strong and the slope significantly different from zero, prokaryotes are controlled by bottom-up effects. In contrast, if the prokaryotic biomass/bBP relation is low and non-significant, this means that the biomass weakly increases in response to bacterial production and thus that prokaryotic mortality may be high (i.e. top-down effect) (Pace and Cole, 1994). In our study, the significant correlation and positive slope between prokaryotic biomass and production with all dataset (**Figure 48**) indicated that production was controlled by bottom-up effects. Pascal *et al.* (2009) showed that only 6% of total bacterial biomass was controlled by consumers in the first cm of the sediment, confirming the major bottom-up effect in the Marennes-Oleron mudflats throughout the studied sediment depth.

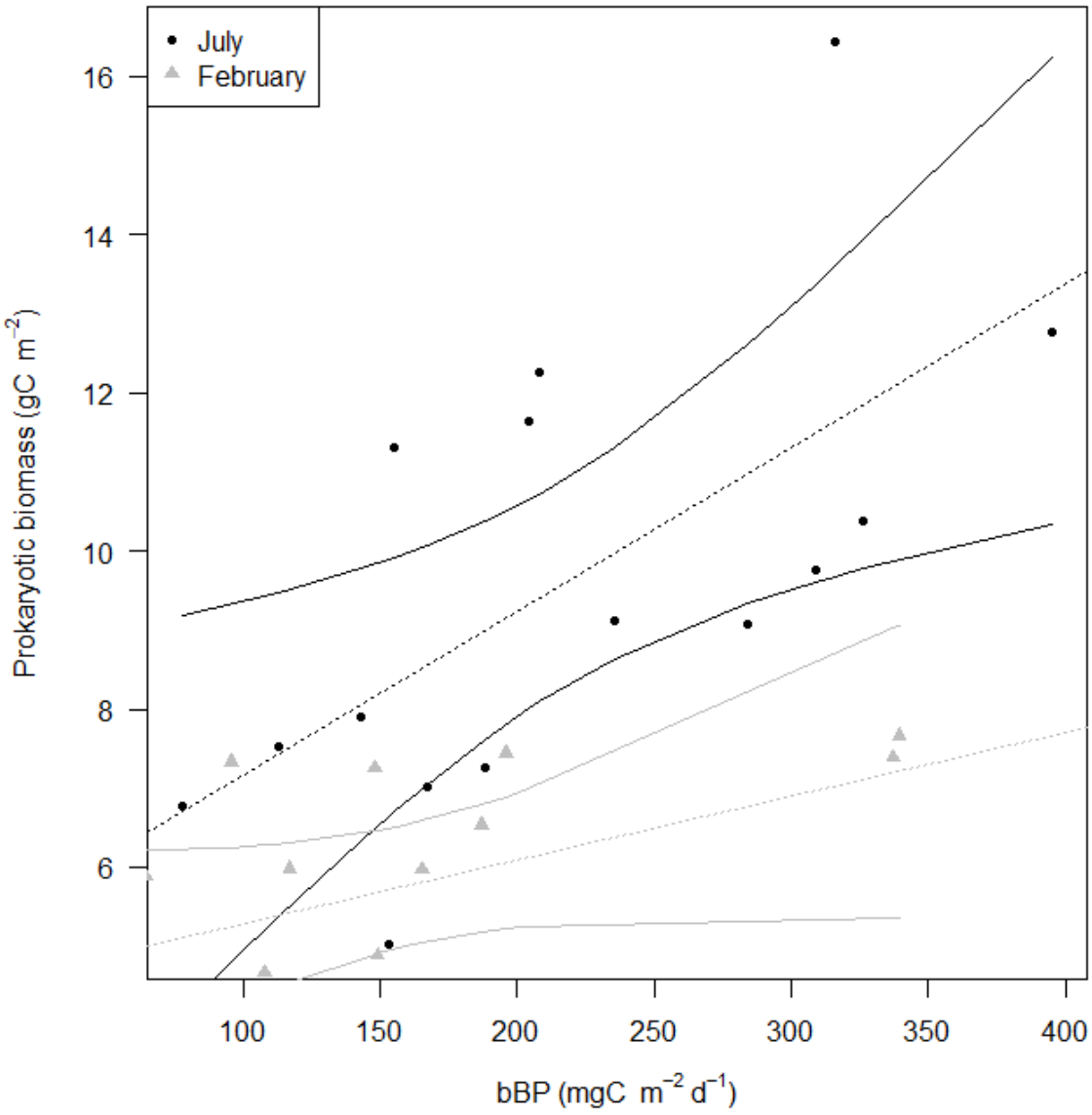


Figure 48. Linear regression of prokaryotic biomass and benthic bacterial production (bBP) in July (dots, dark grey) ($F_{1,13}$=21.8, R^2=0.60, p<0.001) and in February (triangles, light-grey) ($F_{1,13}$=11.2, R^2=0.42, p=0.005) in Marennes-Oléron mudflat. Dot lines were linear regression and lines were 95% confidence limits.

According to these findings, the variation partitioning analysis (on a large set of biotic and abiotic parameters) underlined that the interaction among resources, habitat, and meiofauna abundance had a significant impact on prokaryotic dynamics (i.e. explained 73% variance, **Figure 47**). In detail, 28% of the variation of prokaryotic variables (i.e. PA; bBP; AMA: aminopeptidase activity; and BGA: beta-glucosidase activity) was explained by weather conditions, horizons, and environmental parameters, whereas meiofauna distribution explained only 9% of prokaryotic parameters variation. Böer *et al.* (2009) conducted a similar analysis on diversity data and highlighted that both temporal and depth-related variations are key drivers explaining 35% of bacterial structure, which is in agreement with our results. Accordingly, in our study, prokaryotic activity, production, and abundance were driven by resource supply (POM, nutrients, EPS) and weather conditions (**Table 12**) rather than top-down regulation throughout the 10-cm depth sediment.

1.2.5.3 Two horizons, two different stories

In our study, grain size was not an explicative factor of prokaryotic abundance as the grain size was stable and fine (mean: 11.17 ± 0.48 µm) and not related with PA. On the contrary, the oxygen penetration depth (as measured by an oxygen microsensor, Unisense) was 3.5 mm below sediment surface (bsf) (data not shown) in the Marennes-Oleron mudflat, highlighting that oxygen-driven processes may be variable at a microscale (oxic/anoxic layer) below the sediment surface (Fenchel and Finlay, 2008). It is necessary to work at a microscale to study these processes which implies freezing sediment and slicing the layers of frozen samples. In our study, the investigation of these microscale oxic processes was impossible, as the analysis of a high number of parameters implied a large volume of sediment (almost 0.5 L) and some parameters (such as silicates, bBP, or grain size) needed non-frozen sediments for their analysis. For the first layer, we thus sampled the minimum thickness that was possible: the first 0.5 cm of the sediment surface.

The statistical analysis highlighted a clear pattern of prokaryotic and environmental variables. Globally, our results showed that the 10-cm depth sediment was divided in two horizons: 1) 0-2 cm and 2) 2-10 cm bsf separated by a boundary layer (**Figure 49**). The depth of the boundary layer proposed here was driven by the sampling strategy in our study and was expected to fluctuate from 1.5 cm to 3.5 cm bsf.

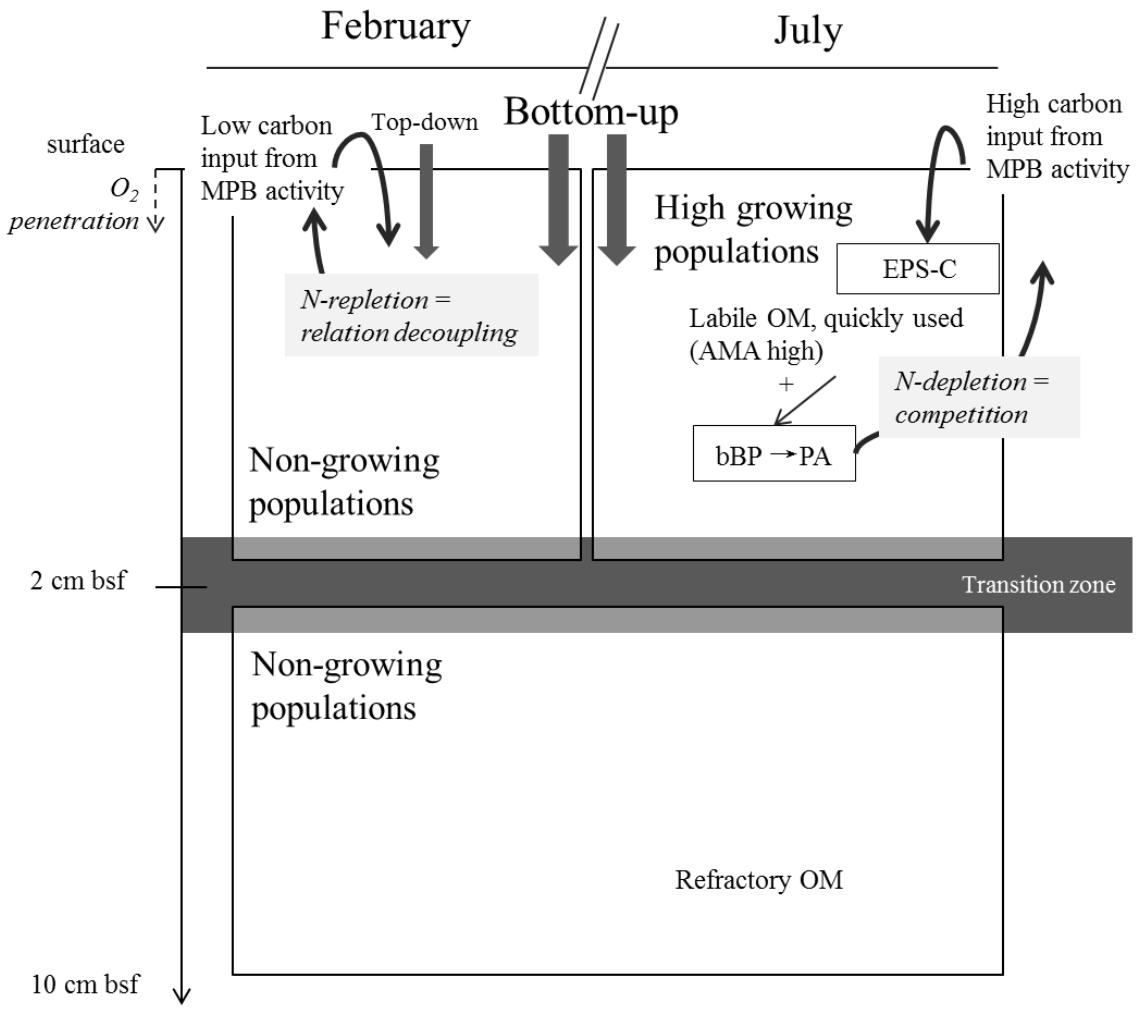


Figure 49. Sediment depth-related structuration in European intertidal mudflats, conceptual assessments following the current study features.

The variables in the first sediment horizon were strikingly different between the two samplings. In July, prokaryotic and environmental variables (e.g. PA, bBP, aminopeptidase activity—AMA, temperature, salinity) were high compared to February. In July, AMA was particularly high compared to other studies (as reviewed by Danovaro *et al.* (2002)) but comparable with AMA recorded in the Balearic Sea (Tholosan *et al.*, 1999). Moreover, bBP was 3 times higher in July than in February, thus we considered that in July the first horizon (0-2 cm bsf) was in dynamic state whereas in February, it was in a static state. At low tide, the first horizon was under a strong influence of external parameters (e.g. light exposure, and emersion cycle), and MPB activity. Although algal biomass was in the same range in both sampling dates, the high MPB primary production (Gross primary production (GPP): 6.0 ± 1.7 mgC h^{-1} m^{-2}, CO_2 fluxes in benthic chambers measurement method, pers. comm. Lavaud) had probably enhanced the heterotrophic prokaryotic production in D1 in July. Therefore, the high prokaryotic and microphytobenthic productions resulted in a specific vertical structuration of the microbial processes which differed from February. Accordingly, a pattern has been observed between the two weather conditions: a dominance of EPS-carbohydrates was recorded in July contrasting with EPS-protein content dominance in February. These results fitted with total protein content measured in our samples but not with previous studies, showing that in Marennes-Oleron, proteins were absent in winter in the first cm of sediments (Orvain *et al.*, 2014b). Colloidal EPS can play a crucial protective role in intertidal areas such as intertidal mudflats where tidal rhythm imply more than 4 hours of emersion, as it can limit desiccation (Orvain *et al.*, 2012). EPS-carbohydrates are implied in mechanical stability of mature biofilms (Flemming and Wingender, 2010) and are also involved in salinity and light protection (Smith and Underwood, 1998; Underwood *et al.*, 2004) which is in agreement with the high EPS-carbohydrates concentrations found in surface in July. Smith and Underwood (2000) reported that colloidal EPS-carbohydrates can be produced by epipelic diatoms when photo-assimilated carbon is in excess in cells in order to dump excess out of the organism. This process is usually associated with a nutrient limitation (Smith and Underwood, 2000). This process may have occurred in our samples because the nutrient concentrations were very low at the surface in July, and N:P ratio was under the atomic value (Redfield, 1958),pointing out a putative limitation in nitrogen for benthic micro-organisms. Since we cannot rule out a quick turnover in prokaryotic release of N-related nutrients and uptake by MPB (Cook *et al.*, 2007), it is not possible to conclude, in our study, if the EPS-carbohydrates were produced in response to a salinity, a light stress, or a nutrient limitation in July. However, multivariate

analysis brought out a positive correlation between EPS-carbohydrates and prokaryotic production strongly linked to temperature and salinity (**Figure 46**B), suggesting that prokaryotes may have produced EPS-carbohydrates for salinity protection as mentioned by Gerbersdorf *et al.* (2009a). These features are in line with Van Duyl *et al.* (1999), who found a relation between bBP and EPS-carbohydrates decoupled with BGA. The labile carbon produced by MPB was thus transferred to prokaryotic communities and used for growth (Fig. 9). This is consistent with ^{13}C-labelling studies in sandy sediments revealing that the MPB-produced carbon was quickly transferred to bacterial biomass (Cook *et al.*, 2007) and intertidal flats (Middelburg *et al.*, 2000). However, the N-related nutrients depletion between 0 and 1 cm bsf in July due to MPB activity could reduce the nitrification rate (Risgaard-Petersen, 2003). In layers where MPB was present and highly dynamic (i.e. in July), we suspected a competition for nitrogen between MPB and prokaryotic communities (**Figure 49**).

In February, higher NO_2^- and NO_3^- concentrations may highlight nitrification and/or higher nitrate concentration in the surrounding water at high tide compared to July. Moreover, low temperatures in February might limit denitrification and thus decrease nitrite and nitrate uptake by prokaryotes. In this first horizon, MPB was probably not N-limited and prokaryotes contributed to diatoms' growth and EPS diatom production by nutrient recycling (as reviewed in Lubarsky *et al.* (2010)). Consequently, the relation between prokaryotes and MPB production may be decoupled with no competition for resources in this horizon at this date (Cook *et al.*, 2007). Concerning the prokaryotic communities, in February, both abundance (PA) and production (bBP) were limited in the first horizon (0-2 cm bsf). In February, the slope of the regression between prokaryotic biomass and production was significantly lower than in July (**Figure 48**), meaning that in February, prokaryotic mortality by predation was higher than in July. Indeed, bBP was particularly low in surficial sediments (D1, 0-05 cm), and this was not only due to the temperature because higher bBP occurred deeper in the sediment despite a similar temperature. This low bBP value confirmed the decoupling of MPB activity and bBP in February, potentially due to diverse other factors. Bacterial growth may be limited by *Peringia ulvae* grazing pressure in surficial sediments in February (i.e. high predation pressure: 1.72 mgC h^{-1}, calculated according to Pascal *et al.* (2009)). In addition, viral lysis has been reported to be responsible for the loss of 40% of bBP in Marennes-Oleron mudflat (Saint-Béat *et al.*, 2013) and may not be neglected.

In the second horizon, between 2 and 10 cm bsf, all biotic and abiotic gradients were stable (clusters Dd, **Figure 46**B). For both sampling dates, the bBP was similar below 2 cm depth horizon despite high environmental variable variations in this second horizon. Indeed, temperature, salinity, and the EPS-C/EPS-P ratio strongly decrease from July to February and nutrient concentration also changed—specifically, phosphate and ammonium concentrations increased. These features highlighted that below 2 cm, bBP was equivalent and stable regardless the variations of crucial abiotic variables. Bacterial communities were thus able to maintain a stable production level between 2 and 10 cm bsf, suggesting that the system may be in a static state in this horizon potentially all over the year.

In this second horizon, the diffusion of organic matter is usually low, leading to low and potentially refractory organic matter available for heterotrophic prokaryotes (Boetius, 1995; Aller and Aller, 1998), thus, EPS concentrations and enzymatic activities were expected to be low. However, significant EPS concentrations have been found and may originate from prokaryotes and to a lesser extent from mucus of meiofauna (Riemann and Schrage, 1978) and/or macrofauna (Meadows *et al.*, 1990) because diatoms are absent at these depths. Moreover, high BGA values were recorded in the layer D4 (between 2 and 5 cm bsf) in February and this was associated with moderately high carbohydrate content. This fact may reflect a stimulation of BGA with high concentrations of carbohydrates beginning a cycle of production/degradation (BGA uses complex carbohydrates and produces simple carbohydrates as glucose, galactose, etc.) resulting in equilibrium of EPS-carbohydrates content. Additionally, BGA have been reported to be higher in the presence of macrofauna because of local organic matter accumulation (Boetius, 1995). It could thus explain the intense enzyme activity in the layer D4 in February and prove that meiofauna and macrofauna can enhance static state prokaryotic metabolism by supplying additional resources and oxygen deeper throughout the sediment depth (Aller and Aller, 1998). This suggested that even at static state, heterotrophic prokaryotes were not in dormancy as mentioned by Luna *et al.* (2002). In our study, since prokaryotes modified their metabolism in response to a sudden change (e.g. EPS concentration), this indicates that they became active quickly and we qualified them as "reactive". In all likelihood, in this "bottom" horizon, prokaryotes were mainly k-selected cells exhibiting a high specificity and thus competiveness for few substrates (Torsvik and Øvreås, 2002).

1.2.5.4 The depth of the transition zone

Layers between the first and the second horizon might represent a transition zone between the external parameters-influenced zone and the "bottom" sediments (**Figure 49**). Therefore, it represent the limit of influence of wheather conditions on sediment structure and prokaryotic communities in the intertidal mudflat. The depth of this layer was expected to weakly fluctuate among the period of the year or according to the emersion time during low tide. Notably, storms can destructure the sediment vertical structuration deeper than the external parameters-influenced zone. Nevertheless, the depth of this layer can be considered as characteristic of the intertidal muddy sediments. Indeed, in sandy flats, interstitial space between sediment particles is bigger, allowing deeper oxygen or/and nutrients advection (Musat *et al.*, 2006), and thus inducing a weak structuration with depth gradient. Moreover, in sub-surface coastal sediments, the boundary layer was deeper as Molari *et al.* (2012) found a shift of communities after 11 cm below sediment surface due to water exchanges. In addition, as a signature, prokaryotes seemed globally abundant in intertidal mudflats and almost one order of magnitude higher than in intertidal sand flats (Musat *et al.*, 2006) and subtidal sand flats (Böer *et al.*, 2009). Except transient storms, the buffer layer is thus located at 1.5-3.5 cm depth in intertidal muddy sediments (this study).

It can be discussed wether this transition zone could be considered as an ecotone zone or an ecocline zone at the fine vertical scale of this study. These two terms have been largely used in ecology to characterise boundary zones where gradients occur but their definition and the way to use them are still unclear (Erdôs *et al.*, 2011). Nevertheless, many authors are in agreement that the term "tone" defines a steep gradient between two units and "cline" stands for gradual changes (Whittaker, 1967; van der Maarel, 1990; Attrill and Rundle, 2002; Erdôs *et al.*, 2011). In the present study, we discussed the identification of a transitional zone among the vertical sediment stratification. This transitional zone corresponded to a gradient zone at a microscale (i.e. not an ecosystem scale, nor a biome scale) specifically characterised by a gradual change of environmental parameters such as porosity or EPS ratios and a gradual change of microbial communities (e.g. algal biomass, enzymatic activities and prokaryotic abundance). Hence, following these definitions and our findings, we could consider the identified transitional zone as an ecoclinal boundary (Erdôs *et al.*, 2011). In this point of view, it is speculative but probable that the taxonomic diversity of the prokaryotic community in this transitional zone could be a mix of "surficial" and "bottom" communities. On one hand, this suggested that different communities composition may result in different specific

functions (e.g. enzymatic activities) but ensure more widespread functions such as production (Langenheder *et al.*, 2006). On the other hand, structure diversity may result in redundant functionality that can provide a robutness for community (Girvan *et al.*, 2005) and can allow the community to react to a punctual event (Allison and Martiny, 2008). Consequently, this boundary layer may provide a bulk of potentially reactive cells and enhance the system productivity and resilience (Peterson *et al.*, 1998; Prosser *et al.*, 2007; Allison and Martiny, 2008).

1.2.6 Conclusion

The current study provided detailed snapshots of depth gradients of bacterial populations and process rates at two contrasting sampling dates with similar tidal range, which allows us to gain understanding of the results of complex interactions between micro-organisms and their environment. Thus, we succeeded in explaining almost 73% of the prokaryotic community structuration by bottom-up control (i.e. chlorophyll *a* content, nutrients), weather conditions, horizons, and to a lesser extent by consumers (meiofauna). Twenty-seven percent of this structuration remained unexplained and further studies are needed to investigate 1) more abiotic parameters such as sulphate or manganese oxide concentration, 2) prokaryotic activity and production dynamics all along the low tide period, or 3) other prokaryotic indices such as diversity or functional genes.

1.2.7 Supplementary information

Table 14. Complete dataset in g^{-1} sed DW, cm^{-3} and m^{-2}

Dataset in g-1 sed DW

	Tidal range	PAR	T°ext	T°	pH	S%	Rho	Rho2	W%	PS	WW/DW	porosity (ϕ)	Grain size	Si Rhiz	PO4 Rhiz	NO2 Rhiz	NO3 Rhiz	NH4 Rhiz
Units	m	µmol photons m^{-2} s^{-1}	°C	°C		‰	g WW ml^{-1}	g DW ml-1	%	g			µm	µmol L-1	µmol L-1	µmol L-1	µmol L-1	µmol L-1
JULY D1r1	5.3	1724.33	27.44	21.98	7.35	41.6	1.22	0.43	65%	21.24	2.88	0.80	8.54	43.81	0.87	1.57	0.96	10.25
JULY D1r2	5.3	1761.22	27.55	22.14	7.48	44.9	1.24	0.44	64%	21.96	2.81	0.80	9.20	49.44	0.59	0.35	1.27	4.80
JULY D1r3	5.3	1900.75	28.91	22.56	7.68	49.6	1.19	0.45	62%	22.35	2.66	0.74	9.44	51.01	1.58	0.14	0.66	1.90
JULY D2r1	5.3	1724.33	27.44	21.91	7.05	37.6	1.14	0.46	60%	22.82	2.51	0.69	7.78	76.70	0.12	0.17	7.45	2.51
JULY D2r2	5.3	1761.22	27.55	22.08	7.04	37.2	1.22	0.48	60%	24.20	2.52	0.73	8.87	62.54	0.30	0.16	1.60	2.53
JULY D2r3	5.3	1900.75	28.91	22.49	6.95	37.7	1.25	0.53	58%	26.46	2.37	0.73	9.39	76.42	0.17	0.90	0.91	9.16
JULY D3r1	5.3	1724.33	27.44	21.68	6.69	34.1	1.17	0.53	55%	26.45	2.20	0.64	9.20	158.18	0.52	0.56	7.23	2.48
JULY D3r2	5.3	1761.22	27.55	21.86	6.88	34.5	1.30	0.60	54%	29.92	2.18	0.71	9.21	150.32	1.44	1.88	7.15	22.66
JULY D3r3	5.3	1900.75	28.91	22.22	6.65	34.3	1.31	0.59	55%	29.45	2.23	0.72	9.62	188.02	1.35	3.04	5.07	23.76
JULY D4r1	5.3	1724.33	27.44	21.23	6.50	34.5	1.31	0.62	52%	31.13	2.10	0.69	10.64	253.72	0.34	0.40	2.28	21.35
JULY D4r2	5.3	1761.22	27.55	21.41	6.61	32.0	1.33	0.63	52%	31.69	2.09	0.69	10.99	312.02	0.64	0.42	3.72	46.02
JULY D4r3	5.3	1900.75	28.91	21.70	6.61	33.9	1.36	0.67	51%	33.27	2.04	0.69	10.44	285.72	0.11	0.46	8.05	34.00
JULY D5r1	5.3	1724.33	27.44	20.66	6.85	34.0	1.40	0.69	51%	34.61	2.03	0.71	10.32	497.94	0.98	0.67	1.98	109.25
JULY D5r2	5.3	1761.22	27.55	20.79	6.98	33.7	1.39	0.70	49%	35.18	1.98	0.69	11.68	402.82	0.37	0.43	2.70	140.81
JULY D5r3	5.3	1900.75	28.91	20.96	6.98	32.5	1.31	0.67	49%	33.61	1.96	0.64	11.01	412.40	0.52	0.50	5.13	109.76
FEB D1r1	5.65	962.75	11.56	10.08	7.82	23.9	1.19	0.43	64%	21.38	2.78	0.76	14.37	60.57	0.54	1.74	16.88	26.21
FEB D1r2	5.65	464.44	10.48	9.47	7.83	24.4	1.31	0.48	63%	24.17	2.70	0.82	14.37	105.26	1.46	0.98	25.82	26.33
FEB D1r3	5.65	354.64	9.17	8.82	7.91	24.7	1.32	0.58	56%	29.16	2.26	0.73	14.37	82.65	0.84	0.96	5.28	32.95
FEB D2r1	5.65	962.75	11.56	9.33	7.21	24.1	1.25	0.50	60%	25.05	2.49	0.75	13.21	135.18	1.56	0.64	3.62	49.34
FEB D2r2	5.65	464.44	10.48	8.86	7.17	24.5	1.29	0.55	58%	27.32	2.37	0.75	13.21	198.27	6.47	1.18	213.60	51.86
FEB D2r3	5.65	354.64	9.17	8.28	7.35	21.8	1.30	0.54	58%	27.20	2.39	0.76	13.21	204.64	5.51	1.02	7.56	65.17
FEB D3r1	5.65	962.75	11.56	9.62	7.19	25.5	1.48	0.63	57%	38.01	2.33	0.84	10.49	257.22	19.69	0.58	2.98	82.38
FEB D3r2	5.65	464.44	10.48	9.28	7.17	23.4	1.29	0.51	60%	25.65	2.51	0.77	10.49	309.82	8.29	1.34	560.68	90.31
FEB D3r3	5.65	354.64	9.17	8.73	7.32	22.0	1.30	0.54	58%	27.20	2.38	0.75	10.49	300.56	18.60	1.04	8.14	85.19
FEB D4r1	5.65	962.75	11.56	8.78	6.80	28.8	1.32	0.60	55%	29.92	2.21	0.73	11.86	409.72	19.11	1.18	5.74	165.23
FEB D4r2	5.65	464.44	10.48	8.87	6.82	27.2	1.30	0.57	56%	28.52	2.28	0.73	11.86	395.56	11.32	1.58	0.74	165.55
FEB D4r3	5.65	354.64	9.17	8.63	7.24	22.8	1.27	0.59	53%	29.68	2.14	0.68	11.86	409.20	118.90	1.02	11.18	164.50
FEB D5r1	5.65	962.75	11.56	8.33	7.02	31.6	1.43	0.75	47%	37.70	1.90	0.68	12.97	559.20	30.95	1.34	1.14	262.05
FEB D5r2	5.65	464.44	10.48	8.47	6.86	30.6	1.37	0.65	53%	32.52	2.11	0.72	12.97	349.44	5.95	0.86	1.84	173.10
FEB D5r3	5.65	354.64	9.17	8.40	7.18	26.2	1.38	0.70	49%	34.80	1.98	0.68	12.97	587.28	12.00	0.92	3.54	242.08

Table 14. continued

Dataset in g-1 sed DW (continued)

	PON	POC	C:N	Chl *a*	CPE	Phaeo/phaeo+chla	Proteins	EPS CP	EPS CC	EPS BP	EPS BC	PA	bBP	Prok Biomass	AMA	BGA
Units	µg g^{-1} sed DW	µg g^{-1} sed DW		µg g^{-1} sed DW	µg g^{-1} sed DW	%	µg g^{-1} sed DW	µg g^{-1} sed DW	µg g^{-1} sed DW	µg g^{-1} sed DW	µg g^{-1} sed DW	cells.gDW^{-1}	pmol ^{3}H-Thy g^{-1} sed DW h^{-1}	gC g^{-1} sed DW	µmol g^{-1} sed DW h^{-1}	µmol g^{-1} sed DW h^{-1}
JULY D1r1	0.053	0.316	6.00	64.77	83.24	22.20	3369.48	108.57	118.54	28.79	362.25	2.70E+10	179.60	0.00	661.20	14.28
JULY D1r2	0.051	0.309	6.11	74.72	95.63	21.86	3569.38	246.62	161.95	53.92	246.48	2.99E+10	199.55	0.00	870.01	18.72
JULY D1r3	0.054	0.331	6.08	69.09	88.45	21.89	5402.24	76.38	189.65	34.01	163.99	4.65E+10	189.90	0.00	473.23	16.17
JULY D2r1	0.047	0.296	6.24	17.40	32.43	46.34	4560.26	30.78	296.66	11.27	18.10	2.71E+10	181.70	0.00	451.79	9.78
JULY D2r2	0.048	0.298	6.24	14.62	28.17	48.11	5854.33	243.07	93.73	12.58	25.74	3.21E+10	115.57	0.00	360.73	11.11
JULY D2r3	0.053	0.339	6.34	16.64	32.19	48.30	4765.51	61.44	131.30	12.08	251.75	3.05E+10	200.60	0.00	303.47	24.03
JULY D3r1	0.047	0.302	6.44	6.59	18.02	63.41	5508.18	102.07	126.51	16.44	164.26	2.71E+10	78.85	0.00	162.94	11.74
JULY D3r2	0.053	0.346	6.50	5.03	15.46	67.49	5699.23	83.33	108.49	15.95	30.23	1.93E+10	108.03	0.00	172.12	10.72
JULY D3r3	0.057	0.365	6.40	7.03	19.63	64.20	5476.08	89.53	172.91	26.19	36.79	2.50E+10	95.50	0.00	144.92	5.83
JULY D4r1	0.054	0.354	6.56	3.16	12.67	75.05	4727.01	223.57	214.78	17.46	237.39	1.38E+10	33.46	0.00	220.40	10.16
JULY D4r2	0.055	0.358	6.47	2.65	11.56	77.11	6026.15	149.77	79.96	22.53	151.94	1.50E+10	47.81	0.00	262.74	8.21
JULY D4r3	0.054	0.367	6.82	2.18	10.85	79.87	4379.06	283.95	100.81	17.42	120.40	1.50E+10	57.65	0.00	152.35	7.34
JULY D5r1	0.056	0.374	6.67	1.76	10.72	83.55	4100.50	167.18	156.92	25.18	102.08	1.33E+10	73.11	0.00	214.73	7.58
JULY D5r2	0.056	0.364	6.50	1.64	9.67	83.02	2497.93	213.87	104.26	22.86	84.87	1.26E+10	63.74	0.00	183.29	4.23
JULY D5r3	0.051	0.335	6.58	1.12	9.28	87.89	5862.97	127.46	79.66	25.22	47.60	9.47E+09	61.14	0.00	112.77	6.39
FEB D1r1	0.038	0.244	6.38	57.90	75.01	22.80	5042.82	192.90	37.43	49.76	16.14	1.38E+10	50.64	0.00	86.08	15.20
FEB D1r2	0.042	0.283	6.76	56.73	76.74	26.07	4295.50	124.07	27.36	48.10	15.75	1.16E+10	29.40	0.00	185.90	11.89
FEB D1r3	0.042	0.295	7.10	63.55	77.71	18.23	5099.82	137.96	30.64	42.57	16.74	1.28E+10	21.74	0.00	130.88	3.37
FEB D2r1	0.041	0.292	7.11	12.99	28.76	54.85	4738.26	155.06	39.14	41.78	17.07	1.23E+10	79.91	0.00	111.78	2.88
FEB D2r2	0.047	0.335	7.10	9.10	24.15	62.31	7539.98	186.54	39.19	45.17	21.11	2.40E+10	140.45	0.00	78.17	4.05
FEB D2r3	0.049	0.363	7.38	10.12	27.89	63.70	4323.23	108.07	26.97	35.76	12.97	1.52E+10	92.30	0.00	90.10	4.83
FEB D3r1	0.064	0.469	7.31	7.69	22.00	65.05	4698.52	99.83	36.74	45.25	17.41	9.93E+09	70.04	0.00	37.19	2.03
FEB D3r2	0.044	0.314	7.10	6.99	25.63	72.74	5137.40	98.06	36.82	41.90	17.10	1.83E+10	102.45	0.00	112.19	3.00
FEB D3r3	0.046	0.353	7.65	5.90	26.37	77.61	5031.95	125.34	35.29	49.53	13.48	1.70E+10	63.43	0.00	123.54	2.09
FEB D4r1	0.047	0.363	7.70	5.68	17.99	68.44	6596.04	129.03	32.67	43.99	15.28	9.06E+09	49.92	0.00	30.33	22.00
FEB D4r2	0.046	0.349	7.56	5.65	18.49	69.45	6117.11	131.12	42.34	65.71	17.89	1.33E+10	55.08	0.00	40.34	33.59
FEB D4r3	0.051	0.369	7.16	7.65	23.71	67.74	7074.98	146.48	41.47	44.31	14.31	1.55E+10	67.03	0.00	64.37	51.14
FEB D5r1	0.045	0.375	8.32	3.29	15.10	78.23	7012.60	113.81	11.38	51.80	14.35	4.61E+09	56.61	0.00	32.38	1.96
FEB D5r2	0.042	0.339	8.00	2.51	11.88	78.84	5684.38	120.80	12.27	55.16	17.70	8.60E+09	83.62	0.00	27.81	12.95
FEB D5r3	0.051	0.391	7.66	2.93	13.64	78.51	6390.17	115.71	24.63	36.85	14.74	1.92E+10	87.51	0.00	29.24	5.97

Table 14. continued

Dataset in cm^{-3}

	Si Rhiz	PO4 Rhiz	NO2 Rhiz	NO3 Rhiz	NH4 Rhiz	PON	POC	Chl *a*	CPE	Proteins	EPS CP	EPS CC	EPS BP	EPS BC	PA	bBP	Prok Biomass	AMA	BGA
Units	mmol cm^{-3}	mmol cm^{-3}	mmol cm^{-3}	mmol cm^{-3}	mmol cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	µg cm^{-3}	cells cm^{-3}	pmol ^{3}H-Thy cm^{-3} h^{-1}	g C cm^{-3}	nmol cm^{-3} h^{-1}	nmol cm^{-3} h^{-1}
JULY D1r1	43.81	0.87	1.57	0.96	10.25	0.02	0.13	27.51	35.36	2668.09	46.12	50.36	12.23	153.89	1.15E+10	76.29	0.91	422.01	7.30
JULY D1r2	49.44	0.59	0.35	1.27	4.80	0.02	0.14	32.82	42.00	3115.03	108.32	71.13	23.68	108.25	1.31E+10	87.64	1.04	540.85	9.32
JULY D1r3	51.01	1.58	0.14	0.66	1.90	0.02	0.15	30.88	39.54	1658.33	34.14	84.78	15.20	73.30	2.08E+10	84.89	1.64	225.97	8.66
JULY D2r1	76.70	0.12	0.17	7.45	2.51	0.02	0.14	7.94	14.80	4496.48	14.05	135.39	5.14	8.26	1.23E+10	82.93	0.98	246.50	4.94
JULY D2r2	62.54	0.30	0.16	1.60	2.53	0.02	0.14	7.07	13.63	4090.17	117.65	45.36	6.09	12.46	1.55E+10	55.93	1.23	208.72	6.45
JULY D2r3	76.42	0.17	0.90	0.91	9.16	0.03	0.18	8.81	17.03	3033.33	32.51	69.48	6.39	133.22	1.62E+10	106.16	1.28	177.73	9.64
JULY D3r1	158.18	0.52	0.56	7.23	2.48	0.02	0.16	3.49	9.53	3927.65	53.99	66.93	8.70	86.89	1.43E+10	41.71	1.13	115.38	8.13
JULY D3r2	150.32	1.44	1.88	7.15	22.66	0.03	0.21	3.01	9.25	4787.67	49.87	64.92	9.55	18.09	1.15E+10	64.65	0.91	129.88	6.42
JULY D3r3	188.02	1.35	3.04	5.07	23.76	0.03	0.22	4.14	11.56	3808.33	52.73	101.84	15.43	21.67	1.47E+10	56.25	1.16	95.90	3.86
JULY D4r1	253.72	0.34	0.40	2.28	21.35	0.03	0.22	1.97	7.89	4585.05	139.19	133.72	10.87	147.80	8.59E+09	20.83	0.68	151.86	7.62
JULY D4r2	312.02	0.64	0.42	3.72	46.02	0.04	0.23	1.68	7.33	4771.72	94.93	50.68	14.28	96.30	9.52E+09	30.30	0.75	184.28	5.76
JULY D4r3	285.72	0.11	0.46	8.05	34.00	0.04	0.24	1.45	7.22	4415.88	188.94	67.08	11.59	80.12	1.00E+10	38.36	0.79	112.19	5.41
JULY D5r1	497.94	0.98	0.67	1.98	109.25	0.04	0.26	1.22	7.42	5057.55	115.72	108.62	17.43	70.66	9.19E+09	50.60	0.73	164.49	5.81
JULY D5r2	402.82	0.37	0.43	2.70	140.81	0.04	0.26	1.15	6.80	4929.22	150.48	73.36	16.09	59.72	8.87E+09	44.85	0.70	142.72	3.29
JULY D5r3	412.40	0.52	0.50	5.13	109.76	0.03	0.22	0.76	6.24	5646.73	85.68	53.54	16.95	32.00	6.37E+09	41.10	0.50	83.89	4.75
FEB D1r1	60.57	0.54	1.74	16.88	26.21	0.02	0.10	24.76	32.07	1664.99	82.48	16.00	21.28	6.90	5.91E+09	21.65	0.47	40.74	7.19
FEB D1r2	105.26	1.46	0.98	25.82	26.33	0.02	0.14	27.43	37.10	1886.68	59.98	13.22	23.25	7.61	5.61E+09	14.21	0.44	99.45	6.36
FEB D1r3	82.65	0.84	0.96	5.28	32.95	0.02	0.17	37.06	45.32	1908.85	80.46	17.87	24.83	9.76	7.45E+09	12.68	0.59	84.47	2.18
FEB D2r1	135.18	1.56	0.64	3.62	49.34	0.02	0.15	6.51	14.41	2701.08	77.69	19.61	20.93	8.55	6.17E+09	40.03	0.49	61.97	1.60
FEB D2r2	198.27	6.47	1.18	213.60	51.86	0.03	0.18	4.97	13.20	3569.76	101.93	21.41	24.68	11.53	9.70E+09	76.74	1.04	47.27	2.45
FEB D2r3	204.64	5.51	1.02	7.56	65.17	0.03	0.20	5.51	15.17	2410.91	58.79	14.67	19.45	7.06	8.27E+09	50.21	0.65	54.24	2.91
FEB D3r1	257.22	19.69	0.58	2.98	82.38	0.04	0.30	4.87	13.93	3415.93	63.24	23.28	28.67	11.03	7.55E+09	44.37	0.50	26.07	1.43
FEB D3r2	309.82	8.29	1.34	560.68	90.31	0.02	0.16	3.59	13.15	3108.27	50.30	18.89	21.50	8.77	9.41E+09	52.56	0.74	63.69	3.03
FEB D3r3	300.56	18.60	1.04	8.14	85.19	0.03	0.19	3.21	14.34	2688.08	68.19	19.20	26.94	7.33	9.27E+09	34.51	0.73	74.38	1.26
FEB D4r1	409.72	19.11	1.18	5.74	165.23	0.03	0.22	3.40	10.77	4194.25	77.21	19.55	26.32	9.14	5.42E+09	29.87	0.43	20.08	16.66
FEB D4r2	395.56	11.32	1.58	0.74	165.55	0.03	0.20	3.22	10.54	3634.67	74.79	24.15	37.48	10.21	7.57E+09	31.42	0.60	22.47	23.00
FEB D4r3	409.20	118.90	1.02	11.18	164.50	0.03	0.22	4.54	14.07	3613.75	86.95	24.62	26.30	8.49	9.18E+09	39.79	0.73	53.75	33.59
FEB D5r1	559.20	30.95	1.34	1.14	262.05	0.03	0.28	2.48	11.38	4910.72	85.81	8.58	39.06	10.82	3.48E+09	42.69	0.27	27.02	1.64
FEB D5r2	349.44	5.95	0.86	1.84	173.10	0.03	0.22	1.63	7.72	4863.65	78.57	7.98	35.88	11.51	5.60E+09	54.39	0.44	20.02	9.32
FEB D5r3	587.28	12.00	0.92	3.54	242.08	0.04	0.27	2.04	9.49	5240.19	80.54	17.14	25.65	10.26	9.35E+09	60.91	1.05	22.52	4.60

Table 14. continued

Dataset in m^{-2}

	Si Rhiz	PO4 Rhiz	NO2 Rhiz	NO3 Rhiz	NH4 Rhiz	PON	POC	Chl *a*	CPE	Phaeo/phaeo+chla	Proteins	EPS CP	EPS CC	EPS BP	EPS BC	PA	bBP	Prok Biomass	AMA	BGA
Units	mmol mL^{-1}	mmol mL^{-1}	mmol mL^{-1}	mmol mL^{-1}	mmol mL^{-1}	mg m^{-2}	mg m^{-2}	mg m^{-2}	mg m^{-2}	%	mg m^{-2}	mg m^{-2}	mg m^{-2}	mg m^{-2}	mg m^{-2}	cells m^{-2}	nmol ^{3}H-Thy m^{-2} h^{-1}	g C m^{-2}	µmol m^{-2} h^{-1}	µmol m^{-2} h^{-1}
JULY D1r1	43.81	0.87	1.57	0.96	10.25	0.22	1.34	275.13	353.62	22.20	26.68	461.19	503.58	122.28	1538.85	1.15E+14	762.94	9.07	3054.76	65.97
JULY D1r2	49.44	0.59	0.35	1.27	4.80	0.22	1.36	328.18	420.01	21.86	31.15	1083.17	711.30	236.82	1082.54	1.31E+14	876.44	10.37	3915.03	84.25
JULY D1r3	51.01	1.58	0.14	0.66	1.90	0.24	1.48	308.84	395.38	21.89	16.58	341.43	847.76	152.03	733.02	2.08E+14	848.86	16.43	2290.44	78.26
JULY D2r1	76.70	0.12	0.17	7.45	2.51	0.22	1.35	79.43	148.01	46.34	44.96	140.46	1353.93	51.43	82.60	1.23E+14	829.26	9.75	2061.98	44.63
JULY D2r2	62.54	0.30	0.16	1.60	2.53	0.23	1.44	70.75	136.35	48.11	40.90	1176.45	453.64	60.91	124.60	1.55E+14	559.34	12.26	1745.94	53.75
JULY D2r3	76.42	0.17	0.90	0.91	9.16	0.28	1.79	88.07	170.33	48.30	30.33	325.14	694.83	63.95	1332.24	1.62E+14	1061.59	12.77	1605.97	127.17
JULY D3r1	158.18	0.52	0.56	7.23	2.48	0.25	1.60	34.87	95.30	63.41	39.28	539.94	669.25	86.97	868.94	1.43E+14	417.10	11.31	1020.01	73.47
JULY D3r2	150.32	1.44	1.88	7.15	22.66	0.32	2.07	30.08	92.52	67.49	47.88	498.67	649.20	95.47	180.88	1.15E+14	646.46	9.12	1029.95	64.14
JULY D3r3	188.02	1.35	3.04	5.07	23.76	0.34	2.15	41.39	115.60	64.20	38.08	527.34	1018.43	154.26	216.70	1.47E+14	562.51	11.65	866.60	34.89
JULY D4r1	253.72	0.34	0.40	2.28	21.35	0.34	2.20	19.68	78.87	75.05	45.85	1391.93	1337.19	108.72	1478.00	8.59E+13	208.31	6.78	1372.23	63.26
JULY D4r2	312.02	0.64	0.42	3.72	46.02	0.35	2.27	16.77	73.25	77.11	47.72	949.26	506.81	142.79	962.99	9.52E+13	303.02	7.52	1665.22	52.05
JULY D4r3	285.72	0.11	0.46	8.05	34.00	0.36	2.44	14.54	72.20	79.87	44.16	1889.38	670.81	115.90	801.16	1.00E+14	383.61	7.90	1013.77	48.87
JULY D5r1	497.94	0.98	0.67	1.98	109.25	0.39	2.59	12.21	74.20	83.55	50.58	1157.23	1086.17	174.32	706.61	9.19E+13	506.05	7.26	1486.37	52.49
JULY D5r2	402.82	0.37	0.43	2.70	140.81	0.39	2.56	11.55	68.03	83.02	49.29	1504.76	733.55	160.86	597.16	8.87E+13	448.48	7.01	1289.60	29.77
JULY D5r3	412.40	0.52	0.50	5.13	109.76	0.34	2.25	7.55	62.35	87.89	56.47	856.80	535.45	169.54	319.99	6.37E+13	410.95	5.03	758.03	42.92
FEB D1r1	60.57	0.54	1.74	16.88	26.21	0.16	1.04	247.60	320.73	22.80	16.65	824.82	160.04	212.75	69.00	5.91E+13	216.54	4.67	368.10	64.98
FEB D1r2	105.26	1.46	0.98	25.82	26.33	0.20	1.37	274.25	370.98	26.07	18.87	599.77	132.25	232.51	76.11	5.61E+13	142.14	4.43	898.63	57.48
FEB D1r3	82.65	0.84	0.96	5.28	32.95	0.24	1.72	370.61	453.22	18.23	19.09	804.59	178.71	248.25	97.60	7.45E+13	126.79	5.88	763.32	19.66
FEB D2r1	135.18	1.56	0.64	3.62	49.34	0.21	1.46	65.07	144.10	54.85	27.01	776.87	196.09	209.34	85.52	6.17E+13	400.33	4.88	560.01	14.45
FEB D2r2	198.27	6.47	1.18	213.60	51.86	0.26	1.83	49.74	131.97	62.31	35.70	1019.27	214.12	246.82	115.32	9.70E+13	767.44	7.66	427.10	22.11
FEB D2r3	204.64	5.51	1.02	7.56	65.17	0.27	1.98	55.07	151.72	63.70	24.11	587.91	146.72	194.54	70.58	8.27E+13	502.11	6.53	490.15	26.28
FEB D3r1	257.22	19.69	0.58	2.98	82.38	0.41	2.97	48.71	139.34	65.05	34.16	632.42	232.77	286.66	110.28	7.55E+13	443.68	5.96	235.57	12.89
FEB D3r2	309.82	8.29	1.34	560.68	90.31	0.23	1.61	35.85	131.50	72.74	31.08	503.04	188.87	214.96	87.73	9.41E+13	525.56	7.44	575.54	15.41
FEB D3r3	300.56	18.60	1.04	8.14	85.19	0.25	1.92	32.12	143.45	77.61	26.88	681.86	191.95	269.44	73.35	9.27E+13	345.07	7.32	672.06	11.37
FEB D4r1	409.72	19.11	1.18	5.74	165.23	0.28	2.17	33.98	107.66	68.44	41.94	772.10	195.48	263.22	91.43	5.42E+13	298.70	4.29	181.48	131.63
FEB D4r2	395.56	11.32	1.58	0.74	165.55	0.26	1.99	32.21	105.44	69.45	36.35	747.94	241.53	374.82	102.05	7.57E+13	314.17	5.98	230.08	191.58
FEB D4r3	409.20	118.90	1.02	11.18	164.50	0.31	2.19	45.40	140.73	67.74	36.14	869.50	246.19	263.00	84.92	9.18E+13	397.88	7.25	382.10	303.56
FEB D5r1	559.20	30.95	1.34	1.14	262.05	0.34	2.83	24.78	113.84	78.23	49.11	858.15	85.82	390.57	108.20	3.48E+13	426.86	2.75	244.15	14.81
FEB D5r2	349.44	5.95	0.86	1.84	173.10	0.28	2.20	16.34	77.24	78.84	48.64	785.67	79.80	358.78	115.13	5.60E+13	543.87	4.42	180.89	84.24
FEB D5r3	587.28	12.00	0.92	3.54	242.08	0.36	2.72	20.40	94.93	78.51	52.40	805.37	171.40	256.46	102.60	9.35E+13	609.05	7.38	203.50	41.58

1.3 Conclusion

Les communautés de procaryotes sont majoritairement contôlées par un effet ressources, appelé « *bottom-up*», qui s'oppose au contrôle par les prédateurs qualifié de « *top-down* » (**Figure 50**). Ainsi, ces communautés se structurent suivant des gradients de paramètres abiotiques, c'est-à-dire les conditions environnementales et leurs ressources (température, nutriments, EPS protéiques liés, biomasse chlorophyllienne), plutôt que selon la pression de prédation. Quelles que soient les conditions météorologiques, les communautés suivent une stratification en deux horizons : 1) de la surface à environ 2 cm *bsf*, et 2) de environ 2 à 10 cm *bsf*. Entre ces horizons, existe une zone de transition dont la position, estimée entre 1,5 et 3,5 cm *bsf*, reste à déterminer plus précisément. La production des bactéries hétérotrophes et la production primaire étaient plus intenses en juillet qu'en février et juillet se caractérisait par une faible teneur en nutriments azotés. Ce résultat suggérait un fort *turnover* de la matière en juillet entraînant une compétition entre le MPB et les procaryotes (**Figure 50**). Ces liens étaient découplés en février dans l'horizon de surface, prouvant une alternance de couplage/découplage guidée par la disponibilité en sels nutritifs dans cette zone.

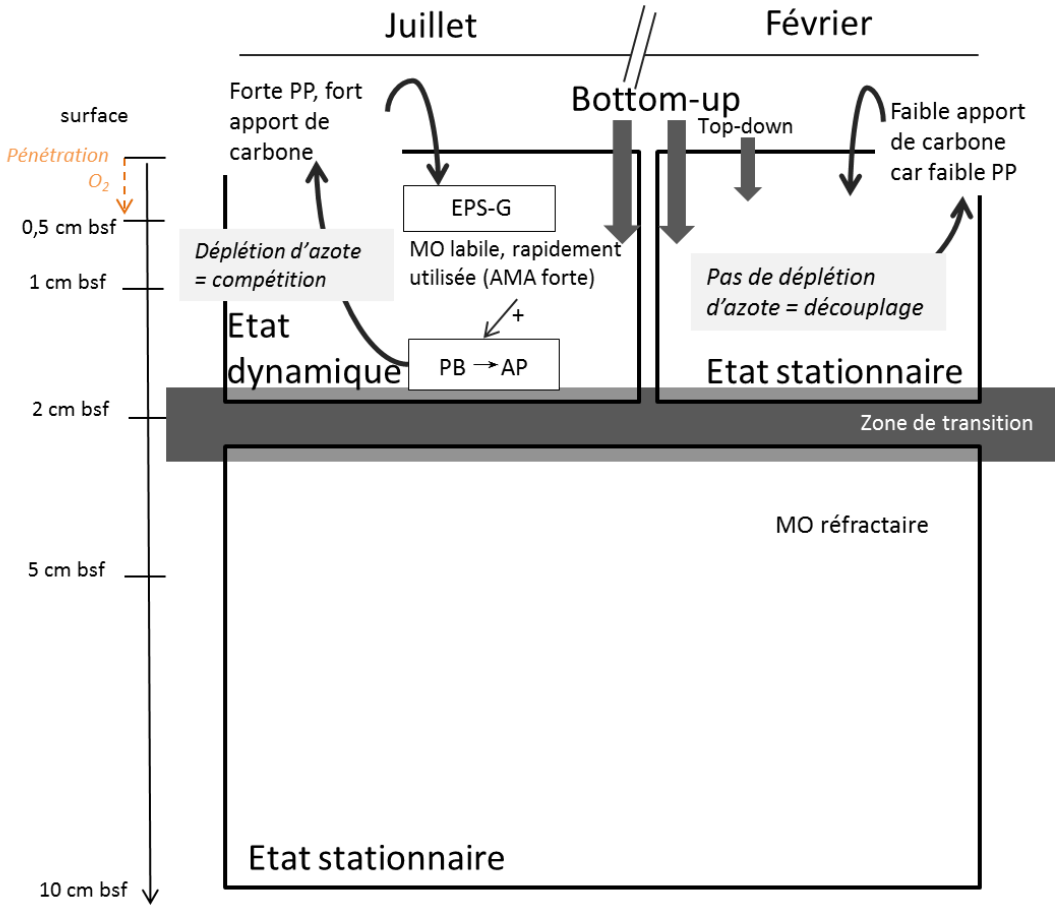


Figure 50. Schéma conceptuel de la stratification verticale (*bsf* pour « *below sediment surface* ») révélée par l'analyse écologique des micro-organismes suivant deux conditions contrastées. En juillet, la forte production primaire (PP) est associée à une production de substances exopolymériques glucidiques (EPS G) constituant de la matière organique (MO) labile hydrolysable par les activités enzymatiques notamment l'aminopeptidase (AMA). Il en découle une plus forte production par les bactéries (PB) et une plus forte abondance de procaryotes (AP). Les communautés subissent deux types de contrôle : effet « *bottom-up* » = effet ressources (effet majoritaire) et effet « *top-down* » = effet prédation.

Chapitre 2. Diversité des communautés de procaryotes et rôle fonctionnel dans le cycle de l’azote dans une vasière intertidale

2.1 Contexte de l'étude

Dans le précédent chapitre, nous avons démontré la présence de forts gradients suivant la profondeur ; gradients dont les profils évoluent selon les conditions météorologiques. Les résultats suggèrent également une stratification en trois horizons. L'horizon intermédiaire, en zone tampon, s'établit entre 1,5 et 3,5 cm *bsf*. L'hypothèse alors émise propose que la composition taxonomique de cette couche tampon soit plus complexe et contienne des organismes des couches supérieures et des couches profondes. D'après certaines études menées en mer de Wadden, les sédiments côtiers sont parmi les écosystèmes les plus diversifiés en termes de structure bactérienne (Zinger *et al.*, 2011) et cette structure semble fortement influencée par la profondeur du sédiment (Gobet *et al.*, 2012). Cette forte diversité présente une redondance fonctionnelle potentiellement forte et assure de nombreux rôle notamment dans les cycles biogéochimiques. Dans les zones côtières, les cycles biogéochimiques sont très dynamiques (Gruber and Galloway, 2008) : l'azote est un élément clé dans le milieu marin et les réactions liées à son cycle sont principalement réalisées par les micro-organismes (Thamdrup and Dalsgaard, 2008). Or, les communautés de procaryotes ont rarement été étudiées dans les vasières côtières.

Les objectifs de ce chapitre sont donc, dans un premier temps de décrire la diversité archéenne et bactérienne suivant un gradient de profondeur et selon deux conditions météorologiques contrastées. Et dans un second temps, de tester si ces assemblages taxonomiques sont associés à certains traits fonctionnels liés au cycle de l'azote.

Afin de répondre à ces objectifs, la stratégie d'échantillonnage adoptée sera similaire à celle du chapitre précédent (**Figure 51**), en revanche, les paramètres utilisés seront différents (**Table 15**).

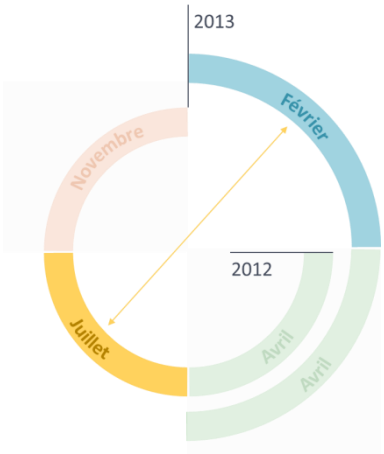


Figure 51. Schéma représentant la stratégie d'échantillonnage choisie

Table 15. Récapitulatif des différents paramètres mesurés dans ce travail et précision des paramètres considérés pour les analyses dans ce chapitre (●).

Paramètres	**Juillet 2012** **Milieu**	**Février 2013** **Milieu**
Irradiance	●	●
Température extérieure	●	●
Température sédiment	●	●
pH	●	●
Salinité	●	●
Teneur en eau		
Granulométrie		
COP/NOP	●	●
Chlorophylle *a*	●	●
Sels nutritifs	●	●
EPS		
Protéines totales		
Méiofaune		
Macrofaune		
Production bactérienne		
Activités enzymatiques		
Abondance procaryotes	●	●
Gènes fonctionnels (ADN)		
amoA bactérien	●	●
amoA archéen	●	●
nirS	●	●
nirK	●	●
nosZ	●	●
anammox*	●	●
Gènes fonctionnels actifs (ADNc)		
amoA bactérien		
amoA archéen		
nirS		
nirK		
nosZ		
anammox*		
Abondance bactéries (gène 16S ARNr)	●	●
Abondance archées (gène 16S ARNr)	●	●
Diversité bactérienne totale (gène 16S ARNr)	●	●
Diversité archéenne totale (gène 16S ARNr)	●	●
Diversité bactérienne active (16S ARNr)		
Diversité archéenne active (16S ARNr)		

*16S rRNA *Planctomycetes*

2.2 *Bacterial and archaeal structure coupled to nitrogen-related functional traits highlighted the influence of fine sediment depth stratification in mudflat*

C. Lavergne [1], C. Dupuy [1], M. Hugoni [2,3], H. Agogué [1]

[1] LIENSs, UMR 7266 ULR – CNRS, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

[2] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement", BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[3] CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63171 Aubière, France

Corresponding author : Lavergne Céline UMR 7266 ULR - CNRS, LIENSs, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.
Tel : +33 (0)5 46 50 76 44
Fax : +33 (0)5 46 50 76 63
E-Mail : celine.lavergne@univ-lr.fr

Running title: Prokaryotic structure in a mudflat

Keywords: *Archaea*, *Bacteria*, intertidal, mudflat, nitrogen cycle

2.2.1 Abstract

In intertidal mudflats, prokaryotic communities are taxonomically diverse and have essential roles in the nitrogen cycle as they supply inorganic nutrients to primary producers and are able to colonize such anaerobic niches. We investigated the prokaryotic functional traits in the nitrogen cycle (functional genes quantification) and prokaryotic community structure (454 pyrosequencing) among a fine depth-related scale (five layers from 0 to 10 cm below sediment surface, bsf). The nitrogen-related prokaryotic community was dominated by denitrifiers and the high abundance of *nosZ* gene traduced the putative capacity of the community to produce N_2 without retention of N_2O. Interestingly, the two genes, *nirS* and *nirK* co-occurred suggesting a similar ecological niche. We found a depth-related structuration of the archaeal community driven by such environmental variables, with a dominance of the *Thaumarchaeota* in surface (0-0.5 cm bsf) and a shift in deeper layers (5-10 cm bsf) with a dominance of the *Euryarchaeota*. The bacterial composition didn't exhibit any changes at this local scale and was dominated by the *Desolfubacterale* order. Weak congruence was found between the prokaryotic community structure and the nitrogen-related functional traits. Our work revealed an unexpected dominance of *δ-proteobacteria* associated with stratified archaeal diversity in a putative N_2-productive system.

2.2.2 Introduction

Prokaryotic communities in coastal zones vary greatly in space and time because of sharp gradients in salinity and nutrients (Kirchman *et al.*, 2005; Böer *et al.*, 2009; Herlemann *et al.*, 2011). At a global scale, salinity is the main factor driving bacterial community structure in oceans (Lozupone and Knight, 2007; Auguet *et al.*, 2009), followed by ecosystem type (e.g. water or sediment) and coastal sediments are the most diverse environment (Zinger *et al.*, 2011). In these benthic coastal systems, fluctuations in composition vary temporally and spatially, with a vertical-related depth influence (Böer *et al.*, 2009; Gobet *et al.*, 2012).

To date, studies focusing on both bacterial and archaeal composition considering their involvement in biogeochemical cycles in coastal sediments are missing. However, marine sediments have a central role in the nitrogen (N) cycle because 1) they constitute the most widely distributed anoxic niche in the marine realm and 2) N-related processes associated with microbes mainly occur in sediments and anoxic waters (Thamdrup and Dalsgaard, 2008).

In addition, in oceanic systems, nitrogen is often a limiting element for primary production and ecosystem productivity sustaining (Falkowski *et al.*, 1998; Capone, 2000), and prokaryotes represent major actors in biogeochemical processes by supplying inorganic nutrients through mineralization. Hence, this biogeochemical cycle is extremely dependent of microbial activities which realize all the major processes such as nitrification, denitrification, or anaerobic oxidation of ammonia (anammox).

N-related genes quantification is now a useful molecular tool used to better understand the role of prokaryotes in biogeochemical cycles among various ecosystems (Francis *et al.*, 2003; Wuchter *et al.*, 2006; Fernandes *et al.*, 2012a; Zhang *et al.*, 2013). During the last decades, microbial ecology studies have provided compelling evidence of genes encoding enzymes (*amoA* genes) related to nitrification in archaeal metagenomes from soil and marine waters (Venter *et al.*, 2004; Treusch *et al.*, 2005; Hallam *et al.*, 2006) and the isolation of the first autotrophic archaeal nitrifier, *Nitrosopumilus maritimus* (Konneke *et al.*, 2005) have led to a drastic shift in the classical view that *Bacteria* were the main responsible for nitrification. Different studies in coastal environments evaluated the abundance of archaeal and bacterial *amoA* (Caffrey *et al.*, 2007; Santoro *et al.*, 2008; Bernhard *et al.*, 2010) and, Smith *et al.* (2014a) suggested that, in intertidal sediments, ammonia oxidizers should be driven by long term ecological niche and short term fluctuations. Nevertheless, the relative contribution of ammonia oxidizing *Archaea* (AOA) *versus* ammonia oxidizing *Bacteria* (AOB) remains unclear and factors that regulate ammonia oxidizing microorganisms' activity and diversity have not yet been fully elucidated in aquatic ecosystems.

Nitrification coupled to denitrification–the anaerobic reduction of nitrates and/or nitrites to nitrous oxide (N_2O) and/or di-nitrogen (N_2) (Philippot, 2002)–, and/or anammox –the anaerobic ammonia oxidation–, can remove anthropogenic nitrogen pollution (Seitzinger, 1988; Corredor *et al.*, 1999; Lam *et al.*, 2007). Indeed, denitrification and anammox are key processes in coastal sediments where oxygen penetration is low and are the major processes of N-loss by N_2 production (Seitzinger, 1988; Gruber and Galloway, 2008). The fate of this fixed nitrogen in coastal zone is to date poorly known and molecular technics should resolve many ecological questions especially through the investigation of the *nirS*, *nirK* and *nosZ* genes (Philippot, 2002).

Globally, all the investigated N-related genes are highly ecosystem-dependent traducing that the N-related microbial processes may exhibit specific niches driving by environmental parameters (Braker *et al.*, 2001; Francis *et al.*, 2003; Caffrey *et al.*, 2007), time and depth (Schöttner *et al.*, 2011; Smith *et al.*, 2014a).

In benthic ecosystems, these changes in functional traits may be associated to changes of prokaryotic community composition. In a sandy flat, Böer *et al.* (2009) showed a vertical-related influence of bacterial community structure, estimated by fingerprint techniques, with higher bacterial operational taxonomic unit (OTU) numbers at 10-15 cm below sediment surface (bsf). By pyrosequencing bacterial 16S rRNA gene, Gobet *et al.* (2012) found a strong depth impact and allow a vertical description of the bacterial composition in sandy sediments (from 0 to 15 cm, 5-cm depth layers). However, recent sequencing techniques were scarcely applied to sediments (Zinger *et al.*, 2011; Gobet *et al.*, 2012) while other fingerprints techniques such as terminal restriction fragment length polymorphism –T-RFLP (Urakawa *et al.*, 2000; Braker *et al.*, 2001; Dang *et al.*, 2009; Luna *et al.*, 2013) or denaturing gradient gel electrophoresis –DGGE (Llobet-Brossa *et al.*, 2002; Franco *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2008) was commonly used to evaluate the prokaryotic community composition among a depth gradient.

In the literature, prokaryotic community structure and their role in biogeochemical cycles are often decoupled and studies combining the two ecological aspects lack in marine microbial ecology. In this work, we use as a workshop-site, the Marennes-Oleron mudflat (Atlantic coast, France). This sampling site is a free of macro-algae intertidal mudflat exhibiting a high primary production ensured by the microphytobenthos. In a previous study Laima *et al.* (2002) showed that nitrifiers could be present in the Marennes-Oleron mudflat until 6 cm bsf but the composition of N-related prokaryotic community and overall, the global prokaryotic structure among depth stratification had never been described yet. Here we studied an intertidal mudflat in two contrasted weather conditions according to a depth gradient to test whether *Bacteria* and *Archaea* had different ecological niches, by pyrosequencing the V3-V5 region of bacterial and archaeal 16S ribosomal RNA (rRNA) gene. As coastal marine sediments are highly diverse we also wanted to test if this diversity is associated with different genetic potential related to the nitrogen cycle by quantifying N-related genes among vertical sediment depth.

2.2.3 Materials and methods

2.2.3.1 Study site and sampling

The Marennes-Oleron Bay is located in the middle of the Atlantic French coast (N 45° 54', 53; W 01° 05', 23). Sampling was performed in the ridges at low tide with similar tidal range (5.5 +/- 0.2 m). Two contrasted weather conditions were compared: high temperature and irradiance (July 5th 2012) and low temperature and irradiance (February 11th 2013). In this study we did not consider the two sampling dates as two seasons because we sampled one day that might not be reflective of the entire season. The texture of the sediment is muddy and grain size range from 8.68 to 14.37 µm. For each sampling date, triplicate 15-cm diameter cores were sliced in five layers from 0 to 10 cm below sediment surface (bsf) (D1 = 0 to 0.5 cm; D2 = 0.5 to 1 cm; D3 = 1 to 2 cm; D4 = 2 to 5 cm and D5 = 5 to 10 cm). Each sediment layer was homogenized directly in a sterile box on the field and brought back to the beach in the dark in a cool box (4°C). Samples were subdivided using 50 mL sterile syringes with cutoff tips for further analysis (storage conditions differ according to parameter). In parallel, triplicate 12-cm cores were recovered for the determination of pore water nutrient concentrations. These 12-cm cores were holed vertically at each 0.5 cm, and sampling was performed at 0.5 cm, 1 cm, 1.5 cm, 3.5 cm and 7.5 cm bsf, corresponding to the middle of each layer sampled with 15-cm cores.

2.2.3.2 Sediment parameters

Depth temperature profiles were measured with Hobo sensors (Hobo Pro V2, Massachusetts, USA) fixed on a homemade stick that was vertically pushed into the sediment to stabilize the sensors at the 5 depths (0.5 cm, 1 cm, 2 cm, 5 cm and 10 cm bsf). Pore water pH and salinity were measured on supernatant after sediment centrifugation (15 min, 3,000 g at 4°C) with a pH probe (Eutech Instruments PC150, USA) and a conductivity meter (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Germany) respectively. Pore water content was quantified by weighting 50 mL of fresh sediment before and after drying (48h at 60°C). Porosity was calculated as the ratio of the volume of water divided by the total volume of sediment. For particular organic matter analysis (POM; nitrogen: PON and carbon: POC), lyophilized and decarbonated samples were by the combustion method (Strickland and Parsons, 1972) using a CHN elemental analyzer (Thermo Fischer Flash EA 1112).

For nutrient concentration analyses, pore water was immediately sampled from the 12-cm diameter cores on the site for the 5 depths, using the Rhizons® (Rhizosphere Research Products, NL-6706, Wageningen) method (Seeberg-Elverfeldt *et al.*, 2005) and interstitial water was stored at -20°C for further measurements. Nutrient concentrations (nitrites (NO_2^-), nitrates (NO_3^-) and ammonium (NH_4^+)) were determined with an autoanalyzer (Seal Analytical, GmbH Nordertedt, Germany) equipped with an XY-2 sampler according to the Aminot and Kérouel (2007) method.
Chlorophyll *a* (Chl *a*), used as a proxy of algal biomass, was 90%-acetone-extracted and expressed as µg μg^{-1} dry weight (DW) according to Lorenzen (1966).

Prokaryotic abundance (PA) was evaluated by flow cytometry after a cell extraction procedure according to Lavergne *et al.* (2014). Briefly, the extraction was based on successive dilution in a detergent mix, a mechanical separation followed by counting the extracted cells stained with SYBRGreen I through flow cytometry.

2.2.3.3 Nucleic acid extraction

DNA was extracted from ~1g of thawed sediment (stored at -20°C) using the UltraClean Soil kit® (MOBIO) according manufacturer recommendations to maximize yields. Samples were then stored at -20°C until quantitative PCR (qPCR) and pyrosequencing.

2.2.3.4 Nitrogen-related functional gene quantification by qPCR

Bacterial and archaeal 16S rRNA gene and six N-related genes (**Table 17**) were quantified based on fluorescent dye SYBRGreen I in each sediment DNA extract. The reaction mix (20 µL) contained 0.45 µM of each primer, 0.5-5 ng sample DNA, 10 µL of Master Mix (Maxima SYBRGreen/ROX, Fermentas) and qsp 20 µL nuclease-free water. All reactions were performed in triplicates using the thermocycler MxPro3000 equipped with MxPro software (Stratagene). For *Archaea* and *Bacteria* quantification, the thermal program used was: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 45 cycles of denaturing (30 s at 94°C for *Archaea*, 1 min at 95°C for *Bacteria*), annealing (30 s at 64°C for archaea and 40 s at 57°C for *Bacteria* extension (40 s at 72°C), plate read (1 s at 72°C). The cycling was followed by a final extension at 94°C for 15 sec, and a melting curve analysis from 55 to 94°C with a plate read every 0.5°C.

For N-related genes quantifications, the program varied between 40 and 45 cycles of denaturation (30 s at 94 °C), annealing (40 s at 55 °C for anammox – *Planctomycetes* 16S rRNA gene, 58 °C for AOA-*amoA* and AOB-*amoA*, and 57 °C for *nirS* and *nirK* gene). The

qPCR efficiencies were 86-101% and correlation coefficients (R^2) were always higher than 0.91 (Table S3). Gene copies number was expressed per gram sediment dry weight (DW) taking into account the copies of each gene per genome: 1 copy per cell of archaeal *amoA* (Blainey *et al.*, 2011), *nirS, nirK, nosZ* (Philippot, 2002), 2.5 copies of bacterial *amoA* (Arp *et al.*, 2007) and 4.3 copies of 16S rRNA gene for *Planctomycetes Bacteria* (mean based on the available genomes). Log10 ratio AOB:AOA was calculated according to Santoro *et al.* (2008).

2.2.3.5 454 Pyrosequencing and bioinformatic analysis

Amplification of the V3-V5 region of the 16S rRNA gene was performed with primers: 563F (AYT GGG YDT AAA GNG) and 907R (CCG TCAA TTC MTT TGA GTT T) for *Bacteria* and 519F (CAG CCG CCG CGG TAA) and 915R (GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT) for *Archaea*. Pyrosequencing was achieved by the GATC plateform (Konstanz, Germany) by using a Roche 454 GS-FLX system with titanium chemistry. Raw sequences for *Archaea* and *Bacteria* were cleaned according to procedures consisting in the elimination of sequences presenting ambiguous bases "N", a quality score <30 for *Archaea* and <27 for *Bacteria*, length shorter than 200pb and with a mismatch in the forward primer. The remaining reads were clustered at 97% similarity threshold (Kim *et al.*, 2011) and representative sequence for each OTU were inserted in phylogenetic trees for taxonomic annotation. The process was automated by PANAM that also computed richness and diversity indexes, Chao1 and Shannon respectively (http://code.google.com/p/panam-phylogenetic-annotation/downloads/list;(Taib *et al.*, 2013)) and chimeras were detected using Uchime (Edgar *et al.*, 2011). Finally, 72% of total archaeal sequences and 70% of total bacterial sequences were suitable for the diversity analysis, and thus were randomly resampled down to 1,500 sequences for the *Archaea* and to 13,000 for the *Bacteria* using PANAM (**Table 17**; Supporting Info). Analysis was done on 10 samples: two contrasted conditions (July and February) at 5 sediment layers (see "Study site and sampling" section). Sampling triplicates were pooled after PCR assays before purification of PCR products. For bacterial analysis, six samples were retained for the analysis because, 1) we do not managed to sequence samples from 2 to 10 cm bsf in July (J-D4 and J-D5) and from 5 to 10 cm in February (F-D5); and 2) F-D4 was excluded because of a large chloroplast amplification bias in the sample. For *Bacteria*, in our dataset, 44% of total operational taxonomic units (OTUs) number were

singletons, after removing these singletons, 6 645 OTUs were retained. In the same way, 46% of archaeal OTUs were singletons and 1025 OTUs were retained for the analysis.

2.2.3.6 Statistical analysis

In the results section, all values are presented as mean ±SE. In order to determine if two variables belong to the same population, student tests (t test) or wilcoxon tests were performed, according to the normality of the data. Spearman was used to measure and test the correlation between functional genes and environmental variables. Non-metric Multidimensional Scaling (NMDS) was performed based on the Bray-Curtis dissimilarity matrix of relative abundance of total archaeal Operational Taxonomic Units (OTUs) and coupled with fitting environmental variables in order to evaluate the drivers of the composition of the community. Then, the number of significant clusters was estimated by the Mantel optimal number of groups followed by a hierarchical ascendant classification (HAC) and significant groups were plotted on the NMDS ordination. The relationship between the functional genes (χ^2 transformed) and 8 environmental parameters was assessed by canonical correlation analysis (CCA). These analyses were performed with the VEGAN package (http://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html) in R.

2.2.4 Results

2.2.4.1 Environmental parameters of sediments of Marennes-Oleron Bay

The temperature weakly fluctuated among vertical depth, but strongly varied between sampling dates as maximum values were recorded in July (21.6 ±0.15°C) and minima in February (8.9 ±0.13°C). Salinity rose to 45.37 ±2.32 in surficial sediment in July and was lower deeper throughout the whole sediment (< 37.5 in July and < 29.5 in February). In February, salinity never compassed 30 and was stable throughout the studied sediment depth. The algal biomass on the surface (D1) was 69.5 ±2.35 µg Chl *a* g^{-1} sed DW in July and 59.4 ±1.72 µg Chl *a* g^{-1} sed DW in February (**Figure 52**A & D). This algal biomass showed an exponential decrease with values never exceeding 17.4 µg Chl *a* g^{-1} sed DW under 0.5 cm below sediment surface (bsf). The porosity of the sediment was almost lower in deeper layer with values ranging from 0.68 to 0.79 regardless of the sampling date. Concerning pore water nutrients, NO_2^- + NO_3^- (NO_x) concentrations tended to be higher in July between 1 and 2 cm bsf (8.3 ±0.37 µM, **Figure 52**B). In contrast, NO_x concentrations in February were highly variables and tend to be higher in surface between 0 and 0.5 cm bsf (**Figure 52**E). NH_4^+concentrations were two times lower in July than in February (**Figure 52**B & E) and were always higher in deeper layers (5-225 µM).

The abundance of prokaryotes followed a decreasing gradient regardless the sampling date (**Figure 52**C & F) except in surficial sediment in February where their abundance exhibited low values. Prokaryotic abundance ranged from 1.08 $\pm 0.75 \times 10^{10}$ to 3.45 $\pm 1.05 \times 10^{10}$ cells g^{-1} sed DW. The percentage of *Archaea* (quantified by qPCR) ranged from 4.7% to 39.6 % of total prokaryotic 16S rRNA genes from surface to deeper layers (**Figure 52**C & F). This proportion of *Archaea* was significantly correlated with ammonia concentration (Spearman correlation: $\rho = 0.46$, $P = 0.011$, $n=30$) and negatively correlated with chlorophyll *a* and porosity (Spearman correlation: $\rho = -0.88$ and -0.66 respectively, $P<0.01$, $n=30$).

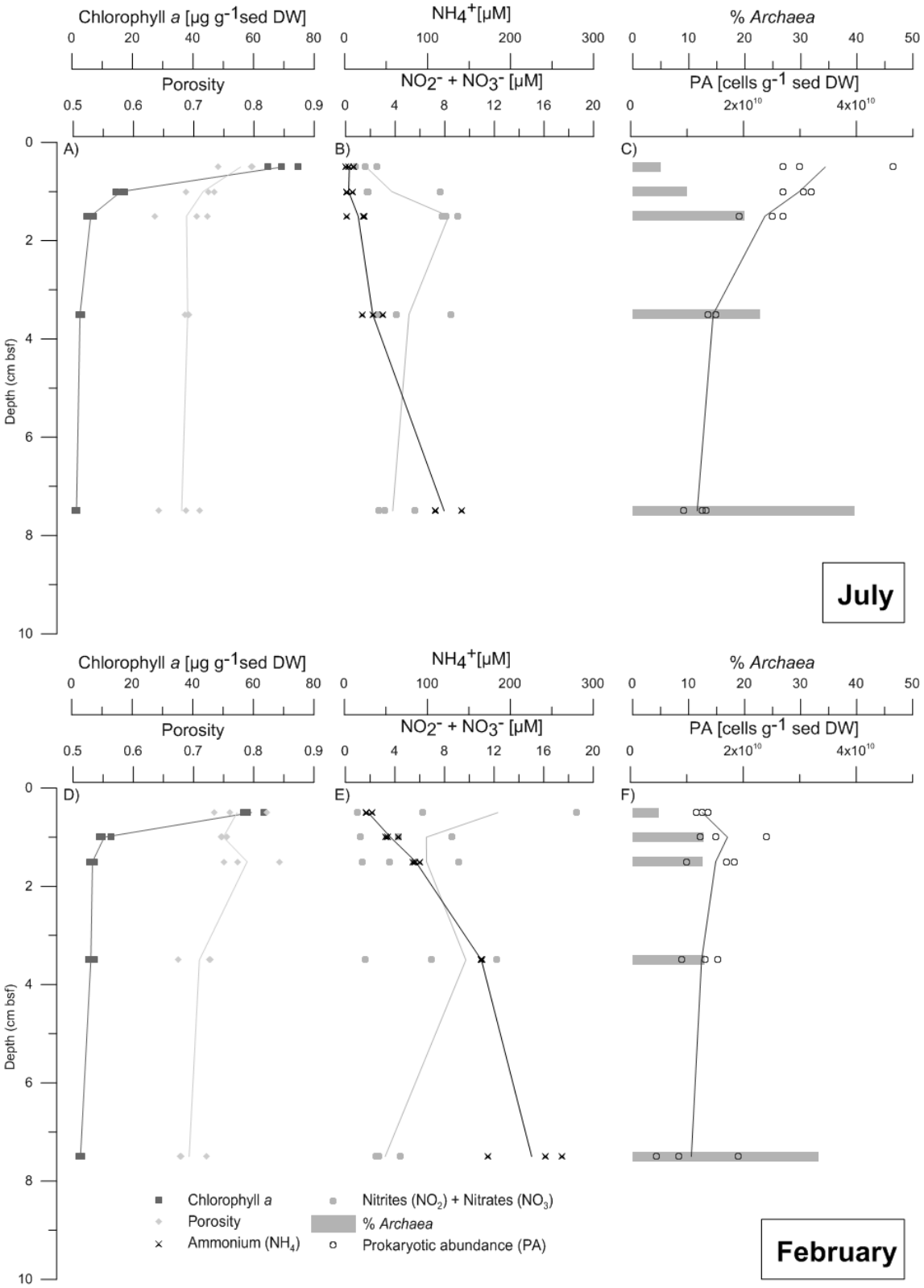


Figure 52. Profiles among depths (from 0 to 10 cm below sediment surface–bsf) of chlorophyll *a*, porosity (A, D), pore water nitrites + nitrates (NO_2^- + NO_3^-), ammonia (NH_4^+), (B, E), % of *Archaea* and prokaryotic abundance (PA) (C, F), in July 5th, 2012 (A-C) and in February 11th, 2013 (D-F).

2.2.4.2 Bacterial diversity, the predominance of Proteobacteria

The structure of the bacterial community was assessed by 454 pyrosequencing on the bacterial 16S rRNA genes. The Shannon index, used as a proxy of the bacterial community diversity (at the OTUs level), was higher in July (7.06) than in February (6.63) (**Table 18**). The total number of OTUs in each sediment sample ranged from 2376 to 3273 OTUs with coverage always higher than 86% (**Table 18**) and rarefaction curves reaching a plateau (**Figure 59**). Considering the 1000 most abundant OTUs, no variation in bacterial OTUs number within phyla was recorded among sampling dates and depths (**Figure 53**). Our samples were highly diverse as 40 phyla were represented and retrieved in almost all the samples resulting to a high similarity value (mean = 86.7%) between samples (always higher to 79%, **Table 19**). The lowest similarity was observed between D1 in February and D3 in July notably due to the difference in abundance of *Planctomycetes* (333 and 1095 sequences respectively) and *Proteobacteria* (6129 and 4653 sequences respectively). The dominant phylum was the *Proteobacteria*, representing 48%-62% of the total bacterial sequences. Within *Proteobacteria*, δ-*proteobacteria* accounted for 41-57%, γ-*proteobacteria* contributed to 29-44%, α-*proteobacteria* contributed to 8-11% and β-*proteobacteria* were the less prevalent contributing to 0.9-1.5% (**Figure 54**). The δ-*proteobacteria* were represented by 210 different OTUs and mostly by the *Desulfobacterales* which are sulfate-reducing bacteria (SRB). All others taxa contributed to a lesser extent (less than 5% of total bacterial sequences) except for the *Planctomycetes* with a prevalence of 6-17% across samples. *Planctomycetes* also exhibited a high diversity of OTUs compared to other taxa and were represented by 72 OTUs (**Figure 52**). *Nitrospirae, Chloroflexi* and *Planctomycetes* 16S rRNA gene sequences relative abundance followed an increasing gradient with depth from 0 to 2 cm bsf (D1-D3) (**Figure 53**). *Acidobacteria* and *Bacteroidetes* never encompass 5% and both always accounted for 8% of the bacterial community. The *Chlamydiae* was the less dominant taxa and was only present in D1 in July and in D2 in February.

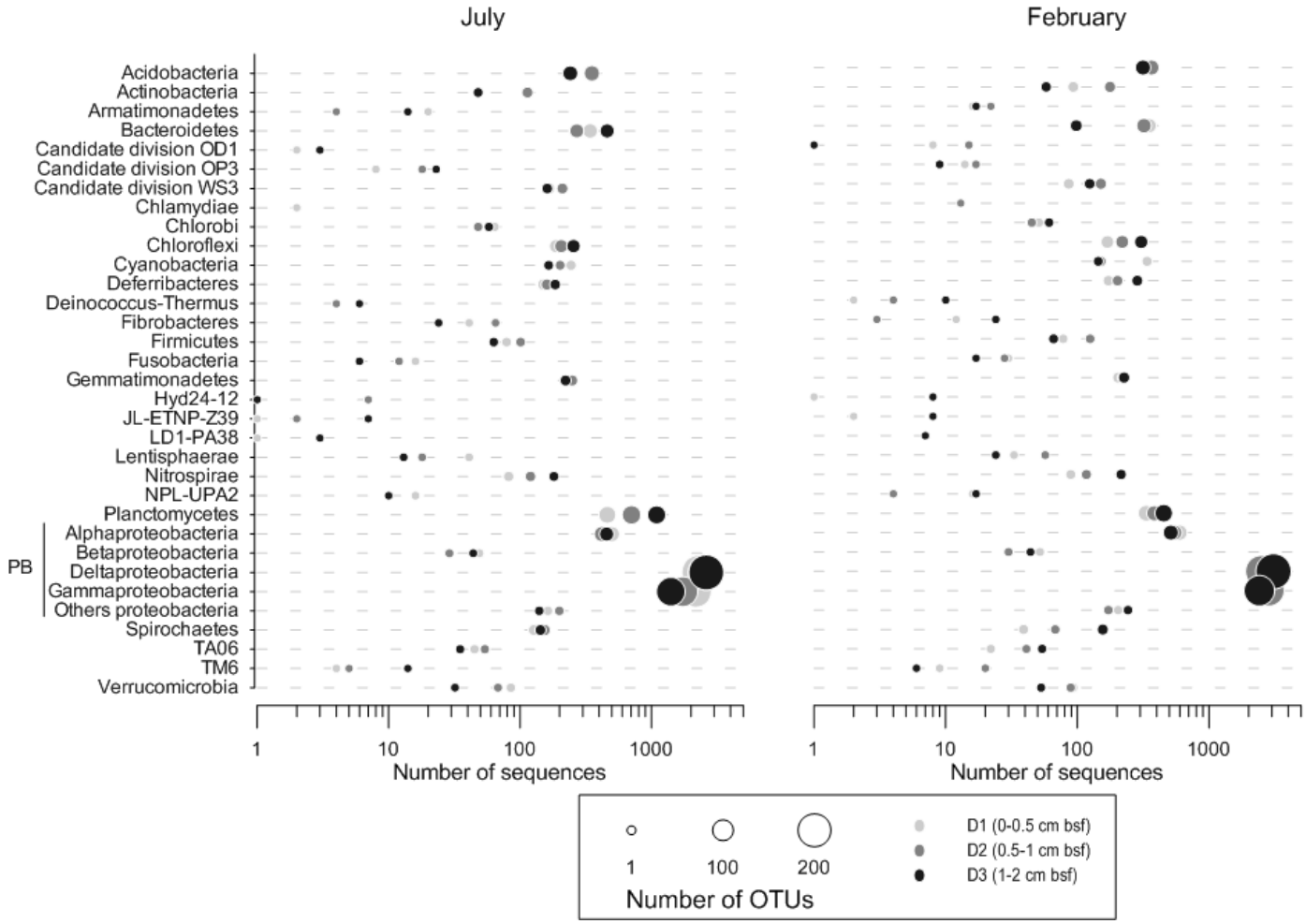


Figure 53. Distribution of bacterial 16S rRNA gene diversity (number of operational taxonomic units –OTUs) and abundance (number of sequences, $\log_{10}$-scaled) on the phylum level among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf) on the 1 000 most abundant bacterial OTUs. *Proteobacteria* (PB) were presented at the class level.

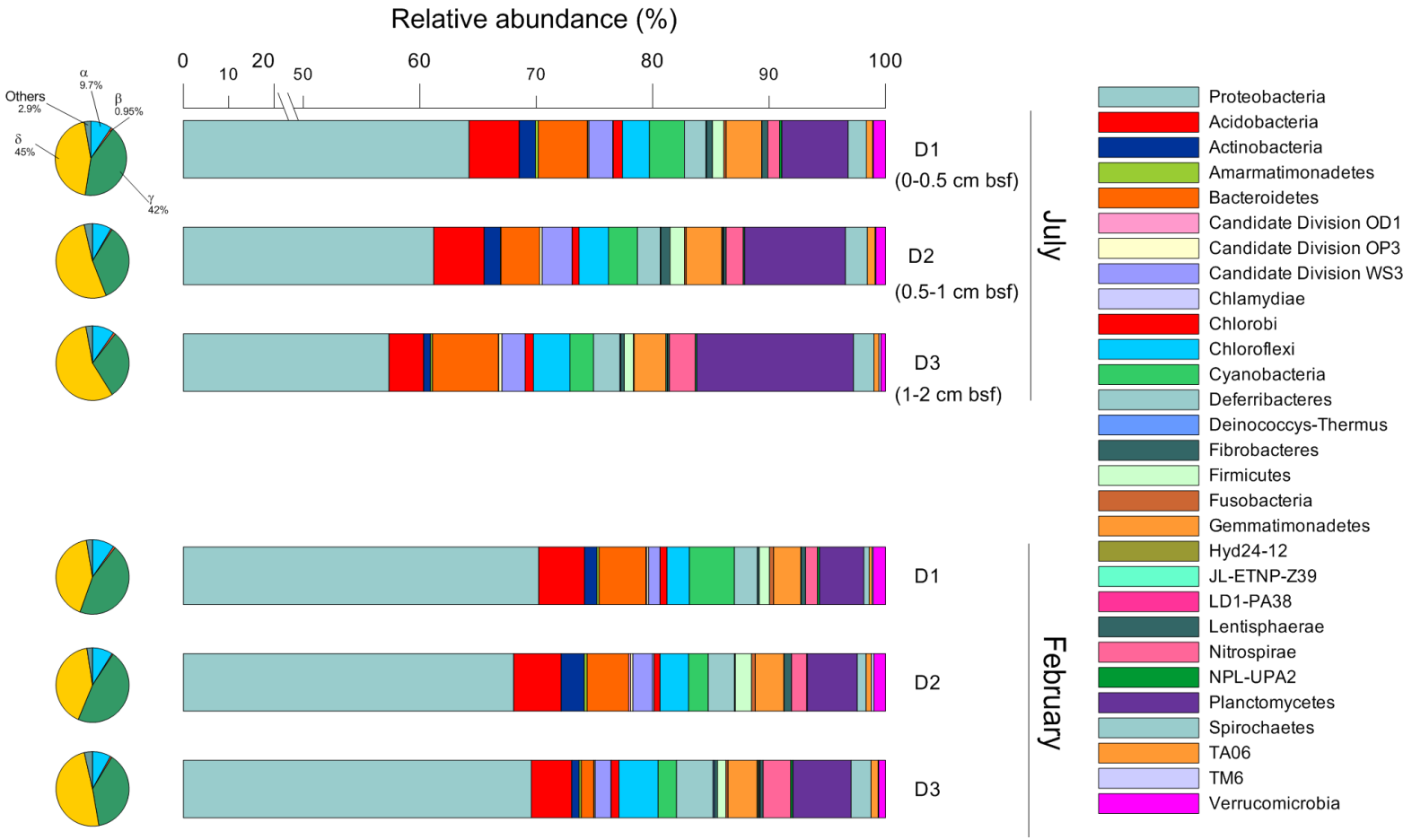


Figure 54. 16S rRNA gene relative abundance and affiliation of the 1 000 most abundant bacterial operational taxonomic units (OTUs) on the phylum level among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf). Pie charts are relative abundance of the *Proteobacteria* in each sample.

2.2.4.3 Archaeal diversity, a depth-related shift from Thaumarchaeota-dominated to Euryarchaeaota-dominated community

The structure of the archaeal community was assessed by 454 pyrosequencing on the archaeal 16S rRNA gene. The diversity of the archaeal communities evaluated by the Shannon index (**Table 18**) showed significant difference between July and February (t-test: t = 2.86, df = 7.4, $P<0.05$, $n=5$). The total number of operational taxonomic units (OTUs) in each sediment sample were significantly different between the two sampling dates (t-test: t = 2.66, df = 5.7, $P<0.05$, $n=5$) and ranged from 295 to 641 OTUs. Nevertheless, the two sampling dates shared more than half (660) of total archaeal OTUs numbers (1025). All the major archaeal taxa were retrieved in our samples excepting unassigned *Crenarchaeota* and unassigned *Thaumarchaeota* which were absent in the surface sediments (from 0 to 1 cm bsf). In our samples, many OTUs belonging to deep-sea hydrothermal vents Euryarchaeotic group (DHVEG) were retrieved, especially in the *Euryarchaeota* from the *Thermoplasmatales* (Marine Benthic Group-D and DHVEG-1). As for *Bacteria*, no variation in OTUs number within taxa was recorded among sampling dates and depths (**Figure 55**). The most diverse taxon was the *Euryarchaeota Halobacteriales* with 20% of the total OTUs number (96 OTUs). Some taxa exhibited a clear vertical structuration such as the Marine Group I (MGI), or the *Thermoplasmata*. These two taxa significantly followed inverse gradient (Spearman correlation: $\rho= -0.818$, $P<0.01$, $n=5$): 16S rRNA gene *Thaumarchaeota* MGI sequences was more abundant (57% of the archaeal sequences) and more diverse (70 OTUs) in surface and their abundances decreased with depth increase (**Figure 56**). On the contrary, *Thermoplasmata* class was more abundant (28% of archaeal sequences) in deeper layers than in surficial sediment (3.6% of archaeal sequences).

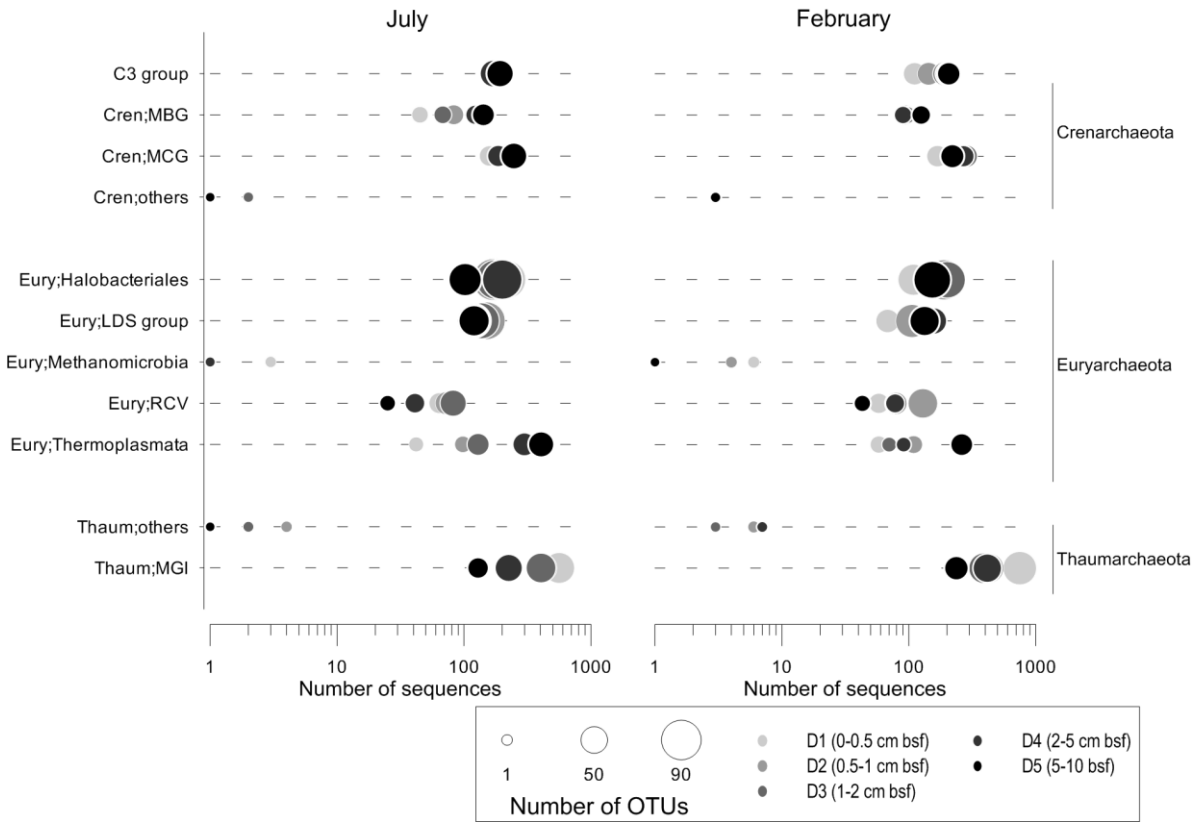


Figure 55. Distribution of 16S rRNA gene archaeal diversity (number of operational taxonomic units, OTUs) and abundance (number of sequences, $\log_{10}$-scaled) at the phylum level among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf).

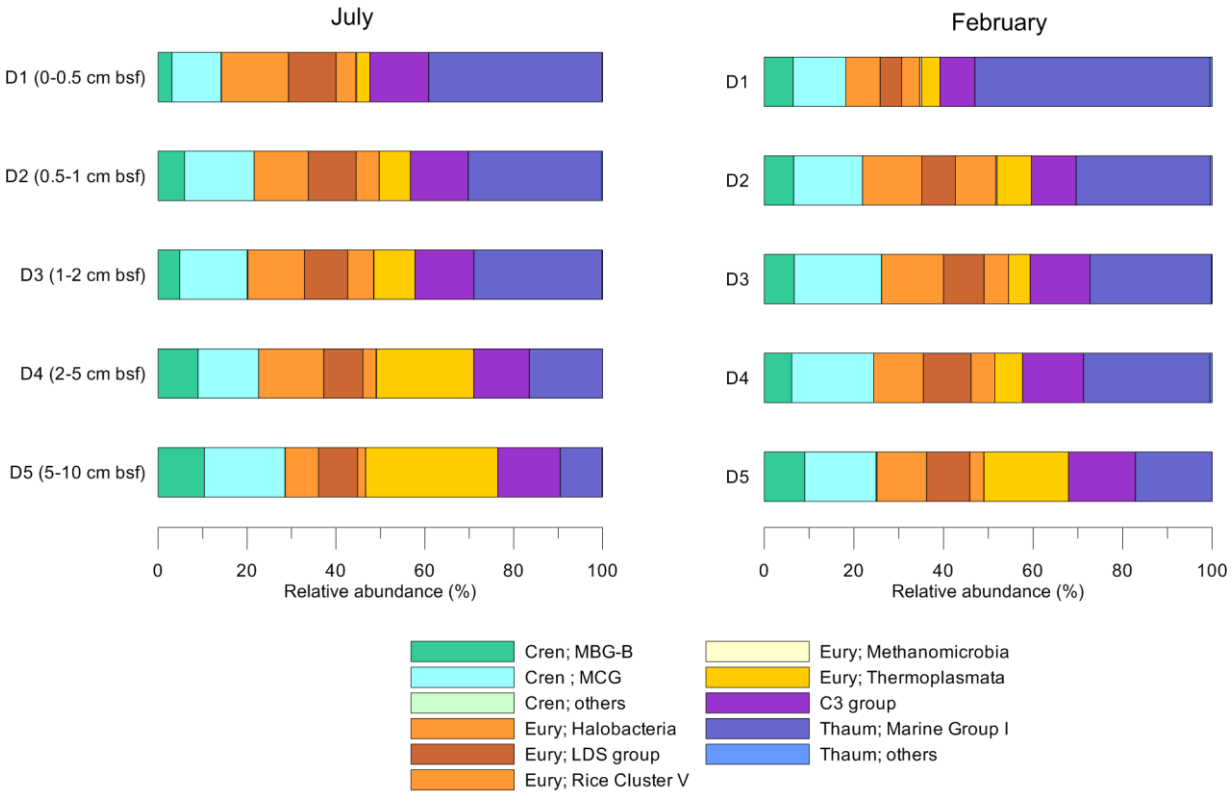


Figure 56. Relative abundance and affiliation of total archaeal operational taxonomic units (OTUs) among sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (bsf).

The NMDS ordination (**Figure 57**A) coupled with a dendrogram (**Figure 57**B) based on the Bray-Curtis distance matrix of the abundance of 16S rRNA gene archaeal taxa, showed a structuration among the samples (**Figure 57**): 3 depth-related clusters were defined. The depth corresponding to the surface from 0 to 0.5 cm bsf in February (F-D1) clustered with any other sampling point due to the combination of low abundance of *Euryarchaeota* and dominance of *Thaumarchaeota* (**Figure 56**). Then, a second cluster, "the transitional cluster" comprising the layers between 0 and 2 cm bsf from July and the layers from 0.5 to 5 cm bsf from February was distinguished and corresponded to a mixing group in terms of diversity structure (**Figure 56**). Finally, a third cluster was identified as deeper layers from 2 to 10 cm bsf in July and from 5 to 10 cm bsf in February. This third "deeper layer" cluster was characterized by the dominance of *Euryarchaeota* especially the *Thermoplasmat*a taxa.

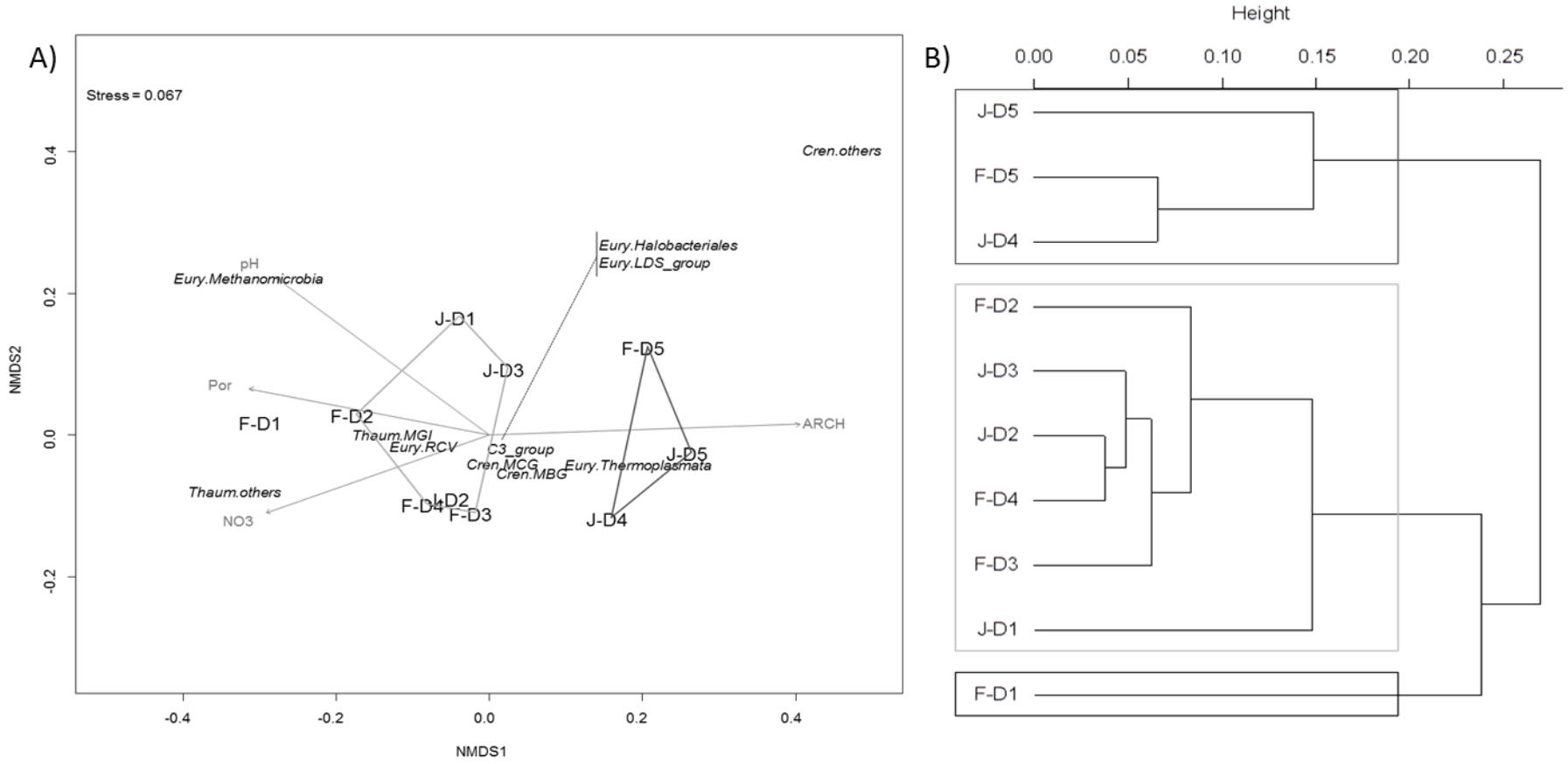


Figure 57. A) Non-metric multidimensional scaling (NMDS) and fitting environmental variables (grey arrows) and B) Hierarchical Ascendant Classification based on Bray-Curtis dissimilarity matrix of abundance of total archaeal operational taxonomic units (OTUs) among sampling dates (J = July 5th, 2012, F = February 11th, 2013) and vertical depth gradient below sediment surface (D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm) showing a significant clustering in 3 groups among depths. For NMDS ordination, stress indicates the mismatch between original distance measures and distance in ordination space.

2.2.4.4 Denitrifiers dominated the N-related prokaryotic community

Nitrifying community was largely dominated by ammonia oxidizing *β-proteobacteria* (β-AOB) in both sampling dates as β-AOB were 30 fold higher than ammonia oxidizing *Archaea* (AOA) (β-AOB/AOA: 5.17-92.75, **Figure 58**). In July, copy number of the archaeal *amoA* genes ranged from $0.80 \pm 0.22 \times 10^6$ copies g^{-1} sed DW (in D1) to $3.97 \pm 1.14 \times 10^6$ (in D2, from 0.5 to 1 cm bsf). The proportion of archaeal *amoA* genes increased with depth but never exceeded 12% except in a unique triplicate in July between 1 and 2 cm bsf (16.2 %). Nevertheless, β-AOB were always one order of magnitude more abundant than AOA as the β-AOB:AOA ratio was comprised between 0.99 and 1.71 and no differences have been found in β-AOB:AOA ratio between samples. Nitrification (β-AOB+AOA) was significantly negatively correlated with ammonia concentration (Spearman correlation: $\rho = -0.42$, $P = 0.023$, $n=30$).

Even in sediment surface (D1), genes encoding anaerobic processes were higher than those encoding aerobic processes (*i.e*. archaeal and bacterial *amoA*). *NosZ* genes were the most abundant denitrifying genes (**Figure 58**) whatever the sampling date and depth with values ranging from to $5.55 \pm 2.01 \times 10^7$ (in D4 in February) to $94.2 \pm 7.2 \times 10^7$ copies g^{-1} sed DW (in D3 in July). All denitrifying and anammox genes were significantly more abundant in July than in February (Wilcoxon tests: W from 177 to 198, $P<0.01$, $n=30$) whereas both bacterial and archaeal *amoA* were not significantly different between the two sampling dates.

The anammox (AMX) bacteria were targeted by quantifying the 16S rRNA gene specific from *Planctomycetes*. The ratio of AMX and *nosZ* genes was always inferior to 1 meaning that N_2 production was driven by *nosZ* genes and this ratio was negatively correlated with temperature (Spearman correlation: $\rho = -0.40$, $P=0.028$, $n=30$) and salinity (Spearman correlation: $\rho = -0.49$, $P<0.01$) and was positively correlated with ammonia (Spearman correlation: $\rho = 0.47$, $P<0.01$), and nitrites concentration (Spearman correlation, $\rho = 0.42$, $P = 0.021$).

Biotic and abiotic parameters significantly explained 67.2% of the N-related genes variance (Monte Carlo permutation test based on 10,000 permutations: $\chi^2=0.1179$, $F= 3.1683$, $P<0.01$). In the canonical correlation analysis (CCA) ordination (**Figure 61**), temperature, pH and porosity were significant environmental factors clustering the sampling points. The

temperature separated the abundance of N-related genes as a proxy of sampling dates with dominance of *nosZ* genes abundance in July when the temperature and the salinity were high.

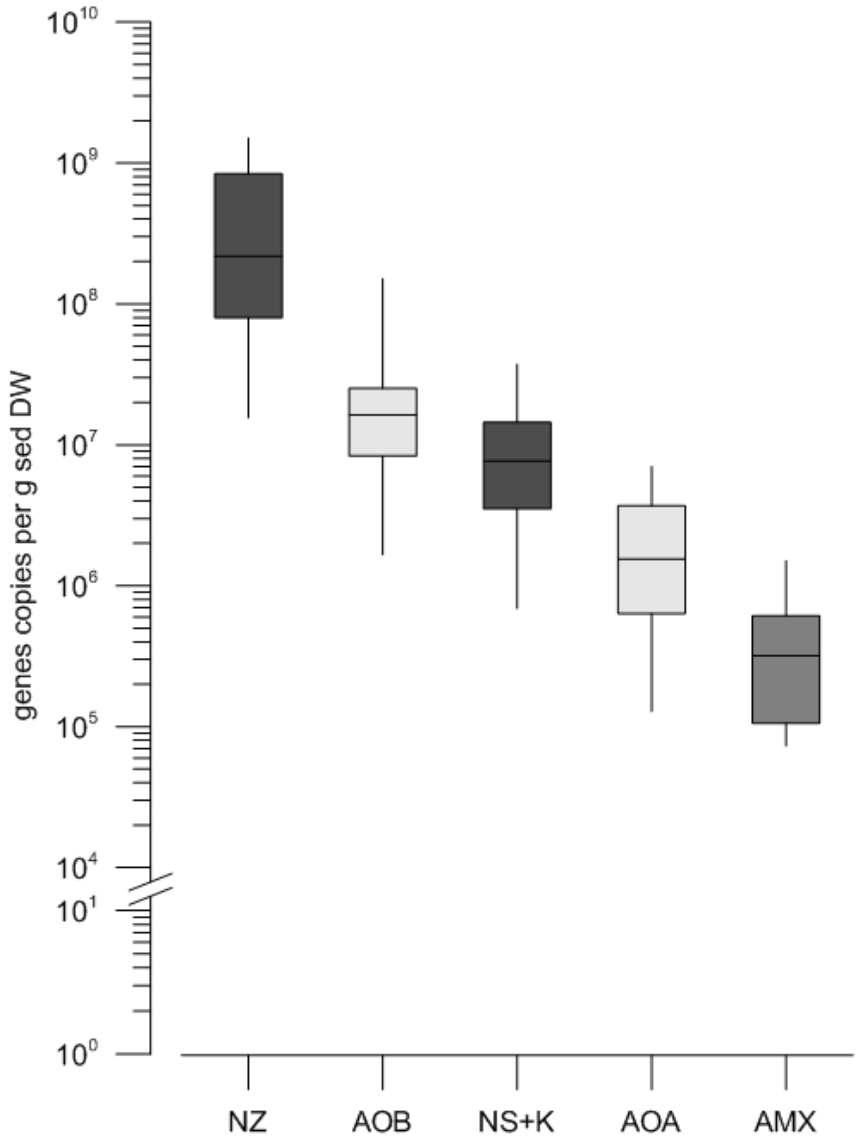


Figure 58. Boxplot of nitrogen-related genes abundance in sediment samples from July 5th, 2012 and February 11th, 2013 and all depths. AOB = ammonia oxidizing *Bacteria* (β-proteobacterial *amoA* gene); AOA= ammonia oxidizing *Archaea* (archaeal *amoA* gene); NZ = *nosZ* gene; NS+K = *nirS* + *nirK* gene; AMX = anammox.

2.2.5 Discussion

This work assessed the prokaryotic diversity in coastal sediments from an intertidal mudflat. The originality of this work resides in the consideration of 5 layers from 0 to 10 cm bsf with an ecological approach coupling archaeal and bacterial 16S rRNA gene 454 pyrosequencing, environmental parameters and nitrogen-related functional genes abundance (archaeal and bacterial *amoA, nirS, nirK, nosZ* and anammox). All of this aiming at investigating whether specific prokaryotic assemblages could be relies to functional traits in nitrogen cycle.

2.2.5.1 Peculiarities of the prokaryotic community composition

2.2.5.1.1 High bacterial diversity and potential functional redundancy of the community

Bacterial community assemblages were dominated by *Proteobacteria* which is in concordance with previous studies conducted in coastal sediments of the Wadden sea (Böer *et al.*, 2009), or the North Sea (Gobet *et al.*, 2012). The predominance of δ-*proteobacteria* in our samples slightly differs compared to previous studies showing a dominance of γ-*proteobacteria* in coastal sediments (Zinger et al., 2011; Gobet et al., 2012). Within, the δ-proteobacteria, the major lineage retrieved was the Desulfobacterale order, one of the sulfate-reducing bacteria group (SRB) (Burow et al., 2014). The SRB are polyphyletic and divided into: Firmicutes and δ-proteobacteria, the major OTUs retrieved in our samples were affiliated with Desulfobulbaceae (δ-proteobacteria) and was also found in Baltic Sea coastal sediments along redox gradient at a redox of 179 mV (Edlund et al., 2008). The SRB are mainly anaerobic, nevertheless, it is now accepted that some lineages have the ability to survive in micro-oxic zones and can quickly switch from an anaerobic metabolism (sulfate reduction) to an aerobic one (oxygen or nitrates respiration) (Cypionka, 1994). Our results, showed that δ-*proteobacteria* were widely distributed regardless the sampling dates and tend to be higher with depth which is congruent with an anaerobic metabolism with aerobic tolerance. All these results showed that the sulfur cycle can be of major interest in coastal sediment regardless the depth gradient and that it can be more pronounced in muddy than in sandy sediments (Mussmann *et al.*, 2005).

Table 16. Spearman correlation coefficients of nitrogen-related functional genes and biotic and abiotic parameters (*n*= 30: two sampling dates, five depths in triplicates). Significant correlations were shown: p<0.05 in normal font, p<0.01 in bold font.

	Temperature	Salinity	Porosity	Chlorophyll *a*	NO_2	NO_3	NH_4	PA
β-AOB *amoA*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,42	ns
AOA *amoA*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
nirS	**0,57**	**0,41**	ns	ns	ns	ns	**-0,61**	**0,52**
nirK	**0,52**	**0,42**	ns	ns	ns	ns	**-0,50**	0,44
nosZ	**0,60**	**0,54**	ns	ns	ns	ns	**-0,58**	**0,49**
AMX	**0,53**	**0,43**	ns	ns	ns	ns	-0,45	ns
pN_2	ns	-0,49	ns	ns	0,42	ns	0,47	-0,43
Nitrification	ns	ns	ns	ns	ns	ns	-0,42	ns

β-AOB = ammonia oxidizing *Bacteria* (β-proteobacterial *amoA* gene); AOA = ammonia oxidizing *Archaea* (archaeal *amoA* gene)*;* AMX: anammox; pN_2 = AMX / *nosZ* = potential of anammox N_2 production; Nitrification = β-AOB *amoA* + AOA *amoA* genes abundance; NO_2^-: nitrites concentration; NO_3^-: nitrates concentration; NH_4^+; ammonia concentration; PA: prokaryotic abundance.

Böer *et al.* (2009) proved that both time (seasons and year) and depth had a strong influence on the bacterial community structure in sand flats. Nevertheless, we didn't find any time or depth-related pattern in our bacterial diversity dataset. We thus concluded that at a local scale (between 0 and 2 cm bsf among two contrasted conditions), no community structure change can be detected despite steep gradients of oxygen, temperature or nutrients in intertidal mudflats. The absence of stratification in bacterial assemblages should suggest no ecological niches differentiation and thus a putative redundancy in functional traits of the community regardless the weather condition. When a community exhibit a high phylogenetic and functional diversity redundancy, the system can exhibit plasticity to punctual events such as storms, etc (Allison and Martiny, 2008) and thus a robustness for community (Girvan *et al.*, 2005).

2.2.5.1.2 Vertical related depth stratification of archaeal diversity

In our work, *Crenarchaeota* appeared to be ubiquitous by representing 30% of total sequences throughout the studied sediment depth. The diversity of archaeal 16S rRNA gene revealed significant depth stratification among the major archaeal taxa. Three horizons were statistically identified:

1) the 'surficial horizon' (0-0.5 cm bsf in February) with dominance (52%) of Marine Group I (MGI) affiliated with *Thaumarchaeota* largely involved in the ammonia oxidation (Brochier-Armanet *et al.*, 2011);

2) the 'transitional horizon' (February: 0.5-5 cm bsf; July: 0-2 cm bsf) with almost the same percentage of each major archaeal taxa (*Crenarcheota, Thaumarcheota* and *Euryarchaeota*) acting as a buffer zone;

3) the 'deeper layer horizon' (February: 5-10 cm bsf; July 2-5 cm bsf) characterized by 45% of methanogens and sulphate-reducing *Archaea Euryarchaeota Thermoplasmata*, Marine Benthic Group-D (MBG-D) and deep-sea hydrothermal vent-G (DHVE-G).

Thaumarchaeota sequences numbers decreased gradually with depth until contributing only to 17% left to the total number of archaeal sequences in the 'deeper layer horizon'. This clear decreasing gradient of *Thaumarcheota* was opposed to an increasing gradient of *Euryarchaeota Thermoplasmata*. Members of *Thermoplasmata* have been found to be the dominant *Archaea* in anoxic sediments such as in marine sub-seafloor (Lloyd *et al.*, 2013). In this study, authors showed that MCG and MBG-D were active and could remineralized detrital proteins in these anoxic environments. Interestingly, some OTUs retrieved in our samples were affiliated (best blast hit) to sequences identified in a wide methane gas accumulation zone, 125-185 cm bsf, located within the main tidal channel of the Marennes-Oleron Bay (Roussel *et al.*, 2009). Bertin and Chaumillon (2005) have shown that Marennes-Oleron was a site of seismic acoustic turbidity associated with methane accumulation (between 90 and 250 cm bsf). In addition, below 95 cm bsf, the MBG-D *Archaea* contributed to 52% of the total archaeal 16S rRNA sequences (Roussel *et al.*, 2009). Although, seismic profile located 250 m from our sampling point didn't exhibited any methane accumulation (mob05_120, Allard *et al.*, 2010), the specific OTUs were also affiliated with an uncultured archaeon from anaerobic oxidation of methane zone in Alaska (Kendall *et al.*, 2007). This is consistent with the theory of an existing 'seed bank' of OTUs in oceans but it raises the question of the role of these organisms between 0-10 cm bsf in coastal sediments.

The archaeal pattern defined in this study demonstrated that *Archaea* were distributed among specific ecological niches in coastal sediments defined by depth stratification and associated with major biogeochemical cycles such as nitrogen, sulphur, and carbon.

2.2.5.2 Bacteria were the major ammonia oxidizers

Studying functional genes is a common approach to understand the functional role of communities in broad ecosystems (Smith *et al.*, 2007). In our samples, β-AOB outnumbered AOA as β-AOB were 30 times more abundant than AOA. This result is in agreement with previous studies conducted in marine sediments (Mosier and Francis, 2008; Santoro *et al.*, 2008; Magalhães *et al.*, 2009; Abell *et al.*, 2013), but in contrast with another showing a dominance of AOA in the first centimeter of intertidal sediments (Smith *et al.*, 2014b). In addition, in our study, ammonia concentration was negatively correlated with β-AOB, but none of the other followed environmental parameters explained ammonia oxidizers dynamics. To explain these high discrepancies, many hypothesis have already been drawn, as AOA seemed to be highly variable spatially (Abell *et al.*, 2010) and could otherwise responds to

environmental parameters such as pH, nitrites or salinity (Abell *et al.*, 2013). In addition, various sets of primers are used in the literature and can constitute a bias to compare ammonia oxidizers dynamics and structure. Moreover, the widespread primers sets only targeted the ammonia oxidizing *β-proteobacteria* because *γ-proteobacteria-amoA* seemed difficult to amplify especially in coastal sediments (Laverock *et al.*, 2014).

2.2.5.3 Denitrifiers dominated the N-related prokaryotic community

Concerning the genes related to the denitrification process, the *nosZ* gene was the most abundant by two orders of magnitude in our samples. The *nirS* and *nirK* genes are known to be present in different organisms respectively and potentially in different ecological niches (Enwall *et al.*, 2010). In our study, the abundance of the two genes was in the same range than previous studies (Abell *et al.*, 2010; Mosier and Francis, 2010; Laverock *et al.*, 2014) and the *nirS* gene outnumbered *nirK* as well as in tropical mangroves (Abell *et al.*, 2010). Our results never show neither temporal nor depth differential patterns between the genes abundances, and both genes were highly correlated bringing out that in coastal sediments, *nirS* and *nirK* co-occurred and did not occupied different ecological niches. Interestingly, this co-occurrence was recently found in a sandy intertidal flat (Kraft *et al.*, 2014).

The predominance of *nosZ* gene traduced the capacity of the system to produce N_2 without retention of N_2O as it was previously found in other environments (Petersen *et al.*, 2012). The high abundance of *nosZ* gene is intriguing in light of the abundances found in the literature seeing as the *nosZ* gene abundance in our samples (10^7 to 10^9 copies g^{-1} DW) outnumbered the abundances previously found in soils or sediments (10^5 to 10^7 copies g^{-1} DW; Henry *et al.* (2006); Braker *et al.* (2012); Fernandes *et al.* (2012a)). Hypotheses could be addressed concerning the presence of *nosZ* genes in foraminifera that are able to do respiration of nitrates into N_2. However, in our samples, no correlations were found between abundance of foraminifera and *nosZ* gene abundance (data not shown). In addition, *nosZ* gene abundance outnumbered the abundance of bacterial 16S rRNA gene. Because our primers are specific to *nosZ* bacteria, it can be hypothesized that benthic bacteria possessed multiple copies of *nosZ* gene in their genomes. However, to our knowledge, no study reported the existence of multiple *nosZ* copies in bacterial genomes.

2.2.5.5 Specific profiles of nitrogen-related functional gene abundance

For all the N-related targeted genes, the highest number of copies was recorded between 1 and 2 cm bsf in February and between 0.5 and 1 cm bsf in July. These profiles almost corresponded to prokaryotic abundance and benthic bacterial production profiles (data not shown, Lavergne *et al*, unpublished). Significant differences existed between the abundance of N-related genes among sampling dates traducing a time-induced effect but no depth-related effect was retrieved because of high spatial variability. These features pointed out that, no ecological niches could be defined in our samples and that one specific layer could be the site of putative high nitrogen-related activity with a nitrification/denitrification coupling: between 1 and 2 cm bsf in February and between 0.5 and 1 cm bsf in July. The two layers of the maximum metabolic potential corresponded to anoxic zones as the maximum oxygen penetration in the Marennes-Oleron sediments was recorded at 2.5 mm bsf (data not shown). It is not surprising to find potential of aerobic processes such as nitrification in anaerobic sediment (under 0.5 cm bsf) because 1) ammonia oxidizing organisms can be adapted to low oxygen environments (Schleper and Nicol, 2010), 2) bioturbation could add locally oxygen deeper in the sediment (Laverock *et al.*, 2014) and 3) some nitrifiers have the ability to realize denitrification process (Kozlowski *et al.*, 2014). Interestingly, in July, the abundance of N-related functional genes was particularly low between 0-0.5 cm bsf and corresponded to low N-related nutrient concentrations but high prokaryotic abundance. In surface, the microphytobenthos is highly active and could thus compete with ammonia oxidizing communities for nutrients (Risgaard-Petersen, 2003). This hypothesis was thus confirmed as the abundance of ammonia oxidizing prokaryotes seemed inhibited in surface. Accordingly, in surface in July, competition for N-related nutrients could occur between micro-organisms and this was not the case in February when the microphytobenthos was less active (Lavergne *et al*, unpublished).

Deeper throughout the whole sediment, between 2 and 10 cm bsf, ammonia accumulation appeared (> 100 µmol L^{-1}), corresponding to low anammox potential and may contribute to prove that anammox may be in low abundance in coastal sediments. Contrasting with a previous study in an Australian estuary (Abell *et al.*, 2013), we managed to amplify 16S rRNA gene of *Planctomycetes* as a proxy of anammox and we found abundances (10^5-10^6 copies g^{-1} wet sediment) in the same range as another study in sediment (Dale *et al.*, 2009). Nevertheless, our results showed that anammox abundance and ammonia concentration were

decoupled. Anammox seemed not to be a major process in coastal sediments (Laverock *et al.*, 2014). It was previously shown that, in coastal sediments, the dissimilatory nitrates reduction to ammonia (DNRA) is a major process (Fernandes *et al.*, 2012b) and often understudied in N-related functional articles. It could result in an accumulation of ammonia in deeper layers in sediments as it was the case in our study. Smith *et al.* (2007) proved that the order of the *Myxococcales* (δ-*proteobacteria*) can reduce nitrate in estuarine sediments and thus be implied in the DNRA. Sequences affiliated with the *Myxococcales* were present in our samples suggesting that the observed ammonia accumulation in deeper layers may originate from DNRA activity.

Additionally, in our study, no accumulation of nitrites or nitrates concentration was recorded. These nutrients have a central role between nitrification and denitrification processes and depletion occurs if denitrification activity largely dominates. In our samples, denitrification genes were predominant regardless the depth and the sampling dates but nitrites and nitrates concentrations were variable. Accordingly, it appeared that denitrification could lead to a NO_x-depletion in deeper layers between 2 and 10 cm bsf where nitrification is supposed to be almost absent and where diffusion is limited (cohesive sediments). The bioturbation may bring diverse compounds from surface to deeper layers throughout the whole sediment and provide nutrients for denitrifier micro-organisms. In our samples, this phenomenon could occur until 5 cm bsf but NO_x concentrations under this depth indicated that either the bioturbation had no impact or denitrification activity was higher than superficial layers.

2.2.5.6 Link between the metabolic potential in nitrogen cycle and diversity of prokaryotic communities

N-related functional genes were quantified and confronted to bacterial and archaeal taxonomy in order to identify the relationship between prokaryotic assemblages and nitrogen cycle in coastal sediments. In this study, we didn't identify any direct significant link between metabolic potential in nitrogen cycle and the relative abundance of bacterial and archaeal taxa. Given that some members of *Thaumarchaeota* MGI may carry out the aerobic ammonia oxidation (Brochier-Armanet *et al.*, 2011), we expected to find relationship between *Thaumarchaeota* MGI relative abundance and archaeal *amoA* abundance. In February, the *Thaumarchaeota* MGI composed more than 50 % of the archaeal community between 0-0.5 cm bsf but AOA was retrieved between 1 and 2 cm bsf. However, a link was found between relative abundance of OTUs from *Thaumarchaeota* MGI and relative abundance of archaeal

amoA gene to archaeal 16S rRNA gene. Taking into account the archaeal 16S rRNA gene abundance, *amoA* quantification was consistent and AOA were more abundant between 0 and 0.5 cm bsf. It is needed to keep in mind that, in surficial sediments, *Archaea* were not abundant (< 5%) and *amoA* gene was also not predominant indicating a limited role of AOA in coastal sediment. Concerning the *Bacteria*, it was expected that *Planctomycetes* should be linked to 16S rRNA gene targeted *Planctomycetes*. Any relation was found neither directly nor by relative gene abundance. The explanation could be that, sequences of *Planctomycetes* in our dataset were dominated by sequences affiliated to the *Phycisphaerae* which are not anammox bacteria and are known to be heterotrophic facultative anaerobe bacteria (Fukunaga *et al.*, 2009; Fuerst and Sagulenko, 2011). This result points out that anammox process seemed not to be dominant in intertidal mudflats.

We cannot ascribe the functional traits implied in the nitrogen cycle to the relative abundance of a bacterial or archaeal phylum, but, our study is a valuable progress in the microbial ecology of coastal sediments because this is the first description of prokaryotic structure coupled to functional traits in these systems. We also raise the necessity to work on active communities targeting mRNA to better understand the link between functionality and the assemblages of prokaryotes retrieved in an ecosystem.

2.2.6 Conclusion

Our diversity dataset on both archaeal and bacterial 16S rRNA gene sequences highlighted that at a local scale, bacterial community structure was stable while archaeal diversity showed a clear depth-related stratification at the phylum level and this was relied to functional traits (ammonia oxidizing archaea, methanogenesis, and sulfate-reduction). Considering the N-related functional traits, the community was dominated by denitrifiers suggesting high nitrogen loss in coastal systems. Both archaeal and bacterial diversity revealed a crucial importance of the sulfur cycle and anaerobic processes. Further investigations will be needed to study both nitrogen and sulfur functional activity by the quantification of the mRNA rather than DNA genes. In this work, we made the investigation at a fine scale that revealed deep changes in ecosystem functioning. Few studies already described the diversity of both *Archaea* and *Bacteria* in coastal cohesive sediments, and it constitutes a building block in microbial ecology of marine sediments.

2.2.7 Data Accessibility

- Experimental procedures details are in the online Supporting Information
- Details of pyrosequencing statistics and rarefaction curves for each samples are online in the Supporting Information
- Environmental dataset and functional genes abundances files : Dryad doi : doi:10.5061/dryad.qg08q
- 16S rRNA gene sequences from 454 pyrosequencing output files (FASTA and quality) : Dryad doi : doi:10.5061/dryad.qg08q

2.2.8 Supporting information

Table 17. Primers used for the quantification of Bacteria, Archaea and N-related genes in intertidal muddy sediments, conditions of qPCR assays. For each reaction, the standard curve was calculated using the MxPro software. The efficiency of the amplification was calculated using the equation $E = (10^{1/slope} -1)*100$.

►

Target	Processes targeted	Genes	Name	Sequence (5'->3')	Reference	Annealing temperature	Efficiency (%)	R^2
Bacteria	-	16S rRNA	b341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer *et al.* (1993)	57°C	100.2 - 101.1	0.998
			518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG				
Archaea	-	16S rRNA	931F	AGG AAT TGG CGG GGG AGC A	Einen *et al.* (2008)	64°C	96.9 - 99.7	0.998
			M1100r	BGG GTC TCG CTC GTT RCC				
β-bacterial *amoA*	Nitrification (ammonium oxidation)	β-*amoA*	amoA-1F	GGG GTT TCT ACT GGT GGT	Rotthauwe *et al.* (1997)	58°C	87.6 - 95	0.981 - 0.987
			amoA-r NEW	CCC CTC BGS AAA VCC TTC TTC	Hornek *et al.* (2006)			
Archaeal *amoA*	Nitrification (ammonium oxidation)	*amoA*	Arch-amoa-for	CTG AYT GGG CYT GGA CAT C	Wuchter *et al.* (2006)	58°C	98.6 - 100.6	0.991 - 0.996
			Arch-amoa-rev	TTC TTC TTT GTT GCC CAG TA				
Bacterial *nirS*	Denitrification (nitrite reduction)	*nirS*	Cd3aF	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	Throbäck *et al.* (2004)	57°C	88.6 - 94.7	0.988 - 0.993
			R3cd	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A				
Bacterial *nirK*	Denitrification (nitrite reduction)	*nirK*	FlaCu	ATC ATG GTS CTGCCG CG	Hallin and Lindgren (1999)	57°C	89.9 - 96.4	0.995 - 0998
			R3Cu	GCC TCG ATC AGR TTG TGG TT				
Bacterial *nosZ*	Denitrification (N_2O reduction)	*nosZ*	nosZ 2F	CGC RAC GGC AAS AAG GTS MSS GT	Henry *et al.* (2006)	60°C	97.7 - 100	0.91 - 0.95
			nosZ 2R	CAK RTG CAK SGC RTG GCA GAA				
Anammox bacteria	Anammox (anaerobic ammonia oxydiation)	16S rRNA	808F	ARC YGT AAA CGA TGG GCA CTA A	Hamersley *et al.* (2007)	55°C	86.3 - 88	0.998
			1040R	CAG CCA TGC AAC ACC TGT RAT A	Muyzer *et al.* (1993)			

Degenerated sites : W = AT, S = CG, Y= CT, M= AC, R = AG, K = GT, and V=ACG

Table 18. Diversity indicators for the bacterial and archaeal 16S rRNA gene in Marennes-Oleron coastal cohesive sediments in July 5th, 2012 (JUL) and February 11th, 2013 (FEB) across 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm.

	Bacteria (16S rRNA gene)					
Sample	Sequences	OTU (97%)	Coverage (%)	Shannon index	ACE	Chao1
JUL D1	13000	3273	86.8	7.03	6040	5790
JUL D2	13000	3167	88.2	7.06	5329	5152
JUL D3	13000	3156	88.1	7.08	5412	5271
FEB D1	13000	2737	90.0	6.63	4589	4311
FEB D2	13000	2376	92.7	6.54	3456	3317
FEB D3	13000	2603	90.7	6.72	4246	4193

	Archaea (16S rRNA gene)					
Sample	Sequences	OTU (97%)	Coverage (%)	Shannon index	ACE	Chao1
JUL D1	1500	378	86.6	4.56	690	649
JUL D2	1500	435	81.7	4.72	967	951
JUL D3	1500	452	80.1	4.76	1153	1143
JUL D4	1500	422	82.5	4.87	1045	833
JUL D5	1500	435	81.3	4.98	1128	1086
FEB D1	1500	402	83.7	4.48	909	800
FEB D2	1500	402	83.9	4.64	893	785
FEB D3	1500	305	88.9	4.24	585	525
FEB D4	1500	238	94.2	4.20	329	312
FEB D5	1500	367	85.5	4.64	827	761

Table 19. Bray-Curtis similarity matrix for Bacteria and Archaea at the phylum level. For Bacteria, only the first 1000 most abundant OTUs were considered

	J-D1	J-D2	J-D3	J-D4	J-D5	F-D1	F-D2	F-D3	F-D4	
J-D1		90.56	84.04			90.63	90.44	87.43		Bacteria
J-D2	86.89		89.78			85.41	86.22	85.55		
J-D3	85.74	96.25				79.93	80.68	81.94		
J-D4	71.59	79.20	80.85				94.23	86.74		
J-D5	58.15	69.42	70.43	84.62				87.33		
F-D1	80.87	76.35	74.07	62.56	54.07					
F-D2	82.30	93.17	92.36	78.37	66.52	77.24				
F-D3	84.89	93.04	92.59	78.92	69.94	73.75	90.15			
F-D4	84.87	96.23	93.49	76.68	70.38	74.91	90.57	95.27		
F-D5	71.25	82.56	83.69	93.23	85.58	63.20	78.70	80.88	81.87	Archaea

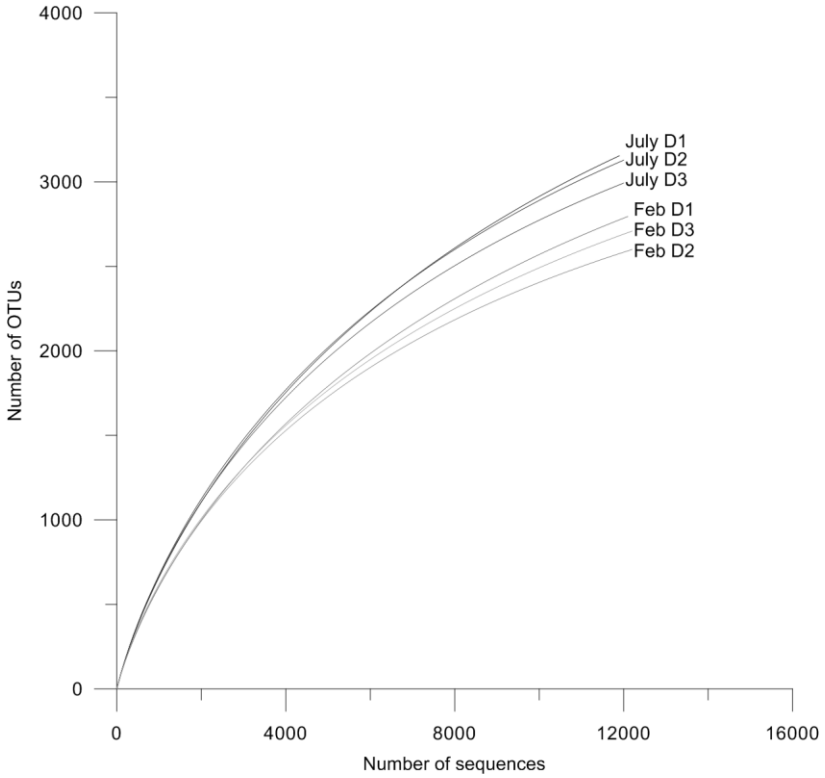


Figure 59. Rarefaction curves for the bacterial 16S rRNA gene of 6 sediment samples of Marennes-Oleron Bay among sampling dates (July = July 5th, 2012, Feb = February 11th, 2013) and sediment layers (D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm).

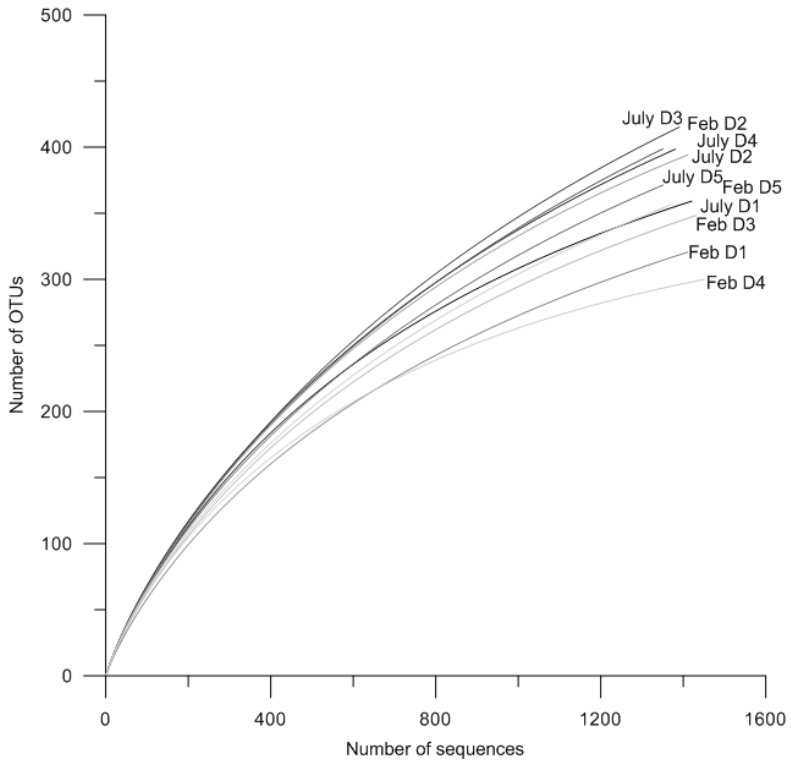


Figure 60. Rarefaction curves for the archaeal 16S rRNA gene of 6 sediment samples of Marennes-Oleron Bay among sampling dates (July = July 5th, 2012, Feb = February 11th, 2013) and sediment layers (D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10.

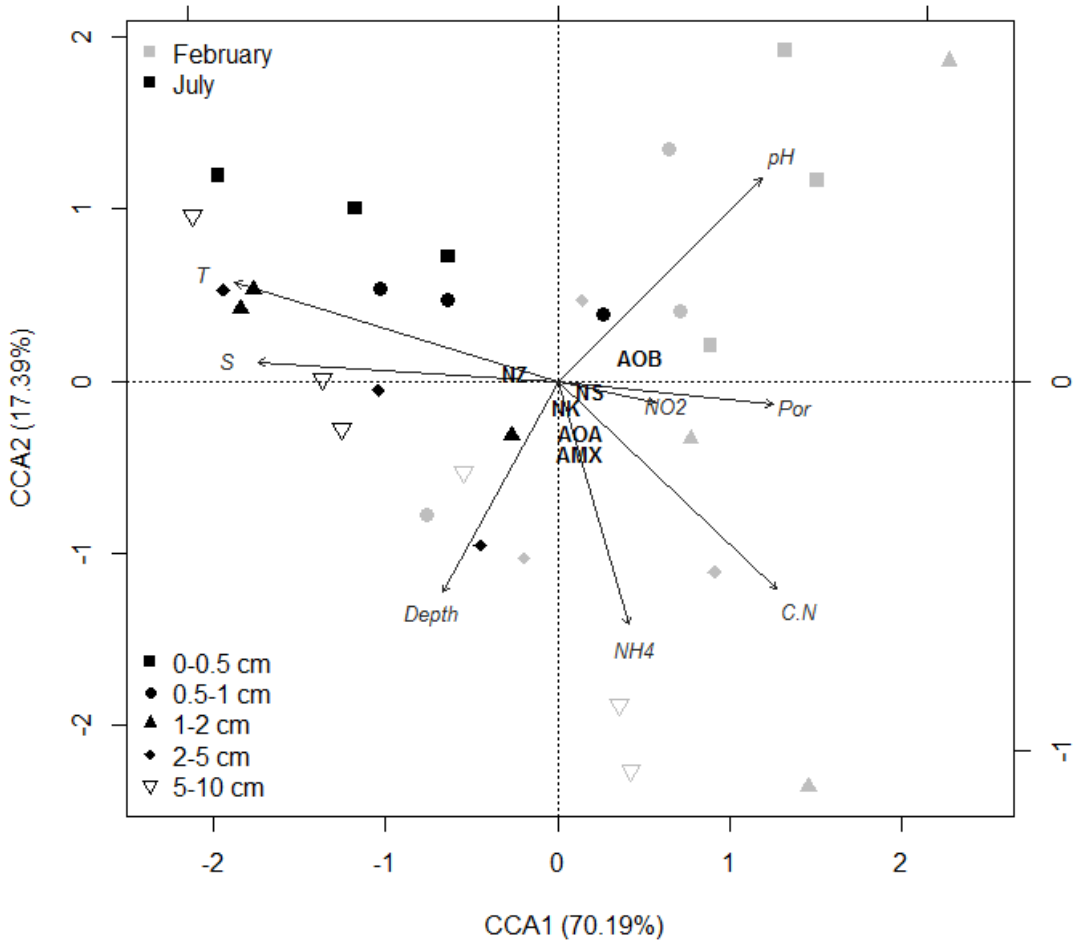


Figure 61. Canonical correlation analysis (cca) ordination of N-related functional genes abundances (copies number, χ^2 transformed) constrained by 8 abiotic parameters among depths and sampling dates (July = July 5th, 2012, February = February 11th, 2013). AOB = ammonia oxidising *Bacteria* (bacterial *amoA* gene); AOA= ammonia oxidising *Archaea* (archaeal *amoA* gene); NZ = *nosZ* gene; NS = *nirS* gene; NK = *nirK* gene; AMX = anammox; T = temperature; S = salinity; NH4 = ammonia; Por = porosity. The cca analysis explained 67,2% of variance of the functional genes distribution.

2.3 Conclusion

Ce chapitre décrit la composition des communautés archéennes et bactériennes benthiques et intègre une dimension fonctionnelle via l'analyse de certains gènes fonctionnels du cycle de l'azote.

L'analyse des diversités archéenne et bactérienne a permis de confirmer la grande diversité présente dans les sédiments côtiers (Zinger *et al.*, 2011) à travers l'identification des groupes majeurs de ces procaryotes.

Tout d'abord, la diversité archéenne présente une stratification en trois horizons définie par la répartition de deux phyla dans deux niches écologiques différentes séparées par une zone d'inversion (**Figure 62**). En surface, les *Thaumarchaeota* sont les archées les plus abondantes. Elles représentent près de 50 % de la communauté archéenne. En profondeur, l'abondance du groupe chute drastiquement et la communauté est alors dominée, à hauteur de 45 %, par les *Euryarchaeota*. D'après la littérature, les représentants des *Thaumarcheota* sont majoritairement impliqués dans l'oxydation de l'ammonium (en conditions aérobies). Il n'est donc pas surprenant de les retrouver en majorité dans les zones plus oxygénées (pénétration de l'oxygène maximale à 3 mm de profondeur). Dans les échantillons, l'abondance relative de phylum corrélée au pourcentage de gène *amoA* archéens confirme leur rôle dans le cycle de l'azote. Par opposition, les *Euryarchaeota*, rencontrées plus en profondeur, en conditions anaérobies, seraient constituées d'écotypes archéens impliqués dans la méthanogenèse et la réduction des sulfates (Cavicchioli, 2010).

Par ailleurs, un décalage vertical s'observe selon les périodes de prélèvements. En effet, l'horizon de surface n'est retrouvé qu'en février et correspond à une zone plus riche en ammonium et plus riche en oxygène. En juillet, cet horizon n'est pas décelé, et cette absence ne s'explique pas par un profil d'oxygène différent. L'hydrodynamisme de la baie de Marennes-Oléron, plus intense en période hivernale, pourrait favoriser le développement des groupes d'archées aérobies mieux adaptées à une forte remise en suspension des sédiments dans la colonne d'eau que les archées anaérobies (Mallet *et al.*, 2014).

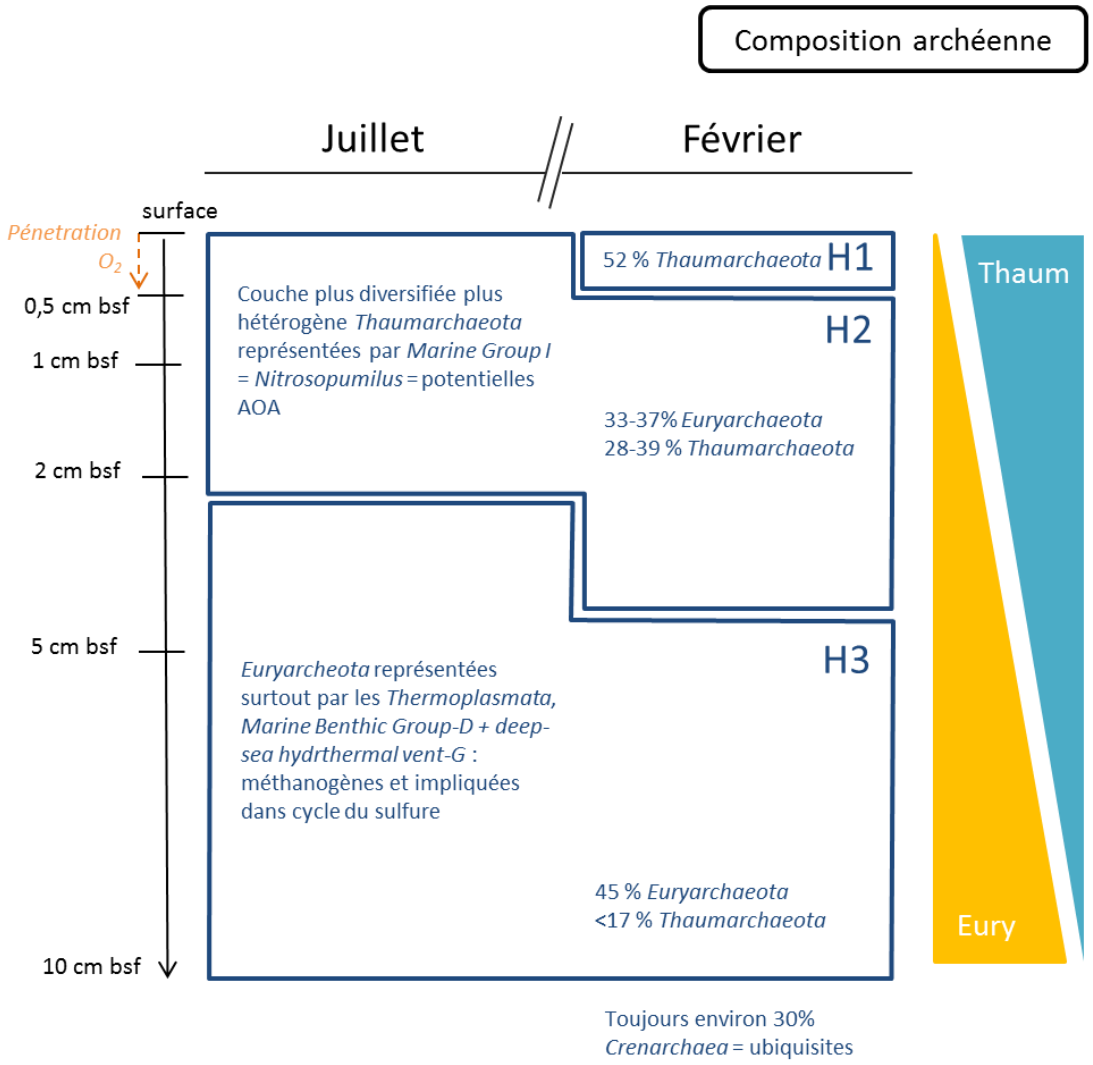


Figure 62. Schéma conceptuel de la stratification révélée par l'étude de la composition des communautés archéennes suivant deux conditions contrastées (Thaum = *Thaumarchaeota*, Eury = *Euryarchaeota*). Les pourcentages correspondent aux abondances relatives par rapport au nombre de séquences totales d'archées.

La diversité bactérienne ne montrait ni stratification verticale, ni variation temporelle (dates de prélèvements). Pour la première fois, dans les sédiments côtiers vaseux, une dominance des *δ-protéobactéries* est décrite (**Figure 63**). Dans nos échantillons, elles sont en majorité représentées par l'ordre des *Desulfobacterales* qui sont connues pour leur implication majeure dans la réduction des sulfates (Leloup *et al.*, 2007) et dans l'oxydation du dihydrogène (Burow *et al.*, 2014).

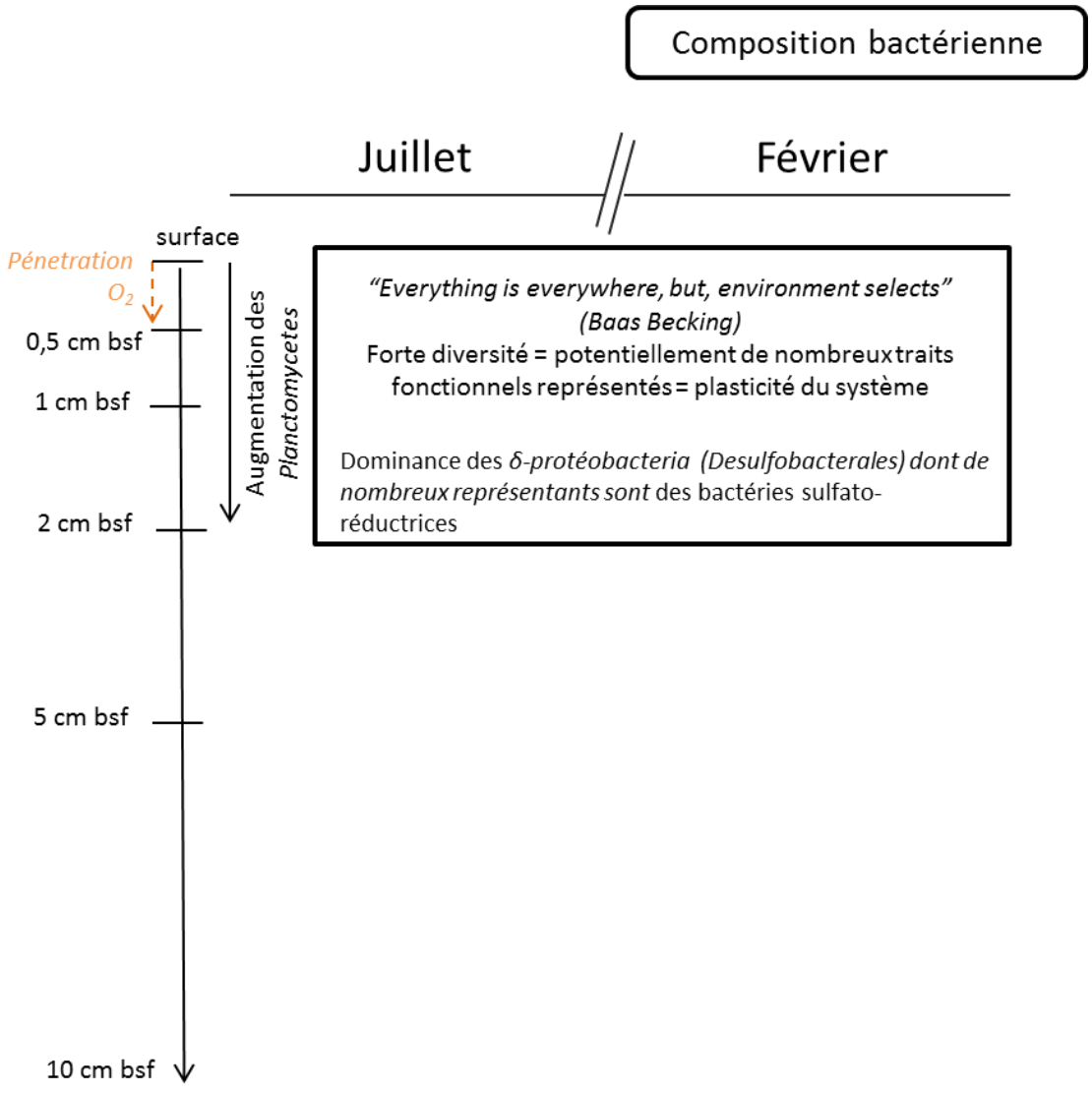


Figure 63. Schéma conceptuel de la stratification révélée par l'étude de la diversité des communautés bactériennes suivant deux conditions météorologiques contrastées. Le séquençage des échantillons correspondant aux profondeurs de 2 à 10 cm en juillet et en février n'ayant pas abouti, les informations ne sont disponibles qu'entre 0 et 2 cm de profondeur.

Enfin, l'analyse de l'abondance des gènes fonctionnels par PCR quantitative, a révélé une forte abondance du gène *nosZ*. Ce résultat montre que la dernière étape de la dénitrification produisant du diazote (N_2) serait un processus prépondérant dans nos échantillons. De plus, il a été mis en évidence une stratification similaire quel que soit le gène considéré (*amoA* bactérien et archéen, *nirS*, *nirK*, *nosZ* ou anammox). Il n'existe pas de niche écologique spécifique à chaque gène liée au cycle de l'azote et donc chaque processus (nitrification, dénitrification et anammox), mais une zone dans laquelle le potentiel de réalisation de toutes les réactions est favorisé. Cette couche s'étend sur une profondeur variable selon la date de prélèvement (**Figure 64**) : en juillet entre 0 ,5 et 1 cm de profondeur et en février entre 1 et 2 cm de profondeur.

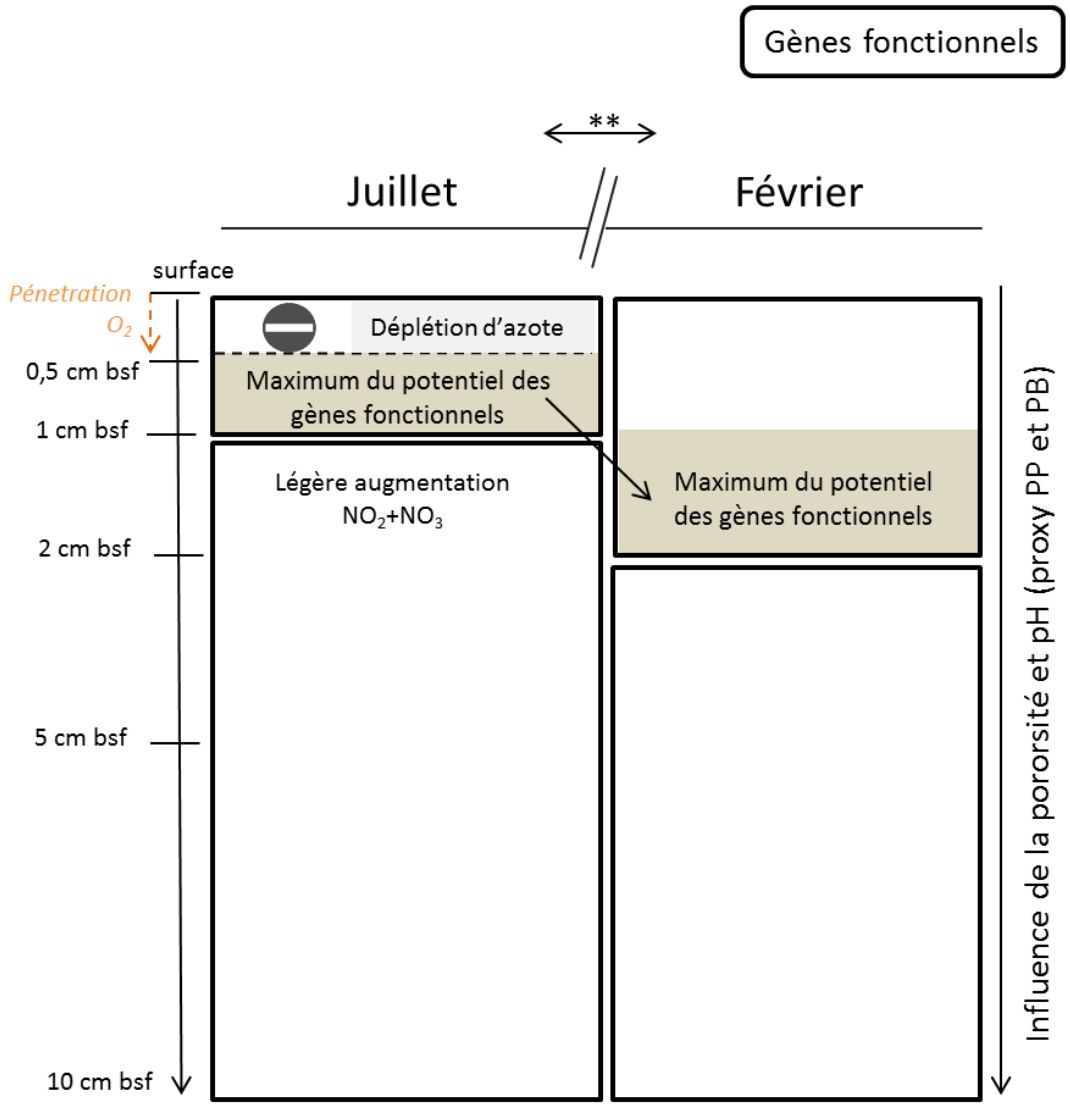


Figure 64. Schéma conceptuel de la stratification révélée par l'étude de l'abondance des gènes fonctionnels suivant deux conditions contrastées.

Le lien entre les traits fonctionnels liés au cycle de l'azote et la structure des communautés de procaryotes semble complexe. En effet, au vu de nos résultats, il n'a pas été possible de relier directement les assemblages taxonomiques des procaryotes avec certaines fonctions liées au cycle de l'azote.

Ce travail met en évidence l'importance des prélèvements de fines couches de sédiment dans l'étude des communautés de procaryotes benthiques : ils permettent d'observer un changement de communautés archéennes et de potentiels métaboliques liés au cycle de l'azote.

Chapitre 3. Impact du temps d'émersion sur le fonctionnement des vasières intertidales

3.1 Contexte de l'étude

Les deux précédents chapitres montrent que, quels que soient les paramètres considérés pour décrire les communautés de procaryotes, ceux-ci sont influencés par 1) la profondeur du sédiment, 2) la saisonnalité et 3) la disponibilité des ressources telles que les nutriments ou les EPS.

Durant la journée, le cycle tidal conditionne la migration des diatomées épipéliques (Consalvey *et al.*, 2004) qui produisent des composés carbonés au cours d'une période d'émersion et qui les remobilisent pour leur migration lorsque la marée remonte (Smith and Underwood, 1998). L'étude de Van Duyl *et al.* (1999) ne montre aucun lien direct entre les EPS glucidiques produits par les algues benthiques et la production des bactéries hétérotrophes. Cependant, les auteurs montrent que ce lien est fort lorsqu'ils considèrent la variation de cette production des bactéries hétérotrophes au cours du cycle tidal (Van Duyl *et al.*, 1999). De plus, une étude menée dans une vasière de l'estuaire de Colne (Royaume-Uni), met en avant une augmentation de la quantité d'EPS glucidiques colloïdaux au cours d'une période d'émersion et une diminution dès la marée haute (Oakes *et al.*, 2010). Ce phénomène ne s'accompagne d'aucun changement dans la composition taxonomique bactérienne active (16S ARNr). Ainsi, il semblerait que le cycle tidal, en particulier le temps d'émersion de jour, soit un facteur essentiel dans le déterminisme de processus microbiens dans les sédiments côtiers de surface, sans modifier systématiquement les assemblages bactériens associés. L'étude de Oakes *et al.* (2010) ne montre pas d'impact du temps d'émersion sur la diversité des bactéries actives benthiques, mais leurs activités de dégradation des EPS et leur production dans le sédiment n'ont que peu été étudiées jusqu'alors.

Notre étude présente la dynamique fonctionnelle des procaryotes dans la vasière de Brouage lors d'une période printanière correspondant à une période intermédiaire entre juillet (période chaude avec une forte compétition pour les nutriments) et février (période froide où le système est peu productif). Les prélèvements ont été réalisés en triplicats le 10 avril 2013 en début (D), milieu (M) et fin (F) de marée basse (**Figure 65**) correspondant respectivement à 30, 105 et 220 minutes d'émersion, et ce, à 5 profondeurs de prélèvements de 0 à 10 cm.

Cette étude apportera ainsi une nouvelle dimension temporelle à ce travail afin d'analyser plus finement les processus au cours d'une marée basse de 4h (temps d'émersion réel du point de prélèvement). Ce travail évaluera donc 1) la variabilité des communautés sur une échelle temporelle courte comparée à une échelle biannuelle (Chapitre 1 et 2), et 2) l'effet du temps d'émersion sur les traits fonctionnels du cycle de l'azote (**Table 20**).

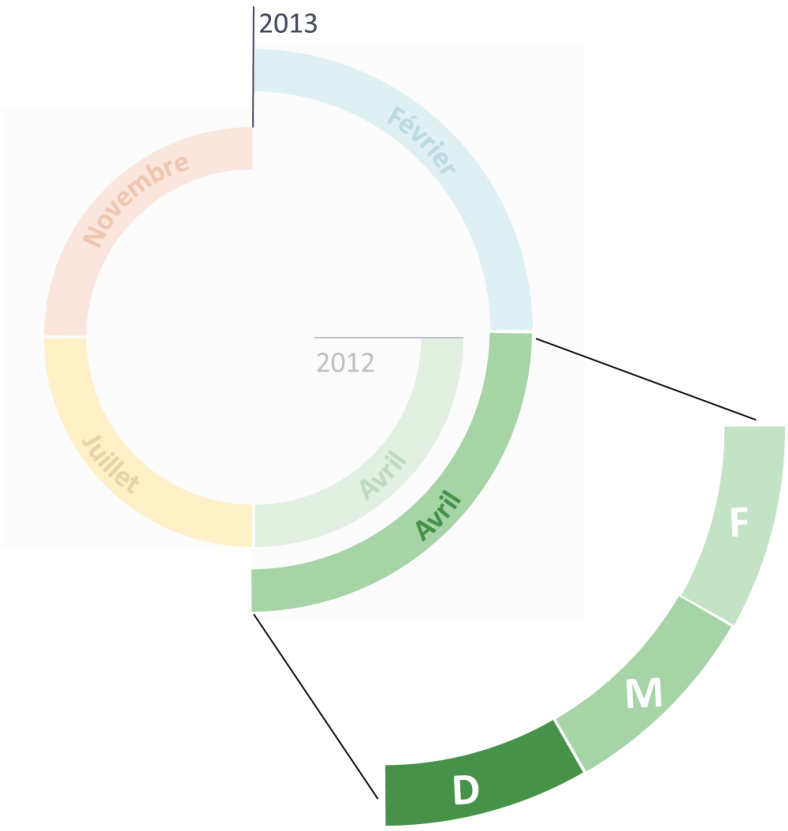


Figure 65. Schéma représentant la stratégie d'échantillonnage choisie. Une nouvelle dimension temporelle a été ajoutée ici : le temps d'émersion, D = début, M = milieu, F=fin.

Table 20. Récapitulatif des différents paramètres mesurés dans ce travail et précision des paramètres considérés pour les analyses dans ce chapitre (●).

	Avril 2013		
Paramètres	**Début**	**Milieu**	**Fin**
Irradiance	●	●	●
Température extérieure	●	●	●
Température sédiment	●	●	●
pH	●	●	●
Salinité	●	●	●
Teneur en eau	●	●	●
Granulométrie			
COP/NOP	●	●	●
Chlorophylle *a*	●	●	●
Sels nutritifs	●	●	●
EPS	●	●	●
Protéines totales	●	●	●
Méiofaune	●	●	●
Macrofaune		●	
Production bactérienne	●	●	●
Activités enzymatiques	●	●	●
Abondance procaryotes	●	●	●
Gènes fonctionnels (ADN)			
amoA bactérien	●	●	●
amoA archéen			
nirS	●	●	●
nirK	●	●	●
nosZ			
anammox*	●	●	●
Gènes fonctionnels actifs (ADNc)			
amoA bactérien			
amoA archéen			
nirS			
nirK			
nosZ			
anammox*			
Abondance bactéries (gène 16S ARNr)			
Abondance archées (gène 16S ARNr)			
Diversité bactérienne totale (gène 16S ARNr)			
Diversité archéenne totale (gène 16S ARNr)			
Diversité bactérienne active (16S ARNr)			
Diversité archéenne active (16S ARNr)			

*16S rRNA *Planctomycetes*

3.2 Résultats

La température extérieure enregistrée à la surface du sédiment variait entre 12 et 16°C et les températures les plus élevées ont été enregistrées après le milieu de la marée basse, suite à un fort ensoleillement. Cet ensoleillement était variable et montrait l'alternance de quelques éclaircies malgré un temps nuageux (8 octas = ciel couvert) et plutôt pluvieux (maximum 2 mm par heure avec des précipitations sur toute la durée horaire, **Figure 66**). Ces conditions se sont traduites par une quantité de lumière reçue (*light dose*) cumulée faible correspondant à la quantité de lumière reçue à la surface du sédiment depuis le début de l'exondation.

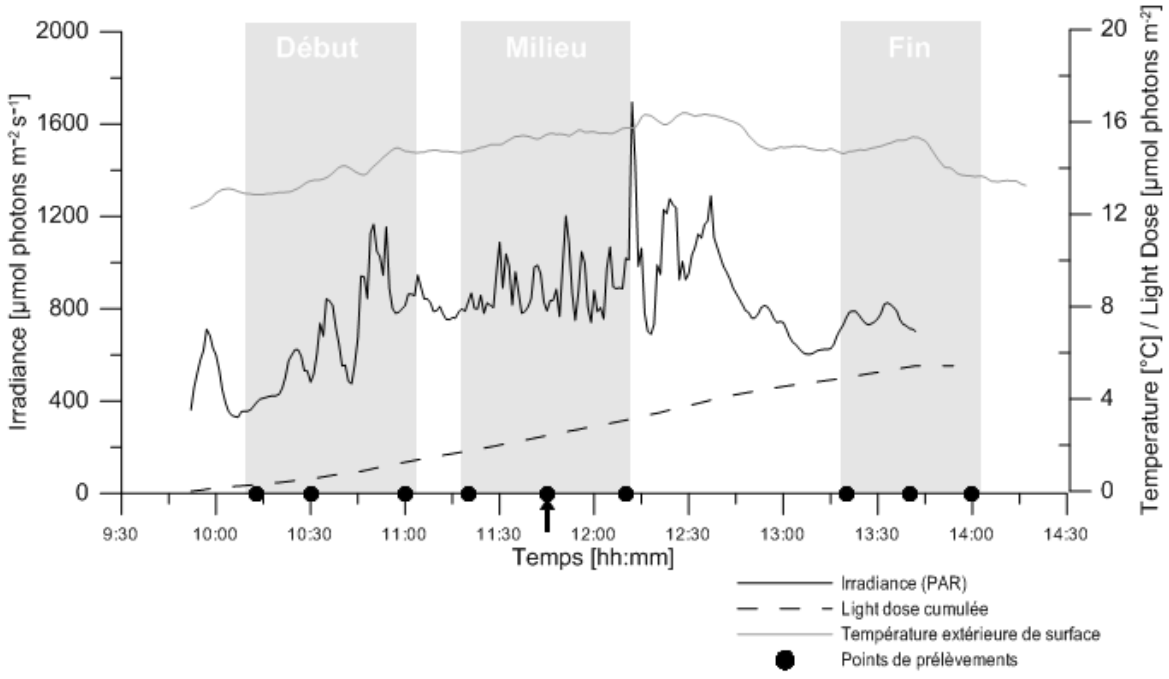


Figure 66. Dynamique de la température extérieure, irradiance et *light dose* mesurées à la surface du sédiment au cours de la marée basse et heures des différents prélèvements. Les trois points noirs pour chaque moment de marée correspondent aux triplicats, il y a donc trois points de prélèvements en triplicats (9 points noirs). La flèche indique l'heure de l'étale de basse mer.

3.2.1 Le mois d'avril, un intermédiaire entre février et juillet ?

Afin de comparer les résultats de ce chapitre avec les résultats des chapitres précédents, les données issues des prélèvements effectués en milieu de marée basse ont été confrontées à celles de juillet 2012 et de février 2013 (prélevés uniquement en milieu de marée).

3.2.1.1 Les paramètres biotiques et abiotiques indiquent des similitudes avec le mois de février

3.2.1.1.1 Description des paramètres

Des paramètres sédimentaires intermédiaires

La température extérieure en moyenne s'élevait à 15,6 ±0,1°C en avril au milieu de la marée basse contre 28 ±0,2°C en juillet et 10,4 ±0,3°C en février. La température du sédiment suivait la même tendance atteignant 13,3 ±0,4°C en avril, 21,6 ±0,2°C en juillet et 9 ±0,1°C en février. La salinité de l'eau interstitielle était forte en juillet (> 36), faible en février (< 26) et intermédiaire en avril avec 31 en moyenne. Si la biomasse chlorophyllienne moyenne était similaire entre juillet et février (près de 18 µg g^{-1} PS), celle-ci était plus élevée en avril (33 µg g^{-1} PS). La teneur en eau apparaît en revanche être un paramètre constant, avec en moyenne 57 % d'eau dans le sédiment quel que soit le mois de prélèvement.

Une déplétion en nutriments

Une similarité entre les concentrations en nutriments entre avril et juillet a pu être observée. En moyenne, les concentrations en nitrites ne dépassaient jamais 0,78 µM en avril et en juillet alors qu'en février, les valeurs étaient presque toujours supérieures à 0,90 µM. Il en était de même pour tous les nutriments considérés (**Table 21**).

Table 21. Moyenne et erreurs standards pour chaque paramètre suivant les trois conditions contrastées (juillet, février et avril).

	5 juillet 2012		11 février 2013		10 avril 2013		
	moy (*n*=15)	SE	moy (*n*=15)	SE	moy (*n*=15)	SE	
Irradiance	1795,43	20,31	593,94	70,72	525,62	3,76	µmol photons m^{-2} s^{-1}
Température extérieure	27,97	0,18	10,41	0,26	15,59	0,10	°C
Température du sédiment	21,64	0,15	8,93	0,13	13,31	0,37	°C
Chlorophylle *a*	19,23	6,88	17,25	5,69	33,13	12,17	µg g^{-1} PS
pH	6,95	0,09	7,26	0,09	7,28	0,06	
Salinité	36,81	1,28	25,43	0,76	31,27	0,45	
Teneur en eau	0,56	0,01	0,56	0,01	0,58	0,01	%
C:N particulaire	6,40	0,06	7,35	0,13	7,22	0,11	
Protéines totales	4,79	0,27	5,65	0,27	4,72	0,27	mg g^{-1} PS
PO_4^{3-}	0,66	0,12	17,41	7,59	1,00	0,24	µM
NO_2^-	0,78	0,21	1,09	0,08	0,63	0,08	µM
NO_3^-	3,74	0,70	7,04	1,72	3,82	0,60	µM
NH_4^+	36,08	11,82	112,15	20,04	51,84	20,84	µM
EPS p colloïdaux	147,17	20,20	132,32	7,26	104,78	5,35	µg g^{-1} PS
EPS g colloïdaux	142,41	15,16	31,62	2,49	17,98	1,39	µg g^{-1} PS
EPS p liés	22,79	2,80	46,51	1,92	40,81	1,84	µg g^{-1} PS
EPS g liés	136,26	26,53	16,14	0,54	21,38	2,27	µg g^{-1} PS
AP	2,29	0,26	1,37	0,13	1,46	0,16	x10^{10} cellules g^{-1} PS
PB	112,41	15,75	70,01	7,66	66,27	8,17	pmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1} PS
AMA	381,31	78,64	88,02	13,60	209,51	52,61	nmol h^{-1} g^{-1} PS
BGA	11,77	1,22	13,67	4,16	11,87	2,92	nmol h-1 g^{-1} PS
β-AOB	24,20	5,62	23,50	9,46	36,00	10,68	x10^6 copies g^{-1} PS
Anammox	2,63	0,44	0,95	0,17	0,19	0,05	x10^6 copies g^{-1} PS
nirS	12,30	2,23	5,23	1,34	0,88	0,20	x10^6 copies g^{-1} PS
nirK	3,09	0,55	0,94	0,24	5,97	0,95	x10^6 copies g^{-1} PS

EPS p = protéiques et g = glucidiques, AP = abondance de procaryotes, PB = production bactérienne,
AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase

Des concentrations en EPS similaires à février

Le mois de juillet était caractérisé par des teneurs en EPS glucidiques très fortes (278 µg g^{-1} PS) par opposition au mois de février (47 µg g^{-1} PS). Les teneurs mesurées en avril s'élevaient à 39,4 µg g^{-1} PS et étaient donc plus proches des valeurs mesurées en février.

Des activités de procaryotes faibles

Si les abondances globales de procaryotes étaient proches entre les trois conditions météorologiques (entre 1,37 $x10^{10}$ et 2,29 $x10^{10}$ cellules g^{-1} PS), les valeurs de productions bactériennes différaient et celles-ci étaient plus élevées en juillet (112,41 ±15,75 nmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1}PS) qu'en février (70,01 ±7,66 nmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1}PS) et avril (66,27 ±8,17 nmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1}PS). En revanche, l'activité aminopeptidase (AMA) en avril (209,51 ±52,61 nmol h^{-1} g^{-1} PS) était intermédiaire entre juillet (381,31 ±78,64 nmol h^{-1} g^{-1} PS) et février (88,02 ±13,60 nmol h^{-1} g^{-1} PS). L'activité β-glucosidase apparaissait stable suivant les trois conditions météorologiques (**Table 21**).

3.2.1.1.2 En résumé :

Une analyse en composantes principales (ACP, **Figure 67**) a permis de décrire les liens entre les paramètres considérés et les principaux facteurs qui structurent le système. Elle a été réalisée sur 15 variables dont 10 variables abiotiques et 5 variables biotiques (4 concernent les procaryotes) et les 3 premiers axes représentent 60 % de la variabilité des données.

- Axe 1 : l'axe principal porte près de 33 % de l'information et représente **la labilité de la matière organique (C:N), sa disponibilité et son utilisation par les bactéries, ainsi que la production bactérienne et l'abondance des procaryotes**. Cette première dimension structure les prélèvements en fonction des conditions météorologiques (**saisonnalité**) (**Table 22**).
- Axe 2 : cet axe explique 19 % de la variabilité et représente la biomasse chlorophyllienne, le pH et la dégradation bactérienne des sucres ; cette dimension **différencie la surface des autres profondeurs** (test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,01, **Table 22**) ce qui place la surface du sédiment (P1 = 0-0,5 cm *bsf*) en haut de l'ordination (**Figure 67**).

Selon cette analyse, les prélèvements d'avril présentent de fortes similitudes avec les prélèvements de février.

Cette analyse a été réalisée avec et sans les données d'avril. L'ajout des données d'avril ne modifie pas l'analyse et seule l'activité β-glucosidase se renforce suivant l'axe 2. Les conclusions sont donc les mêmes pour les deux analyses confirmant l'importance des facteurs structurants identifiés (la labilité de la matière organique (C:N), sa disponibilité et son utilisation par les bactéries, la production bactérienne et l'abondance des procaryotes).

Table 22. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées *a posteriori* sur les composantes principales révélées par l'ACP (**Figure 67**). Les résultats des tests *post hoc* de Tukey à comparaisons multiples sont indiqués sous forme de groupes.

	F	*p value*		Test post hoc Tukey
ACP Juillet vs Février vs Avril				
Axe 1				
Effet condition	338,31	<0,001	***	Juillet ≠ Février ≠ Avril
Effet profondeur	82,61	<0,001	***	P1 ≠ P2 ≠ P3 ≠ P4=P5
Effet C * P	11,56	<0,001	***	
Axe 2				
Effet condition	36,40	<0,001	***	Juillet ≠ Février=Avril
Effet profondeur	52,10	<0,001	***	P1 ≠ P2=P3=P4=P5
Effet C * P	4,38	0,001	**	
Axe 3				
Effet condition	10,00	<0,001	***	Avril ≠ Juillet=Février
Effet profondeur	1,88	0,139		
Effet C * P	9,15	<0,001	***	

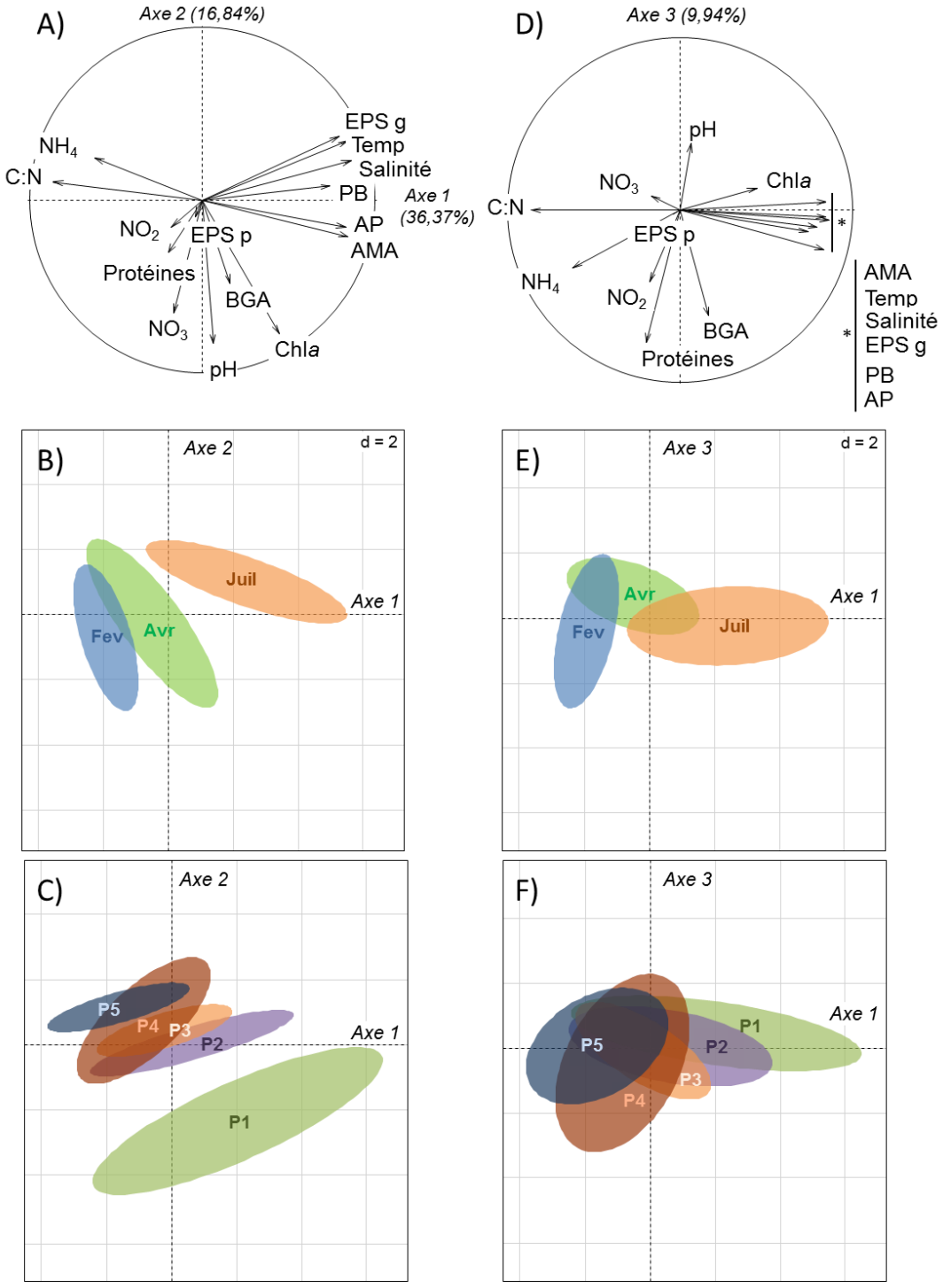


Figure 67. Cercles des corrélations suivant les axes 1 et 2 (A) ou les axes 1 et 3 (D) d'une analyse en composante principale (ACP) réalisée avec une matrice contenant 15 paramètres : 10 paramètres abiotiques et 5 paramètres biotiques puis groupement des échantillons sur l'ordination par conditions météorologiques (B & E) ou par profondeurs (C & F) (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm). AP = abondance de procaryotes, AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase, PB = production bactérienne, Chla = chlorophylle a, EPS g = EPS glucidiques, EPS p = EPS protéiques, NH4 = ammonium, NO2 = nitrites, NO3 = nitrates, S = salinité, Temp = température du sédiment.

3.2.1.2 Les gènes fonctionnels montrent un fonctionnement du cycle de l'azote particulier en avril

Une analyse de cadrage multidimensionnel non-métrique (nMDS) a été réalisée avec les abondances de gènes fonctionnels exprimés en g de poids sec (**Figure 68**). Afin de lisser les différences entre les abondances de chaque gène et de mieux les visualiser, ces abondances ont été transformées en ln(x+1) et une matrice de distance basée sur la distance de Bray-Curtis a été calculée. Cette analyse statistique vise à représenter en deux dimensions des jeux de données complexes. La meilleure représentation est recherchée par un calcul itératif et le stress indique la qualité de la représentation (meilleure représentation pour un stress proche de 0). La nMDS ainsi réalisée (stress = 0,051) montre **une différenciation marquée des prélèvements suivant les conditions météorologiques** avec juillet qui diffère des deux autres mois (PERMANOVA, 10 000 permutations, $p<0,01$). La fonction *envfit* (package « vegan », Oksanen *et al.* (2013)) a permis de représenter les paramètres environnementaux qui expliquent le mieux la distribution des abondances et des prélèvements. Cette analyse met en évidence que la distribution des gènes est **expliquée par la biomasse chlorophyllienne, le pH, les EPS glucidiques et la température du sédiment** (*envfit*, 10 000 permutations, $p<0,01$) et en second temps par **les abondances de procaryotes, la composition de la matière organique et sa dégradation** (*envfit*, 10 000 permutations, $p<0,05$).

Table 23. Résumé des paramètres étant le plus en adéquation avec la représentation suivante (**Figure 68**) déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan » (Oksanen *et al.*, 2013) et significativité.

	NMDS1	NMDS2	r^2	*p value*	
Chlorophylle a	0,808	- 0,589	0,476	*<0,001*	***
pH	0,989	0,145	0,380	*<0,001*	***
EPS glucidiques	- 0,415	- 0,910	0,348	*0,001*	***
Température du sédiment	- 0,245	- 0,970	0,285	*0,001*	***
Abondance des procaryotes	0,092	- 0,996	0,271	*0,002*	**
C:N	0,006	1,000	0,213	*0,008*	**
AMA	0,181	- 0,984	0,202	*0,016*	*
BGA	0,937	- 0,349	0,144	*0,041*	*
Salinité	- 0,160	- 0,987	0,128	*0,063*	
NH_4^+	- 0,790	0,613	0,106	*0,098*	

Codes : < 0,001 = ***; <0,01 = ** ; <0,05 = *

p values basées sur 10000 permutations.

AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase

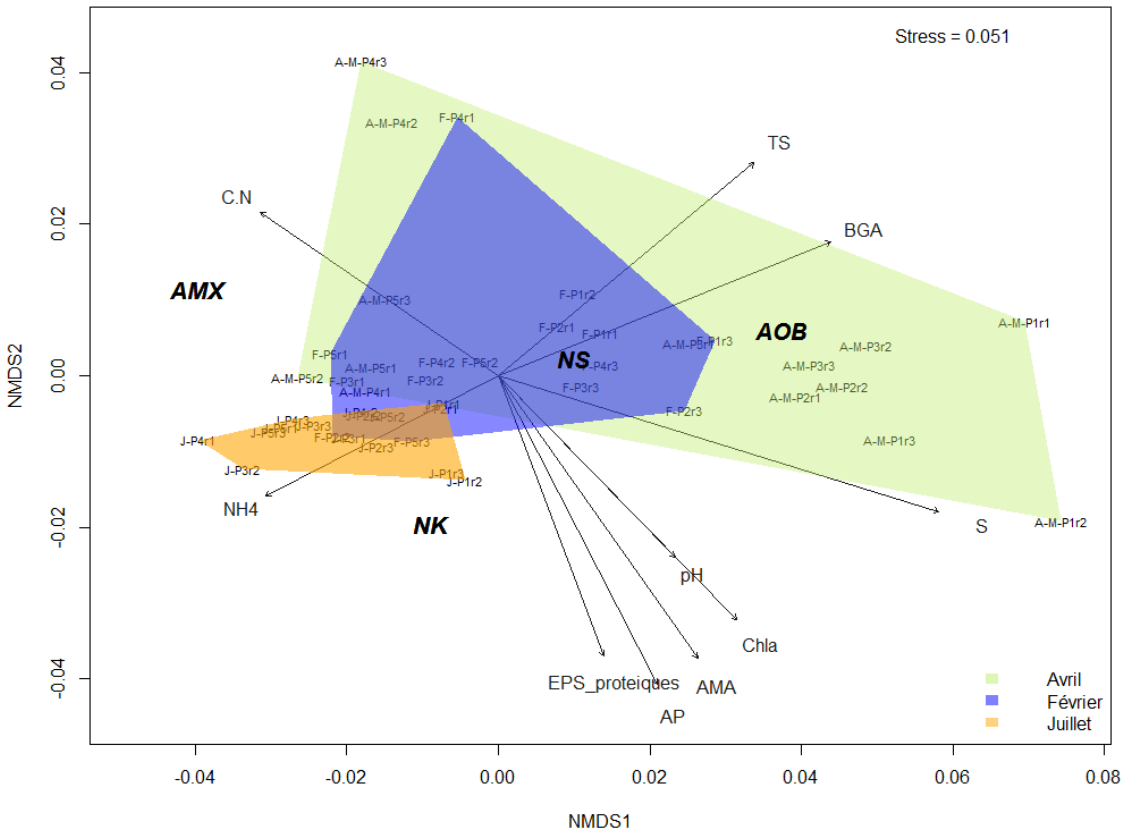


Figure 68. Analyse de cadrage multidimensionnel non-métrique (nMDS) réalisé sur une matrice de distance de Bray-Curtis basée sur les abondances des gènes fonctionnels transformés en ln(*x*+1) (AOB = gène *amoA* β-protéobactérien (β-AOB), AMX = gène 16S des bactéries réalisant l'anammox, NS = gènes *nirS* ; NK = gènes *nirK*). Les paramètres environnementaux ont été contraints à l'ordination et ceux ayant une influence significative sont représentés avec des flèches (déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan », (Oksanen *et al.*, 2013)). Les détails des tests sont indiqués dans le tableau ci-dessus. S = salinité, TS = température du sédiment, AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase, AP = abondance de procaryotes, Chla = chlorophylle a, NH4 = ammonium.

Les prélèvements d'avril 2013 présentent des similitudes avec février 2013 et se placent en intermédiaire entre février 2013 et juillet 2012. Les conditions météorologiques apparaissent donc être un facteur important pour les communautés de procaryotes.
Les paramètres structurant le système semblent liés à la température, la salinité, le pH et à la labilité de la matière organique et sa dégradation.

3.2.2 Impact du temps d'émersion sur le fonctionnement de la vasière

Les résultats précédents ont révélé des paramètres structurant le système. Ces facteurs forçant sont-ils différents si l'échelle temporelle étudiée est réduite ?

3.2.2.1 Description des paramètres environnementaux en avril 2013

La température du sédiment suivait un gradient vertical similaire en début, milieu et fin de marée basse (**Figure 69**). Les températures les plus élevées ont été enregistrées en surface (M P1= 15,59 ±0,27°C, moyenne ± Erreur Standard) et les plus faibles en profondeur (D P5 = 10,98 ±0,12°C). Ce gradient était plus marqué en milieu de marée, là où la température était la plus élevée en surface (15,59°C). Si la température tendait à diminuer en fin de marée, en surface, la salinité n'a cessé d'augmenter et suivait un gradient inverse par rapport à la teneur en eau (différence non significative). La salinité variait majoritairement en surface (P1) entre 30,9 ±0,15 en début de marée, jusqu'à 35,93 ±0,34 en fin de marée basse, puis dans une moindre mesure en P2 (0,5 -1 cm *bsf*) et très peu, plus en profondeur (valeur constante et < 31). La chlorophylle *a*, représentant un proxy de la biomasse microphytobenthique, a peu varié au cours de la marée basse et présentait une décroissance logarithmique avec la profondeur (120 µg Chl*a* g^{-1} PS en surface (P1) et < 30 µg Chl*a* g^{-1} PS après 0,5 cm bsf). Le pH n'a pas montré de variation significative, il suivait une tendance croissante avec le temps d'émersion en P1 (7,55 à 7,83) et restait stable (7,2) plus en profondeur (0,5-10 cm *bsf*).

3.2.2.2 Abondances de procaryotes et activités bactériennes

L'abondance des procaryotes n'a pas varié pendant la période d'émersion et diminuait avec la profondeur de 2,4 ±0,3x10^{10} (en surface) à 0,62 ±0,16 x10^{10}cellules g^{-1} PS (en profondeur) (**Figure 70**). Cette abondance était significativement plus élevée en surface (entre 0 et 2 cm) qu'en profondeur (entre 2 et 10 cm) (test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,01). Les valeurs de production bactérienne avaient tendance à varier uniquement dans les couches les plus superficielles (de 0 à 1 cm *bsf*). Concernant les activités enzymatiques bactériennes, celles-ci suivaient également un gradient dégressif avec la profondeur. L'activité aminopeptidase (AMA) variait entre 402,80 ±97,4 nmol h^{-1} g^{-1} PS et 745,77 ±161,5 nmol h^{-1} g^{-1} PS en surface (P1) et entre 32,25 ±8,6 et 87,76 ±72,2 nmol h^{-1} g^{-1} PS en profondeur (P5). Cette activité diminuait en surface (P1) au cours de la marée basse (**Figure 70**), ce qui l'oppose à l'activité β-glucosidase (BGA) qui augmentait significativement entre le début (13,32 ±0,9 nmol h^{-1} g^{-1} PS) et le milieu de la marée basse (28,39 ±7,6 nmol h^{-1} g^{-1} PS) (**Figure 70**).

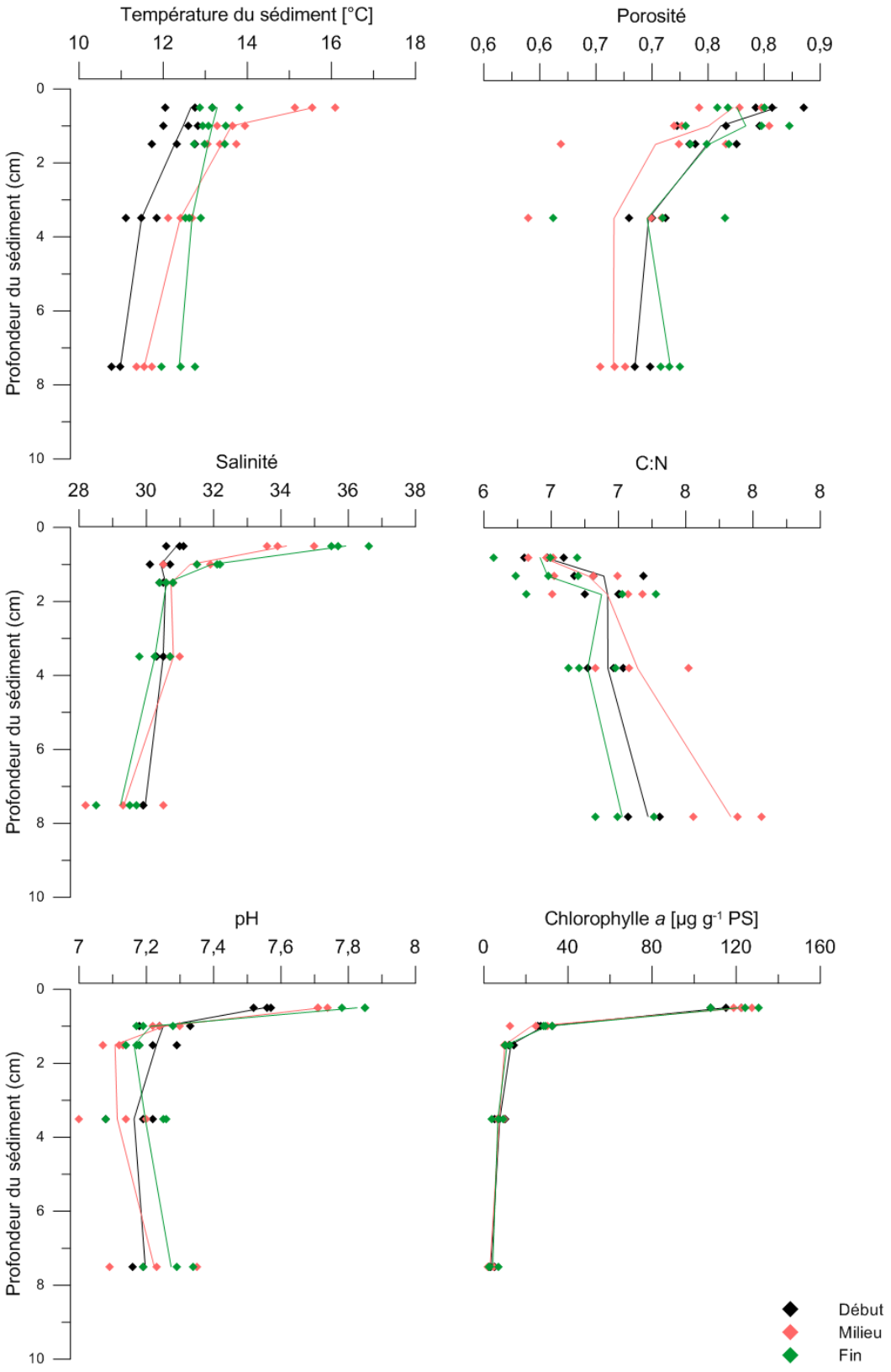


Figure 69. Evolution des paramètres environnementaux au cours d'une période d'émersion (Début = D, Milieu = M, et Fin =F), suivant les profondeurs de prélèvement (10 avril 2013).

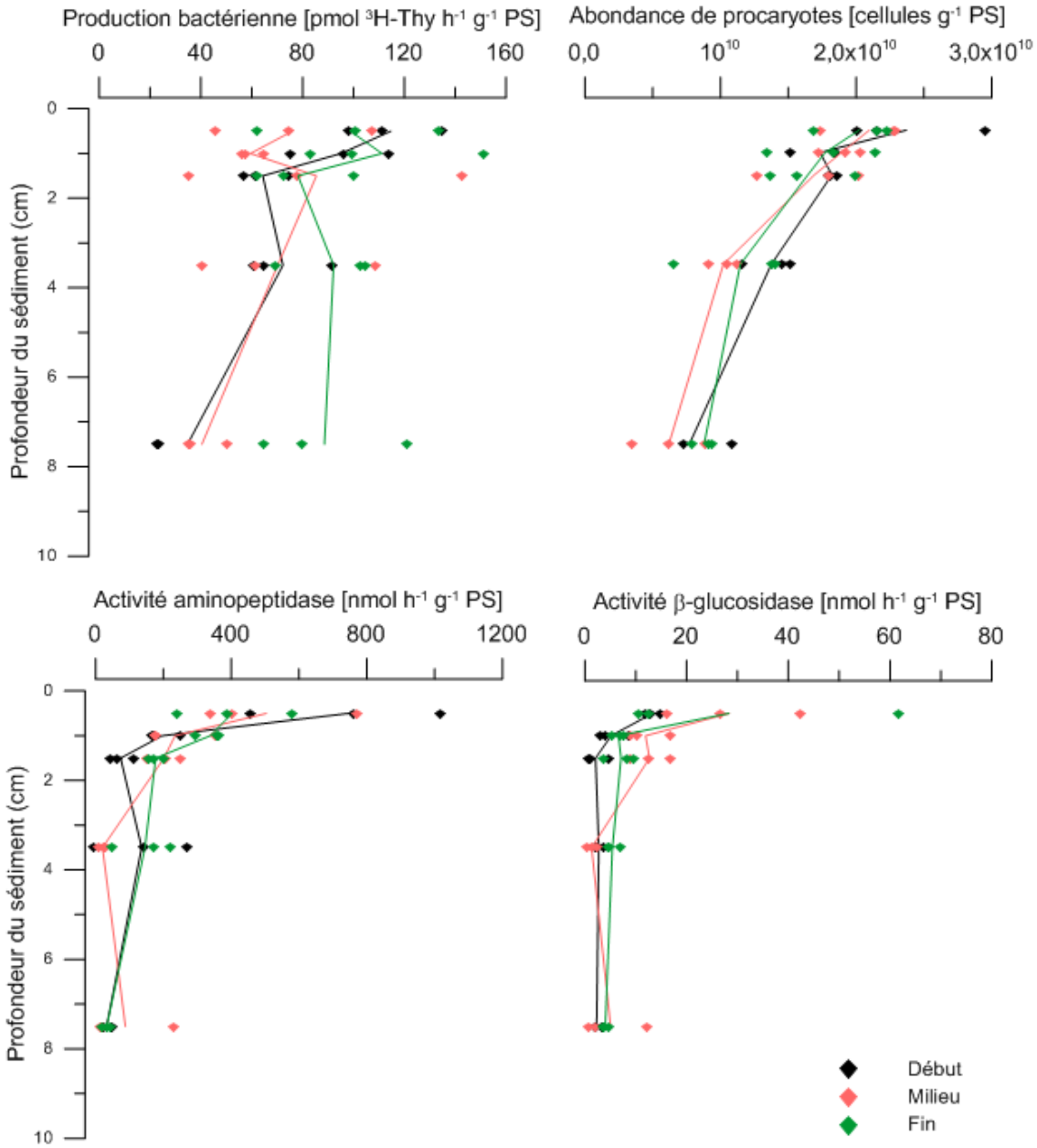


Figure 70. Profils des activités et production bactériennes et des abondances de procaryotes au cours d'une marée basse selon la profondeur de prélèvement (en cm) et le moment de marée (Début en noir, Milieu en rose et Fin en vert) (10 avril 2013).

3.2.2.3 Les facteurs structurant du système ont-ils changé ?

L'impact du temps d'émersion sur le fonctionnement écologique de la vasière a été évalué *via* une analyse en composantes principales (ACP, **Figure 71**). Afin d'être comparable aux analyses précédentes (§ 3.2.1.1.2), elle a été réalisée avec les mêmes paramètres biotiques et abiotiques. Les trois premiers axes représentent 64,5 % de la variabilité des données.

- Axe 1 : l'axe principal porte près de 44 % de l'information et représente **la labilité de la matière organique, sa disponibilité et son utilisation par les bactéries, les paramètres abiotiques caractéristiques du sédiment (salinité, pH) la production bactérienne et l'abondance des procaryotes**. Cette première dimension structure très nettement les stations suivant les profondeurs de prélèvement (**Table 24**).
- Axe 2 : il explique 10,7 % de la variabilité et porte une part importante de l'information concernant les EPS.
- Axe 3 : il porte 10 % de l'information et représente les concentrations en nitrates, en ammonium et la production bactérienne.

Le premier axe de l'ordination porte la majorité de l'information, il met en avant une distribution des points de prélèvements nette suivant la profondeur mais faible entre le début et la fin de la période d'exondation.

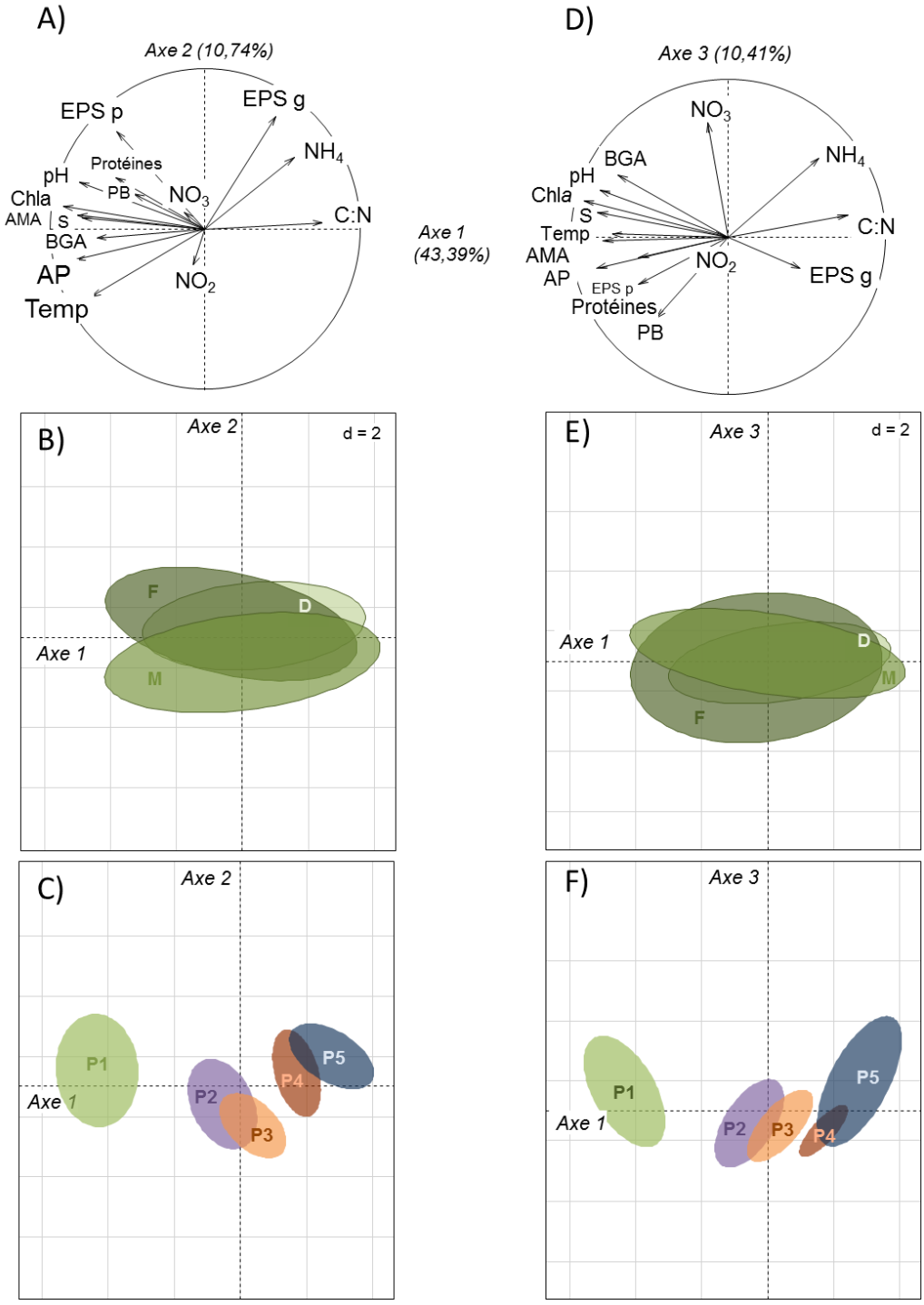


Figure 71. Cercles des corrélations suivant les axes 1 et 2 (A) ou les axes 1 et 3 (D) d'une analyse en composante principale (ACP) réalisée avec une matrice contenant 15 paramètres : 10 paramètres abiotiques et 5 paramètres biotiques puis groupement des échantillons sur l'ordination par temps d'émersion (B & E) ou par profondeurs (C & F) (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm). AP = abondance de procaryotes, AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase, Chl*a* = chlorophylle *a*, EPS g = EPS glucidiques, EPS p = EPS protéiques, NH_4 = ammonium, NO_2 = nitrites, NO_3 = nitrates, PB = production bactérienne, S = salinité, Temp = température du sédiment.

Table 24. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées à posteriori sur les composantes principales révélées par l'ACP (FIG). Les résultats des tests *post hoc* de Tukey à comparaisons multiples sont indiqués sous forme de groupes.

	F	*p value*		Test *post hoc* Tukey
ACP Avril Début, Milieu, Fin				
Axe 1				
Effet émersion	3,55	0,041	*	D ≠ F
Effet profondeur	132,08	<0,001	***	P1 ≠ P2=P3 ≠ P4=P5
Effet E * P	1,17	0,350		
Axe 2				
Effet émersion	15,79	<0,001	***	M ≠ D=F
Effet profondeur	15,46	<0,001	***	P2 ≠ P3 ≠ P1=P4=P5
Effet E * P	2,56	0,029	*	
Axe 3				
Effet émersion	0,58	0,564		
Effet profondeur	3,72	0,014	*	P4 ≠ P5
Effet E * P	0,73	0,668		

Codes : < 0,001 = ***; < 0,01 = ** ; < 0,05 = *

3.2.3 Impact du temps d'émersion sur le cycle de l'azote

3.2.3.1 Description des nutriments azotés

L'ammonium suivait un profil déjà observé dans les chapitres précédents avec une accumulation en profondeur jusqu'à 297,4 ±130 µM en P5 (fin de marée). Cette différence était parfois marquée uniquement par un seul réplicat (réplicat 1) mais restait significative (ANOVA 2 facteurs, F = 14.93, p<0,001) et les concentrations en ammonium étaient significativement plus élevées entre 2 et 10 cm *bsf* qu'entre 0 et 2 cm *bsf* (test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,05). Les concentrations en nitrites étaient faibles et variaient de 0,62 à 1,03 µM suivant des profils similaires, en milieu et en fin de marée ; profils qui contrastaient légèrement avec celui caractérisant le début de marée. Il semblerait qu'au cours de la marée, il y ait eu une tendance à la production de nitrites entre 0.5 et 2 cm *bsf* (+0,54 µM) et une consommation entre 2 et 5 cm *bsf* (-0,25 µM). Une forte concentration des nitrates a été observée au cours de la marée en P1 (-3,96 µM) et P3 (-5,11 µM). En revanche, dans les autres couches, aucun changement n'a été relevé pendant l'émersion.

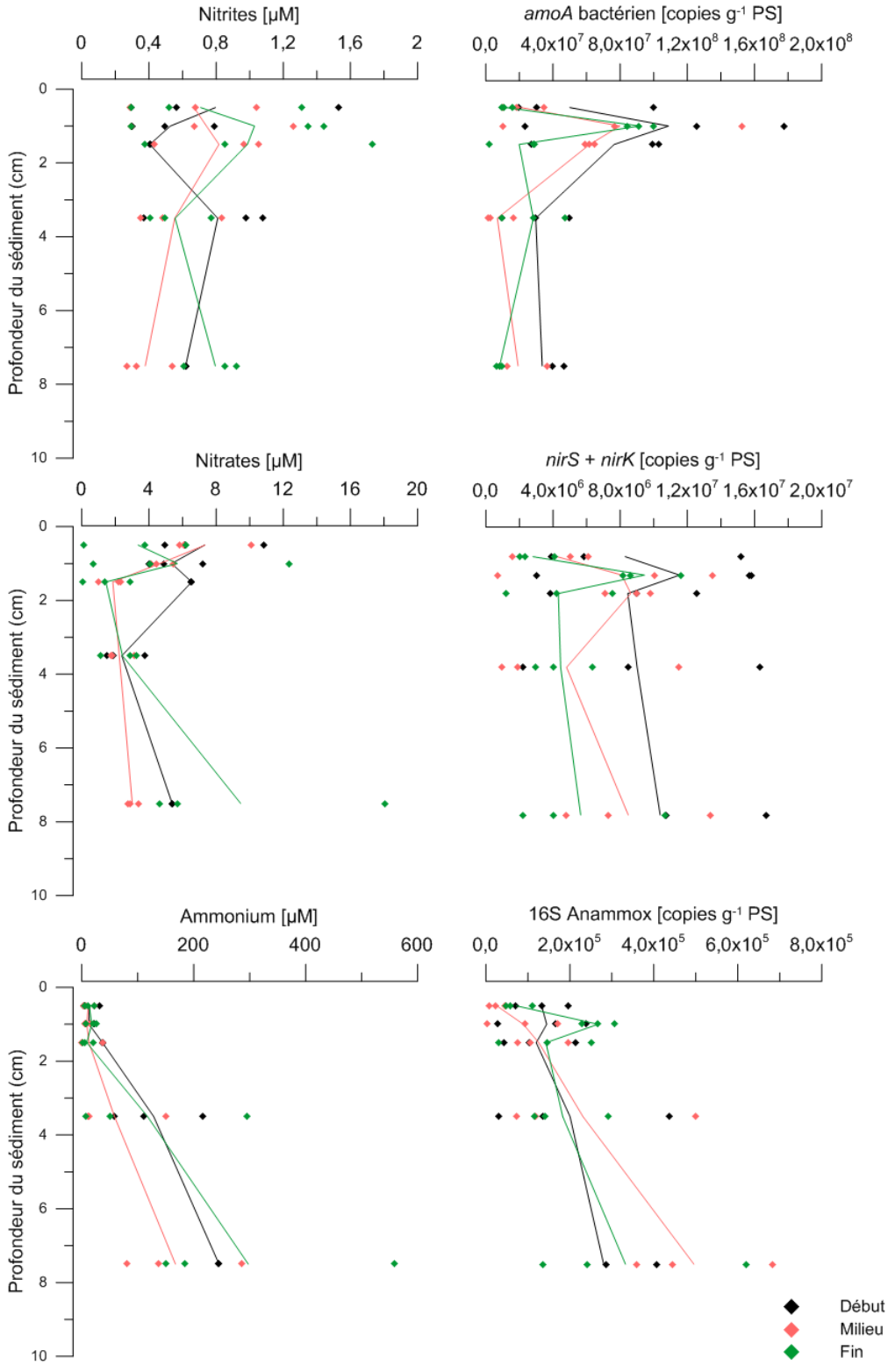


Figure 72. Profils des nutriments azotés et des gènes fonctionnels liés au cycle de l'azote selon la profondeur de prélèvement (en cm) et le moment de marée (Début en noir, Milieu en rose et Fin en vert).

3.2.3.2 Distribution des abondances des gènes fonctionnels liés au cycle de l'azote

Le gène *amoA* bactérien (nitrification) était cinq fois plus abondant que les autres gènes étudiés (cumulés). Ainsi, la nitrification dominait la communauté des procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote. L'abondance des β-AOB variait entre 0,69 ±0,48 et 11 ±4,5x10^7copies g^{-1} PS. Le gène le moins abondant était le gène qui permet de quantifier le processus d'oxydation anaérobie de l'ammonium ou anammox (0,26 ±0,10 et 3,3 ±0,15x10^5 copies g^{-1} PS). Les abondances du gène *nirS* étaient en moyenne neuf fois plus élevées que celles du gène *nirK*, tous deux gènes proxy de la dénitrification. Les abondances de ces deux gènes étant très fortement corrélés (Test de Spearman, ρ=0,94, $p < 0,001$), seule leur somme a été représentée sur la **Figure 72**. L'abondance de ces deux gènes présentait des valeurs minimales en surface (2,8 ±0,64 x10^6 copies g^{-1} PS), un pic en P2 (12 ±4,2 x10^6 copies g^{-1} PS) et une stabilisation de P3 à P5. Les valeurs étaient plus élevées en début de marée basse et très variables selon les triplicats.

Quel que soit le moment de marée basse considéré, les abondances des gènes de la nitrification (*amoA* bactérien) et de la dénitrification (*nirS* + *nirK*) montraient un pic entre 0,5 et 1 cm de profondeur (P2) (**Figure 72**). Ce pic était observable en fin de marée pour les abondances du gène 16S des *Planctomycetes* réalisant l'anammox mais les abondances maximales de ce gène étaient observées entre 5 et 10 cm *bsf* (P5) surtout en milieu de marée. Pour ce gène, une stratification particulière a été observée à chaque moment de marée : en début d'émersion, le profil était 'plat' et montrait peu de stratification ; en milieu d'émersion, le profil était linéaire et les abondances augmentaient en profondeur ; puis, en fin d'émersion, les valeurs étaient toujours fortes en profondeur avec un pic d'abondance entre 0,5 et 1 cm *bsf*. L'abondance du gène *amoA* bactérien diminuait significativement entre le début et la fin de la période d'émersion (test post hoc de Tukey, *p ajustée* < 0,05).

3.2.3.3 Au cours de l'émersion, quels paramètres structurent les traits fonctionnels liés au cycle de l'azote ?

Une nMDS a été réalisée afin d'analyser la répartition des gènes fonctionnels liés au cycle de l'azote en lien avec les paramètres environnementaux. Dans cette étude, le stress était faible (< 0,068) signifiant que l'analyse était fiable (**Figure 73**) et un point 'outlier' a été éliminé (MP2r3). **Les points se répartissaient significativement en fonction des profondeurs de prélèvements (Figure 74) (ANOVA multivariée sur 1 000 permutations, p < 0,01) et non**

selon le temps d'émersion (Figure 73) (ANOVA multivariée, p>0,05). Les points de prélèvements issus de P1 et de P5 étaient très différents et se structuraient majoritairement par l'abondance d'anammox qui était en relation avec le ratio C:N et la quantité de EPS glucidiques. Les profondeurs P1 et P2 se retrouvaient plus à droite de l'ordination du fait d'une plus grande quantité de gènes de la nitrification et de la dénitrification et en lien avec de nombreux paramètres biotiques (**Figure 74**). Les profondeurs P3 et P4 (entre 1 et 5 cm *bsf*) apparaissaient comme des zones de transitions.

Table 25. Résumé des paramètres étant les plus en adéquation avec la représentation des figures suivantes (**Figure 73** et **Figure 74**) déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan » (Oksanen *et al.*, 2013) et significativité.

	NMDS1	NMDS2	r²	*p value*	
Abondance procaryotes	0,951	- 0,308	0,463	*<0,001*	***
NH_4^+	- 0,683	- 0,731	0,359	*<0,001*	***
Température sédiment	0,917	0,398	0,346	*<0,001*	***
EPS glucidiques	- 0,995	- 0,1	0,322	*<0,001*	***
C:N	- 0,921	0,389	0,27	*0,001*	**
Chlorophylle *a*	0,798	- 0,603	0,258	*0,002*	**
AMA	0,739	- 0,674	0,246	*0,003*	**
Salinité	0,95	0,313	0,202	*0,01*	**
BGA	0,998	- 0,062	0,153	*0,038*	*
pH	0,858	- 0,514	0,147	*0,042*	*

Codes : < 0,001 = ***; < 0,01 = ** ; < 0,05 = *

p values basées sur 10 000 permutations.

AMA = activité aminopeptidase, BGA = activité β-glucosidase

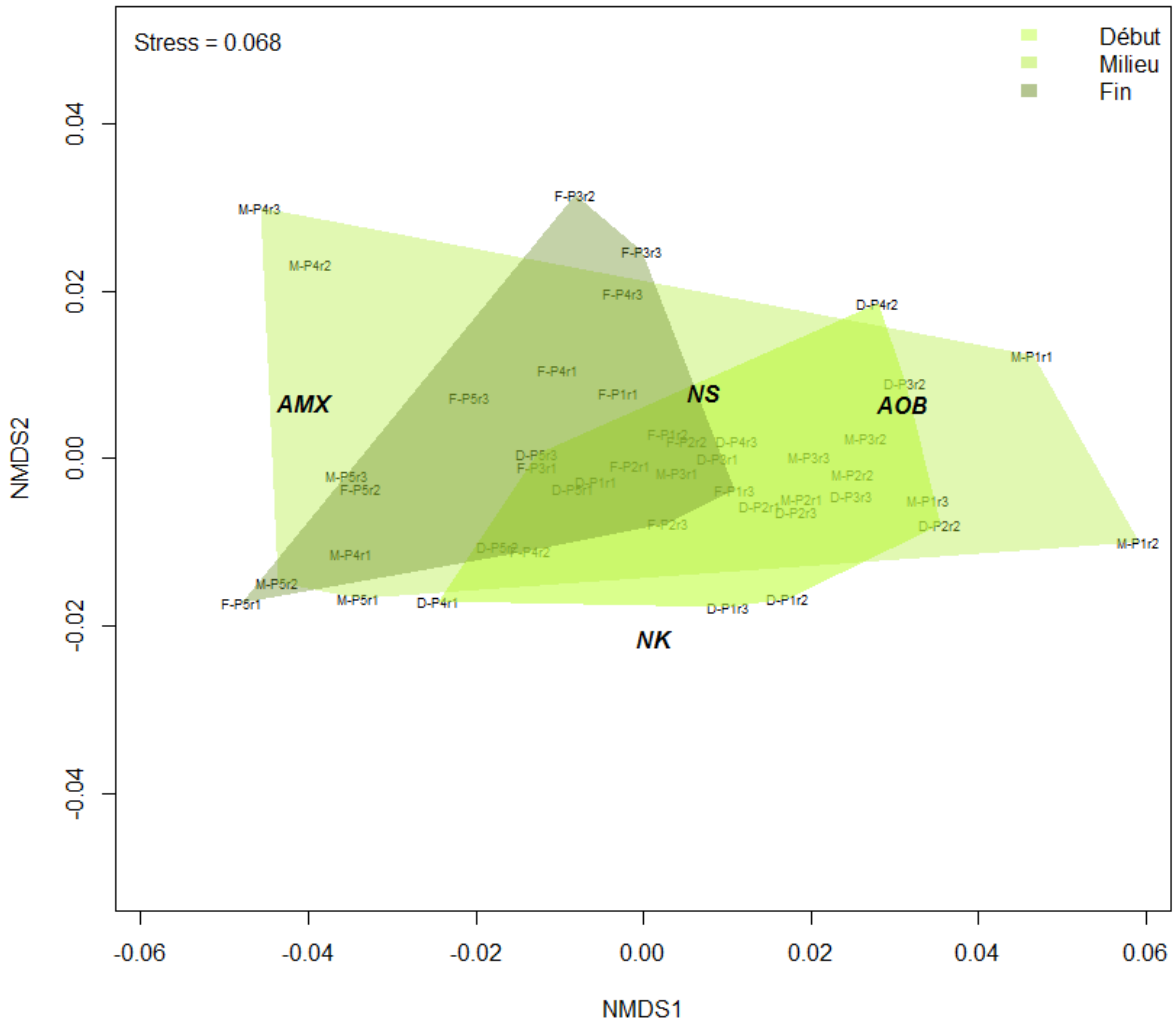


Figure 73. Analyse de cadrage multidimensionnel non-métrique (nMDS) réalisé sur une matrice de distance de Bray-Curtis basée sur les abondances des gènes fonctionnels transformés en ln(x+1) (AOB = gène *amoA* β-protéobactérien (β-AOB), AMX = gène 16S des bactéries réalisant l'anammox, NS = gènes *nirS* ; NK = gènes *nirK*). Les échantillons ont été regroupés suivant le moment d'émersion. Les étiquettes des échantillons suivent un code : D, M ou F pour Début, Milieu ou Fin de marée, P pour profondeur (de P1 à P5) et r pour réplicats (réplicats de 1 à 3).

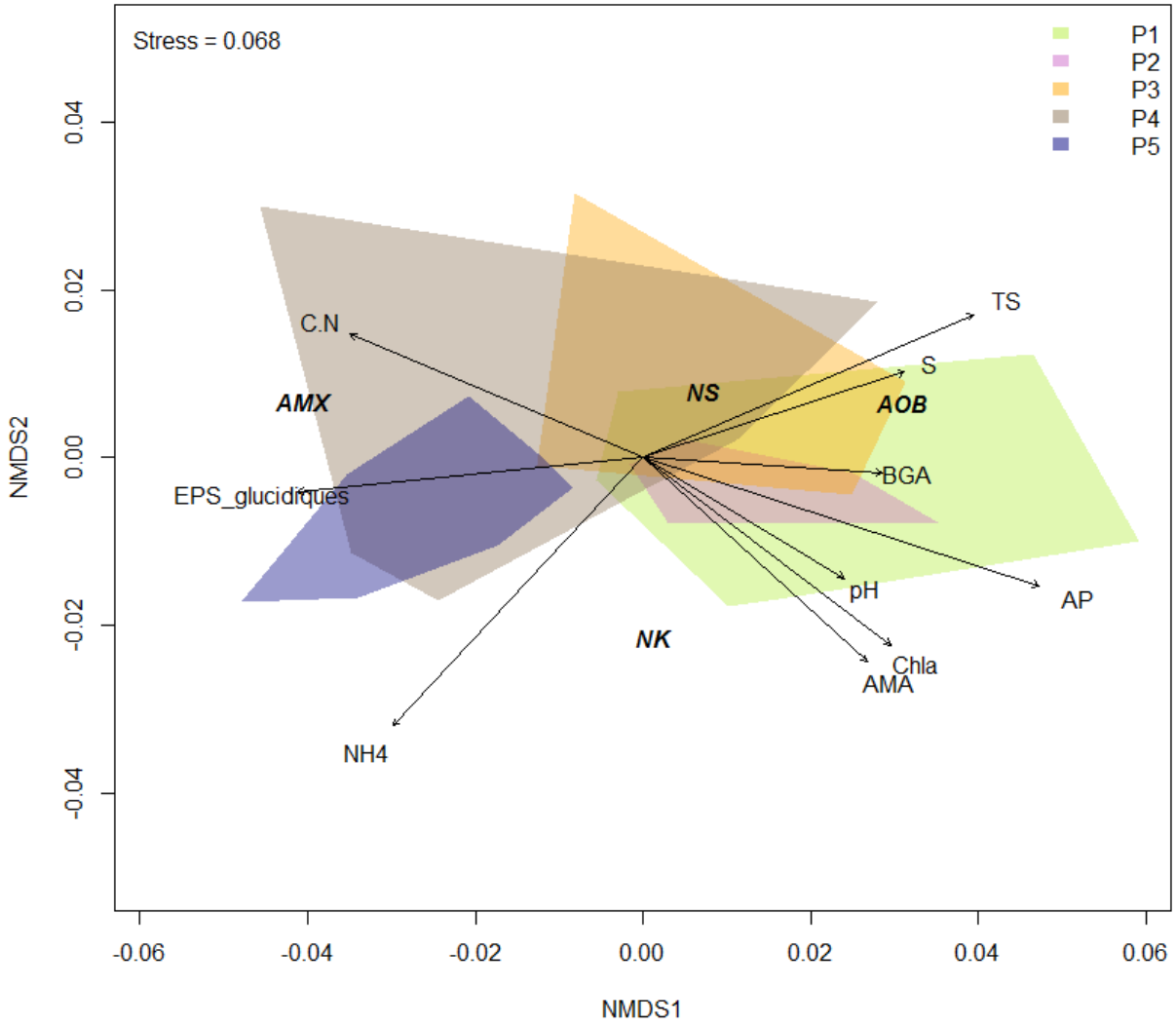


Figure 74. Cadrage multidimensionnel non-métrique (nMDS) identique à la figure précédent. Les échantillons ont été regroupés suivant les profondeurs (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm). Les paramètres étant le plus en adéquation avec la représentation (déterminés par la fonction *envfit* du package « vegan », (Oksanen *et al.*, 2013) sont représentés avec des flèches : TS = température du sédiment ; S= salinité, AP = abondance de procaryotes, Chla = chlorophylle *a*, BGA = activité β-glucosidase, AMA = activité aminopeptidase, NH4 = ammonium.

Le temps d'émersion n'a pas eu d'effet significatif sur le fonctionnement écologique étudié ni sur la fonctionnalité dans le cycle de l'azote.
Les paramètres structurant le système semblent être les mêmes que ceux identifiés dans la première partie des résultats : la température, la salinité, le pH et à la labilité de la matière organique et sa dégradation.

3.3 Discussion

Cette étude visait à comprendre comment les activités des communautés de procaryotes varient au cours d'une période d'exondation (environ 4h) dans une vasière intertidale. Pour cela, l'abondance, la production et les activités enzymatiques bactériennes ainsi que l'abondance des gènes fonctionnels liés au cycle de l'azote ont été étudiés suivant un gradient de profondeur entre 0 et 10 cm *bsf*. Une première comparaison a été réalisée afin de comprendre l'influence de la saisonnalité et de la profondeur puis, l'influence du temps d'exondation a été évaluée.

3.3.1 Vers une meilleure compréhension du fonctionnement écologique des vasières

Dans un premier temps, cette étude intègre de nouvelles données temporelles (prélèvements du mois d'avril 2013 au cours d'une marée basse) apportant une meilleure compréhension du fonctionnement de la vasière intertidale de Brouage. Ces travaux révèlent que le fonctionnement écologique des communautés de procaryotes benthiques est conditionné par la labilité de la matière, la température du sédiment, la salinité et le pH. D'après nos résultats, en surface, la température, la salinité, la biomasse chlorophyllienne et la labilité de la matière favorisent la production et la croissance des bactéries ainsi que leur capacité à hydrolyser les substances exopolymériques. Comme attendu, la saisonnalité se traduit par des variations de températures, de salinité et de biomasse chlorophyllienne, et ce, majoritairement en surface. En effet, au-delà de 0,5 cm de profondeur, les variations sont moins marquées temporellement. Les communautés de procaryotes benthiques sont donc plus productives et plus dynamiques en juillet en surface, que dans les autres périodes de l'année. Böer *et al.* (2009) ont analysé l'effet du temps et de la profondeur dans un estran sableux intertidal. De manière similaire, ils observent une saisonnalité marquée de la production et de l'abondance bactérienne en surface (0-5 cm *bsf*) mais ces paramètres varient peu entre 5 et 15 cm *bsf*.

Les conséquences de cette temporalité et des paramètres environnementaux semblent plus complexes sur le cycle de l'azote. Il existe très peu de lien entre les concentrations en sels nutritifs et les abondances de gènes fonctionnels. Il est possible que l'absence de corrélation soit due à un biais méthodologique. En effet, les mesures de concentrations en nutriments azotés sont issues de carottes dédiées à ces mesures dans lesquelles il a été introduit un

système de rhizons (§ Partie 1- 1.3). Les concentrations en nutriments varient fortement spatialement notamment dans les vasières intertidales. Il est possible que les phénomènes se produisant dans la carotte classique de prélèvement soient différents de ceux se produisant dans la carotte spécifique des rhizons. Il a été prouvé que l'abondance des gènes fonctionnels, par exemple le gène *amoA*, combiné avec les concentrations en ammonium prédisent fidèlement les taux de nitrification potentiels dans les sols (Petersen *et al.*, 2012). Malgré cela, il aurait pu être intéressant de mesurer les taux de nitrification et de dénitrification au cours de la marée afin de corroborer les concentrations de nutriments azotés avec les processus associés.

Les abondances de gènes fonctionnels étaient plus élevées en juillet, hormis le gène *amoA* bactérien, et plus fortes au mois d'avril. Plusieurs auteurs suggèrent que les processus microbiens seraient influencés par l'hydrodynamisme de la zone considérée (Cabrita and Brotas, 2000; Hubas *et al.*, 2007; Böer *et al.*, 2009). Ces phénomènes pourraient ainsi inclure des évènements cycliques et saisonniers tels que les marées de vives eaux et des évènements stochastiques et ponctuels (ex : tempêtes, grêle) dont les effets sont difficiles à appréhender dans les études *in situ*. Ceci expliquerait la forte abondance des gènes bactériens impliqués dans l'oxydation de l'ammonium qui suggère un système plus oxygéné et une plus forte disponibilité de l'ammonium en surface.

3.3.2 Effet du temps d'émersion à la surface du sédiment

La biomasse microphytobenthique estimée *via* la biomasse de chlorophylle *a*, a très peu varié en surface pendant l'exondation. Premièrement, ce résultat confirme que la migration des diatomées épipéliques se réalise dans les 5 premiers millimètres de surface, sans quoi, des variations auraient été visibles entre les biomasses de chlorophylle en P1 et en P2 (Herlory *et al.*, 2004). Deuxièmement, cela indique que s'il y a eu multiplication et/ou croissance algale, celle-ci semble avoir été régulée soit par la disponibilité des nutriments (Risgaard-Petersen, 2003), soit par les prédateurs en surface (Orvain *et al.*, 2014b). Les diatomées épipéliques sont connues pour être très peu limitées par les nutriments (Underwood and Kromkamp, 1999), en revanche, les hydrobies sont des gastéropodes prédateurs du biofilm et sont souvent présentes en grandes quantités en surface sur ce site d'étude (Orvain *et al.*, 2014b). Ces hydrobies pourraient avoir un rôle de contrôle de la biomasse algale en surface au cours de la période d'exondation.

Les périodes d'exondation sont généralement caractérisées par une diminution de la teneur en eau du sédiment et une augmentation de la salinité liées à la dessiccation. De plus, il a été prouvé qu'une période d'émersion prolongée peut mener à une augmentation du contact avec l'atmosphère et donc une augmentation de l'oxygène disponible dans les sédiments (Laima *et al.*, 2002). Ainsi, les micro-organismes seraient impactés par cette émersion via 1) une diminution de leurs activités et/ou de leur production et 2) une augmentation des processus aérobies plus profondément dans le sédiment. Mais dans notre étude, seuls les 5 premiers millimètres présentent un changement de salinité et de température et aucune différence significative de changement de teneur en eau n'a été enregistrée. Ces observations pourraient certainement être dues à la présence, en surface, du biofilm microphytobenthique qui constitue une zone d'interface entre air et sédiment. La composition en EPS et la production continue de ces molécules confèrent à ce biofilm des propriétés de stabilisation du sédiment (Flemming and Wingender, 2010) et de protection face à la dessiccation (Orvain *et al.*, 2012). Ainsi, le sédiment a pu conserver ses propriétés cohésives. Dans nos conditions d'étude, une période de 4h d'émersion n'entraînait donc pas de dessiccation et pas de stimulation des processus aérobies. Au contraire, une tendance à l'augmentation des processus anaérobies a été observée.

3.3.3 Le milieu de marée basse permet d'intégrer la variabilité de toute la période d'émersion

Les analyses multivariées suggèrent globalement que la fonction du système lié aux procaryotes ne serait pas ou peu affectée au cours d'une période d'exondation. Ces analyses soulignent également que le milieu de marée procure une image intégrée des phénomènes à l'échelle de toute la période d'émersion. Ceci atteste d'un bon choix dans nos travaux précédents quant à l'échantillonnage du milieu de marée basse pour les autres saisons.

3.3.4 Le temps d'émersion peut modifier les processus liés au cycle de l'azote

Quels que soient le temps d'émersion et la profondeur, le gène *amoA* bactérien dominait les abondances de gènes quantifiés (3,60 x10^7 copies g^{-1} PS). Ces résultats sont intéressants puisque ce gène n'a pas été retrouvé dans de telles proportions lors des deux autres prélèvements (2,4 x10^7 copies g^{-1} PS) pour lesquels le gène *nosZ* était majoritaire. Ce gène n'a pas été quantifié dans ce chapitre ce qui ne permet pas de statuer quant à son abondance.

Un pic d'abondance des gènes étudiés a été observé entre 0,5 et 1 cm correspondant à la profondeur de potentiel métabolique maximal également identifié en juillet (dans le chapitre précédent). A cette profondeur, les nutriments en lien avec les réactions métaboliques représentées par les gènes fonctionnels variaient. En début de marée, les nitrites étaient moins concentrés et la concentration en nitrates était plus élevée. Ces valeurs sont un indicateur d'une forte nitrification qui produit des nitrates correspondant également à une forte abondance des gènes de l'oxydation de l'ammonium et à de faibles concentrations en ammonium. Comme les gènes *nirS* et *nirK*, proxy de la dénitrification, ont également été retrouvés à cette profondeur, soit : 1) ces gènes ne sont pas exprimés en début de marée basse, soit 2) l'expression des gènes liés à la nitrification est plus importante. En début de marée basse, cette zone pourrait encore être partiellement oxygénée entraînant une dominance des processus de nitrification sur les processus anaérobies. En milieu de marée basse, les concentrations en nitrates diminuent alors que les nitrites augmentent et ceci s'accompagne d'une légère baisse de l'abondance des gènes liés à la nitrification. Il est donc possible qu'à ce stade, la nitrification diminue et que les processus anaérobies deviennent dominants notamment via la réduction des nitrates qui serait à l'origine de l'augmentation de la concentration en nitrites (Papaspyrou *et al.*, 2014). Enfin, à la fin de l'exondation, les concentrations en nitrites continuent d'augmenter légèrement ce qui pourrait confirmer la diminution progressive des concentrations en oxygène dans cette couche au cours de l'émersion et ce qui limiterait la nitrification au profit de la dénitrification ou du processus d'anammox.

A partir de 2 cm de profondeur, une accumulation d'ammonium apparaît. Ce phénomène a déjà été observé dans les chapitres précédents et l'analyse de trois moments de marée révèle qu'en milieu de marée basse, l'abondance du gène de l'anammox était plus élevée entre 5 et

10 cm de profondeur par rapport aux autres temps d'exondation considérés. Ce phénomène correspond à une légère diminution de la concentration en NH_4^+ qui pourrait donc être utilisée pour les réactions d'oxydation de l'ammonium en conditions anaérobies. En revanche, tout comme dans le chapitre précédent, cette accumulation d'ammonium en profondeur malgré la présence du gène de l'anammox confirmerait la présence de la réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium (RDNA) en profondeur dans nos échantillons (Smith *et al.*, 2007).

Enfin, l'analyse s'est focalisée sur l'abondance des gènes fonctionnels. Les abondances quantifiées reflètent donc tous les gènes présents, que les cellules (mortes ou vivantes) les expriment ou non. Il ne s'agit pas là d'une preuve formelle que le gène s'exprime et donc que la réaction ciblée se déroule. En effet, comme précisé en introduction (§ Introduction générale- 1.2.1), les gènes chez les procaryotes ne s'expriment que s'ils sont nécessaires. Ils peuvent donc être portés par les organismes mais non exprimés. L'abondance des gènes (quantification de l'ADN génomique) représente un potentiel et une adaptation à long terme des organismes. L'expression des gènes (quantification de l'ARN messager) reflète un besoin à court terme et donc une forte potentialité de synthèse de l'enzyme qui peut mener à la réalisation du processus. Dans notre étude, les abondances de gènes fonctionnels variaient peu au cours d'une période d'exondation (4h). A la vue des points abordés dans ce paragraphe, cela n'est pas très étonnant puisque il a été quantifié des processus variant à long terme et ce sur une courte période.

De plus, il est remarqué une nouvelle fois que la variabilité entre réplicats est importante ce qui confirme la forte hétérogénéité spatiale des sédiments côtiers.

3.4 Conclusion

Dans la vasière intertidale étudiée, le temps d'exondation n'a pas révélé d'impact marqué sur les communautés de procaryotes. **Les communautés bactériennes et archéennes semblent adaptées à ces périodes d'exondation cycliques et ni leur activité ni leur production ne sont affectées**. Cette étude établit que les variations spatiales et temporelles du fonctionnement de cet écosystème sont **contrôlées par la labilité de la matière (C:N), la température, la salinité et la biomasse chlorophyllienne**. Ces paramètres environnementaux structurent les procaryotes majoritairement suivant un gradient de profondeur, facteur crucial dans les sédiments côtiers. Comme dans le chapitre précédent, la profondeur du **potentiel métabolique maximal** est la même quel que soit le gène considéré et **se trouve entre 0,5 et 1 cm de profondeur.** Notre étude confirme l'importance d'une échelle verticale fine dans les sédiments vaseux intertidaux.

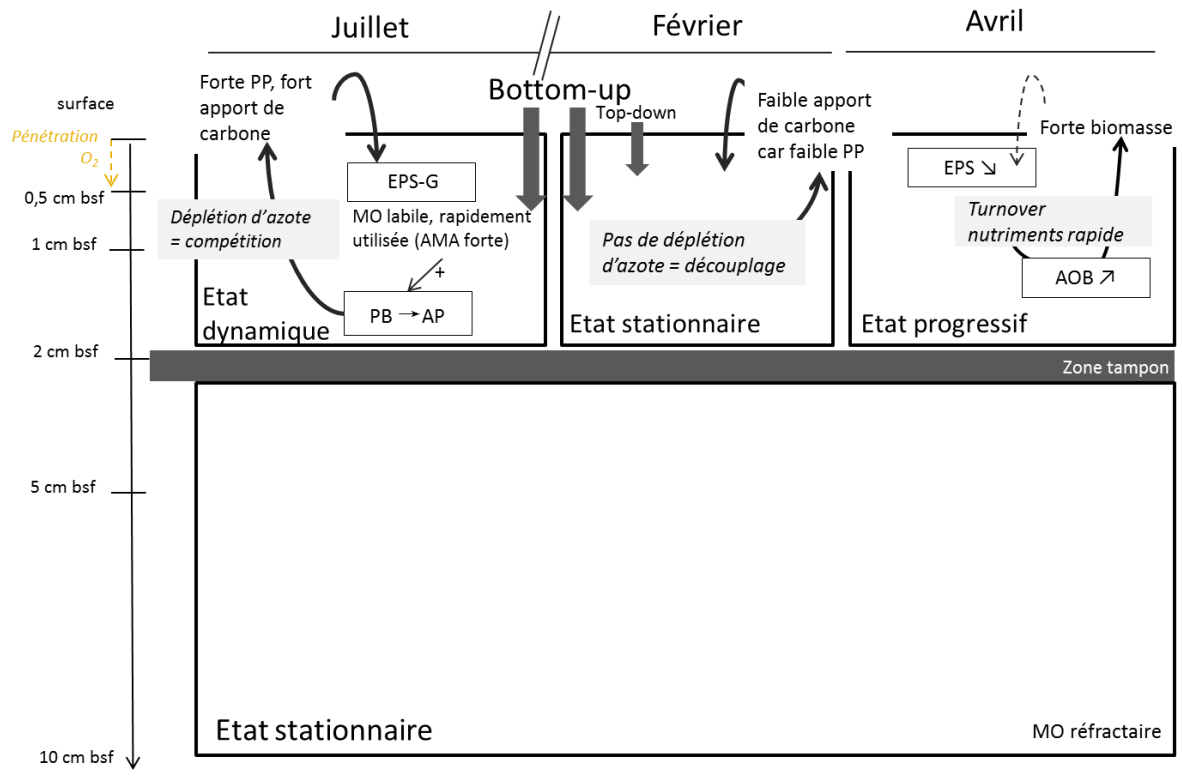


Figure 75. Schéma conceptuel du fonctionnement écologique dans un écosystème stratifié, apport d'une condition printanière en progression.

Conclusion Partie 2

4.1 Un choix d'échantillonnage pertinent

Le dernier chapitre présenté (Chapitre 3) confirme le choix pertinent qui fut de réaliser les échantillonnages en milieu de marée basse. Cette étale permet en effet d'intégrer les processus se déroulant tout au long de la marée basse, et de répondre aux objectifs de ces travaux de thèse. Le découpage en 5 couches de profondeurs différentes semble également adéquat. Il fut indispensable de réaliser des couches de prélèvement plus fines proches de la surface puisque les processus varient plus en surface. Plus en profondeur, les paramètres biotiques et abiotiques se stabilisent et l'utilisation de couches plus épaisses se justifie. Cette approche entre 0 et 10 cm de profondeur améliore largement les connaissances quant au fonctionnement écologique du système et révèle de forts gradients verticaux rarement décrits auparavant (Laima *et al.*, 2002). Elle apporte notamment une meilleure compréhension des phénomènes anaérobies et des activités procaryotiques associées. En effet, différentes études en mer de Wadden, sur du sédiment perméable, ont été menées suivant 3 couches de 5 centimètres chacune entre 0 et 15 cm de profondeur (Böer *et al.*, 2009; Gobet *et al.*, 2012). Elles mettent en avant une forte influence de la profondeur et des saisons dans la structuration des communautés bactériennes par des méthodes d'empreintes génétiques. De plus, de nombreux articles ont étudiés les variations des gènes fonctionnels liés au cycle de l'azote dans des sédiments variés. Mais souvent, l'étude est faite sur le premier cm de profondeur au minimum (Braker *et al.*, 2001; Dang *et al.*, 2010b; Fernandes *et al.*, 2012a; Smith *et al.*, 2014a). Dans notre étude, la profondeur qui possède le plus de potentiel métabolique lié au cycle de l'azote se trouve entre 0,5 et 1 cm *bsf*; potentiel qui aurait été manqué/dilué/sous-estimé si les prélèvements avaient été réalisés sur 1 cm d'épaisseur. Cette information est capitale puisqu'elle montre que les procaryotes seraient en compétition avec le microphytobenthos (MPB) en surface et auraient tendance à être plus actives en-deçà de la profondeur du biofilm microphytobenthique, c'est-à-dire entre 0,5 et 1 cm de profondeur. Les références citées précédemment ne concernent pas toutes des sédiments occupés en surface par un MPB actif mais dans le cas de sédiment vaseux, il reste primordial de considérer finement cette interface eau-air/sédiment.

Cependant, à la vue des forts écart-types mesurés entre les triplicats, la vasière présente une forte hétérogénéité spatiale qui complexifie nos analyses et nos conclusions. L'intégration de cette variabilité spatiale importante fut un choix pour ces travaux mais s'avère parfois problématique pour statuer sur des processus fins.

Même si nos choix d'échantillonnages sont perfectibles, ils intègrent de nouvelles dimensions aux études préalables et affinent ainsi nos connaissances sur le fonctionnement écologique des vasières intertidales.

4.2 « *Le jeu des échelles* », d'une échelle biannuelle à une échelle tidale

L'écosystème étudié semble être contrôlé à marée basse par **les conditions environnementales** (tels que la salinité et la température), **la biomasse chlorophyllienne** en surface **et la labilité de la matière**. Ces paramètres écologiques structurent verticalement et temporellement le fonctionnement écologique de la vasière.

Au cours d'une année, la température et la salinité représentent des indicateurs de saisonnalité et conditionnent l'état du système. Les résultats de cette partie montrent que l'écosystème est plus productif en période de températures et salinités élevées (**Figure 76**). Lors de températures et salinités basses, le *turnover* des nutriments azotés est plus faible, et les procaryotes sont moins abondants et moins productifs. En avril, la température et la salinité sont intermédiaires et le système se trouve en transition.

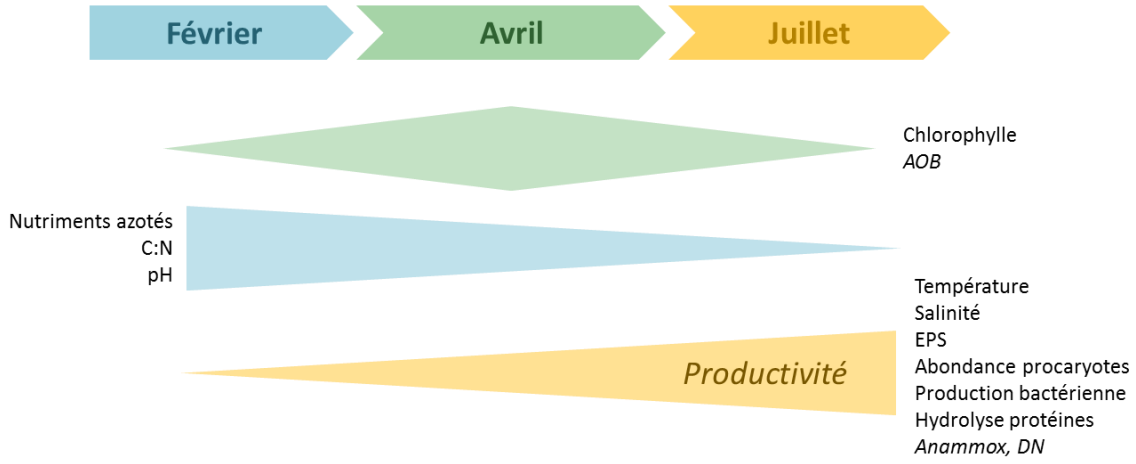


Figure 76. Schéma conceptuel illustrant les variations temporelles du fonctionnement écologique global (intégration de la profondeur) de la vasière révélé par nos études.

A l'échelle d'une marée basse, les stratifications verticales ne sont pas modifiées et les paramètres suivent les mêmes tendances que ce qui a été mis en avant pendant le reste du suivi. En effet, peu de variations ont été observées au cours d'une période d'exondation qui

n'implique, d'après nos résultats, aucune dessiccation. Le système serait néanmoins de plus en plus favorable aux processus des niches anoxiques comme l'anammox, et ce, au détriment des processus liés à la nitrification qui régressent largement avec le temps d'exondation (malgré leur très forte abondance globalement en avril).

La disponibilité des nutriments azotés est souvent un facteur important dans les écosystèmes puisqu'ils sont au centre de la boucle microbienne qui relie les micro-algues aux procaryotes (Risgaard-Petersen, 2003). Notamment, la concentration en nutriments est utilisée pour classer les écosystèmes : un système est oligotrophe s'il est pauvre en nutriments ou eutrophe s'il est riche en nutriments (Church, 2008). En écologie microbienne, l'écosystème est considéré différemment suivant sa disponibilité en nutriments. Dans nos travaux, le seul nutriment qui structure significativement le système est l'ammonium qui s'accumule en profondeur. Ce processus révèle un *turnover* très important des nutriments dans la vasière de Brouage, qui maintient leurs concentrations basses. Malgré une nitrification potentiellement forte, les nitrates diminuaient alors que les nitrites augmentaient au cours de la marée basse là où le microphytobenthos était absent, ce qui suggère une forte activité de réduction des nitrates dans les couches anoxiques. Ici, une étude plus fine des concentrations en continu au cours de la marée, couplée à l'analyse de l'expression des gènes du cycle de l'azote offrirait la possibilité de décrire une dynamique précise et pourrait apporter des nouvelles connaissances dans le cycle de l'azote benthique.

4.3 Une forte diversité de procaryotes

La vasière est un écosystème très riche dans lequel tous les groupes majeurs de procaryotes ont été retrouvés. Cette diversité implique que de nombreuses fonctions peuvent être assurées, ce qui représente une grande plasticité fonctionnelle (Böer *et al.*, 2009).

Tout d'abord, les archées sont stratifiées suivant deux niches écologiques qui subissent un glissement vertical suivant les conditions météorologiques (**Figure 62**). Ces deux niches se définissent par la dominance de deux grands phyla archéens : les *Thaumarcheota* et les *Euryarcheaota* dont les abondances relatives s'opposent. Le troisième groupe majeur, les *Crenarcheaota* seraient ubiquistes dans les sédiments côtiers. Cette stratification révèle de forts gradients liés aux cycles biogéochimiques, contrôlant la répartition des écotypes archéens.

Par opposition, la composition des communautés bactériennes ne montrait aucune variation verticale ni temporelle. La diversité était dominée par les *Protéobactéries* en particulier les *δ-protéobactéries* de la famille des Desulfobulbaceae majoritairement impliquées dans la réduction des sulfates (Mussmann *et al.*, 2005). Cette diversité suggère une large importance du cycle du soufre dans les sédiments côtiers en particulier dans la baie de Marennes-Oléron. Malheureusement, le pyroséquençage haut débit utilisé pour cette analyse n'a pas fonctionné pour les échantillons des profondeurs entre 2 et 10 cm *bsf*. Cette contrainte a limité notre étude et de nombreuses questions restent en suspens sur le gradient potentiel plus en profondeur. En outre, seulement les unités taxonomiques (OTUs) les plus abondantes ont été considérées pour cette étude. Une analyse des OTUs rares ou des OTUs actifs pourrait révéler une structure particulière.

4.1 La vasière intertidale est un écosystème stratifié

Quel que soit le paramètre considéré, la composante verticale est primordiale et montre que les études se cantonnant à la surface décrivent un système particulier qui n'est pas extrapolable plus profondément dans le sédiment. En effet, en dessous de 1 cm *bsf*, les échanges avec l'atmosphère sont bien plus rares et le renouvellement de l'eau interstitielle est dépendant de l'épaisseur de la couche sédimentaire remise en suspension. Contrairement à un estran sableux, pouvant recevoir un apport continu de nutriments jusqu'à 6 cm de profondeur via l'eau surnageante (De Beer *et al.*, 2005; Marchant *et al.*, 2014), le sédiment vaseux est cohésif et limite les échanges. Par ailleurs, la macrofaune semble avoir un effet de bioturbation limité sur les sédiments de granulométrie moyenne inférieure à 100 µm comparée à des sédiments de 100 à 300 µm en moyenne (Vanaverbeke *et al.*, 2011; Braeckman *et al.*, 2014). Le challenge pour les communautés peuplant ces sédiments côtiers anoxiques sera donc de trouver les nutriments nécessaires à leur croissance sans oxygène et en conditions limitantes.

Notre travail se focalise sur les procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote. Les abondances des gènes proxy de la nitrification, la dénitrification et de l'anammox semblent montrer que peu importe la demande en oxygène ou en nutriments de ces processus, ceux-ci sont maximaux à une même profondeur donnée. Ainsi en juillet 2012 et en avril 2013, tous les processus semblaient potentiellement se dérouler majoritairement entre 0,5 et 1 cm *bsf* alors que cette profondeur était abaissée entre 1 et 2 cm *bsf* en février 2013. Il aurait été intéressant

de pouvoir exprimer ces abondances de gènes en fonction de la quantité de gène 16S ARNr pour tenir compte d'une abondance totale en procaryotes et vérifier cette stratification. Malgré tout, cela montre que les conditions semblent plus favorables aux procaryotes reminéralisant l'azote à une certaine profondeur et cela suggère une cooccurrence des processus aérobies et anaérobies dans les sédiments côtiers. Enfin, le processus d'anammox serait plus abondant en profondeur, là où l'ammonium (substrat de cette réaction) était aussi présent à une concentration plus élevée. Ainsi, il est possible que la production d'ammonium soit supérieure à l'assimilation par les bactéries réalisant l'anammox. Par exemple, il a été démontré que, dans les sédiments côtiers, le processus de réduction dissimilatrice des nitrates en ammonium (RDNA) (produisant donc de l'ammonium) serait sous-étudié mais très important (Fernandes *et al.*, 2012b). Ce processus a été retrouvé chez des Planctomycetes du genre *Kuenenia* réalisant l'ammonium qui sont capables de réduire les nitrites en ammonium en utilisant des acides organiques comme donneurs d'électrons et donc de devenir compétitifs face aux organismes dénitrifiants (Kartal *et al.*, 2007). L'ammonium mesuré pourrait donc également provenir de ce phénomène.

4.2 Perspectives

Cette partie permet d'identifier les facteurs importants qui permettent de décrire les vasières côtières, mais certaines relations entre paramètres ou entre compartiments restent encore peu comprises.

Dans un premier temps, le lien entre procaryotes et microphytobenthos pourrait être évalué par la mesure de production primaire. Dans cette étude, la production primaire a été estimée grâce à la méthode des cloches benthiques (Annexe 24). Les résultats n'ont en revanche pas ou peu été présentés dans ce travail puisque le système a montré des défaillances qui n'ont pues être réglées pour l'instant. Un nouveau dispositif est en cours d'acquisition et permettra d'obtenir un facteur de conversion pour analyser les données acquises lors des mesures sur le terrain.

Ensuite, il a été difficile d'appréhender le rôle de la macrofaune dans le système malgré un effet suspecté sur la stratification d'après la littérature (Laverock *et al.*, 2011; Braeckman *et al.*, 2014; Laverock *et al.*, 2014). Il a été suggéré que l'hydrodynamisme pouvait conditionner

la stratification des sédiments. De plus, la vasière étant un système à très forte hétérogénéité spatiale, les triplicats variaient beaucoup et complexifiaient l'analyse des résultats. Enfin, l'exploration initiée, centrée sur le cycle de l'azote, révèle la nécessité de travailler à l'avenir sur l'expression des gènes fonctionnels et non pas uniquement sur leur présence dans l'environnement. Ce type d'étude permettrait de relier les concentrations en sels nutritifs avec des réactions métaboliques réellement réalisées dans l'écosystème.

Partie 3. Simplifier pour mieux comprendre

Partie 3

Cette partie décrit un dispositif expérimental développé dans le but de recréer l'écosystème « vasière intertidale » tout en contrôlant certains paramètres. La simplification du système a pour intérêt de mieux comprendre son fonctionnement et d'évaluer les facteurs qui décrivent le mieux les variations des processus étudiés.

Le premier chapitre présente la mise en place du dispositif, ses caractéristiques et vérifie sa validité. Le second chapitre permet de tester de nombreuses hypothèses et évalue l'effet du temps d'émersion sur l'activité de communautés procaryotes en conditions semi-contrôlées en présence ou en absence d'activité photosynthétique (lors d'une marée basse de jour et de nuit, respectivement).

Le troisième chapitre correspond à un article qui sera soumis dans ISME Journal (*International Society for Microbial Ecology*) qui compare la stratification des communautés actives (expression du gène 16S rRNA) des procaryotes en milieu de marée basse de jour et de nuit.

Le dispositif de mésocosmes tidaux a été pensé et appliqué (Agogué *et al.*, 2014) en 2008 lors de l'ANR blanche VASIREMI, et a été utilisé dans le cadre du projet EC2CO CAPABIOC en 2013. Il a nécessité les expertises techniques de Michel Prineau et Nicolas Lachaussée. La mise en place des carottes dans les mésocosmes a été réalisé avec l'aide de Claire Dussud (stagiaire M1, ULR) et l'analyse des EPS et des activités enzymatiques ont été en partie réalisées par Clément Chaigneau (stagiaire DUT ABB, IUT La Rochelle). Les prélèvements ayant été nombreux et concentrés sur deux journées, il n'aurait pas été possible de les effectuer sans l'aide de nos collègues de LIENSs et du LEMAR (Brest).

Chapitre 1. Développement d'un dispositif expérimental en conditions semi-contrôlées : la validation 237

1.1 Contexte de l'étude 238

1.2 Mise en place 240

1.3 Stratégie d'échantillonnage 246

1.4 Résultats 249

1.5 Discussion 259

Chapitre 2. Effet du temps d'émersion au cours d'une marée basse de jour et de nuit sur les communautés procaryotes benthiques 265

2.1 Contexte de l'étude 266

2.2 Résultats 270

2.3 Discussion 293

Chapitre 3. Diversité des procaryotes actifs liés au cycle de l'azote en conditions semi-contrôlées : impact d'un cycle jour/nuit 301

3.1 Contexte de l'étude 302

3.2 *Active prokaryotic community structure in coastal muddy sediments during day and night low tide* 305

3.3 Conclusion 334

Conclusion Partie 3 337

Chapitre 1. Développement d'un dispositif expérimental en conditions semi-contrôlées : la validation

1.1 Contexte de l'étude

La Partie précédente a dévoilé la complexité d'étudier les processus d'une vasière intertidale, puisque ce système est soumis à de nombreux facteurs forçants conduisant à des effets individuels ou synergiques encore peu compris. Les résultats ont montré que la profondeur du sédiment était très structurante, et qu'au cours d'une période d'émersion, les profils des paramètres étudiés ne semblent pas être modifiés significativement malgré une anoxification du sédiment et une augmentation des processus anaérobies.

Le mésocosme est défini par Odum (1984) comme se situant entre le microcosme en laboratoire et le milieu naturel. Ce sont des enceintes closes permettant l'étude d'un ou plusieurs compartiments trophiques soumis à des variables environnementales contrôlées. Ce contrôle sur certains paramètres offre de nombreuses opportunités à la communauté scientifique pour mieux comprendre le fonctionnement des écosystèmes. L'utilisation de mésocosmes est donc d'une importance capitale en écologie. Les mésocosmes doivent néanmoins répondre à trois règles de base (Giesy and Allred, 1985) qui sont d'être : 1) représentatifs du milieu mimé, 2) reproductibles et 3) réplicables. La reproductibilité dans le cas des mésocosmes est souvent réduite puisqu'ils représentent des milieux complexes difficile à reproduire deux fois à l'identique. La réplicabilité correspond à la cohérence entre les réplicats dans un même dispositif qui doit être plus faible que la variabilité entre les conditions testées. De plus, Petersen *et al.* (2003) soulèvent l'importance du choix de l'échelle (taille et temps) notamment pour éviter l'effet « confinement » qui joue sur les paramètres mesurés. Ainsi, ils suggèrent de tenir compte de l'échelle du processus ciblé afin de développer un mésocosme de taille adaptée. Ces auteurs précisent aussi l'importance de rester prudent quant à l'extrapolation directe au milieu naturel. Par exemple, une étude en mésocosme a montré un changement de structure de la communauté de bactéries planctoniques, y compris dans les mésocosmes contrôles, probablement dû à l'élimination de la fraction biologique supérieure à 200 µm (Schäfer *et al.*, 2001). Ceci souligne la difficulté de reproduire à l'identique un écosystème et confirme l'importance de rester modéré sur les extrapolations des résultats au milieu naturel. Cela étant dit, les mésocosmes permettent de simplifier un écosystème et donc de mieux comprendre les processus majoritaires. Ce sont des outils essentiels pour l'écologie afin de tester de nombreuses hypothèses, mieux décrire un système et ainsi favoriser la compréhension des processus mesurés *in situ*.

En conséquence, un dispositif expérimental a été développé au laboratoire dans le but 1) de simplifier ce système, 2) d'analyser finement les variations d'activités des procaryotes dans les vasières, et 3) d'étudier ces processus lorsque le MPB ne réalise pas la photosynthèse, c'est-à-dire la nuit.

L'outil utilisé dans cette étude, est un mésocosme tidal qui avait été développé en 2008 dans le cadre de l'ANR VASIREMI afin d'étudier l'impact du microphytobenthos sur la dynamique des procaryotes dans le sédiment de surface. Ce travail a mis en avant l'influence des EPS et particulièrement des EPS glucidiques liés, sur la production bactérienne en surface (Agogué *et al.*, 2014).

Le but principal du développement de ce dispositif tidal en conditions semi-contrôlées était de simplifier l'écosystème vasière **1) en éliminant la macrofaune (prédateurs et bioturbateurs) et 2) en diminuant voire supprimant l'impact de l'hydrodynamisme. Afin d'étudier l'écosystème de façon originale et impossible sur le terrain, deux dispositifs ont été réalisés en parallèle : l'un en vue d'étudier la vasière le jour et l'autre en vue d'étudier la vasière de nuit.** Dans ce chapitre, l'objectif est de se focaliser sur la reproductibilité, la représentativité et la réplicabilité des mésocosmes afin de valider leur application. Ce chapitre présente donc la mise en place et la validation des mésocosmes (de jour et de nuit, **Figure 77**) et les paramètres biotiques et abiotiques qui ont été étudiés et qui ont permis de valider le système.

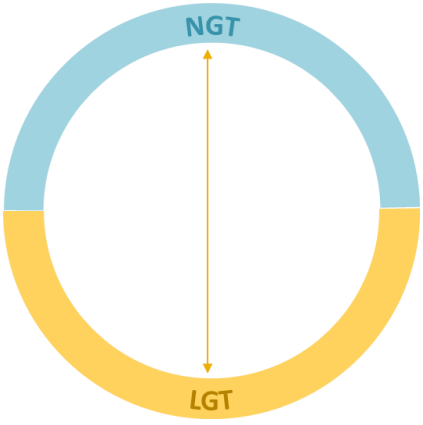


Figure 77. Stratégie d'analyse adoptée dans ce chapitre. Dans ce chapitre, les valeurs des trois moments de marée ont été moyennés pour comparer uniquement les conditions jour (LGT)/nuit(NGT).

1.2 Mise en place

1.2.1 Conception du dispositif

Quatre bacs (plastique opaque) mesurant 90*110*100 cm, pouvant ainsi contenir près de 1000 litres d'eau, ont été utilisés. Deux bacs correspondaient aux bacs principaux contenant les carottes de sédiment pour les deux conditions : LGT (jour) et NGT (nuit) et deux autres cuves servaient de réserves recueillant l'eau afin de mimer la marée basse dans le bac principal. Afin de faciliter le prélèvement des carottes, un faux fond a été créé dans chaque bassin principal rehaussant les carottes et permettant également de loger la pompe dans le fond (**Figure 78**). Un bac principal était toujours relié au même bac tampon via un système de tuyaux et de pompes (**Figure 78** et **Figure 79**). L'arrêt de ces pompes était déclenché grâce à des flotteurs qui permettaient de contrôler le niveau d'eau (**Figure 79**). Deux flotteurs se trouvaient dans chaque bac principal : un placé au niveau d'eau le plus bas souhaité afin de stopper la pompe du bac principal qui évacue l'eau vers le bac tampon et un deuxième placé à hauteur du niveau maximum d'eau souhaité à marée haute permettant de stopper la pompe du bac tampon alimentant le bac principal. Le déclenchement des pompes était programmé aux heures souhaitées via l'utilisation d'un panneau électrique.

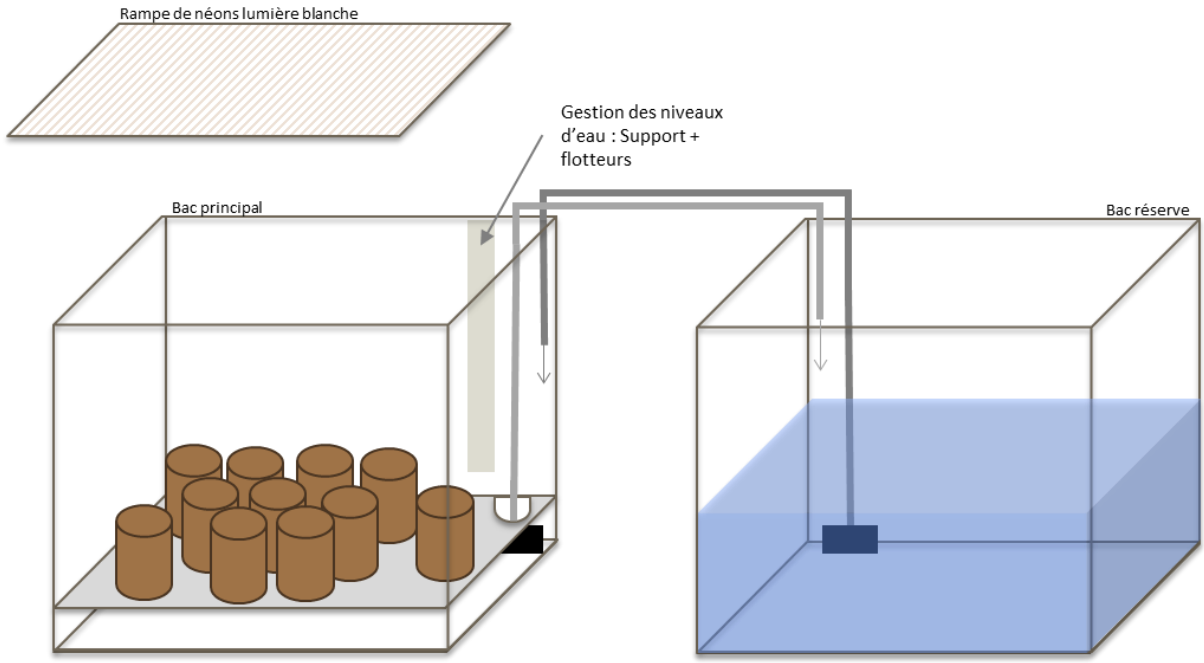


Figure 78. Dispositif expérimental développé en double à l'identique (LGT et NGT). Les pompes permettant les flux d'eau sont représentées par des carrés noirs, les carottes de vases par des cylindres bruns qui sont disposés sur un faux fond grisé.

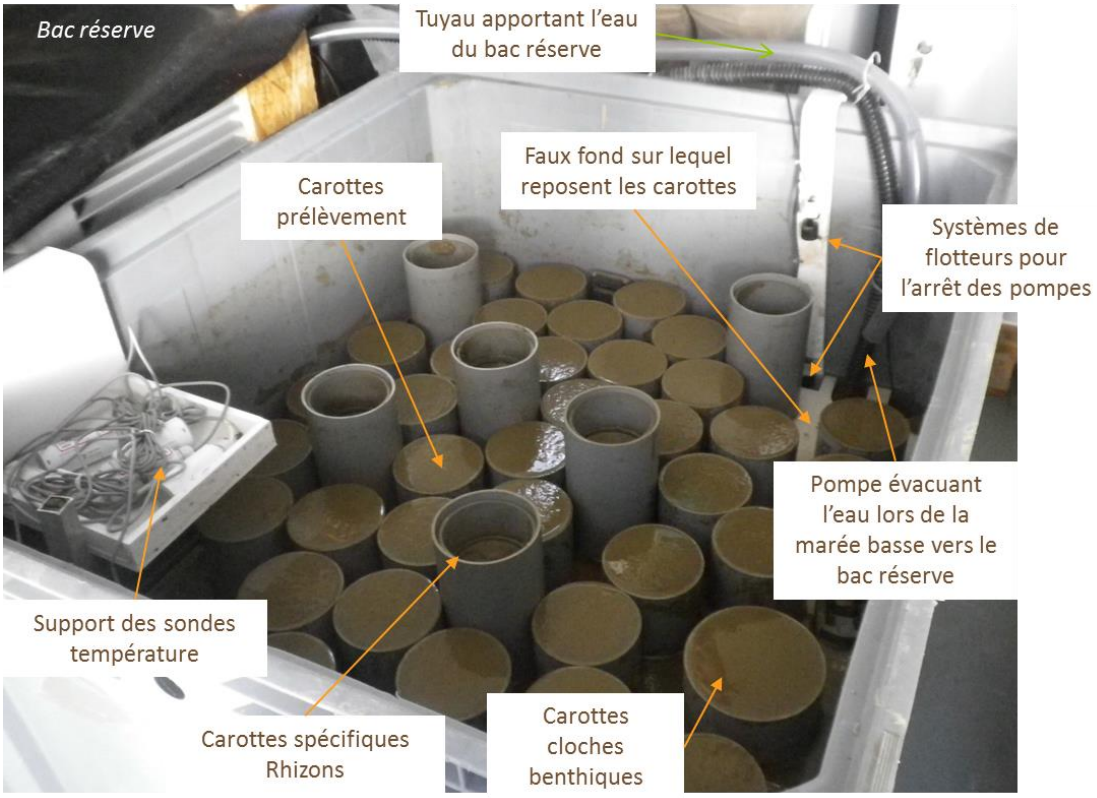


Figure 79. Photo du bac principal du dispositif expérimental illustrant la **Figure 78**. Le bac réserve se trouve à gauche de la photo.

1.2.2 Restructuration des sédiments par tamisage en couches

Selon Michaud *et al.* (2010), la majorité des études menées en mésocosmes sur du sédiment sableux ou vaseux intertidal ne reconstitue pas les conditions *in situ*. Le transport des sédiments, le tamisage et la disposition dans les mésocosmes apportent de nombreux biais et contaminations. Michaud *et al.* (2010) démontrent que le fait de restructurer le sédiment par couche plutôt que de l'homogénéiser a un impact sur la distribution des galeries de *Nepthys incisa*. Ces galeries sont d'une importance majeure pour les processus dépendant de l'oxygène tels que le métabolisme aérobie et la nitrification puisqu'elles constituent un apport d'oxygène et d'eau chargée en nutriments modifiant les processus dans le sédiment alentour. Selon ces auteurs, il apparaît indispensable de ne pas homogénéiser le sédiment afin de maintenir les gradients et les équilibres biogéochimiques et sédimentaires dans la colonne de sédiment (Michaud *et al.*, 2010). La méthode développée par Michaud *et al.* (2010) se caractérise donc par le prélèvement des sédiments par couches (dans leur étude : 0-2 cm, 4-6 cm, 6-10 cm, 10-15 cm). Les sédiments sont ensuite stockés puis tamisés, si besoin, et reconstitués couche par couche dans des carottes. Ainsi, les propriétés sédimentaires de chaque couche et les concentrations en matière organique et inorganique sont maintenues en fonction de la profondeur et la restructuration de ces paramètres est plus rapide et plus représentative du milieu naturel.

Les éléments clés étudiés dans notre travail étant les procaryotes et le cycle de l'azote, il fallait donc mettre en place une restructuration des profils de nutriments rapide et la moins invasive possible (en termes de manipulation de communautés). Les sédiments ont donc été prélevés le 11 Avril 2013 sur la vasière de Brouage à l'étale de marée basse. Le prélèvement a été réalisé par couches spécifiques à notre étude : 0-0,5 cm (P1), 0,5-1 cm (P2), 1-2 cm (P3), 2-5 cm (P4) et 5-10 cm (P5).

Table 26. Quantité de sédiment prélevé sur le terrain, le 11 Avril 2013, en vue de la mise en place des mésocosmes

	Volume à prélever (L)
P1-P2	4
P3	8
P4	24
P5	80

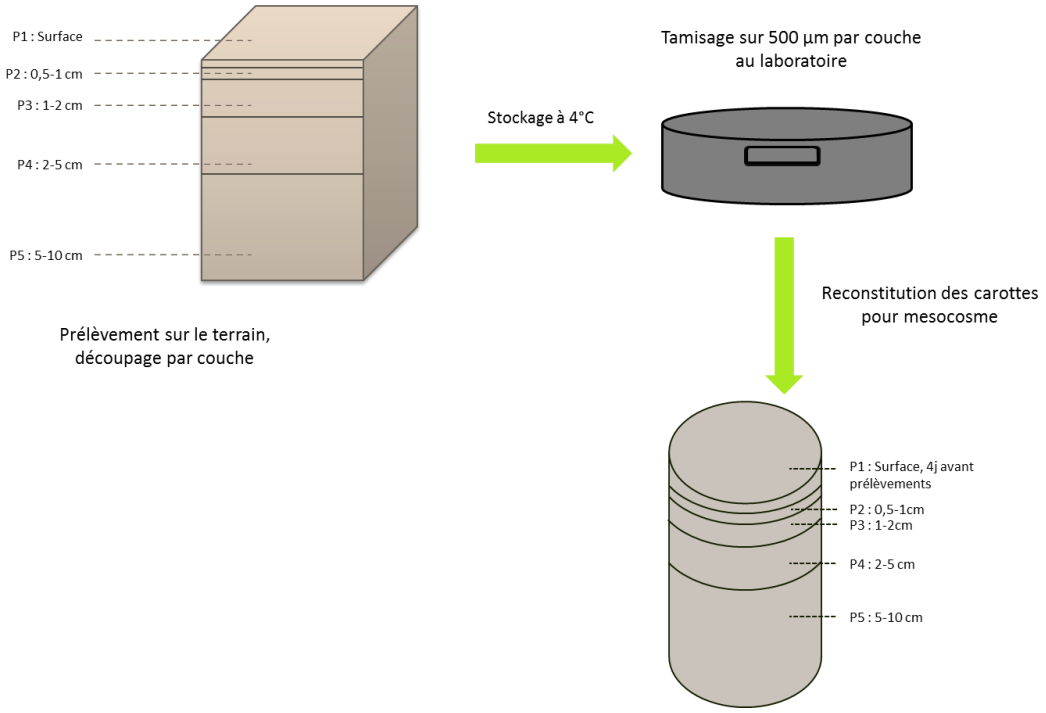


Figure 80. Procédure de mise en place des carottes dans le dispositif expérimental : stratégie de prélèvement par couches de la colonne sédimentaire de 0 à 10 cm de profondeur, puis tamisage par couche et reconstitution des carottes de sédiment. Dans ces carottes reconstituées, du microphytobenthos frais a été ajouté 5 jours avant les prélèvements, voir § 1.2.4.

Un total de 116 L de vase (**Table 26**) a été rapporté au laboratoire (conservé au noir à 4°C) et une semaine a été nécessaire pour le tamisage (dans la semaine suivant le prélèvement). Le tamisage a été réalisé sur un tamis de vide de maille de 500 µm afin d'éliminer la macrofaune (hydrobies en surface, bivalves, vers) et sans ajout d'eau pour ne pas modifier la teneur en eau.

1.2.3 Mise en route et stabulation des carottes

Au total, 84 carottes ont été reconstituées couche par couche puis disposés dans les mésocosmes pendant 20 à 23 jours le temps de la reconstitution des profils de nutriments suivant le gradient de profondeur, similaire au milieu naturel. Pendant ce temps de stabulation, le sédiment a été soumis au cycle tidal (semi-diurne) d'une durée de 12h par cycle (6h marée basse, 6h marée haute), au noir :

- Marée basse : de 10h à 16h et de 22h à 4h
- Marée haute de 16h à 22h et de 4h à 10h

L'eau de mer utilisée provenait du site de prélèvement (Port de Port-des-Barques) dans le but de conserver une eau riche en sels nutritifs. Un renouvellement d'eau a été réalisé une fois par semaine. Cette eau a été filtrée successivement sur des tamis de 100, 63 puis 10 µm avant d'alimenter les mésocosmes afin de limiter les ajouts de microorganismes (vérification par un comptage en cytométrie en flux).

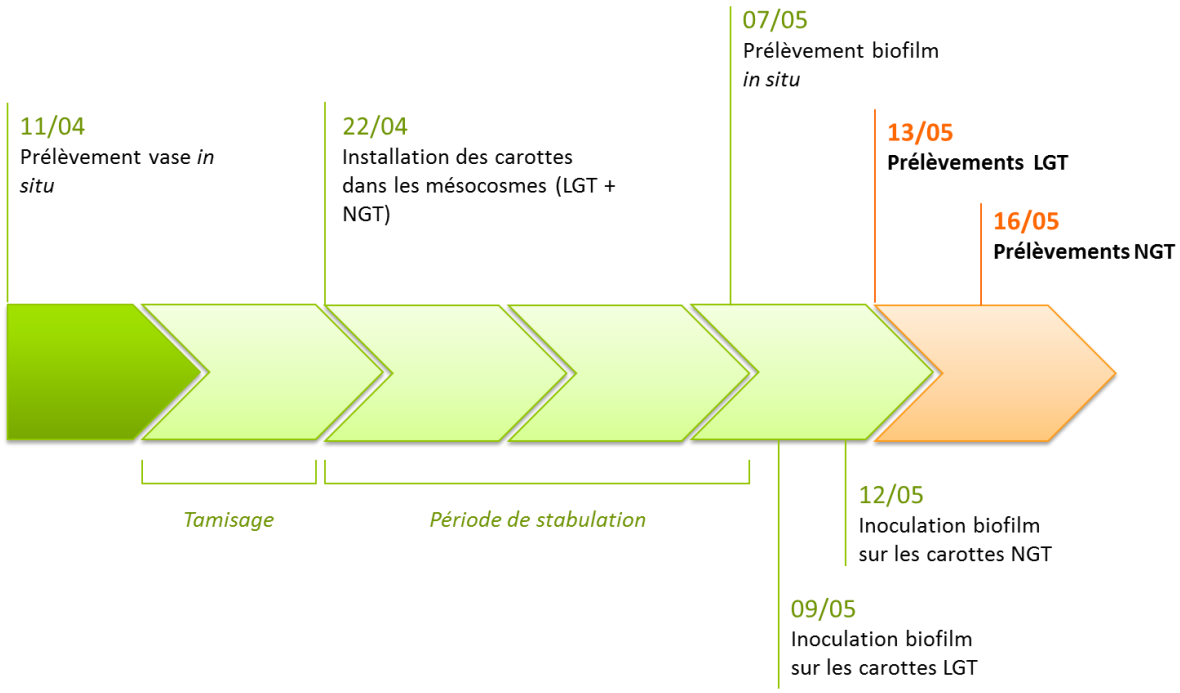


Figure 81. Frise temporelle des tâches réalisées pour la mise en place du dispositif expérimental (en Avril et Mai 2013).

1.2.4 Ajout du biofilm microphytobenthique frais

Les sédiments ayant été conservés au noir, il a été nécessaire d'obtenir quelques jours avant les prélèvements, un microphytobenthos frais provenant de milieu naturel. Le 7 mai 2013, un prélèvement de biofilm a donc été réalisé sur la vasière de Brouage puis rapporté au laboratoire. Un concentrât a été préparé pendant quelques jours en utilisant la capacité de migration du biofilm. Le sédiment a été disposé dans des barquettes plates qui permettent une plus grande surface de prélèvement des algues afin de récolter le biofilm en surface lors de la migration des diatomées. Au laboratoire, à l'heure de la marée basse, un concentrât d'algues a été récupéré et à chaque marée haute, le sédiment a été ré-homogénéisé et réhydraté pour mimer le phénomène de marée haute. Quatre jours avant la date de prélèvement final, cet inoculum a été dilué dans du sédiment tamisé stocké au noir à 4°C afin d'obtenir une biomasse algale proche de la biomasse *in situ* et disposé sur chaque carotte du mésocosme afin de constituer la couche P1 de surface (5 mm). Afin de ne pas réaliser les prélèvements finaux en période de décroissance des algues, une mesure de l'efficacité du photosystème II (PSII) par fluorimétrie (pulse amplitude modulation : PAM) a été utilisée comme proxy de l'état de santé des algues (Vieira *et al.*, 2013). Il s'agit de la mesure du ratio F_v/F_m avec F_m correspondant à la fluorescence maximale d'un échantillon adapté au noir de la fluorescence et F_v le delta entre cette fluorescence maximale et la fluorescence minimale d'un échantillon adapté au noir. Lors des prélèvements, les ratios était en moyenne à 0,76, attestant d'une bonne condition physiologique des algues.

Un cycle jour/nuit adapté au cycle *in situ* a été appliqué dès l'ajout du biofilm microphytobenthique. Une rampe de néons (Tubes fluorescents Lumière du jour 36W 50 Hz, OSRAM, Munich, Allemagne) a été utilisée pour imposer une lumière de 231 ±46 µmol photons m^{-2} s^{-1} selon les cycles suivants:

- Mésocosme LGT
    - Jour : 6h à 21h (durée = 15h)
    - Nuit : 21h à 6h (durée = 9h)
- Mésocosme NGT
    - Jour : 18h à 9h (durée = 15h)
    - Nuit : 9h à 18h (durée = 9h)

1.3 Stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements finaux ont été effectués sur une journée, en fin de phase exponentielle de croissance des algues afin de faire correspondre nos prélèvements à ceux du terrain. En effet, comme précisé dans la Partie 1, les échantillons ont été prélevés lors des coefficients de marée les plus forts au moment où le biofilm est le plus constitué et avant son déclin. Un jour entier de prélèvements et de mesures a été consacré au mésocosme de jour (LGT, **Figure 81**) et un autre au mésocosme de nuit (NGT). Lors de la marée basse, 3 prélèvements ont été effectués à 15, 180 et 345 minutes d'émersion, appelés L1, L2 et L3 respectivement (**Figure 82**). A chaque prélèvement, différents paramètres biotiques et abiotiques ont été mesurés et un conditionnement particulier a été adopté afin de minimiser la quantité de vase nécessaire pour l'analyse de chaque paramètre (**Table 27**). Les paramètres considérés mesurés ou analysés dans le cadre de cette étude sont résumés dans la **Table 28**.

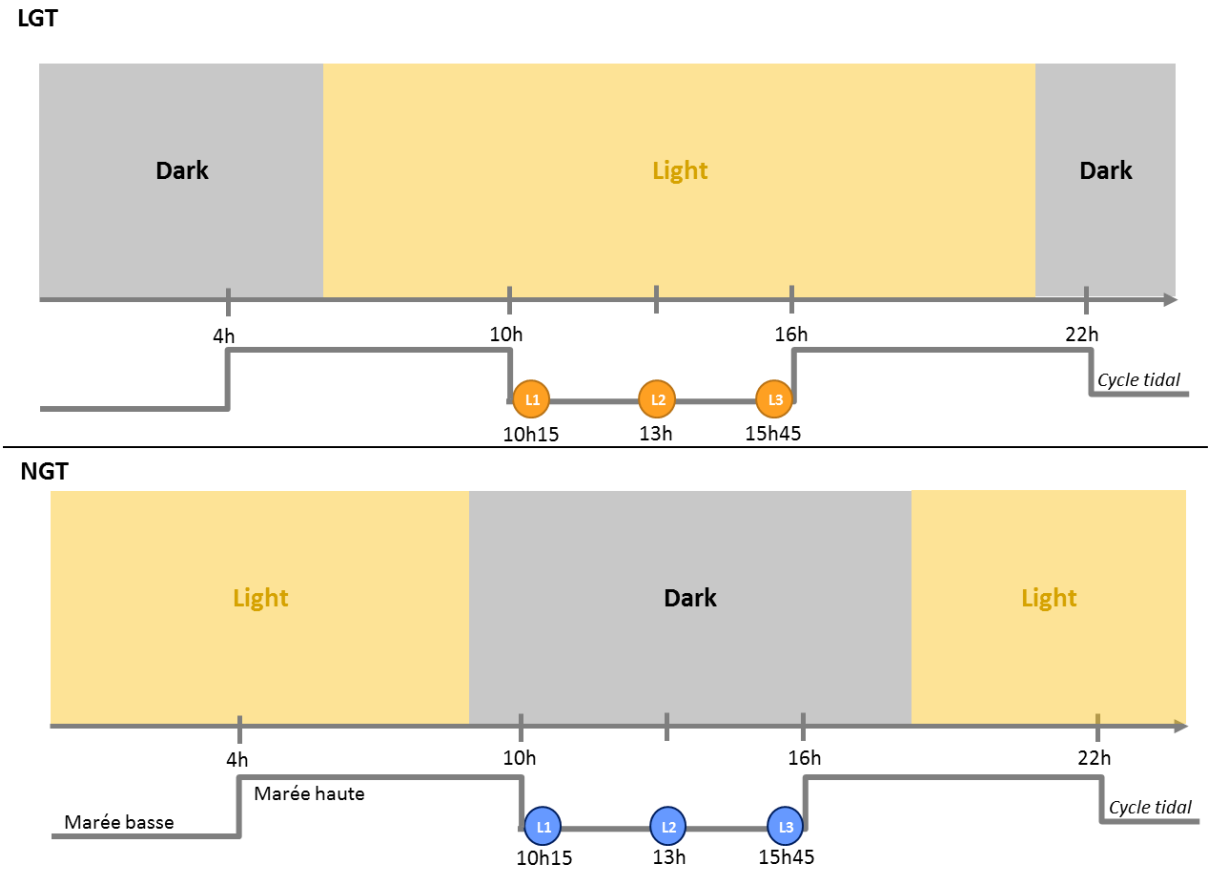


Figure 82. Stratégie de prélèvement sur une journée par mésocosme tidal, LGT (marée basse de jour) et NGT (marée basse de nuit).

Table 27. Procédure de conditionnement des échantillons suite aux prélèvements.

Paramètres	**Pot/Tube**	**Volume**						
Congélateur				*P1*	*P2*	*P3*	*P4*	*P5*
Chloro	Pot 60 ml	10 ml	-20°C					
COP/NOP	Boite Petri	8 ml	-20°C					
Protéines tot I et II	2x Falcon 15 ml	1 ml	-20°C					
ADN	Petit pot spéciaux	10 ml	-20°C					
FISH	Falcon 15 ml	1 ml	-20°C					
AE	6x Eppendorf	0,5 ml	- 20°C					
AE GE	2x Pots 60 ml	4 ml	-20°C					
Destination Labo								
Teneur en eau	Pot 60 ml	10 ml	+60°C*					
pH, S%	Falcon 50 ml	reste	centri					
Prod bact	Eppendorf	0 ,5 ml						
Chambre froide								
AP**	Petit pot spéciaux	2 ml	4°C					
EPS int	Falcon 15 ml	5 ml	4°C					
-80°C								
ARN	seringues *2	6 ml	-80°C					

*peser les pots pour la teneur en eau avant de les faire sécher à l'étuve

**le pot AP (abondance de procaryotes) contient 2mL de Formol 4%

Table 28. Tableau récapitulatif des paramètres considérés dans le cas des mésocosmes, ● = paramètres utilisés dans ce chapitre

Paramètres	LGT L1	LGT L2	LGT L3	NGT L1	NGT L2	NGT L3
Irradiance	●	●	●	●	●	●
Température extérieure	●	●	●	●	●	●
Température sédiment	●	●	●	●	●	●
pH	●	●	●	●	●	●
Salinité	●	●	●	●	●	●
Teneur en eau	●	●	●	●	●	●
Granulométrie						
COP/NOP	●	●	●	●	●	●
Chlorophylle a	●	●	●	●	●	●
Sels nutritifs	●	●	●	●	●	●
EPS						
Protéines totales	●	●	●	●	●	●
Méiofaune	---	●	---	---	●	---
Macrofaune						
Production bactérienne						
Activités enzymatiques						
Abondance procaryotes	●	●	●	●	●	●
Gènes fonctionnels (ADN)						
amoA bactérien						
amoA archéen						
nirS						
nirK						
nosZ						
anammox*						
Gènes fonctionnels actifs (ADNc)						
amoA bactérien						
amoA archéen						
nirS						
nirK						
nosZ						
anammox*						
Abondance bactéries (gène 16S ARNr)						
Abondance archées (gène 16S ARNr)						
Diversité bactérienne totale (gène 16S ARNr)						
Diversité archéenne totale (gène 16S ARNr)						
Diversité bactérienne active (16S ARNr)						
Diversité archéenne active (16S ARNr)						

*16S rRNA *Planctomycetes*

1.4 Résultats

Afin de décrire, de valider le système et de comparer les mésocosmes de jour et de nuit, les résultats présentés dans ce chapitre correspondent à des valeurs moyennes par condition (LGT ou NGT) des moments de marée.

1.4.1 Une bonne représentativité du milieu mimé

1.4.1.1 Profils d'oxygène

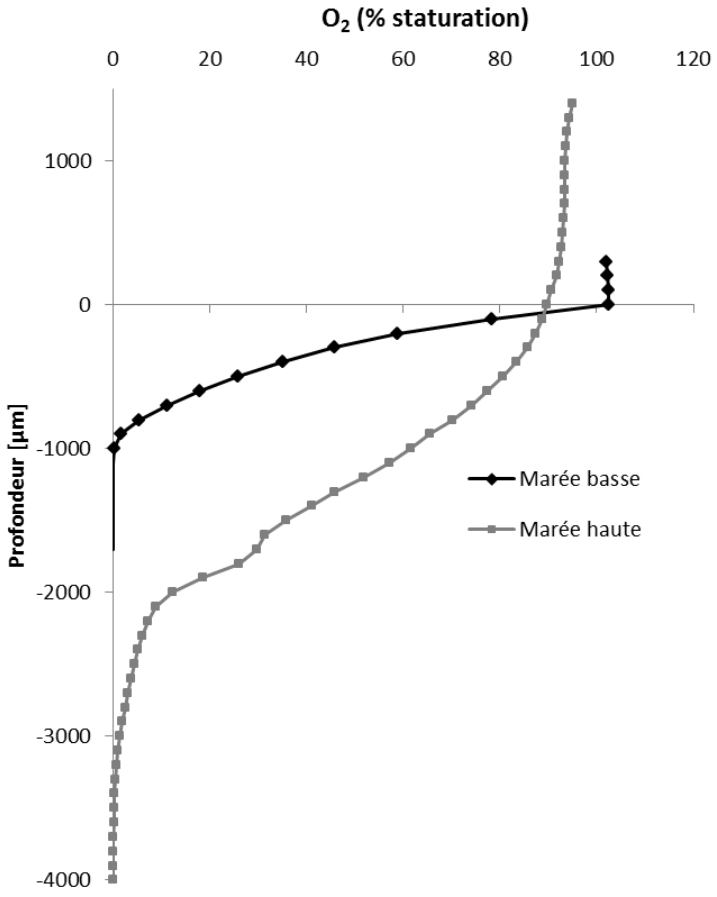


Figure 83. Exemple de profils d'oxygène à marée basse et à marée haute sur des carottes issues des mésocosmes.

Les profils d'oxygènes dans les sédiments différaient entre marée haute et marée basse. En effet, à marée basse, la profondeur de pénétration de l'oxygène dans le sédiment était fortement diminuée (0,9 mm en moyenne). A marée haute, le pourcentage de saturation de l'oxygène atteignait des valeurs inférieures à 1 % de saturation après 3 mm en moyenne.

La production primaire et la respiration ont été mesurées par la méthode des cloches benthiques (Annexe 24). Cela a permis de confirmer que le microphytobenthos réalisait la photosynthèse de jour et respirait la nuit. Comme précisé précédemment, les valeurs ont été biaisées par un système défaillant et devront être corrigées dès l'acquisition d'un nouvel instrument de mesure.

1.4.1.2 Les paramètres biotiques et abiotiques sont proches entre les deux mésocosmes et comparable aux mesures in situ

La teneur en eau du sédiment était similaire entre les deux mésocosmes (63 %) et légèrement supérieure à celle du suivi *in situ* (57 %), diminuant linéairement avec la profondeur de 73 % à 50 % (**Figure 84**). La température moyenne du sédiment variait de 24°C de jour à 20 °C de nuit et restait stable sur toute la colonne sédimentaire (**Figure 84**). Ces valeurs correspondent à des températures comparables au mois de juillet 2012 (**Table 29**). Les valeurs de biomasses chlorophylliennes étaient très élevées dans les mésocosmes avec 45,96 ±8,25 µg g^{-1} PS et 38,59 ±4,87 µg g^{-1} PS de chlorophylle *a* de jour et de nuit respectivement contre un maximum de 33,13 ±12,2 µg g^{-1}PS en avril 2013 (*in situ*). Les valeurs n'étaient pas significativement différentes entre les deux mésocosmes mais suivait un gradient de profondeur marqué (ANOVA 2 facteurs, effet mésocosme : F= 2,0 ; p>0,05 et effet profondeur : F=848,1 ; p<0,01). En revanche, les valeurs de chlorophylle *a* différaient en surface entre les deux mésocosmes (test *post hoc* de Tukey : p<0,01). Les valeurs de chlorophylle *a* ont été mesurées lors de l'ensemencement du biofilm dans les mésocosmes. Dans le mésocosme NGT, la valeur n'a pas ou peu varié entre l'ensemencement (87,19 µg g^{-1} PS) et les prélèvements (81,95 ±10,80 µg g^{-1} PS). En revanche, dans le mésocosme LGT, la valeur a augmenté passant de 119 µg g^{-1} PS à 147 µg g^{-1} PS. Le pH suivait un gradient avec la profondeur similaire entre *ex situ* et *in situ* (**Figure 84**) et présentait des valeurs semblables au mois de juillet 2012 (**Table 29**). Le ratio POC:PON était également fort dans les deux mésocosmes avec des valeurs entre 6,9 ±0,1 en surface et 7,68 ±0,1 en profondeur. De jour, ce ratio était comparable aux valeurs en février 2013 (*in situ*) et s'élevait en moyenne à 7,4 ±0,06. De nuit, le ratio POC:PON prenait des valeurs moyennes de 7,04 ±0,07. Les protéines totales ne semblaient pas ou peu varier durant le suivi *in situ*, en revanche, dans les mésocosmes, les concentrations totales en protéines étaient très élevées particulièrement de jour où les valeurs étaient de 14,74 ±0,82 µg g^{-1} PS en moyenne.

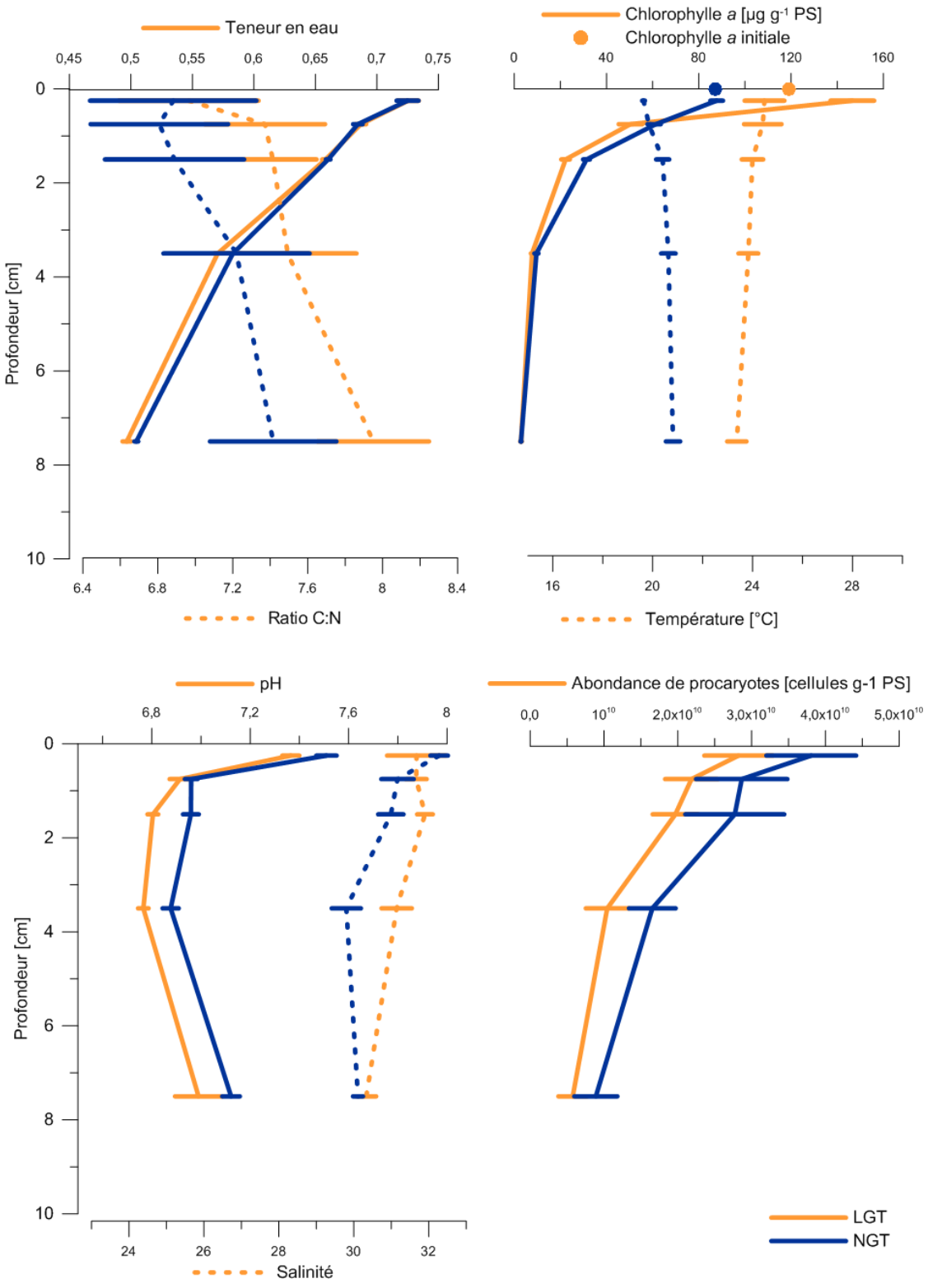


Figure 84. Profils des différents paramètres biotiques et abiotiques mesurés dans chaque mésocosme (moyennes des 3 temps d'émersion).

1.4.1.3 La cohérence des profils de nutriments

Afin de vérifier la mise en place des profils de nutriments, les profils du milieu de marée basse ont été comparés aux profils obtenus en milieu de marée sur terrain (**Figure 85**). Les concentrations en nitrites, en nitrates et en ammonium dans le mésocosme de nuit (NGT) étaient très proches des concentrations en février 2013. Le profil des concentrations en nitrites dans le mésocosme de jour (LGT) suivait le profil en juillet 2012 de 0 à 2 cm de profondeur puis les concentrations restaient élevées dans le mésocosme, ce qui n'était pas le cas *in situ*. Concernant les nitrates, les concentrations dans le mésocosme de jour étaient particulièrement élevées entre 1 et 10 cm de profondeur (jusqu'à 10 fois plus élevées qu'en juillet 2012) et ne correspondent à aucune valeur mesurée *in situ*. Les concentrations en ammonium dans le mésocosme de jour suivaient sensiblement les tendances observées en Février 2013. Enfin, concernant les phosphates, dans le mésocosme de nuit, le profil est similaire à celui de Février 2013 malgré des concentrations plus faibles. Dans le mésocosme de jour, le profil est linéaire et présente des concentrations plus proches du mésocosme de nuit.

1.4.1.4 L'abondance des procaryotes

Les abondances de procaryotes étaient similaires au suivi *in situ*, étaient significativement supérieures dans le mésocosme de nuit (2,4 ±0,17 $x10^{10}$ cellules g^{-1} PS) que dans celui de jour (1,72 ±0,13 $x10^{10}$ cellules g^{-1} PS). Leurs profils suivant la profondeur (**Figure 84**) ressemblaient, en revanche, aux profils d'abondance observés *in situ*.

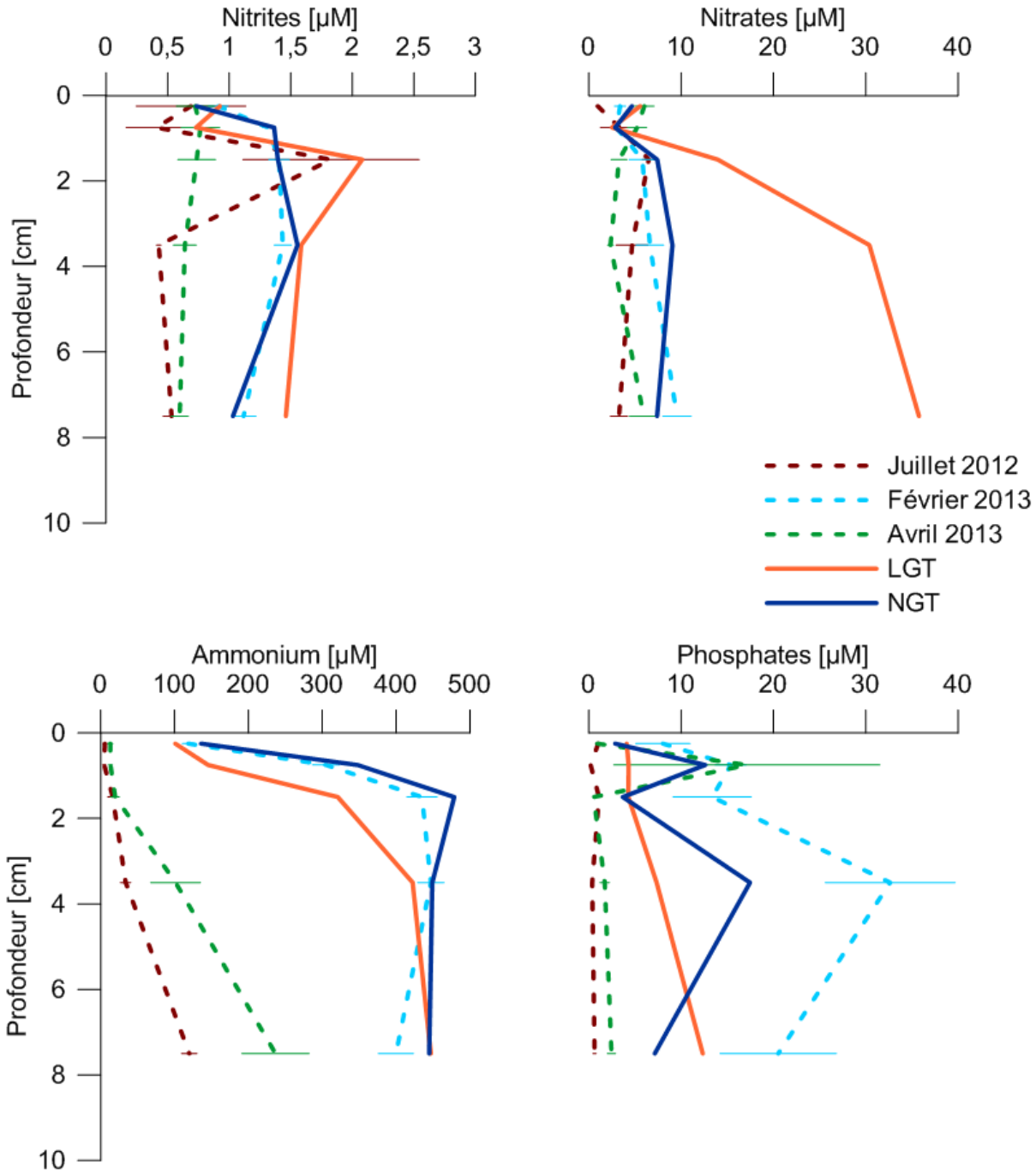


Figure 85. Profils comparatifs des concentrations en nutriments en milieu de marée, en juillet 2012, février 2013, avril 2013 et dans les mésocosmes de jour (LGT) et de nuit (NGT).

Table 29. Présentation des paramètres descriptifs des deux mésocosmes (LGT, jour et NGT, nuit) et durant le suivi *in situ*.

	Mésocosme		Suivi *in situ*			
	LGT	**NGT**	**Juillet**	**Février**	**Avril**	Unité
Teneur en eau	0,63 ± 0,01	0,63 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,01	%
Température du sédiment	24,01 ± 0,25	20,26 ± 0,12	21,64 ± 0,15	8,93 ± 0,13	13,31 ± 0,37	°C
Chlorophylle *a*	45,96 ± 8,25	38,59 ± 4,87	19,23 ± 6,88	17,25 ± 5,69	33,13 ± 12,17	µg g^{-1} PS
pH	6,94 ± 0,04	7,09 ± 0,04	6,95 ± 0,09	7,26 ± 0,09	7,28 ± 0,06	
Salinité	31,34 ± 0,20	30,87 ± 0,19	36,81 ± 1,28	25,43 ± 0,76	31,27 ± 0,45	
C:N	7,44 ± 0,06	7,04 ± 0,07	6,40 ± 0,06	7,35 ± 0,13	7,22 ± 0,11	
Protéines totales	14,74 ± 0,82	7,71 ± 0,24	4,79 ± 0,27	5,65 ± 0,27	4,72 ± 0,27	mg g^{-1} PS
PO_4^{2-}	9,51 ± 6,26	17,98 ± 11,7	0,66 ± 0,12	17,41 ± 7,59	1,00 ± 0,24	µM
NO_2^-	2,1 ± 1,85	1,24 ± 0,24	0,78 ± 0,21	1,09 ± 0,08	0,63 ± 0,08	µM
NO_3^-	54,06 ± 80,77	5,67 ± 3,11	3,74 ± 0,70	7,04 ± 1,72	3,82 ± 0,60	µM
NH_4^+	242,75 ± 164,72	341,15 ± 127	36,08 ± 11,82	112,15 ± 20,04	51,84 ± 20,84	µM
Abondance procaryotes	1,72 ± 0,13	2,40 ± 0,17	2,29 ± 0,26	1,37 0,13	1,46 ± 0,16	x10^{10} cellules g^{-1} PS

PS : Poids sec

1.4.2 Des abondances de méiofaune benthique parfois très fortes

Le sédiment utilisé pour la mise en place du mésocosme a été préalablement tamisé sur 500 µm. Ce tamisage permet l'élimination de la macrofaune (1 mm < taille < 2cm) mais il reste impossible d'ôter la méiofaune (organismes inférieurs à 1 mm) (Swift *et al.*, 1979). Les assemblages taxonomiques étaient similaires entre les mésocosmes et le suivi *in situ*, et étaient largement dominés par les nématodes en surface. En profondeur, la part de foraminifères s'accentuait et atteignait 65 % de l'abondance de la méiofaune en juillet 2012. Les abondances totales des organismes de la méiofaune diminuaient avec la profondeur. Dans le mésocosme de jour, les abondances étaient très nettement supérieures à toutes les abondances relevées *in situ* et *ex situ* (de nuit) avec notamment près de 1600 nématodes par cm^{-3} (**Figure 86**). Le profil des abondances différait légèrement entre le *in situ*, où la diminution est exponentielle et le *ex situ*, où les abondances sont encore importantes jusqu'à 2 cm de profondeur. A partir des taux de prédation de la production carbonée estimée par Pascal *et al.* (2009) dans la baie de Marennes-Oléron, une estimation de la perte de la production primaire et bactérienne par prédation a pu être calculée (**Table 30**). La prédation des nématodes représentait entre 0 (en profondeur) et 5,6 % (en surface) de la production carbonée totale et celle des foraminifères de 0 à 1,3 % (**Table 30**). Cumulées, les pressions de prédation imposées par les organismes de la méiofaune ne représentaient qu'une consommation maximale de 6,9 % de la production carbonée dans les sédiments issus des mésocosmes de jour et de nuit, alors que sur le terrain cette perte peut varier de 7 à 28 % (Pascal *et al.*, 2009). Les abondances de nématodes étaient donc particulièrement élevées dans les mésocosmes mais les estimations prouvent que cette forte abondance ne semblerait pas avoir d'impact marqué sur la production des procaryotes.

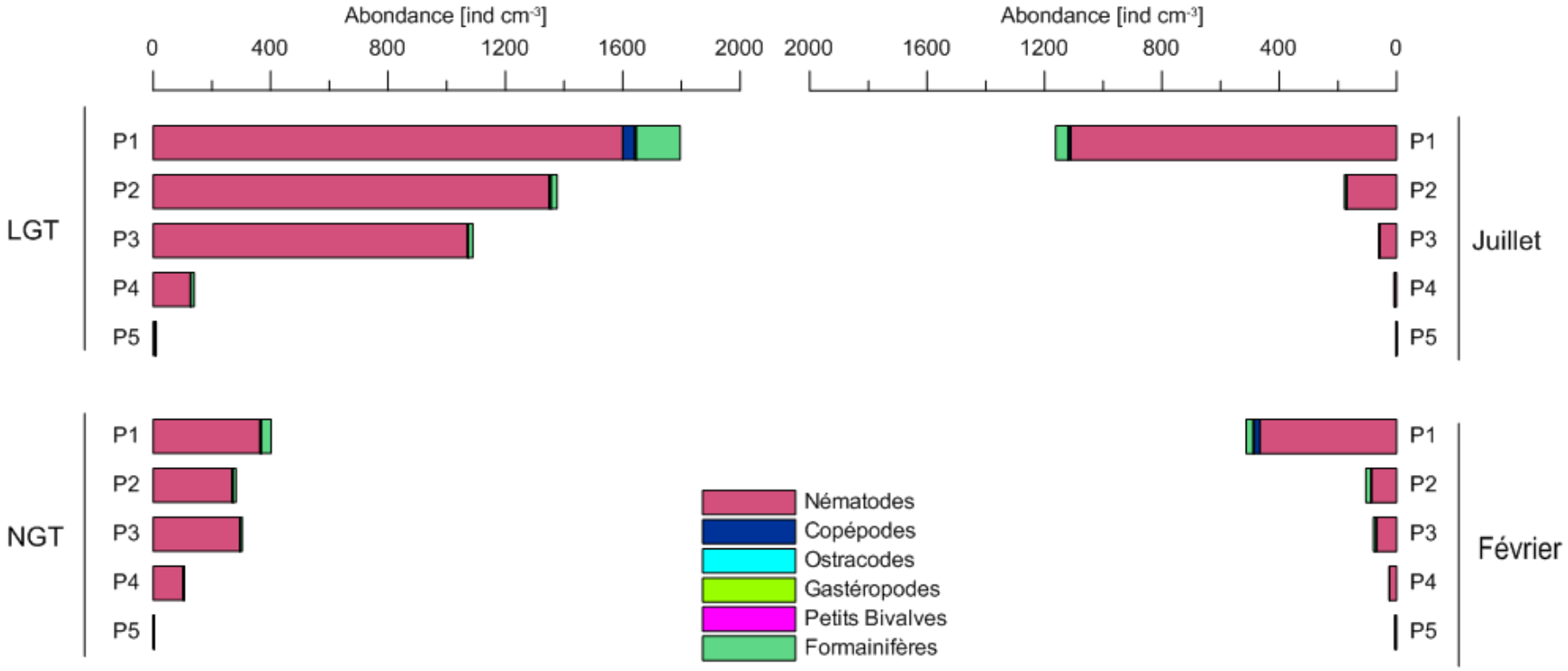


Figure 86. Distribution et diversité de la méiofaune benthique (abondance relative), *ex situ* de jour (LGT) et de nuit (NGT) et *in situ* en Février et en Juillet, suivant les 5 profondeurs de prélèvement (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm) dans un dispositif expérimental.

Table 30. Importance de la prédation par la méiofaune sur la production carbonée totale (primaire et secondaire bactérienne) dans les sédiments vaseux des mésocosmes

	Abondance	Taux prédation maximal par individu [a]	Taux de prédation maximal	Production primaire	Production bactérienne	Production C totale	Production perdue par prédation
	ind mL^{-1}	pg C ind^{-1} h^{-1}	ng C h^{-1} mL^{-1}	ng C h^{-1} mL^{-1}	ng C h^{-1} mL^{-1}	ng C h^{-1} mL^{-1}	
Nématodes							
LGT P1	1600,0	40	64,0	9491,4	1363,4	10854,9	0,6%
LGT P2	1348,3	40	53,9		959,3	959,3	5,6%
LGT P3	1070,9	40	42,8		946,0	946,0	4,5%
LGT P4	126,9	40	5,1		684,5	684,5	0,7%
LGT P5	6,6	40	0,3		626,2	626,2	0,0%
NGT P1	363,7	40	14,5		647,1	10138,5	2,2%
NGT P2	267,7	40	10,7		505,7	505,7	2,1%
NGT P3	294,4	40	11,8		451,9	451,9	2,6%
NGT P4	102,9	40	4,1		324,5	324,5	1,3%
NGT P5	2,6	40	0,1		250,6	250,6	0,0%
Foraminifères							
LGT P1	150,0	600	90,0	9491,4	1363,4	10854,9	0,8%
LGT P2	21,3	600	12,8		959,3	959,3	1,3%
LGT P3	15,3	600	9,2		946,0	946,0	1,0%
LGT P4	11,5	600	6,9		684,5	684,5	1,0%
LGT P5	3,3	600	2,0		626,2	626,2	0,3%
NGT P1	34,2	600	20,5		647,1	10138,5	3,2%
NGT P2	10,3	600	6,2		505,7	505,7	1,2%
NGT P3	7,0	600	4,2		451,9	451,9	0,9%
NGT P4	2,5	600	1,5		324,5	324,5	0,5%
NGT P5	0,2	600	0,1		250,6	250,6	0,0%

[a] selon Pascal *et al.* (2009)

1.4.3 Une réplicabilité satisfaisante

La réplicabilité est un des facteurs qui conditionne la robustesse des analyses. D'après des analyses de variances cherchant à évaluer l'influence des réplicats (ANOVA 1 facteur), il n'existe aucun effet des réplicats sur les paramètres descriptifs du système ($p > 0,05$, **Table 31**). Cela signifie que les différences entre les réplicats sont négligeables par rapport aux différences entre prélèvements.

Table 31. Paramètres et significativité des ANOVA un facteur révélant l'effet de la réplicabilité, pour chaque ANOVA, $n = 5$.

	LGT		**NGT**	
	F	*p value*	F	*p value*
L1				
Teneur en eau	0,03	0,968	0,05	0,953
Salinité	0,15	0,861	0,20	0,821
pH	0,13	0,879	0,16	0,858
ln (Chlorophylle a)	0,07	0,933	0,03	0,970
Phéopigments	0,04	0,958	0,02	0,981
Protéines	0,54	0,596	0,28	0,144
Abondances de procaryotes	0,14	0,874	0,02	0,976
L2				
Teneur en eau	0,02	0,981	0,05	0,956
Salinité	0,19	0,832	0,13	0,878
pH	0,34	0,722	0,18	0,838
ln (Chlorophylle a)	0,02	0,982	0,05	0,954
Phéopigments	0,02	0,984	0,03	0,967
Protéines	0,05	0,956	0,41	0,674
Abondances de procaryotes	0,12	0,886	0,05	0,951
L3				
Teneur en eau	0,12	0,885	0,01	0,992
Salinité	0,31	0,737	0,17	0,846
pH	0,02	0,982	0,14	0,870
ln (Chlorophylle a)	0,05	0,948	0,01	0,998
Phéopigments	0,06	0,938	0,00	1,000
Protéines	0,05	0,612	0,91	0,428
Abondances de procaryotes	0,25	0,782	0,21	0,875

1.5 Discussion

1.5.1 Améliorations méthodologiques

1.5.1.1 Améliorations apportées par ce travail

Ce travail présente un aspect innovant en recréant un mésocosme tidal issu d'une reconstitution par couches sédimentaires. En effet, de nombreux travaux menés sur la verticalité homogénéisent la colonne sédimentaire et la restructure aléatoirement dans leur dispositif (Michaud *et al.*, 2010). Dans cette étude, nous avons recherché à mimer au mieux les gradients identifiés lors des prélèvements de terrain et ce en prélevant, tamisant et restructurant toujours le sédiment vaseux couche par couche.

L'utilisation de l'eau du site de prélèvement pour l'alimentation des mésocosmes fut fastidieuse mais primordiale puisqu'elle évite l'appauvrissement en sels nutritifs du système et permet de mieux mimer les conditions *in situ*. Des tests préalables avaient été menés avec l'eau de mer disponible au laboratoire. Celle-ci s'était avérée trop pauvre en nitrites et en nitrates et ne permettait pas de reconstituer les gradients verticaux dans les sédiments. Cela changeait donc les processus s'y déroulant et aurait biaisé notre étude.

Les concentrations en sels nutritifs dans les mésocosmes étaient globalement proches des mesures *in situ* même si elles se rapprochaient de mesures hivernales. Il est possible que cette forte concentration en sels nutritifs puisse venir d'une période de stabulation trop courte qui n'aurait pas permis la remise en place totale des concentrations. Cependant, cette période ne pouvait pas être longue pour éviter de modifier trop largement la composition des communautés de procaryotes benthiques.

1.5.1.2 Points méthodologiques à améliorer

La concentration en chlorophylle *a* de la couche de surface apportée au système a été différente entre les deux dispositifs puisque ces derniers, pour des raisons pratiques, ont été ensemencés à des dates différentes. Il pourrait être important d'ensemencer chaque mésocosme avec la même concentration en chlorophylle *a*. Ceci demanderait alors de pouvoir mesurer en temps réel la concentration en chlorophylle dans le sédiment. La chlorophylle *a* peut-être dosée après extraction d'une nuit dans l'acétone, ce protocole ne permet donc pas une mesure immédiate de la chlorophylle. Récemment, une corrélation robuste a été trouvée entre la quantité de chlorophylle dosée après extraction et celle estimée par le F_s (fluorescence

de base sur un échantillon non adapté à l'obscurité) obtenu en fluorimétrie (imaging-PAM) (A. Barnett, com.pers.). Cette technique pourrait résoudre le problème et permettre une quantification rapide de la biomasse de chlorophylle *a*. Cependant, la fluorimétrie est sensible à la granulométrie du sédiment et nécessite de réaliser des tests préliminaires afin de paramétrer la mesure.

Par ailleurs, dans notre étude, la température extérieure n'a pas été totalement contrôlée. Les mésocosmes étaient placés dans une salle non thermo-régulée (température de la salle non mesurée) et recouverts d'une bâche noire afin de contrôler précisément la lumière. Cette bâche entraîne une diminution de l'aération du mésocosme et donc une augmentation de la température au sein du mésocosme lorsque les néons sont allumés (température ambiante = 31°C de jour et 20°C de nuit). Il aurait donc pu être intéressant de pouvoir réguler la température ambiante afin de pouvoir recréer éventuellement des conditions hivernales. Dans notre laboratoire, cela n'aurait, en revanche, pas été possible puisqu'aucune chambre thermostatée n'est assez grande pour accueillir les 4 bacs de 1 000 L qui ont été nécessaires à notre étude.

Enfin, des rampes de néons ont été utilisées pour éclairer le mésocosme. Il était donc nécessaire lors de chaque prélèvement, de retirer la rampe afin de récupérer une carotte de sédiment. Ceci pourrait avoir un impact sur les autres carottes présentes dans le mésocosme. Particulièrement lors des prélèvements sur le mésocosme de nuit puisqu'il faisait jour dans la salle de prélèvement. Le mésocosme a été laissé ouvert à chaque prélèvement pendant environ 5 à 10 minutes. Il pourrait être envisageable de placer cette rampe de néons plus haut sur un support, mais l'irradiance en serait diminuée drastiquement et ne permettrait pas des conditions optimales pour la croissance des diatomées. Cette rampe pourrait donc être allégée et installée sur un dispositif spécifique permettant de la faire remonter mécaniquement lors des prélèvements dans le mésocosme.

1.5.2 Représentativité

Les paramètres descriptifs tels que la température, la teneur en eau, le pH et la salinité confirment la représentativité des dispositifs *ex situ* utilisés. Néanmoins, quelques paramètres diffèrent nettement avec les gammes de valeurs enregistrées sur le terrain. D'abord, la biomasse chlorophyllienne de surface était très élevée dans les mésocosmes. Ceci était dû notamment à une concentration initiale d'ensemencement plus élevée que dans le milieu naturel qui est nécessaire pour un développement optimal du biofilm en laboratoire. Ceci est également certainement dû aux conditions plus stables de température et de lumière dans les mésocosmes, favorables à la multiplication des algues et donc à une augmentation de la biomasse en chlorophylle *a* (Underwood and Kromkamp, 1999). Et, l'absence d'hydrobies, principaux brouteurs du biofilm a contribué à cette augmentation de la biomasse microphytobenthique. Cette absence de prédation et ces conditions favorables au développement ont aussi été propices aux procaryotes qui étaient plus de deux fois plus nombreux que sur le terrain. Dans les mésocosmes, les procaryotes étaient significativement moins abondants de jour lorsque les pressions de prédations étaient les plus fortes. Ceci est en adéquation avec une plus forte prédation de la méiofaune sur les procaryotes dans le mésocosme de jour. Enfin, il est important de remarquer que la méiofaune pourrait avoir un rôle de bioturbateur dans notre étude (Passarelli *et al.*, 2014).

Un plus fort ratio C:N a été observé dans les mésocosmes par rapport aux données *in situ*. Ce résultat reste néanmoins à nuancer puisque dans notre cas, quel que soit le prélèvement (c'est-à-dire *ex situ* ou *in situ*), les valeurs de ce ratio sont toujours faibles et indique une matière riche en azote et labile. On peut tout de même se demander si cette augmentation du ratio C:N aura un impact sur la production bactérienne et l'hydrolyse de la matière organique.

Les profils de nutriments étaient très bien établis et ce résultat est extrêmement important pour la mesure des processus liés au cycle de l'azote. Dans cette étude, la reconstitution des carottes de sédiment par couche et l'approvisionnement du système expérimental en eau du milieu a permis de conserver les profils de sels nutritifs équivalents à ceux du terrain.

Les analyses statistiques ont montré que les paramètres descriptifs étaient comparables entre les deux mésocosmes. Cependant, quelques différences existent pour certains paramètres comme la salinité (Δ= 0,47) ou le pH (Δ= 0,15) qui étaient significativement différents entre les deux mésocosmes. Le pH affecte les communautés microbiennes notamment les bactéries

du sol pour lesquelles un pH < 5,5 diminuerait leur multiplication et leur colonisation (Chamier, 1987). Dans une étude plus récente, la diversité et l'abondance relative des bactéries du sol seraient positivement corrélées au pH (entre 4 et 8) (Rousk *et al.*, 2010). La salinité impacte également les communautés de procaryotes benthiques notamment en diminuant la quantité d'ammonium utilisable pour la nitrification (Seitzinger *et al.*, 1991). Dans les deux cas, les études présentent une influence sur les communautés pour des gammes de valeurs larges (entre 4 et 8 pour le pH et entre 35 et 0 pour la salinité) suggérant donc une importance modérée de ces variations de paramètres sur les communautés dans notre étude. Enfin, la biomasse de chlorophylle *a* lors de l'ensemencement différait entre les deux mésocosmes ce qui pourrait avoir modifié le fonctionnement de l'écosystème. Tout comme les paramètres discutés précédemment, les conséquences dépendent des gammes de valeurs considérées. Dans notre étude, la biomasse en chlorophylle *a* en surface était 1,7 fois plus importante de jour ce qui pourrait avoir des conséquences sur le fonctionnement écologique du système. Néanmoins, l'impact majeur pourrait être dû à une plus forte production primaire dans le mésocosme de jour. Ceci n'aura donc que peu d'influence puisque le mésocosme de nuit étudie les phénomènes de nuit donc sans photosynthèse et donc sans production primaire. Enfin, la variance entre les réplicats était faible et ne révèle aucun effet significatif de ces réplicats sur les paramètres considérés. Il semblerait donc que nos mesures soient robustes et que cela valide notre étude.

1.5.3 L'effet « confinement »

L'impact de la taille des mésocosmes de cette étude n'a pas été mesuré. Pour cela, il aurait fallu développer différents bacs de taille et de formes différentes et répéter les manipulations dans chacun de ces systèmes (Petersen *et al.*, 2003). L'intérêt, ici n'est pas d'extrapoler directement nos conclusions au milieu naturel et il est évident que la manipulation des sédiments, malgré nos précautions, reste un biais. Notamment, les communautés de procaryotes ont un temps de génération court et ont donc dû évoluer entre les prélèvements initiaux sur le terrain et ceux en mésocosmes. Mais le but de ce dispositif reste de comparer deux situations, de jour et de nuit afin de comprendre si l'activité des procaryotes est modifiée par la migration et l'activité des algues microphytobenthiques. Agogué *et al.* (2014), ont montré que ce système était un outil fiable pour l'étude des dynamiques de procaryotes dans le sédiment vaseux. Nous apportons dans le présent travail, une dimension verticale prouvant qu'il est également possible d'étudier les communautés jusqu'à 10 cm de profondeur.

Ainsi, nous avons œuvré à développer un mésocosme assez grand pour 1) éviter l'effet « enceinte », 2) de taille raisonnable concernant la quantité de vase à collecter et la mise en place au laboratoire et 3) permettant d'accueillir le nombre suffisant de carottes nécessaires pour les prélèvements. De plus, tous les paramètres descriptifs suivaient des profils similaires lors des prélèvements *in situ* et *ex situ*. Ainsi, le dispositif mis en place a permis de recréer un écosystème vasière et va permettre de mieux comprendre le fonctionnement écologique des procaryotes dans des sédiments intertidaux et leurs fonctions dans le cycle de l'azote.

Chapitre 2. Effet du temps d'émersion au cours d'une marée basse de jour et de nuit sur les communautés procaryotes benthiques

2.1 Contexte de l'étude

Les organismes benthiques sont soumis à de nombreuses pressions tidales entraînant sans cesse des périodes d'immersion/émersion. Couplé à ce cycle, le cycle nycthéméral (alternance jour/nuit) ajoute une dimension de complexité au système et donc multiplie les forçages appliquées aux communautés vivant dans le sédiment.

Dans la littérature, les études se concentrent généralement sur l'analyse des sédiments à marée basse de jour ; et faible est le nombre d'articles explorant les processus benthiques de nuit (Friend *et al.*, 2003; Friend *et al.*, 2005; Tolhurst, 2009). Or, les communautés sont confrontées régulièrement à ces conditions de marées basses nocturnes pendant lesquelles la photosynthèse n'est pas réalisée et où le système doit donc fonctionner de façon différente. En effet, il est supposé qu'en absence de photosynthèse, la pénétration de l'oxygène dans le sédiment soit diminuée du fait de l'absence de production d'oxygène. De plus, les algues utiliseraient l'énergie accumulée lors de la phase diurne sous forme de composés à fort pouvoir réducteur (NADPH) et d'énergie (ATP) afin de produire les molécules nécessaires à leur croissance et leur multiplication (Falkowski and Raven, 1997). Un découplage a été suggéré entre les périodes de photosynthèse et les périodes de croissance chez les diatomées (Saburova and Polikarpov, 2003). Celles-ci stockeraient donc l'énergie lumineuse pendant la phase de photosynthèse puis l'utiliserait soit lors de la migration soit lors de période sans lumière pour leur métabolisme. Ces périodes nocturnes sont peu étudiées car il est difficile d'accéder à la vasière la nuit et de réaliser les mesures et prélèvements nécessaires pour des questions de sécurité et de logistique (Friend *et al.*, 2003).

De plus, dans les systèmes côtiers, les apports en nutriments et en matière sédimentaire sont importants et la présence de bioturbateurs peut irriguer le sédiment plus en profondeur par ces composés sédimentaires et autres composés oxygénés (Michaud *et al.*, 2010). Ces organismes bioturbateurs auraient donc un impact marqué sur le métabolisme des micro-organismes et donc sur les cycles biogéochimiques. En particulier, le cycle de l'azote peut être affecté par les bioturbateurs dans les sédiments (Laverock *et al.*, 2011) qui modifient la diversité, la fonction et l'activité des procaryotes benthiques (Laverock *et al.*, 2014) via la formation de micro-niches. Finalement, l'hydrodynamisme et donc la remise en suspension aurait un rôle sur les communautés actives de procaryotes. Cette remise en suspension dynamiserait et donc complexifierait les conditions environnementales à fine échelle et les processus benthiques (Mallet *et al.*, 2014).

Afin de mieux comprendre les processus inhérents aux vasières intertidales, il est nécessaire de simplifier ce système en éliminant les bioturbateurs ou certains paramètres qui complexifient le système. Dans notre étude, la mise en place d'un mésocosme s'est avérée indispensable car celui-ci va permettre l'investigation de processus microbiens à fines échelles (temps et profondeurs), en éliminant la bioturbation et l'hydrodynamisme, et dans des conditions impossibles à échantillonner sur le terrain : la nuit.

Les chapitres de la partie précédente ont suggéré l'importance d'étudier non pas l'abondance des gènes fonctionnels mais surtout l'expression de ces gènes afin de quantifier la réalisation (ou du moins un fort potentiel de réalisation) des processus impliqués dans le cycle de l'azote. Le premier chapitre de cette partie a permis de valider le dispositif expérimental développé. Il va donc être utilisé afin d'étudier plus finement et en conditions semi-contrôlées, les communautés de procaryotes peuplant les vasières intertidales.

Les objectifs de ce chapitre sont donc :

1) de comprendre la structuration des procaryotes en réponse à des facteurs biotiques et abiotiques sans bioturbateurs, avec peu de remise en suspension et sous conditions semi-contrôlées (cycle tidal, lumière),

2) de comprendre comment la photosynthèse réalisée par le microphytobenthos modifie les activités procaryotiques impliquées dans le cycle de l'azote,

3) analyser le fonctionnement biologique du cycle de l'azote au cours d'une marée basse.

Les prélèvements et le conditionnement étant facilités lors d'études en laboratoire, cette expérimentation va permettre de travailler sur l'activité et l'expression des gènes plutôt que sur leur abondance. Ces activités sont suspectées d'être modifiées au cours de la marée où les nutriments sont consommés par le microphytobenthos. Une approche dynamique a donc à nouveau été menée en réalisant les expérimentations à 3 temps d'émersion différents.

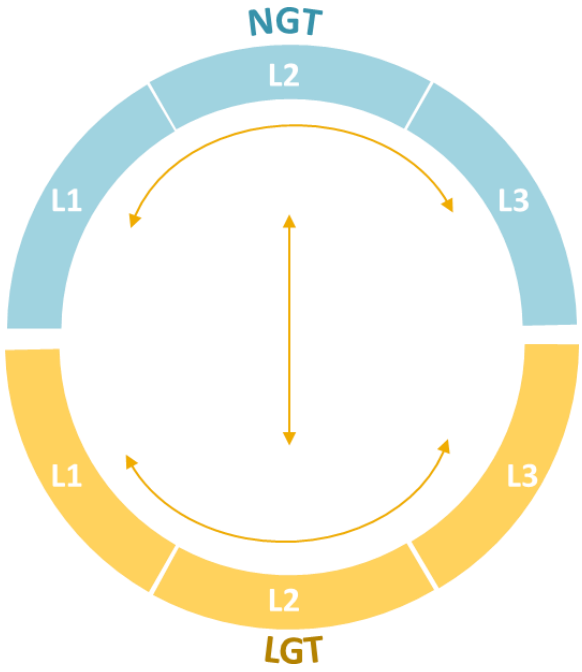


Figure 87. Stratégie d'échantillonnage considérée dans ce chapitre. Il est ici question de comparer les processus de jour (LGT) et de nuit (NGT), et ce à 3 moments de marées, en début (L1), milieu (L2) et fin, de marée basse (L3).

NB : Certaines données sont manquantes dans ce chapitre. Tout d'abord, dû à un problème technique (panne de courant, décongélation des échantillons), les échantillons prélevés en vue de mesurer les activités enzymatiques de nuit (NGT) ont été perdus. De plus, l'étude de l'expression des gènes fonctionnels demandant de nombreux ajustements, 3 gènes n'ont pas été traités faute de temps : *nirK*, *amoA* bactérien et *nosZ* (**Table 32**).

Table 32. Tableau récapitulatif des paramètres considérés dans le cas des mésocosmes, ● = paramètres utilisés dans ce chapitre

Paramètres	**LGT L1**	**LGT L2**	**LGT L3**	**NGT L1**	**NGT L2**	**NGT L3**
Irradiance	●	●	●	●	●	●
Température extérieure	●	●	●	●	●	●
Température sédiment	●	●	●	●	●	●
pH	●	●	●	●	●	●
Salinité	●	●	●	●	●	●
Teneur en eau	●	●	●	●	●	●
Granulométrie	--------	●	--------- -	---------- -	●	---------- -
COP/NOP	●	●	●	●	●	●
Chlorophylle *a*	●	●	●	●	●	●
Sels nutritifs	●	●	●	●	●	●
EPS	●	●	●	●	●	●
Protéines totales	●	●	●	●	●	●
Méiofaune						
Macrofaune						
Production bactérienne	●	●	●	●	●	●
Activités enzymatiques	●	●	●			
Abondance procaryotes	●	●	●	●	●	●
Gènes fonctionnels (ADN)						
amoA bactérien						
amoA archéen						
nirS						
nirK						
nosZ						
anammox*						
Gènes fonctionnels actifs (ADNc)						
amoA bactérien						
amoA archéen	●	●	●	●	●	●
nirS	●	●	●	●	●	●
nirK						
nosZ						
anammox*	●	●	●	●	●	●
Abondance bactéries (gène 16S ARNr)						
Abondance archées (gène 16S ARNr)						
Diversité bactérienne totale (gène 16S ARNr)						
Diversité archéenne totale (gène 16S ARNr)						
Diversité bactérienne active (16S ARNr)		●			●	
Diversité archéenne active (16S ARNr)		●			●	

*16S rRNA *Planctomycetes*

2.2 Résultats

2.2.1 Evolution des profils des paramètres abiotiques et biotiques

2.2.1.1 De faibles changements suivant le temps d'émersion

Comme remarqué dans le chapitre précédent, la température du sédiment était supérieure à marée basse de jour. La **Figure 88**, montre que ces valeurs de températures étaient stables de nuit quel que soit le temps d'émersion (20,3 °±0,1C). En revanche, de jour, les valeurs étaient plus variables surtout en surface (P1) où la température passait de 24,7°C en début de marée (L1), à 27,1°C en milieu de marée basse (L2) pour diminuer ensuite à 21,6° C en fin de marée basse (L3). La salinité était relativement stable par rapport aux valeurs enregistrées sur le terrain avec une salinité moyenne à 31. Malgré cela, des différences significatives ont été observées notamment différenciant les couches P1, P2 et P3 des couches profondes P4 et P5 (**Table 33**, test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,001). Les profils montrent une augmentation de la salinité de surface (P1) de jour entre le début (28,9 ±0,04) et le milieu (32,9 ±0,14) de marée basse. Le pH suivait des profils extrêmement similaires entre jour et nuit (**Figure 88**) avec des valeurs maximales en surface qui décroissent puis ré-augmentent après 5 cm *bsf*. Une « anomalie » dans ces profils a été notée entre 5 et 10 cm *bsf* de jour où la valeur en début de marée était basse par rapport aux valeurs attendues (6,6 ±0,02). La biomasse chlorophyllienne était exponentiellement décroissante avec la profondeur et significativement plus élevée en P1 de jour (173,6 ±20,8 µg g^{-1} PS) que de nuit (90,08 ±4,2 µg g^{-1} PS) (**Table 33**, test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,001).

Quel que soit le mésocosme considéré, les valeurs du ratio C:N particulaire étaient inférieures à 8 et variaient de 6,31 à 8,12. Comme de nombreux paramètres (**Table 33**), les valeurs apparaissaient significativement différentes entre les profondeurs, les moments de marée basse et les deux mésocosmes (de jour et de nuit). La porosité n'était pas significativement influencée par les conditions et le temps d'émersion mais variait selon la profondeur. Cette porosité était statistiquement similaire au niveau des couches de surface (de 0 à 2 cm *bsf*), puis différente plus en profondeur (**Table 33**, test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,001). Enfin, les protéines totales qui n'avaient pas montré de profils particuliers lors des campagnes de terrain montrent ici des profils marqués surtout de jour. En particulier, une consommation de près de 8 mg de protéines par g de sédiment sec a été observée, de jour, au cours la marée basse.

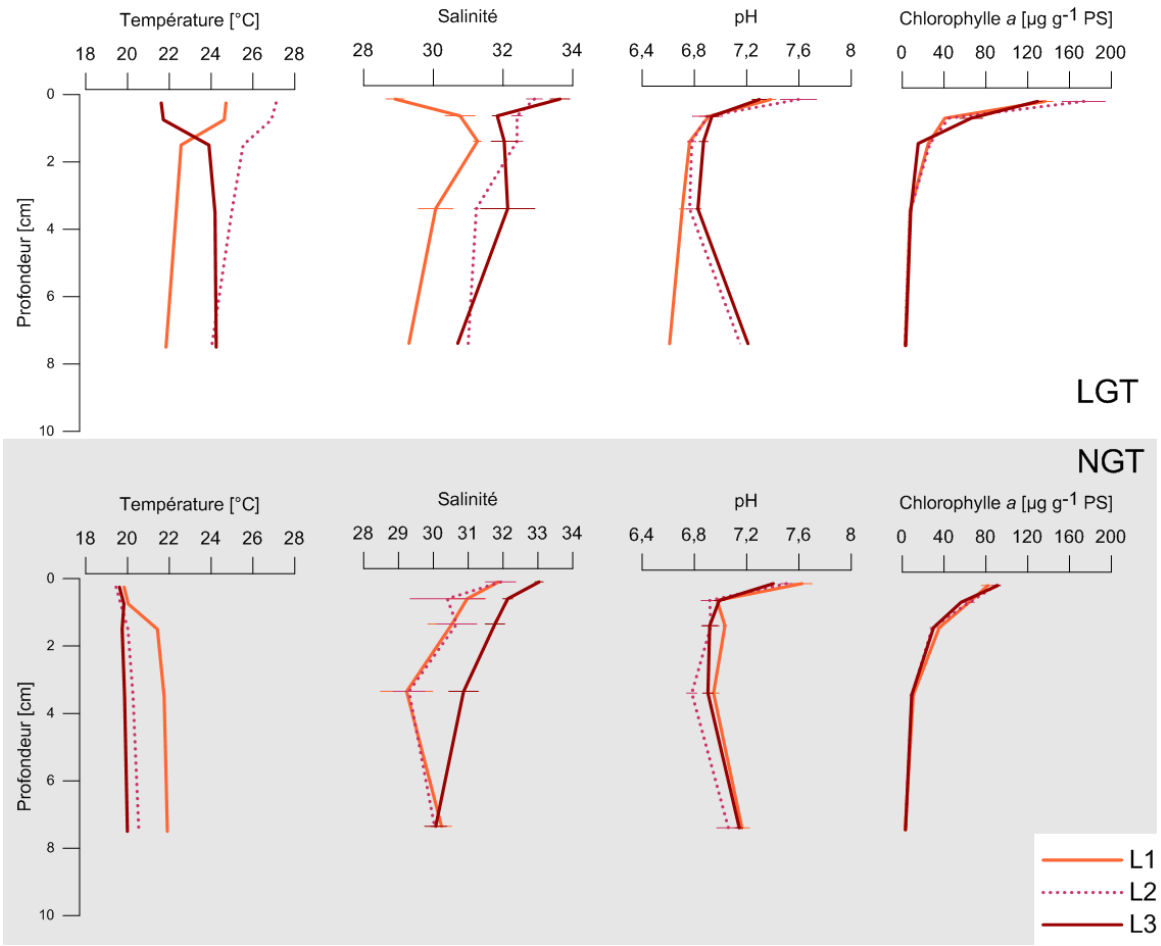


Figure 88. Profils des paramètres physico-chimiques et biotiques du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse

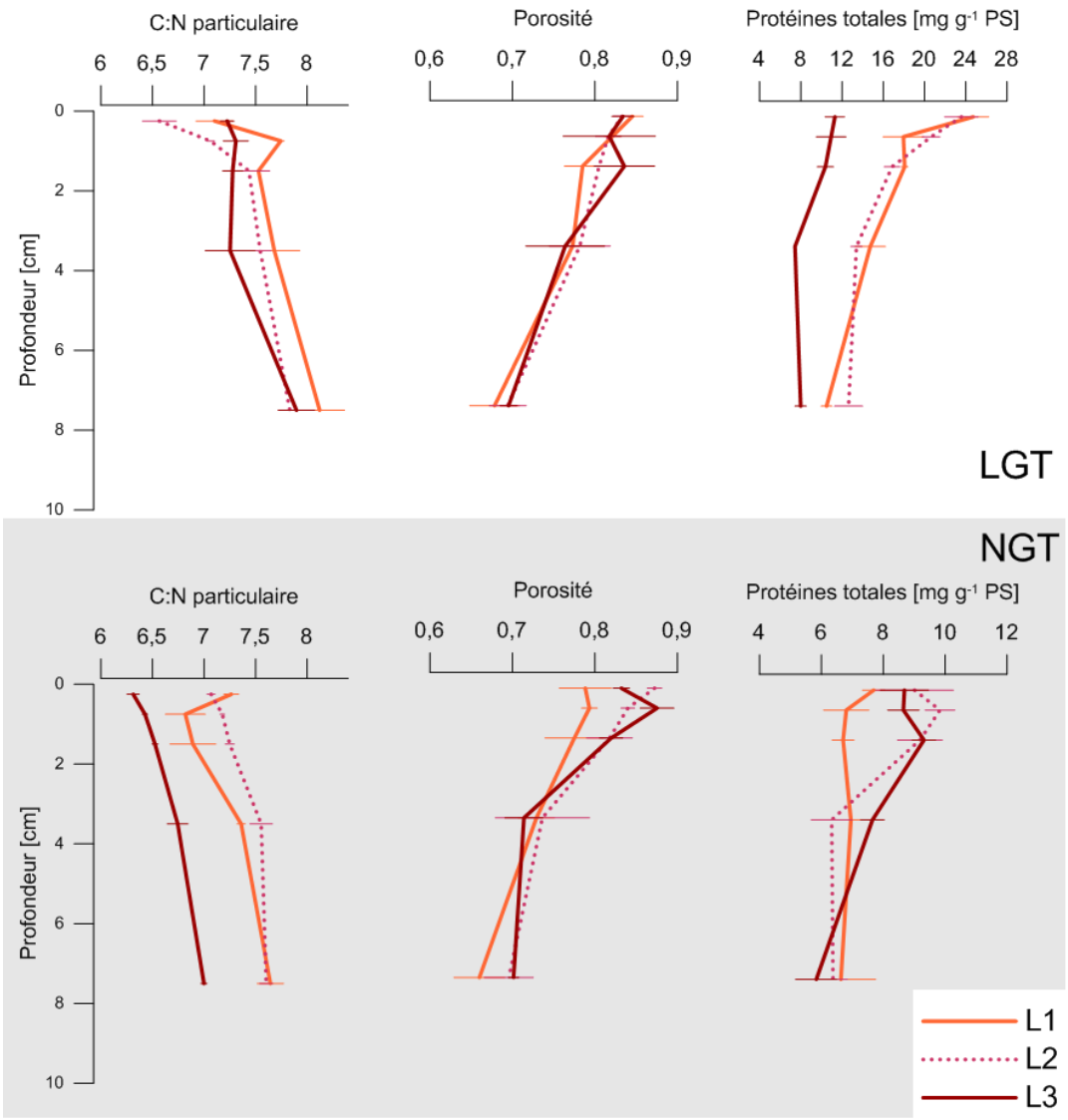


Figure 89. Profils des paramètres physico-chimiques du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse. NB : l'échelle est differente de jour et de nuit pour les protéines totales

Table 33. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées sur les valeurs brutes des différents paramètres mesurés.

							Interactions							
	Mésocosme		Moment		Profondeur		Mésocosme:Moment		Mésocosme:profondeur		Moment:profondeur		Méso:Mom:prof	
	F		F		F		F		F		F		F	
Salinité[a]	12,10	***	34,66	***	25,66	***	17,35	***	4,57	**	230,00	*	2,08	
pH	28,37	***	1,29		135,24	***	18,32	***	0,91		5,98	***	3,37	**
Chlorophylle *a* (ln(x))	2,39		0,20		1017,13	***	0,62		13,49	***	2,16	*	2,13	*
C:N	69,12	***	27,88	***	30,04	***	25,69	***	3,92	**	1,57		2,13	*
Porosité	0,79		2,75		32,48	***	1,42		1,15		0,47		0,46	
Protéines tot	424,34	***	51,18	***	38,00	***	64,36	***	14,24	***	3,15	**	3,31	**
EPS gC	5,60	*	27,23	***	43,48	***	42,46	***	0,31		3,96	***	2,96	**
EPS gL	32,79	***	0,87		19,38	***	6,95	**	10,28	***	4,24	***	7,97	***
EPS pC	20,90	***	33,33	***	33,49	***	94,14	***	8,27	***	4,91	***	5,00	***
EPS pL	0,12		10,69	***	6,45	***	66,13	***	5,89	***	6,41	***	4,79	***
Abondance procaryotes (ln(x))	153,56	***	58,38	***	373,07	***	7,22	**	1,96		4,80	***	1,34	
Production bactérienne	227,65	***	4,19	*	129,88	***	3,69	*	2,42		2,52	*	3,09	**

Codes : < 0,001 = ***; < 0,01 = ** ; < 0,05 = *

[a]résidus de l'ANOVA non normaux, Analyse de variance non paramétrique (Scheirer-Ray-Hare, Dytham (2011))

EPS = substances exopolymériques, g = glucidiques, p = protéiques, C = colloïdaux, L = liés

2.2.1.2 Une forte consommation de nitrates au cours d'une marée basse de jour

De façon analogue à ce qui avait été observé sur le terrain, les nitrites étaient maintenus à des concentrations relativement faibles entre 0,4 et 7,79 µM. Les profils d'ammonium évoluaient peu au cours de l'émersion, mais il semblait y avoir une forte production de jour en milieu de marée (L2, en P3) où la concentration en ammonium s'élevait à 321,02 µM, soit près de deux fois plus qu'en début (172,29 µM) ou fin (156,96 µM) de marée basse. A marée basse de nuit, les concentrations en nitrates étaient faibles en début de marée (2,25 µM) et le profil montrait des évolutions légères notamment en P3 au cours de la marée avec une évolution positive (production supérieure à la consommation) de nitrates de 5 µM. En revanche, une particularité a été enregistrée concernant les concentrations en nitrates en début de marée basse de jour. En effet, les concentrations moyennes s'élevaient à 140,3 µM. Il semblerait qu'au cours de la marée basse, la presque totalité de ce nitrate soit consommé et les concentrations atteignent 4,22 µM en fin de marée basse de jour. Les valeurs de phosphates s'étendaient de 2,76 µM à 22,44 µM de jour et de 2,85 µM à 45,24 µM de nuit.

2.2.1.3 Des procaryotes plus nombreux la nuit mais moins actifs

Les profils concernant les paramètres de procaryotes suivent tous une décroissance avec la profondeur. Ainsi, les procaryotes sont plus abondants en surface (3,32 $x10^{10}$ cellules g^{-1} PS) qu'en profondeur (0,73 $x10^{10}$ cellules g^{-1} PS) et ce quel que soit le moment de marée basse. Les procaryotes étaient plus abondants la nuit (2,4 ±0,17 $x10^{10}$ cellules g^{-1} PS) que le jour (1,72 ±0,13 $x10^{10}$ cellules g^{-1} PS) mais près de deux fois plus productifs le jour (154,29 ±13,38 nmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1} PS) que la nuit (72,7 ±6,20 nmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1} PS). De jour, la production bactérienne était plus faible en surface (P1) en début de marée basse (209,46 ±32,12 nmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1} PS) et devenait plus intense (330,60 ±4,6 nmol ^{3}H-Thy h^{-1} g^{-1} PS) en milieu de marée basse. A l'inverse, l'activité aminopeptidase de jour en surface (P1) diminuait entre le début de marée (1798,01 ±203,42 nmol h^{-1} g^{-1} PS) et le milieu de marée basse (848,81 ±110,49 nmol h^{-1} g^{-1} PS). Cette activité de dégradation des protéines chutait rapidement dès 0,5 cm de profondeur et se stabilisait à des valeurs inférieures 100 nmol h^{-1} g^{-1}PS après 2 cm de profondeur. De façon intéressante, l'activité β-glucosidase présentait un profil similaire à celle de l'aminopeptidase en début et milieu de marée (**Figure 91**) avec des valeurs allant de 30,57 ±7,2 nmol h^{-1} g^{-1} PS (en P1) à 27,9 ±2,03 nmol h^{-1} g^{-1} PS (en P5), mais ces activités diminuaient nettement en fin de marée basse ne dépassant pas 19,65 ±1,08 nmol h^{-1} g^{-1} PS.

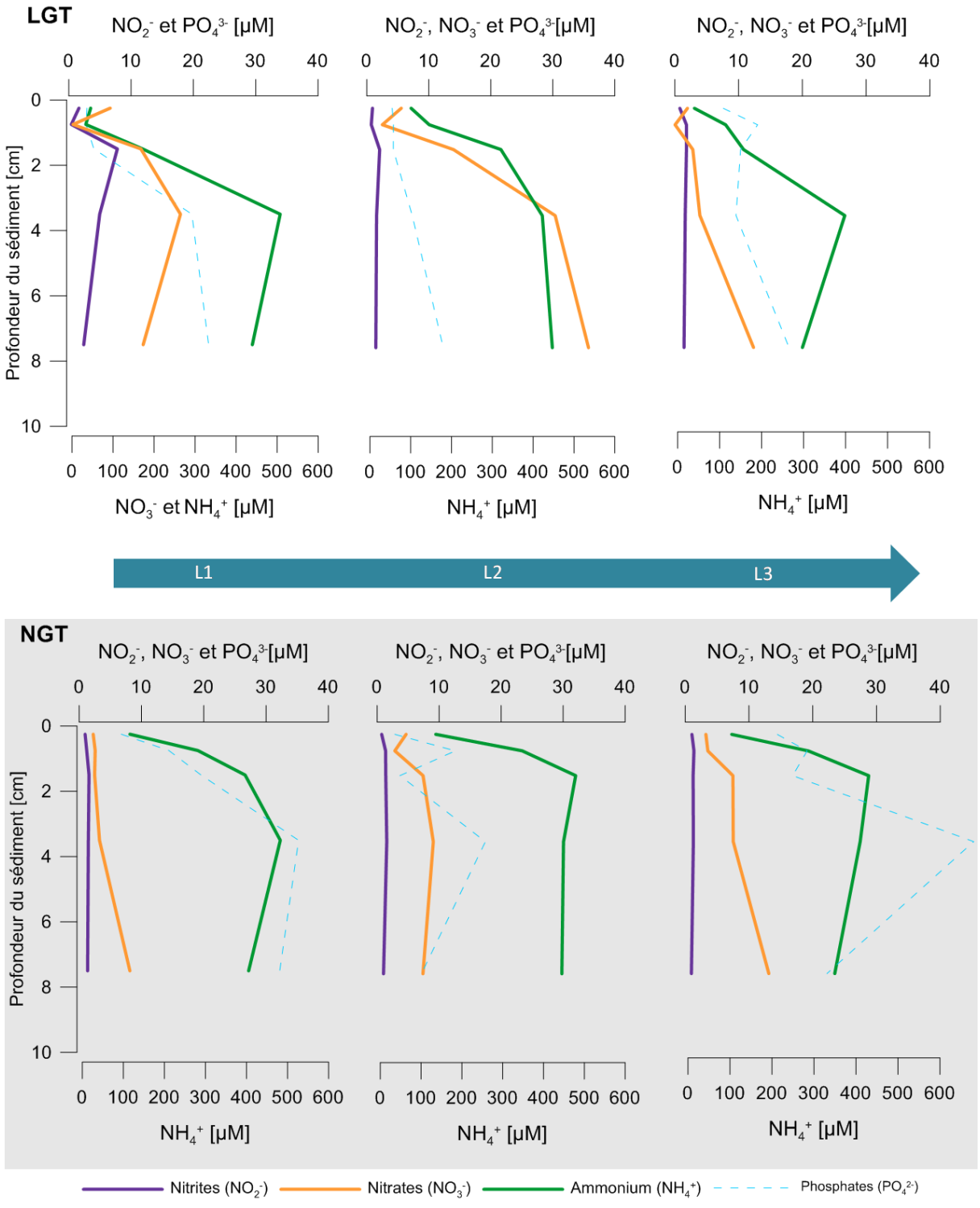


Figure 90. Profils des nutriments dans l'eau interstitielle des sédiments issus des mésocosmes de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée) au cours d'une marée basse (L1 = début, L2 = milieu et L3 = fin, de gauche à droite). NB : en L1, de jour (LGT, profils en haut à gauche), les concentrations en nitrates (en orange) sont à lire sur l'axe de l'ammonium.

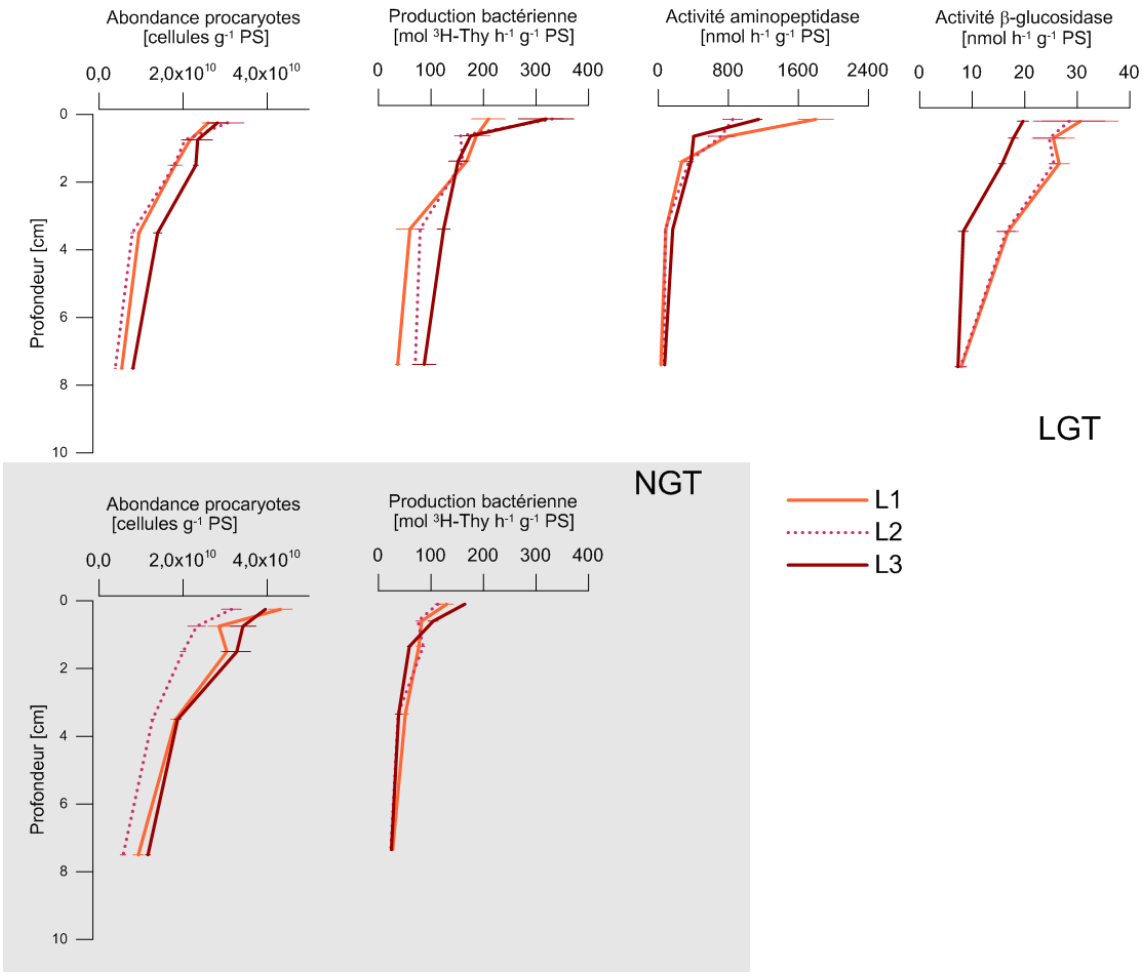


Figure 91. Profils des paramètres liés au procaryotes benthiques du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse. Comme précisé dans le § 2.1, les activités exo-enzymatiques n'ont pu être mesurées la nuit (NGT).

2.2.1.4 La dynamique des EPS de jour et de nuit

La dynamique des EPS était très différente de jour et de nuit (**Figure 92**). De nuit, en début de marée, les EPS protéiques liés et colloïdaux étaient particulièrement élevés avec des valeurs moyennes de 866,12 ±110,9 µg EPS protéiques colloïdaux g^{-1} PS et 366,65 ±62,7 µg EPS protéiques liés g^{-1} PS, soit environ 3 fois plus que le jour. Ces valeurs sont particulièrement élevées en début de marée avec jusqu'à 1231,10 ±397,2 µg EPS protéiques colloïdaux g^{-1} PS et 669,96 ±44,5 µg EPS protéiques liés g^{-1} PS. De jour, les valeurs d'EPS protéiques colloïdaux étaient plus faibles que de nuit, de dépassant pas 560 µg g^{-1} PS. Les profils montraient des valeurs maximales en surface (555,81 ±16,27 µg g^{-1} PS entre 0,5 et 1 cm) et minimales en profondeur (130,75 ±11,94 µg g^{-1} PS entre 5 et 10 cm). De jour, les EPS protéiques liés présentaient un pic de concentration entre 0,5 et 1 cm de profondeur en fin de marée basse (775,83 ±63,55 µg g^{-1} PS).

De nuit, des profils similaires d'EPS glucidiques colloïdaux ont été observés en début et en fin de marée avec un pic de concentration entre 0,5 et 1 cm de profondeur en début de marée et entre 1 et 2 cm de profondeur en fin de marée basse à 75,05 ±2,40 µg g^{-1} PS et 42,71 ±1,29 µg g^{-1} PS respectivement. De jour, les profils montraient également des concentrations en EPS glucidiques colloïdaux maximales entre 0,5 et 2 cm de profondeur quel que soit le moment de marée. La valeur forte entre 2 et 5 cm de profondeur en début de marée n'est due qu'à une concentration très forte dans un des trois réplicats. Les EPS glucidiques liés ne montraient des variations qu'en milieu de marée. De jour, en milieu de marée, la concentration augmentait en surface (0,5-1 cm) passant de 81 µg g^{-1} PS en moyenne (début et fin de marée) à 185,26 ±45,16 µg g^{-1} PS en milieu de marée. De nuit, une augmentation était visible également entre 1 et 2 cm de profondeur avec des valeurs atteignant 76,21 ±38,08 µg g^{-1} PS.

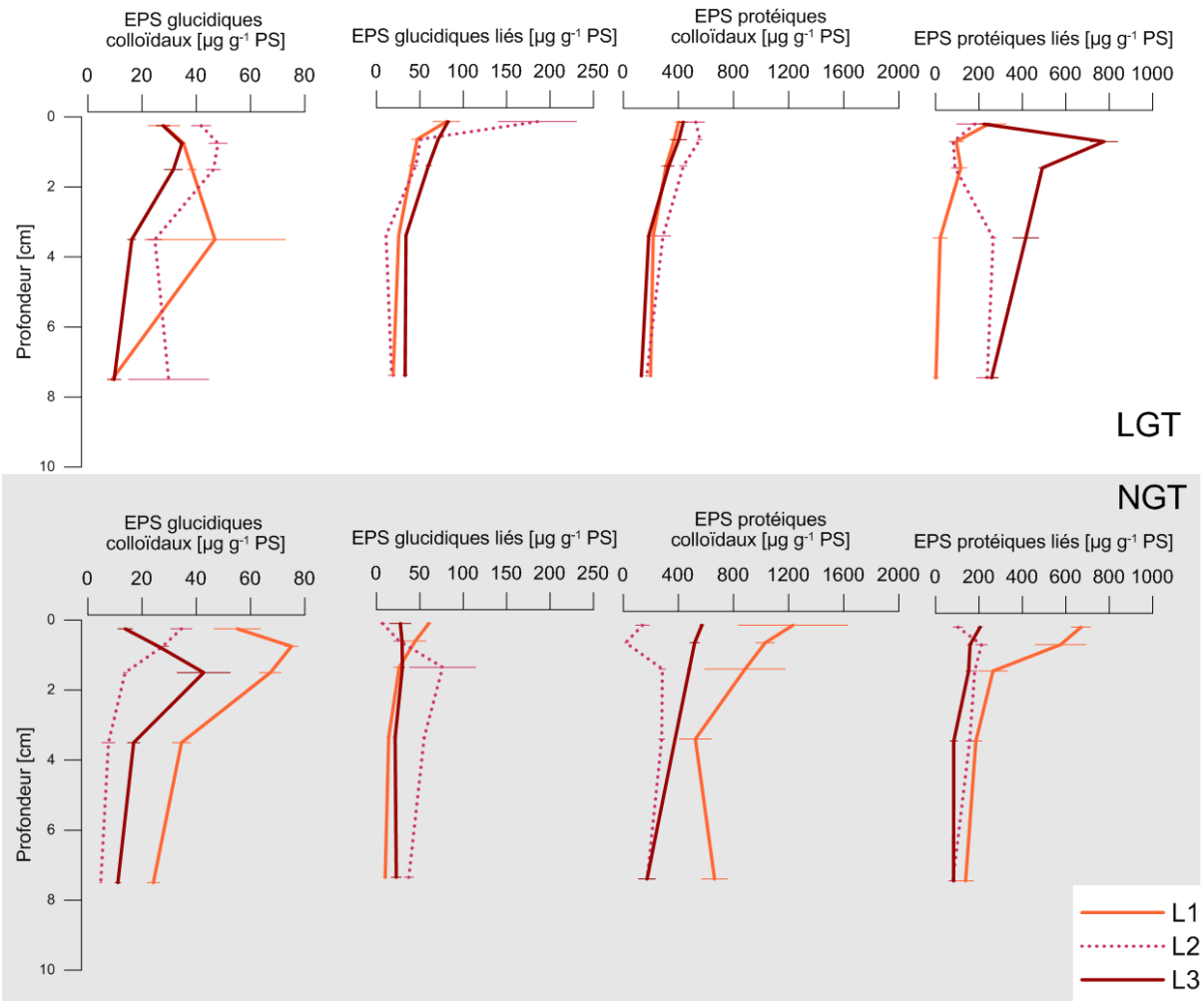


Figure 92. Profils des concentrations en EPS glucidiques et protéiques liés ou colloïdaux du sédiment de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), en début (L1), milieu (L2) et fin (L3) de marée basse.

2.2.2 Variation des expressions de gènes fonctionnels

2.2.2.1 Une forte diminution de l'expression des gènes du cycle de l'azote de nuit

L'expression de chaque gène fonctionnel a été moyennée suivant les deux conditions (n = 45, 3 moments de prélèvements à marée basse, 5 profondeurs en triplicats): jour (LGT) et nuit (NGT) (**Figure 93**). En moyenne, l'abondance des transcrits d'*amoA* archéens variaient de 4,02 ±0,61 x10^4 transcrits g^{-1} PS de jour à 2,45 ±0,41 x10^4 transcrits g^{-1} PS de nuit. Le gène *nirS* présentait des abondances de transcrits entre 1,71 ±0,41 x10^4 transcrits g^{-1} PS de jour et 0,51 ±0,11 x10^4 transcrits g^{-1} PS de nuit. Enfin, le gène proxy de la réaction d'anammox était le plus exprimé avec 14,7 ±1,25 x10^6 transcrits g^{-1} PS de jour et 7,32 ±0,82 x10^6 transcrits g^{-1} PS de nuit. Les expressions de ces gènes étaient significativement plus élevées de jour que de nuit dans le cas du gène *nirS* (ANOVA 2 facteurs, $p < 0,05$) et de l'anammox (ANOVA 2 facteurs, $p < 0,01$). En revanche, la différence observée de l'abondance des transcrits d'*amoA* archéens n'était pas significative, due à une plus forte variabilité entre les profondeurs et les moments de marée basse (ANOVA 2 facteurs, F = 2,617, $p = 0,11$).

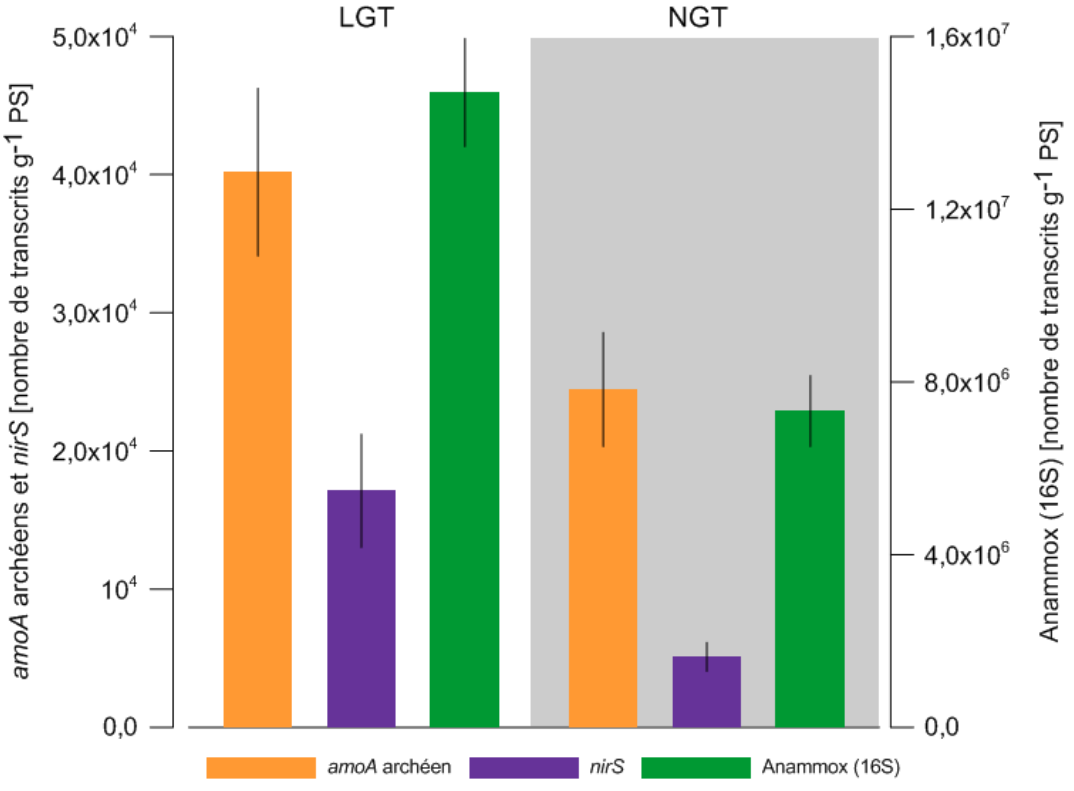


Figure 93. Expression des gènes fonctionnels du cycle de l'azote (transcrits par gramme de sédiment sec) moyennés selon deux conditions, de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée), dans le dispositif expérimental

Les profils spécifiques des expressions des gènes fonctionnels semblent se mettre en place au fur et à mesure de la marée basse de jour vers un profil à deux pics en P1 et P3. Ce phénomène n'a pas été observé de nuit, où les expressions diminuaient largement avec le temps d'exondation quel que soit le gène, et donc le processus considéré (**Figure 94**).

De façon intéressante, les profils d'expression du gène *nirS* (dénitrification) et des AOA (archées nitrifiantes) étaient similaires en début de marée basse de jour (L1, LGT) : une expression maximale en surface (P1) (8,90 ±4,95 $x10^4$ transcrits de *nirS* g^{-1} PS, 6,58 ±1,86 $x10^4$ transcrits d'*amoA* archéens g^{-1} PS) puis une forte chute dès 0,5 cm de profondeur (P2) (2,10 ±0,005 $x10^4$ transcrits de *nirS* g^{-1} PS, 2,21 ±0,20 $x10^4$ transcrits d'*amoA* archéens g^{-1} PS). Concernant les archées nitrifiantes, l'expression du gène *amoA* était similaire en début et fin de marée de jour, avec des valeurs moyennes de 2,34 ±0,68 $x10^4$ et 3,22±0,83 $x10^4$ transcrits g^{-1} PS respectivement. Ces expressions étaient maximales en milieu de marée basse avec en moyenne 6,49 ±1,31 $x10^4$ transcrits g^{-1} PS. A marée basse de nuit, les valeurs moyennes d'expression des AOA était plus faibles (entre 1,30 ±0,34 $x10^4$ et moyenne 3,39 ±0,68 $x10^4$ transcrits g^{-1} PS). L'expression du gène *nirS* était décroissante au cours des marées basse de jour et de nuit avec des valeurs variant de 0,84 ±0,26 $x10^4$ transcrits g^{-1} PS à 2,63 ±1,14 $x10^4$ transcrits g^{-1} PS de jour et de 0,35 ±0,09 $x10^4$ transcrits g^{-1} PS à 0,78 ±0,28 $x10^4$ transcrits g^{-1} PS de nuit.

L'expression du gène de l'anammox variait entre 0,58 ±0,39 $x10^6$ et 25,2 ±2,9 $x10^6$ transcrits g^{-1} PS. Les expressions étaient maximales en milieu de marée de jour (17,6 ±2,4 $x10^6$ transcrits g^{-1} PS) et minimales en fin de marée de nuit (4,15 ±0,76 $x10^6$ transcrits g^{-1} PS).

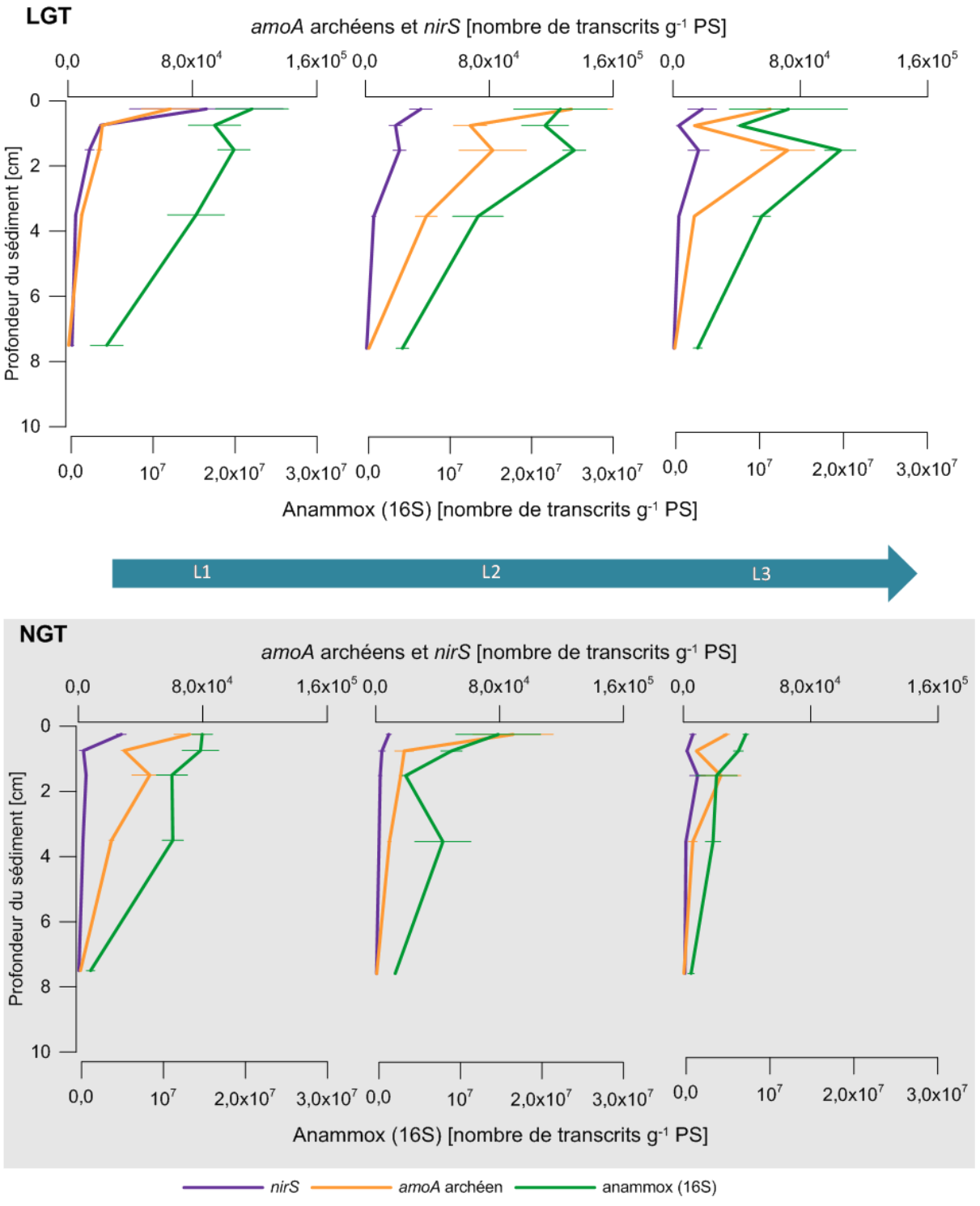


Figure 94. Profils des expressions des gènes fonctionnels (*amoA* archéen, *nirS* et anammox) dans les sédiments des mésocosmes de jour (LGT, zone blanche) et de nuit (NGT, zone grisée) à trois moments de la marée basse (L1 = début, L2 = milieu, L3 = fin, de gauche à droite)

2.2.3 Une répartition structurée par les profondeurs

Une analyse en composantes principales (ACP, **Figure 95**) a permis 1) de décrire les liens entre les paramètres mesurés et 2) d'identifier les principaux facteurs qui structurent le système. Elle a été réalisée sur 17 variables dont 11 variables abiotiques et 6 variables biotiques (dont 5 concernent les procaryotes) et les 3 premiers axes représentent plus de 67% de la variabilité des données.

- Axe 1 : l'axe principal porte plus de 43 % de l'information et représente la chlorophylle *a*, la production bactérienne et l'expression des archées nitrifiantes. Cette première dimension structure les échantillons en fonction **des profondeurs** (**Figure 95** B &C). Le test de comparaisons multiples (test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,01) réalisé montre la ségrégation en 3 groupes : P1 (surface), P2-P3 (intermédiaire) et P4-P5 (couches profondes), clairement visibles sur la **Figure 95**B.
- Axe 2 : cet axe explique 17 % de la variabilité et représente la température, les protéines totales du sédiment, les nitrites et les nitrates (NO_x) et la labilité de la matière particulaire (C:N). Cette dimension **différencie les les deux conditions (LGT et NGT)** (test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,01) (**Table 34**).
- Axe 3 : il porte moins de 7 % de l'information et représente la porosité, la salinité et les nitrates et les nitrites (NO_x).

Selon cette analyse, le système dépourvu de macrofaune et soumis à un hydrodynamisme très faible serait structuré majoritairement par la profondeur via la biomasse chlorophyllienne, la production bactérienne et l'expression des archées nitrifiantes. Ici, le sédiment est structuré en 3 horizons : de 0 à 0,5 cm, de 0,5 à 2 cm et de 2 à 10 cm de profondeur.

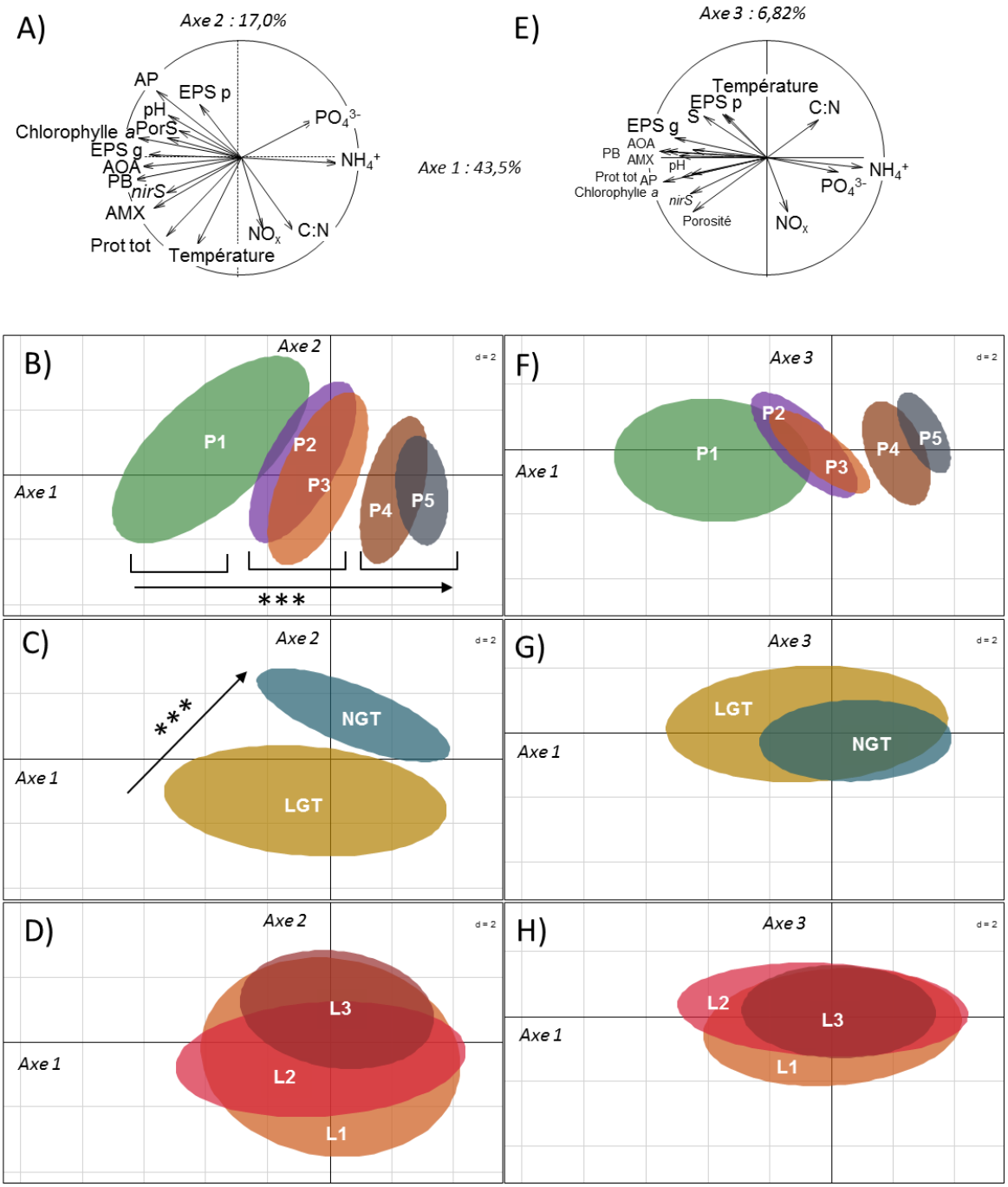


Figure 95. Analyse en composantes principales (ACP) réalisée 17 variables (6 variables biotiques, dont la chlorophylle *a*, les abondances totales de procaryotes – AP, la production bactérienne – PB, et les expressions des gènes fonctionnels de la nitrification archéenne – AOA, de la dénitrification – *nirS*, et de l'anammox – AMX ; et 11 variables abiotiques, dont Por = porosité, NO_x = NO_2^-+$NO3^-$, EPS g = EPS glucidiques colloïdaux + liés, EPS p = EPS protéiques colloïdaux + liés, Prot tot = Protéines totales). En haut : cercles des corrélations (à gauche, axe1/axe2, à droite : axe1/axe3), en dessous (de bas en haut) : analyses par groupes soit de profondeurs (P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm), soit de conditions (LGT = jour, NGT = nuit) ou de période d'émersion (L1 = début, L2 = milieu, L3 = fin). Les flèches et les étoiles indiquent la significativité des groupes (**Table 34**), les crochets montrent les groupes dégagés par un test *post hoc* de Tukey, *p ajustée* < 0,01.

Table 34. Paramètres et significativité des ANOVA réalisées *a posteriori* sur les composantes principales révélées par l'ACP (**Figure 95**). Les résultats des tests *post hoc* de Tukey à comparaisons multiples sont indiqués sous forme de groupes.

	Axe 1 (43,47%)		**Axe 2 (17,00%)**		**Axe 3 (6,82%)**	
	F	*p value*	F	*p value*	F	*p value*
Profondeur	386,02	***	933,00	***	13,18	**
Mésocosme	147,50	***	132,42	***	5,40	**
Moment	1,17		32,02	***	3,92	*
Prof:Méso	3,82	*	48,58	***	53,24	***
Prof:Moment	4,62	***	7,42	***	4,32	**
Méso:Moment	25,10	***	2,73	*	2,52	*
Prof:Méso:Moment	2,02		2,51	*	1,44	

Codes : < 0,001 = ***; < 0,01 = ** ; < 0,05 = *

Boîte à outils 1. Identifier les paramètres structurant la variabilité des communautés de procaryotes par une démarche statistique

L'analyse vise à comprendre l'impact des paramètres biotiques et abiotiques inhérents au sédiment, des conditions spatiales (profondeurs) et temporelles (jour/nuit, moment de marée basse) et de leur interaction. Dans un premier temps, une analyse en composante principale sur les 5 variables cibles a été réalisée afin de visualiser les variations et les corrélations entre les variables décrivant les paramètres de procaryotes (fonction *dudi.coa*, package « ade4 », Dray and Dufour (2007)).

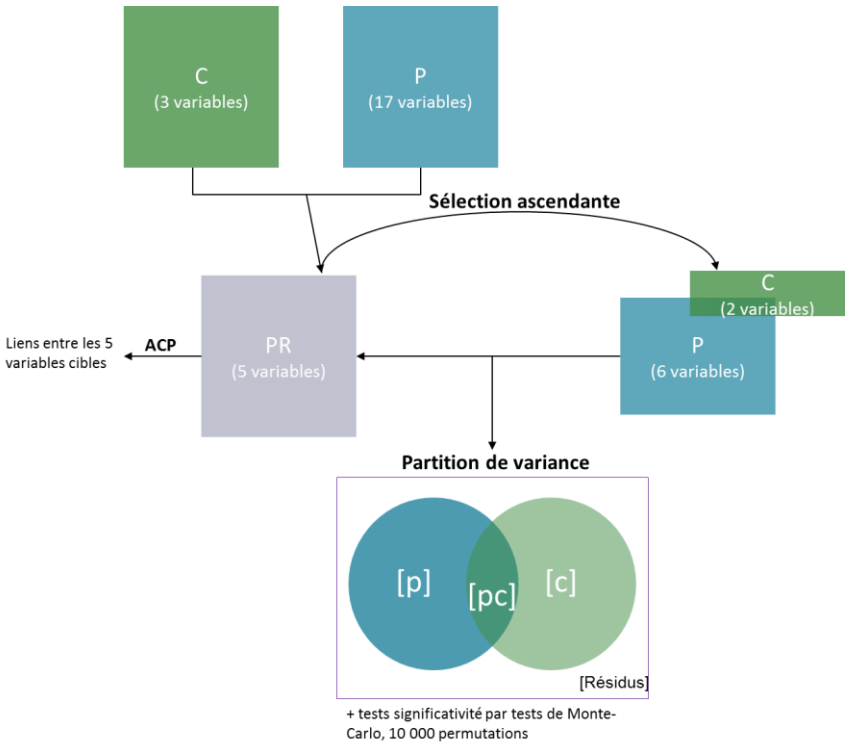


Figure 96. Des statistiques à l'écologie, la description des paramètres structurant les communautés de procaryotes benthiques, une démarche statistique. Matrice à expliquer : PR = procaryotes, matrices explicatives : C = conditions, P = paramètres biotiques et abiotiques.

Ensuite, une sélection ascendante des variables explicatives a été menée afin de 1) évaluer les variables explicatives les plus influentes, 2) s'affranchir des variables ayant peu d'impact dans l'analyse et donc 3) de rendre plus robuste les analyses multivariées suivantes. La sélection ascendante crée tout d'abord un modèle nul, sans variables explicatives, puis elle rajoute au modèle, la variable qui permet de faire augmenter significativement (selon un critère d'erreur $\alpha<0,05$) la robustesse (R^2) du modèle.

Ensuite, les variables sont ajoutées une à une par un système d'itérations et ne sont conservées que si elles permettent d'augmenter significativement le R^2 du modèle. La sélection s'arrête soit lorsque le nombre maximal de variables demandées est atteint, soit lorsque aucune variable n'augmente significativement (selon un critère d'erreur $\alpha < 0,05$) le R^2 du modèle (Legendre and Legrendre, 1998). Cette analyse a été réalisée avec le package « packfor » (Dray *et al.*, 2013) qui tient compte des améliorations réalisées par Blanchet *et al.* (2008). Cette méthode présente l'avantage d'être applicable sur des données univariées ou multivariées. Dans le cas de données multivariées, le choix du modèle est très dépendant des valeurs des variables à expliquer. Ainsi, si les unités et les gammes de valeurs de la matrice à expliquer sont différentes, il est conseillé de réaliser des sélections ascendantes pour chacune des variables.

Les variables structurantes ainsi déterminées, une partition de variance a été réalisée (package « vegan », Oksanen *et al.* (2013)). Cette partition de variance permet d'évaluer la part de la variabilité des procaryotes expliquée par les variables explicatives choisies. Ces variables sont regroupées par groupe logique et fonctionnel. Dans notre cas, la variabilité des abondances et des activités de procaryotes a été expliquée par une matrice P (pour Paramètres biotiques et abiotiques) et une matrice C (pour Conditions expérimentales). La significativité de chaque part explicative a été testée *via* des tests de Monte-Carlo basés sur des analyses de redondances (ARD) (Volis *et al.*, 2011).

2.2.4 L'activité des communautés de procaryotes, entre profondeur et rythme jour/nuit

2.2.4.1 Une forte activité des procaryotes de jour en surface

Tout d'abord, une analyse en composantes principales (ACP, **Figure 97**) a été réalisée sur 5 variables décrivant les communautés de procaryotes et les 3 premiers axes représentent 92,4 % de la variabilité des données.

- Axe 1 : l'axe principal porte plus de 70 % de l'information et représente tous les paramètres considérés : Abondance de procaryotes, production bactérienne et expression des gènes. Cette première dimension structure les échantillons en fonction des **profondeurs** ce qui est en adéquation avec les profils décroissants observés avec la profondeur.
- Axe 2 : cet axe explique 12,7 % de la variabilité et porte une part de la variabilité due aux abondances de procaryotes. Cet axe différencie les échantillons suivant les **conditions jour (LGT)/nuit (NGT)** (**Figure 97**, en bas à gauche).
- Axe 3 : il porte 9,3 % de l'information et porte une part de la variabilité due à l'expression du gène *nirS*.

Cette analyse confirme et intègre les conclusions mises en avant par l'analyse des profils : les procaryotes étaient plus abondants dans le mésocosme de nuit (NGT) mais plus actifs dans le mésocosme de jour (LGT) et en surface. De plus, une structuration plus forte est observée ici avec 4 niveaux de profondeurs : surface (0-0,5 cm), intermédiaire (0,5-2 cm), profond 1 (2-5 cm) et profond 2 (5-10 cm).

2.2.4.2 Le microphytobenthos, la matière organique et les nutriments comme facteurs descriptifs des activités de procaryotes

Comme détaillé dans la Boîte à outils 1 **(p285)**, deux matrices ont été créées, une appelée « C » pour « Conditions » contenant les profondeurs, les mésocosmes et les moments de marées, et une deuxième appelée « P » pour « Paramètres » contenant 17 variables environnementales. Avec ces deux matrices, une sélection ascendante a été utilisée afin de sélectionner les variables explicatives qui permettent de décrire au mieux les communautés de procaryotes benthiques (matrice à expliquer = PR pour procaryotes contenant l'abondance de procaryotes, la production bactérienne, et les expressions des gènes fonctionnels de la nitrification, dénitrification et de l'anammox). Cette méthode statistique a été appliquée sur chaque variable à expliquer une à une (les variables liées aux procaryotes, en italique dans la **Table 35**) de jour et de nuit séparément ou dans une même matrice (LGT+NGT, **Table 35**). Cette analyse montre dans un premier temps, que les variables explicatives ne sont pas les mêmes de jour et de nuit pour une même variable à expliquer. Dans un deuxième temps, ceci permet de révéler **les facteurs structurant les communautés de procaryotes dans les mésocosmes** qui sont **: la profondeur, le type de mésocosmes (LGT/NGT), la biomasse chlorophyllienne, les protéines totales du sédiment, les EPS glucidiques liés, le pH et les concentrations en ammonium et en nitrates** (variables en gras dans la **Table 35**).

Une fois les facteurs décrivant les communautés de procaryotes sélectionnés, il a été intéressant de réaliser une analyse de partition de variance. Cette analyse **permet d'expliquer 87 % de la variabilité des communautés de procaryotes benthiques**. Les paramètres biotiques et abiotiques expliquent seuls 12,5 % de cette variabilité de façon significative (**Table 36**). De plus, les types de mésocosmes et la profondeur expliquent 26% de la variabilité des communautés de procaryotes. Enfin, la part de variance expliquée par les deux matrices est très élevée et représente près de la moitié (49 %) de la variance des communautés. Ceci est visible sur la **Figure 99**, qui montre que les protéines varient co-linéairement avec les mésocosmes, de même que la chlorophylle *a* et l'ammonium avec la profondeur. Seulement 13 % reste inexpliquée par les paramètres choisis (**Figure 98**).

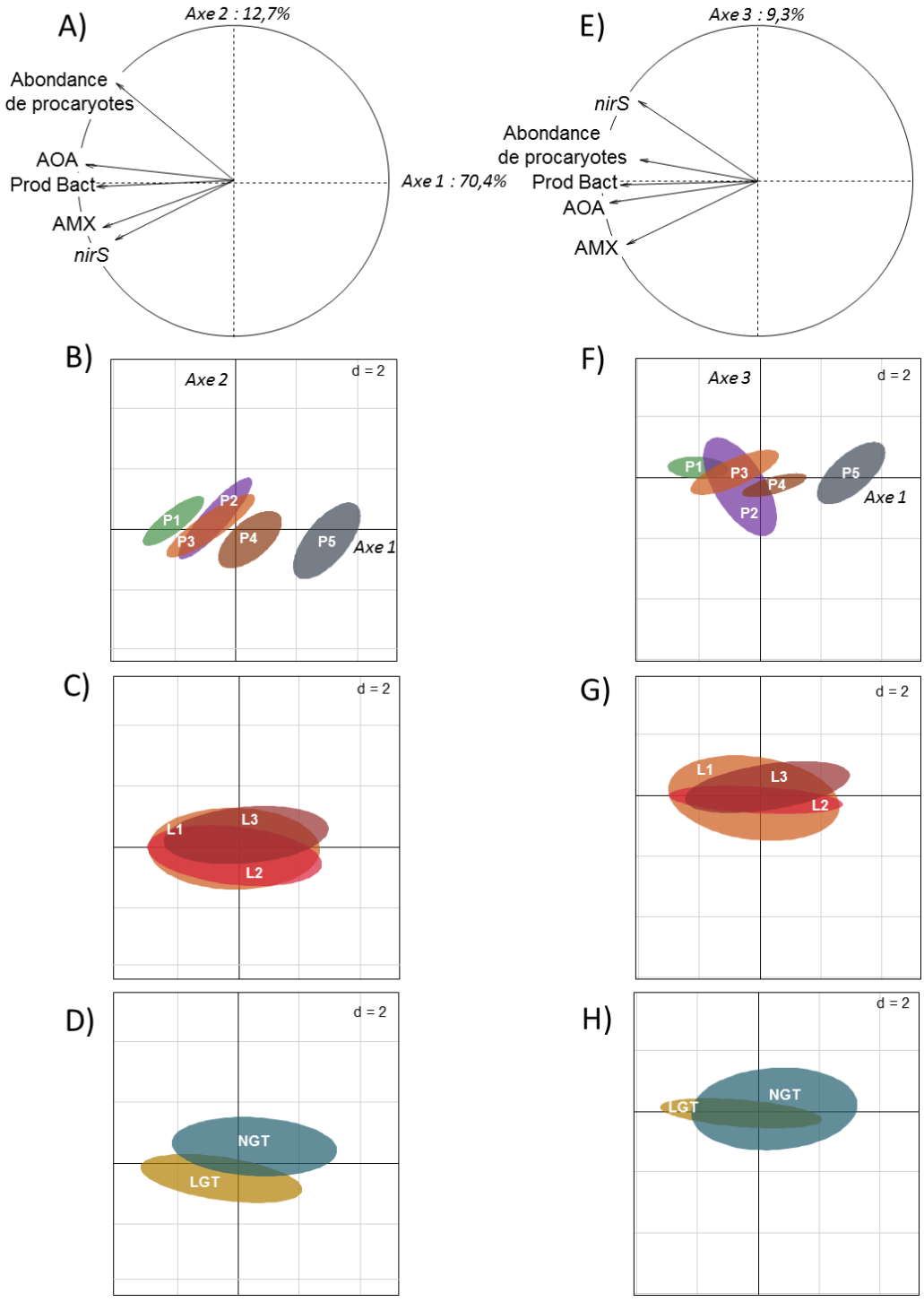


Figure 97. Analyse en composantes principales (ACP) réalisée sur les variables caractérisant les communautés de procaryotes benthiques (5 variables, dont les abondances totales de procaryotes, la production bactérienne – Prod Bact, et les expressions des gènes fonctionnels de la nitrification archéenne – AOA, de la dénitrification – *nirS*, et de l'anammox – AMX). Cercles des corrélations (A & E) et diagramme de dispersion associés (B-D et F-H) suivant différents axes de l'ACP, A : axe1/axe2, E : axe1/axe3. Les diagrammes de dispersions sont représentés selon différents critères : de profondeurs (B et F : P1 = 0-0,5 cm, P2 = 0,5-1 cm, P3 = 1-2 cm, P4 = 2-5 cm, P5 = 5-10 cm), soit de période d'émersion (C et G : L1 = début, L2 = milieu, L3 = fin) ou par condition (D et H : LGT = jour, NGT = nuit).

Table 35. Paramètres et significativité de la sélection ascendante des variables influentes. En gras, les variables qui ont été retenues pour les analyses suivantes. $R^2ca = R^2$ cumulé et ajusté

LGT+NGT		R^2 ca	F	*p*
Abondance procaryotes				
	Profondeur	0,67	118,97	*0,001*
	pH	0,81	44,89	*0,001*
	Température	0,87	27,64	*0,001*
	EPS pC	0,88	5,32	*0,026*
Production bactérienne				
	Chlorophylle a	0,67	120,38	*0,001*
	Mésocosme	0,87	91,23	*0,001*
	Profondeur	0,89	12,50	*0,001*
	Porosité	0,90	7,64	*0,008*
	Salinité	0,91	7,46	*0,013*
	Température	0,92	4,51	*0,042*
	Ammonium	0,92	4,49	*0,044*
	Nitrites	0,93	4,98	*0,032*
	Nitrates	0,94	6,90	*0,012*
	EPS gC	0,94	6,41	*0,018*
AOA				
	Chlorophylle a	0,44	48,11	*0,001*
	Température	0,54	13,69	*0,001*
	EPS gC	0,60	8,37	*0,007*
Anammox				
	Protéines tot	0,46	51,05	*0,001*
	EPS gC	0,57	16,78	*0,001*
	Profondeur	0,60	5,26	*0,033*
	Température	0,65	8,01	*0,013*
	Nitrates	0,67	4,29	*0,047*
nirS				
	Protéines tot	0,34	31,76	*0,001*
	pH	0,41	7,73	*0,014*

LGT	R^2 ca	F	*p*
Abondance procaryotes			
Profondeur	0,74	85,43	*0,001*
EPS gL	0,88	31,85	*0,001*
Ammonium	**0,91**	10,47	*0,001*
Production bactérienne			
Chlorophylle a	0,83	139,35	*0,001*
Profondeur	0,90	20,38	*0,001*
Salinité	0,92	6,86	*0,021*
Phosphates	0,93	5,43	*0,021*
EPS gL	0,94	5,93	*0,019*
Température	**0,95**	5,68	*0,030*
AOA			
EPS gL	0,53	33,88	*0,001*
Température	0,66	11,06	*0,007*
Porosité	**0,73**	8,14	*0,008*
Anammox			
Profondeur	0,47	26,71	*0,001*
Protéines tot	**0,56**	7,01	*0,010*
nirS			
Protéines tot	**0,32**	14,39	*0,001*

NGT	R^2 ca	F	*p*
Abondance procaryotes			
Chlorophylle a	0,73	80,51	*0,001*
Profondeur	0,79	8,93	*0,010*
pH	0,86	15,18	*0,003*
C:N particulaire	0,88	4,76	*0,034*
EPS pL	**0,91**	7,65	*0,010*
Production bactérienne			
Chlorophylle a	**0,83**	142,98	*0,001*
AOA			
pH	0,48	27,27	*0,001*
Profondeur	0,64	13,61	*0,002*
Ammonium	**0,70**	6,61	*0,019*
Anammox			
Nitrates	0,45	24,66	*0,001*
EPS pL	**0,53**	5,81	*0,024*
nirS			
pH	0,46	25,42	*0,001*
EPS pL	**0,59**	9,71	*0,007*

EPS gL = EPS glucidiques liés; EPS gC = EPS glucidiques colloïdaux, EPS pL =EPS protéiques liés ; EPS pC = EPS protéiques liés

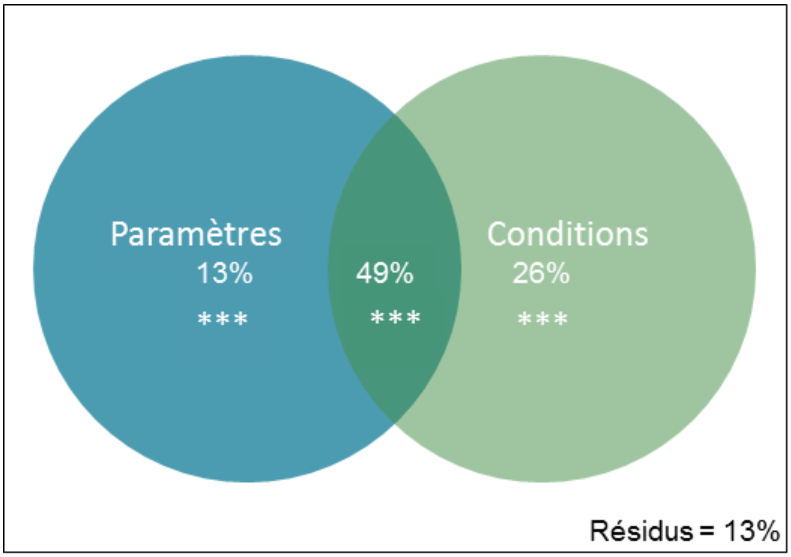


Figure 98. Partition de variance expliquant la variabilité des communautés de procaryotes (abondance, production bactérienne et expression des gènes fonctionnels). Les communautés sont ici caractérisées par deux matrices : « Paramètres » : Chlorophylle *a*, pH, concentrations de nitrates et d'ammonium, EPS glucidiques liés, concentration en protéines totales du sédiment (13%), et « Conditions » : profondeurs (de 0 à 10 cm) et mésocosme (LGT, NGT) (26%). 12% de la variance reste inexpliquée par les paramètres choisis. La significativité de chaque part de variance expliquée a été testée par des ARD totales et partielles résumées dans la **Table 36**.

Table 36. Paramètres de la partition de variance (**Figure 98**) permettant de décrire les communautés de procaryotes benthiques. Composants de la variation et somme des valeurs propres et significativité des ARD totales (ARD) et partielles (ARDp)

Analyse	Variable contraignante	Covariable	Composant de la variation	Somme des valeurs propres	
ACP	-	-	-		
ARD	P		p +pc	0,613	***
ARD	C		c + pc	0,747	***
ARD	P+C		c + p + pc	0,873	***
ARDp	P	C	p	0,125	***
ARDp	C	P	c	0,26	***

$p < 0{,}001$ = ***

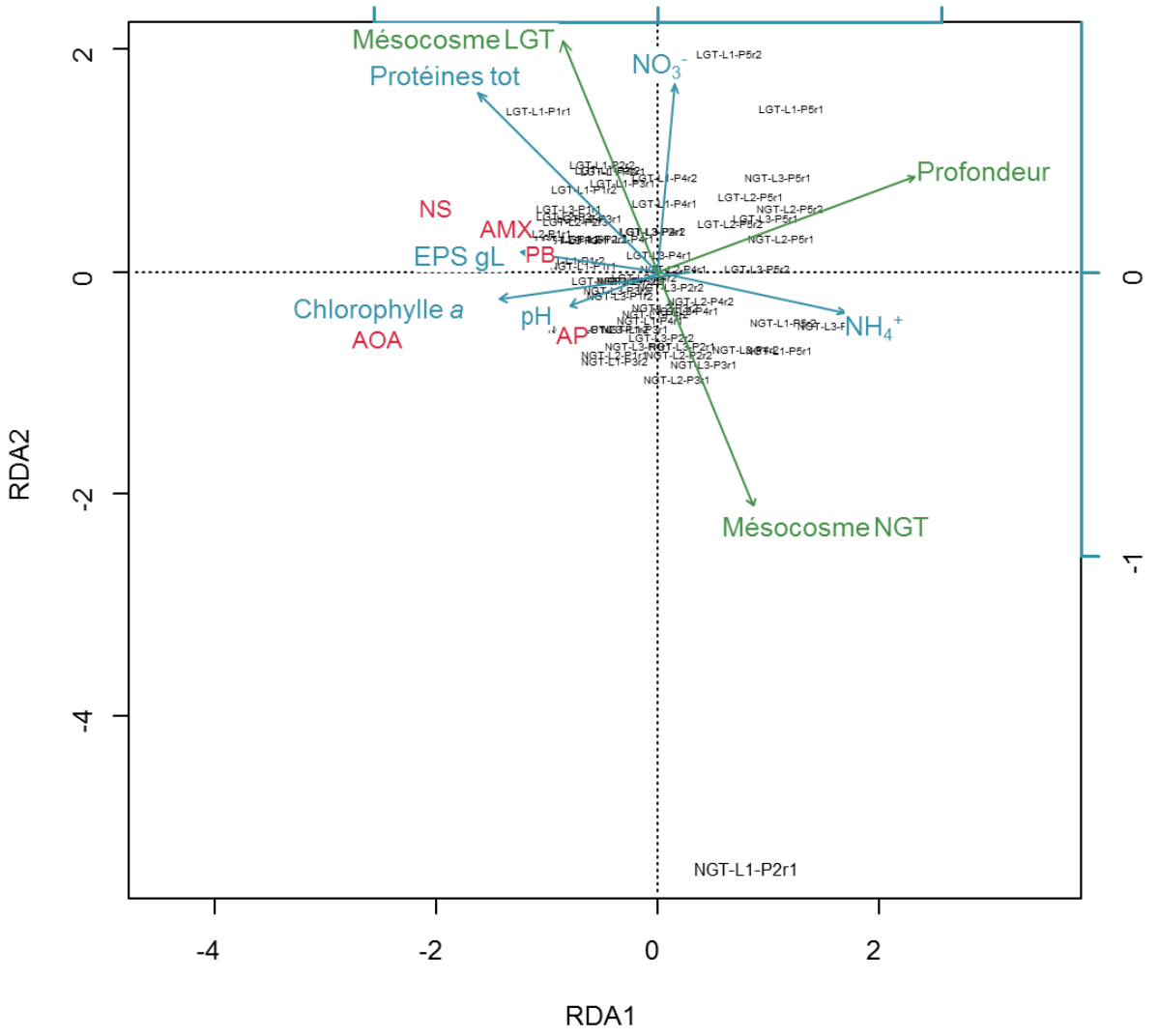


Figure 99. Analyse de redondances (ARD) (package « vegan », Oksanen *et al.* (2013)) totale représentant les variations des paramètres liés aux procaryotes en rouge (AOA = expression du gène *amoA* archéen, NS = expression du gène *nirS*, AMX = expression du gène de l'anammox, PB = production bactérienne, AP = abondance de procaryotes) contraints par les paramètres en bleu (biotiques et abiotiques, dont EPS gL = EPS glucidiques liés), et les conditions en vert (mésocosme et profondeur).

2.3 Discussion

Dans cette étude, la structure de la diversité fonctionnelle des communautés de procaryotes a été très fortement impactée par la profondeur du sédiment. Dans un deuxième temps, les conditions opposées dans le cycle jour/nuit ont montré un impact sur cette diversité fonctionnelle et ceci se traduit par des différences de température, de teneur en protéines totales et de concentration en nitrates, entraînant une augmentation des processus anaérobies de jour et une forte abondance de procaryotes de nuit. Enfin, cette étude confirme que l'impact de la durée d'émersion sur les communautés de procaryotes, même actives, est négligeable.

2.3.1 L'alternance jour/nuit impacte le fonctionnement du cycle de l'azote, l'effet de l'activité du microphytobenthos ?

Les articles étudiant les vasières ou les milieux benthiques côtiers de nuit sont peu nombreux. Selon Friend *et al.* (2003), une plus forte bio-stabilisation des sédiments aurait lieu la nuit dans les estran sableux ; au contraire, dans les sédiments vaseux, la stabilisation est plus forte le jour (Friend *et al.*, 2005). Les auteurs attribuent ces différences majoritairement à l'effet de la vitesse du vent pendant la période d'immersion précédent les prélèvements et non à l'absence de production primaire ou de production d'EPS glucidiques. Dans notre étude en mésocosme, cet effet du vent a donc été éliminé, cela pourrait permettre d'évaluer l'effet propre de l'absence d'activité du MPB la nuit.

Une comparaison du fonctionnement de l'écosystème de jour et de nuit a pu être effectuée dans cette étude en mésocosme. Ces échantillonnages ont été réalisés dans le but d'analyser l'impact de l'activité du MPB sur la diversité fonctionnelle des communautés actives de procaryotes. Les différences sont donc attendues plus en surface et notre étude permet d'évaluer l'impact sur une partie de la colonne sédimentaire jusqu'à 10 cm de profondeur. De fortes différences apparaissent entre les deux conditions, et celles-ci s'appliquent globalement sur toute la profondeur du sédiment. Cela reste tout de même à nuancer entre 2 et 10 cm de profondeur où les différences s'atténuent. Considérant indistinctement la diversité fonctionnelle liée au cycle de l'azote et la diversité fonctionnelle liée à la dégradation des EPS, les facteurs qui semblent conditionner ces fonctions sont : la biomasse chlorophyllienne, la matière organique (EPS glucidiques liés et protéines totales), les sels nutritifs (ammonium et nitrates), le pH et les profondeurs. Au travers de ces différents paramètres, l'élément

structurant reste la profondeur du sédiment. En effet, les analyses statistiques permettent d'extraire les variables ayant le plus d'influence sur les procaryotes mais celles-ci sont elles-mêmes structurées verticalement. Cette information est révélée par la partition de variance qui montre que 50 % de la diversité fonctionnelle active des procaryotes est expliquée par les paramètres abiotiques et biotiques et par les profondeurs.

Une sélection ascendante des variables puis de partition de variance a été réalisée uniquement sur les expressions des gènes fonctionnels (*amoA* archéen, *nirS* et anammox). Cette analyse a montré que 65 % de la variance pouvait être expliquée par les paramètres choisis (paramètres choisis par sélection ascendante : EPS glucidiques et protéiques liés, pH, protéines totales, la température, production bactérienne et concentrations en nitrates, profondeur, mésocosme) et 35 % de la variance restait inexpliquée. Ce pourcentage de résidus était plus fort que lorsque l'on considère également les autres paramètres liés aux procaryotes (production bactérienne et abondance). Ainsi, cette analyse tend à monter que le rôle fonctionnel des procaryotes dans le cycle de l'azote ne s'expliquerait pas totalement par les paramètres considérés et serait soumis à des paramètres que nous n'avons pas mesurés. De plus, il est possible que l'échelle d'étude choisie ne permette pas d'obtenir une variabilité expliquant significativement les expressions de gènes fonctionnels.

Cette même analyse a été réalisée une deuxième fois en éliminant la variable « mésocosme » qui définit donc les deux conditions : jour et nuit. Les résultats ont montrés que cette variable « mésocosme » n'intervenait pas dans l'analyse car la différence entre jour et nuit se traduisait par une variation de paramètres biotiques et abiotiques (pris en compte par la matrice P, voir la Boite à outils 1). Finalement dans ce cas, les paramètres physico-chimiques expliquent 33 % de la variance des gènes fonctionnels. Ces tests mettent en avant une influence des conditions (jour et nuit) sur le cycle de l'azote qui peut être définie par des différences de paramètres physico-chimiques telle que la matière organique (EPS et protéines totales), la température, et le pH.

Notre étude montre clairement que **les communautés actives des procaryotes sont structurés verticalement suivant un gradient de profondeur dans le sédiment. Ces communautés sont, de surcroît, sensibles à des variations de températures, de pH, de concentration en EPS et de protéines totales qui sont différentes entre les marées basses de jour et de nuit.**

Les expressions des gènes mesurés représentant des proxys de la dénitrification, de la nitrification et de l'anammox montrent que ces processus seraient favorisés le jour. Par analogie, la production bactérienne était plus importante le jour alors que les procaryotes étaient plus abondants la nuit. En particulier, les expressions des gènes codant des enzymes impliqués dans les réactions anaérobies étaient significativement plus importantes de jour que de nuit et ce entre 0 et 5 cm de profondeur. A la vue du nombre de transcrits par gramme de sédiment sec, le processus d'anammox serait dominant dans nos prélèvements alors que lors du suivi saisonnier, ce processus était apparu comme mineur dans les sédiments côtiers. Il est possible que notre étude en mésocosme ait favorisé les bactéries réalisant l'anammox et cette hypothèse pourra être vérifiée dans le chapitre suivant qui présentera la diversité phylogénétique active des procaryotes dans les mésocosmes. Il est également possible que cela soit dû à un biais méthodologique. En effet, ce travail a été réalisé sur le pool des ARN messagers dans les échantillons, ces ARN ont été transcrits en ADN complémentaires afin d'être quantifiés. Lors de cette transcription, notre choix s'est porté vers l'utilisation d'amorces universelles (hexamères) qui permettent la transcription de tous les ARN messagers. La quantification de l'anammox a été faite via le gène codant la petite sous unité 16S du ribosome qui est le gène majoritairement présent. Ceci constitue un biais possible qui aurait pu être évité en réalisant une transcription spécifique pour chaque gène à quantifier. Cependant, la réalisation de transcriptions spécifiques pourrait également apporter des biais et surestimer certaines expressions. Le choix a donc été fait de quantifier l'expression des gènes à partir d'un même matériel génétique. A l'avenir, il sera envisagé de préférer quantifier la réaction d'anammox via le gène le gène *hzo* (Schmid *et al.*, 2008) ou par l'analyse des laddéranes, lipides spécifiques des bactéries réalisant la réaction d'anammox.

De façon intéressante, un pic de concentration des EPS glucidiques liés a été observé en surface en milieu de marée basse de jour. Ces EPS glucidiques sont très étudiés dans la littérature puisqu'ils sont majoritairement produits par le microphytobenthos, en particulier par les diatomées pendant les marées basses de jour (De Brouwer and Stal, 2001; Underwood and Paterson, 2003). La nuit, la quasi-totalité de ces EPS serait dégradée en EPS colloïdaux (Underwood and Smith, 1998; De Brouwer *et al.*, 2002). Notre étude montre en effet une production d'EPS glucidiques liés en milieu de marée de jour. De nuit, les teneurs en EPS liés étaient faibles et les EPS glucidiques colloïdaux étaient consommées au cours de la marée. Si les EPS glucidiques liés étaient en effet dégradés en produisant des EPS colloïdaux, cela signifie que l'assimilation par les procaryotes devait être très importante. Dans cette étude, les

activités exo-enzymatiques n'ont pu être mesurées de nuit mais ces résultats suggèrent que l'activité β-glucosidase pourrait être très forte la nuit.

2.3.2 Une faible importance du temps d'émersion

Le temps d'émersion n'avait pas montré de différences des paramètres mesurés. La conclusion de ces résultats suggérait que cet évènement cyclique et journalier n'était pas un facteur forçant pour les communautés de procaryotes et que celles-ci étaient adaptées à de telles conditions. Mais une hypothèse avait proposé l'importance de se focaliser sur l'expression des gènes fonctionnels plutôt que leur abondance. Cela dans le but de quantifier la réalisation d'un processus au travers la production d'enzymes initiée par la transcription d'ARN messagers.

Dans cette étude, les analyses globales montrent à nouveau une absence d'effet du temps d'émersion avec un milieu de marée intégrateur des processus se déroulant au cours de l'émersion. Ce résultat prouve qu'une grande partie des paramètres considérés sont des paramètres qui décrivent le système mais qui ne sont pas dynamiques à l'échelle d'une seule marée basse.

2.3.2.1 Une quantité d'EPS protéiques très élevée

Bien que les prédateurs aient été éliminés, la biomasse chlorophyllienne n'a pas variée au cours de l'émersion de nuit où les valeurs étaient plus faibles que de jour. De jour, une légère augmentation en milieu de marée de cette biomasse a pu être observée. Ce phénomène est étonnant puisqu'il était attendu que, de nuit, en l'absence de lumière, les diatomées se multiplient (Saburova and Polikarpov, 2003) augmentant ainsi la quantité de chlorophylle *a* en surface. En revanche, les quantités d'EPS protéiques étaient extrêmement élevées entre 0 et 1 cm de profondeur. Cette forte présence d'EPS protéiques a été également mise en évidence dans une étude d'érodimétrie sur le sédiment de Brouage (Orvain *et al.*, 2014a). Lors de ces expérimentations, une forte corrélation positive avait été trouvée entre les concentrations en EPS protéiques et les abondances d'hydrobies (*Peringia ulvae*), se nourrissant du biofilm en surface entre 0 et 1 cm de profondeur. Dans notre étude, cette hypothèse est exclue puisque que le tamisage a éliminé la macrofaune. La production d'EPS protéiques est recensée comme indicateur d'un stress environnemental (Lubarsky *et al.*, 2010). La manipulation et l'incubation en mésocosme sont des points communs entre les deux études mais cette manipulation a été menée de façon totalement différente dans les deux cas. Ainsi, il est

possible que les diatomées soient finalement à l'origine de cette forte production d'EPS protéiques potentiellement en réponse à un stress soit dû à la forte abondance des procaryotes, soit à un stress qui n'a pas été mis en évidence dans notre étude. De plus, les procaryotes étant plus abondants de nuit, il est possible que cette forte concentration reflète un effet couplé de la production par les diatomées et de la production et dégradation par les bactéries. Cette activité enzymatique n'a pu être mesurée de nuit suite à des problèmes techniques, mais de jour, en surface cette activité était très forte et il est possible que celle-ci ait été très importante également de nuit.

2.3.2.2 Les nitrates s'accumulent en profondeur de jour, pourquoi ?

Le début de marée basse de jour était caractérisé par une forte concentration en nitrates dans le sédiment, particulièrement entre 2 et 10 cm de profondeur. Classiquement, les nitrates sont produits en présence d'oxygène par nitrification à partir de l'ammonium puis assimilés ou métabolisés dans les sédiments anoxiques par réduction. Lors de ces expérimentations, de jour, la concentration maximale en nitrates en début de marée était de 264,36 µM entre 2 et 5 cm de profondeur. Les nutriments ont été mesurés uniquement dans une seule carotte pour des raisons inhérentes à la taille des mésocosmes et à la réalité des manipulations. Il est donc possible que cette carotte ait présenté des valeurs particulièrement élevée. Malgré tout, en milieu de marée, la concentration en nitrates a été diminuée par 10 et était maximale entre 5 et 10 cm de profondeur (35,76 µM). Cette consommation de nitrates a continué jusqu'en fin de marée où les concentrations ne dépassaient pas 12,34 µM (entre 5 et 10 cm de profondeur). Ces résultats suggèrent donc une très forte production de nitrates pendant la marée haute précédent nos prélèvements et la consommation de la presque totalité de cette production au cours d'une marée basse. Si la consommation de ces nitrates au cours de la marée était attendue, l'observation de ces nutriments en profondeur ne l'était pas. Le gène impliqué dans la nitrification par les archées (*amoA* archéen) ne semblait être exprimé qu'en surface entre 0 et 0,5 cm de profondeur en début de marée, ce qui n'explique pas ce phénomène. Ces résultats restent à nuancer puisque dans cette étude, il n'a pas été possible de quantifier l'expression du gène *amoA* par les bactéries et cela aurait pu apporter des éléments de réponse. Une première observation issue de résultats préliminaires suggère néanmoins que l'expression du gène *amoA* bactérien ne s'exprimait qu'en surface (0-0,5 cm). Dans la littérature, des espèces bactériennes impliquées dans le cycle du soufre, les *Beggiatoa*, *Thioploca* et *Thiomargarita*, seraient capables de stocker les nitrates dans leurs vacuoles (Mussmann *et al.*, 2003). Certains

représentants de ces genres ont été retrouvés lors du suivi *in situ* de ce travail (Partie 2) et pourraient être à l'origine de cette forte concentration en nitrates en profondeur. De plus, divers groupes de foraminifères tels que les Miliolidés, Rotaliidés, et Textulariidés sont également capables de stocker les nitrates (Piña-Ochoa *et al.*, 2010). En revanche, dans la vasière de Brouage, les deux espèces retrouvées qui sont *Ammonia tepida* et *Haynesina germanica* ne semblent pas avoir cette capacité et ne pourraient donc pas expliquer l'accumulation de nitrates observée en profondeur.

2.3.2.3 Une structuration progressive des profils d'expression de gènes fonctionnels

Si le temps d'émersion n'apparaissait pas structurant pendant notre étude, il reste important de remarquer qu'au cours d'une marée basse, des profils particuliers d'expression des gènes fonctionnels semblaient se mettre en place. En effet, de nuit, les expressions étaient largement diminuées au cours de la marée basse. De jour, un modèle de profil semble apparaître avec des valeurs fortes entre 0 et 0,5 cm de profondeur qui diminuaient entre 0,5 et 1 cm, puis ré-augmentaient pour atteindre un maximum entre 1 et 2 cm de profondeur et enfin diminuaient progressivement jusqu'à 10 cm. Le calcul du ratio DIN:PO_4^{3-} montrait une limitation en azote en surface en fin de marée basse indiquant une forte compétition entre le microphytobenthos et les procaryotes de jour et de nuit pour les nutriments azotés. Malgré cela, le processus de nitrification semblait être maintenu à de forts taux en surface. Etant donné que l'expression du gène *nirS* était très faible, il est plus probable que la consommation des nitrates et des nitrites produits par nitrification soit due à une assimilation rapide par le microphytobenthos (de jour comme de nuit). Dans cette étude, un suivi d'incorporation de nutriments marqués avec des isotopes stables de l'azote comme le ^{15}N (Veuger *et al.*, 2005; Veuger *et al.*, 2007) et un séquençage des espèces ayant incorporé cet élément auraient pu permettre d'étayer ces hypothèses (technique de DNA-SIP) (Bell *et al.*, 2011).

2.3.3 Conclusion

Cette étude en laboratoire a offert la possibilité d'appréhender certains processus se déroulant de nuit dans les sédiments vaseux en conditions semi-contrôlées. Ces mesures sont essentielles puisque impossibles sur la vasière de Brouage pour des questions évidentes de sécurité et de logistique. Lors de ces expérimentations, quelle que soit le moment de la journée ou de la nuit, la structuration des activités de procaryotes a été confirmée suivant la profondeur du sédiment (**Figure 100**). Une fois de plus, la surface (P1, 0-0,5 cm de profondeur) semblait présenter des caractéristiques particulières et les plus fortes activités procaryotiques. Ensuite, les profondeurs P2 et P3 (entre 0,5 et 2 cm), constituent une zone intermédiaire entre l'horizon de surface et les horizons profonds. Dans cette zone, les activités enzymatiques étaient faibles mais le potentiel dans les réactions liées au cycle de l'azote était fort, surtout l'oxydation de l'ammonium par les archées nitrifiantes (forte expression du gène *amoA* archéen) et la réaction d'anammox (forte expression du gène 16S ciblant les Planctomycetes réalisant l'anammox). Enfin, entre 2 et 10 cm de profondeur, les sédiments font partie d'un horizon profond où les activités enzymatiques étudiées étaient très faibles et où les réactions liées au cycle de l'azote semblaient également réduites. Ensuite, cette étude a permis de monter que les procaryotes étaient plus abondants la nuit et plus productifs le jour. Il est possible que ces observations reflètent l'impact de la prédation par les nématodes plus nombreux dans le mésocosme de jour (chapitre 1) mais cela peut également suggérer un découplage entre production et biomasse suivant les émersions de jour et de nuit.

Enfin, l'élimination de la macrofaune benthique a montré une meilleure réplicabilité des résultats et rend donc les résultats plus exploitables. Par exemple, les données d'EPS étaient parfois difficiles à exploiter sur le terrain alors que dans cette étude, les réplicats semblaient plus proches et plus cohérents. De même, les expressions des gènes étaient moins variables entre réplicats. Sur le terrain, la macrofaune bioturbatrice crée des micro-niches dans le sédiment expliquant les fortes variations spatiales (entre réplicats) qui ont pu être observées. Dans les mésocosmes, les résultats montrent que l'absence de bioturbation par la macrofaune ne modifie pas drastiquement les profils par rapport au terrain mais les mesures sont plus fiables et moins variables entre réplicats. Dans les mésocosmes, les différents gènes étudiés montrent des profils d'expression très proches confirmant l'absence de micro-niches au sein de la colonne sédimentaire étudiée et donc une bioturbation de la méiofaune potentiellement faible.

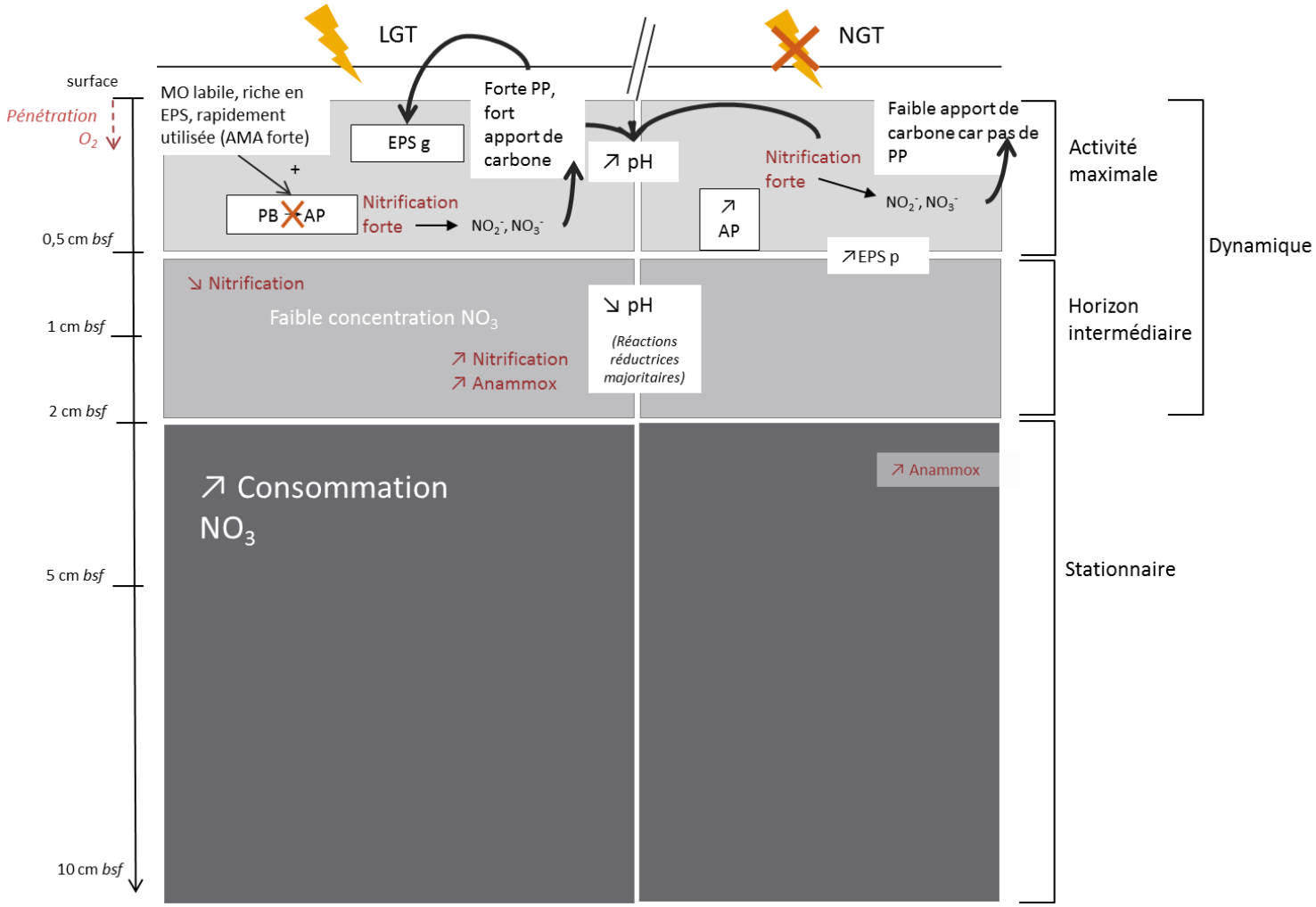


Figure 100. Schéma conceptuel représentant les interactions entre procaryotes et microphytobenthos en surface ainsi que les activités des procaryotes observées lors d'expérimentation en mésocosme suivant la profondeur du sédiment (*bsf* = « *below sediment surface* ») dans les 10 premiers cm de jour (LGT) et de nuit (NGT). AP = abondance de procaryotes, PB = production bactérienne, AMA = actvitié aminopeptidase, MO = matière organique, EPS p = protéiques, EPS g = EPS glucidiques

Chapitre 3. Diversité des procaryotes actifs liés au cycle de l'azote en conditions semi-contrôlées : impact d'un cycle jour/nuit

3.1 Contexte de l'étude

A marée basse de jour, l'activité photosynthétique et la production d'EPS liées au microphytobenthos modifient la structure et la fonction des procaryotes benthiques en surface (Haynes *et al.*, 2007). De plus, de jour, le microphytobenthos utilise une forte quantité d'ammonium par rapport aux marées basse de nuit pouvant impacter les communautés nitrifiantes (Thornton *et al.*, 1999) et diminuer les processus de nitrification-dénitrification à la surface des sédiments (Hochard *et al.*, 2010). Cette compétition pour les nutriments entre microphytobenthos et procaryotes peut amener à de fortes différences de composition des communautés actives en surface entre les marées basses de jour et de nuit (Risgaard-Petersen, 2003). Dans ces sédiments, la bioturbation crée des micro-niches aérobies (Bertics and Ziebis, 2010) et apporte de la matière organique labile plus en profondeur, modifiant ainsi les processus biogéochimiques (Laverock *et al.*, 2011). En absence de bioturbation, le chapitre précédent a montré que les mesures étaient plus réplicables et que la stratification verticale était nette. Le rôle fonctionnel des procaryotes différait sensiblement entre les deux conditions diurnes testées dans ce travail.

Le but de cette étude est de décrire la diversité active des procaryotes en milieu de marée basse de jour et de nuit suivant un gradient vertical de profondeur dans un mésocosme tidal (**Figure 101**). Cette diversité sera évaluée par pyroséquençage de l'ARNr 16S bactérien et archéen (**Table 37**).

De façon analogue à l'étude de la diversité réalisée sur le terrain, les prélèvements en milieu de marée basse ont été préférés puisqu'ils représentent le mieux les processus se déroulant à marée basse. Il est attendu que les communautés actives diffèrent en surface entre les deux conditions puisque l'activité photosynthétique du microphytobenthos en surface de jour semblait favoriser l'activité et la production bactérienne.

L'étude présentée contient des analyses qui demanderont des améliorations avant soumission à un journal et correspond donc à un article en préparation contenant des résultats préliminaires. Il sera également nécessaire 1) d'améliorer les analyses phylogénétiques, 2) de continuer à analyser les données issues du pyroséquençage et enfin 3) d'apporter les données de production primaire une fois mises à jour et fiabilisées.

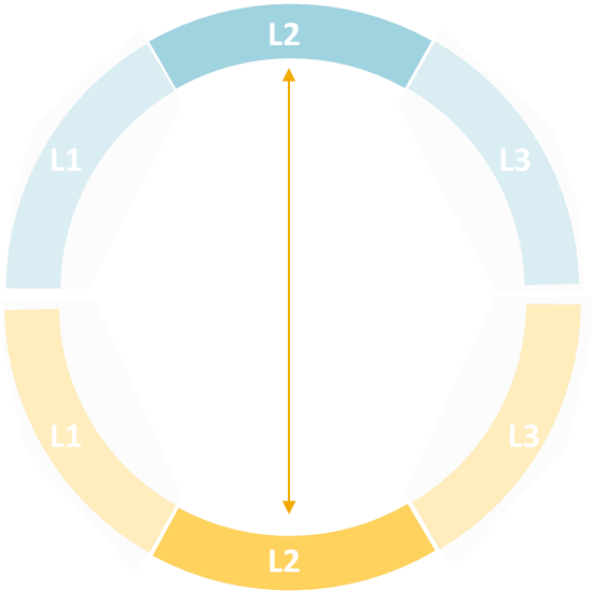


Figure 101. Stratégie d'analyse adoptée dans ce chapitre. Il est ici question de comparer les conditions de jour (LGT) et de nuit (NGT), uniquement en milieu de marée basse (L2).

Table 37. Tableau récapitulatif des paramètres considérés dans le cas des mésocosmes, ● = paramètres utilisés dans ce chapitre

Paramètres		LGT L2	NGT L2
Irradiance		●	●
Température extérieure		●	●
Température sédiment		●	●
pH		●	●
Salinité		●	●
Teneur en eau		●	●
Granulométrie		●	●
COP/NOP		●	●
Chlorophylle *a*		●	●
Sels nutritifs		●	●
EPS			
Protéines totales			
Méiofaune			
Macrofaune			
Production bactérienne			
Activités enzymatiques			
Abondance procaryotes		●	●
Gènes fonctionnels (ADN)			
	amoA bactérien		
	amoA archéen		
	nirS		
	nirK		
	nosZ		
	anammox*		
Gènes fonctionnels actifs (ADNc)			
	amoA bactérien		
	amoA archéen	●	●
	nirS		
	nirK		
	nosZ		
	anammox*		
Abondance bactéries (gène 16S ARNr)			
Abondance archées (gène 16S ARNr)			
Diversité bactérienne totale (gène 16S ARNr)			
Diversité archéenne totale (gène 16S ARNr)			
Diversité bactérienne active (16S ARNr)		●	●
Diversité archéenne active (16S ARNr)		●	●

*16S rRNA *Planctomycetes*

3.2 *Active prokaryotic community structure in coastal muddy sediments during day and night low tide*

C. Lavergne [1], M. Hugoni [2,3], C. Dupuy [1], D. Debroas [2,3], H. Agogué [1]

[1] LIENSs, UMR 7266 ULR – CNRS, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

[2] Clermont Université, Université Blaise Pascal, Laboratoire "Microorganismes : Génome et Environnement", BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand, France

[3] CNRS, UMR 6023, LMGE, F-63171 Aubière, France

Corresponding author : Lavergne Céline UMR 7266 ULR - CNRS, LIENSs, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France.
Tel : +33 (0)5 46 50 76 44
Fax : +33 (0)5 46 50 76 63
e-mail : celine.lavergne@univ-lr.fr

Running title: Prokaryotic structure during day/night exposures

3.2.1 Abstract

In coastal sediments, environmental conditions shaped the inhabiting prokaryotic communities during emersion period. In particular, these intertidal benthic ecosystems are characterized by a high primary production ensured by microphytobenthos at daytime. Only weak studies had investigated microbial communities during night exposures due to hard logistic and security issues, but the absence of microphytobenthic activity and exopolymeric production during night should drastically affect both bacterial and archaeal communities. We developed a tidal mesocosm experiment allowing sampling the top 10 cm of muddy sediment at low tide during day and night exposures. Active diversity of the benthic prokaryotic community was assessed by V3-V5 region pyrosequencing of bacterial and archaeal 16S ribosomal RNA (rRNA). Noticeable discrepancies were retrieved between day and night exposures between 0-1 cm below sediment surface; nevertheless, vertical-depth gradient shaped the prokaryotic community. Benthic *Bacteria* were highly diverse and dominated by *Proteobacteria* such as δ- and γ-proteobacteria. The majority of metabolically active *Archaea* (more than 60%) fell into *Thaumarchaeota* lineage known to be largely involved in the ammonia oxidation. Interestingly, *Thaumarchaeota* C3 group were very active in the anoxic zone of the sediment. While, it is unlikely that these organisms could be ammonia oxidizers, it raises compelling hypothesis on their putative functional role. This study reported the first description of active prokaryotic community during day and night emersion periods in muddy sediments from a tidal mesocosm experiment.

Keywords: *Archaea* / *Bacteria* / active community /intertidal mudflat / benthic nitrogen cycle / mesocom experiment/ low tide

3.2.2 Introduction

The photosynthetic activity ensured by micro-algae represents 50% of the primary production in estuaries areas (Underwood and Kromkamp, 1999). In intertidal mudflats, at low tide, microphytobenthos (MPB) impacts the prokaryotic community in surface of the sediments (Haynes *et al.*, 2007). Indeed, MPB could change the structure and the functionality of bacterial communities by producing a large amount of exopolymeric substances and major nutrient uptake during daytime emersion. Nevertheless, almost nothing is known about the becoming of the produced organic matter and the prokaryotic activity during night-time emersion periods, because of logistic and securities issues (Friend *et al.*, 2003; Friend *et al.*, 2005). The relationships between prokaryotic communities and the MPB in intertidal flats is poorly investigated during night exposure, while Thornton *et al.* (1999) have shown a drastic uptake of ammonium during daytime emersion periods compared to night-time suggesting an impact on nitrifying prokaryotes. By analogy, Hochard *et al.* (2010) have shown a strong decrease of nitrification and denitrification at daytime associated with photosynthesis. These features are consistent with a competition between MPB and prokaryotic communities for nutrients (Risgaard-Petersen, 2003). All these issues argued that the MPB activity can shape prokaryotic communities and inversely, that variation in prokaryotic activities and functionality may occur at different diurnal conditions and different depths.

Prokaryotic communities in coastal zones vary greatly in space and time because of sharp gradients in salinity and nutrients (Kirchman *et al.*, 2005; Böer *et al.*, 2009; Herlemann *et al.*, 2011). In these benthic coastal systems, fluctuations in composition vary temporally and spatially, with a vertical-related depth influence (Böer *et al.*, 2009; Gobet *et al.*, 2012). During low tide, the vertical stratification of prokaryotic communities is under strong pressures among 1) stochastic events such as storms, rain or hail, and 2) deterministic parameters as organic carbon availability (Böer *et al.*, 2009), inorganic nutrient enrichment (Hewson *et al.*, 2003) or MPB activity (primary production, production of labile organic matter and nutrient uptake) (Risgaard-Petersen, 2003; Hochard *et al.*, 2010). Additionally, the overall sedimentary stratification could be disturbed by bioturbation (Laverock *et al.*, 2011). Indeed, ecosystem engineers have shown differential effects according to whether the study considered one specie, multi-species, sandy or muddy flats (Goñi-Urriza *et al.*, 1999; Vanaverbeke *et al.*, 2011; Passarelli *et al.*, 2012; Laverock *et al.*, 2013). Bioturbation modify the prokaryotic communities in sediments acting on their activity and their community

(Laverock *et al.*, 2011; Stauffert *et al.*, 2014). The effect of bioturbation on both *Bacteria* and *Archaea* have been understudied, nevertheless, Stauffert *et al.* (2014) have shown that the ragworm *Hediste diversicolor* impacts archaeal active diversity in muddy oil-contaminated sediments maintained in microcosms. Finally, sediment stability which is enhanced by MPB and EPS production (Gerbersdorf *et al.*, 2009b; Lubarsky *et al.*, 2010; Passarelli *et al.*, 2014) should be modified by hydrodynamic pressures such as wind or wave action (Friend *et al.*, 2003; Friend *et al.*, 2005).

Previous studies have shown specific bacterial diversity associated with MPB and rich-EPS sediments (Haynes *et al.*, 2007) and effect of sediment erosion on prokaryotic composition (Mallet *et al.*, 2014). The aim of this study was to decipher the activity and the phylogeny of *Bacteria* and *Archaea* during day/night emersion in muddy sediment. Because coastal benthic ecosystems are highly complex and sampling at night implies logistic and/or securities issues, we simplify the system (removal of macrofauna and hydrodynamism) and developed a tidal mesocosm experiment. In this study, we reported the first description of active prokaryotic communities assessed by pyrosequencing the V3-V5 region of bacterial and archaeal 16S ribosomal RNA (rRNA), during day and night emersion periods from a tidal mesocosm experiment.

3.2.3 Experimental procedures

3.2.3.1 Sampling and tidal mesocosm set-up

Sediment was collected at low tide on the ridges from the intertidal mudflat of the Marennes-Oleron bay (France, N 45° 54′ 53″; W 01° 05′ 23″). Cores were sliced in five layers from 0 to 10 cm below sediment surface (bsf; D1 = 0-0.5 cm; D2 = 0.5-1 cm; D3 = 1-2 cm; D4 = 2-5 cm and D5 = 5-10 cm). Each layer was stored in bags in the dark at 4°C individually and brought back to the laboratory. A total of 0.12 m^3 of sediment was collected sieved by hand without seawater addition (the week following the sample collection) through 500 µm to remove macrofauna (i.e. grazers, bioturbators).

The tidal mesocosm consisted in both main and overflow tanks (**Figure 107**). According to Michaud *et al.* (2010), the experimental cores (height: 12 cm; diameter 12.5 cm) were reconstituted layers by layers and placed in the main tanks. Tidal cycles (semi-diurnal cycle, 6h:6h emersion:immersion, two times a day) were simulated with pumps automatically controlled for launch and automatically stopped by a floats system regulating water level in

the main tank. Cores were maintained in experimental mesocosm during the two-weeks stalling period, and seawater used for recirculating system was originated from the sediments sampling site and filtered through 10 µm.

Two weeks after cores installation, inoculation of microphytobenthos was perform using fresh microalgae sampled on the field (0-0.5 cm bsf) and previously sieved through 500 µm mesh. This inoculum was deposited on the top 0.5 cm of each experimental core. Then, the fluorescent-derived parameter F_v/F_m (Vieira *et al.*, 2013) was measured with a PAM (pulse amplitude modulation) and used as a proxy for algae photochemical efficiency.

Two identical tidal mesocosms were created in order to study both day (LGT) and night (NGT) emersion periods (**Figure 107**). Diurnal and tidal cycles were artificially simulated without strong current to prevent microalgae re-suspension (Orvain *et al.*, 2003; Agogué *et al.*, 2014).

Experimental sampling was performed during one day for the two conditions (LGT and NGT) at low tide stall. For the sampling, three individuals cores were randomly chosen, and the corresponding 5 layers of each 3 cores were collected separately, homogenised and then analysed as below.

3.2.3.2 Abiotic parameters

Depth temperature profiles were measured with 3.1 cm-length Hobo sensors (Hobo Pro V2, Massachusetts, USA) fixed on a homemade stick that was vertically pushed into a specific sediment core to stabilize the sensors at the 5 depths (0.5 cm, 1 cm, 2 cm, 5 cm and 10 cm bsf).

Pore water pH and salinity were measured on supernatant after sediment centrifugation (15 min, 3000 g at 8°C) with a pH probe (Eutech Instruments PC150, Waltham, MA, USA) and a conductivity meter (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Germany) respectively.

For nutrient concentration analyses, pore water was immediately sampled from the 12-cm diameter cores on the site for the 5 depths, using the Rhizons® (Rhizosphere Research Products, NL-6706, Wageningen) method (Seeberg-Elverfeldt *et al.*, 2005). Interstitial water was stored at -20°C for further measurements of nitrite NO_2^-, nitrate NO_3^-, ammonium NH_4^+, and phosphate PO_4^{3-}, and at +4°C for silicate $Si(OH)_4$. Nutrient concentrations were determined with an autoanalyzer (Seal Analytical, Nordertedt, Germany) equipped with an XY-2 sampler according to the Aminot and Kérouel method (2007).

3.2.3.3 Biotic parameters

Chlorophyll *a* (Chl *a*), used as a proxy of algal biomass, was assessed by fluorimetry (640 nm, Turner TD 700, Turner Desigs, USA) using 50 mg of freeze-dried sediment extracted at night in the dark at +4°C with 90%-acetone (mixed by repeatedly turning) and centrifuged (10 min, 3500 g, +8°C). Chl *a* concentrations were expressed as µg μg^{-1} dry weight (DW) according to Lorenzen (1966).

Prokaryotic abundance (PA) was evaluated by flow cytometry after a cell extraction procedure according to Lavergne *et al.* (2014). Briefly, the extraction was based on successive dilutions in a detergent mix, a mechanical separation followed by counting the extracted cells stained with SYBRGreen I through flow cytometer.

3.2.3.4 RNA extraction

RNA extraction was performed using the Power Soil™ Total RNA Isolation Kit (MOBIO, CA, USA) following manufacturer recommendations. The RNA samples were quantified (Nanodrop, ND-800, Thermo Scientific, MA, USA), and genomic DNA contaminations were remove by DNase treatment (Turbo DNA-free, Ambion, Life Technologies, CA, USA). Then RNA samples were reverse transcribed with random primers using the SuperScript III (Invitrogen, Life Technologies, CA, USA).

3.2.3.5 RT quantitative PCR

Bacterial and archaeal 16S rRNA and three N-related gene expressions (Table 1) were quantified based on fluorescent dye SYBRGreen I in each sediment DNA extract. The reaction mix (20 µL) contained 0.45 µM of each primer, 0.5-5 ng sample DNA, 10 µL of Master Mix (Maxima SYBRGreen/ROX, Fermentas, Waltham, MA, USA) and qsp 20 µL nuclease-free water. All reactions were performed in triplicates using the thermocycler MxPro3000P (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA, USA) equipped with MxPro software (Version 4.10). For *Archaea* and *Bacteria* quantification, the thermal program used was: 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, 45 cycles of denaturing (30 s at 94°C for *Archaea*, 1 min at 95°C for *Bacteria*), annealing (30 s at 64°C for archaea and 40 s at 57°C for *Bacteria* extension (40 s at 72°C), plate read (1 s at 72°C). The cycling was followed by a final extension at 94°C for 15 sec, and a melting curve analysis from 55 to 94°C with a plate read every 0.5°C.

For N-related genes quantifications, the qPCR program varied between 40 and 45 cycles of denaturation (30 s at 94 °C), annealing (40 s at 55 °C for anammox – *Planctomycetes* 16S rRNA gene, 58 °C for AOA-*amoA*, and 57 °C for *nirS* gene). The qPCR efficiencies were

90.1-101.8% and correlation coefficients (R^2) were always higher than 0.99 (**Table 38**; Supplementary information). Gene expression was expressed as the ratio of number of transcripts and number of 16S rRNA transcripts (bacterial 16S rRNA for *nirS* and Planctomycetes and archaeal 16S rRNA for archaeal *amoA*).

3.2.3.6 454 Pyrosequencing and bioinformatic analysis

Amplification of the V3-V5 region of the 16S rRNA was performed with primers: 563F (AYT GGG YDT AAA GNG) and 907R (CCG TCAA TTC MTT TGA GTT T) (Muyzer *et al.*, 1995) for *Bacteria* and 519F (CAG CCG CCG CGG TAA; Herfort *et al.* (2007)) and 915R (GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT; Casamayor *et al.* (2002)) for *Archaea*. Libraries were created from each five layer (D1 = 0 to 0.5 cm; D2 = 0.5 to 1 cm; D3 = 1 to 2 cm; D4 = 2 to 5 cm and D5 = 5 to 10 cm) and the two conditions (NGT, LGT), triplicates were pooled after amplification. Then, pyrosequencing was achieved by the GATC plateform (Konstanz, Germany) by using a Roche 454 GS-FLX system with titanium chemistry. Raw sequences for *Archaea* and *Bacteria* were cleaned according to procedures consisting in the elimination of sequences presenting ambiguous bases "N", a quality score <30 for *Archaea* and <27 for *Bacteria*, length shorter than 200pb and with a mismatch in the forward primer. The remaining reads were clustered at 97% similarity threshold (Kim *et al.*, 2011) and representative sequence for each OTU were inserted in phylogenetic trees for taxonomic annotation. The process was automated by PANAM that also computed richness and diversity indexes, Chao1 and Shannon respectively (http://code.google.com/p/panam-phylogenetic-annotation/ downloads/list;Taib *et al.* (2013)) and chimeras were detected using UCHIME (Edgar *et al.*, 2011). Finally, 72% of total archaeal sequences and 70% of total bacterial sequences were suitable for the diversity analysis, and thus were randomly resampled down to 800 sequences for the *Archaea* and to 13,000 for the *Bacteria* using PANAM (**Table 39**). In the archaeal dataset, a mean of 3 831 sequences per samples were retrieved ranging from 825 to 7470. The number of sequences was minimal in the sample from 0-0.5 cm bsf during night-time exposure and we made the choice to normalise at 800 sequences to conserve all the samples. Entire dataset for both *Bacteria* (25600 OTUs) and *Archaea* (1065 OTUs) were considered in this study, including singletons.

3.2.3.7 Archaeal C3 group phylogeny

Sequences have been analysed using the ARB software package (version July 2014) (Ludwig *et al.*, 2004) and the corresponding SILVA SSURef 99 database (Yilmaz *et al.*, 2014). All sequences were automatically aligned using the SINA tool (Pruesse *et al.*, 2012). After

importing aligned sequences, manual refinement of the alignment was carried out taking into account the secondary structure information of the rRNA. Tree reconstruction was performed with up to 1000 sequences using the neighbour joining (ARB), and ML (RAxML v8.0.24, Stamatakis (2014)) methods. Based on their abundance and similarities, 31 OTUs were selected and added in the phylogenetic tree. The final tree was calculated with 89 sequences based on 300-400 valid columns (no filtering) with neighbour joining (model: Kimura), bootstrapping method (1000 replications). The final topology of the tree was imported in R (R Core Team, 2013) and OTUs abundances were added as bubbles for each samples branches using the "ape" package (Paradis *et al.*, 2004). The bubbles size was calculated by normalizing abundance data (sum of squares equal to one, using "decostand" function, in the "vegan" package; Oksanen *et al.* (2013)).

3.2.3.8 Statistical analysis

In the results sections, values are presented as mean and standard error (SE). Venn diagram of OTUs abundance was plotted using VENNY (Oliveros, 2007). All other statistical analyses were performed with R software (R Core Team, 2013). The table of OTU abundances from pyrosequencing was standardised using Hellinger transformation and β-diversity matrix was calculated using Bray-Curtis dissimilarity coefficient (Legendre and Legrendre, 1998; Zinger *et al.*, 2011). According to cophenetic correlation the method producing the best clustering model for the dissimilarity matrix was the unweighted arithmetic average clustering method, UPGMA. A dendrogram was thus built by hierarchical ascendant classification (UPGMA) and clusters were determined with the Mantel correlation between the dissimilarity matrix and binary matrices computed from the dendrogram (Borcard *et al.*, 2011) .

3.2.4 Results

3.2.4.1 Abiotic parameters

At the sediment surface, the photosynthetically active radiation (PAR) was 231 ±46 µmol photons m^{-2} s^{-1} during the simulated diurnal low tide (as measured by Licor captor). The ambient temperature varied between day and night due to light warming, mean temperature was 31.2 ±6.3°C during the day emersion, and 20.2 ±0.7°C during night emersion. Sediment temperature was 25.7 ±0.3 °C during day exposure and 19.9 ±0.1 °C during night. Salinity varied from 31.99 ±0.2 during day to 30.5 ±0.3 during night and pH mostly exhibited depth variations ranging from 6.76 to 7.6 at both day and night.

3.2.4.2 Biotic parameters

In surface, chlorophyll biomass (first 0.5 cm) was 173.6 ±20.8 µg g^{-1}sed DW and 90.1 ±4.2 µg g^{-1}sed DW during day and night emersion, respectively. Chlorophyll *a* biomass followed an exponential decrease with depth gradient falling down to 28 µg g^{-1} sed DW after 2 cm bsf. Meiofauna was dominated by nematods accounted for 831 ±323 ind cm^{-3} and 206 ±66 ind cm^{-3}. Predation pressure by meiofauna was estimated with predation rate from Pascal *et al.* (2009) and was found to affect less than 5.6% of the total bacterial production during day (data not shown) and less than 1.3% during night.

As measured by qPCR, 16S rRNA expression of *Archaea* was two orders of magnitude lower than bacterial expression. The percentage of active archaea to the total active prokaryotes was on average, 0.31 ±0.02% and 0.40 ±0.06%, during light and night emersion, respectively. Noticeable difference was observed during night exposures between 5-10 cm bsf with maximal archaeal 16S rRNA expression accounted for 0.62 ±0.07% of total prokaryotic 16S rRNA expression. Ammonia oxidizing archaea (AOA) activity was quantified by targeting the archaeal *amoA* gene expression. The percentage of AOA to archaeal 16S rRNA ranged from 0 to 0.17%, was maximal during night exposure between 1-2 cm bsf and minimal between 5-10 cm bsf during night too.

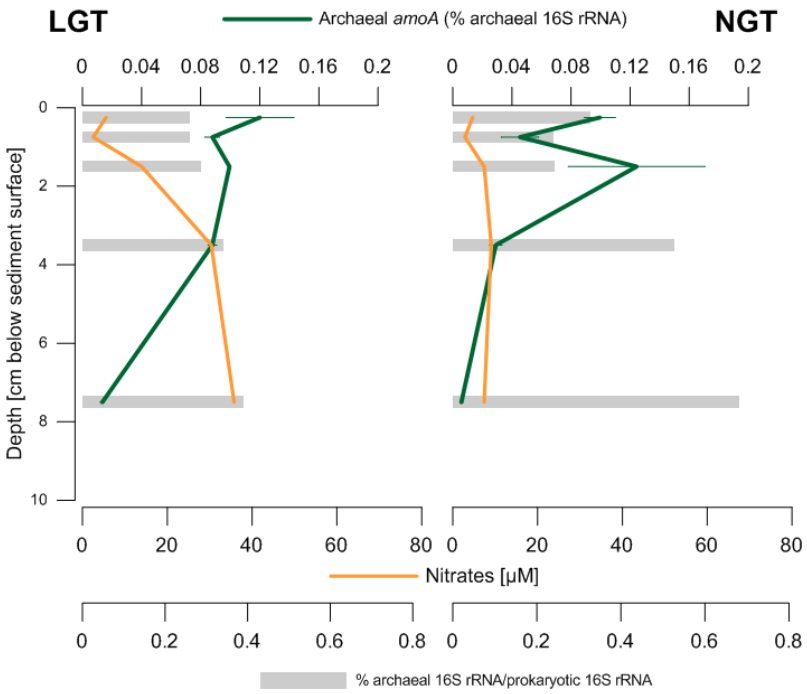


Figure 102. Vertical profiles of archaeal *amoA* relative abundance to total archaeal 16S rRNA expression, relative abundance of total archaea (% total prokaryotic 16S rRNA) and pore water nitrates concentration [µM] during day (LGT) and night (NGT) emersion.

3.2.4.3 Active bacterial 16S rRNA diversity

The presence of an active microphytobenthic biofilm was confirmed by retrieving plastids sequences in our bacterial dataset. These plastids were highly abundant between 0 to 1 cm bsf by representing 33-56.6% of total active bacterial dataset (**Figure 103**).

The active bacterial diversity sequences fell into 42 phyla among the most currents known bacterial phyla (including Candidates and other environmental lineages). A total of 15 724 singletons (61.42% of total sequences) were retrieved, representing 12.1% of total bacterial sequence abundance. Coverage values (71.8-88.4%) and rarefaction curves (**Figure 108**, Supplementary information) indicated that we assessed a large part of the active bacterial community. The calculated diversity indicators pointed out that no differences occurred between day and night exposures (t-test; t = -0.4247, df = 7.108, $p > 0.05$; **Table 39** Supplementary information). Nevertheless, discrepancies were observed among depth seeing that bacterial OTUs richness increased with depth with a maximum at 10 cm bsf during the day and 2 cm bsf during night (**Table 39**; Supplementary information). We also recorded differences in Shannon index values between day and night in surface (0-0.5 cm bsf) with 4.67 for the daytime emersion and 6.54 for the night-time emersion (**Table 39**; Supplementary

information). Higher OTUs richness, and thus higher Shannon indexes values, were found in surface sediment during night compared to day exposure.

The 2 major bacterial groups were *Proteobacteria* and *Planctomycetes*. *Proteobacteria* tended to increase with depth (from 27.4% to 66.8%). Within the *Proteobacteria*, a systematic dominance of both γ- and δ-proteobacteria (75.8% pf proteobacteria affiliated sequences) was recorded. The γ-proteobacteria were mainly retrieved in surface from 0-2 cm bsf and δ-proteobacteria characterized deeper horizon from 5-10 cm bsf. The α-proteobacteria accounted for 13-22% of *Proteobacteria*, and were more active in surface. The remaining *Proteobacteria* such as β- and ε-proteobacteria were represented by less than 5% of total *Proteobacteria* sequences (**Figure 103**). *Planctomycetes* accounted for 4-7% in each samples except in surficial sediments (0-0.5 cm bsf) during daytime exposure where they were found at low abundance (0.8 %). *Planctomycetes* consisted of almost 44% of Phycisphaerae and 18% of Planctomycetacia. δ- and γ-proteobacteria exhibited a rich diversity with 5858 and 5535 OTUs number respectively.

3.2.4.4 Active archaeal 16S rRNA diversity

The archaeal cDNA library contained 1065 OTUs with 610 singletons sequences representing 57.28% of OTUs number and 7.62% of total archaeal sequence abundance. *Thaumarchaeota* dominated the overall archaeal community (48-78%) as compared to others archaeal lineages. *Thaumarchaeota* was mainly represented by the Marine Group I (MGI) and C3 group accounted for 4.6-78.8% and 6.5-71.5%, of total archaeal sequences, respectively (**Figure 104**A). All major archaeal phyla (*Thaumarchaeota, Crenarchaeota* and *Euryarchaeta*) were retrieved in the overall dataset and only few sequences fell into Methanomicrobia (less than 0.125% of active archaeal community) and no *Korachaeota* or *Nanoarchaeota* were found.

For the sediment surface (0-0.5 cm bsf), the Shannon index values were 3.71 during daytime and 4.39 during night-time (**Table 39**; Supplementary information). The Venn diagram of shared OTUs without singletons sequences (**Figure 110**; Supplementary information) revealed a strong archaeal core microbiome between both day and night emersion (whatever the depth). The singletons were mainly affiliated to *Euryarchaeota* Halobacteria, deep hydrothermal vent group-6 (DHVEG-6) resulting in a high diversity of Halobacteria OTUs (**Figure 104**B) with a total of 370 OTU_s. The second most diverse taxa was the Rice Cluster V (RC-V) group exhibiting 241 OTUs. Interestingly, MGI did not harboured high OTUs diversity with only 122 OTUs sequenced in the active archaeal library.

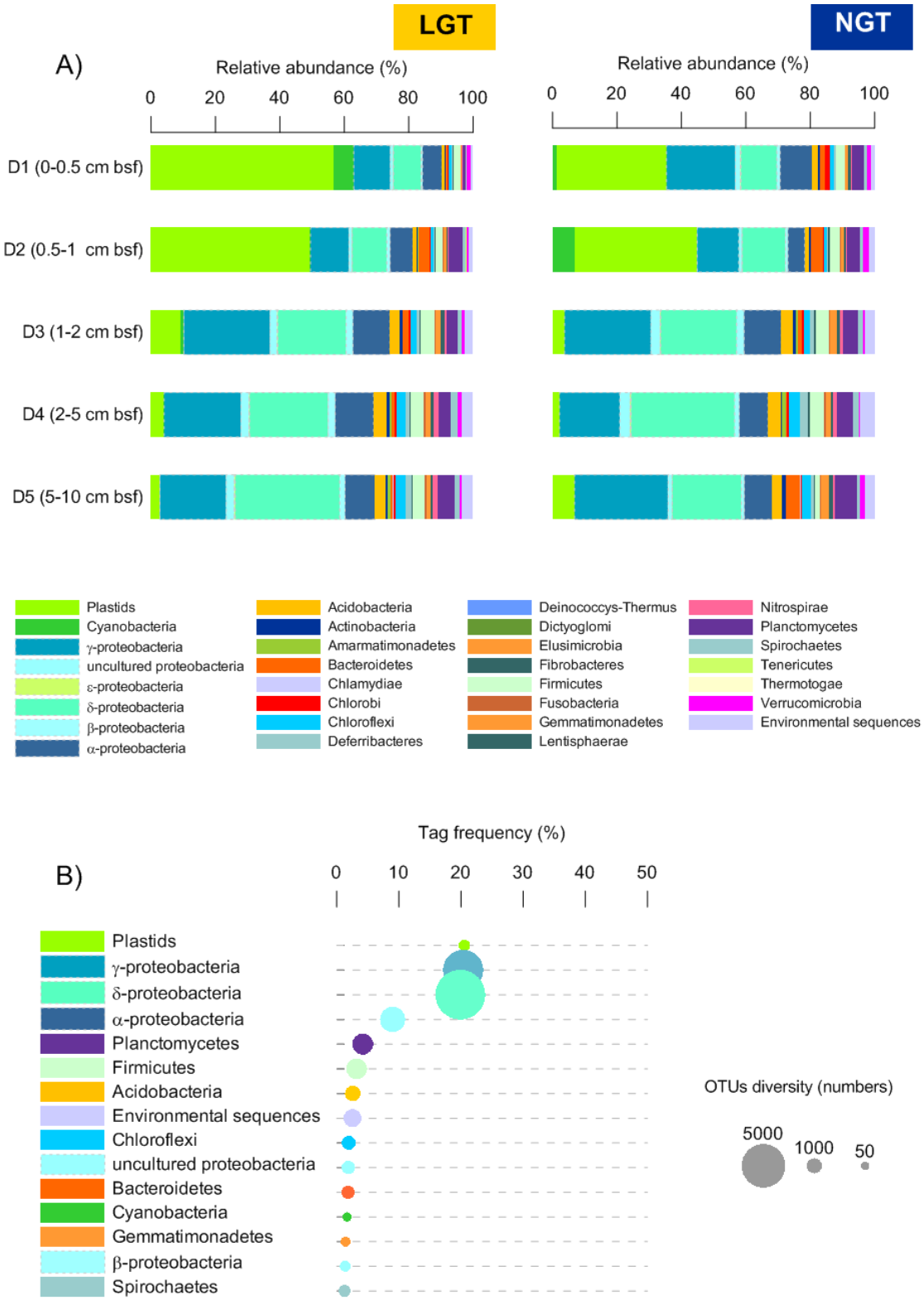


Figure 103. A) 16S rRNA relative abundance and affiliation of the total bacterial operational taxonomic units (OTUs) on the phylum level (except for *Proteobacteria*) between day (LGT) and night (NGT) emersion periods among 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm below sediment surface. B) Tag frequency and number of 16S rRNA bacterial OTUs within each phylogenetic group.

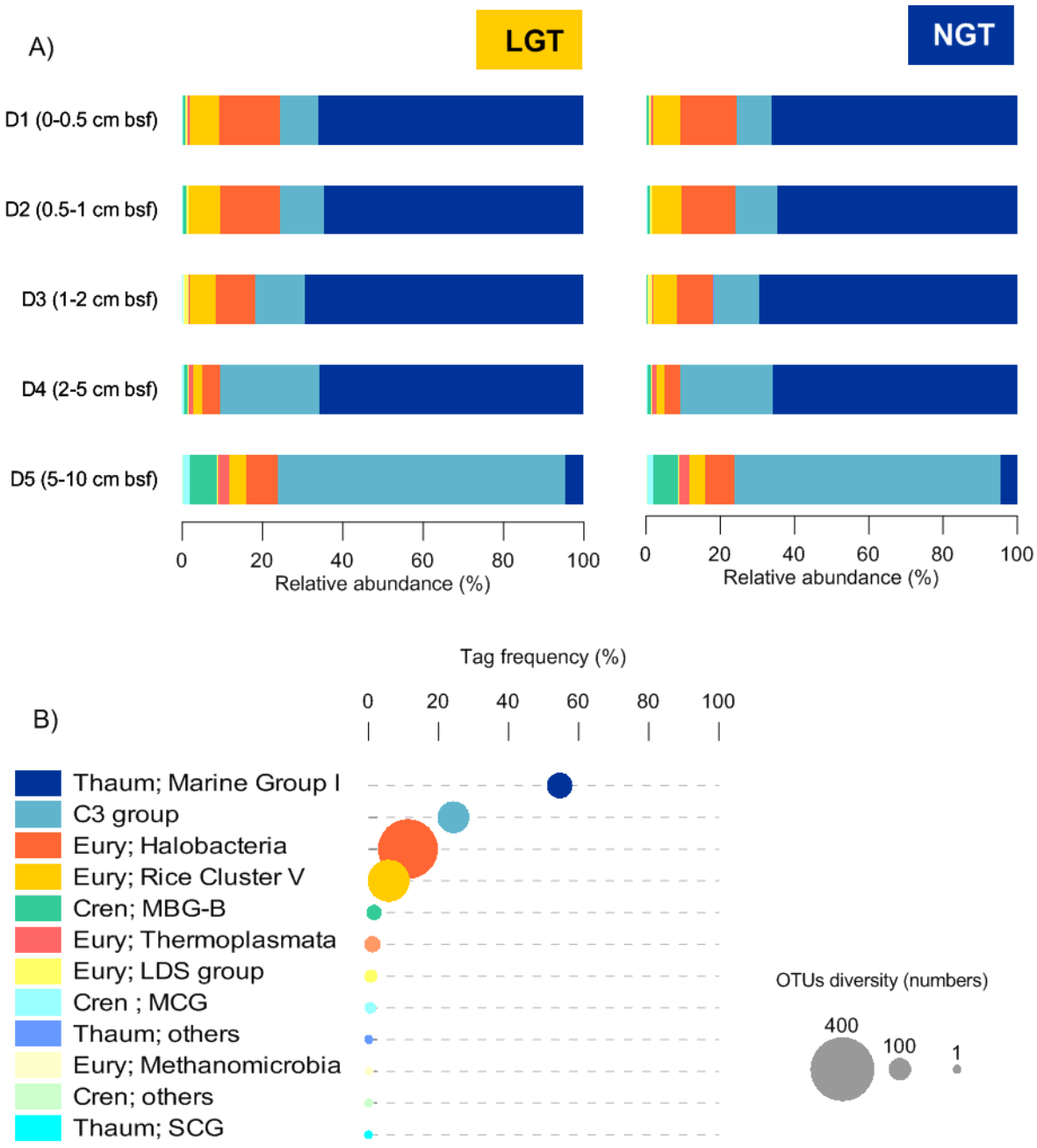


Figure 104. A) Relative abundance and affiliation of total archaeal 16S rRNA operational taxonomic units (OTUs) between day (LGT) and night (NGT) emersion periods among 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm below sediment surface. B) Tag frequency and number of 16S rRNA archaeal OTUs within each phylogenetic group.

3.2.4.5 Horizon segregation of active diversity at day and night emersion

The clustering analysis based on the β-diversity (Bray-Curtis dissimilarity matrix) divided the active bacterial structure in 3 clusters corresponding to 3 different depth horizons. The first cluster, "surficial cluster", distinctly separated the sediment horizon of 0-1 cm bsf characterized by plastids dominance. By opposition, we observed a "deep cluster" identified by the low plastid expression and 32% of δ-proteobacteria. The last group named "mixed assemblages" as it is considered as a mix between surficial and deep horizons. In this last group, the deeper layer (D5 from 5-10 cm bsf) during night exposure was less similar to the other group members. This sample exhibited lower active δ-proteobacteria than 'real' deeper samples but more active *Planctomycetes* (6.74%) and Bacteroidetes (4.36%).

Differential horizon segregation was deduced from archaeal β-diversity analysis. A clear vertical-depth pattern was recorded splitting the stratification in two horizons defined by the shift from Marine Group I (MGI) to C3 group dominance. The very low values of dissimilarity highlighted the stable diversity of active archaea in our samples. Nevertheless, the sharp shift from MGI to C3 group pointed out a clear change in the sedimentary properties.

(Preliminary results)

The 149 OTUs related to the C3 group represented 1940 sequences, corresponding to 24.5% of total archaeal sequences. A phylogenetic analysis was focused on selected C3 group-related OTUs, with C3 group-identified sequences from SILVA database (Quast *et al.*, 2013; Yilmaz *et al.*, 2014). Almost all the sequences were originated from sediments (**Figure 106**). Most of the OTUs fell into the "estuarine group", notably the most abundant OTU ARCH872 (5.45% of total active archaeal abundance) which was close to marine sediments from microcosms (JF931524, JF931441) and estuarine sediments from China (HQ267250, EF125478, and JQ245936).The "extreme group" contained sequences retrieved from hydrothermal vents (AB301865 and AB611390) and five sequences from our study (**Figure 106**). We also observed a "deep/cold group" composed by diverse sequences originating from various environments and 14 OTUs fell into this group. OTU ARCH1547 was closed to sequences from *Thaumarchaeota* MGI Candidatus Nitrosopumilus (CP003843 and CP003842) (**Figure 106**).

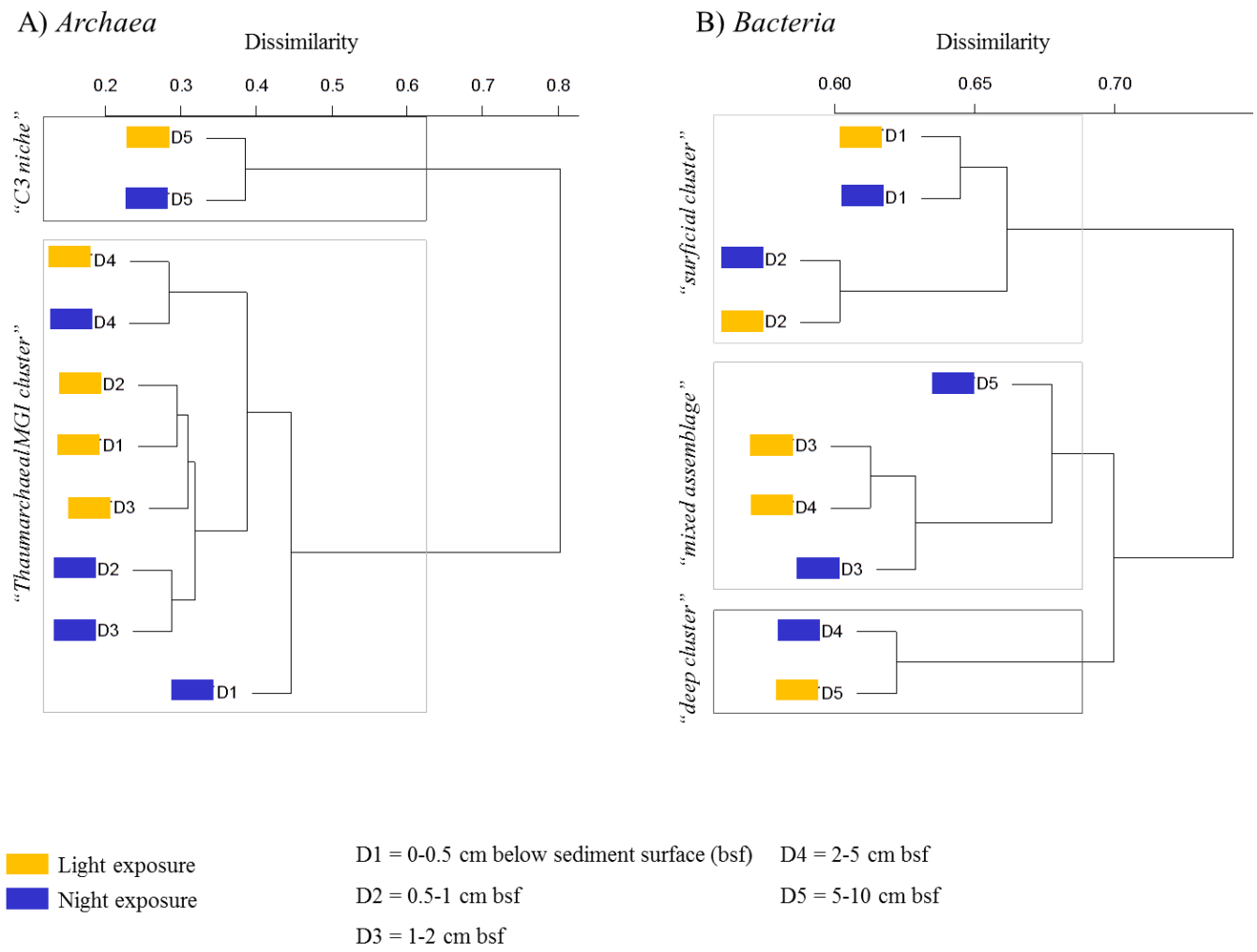


Figure 105. Hierarchical ascendant classification dendrogram (unweighted arithmetic average clustering, UPGMA) based on Bray-Curtis dissimilarity matrix of abundance of total archaeal OTUs (Hellinger-transformed).

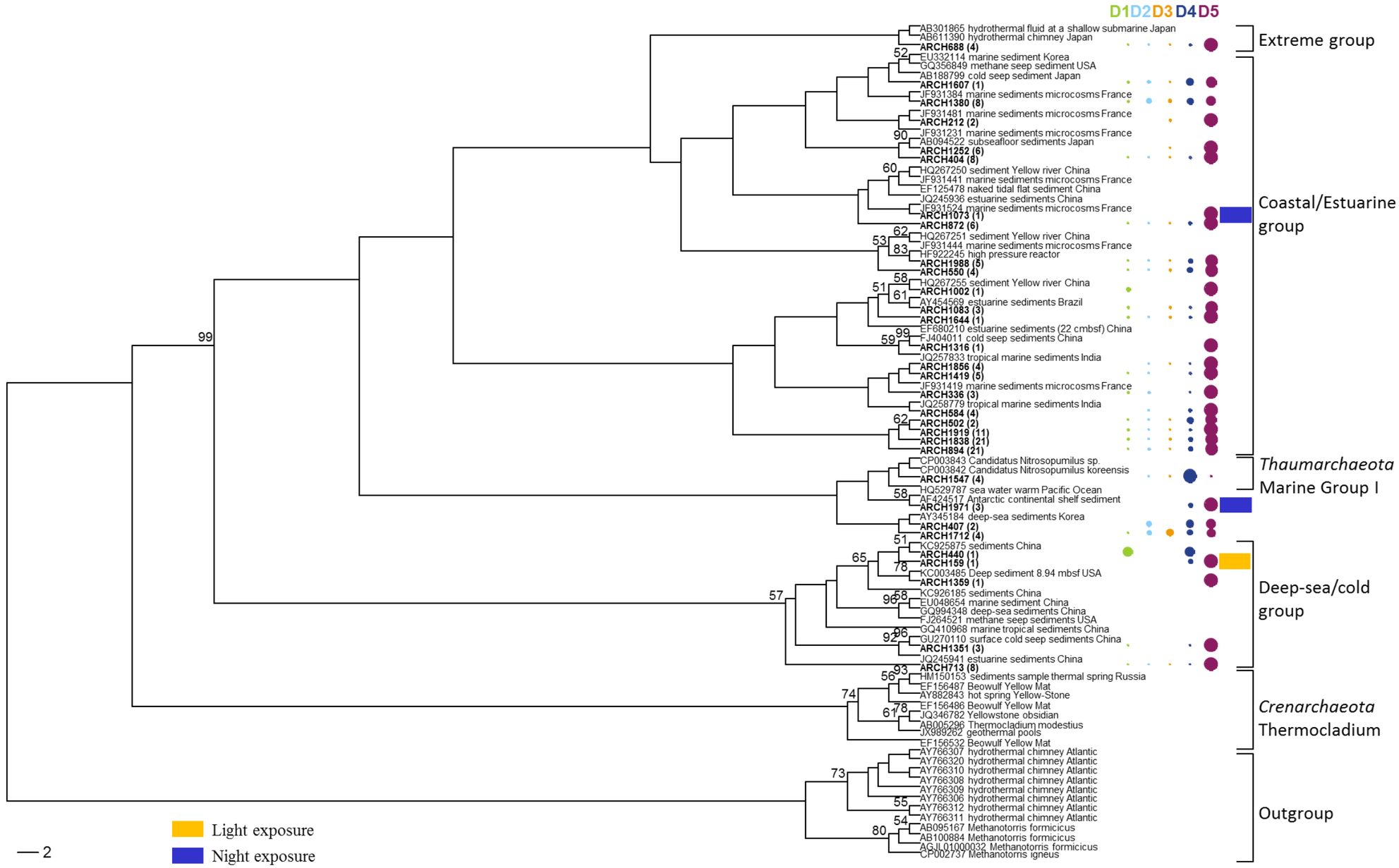


Figure 106. (preliminary tree) Phylogenetic tree of C3 group (*Thaumarchaeota*) constructed using selected 16S rRNA OTUs (max length = 400 pb) and related sequences from SILVA. The tree was built with the neighbour joining method by using the Kimura distance (ARB software). Values at nodes indicate bootstrap percentages for 1000 replicates. Values less than 50% are not reported. Scale bar indicates a Kimura distance of 2. Values in parentheses indicate the number of close OTUs in the dataset. The bubbles size was calculated by normalizing abundance. For each OTU, bubble size was maximal when abundance was maximal in the considered depth. The most abundant OTU was underlined.

3.2.5 Discussion

The first aim of this study was to investigate prokaryotic active diversity in an intertidal mudflat during both day and night emersion periods. Sampling during night implies different logistic and security issues; accordingly, we developed a tidal mesocosm which is a convenient tool to collect easily benthic samples at night. Moreover, aiming at simplifying the complexity of intertidal mudflats ecosystems, in this study, we removed macrofauna that can be major bacterial grazers (Pascal *et al.*, 2009) and can strongly impact sediment vertical structuration by surficial compounds and oxygen input in deeper sediments layers (Laverock *et al.*, 2011). Nevertheless, we did not remove the meiofauna which can act as sediment engineers and grazers of prokaryotes (Hubas *et al.*, 2010). Although calculated predation pressure was low, it may result in the 40% increasing of prokaryotic abundance during night emersion. Indeed, at night-time, prokaryotic abundance was higher but bacterial production lower than at daytime confirming a potential impact of nematods on prokaryotic abundance during day emersion. Additionally, we strongly decreased hydrodynamic pressure and thus decreased resuspension phenomenon suspected to shape prokaryotic communities on the field. Indeed, erodimetry experiments were done in the Marennes-Oleron bay showing an impact of sediment resuspension on both diversity structure and enzymatic activity of prokaryotic communities (Mallet *et al.*, 2014).

Chlorophyll *a* biomass was lower during night compared to daytime. This is congruent with a lower activity of plastids recorded by bacterial 16S rRNA pyrosequencing. Preliminary affiliation of these eukaryotic sequences suggested that the plastid belong to diatom species from Bacillariophyta (best hit: AF514848, AF514855, AF514847). We also noted that during night emersion, plastids were more active between 0.5-1 cm bsf, this could indicate that diatom did not migrate at the sediment surface during night emersion (Consalvey *et al.*, 2004). These results indicated that biofilm influence was high during the day as confirmed by positive values of primary production (data not shown).

3.2.5.1 Diurnal and vertical patterns of active prokaryotic diversity

Whatever the diurnal condition, the *Proteobacteria* were the metabolically active dominant *Bacteria* in our samples. Nonetheless, many bacterial phyla were retrieved pointed out an interesting diverse active bacterial community. This diversity appeared to increase with depth until to 10 cm bsf during day and until 5 cm during night-time associated with the same increasing trend of δ-proteobacteria. Between 5 and 10 cm bsf at night emersion, the diversity decreased and the γ-proteobacteria dominated over δ-protebacteria, especially, the γ-proteobacteria were composed by two specific phylogenetic groups: the OM60/NOR5 and the Dasania clades. The OM60/NOR5 clade seems to be preferentially retrieved in marine coastal waters and sediments and can represent 4% of total DAPI-counts in intertidal North Sea sediments (Yan *et al.*, 2009). The presence of the Dasania clade was more surprising as this genus is reported to contain obligatory aerobic Bacteria (Lee *et al.*, 2007). The Dasania clade represented 3.55% of the active bacterial community between 5 and 10 cm bsf during night while this horizon was anoxic.

Considering both bacterial and archaeal active diversity, OTUs richness was higher in surface sediment (0-0.5 cm bsf) during night compared to day exposures. In addition, *Thaumarchaeota* were predominant in the active archaeal community but their relative abundance gone below 50% in surface (0-0.5 cm bsf) during night exposure, where Halobacteria increased up to 25% of the archaeal diversity. The active prokaryotic diversity was more important during night exposures compared to daytime but clustering analysis showed no significant differences suggesting that this diversity contained a large part of redundancy within the phylogenetic groups. These results showed that while the diversity seemed increased at night-time, the functionality may not be different. It pointed out that MPB activity should have a negative impact on both bacterial and archaeal active diversity in surface (0-0.5 cm bsf).

The core analysis without singletons on the archaeal dataset (Venn diagram) could result in skewed conclusions of a strong core microbiome between day and night with few specific OTUs. Adding singletons sequences resulted in any core microbiome modification but changed the specific structure of day and night samples which is consistent with the necessity to consider archaeal singletons in our analysis. The major differences between diurnal conditions were thus associated with one group bringing out a phylogenetic redundancy in the microbiome. When the phylogenetic redundancy is associated with a limited function, it could led to functional redundancy and thus do not implies a change in the ecosystem function

(Miki *et al.*, 2014). The Halobacteria are aerobic chemo-organotrophs and were majorly retrieved in surficial sediments in our samples. Nonetheless, in absence of oxygen, they can switch to anaerobic metabolism using alternative terminal electron acceptor such as nitrate (Bickel-Sandkötter *et al.*, 1996) which is reliable with our data showing that Halobacteria could represent until 10% of the active archaeal community between 5-10 cm bsf (**Figure 104**A). Therefore, Halobacteria may play differential roles in oxygenic and anoxygenic zones. Accordingly, Halobacteria-affiliated OTUs may putatively not result in functional redundancy but provide diverse functions in the different layers of the sediments.

Active archaeal communities were dominated by *Thaumarchaeota* Marine Group I (MGI) from 0 to 5 cm bsf. These assemblages showed few discrepancies between day and night emersion periods (**Figure 105**). This dominance contrasted to findings in another microcosm experiment from French mudflat showing a large abundance of metabolically active *Crenarchaeota* (Stauffert *et al.*, 2014) mainly belonging to Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG). In peatland, archaeal active assemblage was characterized by methanogens with less than 10% of MGI (Hawkins *et al.*, 2014). Major active MGI suggested a main influence of nitrogen cycle in intertidal mudflats. Indeed, *Thaumarchaeota* MGI were reported as major ammonia oxidizers in various environments such as deep (Agogué *et al.*, 2008) or estuarine waters (Bernhard *et al.*, 2007), marine sediments (Francis *et al.*, 2005), lakes (Auguet and Casamayor, 2013), or soils (Jung *et al.*, 2014).

3.2.5.2 What are the functional roles of the group C3 in deep horizon?

The metabolically active archaeal community composition drastically changed after 5 cm depth for a dominance of the C3 group (65.5-71.5% total sequence abundance). This sharp shift suggested drastic modifications in the sedimentary properties, as *Archaea* C3 group are supposed to be specific from anoxic sediments (Kubo *et al.*, 2012). This phylogenetic group was previously considered as Miscellaneous Crenarchaeotic Group (MCG) (Inagaki *et al.*, 2006a; Hirayama *et al.*, 2007) or MCG-15 (Kubo *et al.*, 2012) and no member has been cultivated yet. No functional role was assigned to this group and according to SILVA database, many of them have been found in sediments, particularly in marine sediments (**Figure 106**). Phylogenetic analysis of sequences affiliated to C3 group was performed in order to investigate the diversity of this group. The C3-affiliated OTUs fell into clusters represented by sequences originated from various ecosystems, such as hydrothermal vents (Hirayama *et al.*, 2007; Wemheuer *et al.*, 2013), methane seep, cold seep (Fang *et al.*, 2006; Dang *et al.*, 2010a), or estuarine sediments (Stauffert *et al.*, 2014). Although this phylotype

has been retrieved in diverse environments it was rarely recorded to be abundant or active in any ecosystem, yet. In this study, member of C3 group were mostly active between 5-10 cm bsf and did not express archaeal *amoA* (**Figure 102**) despite their affiliation to *Thaumarchaeota*, putatively ammonia oxidizers (Konneke *et al.*, 2005). In a study describing the MCG group including C3 one, Kubo *et al.* (2012) found no proof supporting the hypothesis of Biddle *et al.* (2006) suggesting that C3group may be involved in the methane oxidation. The question of the carbon and energy source used by C3 group was asked previously by Kubo *et al.* (2012) for the overall MCG archaea and no answer have been found yet. Recently, C3 group have been affiliated to *Thaumarchaeota* in the SILVA database, reopening the debate on the C3 functional role. By analogy to Kubo *et al.* (2012), who proceeded by eliminating hypothesis, we showed in this study that C3 did not express archaeal *amoA*. Additionally, the shift of C3 is sharp as they represented less than 25% of the overall active archaeal community from 2-5 cm bsf and more than 65% between 5-10 cm bsf. Tentative correlations with many environmental variables such as exopolymeric content, temperature, pH, or nutrients, failed to explain the C3 group distribution. Nevertheless, depth and ammonium concentrations were found to better explained this shift. This information only confirmed the deep C3 group ecological niche as ammonium concentration increased in deeper horizons. Using stable-isotope probing (DNA-SIP), Webster *et al.* (2010) found an active utilization of acetate in anaerobic marine sediments partially due to archaeal member of MCG and putatively C3 group between 20 and 40 cm bsf. Because affiliation of this group is still in debate, it is difficult to confirm that the OTUs affiliated to C3 group retrieved in our study could use acetate as a substrate. Their observation of acetate utilization in anaerobic zone of intertidal sediment could fit with our findings of active C3 members in anoxic sediments and can be a first hypothesis for understanding the C3 group functional role in anoxic intertidal sediments.

3.2.6 Conclusion

It becomes essential to unravel active prokaryotic community structure, linked to functionality in coastal ecosystem. To our knowledge, we reported the first description of active prokaryotic community during day and night emersion periods in muddy sediments from intertidal flat. *In situ* sampling in these ecosystems is difficult during night. In this study, we solved this field limitation by developing a very convenient tidal mesocosm suitable for microorganisms' assessments.

All the features brought out that day and night exposures had a weak impact on active prokaryotic community of the top 10 cm of muddy sediments. Nevertheless, noticeable discrepancies were recorded in surface (0-1 cm bsf) and were linked to higher activity of microphytobenthos during the day emersion. Interestingly, diatoms photosynthesis seemed to inhibit the active bacterial diversity between 0-1 cm bsf. *Thaumarchaeota* MGI was the most active group between 0-5 cm bsf, deeper, members of the C3 group (uncultivable yet) represented more than 65% of the active archaeal community. These organisms are poorly known and are mainly found in sediments (Inagaki *et al.*, 2006a). Our study highlighted that these C3 members may not be able to express *amoA* gene. Nevertheless, it raises many questions about their functional role in anoxic sediment and concerning their energy and carbon sources. While we pointed out a major role of this phylotype for sediment ecosystems, further work will be needed in order to evaluate their physiology and functionality in anoxic sediments.

3.2.7 Data Accessibility

- 16S rRNA gene sequences from 454 pyrosequencing output files (FASTA and quality) : Dryad doi : doi:10.5061/dryad.qg08q

3.2.8 Supporting information

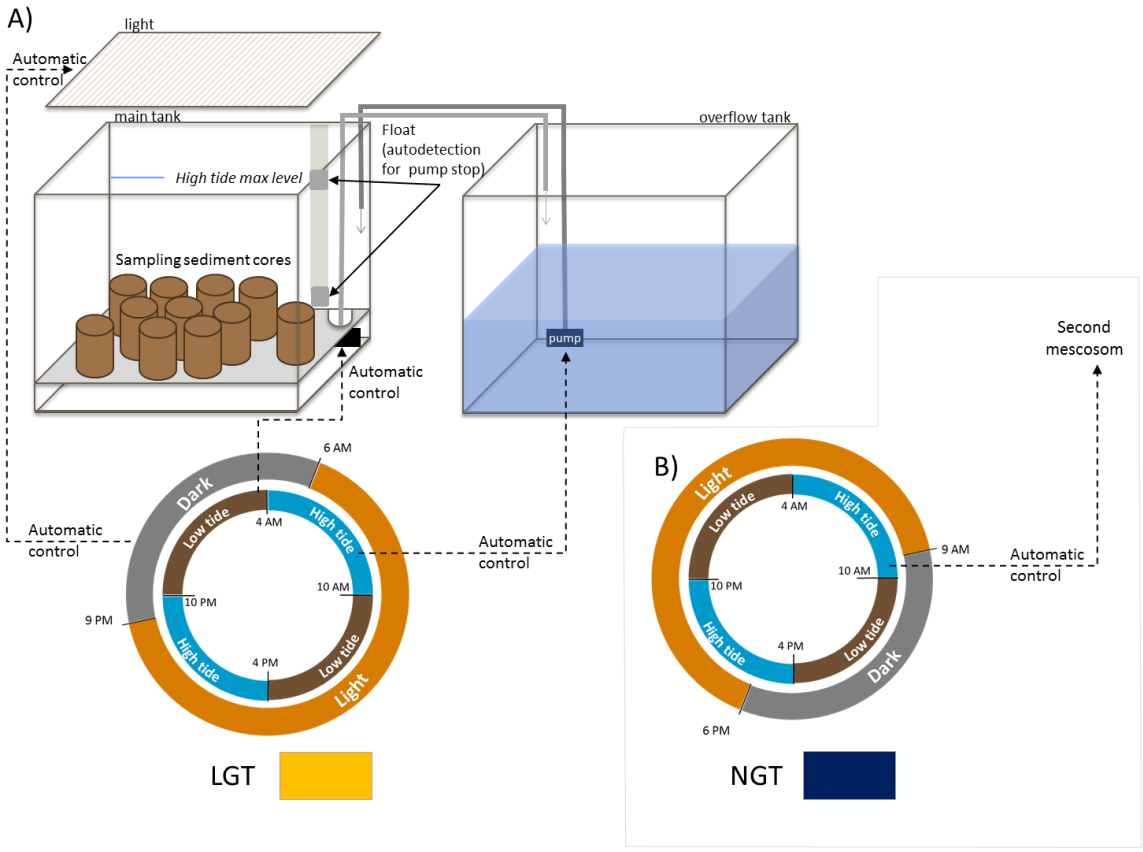


Figure 107. Schematic view of the mesocosm used for day/night measurements. One mesocosm consisted in two tanks: main and overflows tank. A) mesocosm dedicated to light emersion sampling (LGT, shown in this figure), B) mesocosm dedicated to night emersion sampling (NGT, identical as LGT mesocosm, only automatic schedule changed).

Table 38. Primers used for the quantification of Bacteria, Archaea and nitrogen-related genes

Target	Processes targeted	Genes	Name	Sequence (5'->3')	Reference	Annealing temperature (°C)	Efficiency (%)	R^2
Bacteria	-	16S rRNA	b341F	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer *et al.* (1993)	57	101.8	0.994
			518R	ATT ACC GCG GCT GCT GG				
Archaea	-	16S rRNA	931F	AGG AAT TGG CGG GGG AGC A	Einen *et al.* (2008)	64	100.4	0.999
			M1100r	BGG GTC TCG CTC GTT RCC				
Archaeal *amo*A	Nitrification (ammonium oxidation)	*amoA*	Arch-amoa-for	CTG AYT GGG CYT GGA CAT C	Wuchter *et al.* (2006)	58	100-97.5	0.991-0.994
			Arch-amoa-rev	TTC TTC TTT GTT GCC CAG TA				
Bacterial *nirS*	Denitrification (nitrite reduction)	*nirS*	Cd3aF	GTS AAC GTS AAG GAR ACS GG	Throbäck *et al.* (2004)	57	90.1-94.6	0.994-0.990
			R3cd	GAS TTC GGR TGS GTC TTG A				
Anammox bacteria	Anammox (anaerobic ammonia oxydiation)	16S rRNA	808F	ARC YGT AAA CGA TGG GCA CTA A	Dale *et al.* (2009)	55	91.8-94.3	0.999-0.998
			1040R	CAG CCA TGC AAC ACC TGT RAT A				

Degenerated sites : B = CGT, R = AG, S = CG, and Y= CT

Table 39. Diversity indicators for the bacterial and archaeal 16S rRNA gene in sediments samples at day emersion (LGT) and night emersion (NGT) across 5 layers: D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm, D4 = 2-5 cm, D5 = 5-10 cm.

Bacteria (16S rRNA)

	OTUs (97%)	Coverage (%)	Chao1	Shannon Index	ACE
LGT					
0-0.5 cm bsf	2652	88.3	5 787	4.67	6 505
0.5-1 cm bsf	3574	84.8	7 412	5.85	8 268
1-2 cm bsf	4979	79.7	9 543	7.61	10 393
2-5 cm bsf	5595	76.6	10 849	7.93	12 424
5-10 cm bsf	5596	75.3	12 236	7.87	13 433
NGT					
0-0.5 cm bsf	4006	82.7	7 939	6.54	9 195
0.5-1 cm bsf	3598	85.4	6 811	6.13	7 256
1-2 cm bsf	6207	71.8	13 709	8.10	15 646
2-5 cm bsf	5809	74.6	11 625	8.00	13 542
5-10 cm bsf	3748	88.4	5 085	7.24	5 324

Archaea (16S rRNA)

	OTUs (97%)	Coverage (%)	Chao1	Shannon Index	ACE
LGT					
0-0.5 cm bsf	217	87.1	519	3.71	544
0.5-1 cm bsf	240	86.3	481	3.86	655
1-2 cm bsf	226	86.5	860	3.85	734
2-5 cm bsf	200	90.1	387	3.83	442
5-10 cm bsf	248	88.6	327	4.38	344
NGT					
0-0.5 cm bsf	275	83.4	649	4.39	685
0.5-1 cm bsf	192	90.3	265	3.50	279
1-2 cm bsf	179	78.3	870	3.19	1 172
2-5 cm bsf	228	86.0	475	3.88	641
5-10 cm bsf	285	85.5	426	4.57	443

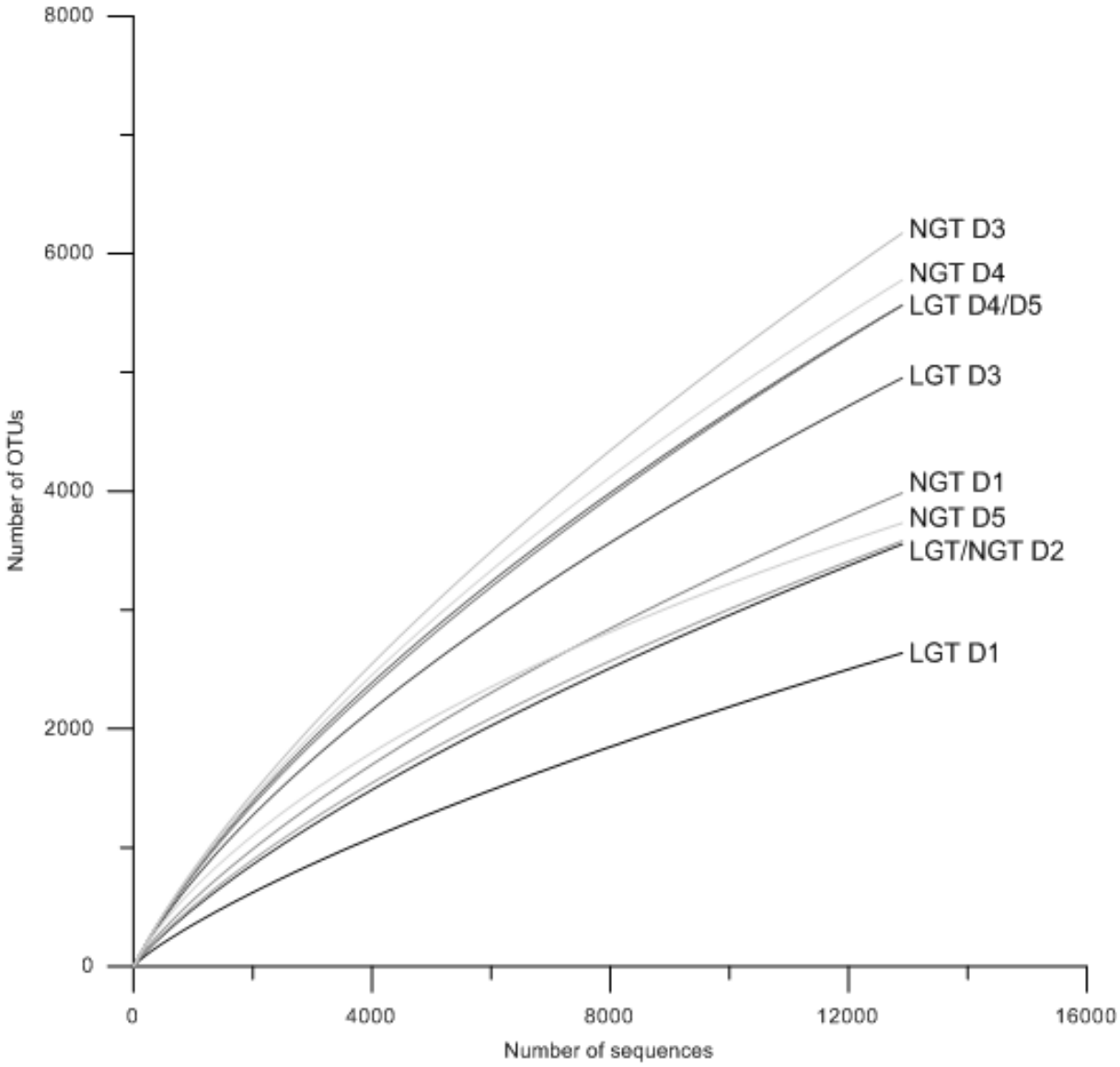


Figure 108. Rarefaction curves from the bacterial 16S rRNA library (OTUs, 97% cutoff, normalized dataset at 13000 sequences per sample) in the 10 sediment samples (LGT = light exposures, NGT = night exposures; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm).

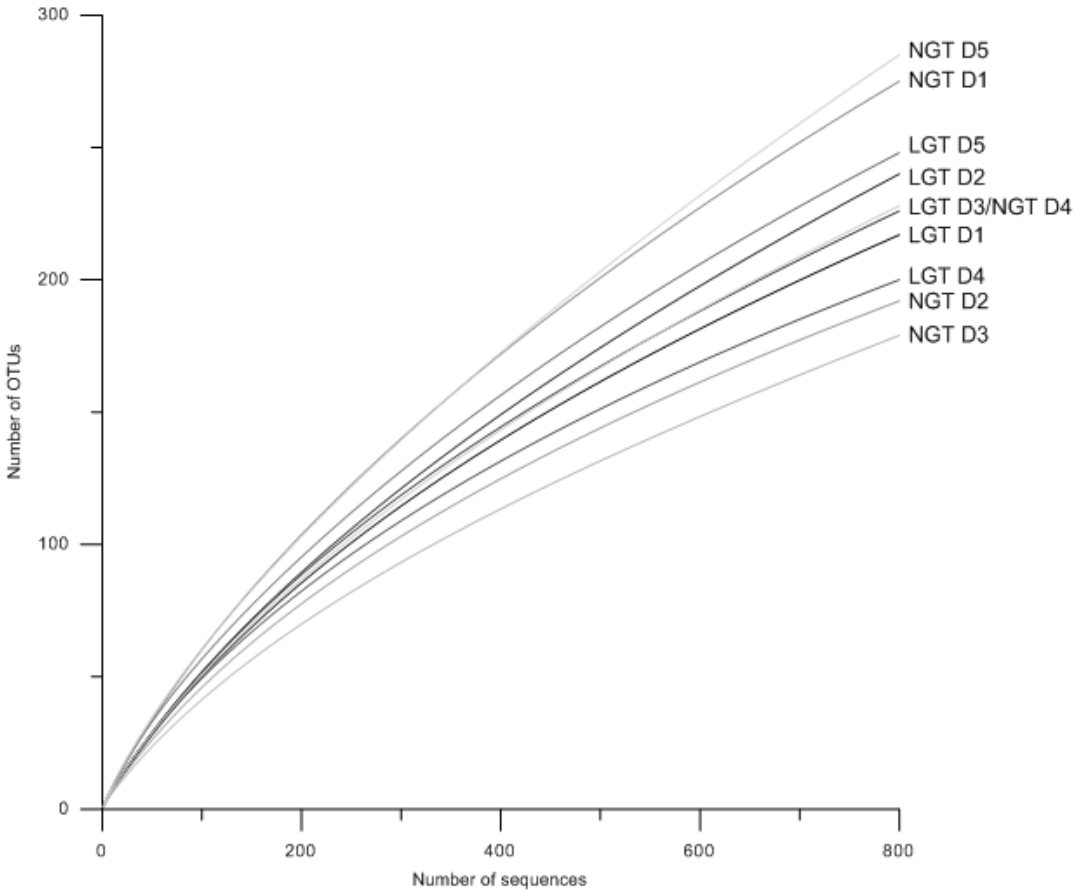


Figure 109. Rarefaction curves from the archaeal 16S rRNA library (OTUs, 97% cutoff, normalized dataset at 800 sequences per sample) in the 10 sediment samples (LGT = light exposures, NGT = night exposures; D1 = 0-0.5cm, D2 = 0.5-1 cm, D3 = 1-2 cm).

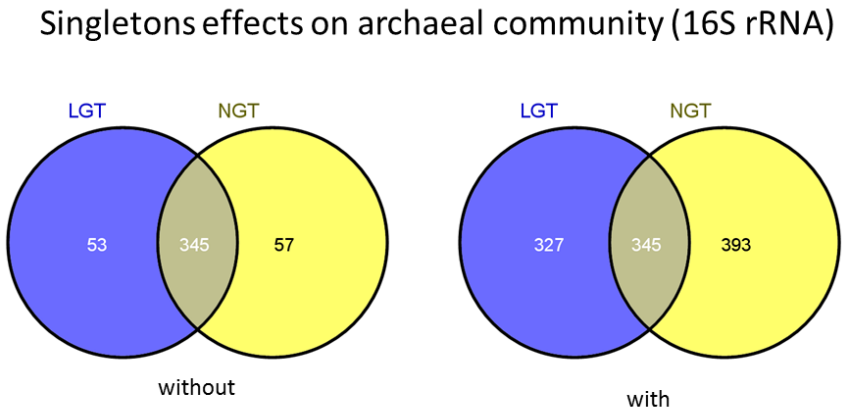


Figure 110. Venn diagram based on shared membership by presence/absence of archaeal OTUs, without and with singletons OTUs

Table 40. Number of OTUs represented by the selected OTUs inserted in the tree (**Figure 106**) and relative abundance in each samples.

	number of OTUs represented	LGT	NGT	D1 (0-0.5 cm bsf)	D2 (0.5-1 cm bsf)	D3 (1-2 cm bsf)	D4 (2-5 cm bsf)	D5 (5-10 cm bsf)
MGI-affiliated								
ARCH1547	**4**	0.59%	0.68%	-	0.64%	0.69%	2.37%	0.09%
Extreme group								
ARCH688	**4**	2.77%	2.73%	2.05%	2.55%	2.07%	1.85%	3.29%
Deep/cold group								
ARCH713	**8**	0.99%	1.02%	0.68%	0.64%	1.38%	0.26%	1.32%
ARCH1351	**3**	0.59%	0.23%	0.68%	-	-	0.26%	0.56%
ARCH1359	**1**	0.30%	0.46%	-	-	-	-	0.66%
ARCH159	**1**	0.40%	0.91%	-	-	-	0.79%	0.85%
ARCH440	**1**	0.20%	-	0.68%	-	-	0.26%	0.00%
ARCH1712	**4**	3.26%	1.48%	2.05%	4.46%	8.28%	2.64%	1.32%
ARCH407	**2**	0.40%	0.91%	0.00%	1.91%	0.00%	1.06%	0.47%
ARCH1971	**3**	-	0.46%	-	-	-	0.26%	0.28%
Total D/C	**23**	**6.13%**	**5.46%**	**4.11%**	**7.01%**	**9.66%**	**5.54%**	**5.46%**
Coastal/estuarine group								
ARCH894	**21**	7.22%	6.14%	4.11%	8.92%	6.21%	7.39%	6.59%
ARCH1838	**21**	13.25%	11.83%	18.49%	13.38%	17.24%	13.19%	10.82%
ARCH1919	**11**	2.57%	2.96%	4.11%	1.27%	3.45%	1.85%	3.01%
ARCH502	**2**	1.29%	1.59%	1.37%	1.27%	1.38%	2.11%	1.22%
ARCH584	**4**	0.30%	0.80%	-	0.64%	-	0.53%	0.66%
ARCH336	**3**	1.19%	1.37%	2.05%	1.91%	-	0.53%	1.51%
ARCH1419	**5**	1.58%	1.48%	1.37%	0.64%	-	1.06%	2.07%
ARCH1856	**4**	2.87%	2.05%	-	0.64%	0.69%	0.26%	4.14%
ARCH1316	**1**	0.00%	0.23%	-	-	0.00%	0.00%	0.19%
ARCH1644	**1**	1.29%	2.16%	2.74%	0.64%	2.76%	1.06%	1.79%
ARCH1083	**3**	0.40%	0.34%	0.68%	0.00%	0.69%	0.26%	0.38%
ARCH1002	**1**	0.10%	0.34%	0.68%	-	-	0.00%	0.28%
ARCH550	**4**	6.53%	6.14%	7.53%	3.18%	8.97%	7.65%	5.83%
ARCH1988	**5**	7.12%	5.92%	3.42%	3.82%	5.52%	7.65%	7.15%
ARCH872	**6**	22.26%	24.00%	18.49%	10.19%	8.97%	21.90%	27.94%
ARCH1073	**1**	-	0.23%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.19%
ARCH404	**8**	3.36%	4.44%	4.79%	3.82%	1.38%	2.64%	4.52%
ARCH1252	**6**	0.40%	0.46%	-	-	0.69%	-	0.66%
ARCH212	**2**	0.30%	0.34%	-	-	0.69%	-	0.47%
ARCH1380	**8**	11.57%	12.17%	15.75%	28.03%	22.07%	13.19%	7.06%
ARCH1607	**1**	6.92%	6.14%	8.22%	11.46%	6.90%	8.97%	4.70%
Total C/E	**118**	**90.50%**	**91.13%**	**93.84%**	**89.81%**	**87.59%**	**90.24%**	**91.16%**

3.3 Conclusion

L'activité photosynthétique était suspectée d'avoir un impact marqué sur la diversité active des procaryotes en surface entre les deux conditions diurnes testées.

Le pyroséquençage a permis d'identifier 1065 OTUs archéens et 25 600 OTUs bactériens parmi lesquels, 465 OTUs appartenaient à des eucaryotes autotrophes. En effet, une grande quantité de séquences a été identifiée comme des chloroplastes due à la présence du biofilm microphytobenthique contenant principalement des diatomées entre 0 et 1 cm de profondeur. Les communautés actives bactériennes étaient dominées par les *Protéobactéries*, particulièrement les γ- et δ-protéobactéries qui pouvaient représenter plus de 50 % de la communauté active dans certains échantillons. Les *Planctomycetes* étaient également abondants et diversifiés. Des différences de composition des communautés actives ont pues être observées puisque les δ-protéobactéries étaient plus abondantes au-delà de 1 cm de profondeur alors que les γ-protéobactéries étaient prédominantes en surface.

Les *Thaumarchaeota* dominaient la communauté archéenne active et représentait plus de 60 % des séquences retrouvées. Ces *Thaumarchaeota* étaient composées de deux groupes majoritaires, le Marine Group I (MGI) et le groupe C3. Les membres du MGI composaient 60% de la communauté active entre 0 et 5 cm de profondeur. Au-delà, un changement marqué a été observé et les membres du groupe C3 étaient les plus actifs. Cette transition soudaine est très intéressante puisqu'aucun représentant du groupe C3 n'a pu être cultivé jusqu'à présent. Récemment affilié aux *Thaumarchaeota*, le groupe C3 était initialement considéré comme un groupe appartenant au *Miscellaneous Crenarchaeotic Group*-15 (MCG-15) (Inagaki *et al.*, 2006a; Kubo *et al.*, 2012). Kubo *et al.* (2012) ont suggéré que ces organismes ne devaient pas être impliqués dans l'oxydation du méthane. Dans notre étude, nous prouvons que ces archées sont très actives dans les sédiments côtiers anoxiques et n'expriment pas le gène *amoA* archéen ce qui exclut leur implication potentielle dans l'oxydation de l'ammonium. Le rôle fonctionnel de ces archées semble primordial mais n'est pas encore décrit. Dans une étude sur des sédiment intertidaux en Angleterre, Webster *et al.* (2010) ont prouvé que des archées MCG pouvaient utiliser l'acétate et étaient en partie composés de membres du groupe C3. L'écosystème ciblé dans cette étude étant similaire à la vasière de Brouage, il est possible que cela puisse expliquer la forte activité des C3 dans nos échantillons. Afin de mieux comprendre le rôle fonctionnel de ces archées, il pourra être intéressant à l'avenir d'utiliser également une

technique d'incorporation de composés marqués aux isotopes stables du carbone et de l'azote (DNA-SIP) comme utilisé par Webster *et al.* (2010).

Notre étude permet de prouver des variations de composition des communautés actives dans les sédiments suivant un gradient de profondeur. Entre les émersions de jour et de nuit, des différences sont notables et concernent principalement des variations de diversité d'OTUs. La nuit en surface, les communautés semblent plus diversifiées que de jour suggérant une spécialisation des communautés en présence d'activité photosynthétique.

Conclusion Partie 3

La reconstitution par couches des sédiments lors de la mise en place des mésocosmes fut un choix pertinent et a permis une bonne représentativité du milieu. De plus, la réalimentation en eau du site (filtrée) a été cruciale pour maintenir les niveaux de nutriments équivalents à ceux retrouvés sur le terrain. Le premier chapitre de cette partie valide l'utilisation de ce dispositif pour l'étude des procaryotes benthiques et remplissant les trois critères de vérification : représentativité, reproductibilité et réplicabilité. Ainsi, le dispositif mis en place a permis de recréer un écosystème « vasière » afin de mieux comprendre le fonctionnement écologique des procaryotes dans des sédiments intertidaux et leurs fonctions dans le cycle de l'azote.

Par analogie aux mesures de terrain, les communautés de procaryotes étaient structurées verticalement avec des valeurs de production et d'activités plus élevées en surface qu'en profondeur. De plus, des différences ont été notées entre les émersions de jour et de nuit puisque les procaryotes étaient plus abondants mais moins actifs la nuit et ce, dû à des variations de températures, de pH, de teneur en EPS et en protéines totales. Ces différences peuvent aussi traduire l'influence de la prédation par les nématodes plus nombreux dans le mésocosme de jour (chapitre 1) ou suggérer un découplage entre production et biomasse suivant les émersions de jour et de nuit.

Le processus d'anammox semblait dominant et cela était en adéquation avec la forte quantité de bactéries affiliées au genre *Planctomycetes*. La diversité active des bactéries était composée de γ-protéobactéries et plus en profondeur, les δ-protéobactéries dominaient la communauté active. Les *Thaumarchaeota* Marine Group I (MGI) étaient les archées les plus actives concordant avec une forte expression du gène *amoA* archéen proxy de la nitrification par les archées. Entre 5 et 10 cm de profondeur, la diversité active des archées était dominée par des *Thaumarchaeota* du groupe C3 ; groupe spécifique des sédiments marins encore peu connu.

Dans cette étude, les analyses globales montrent à nouveau une absence d'effet du temps d'émersion sur les communautés de procaryotes et confirme que les prélèvements du milieu de marée sont les plus pertinents à considérer. Néanmoins, une très forte consommation de nitrates entre 2 et 10 cm de profondeur a été observée au cours de la marée basse, de jour ; consommation rendue possible par une potentielle forte production de nitrates au cours de la marée haute précédente.

Enfin, l'absence de bioturbation ne modifierait pas drastiquement les profils des paramètres considérés par rapport au terrain mais les mesures semblent plus fiables et moins variables entre réplicats.

Discussion générale

Comprendre le fonctionnement des écosystèmes est essentiel pour leur conservation et leur protection. Par leur rôle de reminéralisateurs, les procaryotes maintiennent les processus biogéochimiques et recyclent la matière détritique pour la rendre à nouveau disponible pour les organismes vivants. Ils jouent donc un rôle crucial dans les écosystèmes et en particulier dans les environnements benthiques, où leur abondance est très forte.

Les vasières sont des écosystèmes côtiers extrêmement productifs (Admiraal, 1984; Underwood and Kromkamp, 1999) et cette production est utilisée par l'écosystème benthique ou exportée aux écosystèmes adjacents (Saint-Béat *et al.*, 2014). Dans les Pertuis Charentais, le microphytobenthos se développant à la surface des vasières peut être exporté par remise en suspension à chaque marée haute, permettant ainsi le maintien d'une aquaculture intense, primordiale pour l'économie de la région. Dans les écosystèmes marins, l'azote limite souvent la production primaire assurée par les algues (Underwood and Kromkamp, 1999). Cet élément est donc essentiel au système et sa dynamique est largement associée aux apports allochtones d'une part, et aux transformations biologiques réalisées par les procaryotes d'autre part. Ce dernier rôle crucial a donc été ciblé dans ce travail de thèse, afin de mieux comprendre les dynamiques des transformations de cet élément et d'identifier des fonctions majeures assurées par les procaryotes dans la vasière de Brouage.

1.1 Le développement d'outils pour l'analyse des environnements benthiques

1.1.1 La mise au point de méthodes

Afin d'étudier les sédiments, il s'est révélé indispensable de réaliser des mises au point méthodologiques. Certaines techniques n'ont demandé que des optimisations (les protocoles détaillés sont disponibles en Annexe). D'autres, ont fait l'objet de développements plus approfondis, qui sont retranscrits dans la Partie 1 de ce manuscrit. Par exemple, une banque de standards pour la quantification des gènes *nirS* et *nirK* a été créée et restera disponible pour de futures utilisations au laboratoire ou pour des collaborations. Par ailleurs, de nombreux essais ont été réalisés afin de quantifier la part d'Archées et de Bactéries dans les échantillons par la méthode d'hybridation moléculaire (FISH et CARD-FISH). Il n'a pas été possible de développer un protocole abouti pour ces techniques et il est envisagé de finaliser

prochainement le développement de ce protocole de quantification. Finalement, un protocole essentiel a pu être développé et publié (Lavergne *et al.*, 2014), permettant d'évaluer l'abondance des procaryotes hétérotrophes benthiques par cytométrie en flux. Plusieurs protocoles existaient déjà dans la littérature pour une application dans des sédiments profonds par exemple (Kallmeyer *et al.*, 2008; Morono *et al.*, 2013). Cependant, ces protocoles s'avèrent longs, parfois coûteux et ne s'adaptent pas directement à l'analyse de sédiments vaseux côtiers riches en micro-algues et en EPS. Cette problématique a donc motivé notre travail. Ainsi, une technique optimisée a pu être développée et permet l'analyse de 30 échantillons en moins de 4h par une technique d'extraction mécanique et chimique des cellules répétée deux fois suivie d'un comptage des cellules de procaryotes par cytométrie en flux en routine.

1.1.2 L'étude de la verticalité, le choix des profondeurs étudiées

Un autre point positif de ce travail de thèse a été d'apporter une dimension verticale primordiale dans le système étudié. Nous avons montré que l'échantillonnage de sédiments de surface entre 0 et 1 cm de profondeur diluait les processus qui se déroulent à plus fine échelle. La prise en compte dans l'échantillonnage de différentes couches de sédiment, notamment celle de surface entre 0 et 0,5 cm de profondeur constitue le meilleur compromis entre la réalité du terrain (difficulté de prélever précisément des couches de quelques millimètres) et la pertinence par rapport aux processus étudiés. En effet, dans les vasières, le sédiment est cohésif et les composés diffusent peu. Ainsi, l'oxygène ne pénètre pas ou peu au-delà de 5 mm. Cela pourrait justifier, l'utilisation d'une couche de sédiment encore plus fine qui permettrait 1) de tenir compte de la migration des diatomées (Consalvey *et al.*, 2004) et 2) du profil d'oxygène. Mais ce genre de prélèvements à micro-échelle ne serait pas adapté pour le type d'études menées dans ce travail car cela implique de fixer le sédiment à l'azote liquide pour le découper en fines couches. Tout d'abord, la quantité du sédiment qu'il est possible de congeler ne serait pas suffisante pour permettre d'analyser tous les paramètres à considérer. Enfin, certains paramètres comme les mesures de concentration en silices (Aminot and Kérouel, 2007) ou en EPS (Takahashi *et al.*, 2009), et la quantification par hybridation moléculaire (FISH) (Glöckner *et al.*, 1996) demandent un traitement particulier, ne supportant pas la congélation.

Pendant ce travail, une stratification particulière a été observée dans les 10 premiers cm du sédiment qui variait selon les saisons. L'horizon entre 1 et 2 cm de profondeur a ainsi était

défini comme un horizon tampon intermédiaire entre les couches de surface très productives et l'horizon profond caractérisé par des sédiments anoxiques dans lesquels les cycles du soufre, du fer et du manganèse seraient majoritaires (Park and Jaffé, 1996). Le découpage du sédiment en différentes couches a représenté une approche pertinente et originale dans cet écosystème.

1.2 Fonctions des procaryotes benthiques dans les vasières intertidales

1.2.1 Quelle est la distribution des procaryotes benthiques ? Entre production et dégradation, les variations sont-elles temporelles et/ou spatiales ?

Lors du suivi saisonnier (Partie 2), les abondances de procaryotes, la production bactérienne et la dégradation enzymatique des EPS par les bactéries tendaient à diminuer avec la profondeur, quelle que soit la saison, s'opposant ainsi à une augmentation du ratio C:N (particulaire) et de concentration en ammonium (**Figure 111**). Cette diminution progressive de l'abondance des procaryotes avec la profondeur dans les 10 premiers cm du sédiment avait pu être observée dans des sédiments sableux sub-tidaux côtiers (Ishii *et al.*, 2004; Böer *et al.*, 2009; Molari *et al.*, 2012), dans des marais au Portugal (Oliveira *et al.*, 2012), dans une marge continentale du Golfe du Mexique (Deming and Carpenter, 2008), ou dans des sédiments profonds de fjords Norvégiens (Sahm and Berninger, 1998). Dans notre étude, cette diminution globale de l'abondance des procaryotes s'accompagnait systématiquement d'une augmentation du pourcentage d'Archées dans la communauté (mesurée par qPCR), atteignant jusqu'à 40 % des procaryotes totaux. Cette distribution concorde avec d'autres environnements benthiques (Sahm and Berninger, 1998; Molari *et al.*, 2012). Dans la littérature, la production bactérienne est étroitement corrélée à la température et la biomasse chlorophyllienne (Sander and Kalff, 1993; van Duyl and Kop, 1994) et suit de fortes variations saisonnières (Böer *et al.*, 2009). Dans notre étude, les facteurs expliquant au mieux la production bactérienne étaient l'abondance de procaryotes (majoritairement *in situ*), l'activité du microphytobenthos (*ex situ*) et la salinité (en surface, *in situ*). Par analogie aux travaux de Böer *et al.* (2009), dans des sédiments sableux, la production bactérienne était très variable en surface et variait peu en profondeur.

Enfin, les activités enzymatiques bactériennes dégradant les sucres présentaient des valeurs plus faibles que celles retrouvées précédemment dans la vasière de Brouage (Mallet *et al.*, 2014) mais beaucoup plus élevées que dans certains sédiments en Antarctique (Fabiano and Danovaro, 1998). Cette activité β-glucosidase était plus forte en mésocosmes que sur le terrain, traduisant le lien important entre cette activité et la forte production des EPS glucidiques par les algues lors des expérimentations en mésocosmes. Ce phénomène était confirmé sur le terrain, en surface (0-0,5 cm de profondeur), où cette dégradation des sucres était fortement liée à la biomasse chlorophyllienne et donc plus intense en avril 2013. Par opposition, l'activité aminopeptidase dégradant les protéines était particulièrement élevée dans les mésocosmes (de jour) et sur le terrain. Cette activité suivait une variabilité saisonnière forte en surface, augmentant progressivement avec la température (**Figure 111**).

Les abondances de procaryotes, la production bactérienne et les activités enzymatiques bactériennes suivent donc une forte structuration verticale dans les 10 premiers cm des vasières intertidales. Ces paramètres sont maximaux en surface et diminuent avec la profondeur. Les abondances de procaryotes montrent peu de variations saisonnières et restent stables au cours de l'année, en revanche, production et dégradation suivent une forte dynamique saisonnière favorisée par les températures plus fortes et une biomasse chlorophyllienne plus importante (**Figure 111**), soulignant un fort couplage pour ces activités entre procaryotes et microphytobenthos.

1.2.2 Les processus liés au cycle de l'azote suivent-ils une dynamique spatiale et/ou temporelle ?

Le rôle fonctionnel des procaryotes dans le cycle de l'azote a été évalué *in situ* via des méthodes de biologie moléculaire visant les abondances de gènes fonctionnels spécifiques (Partie 2). Il était attendu que les processus aérobies se déroulent en surface dans les sédiments, et que les processus anaérobies soient retrouvés plus en profondeur, définissant des niches écologiques spécifiques. Quelle que soit la saison, il existe une profondeur donnée du sédiment dans laquelle les processus aérobies et anaérobies coexistent. En effet, le potentiel de chaque réaction (nitrification, dénitrification, et anammox) représenté par l'abondance des gènes fonctionnels était maximal à une seule et même profondeur. Contrairement aux résultats attendus, il n'a pas été observé de différenciation des processus liés au cycle de l'azote suivant des niches écologiques différentes. Ce travail a permis d'identifier un horizon propice aux processus liés au cycle de l'azote. Cet horizon aurait une profondeur variable, identifié

entre 1 et 2 cm de profondeur en février et plus en surface entre 0,5 et 1 cm de profondeur en juillet et avril. En revanche, le processus de dénitrification (processus anaérobie) dominait en février et juillet et la nitrification (oxydation de l'ammonium en conditions aérobies) dominait en avril avec un fort potentiel de réalisation de l'anammox plus en profondeur (entre 2 et 5 cm de profondeur). Ainsi, nos résultats sont en accord avec l'hypothèse d'un couplage entre nitrification et dénitrification jusqu'à 2 cm de profondeur qui pourrait être à l'origine d'une forte élimination des pollutions azotées apportées au système (Seitzinger, 1988; Lam *et al.*, 2007).

La diversité des fonctions dans le cycle de l'azote serait donc plus importante en avril où il semblerait que l'ammonium soit rendu disponible sous forme de nitrites et/ou nitrates en surface et où le processus d'anammox en profondeur produit du diazote. Tout comme la dénitrification, la réaction d'anammox aboutit à la perte de l'azote apporté au système, puisque le diazote n'est pas utilisable pour la majorité des organismes vivants. Ces résultats suggèrent donc que, dans la vasière de Brouage, une grande quantité de l'azote apporté est consommé en surface et perdu en profondeur par la production de gaz. Certaines études ont montré que le cycle de l'azote était contrôlé par la température, les nitrates de l'eau surnageante, le marnage et le microphytobenthos (Cabrita and Brotas, 2000). D'après une autre étude, la variation des gènes fonctionnels seraient en lien avec la nature de la matière organique (Abell *et al.*, 2013). Selon nos résultats, la nitrification, la dénitrification et la réaction d'anammox seraient sous influence de la température, du pH, de la biomasse chlorophyllienne et de la production d'EPS glucidiques (les deux derniers paramètres étant liés au microphytobenthos).

1.2.3 Quel est l'effet de l'élimination de la macrofaune et de l'hydrodynamisme sur la structure verticale des processus liés au cycle de l'azote ?

Le développement d'un mésocosme tidal a permis l'évaluation de l'activité fonctionnelle des procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote (Partie 3). L'inhibition des processus biogéochimiques observés entre 0 et 0,5 cm de profondeur lors du suivi *in situ* n'a pas été observée en mésocosme. L'expression des gènes traduit la forte possibilité de réalisation des processus (nitrification, dénitrification et anammox pour cette étude). Lors de cette expérimentation, ces expressions étaient importantes en surface entre 0 et 2 cm de profondeur de jour. En particulier, lors des prélèvements de jour, l'oxydation de l'ammonium par les

archées, de même que la dénitrification, était maximale entre 0 et 2 cm de profondeur. Il semblerait que l'absence de bioturbateurs et de la faible remise en suspension aient permis un structure verticale différente de celle observée sur le terrain. Entre 0 et 0,5 cm de profondeur, l'expression des gènes était forte alors que l'abondance des gènes sur le terrain était toujours faible. Il est possible que ces observations soient dues 1) à l'expression de gènes même peu abondants, ou 2) à des conditions plus favorables en mésocosme que sur le terrain. Ce deuxième point peut mettre en évidence deux facteurs. En effet, il est possible que l'absence d'hydrobies (brouteurs de micro-organsimes dont les procaryotes, Pascal *et al.* (2009)) en surface puisse favoriser l'activité des procaryotes. Par ailleurs, l'absence de remise en suspension pourrait être à l'origine d'une plus forte stabilité du sédiment, favorisant ainsi l'activité des procaryotes, comparée aux prélèvements *in situ* pour lesquelles la remise en suspension est susceptible de jouer un rôle important sur les communautés.

1.2.4 Quelle est la dynamique des communautés de procaryotes au cours d'une période d'émersion ?

L'étude de l'effet du temps d'émersion sur les communautés de procaryotes et sur le rôle fonctionnel de ces communautés dans le cycle de l'azote n'a pas révélé de résultats marqués. Il semblerait qu'au cours d'une marée basse, les réactions anaérobies (dénitrification et anammox) soient favorisées au détriment de la nitrification.

Par ailleurs, lors de l'expérimentation en mésocosme, il a été possible de mesurer une très forte consommation de nitrates en profondeur ce qui prouve l'importance de la réduction des nitrates dans les sédiments, ceci a déjà été observé dans des estuaires (Smith *et al.*, 2007).

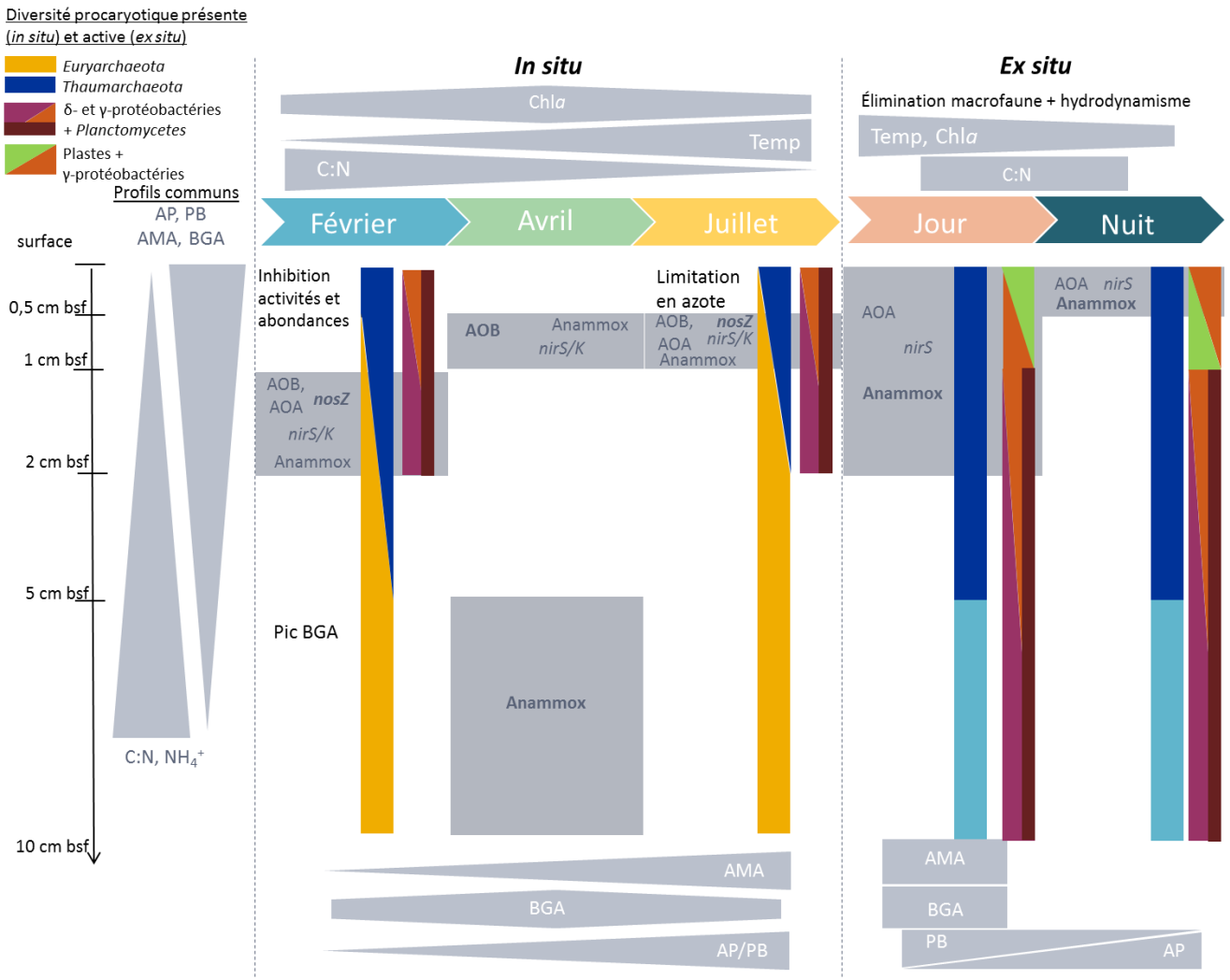


Figure 111. Rôle (structure et fonction) des communautés de procaryotes dans une vasière intertidale : une approche multi-échelle. AMA= activité aminopeptidase, BGA = β-glucosidase, AP= abondance de procaryotes, PB= production bactérienne, Chl*a*= chlorophylle *a*, Temp= température, Nitrification : AOA = archée nitrifiantes et AOB= bactéries nitrifiantes, dénitrification : *nirS/K* et *nosZ*.

1.3 Structure phylogénétique des communautés de procaryotes benthiques

Les procaryotes benthiques sont très diversifiés (Zinger *et al.*, 2011) et jusqu'à 10^4 fois plus abondants par unité de volume que dans la colonne d'eau (Bertrand *et al.*, 2011). Ainsi, les sédiments contiennent des communautés abondantes, diversifiées et polyvalentes impliquant un écosystème complexe. Zhao *et al.* (2008) ont mis en évidence le manque de connaissances quant à la variabilité des communautés de procaryotes benthiques suivant un gradient vertical. Ce travail propose la description de cette diversité dans les 10 premiers cm de sédiments d'une vasière intertidale nue.

1.3.1 La vasière de Brouage, un milieu extrême ?

Les archées ont longtemps été considérées comme des organismes extrêmophiles. A présent, de nombreuses études prouvent leur présence dans tous les milieux, extrêmes ou non, y compris en milieu marin côtier (DeLong, 1992). Dans les écosystèmes extrêmes, les assemblages de procaryotes sont très spécifiques et liées aux caractéristiques du milieu. Dans la vasière de Brouage, le pyroséquençage a révélé la présence d'archées méthanogènes (*Euryarchaeota*) entre 5 et 10 cm de profondeur affiliées à des séquences déjà retrouvées dans les Pertuis Charentais près de poches de méthane à 90 cm de profondeur (Roussel *et al.*, 2009). Ces archées ont été retrouvées dans nos prélèvements, là où la communauté bactérienne était dominée par les δ-protéobactéries dont les Desulfobulbaceae. Ces deux espèces de procaryotes peuvent s'associer pour former des *consortia* mis en évidence pour la première fois dans des sédiments profonds par Boetius *et al.* (2000) et de nos jours bien étudiés. D'après notre étude, il est envisageable que ce genre de *consortia* puisse exister dans la vasière de Brouage entre 5 et 10 cm de profondeur et il pourrait être intéressant de réaliser un marquage par hybridation *in situ* (FISH) afin de vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, la dominance des *Euryarcheota* est typique des milieux riches en gaz et en méthane (Inagaki *et al.*, 2006b; Parkes *et al.*, 2007; Pachiadaki *et al.*, 2010) et il semblerait que la diversité observée dans la vasière de Brouage soit proche de celle recensée dans les milieux extrêmes tels que des vases de volcans sous-marins (Pachiadaki *et al.*, 2010). Ceci se révèle très intéressant et peut être discuté. En effet, des théories émises suggèrent qu'il existe dans les océans ce que le terme anglais « *seed bank* » désigne comme un pool d'espèces procaryotiques disponibles, qui serait équivalent quelle que soit la situation géographique

(Gibbons *et al.*, 2013). Couplé aux théories de Baas Becking (1934), qui considère que « *Tout est partout, mais, que l'environnement sélectionne* » (« *Everything is everywhere, but, environment selects* »), cela suggère que la distribution observée des micro-organismes puisse remettre en cause les notions de biogéographie classiques. Si les techniques d'évaluation de la biodiversité parviennent à reconnaître avec précision même des espèces extrêmement rares, il est possible que l'on ne trouve aucune différence de diversité phylogénétique quelle que soit le lieu de prélèvement, mais que les différences se fassent sur les abondances et les activités de chaque unité taxonomique. Ainsi, le fait que, les assemblages bactériens et archéens dans la vasière de Brouage soient proches d'assemblages issus de milieux océaniques extrêmes peut aller dans le sens de l'existence de cette banque de semences commune aux écosystèmes océaniques.

Par ailleurs, l'évaluation de la diversité découle d'une affiliation par comparaison aux bases de données de séquences ou de génomes. Même si de plus en plus d'informations sont disponibles, les comparaisons sont dépendantes de ces séquences et des études menées au préalable au sein de la communauté scientifique. Dans le cas des sédiments côtiers, une étude recense cette diversité phylogénétique des bactéries et montre les différences d'assemblages par rapport aux écosystèmes profonds souvent plus étudiés (Zinger *et al.*, 2011). De plus, dans le cas des archées, celles-ci sont majoritairement présentes en milieux extrêmes et donc plus étudiées dans ces écosystèmes. Ainsi, dans leur étude de la diversité des archées présentes et actives dans la baie de Marennes-Oléron, Roussel *et al.* (2009) notaient également que la diversité archéenne dans cette zone était comparable à celle de zones riches en méthane et à des milieux extrêmes (Knittel *et al.*, 2005; Kendall *et al.*, 2007).

1.3.2 Une forte diversité bactérienne

Dans la vasière de Brouage, la diversité phylogénétique présente était particulièrement importante puisque de nombreux phyla ont été identifiés. Ce résultat est en adéquation avec les résultats mis en évidence par Zinger *et al.* (2011), qui, à l'échelle globale de la planète identifient les sédiments comme les écosystèmes les plus diversifiés en terme de diversité bactérienne présente. Dans ce travail, la diversité bactérienne présente était dominée par les δ-protéobactéries suivies des γ-protéobactéries et des *Planctomycetes*. Zinger *et al.* (2011) recensent une dominance des γ-protéobactéries dans les sédiments côtiers. Les protéobactéries sont les bactéries les mieux décrites en microbiologie et ce phylum englobe un grand nombre d'organismes avec des rôles fonctionnels très différents (Bertrand *et al.*, 2011). A une échelle

locale, notre étude a montré que la diversité bactérienne était dominée par la famille des Desulfobulbaceae. Il a été prouvé que cette famille, majoritairement représentée par des bactéries sulfato-réductrices, pouvait être abondante dans les vasières intertidales et qu'elles avaient également la capacité de réduire les nitrates (Mussmann *et al.*, 2005).

Lors des expérimentations en mésocosmes, notre étude a permis de décrire la diversité active des procaryotes. Cette étude a montré que la diversité active des bactéries était dominée par les γ-protéobactéries suivies des δ-protéobactéries puis des *Planctomycetes*. Même si les conditions étaient différentes entre les prélèvements *in situ* et *ex situ*, cela suggère de légères divergences entre les diversités actives et présentes des communautés bactériennes. Les mêmes groupes majeurs se retouvent mais leur importance était modifiée : à la surface des sédiments, les δ-protéobactéries étaient plus présentes qu'actives alors que les γ-protéobactéries étaient plus actives que présentes.

1.3.3 Une forte activité du groupe archéen « C3 »

L'étude en mésocosme a mis en évidence une rupture dans les assemblages de la diversité active archéenne après 5 cm de profondeur. Cette diversité active était dominée par les membres du Marine Group I (*Thaumarchaeota*) entre 0 et 5 cm de profondeur et entre 5 et 10 cm de profondeur, elle était dominée par des archées appartenant au groupe C3. Ce groupe est encore peu connu et son affiliation taxonomique reste encore incertaine (Inagaki *et al.*, 2006b). Aucun représentant n'a pu être cultivé à l'heure actuelle et leur rôle fonctionnel dans les écosystèmes n'a pu être évalué jusqu'alors. Notre étude montre que ces organismes ont une importance cruciale pour le fonctionnement des vasières intertidales puisqu'ils constituent plus de 65 % de la communauté archéenne active. Par ailleurs, les représentants du groupe C3 avaient été identifié par Roussel *et al.* (2009) dans les Pertuis Charentais à 65 cm de profondeur. Il y a cinq ans, les membres du groupe C3 aujourd'hui identifiés comme des *Thaumarchaeota* par la classification SILVA (Yilmaz *et al.*, 2014), étaient affiliés au groupe des Miscellaneous Crenarchaeotic group (MCG) qui dominait la communauté archéenne présente entre 60 et 65 cm de profondeur dans l'étude de Roussel *et al.* (2009).

Ce travail de thèse a permis la description de diversités actives et présentes des bactéries et des archées suivant 5 couches sédimentaires entre 0 et 10 cm de profondeur dans la vasière de Brouage. Cette évaluation de la diversité des procaryotes est essentielle, car cela permettra de mieux décrire les assemblages et les rôles de ces écosystèmes riches et

productifs. Pour acquérir ce conséquent jeu de données, une méthode récente de séquençage haut débit a permis d'obtenir une profondeur de séquençage élevée qui multiplie l'information par rapport à un séquençage classique. Il est néanmoins important de rester prudent quant à l'interprétation de ces données qui peuvent être traitées comme des données de biodiversité classique. Cette technique de pyroséquençage est semi-quantitative, c'est-à-dire que les abondances brutes ne reflètent pas réellement la quantité de séquences présentes dans l'échantillon. Ces données sont donc à analyser avec précautions et à présenter en abondances relatives plutôt qu'absolues (Shade and Handelsman, 2012).

1.4 Conclusions et perspectives

Les écosystèmes sont des entités dynamiques, changeantes, que les scientifiques tentent de comprendre, d'expliquer, et de restaurer. A présent, la science reste encore limitée par les méthodes d'analyses qui conditionnent les recherches et donc les conclusions et la compréhension. Dans ce travail de thèse, le sédiment de 0 à 10 cm a été découpé en cinq couches et les interprétations sont dépendantes de leurs épaisseurs fixées. Cela étant dit, cette approche est novatrice et indispensable dans ce type d'environnement. Cette thèse permet d'améliorer et de compléter les connaissances sur les procaryotes benthiques en milieu côtier encore peu abordées à ces échelles d'études. Il a été montré pendant ce travail que la vasière de Brouage était extrêmement stratifiée verticalement et que cette stratification était modifiée saisonnièrement. En effet, celle-ci semblait se mettre en place de la période hivernale à la période estivale en présentant des concentrations de nutriments de plus en plus faibles et une activité procaryotique de plus en plus forte. Par ailleurs, les procaryotes interagissent avec le microphytobenthos oscillant entre périodes de couplage et de découplage pour les nutriments par exemple. En absence de photosynthèse (la nuit), les procaryotes sont moins actifs, plus nombreux et certains groupes de bactéries se développent plus en surface (*Planctomycetes*).

A l'avenir, il est clair que l'étude de la variabilité au cours d'une marée basse ne sera pas privilégiée puisque notre étude n'a pas montré d'influence sur les communautés de procaryotes. En revanche, la saisonnalité s'est révélée intéressante et pourra être renouvelée afin de compléter cette étude. Tous les gènes fonctionnels n'ont pu être quantifiés dans ce travail et il serait intéressant de quantifier 1) la réduction des nitrates via les gènes *narG/napA* (Smith *et al.*, 2007), 2) la réduction dissimilatrice des nitrites en ammonium (RDNA) via le gène fonctionnel *nrfA* pour la DNRA (Giblin *et al.*, 2013), et 3) le processus d'anammox via le gène *hzo* pour l'anammox (Schmid *et al.*, 2008). Des mesures de flux de nutriments

pourraient également confirmer les résultats de biologie moléculaire. Par ailleurs, il pourra être envisagé de comprendre la variabilité des assemblages procaryotiques en couplant les analyses de pyroséquençage à des techniques d'empreintes génétiques (ARISA, T-RFLP ou DGGE) pour observer des différences de structure à moindre coût (comparé aux méthodes de séquençage haut débit) sur un plus grand nombre d'échantillons. Ces techniques ont été largement utilisées, montrent des résultats satisfaisants et permettent d'analyser la structure des communautés de procaryotes sur un grand nombre d'échantillons (Gobet *et al.*, 2014).

Pour finir, ce travail a mis en évidence une forte activité des archées membres du groupe C3 encore très peu connu et une forte diversité des δ-protéobactéries. Si les sources d'énergie et de carbone des C3 n'est pas encore connue, les δ-protéobacteries ont un rôle majeur en tant que réductrices des sulfates et peuvent utiliser le nitrate, le fer ou le manganèse comme accepteur d'électron (Mussmann *et al.*, 2005). Certaines seraient également impliquées dans la fixation du diazote (Bertics *et al.*, 2010). Cette diversité révèle l'importance des cycles du soufre, du fer ou du manganèse dans la vasière de Brouage qui pourraient faire l'objet d'études futures. De même, les Pertuis Charentais sont des zones contenant des poches de méthane associées à une communauté archéenne active (Roussel *et al.*, 2009). L'étude de la diversité des archées et des bactéries au niveau de ces poches des profondeurs plus fines offrirait la possibilité de prouver l'importance fonctionnelle capitale des procaryotes dans les écosystèmes benthiques.

Bibliographie

Aakra, A., Hesselsoe, M., and Bakken, L.R. (2000) Surface attachment of ammonia-oxidizing bacteria in soil. *Microb Ecol* **39**: 222-235.

Abell, G.C., Revill, A.T., Smith, C., Bissett, A.P., Volkman, J.K., and Robert, S.S. (2010) Archaeal ammonia oxidizers and *nirS*-type denitrifiers dominate sediment nitrifying and denitrifying populations in a subtropical macrotidal estuary. *ISME J* **4**: 286-300.

Abell, G.C., Ross, D.J., Keane, J.P., Oakes, J.M., Eyre, B.D., Robert, S.S., and Volkman, J.K. (2013) Nitrifying and denitrifying microbial communities and their relationship to nutrient fluxes and sediment geochemistry in the Derwent Estuary, Tasmania. *Aquat Microb Ecol* **70**: 63-75.

Admiraal, W. (1984) The ecology of estuarine sediment inhabiting diatoms. *Progress in Phycological Research* **3**: 269-314.

Agogué, H., Brink, M., Dinasquet, J., and Herndl, G.J. (2008) Major gradients in putatively nitrifying and non-nitrifying Archaea in the deep North Atlantic. *Nature* **456**: 788-791.

Agogué, H., Mallet, C., Orvain, F., De Crignis, M., Mornet, F., and Dupuy, C. (2014) Bacterial dynamics in a microphytobenthic biofilm: A tidal mesocosm approach. *J Sea Res* **92**: 36-45.

Albright, L.J., McCrae, S.K., and May, B.E. (1986) Attached and free-floating bacterioplankton in Howe Sound, British Columbia, a coastal marine fjord-embayment. *Appl Environ Microbiol* **51**: 614-621.

Alkemade, R., Wielemaker, A., De Jong, S.A., and Sandee, A.J.J. (1992) Experimental evidence for the role of bioturbation by the marine nematode *Diplolaimella dievengatensis* in stimulating the mineralization of *Spartina anglica* detritus. *Mar Ecol Prog Ser* **90**: 149-155.

Allard, J., Chaumillon, E., Bertin, X., Poirier, C., and Ganthy, F. (2010) Sedimentary record of environmental changes and human interferences in a macrotidal bay for the last millenaries: the Marennes-Oléron Bay (SW France). *Bulletin de la Societe Geologique de France* **181**: 151-169.

Aller, R.C., and Aller, J.Y. (1998) The effect of biogenic irrigation intensity and solute exchange on diagenetic reaction rates in marine sediments. *Journal of Marine Research* **56**: 905-936.

Allison, S.D., and Martiny, J.B.H. (2008) Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 11512-11519.

Alonso-Sáez, L., Waller, A.S., Mende, D.R., Bakker, K., Farnelid, H., Yager, P.L. et al. (2012) Role for urea in nitrification by polar marine Archaea. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 17989-17994.

Alves-de-Souza, C., González, M.T., and Iriarte, J.L. (2008) Functional groups in marine phytoplankton assemblages dominated by diatoms in fjords of southern Chile. *J Plankton Res* **30**: 1233-1243.

Alves, R.J.E., Wanek, W., Zappe, A., Richter, A., Svenning, M.M., Schleper, C., and Urich, T. (2013) Nitrification rates in Arctic soils are associated with functionally distinct populations of ammonia-oxidizing archaea. *ISME J* **7**: 1620-1631.

Amalfitano, S., and Fazi, S. (2008) Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *J Microbiol Methods* **75**: 237-243.

Amalfitano, S., and Puddu, S.F. (2009) Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles. *J Microbiol Methods* **79**: 246-249.

Amann, R., and Fuchs, B.M. (2008) Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques. *Nat Rev Microbiol* **6**: 339-348.

Amann, R.I., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1995) Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**: 143-169.

Aminot, A., and Kérouel, R. (2007) *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu*: Ifremer.

Arp, D.J., Chain, P.S.G., and Klotz, M.G. (2007) The impact of genome analyses on our understanding of ammonia-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**: 503-528.

Arrigo, K.R. (2005) Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**: 349-355.

Attrill, M.J., and Rundle, S.D. (2002) Ecotone or Ecocline: Ecological Boundaries in Estuaries. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **55**: 929-936.

Auguet, J.-C., and Casamayor, E.O. (2013) Partitioning of Thaumarchaeota populations along environmental gradients in high mountain lakes. *FEMS Microbiol Ecol* **84**: 154-164.

Auguet, J.-C., Barberan, A., and Casamayor, E.O. (2009) Global ecological patterns in uncultured Archaea. *ISME J* **4**: 182-190.

Azam, F., and Malfatti, F. (2007) Microbial structuring of marine ecosystems. *Nat Rev Micro* **5**: 782-791.

Baas Becking, L.G.M. (1934) *Geobiologie of inleiding tot de milieukunde*. The Hague, the Netherlands: W.P. Van Stockum & Zoon (in Dutch).

Bale, N.J., Villanueva, L., Fan, H., Stal, L.J., Hopmans, E.C., Schouten, S., and Sinninghe Damsté, J.S. (2014) Occurrence and activity of anammox bacteria in surface sediments of the southern North Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **89**: 99-110.

Barnett, A., Meleder, V., Blommaert, L., Lepetit, B., Gaudin, P., Vyverman, W. et al. (2014) Growth form defines physiological photoprotective capacity in intertidal benthic diatoms. *ISME J*.

Barnett, A.J., Finlay, K., and Beisner, B.E. (2007) Functional diversity of crustacean zooplankton communities: towards a trait-based classification. *Freshwater Biology* **52**: 796-813.

Barra Caracciolo, A., Grenni, P., Cupo, C., and Rossetti, S. (2005) *In situ* analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. *FEMS Microbiol Lett* **253**: 55-58.

Bell, T.H., Yergeau, E., Martineau, C., Juck, D., Whyte, L.G., and Greer, C.W. (2011) Identification of nitrogen-incorporating bacteria in petroleum-contaminated arctic soils by using [^{15}N]DNA-based stable isotope probing and pyrosequencing. *Appl Environ Microbiol* **77**: 4163-4171.

Bellinger, B.J., Abdullahi, A.S., Gretz, M.R., and Underwood, G.J.C. (2005) Biofilm polymers: relationship between carbohydrate biopolymers from estuarine mudflats and unialgal cultures of benthic diatoms. *Aquat Microb Ecol* **38**: 169-180.

Beman, J.M., Bertics, V.J., Braunschweiler, T., and Wilson, J. (2012) Quantification of ammonia oxidation rates and the distribution of ammonia-oxidizing Archaea and Bacteria in marine sediment depth profiles from Catalina Island, California. *Frontiers in Microbiology* **3**: 263.

Bernard, L., Courties, C., Servais, P., Troussellier, M., Petit, M., and Lebaron, P. (2000) Relationships among Bacterial Cell Size, Productivity, and Genetic Diversity in Aquatic Environments using Cell Sorting and Flow Cytometry. *Microb Ecol* **40**: 148-158.

Bernhard, A.E., Donn, T., Giblin, A.E., and Stahl, D.A. (2005) Loss of diversity of ammonia-oxidizing bacteria correlates with increasing salinity in an estuary system. *Environ Microbiol* **7**: 1289-1297.

Bernhard, A.E., Tucker, J., Giblin, A.E., and Stahl, D.A. (2007) Functionally distinct communities of ammonia-oxidizing bacteria along an estuarine salinity gradient. *Environ Microbiol* **9**: 1439-1447.

Bernhard, A.E., Landry, Z.C., Blevins, A., de la Torre, J.R., Giblin, A.E., and Stahl, D.A. (2010) Abundance of ammonia-oxidizing archaea and bacteria along an estuarine salinity gradient in relation to potential nitrification rates. *Appl Environ Microbiol* **76**: 1285-1289.

Bertics, V.J., and Ziebis, W. (2010) Bioturbation and the role of microniches for sulfate reduction in coastal marine sediments. *Environ Microbiol* **12**: 3022-3034.

Bertics, V.J., Sohm, J.A., Treude, T., Chow, C.-E.T., Capone, D.C., Fuhrman, J.A., and Ziebis, W. (2010) Burrowing deeper into benthic nitrogen cycling: the impact of bioturbation on nitrogen fixation coupled to sulfate reduction. *Mar Ecol Prog Ser* **409**: 1-15.

Bertin, X., and Chaumillon, E. (2005) New insights in shallow gas generation from very high resolution seismic and bathymetric surveys in the Marennes-Oléron Bay, France. *Marine Geophysical Researches* **26**: 225-233.

Bertrand, J.-C., Caumette, P., Lebaron, P., Matheron, R., and Normand, P. (2011) *Ecologie microbienne : Microbiologie des milieux naturels et anthropisés*. Pau, France: Presses universitaires de Pau et des pays de l'Adour.

Bickel-Sandkötter, S., Gärtner, W., and Dane, M. (1996) Conversion of energy in halobacteria: ATP synthesis and phototaxis. *Arch Microbiol* **166**: 1-11.

Biddle, J.F., Lipp, J.S., Lever, M.A., Lloyd, K.G., Sørensen, K.B., Anderson, R. et al. (2006) Heterotrophic Archaea dominate sedimentary subsurface ecosystems off Peru. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3846-3851.

Bissett, A., Bowman, J., and Burke, C. (2006) Bacterial diversity in organically-enriched fish farm sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **55**: 48-56.

Blainey, P.C., Mosier, A.C., Potanina, A., Francis, C.A., and Quake, S.R. (2011) Genome of a low-salinity ammonia-oxidizing archaeon determined by single-cell and metagenomic analysis. *PLoS ONE* **6**: e16626.

Blanchard, G.F., Guarini, J.-M., Orvain, F., and Sauriau, P.-G. (2001) Dynamic behaviour of benthic microalgal biomass in intertidal mudflats. *J Exp Mar Biol Ecol* **264**: 85-100.

Blanchard, G.F., Guarini, J.-M., Dang, C., and Richard, P. (2004) Characterizing and quantifying photoinhibition in intertidal microphytobenthos. *Journal of Phycology* **40**: 692-696.

Blanchet, F.G., Legendre, P., and Borcard, D. (2008) Forward selection of explanatory variables. *Ecology* **89**: 2623-2632.

Blazewicz, S.J., Barnard, R.L., Daly, R.A., and Firestone, M.K. (2013) Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *ISME J* **7**: 2061-2068.

Blott, S.J., and Pye, K. (2001) GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surf Proc Land* **26**: 1237-1248.

Bocher, P., Piersma, T., Dekinga, A., Kraan, C., Yates, M., Guyot, T. et al. (2007) Site- and species-specific distribution patterns of molluscs at five intertidal soft-sediment areas in northwest Europe during a single winter. *Mar Biol* **151**: 577-594.

Böer, S.I., Hedtkamp, S.I., van Beusekom, J.E., Fuhrman, J.A., Boetius, A., and Ramette, A. (2009) Time- and sediment depth-related variations in bacterial diversity and community structure in subtidal sands. *ISME J* **3**: 780-791.

Boetius, A. (1995) Microbial hydrolytic enzyme activities in deep-sea sediments. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* **49**: 177-187.

Boetius, A., and Lochte, K. (1996) Effect of organic enrichments on hydrolytic potentials and growth of bacteria in deep-sea sediments. *Mar Ecol Prog Ser* **140**: 239-250.

Boetius, A., and Damm, E. (1998) Benthic oxygen uptake, hydrolytic potentials and microbial biomass at the Arctic continental slope. *Deep-Sea Res Part I Oceanogr Res Pap* **45**: 239-275.

Boetius, A., Ravenschlag, K., Schubert, C.J., Rickert, D., Widdel, F., Gieseke, A. et al. (2000) A marine microbial consortium apparently mediating anaerobic oxidation of methane. *Nature* **407**: 623-626.

Borcard, D., Legendre, P., and Drapeau, P. (1992) Partialling out the Spatial Component of Ecological Variation. *Ecology* **73**: 1045-1055.

Borcard, D., Gillet, F., and Legendre, P. (2011) *Numerical ecology with R*. New-York, NY, USA: Springer.

Bouvier, T., Troussellier, M., Anzil, A., Courties, C., and Servais, P. (2001) Using light scatter signal to estimate bacterial biovolume by flow cytometry. *Cytometry* **44**: 188-194.

Braeckman, U., Foshtomi, M.Y., Van Gansbeke, D., Meysman, F., Soetaert, K., Vincx, M., and Vanaverbeke, J. (2014) Variable importance of macrofaunal functional biodiversity for biogeochemical cycling in temperate coastal sediments. *Ecosystems* **17**: 720-737.

Braker, G., Dörsch, P., and Bakken, L.R. (2012) Genetic characterization of denitrifier communities with contrasting intrinsic functional traits. *FEMS Microbiol Ecol* **79**: 542-554.

Braker, G., Zhou, J., Wu, L., Devol, A.H., and Tiedje, J.M. (2000) Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in pacific Northwest marine sediment communities. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2096-2104.

Braker, G., Ayala-del-Río, H.L., Devol, A.H., Fesefeldt, A., and Tiedje, J.M. (2001) Community structure of denitrifiers, bacteria, and archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restrictionfragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1893-1901.

Brochier-Armanet, C., Forterre, P., and Gribaldo, S. (2011) Phylogeny and evolution of the Archaea: one hundred genomes later. *Curr Opin Microbiol* **14**: 274-281.

Brotas, V., Amorim-Ferreira, A., Vale, C., and Catarino, F. (1990) Oxygen profiles in intertidal sediments of Ria Formosa (S. Portugal). *Hydrobiologia* **207**: 123-130.

Burgin, A.J., and Hamilton, S.K. (2007) Have we overemphasized the role of denitrification in aquatic ecosystems? A review of nitrate removal pathways. *Frontiers in Ecology and the Environment* **5**: 89-96.

Burow, L.C., Woebken, D., Marshall, I.P.G., Singer, S.W., Pett-Ridge, J., Prufert-Bebout, L. et al. (2014) Identification of Desulfobacterales as primary hydrogenotrophs in a complex microbial mat community. *Geobiol* **12**: 221-230.

Cabrita, M.T., and Brotas, V. (2000) Seasonal variation in denitrification and dissolved nitrogen fluxes in intertidal sediments of the Tagus estuary, Portugal. *Mar Ecol Prog Ser* **202**: 51-65.

Caffrey, J.M., Bano, N., Kalanetra, K., and Hollibaugh, J.T. (2007) Ammonia oxidation and ammonia-oxidizing bacteria and archaea from estuaries with differing histories of hypoxia. *ISME J* **1**: 660-662.

Capone, D.G. (2000) The marine microbial nitrogen cycle. In *Microbial ecology of the oceans*. Kirchman, D.L. (ed): Wiley-Liss, pp. 455-494.

Cartaxana, P., Ruivo, M., Hubas, C., Davidson, I., Serôdio, J., and Jesus, B. (2011) Physiological versus behavioral photoprotection in intertidal epipelic and epipsammic benthic diatom communities. *J Exp Mar Biol Ecol* **405**: 120-127.

Casamayor, E.O., Massana, R., Benlloch, S., Øvreås, L., Díez, B., Goddard, V.J. et al. (2002) Changes in archaeal, bacterial and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern. *Environ Microbiol* **4**: 338-348.

Cavicchioli, R. (2010) Archaea — timeline of the third domain. *Nat Rev Microbiol* **9**: 51-61.

Chamier, A.C. (1987) Effect of pH on microbial degradation of leaf litter in seven streams of the English Lake District. *Oecologia* **71**: 491-500.

Church, M.J. (2008) Resource control of bacterial dynamics in the sea. In *Microbial ecology of the oceans*: John Wiley & Sons, Inc., pp. 335-382.

Ciobanu, M.-C., Burgaud, G., Dufresne, A., Breuker, A., Redou, V., Ben Maamar, S. et al. (2014) Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. *ISME J* **8**: 1370-1380.

Compton, T., Troost, T., van der Meer, J., Kraan, C., Honkoop, P., Rogers, D. et al. (2008) Distributional overlap rather than habitat differentiation characterizes co-occurrence of bivalves in intertidal soft sediment systems. *Mar Ecol Prog Ser* **373**: 25-35.

Consalvey, M., Paterson, D.M., and Underwood, G.J. (2004) The ups and downs of life in a benthic biofilm: migration of benthic diatoms. *Diatom Res* **19**: 181-202.

Cook, P.L.M., Veuger, B., Böer, S., and Middelburg, J.J. (2007) Effect of nutrient availability on carbon and nitrogen incorporation and flows through benthic algae and bacteria in near-shore sandy sediment. *Aquat Microb Ecol* **49**: 165-180.

Corredor, J., Howarth, R., Twilley, R., and Morell, J. (1999) Nitrogen cycling and anthropogenic impact in the tropical interamerican seas. *Biogeochemistry* **46**: 163-178.

Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B. et al. (1998) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Ecol Econ* **25**: 3-15.

Cypionka, H. (1994) Novel metabolic capacities of sulfate-reducing bacteria, and their activities in microbial mats. In *Microbial Mats*. Stal, L., and Caumette, P. (eds): Springer Berlin Heidelberg, pp. 367-376.

Daims, H., Lücker, S., Le Paslier, D., and Wagner, M. (2011) Diversity, environmental genomics, and ecophysiology of nitrite-oxidizing bacteria. In *Nitrification*. Ward, B., Arp, D.J., and Klotz, M.G. (eds). Washington: ASM Press, pp. 295-322.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H., and Wagner, M. (1999) The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol* **22**: 434-444.

Dale, O.R., Tobias, C.R., and Song, B. (2009) Biogeographical distribution of diverse anaerobic ammonium oxidizing (anammox) bacteria in Cape Fear River Estuary. *Environ Microbiol* **11**: 1194-1207.

Daley, R. (1979) Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: uses, limitations, and comparative accuracy. In *Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology*. Costerton, J.W., and Colwell, R.R. (eds): American Society for Testing Materials, pp. 29-45.

Dang, H., Li, J., Chen, M., Li, T., Zeng, Z., and Yin, X. (2009) Fine-scale vertical distribution of bacteria in the East Pacific deep-sea sediments determined via 16S rRNA gene T-RFLP and clone library analyses. *World J Microbiol Biotechnol* **25**: 179-188.

Dang, H., Luan, X.-W., Chen, R., Zhang, X., Guo, L., and Klotz, M.G. (2010a) Diversity, abundance and distribution of amoA-encoding archaea in deep-sea methane seep sediments of the Okhotsk Sea. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 370-385.

Dang, H., Li, J., Chen, R., Wang, L., Guo, L., Zhang, Z., and Klotz, M.G. (2010b) Diversity, abundance, and spatial distribution of sediment ammonia-oxidizing betaproteobacteria in response to environmental gradients and coastal eutrophication in Jiaozhou Bay, China. *Appl Environ Microbiol* **76**: 4691-4702.

Danovaro, R., Manini, E., and Fabiano, M. (2002) Exoenzymatic activity and organic matter composition in sediments of the Northern Adriatic Sea: response to a river plume. *Microb Ecol* **44**: 235-251.

Danovaro, R., Dell'Anno, A., Trucco, A., Serresi, M., and Vanucci, S. (2001) Determination of virus abundance in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **67**: 1384-1387.

De Beer, D., Wenzhöfer, F., Ferdelman, T.G., Boehme, S.E., Huettel, M., Van Beusekom, J.E.E. et al. (2005) Transport and mineralization rates in North Sea sandy intertidal sediments, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Limnol Oceanogr* **50**: 113-127.

De Brouwer, J.F.C., and Stal, L.J. (2001) Short-term dynamics in microphytobenthos distribution and associated extracellular carbohydrates in surface sediments of an intertidal mudflat. *Mar Ecol Prog Ser* **218**: 33-44.

De Brouwer, J.F.C., Wolfstein, K., and Stal, L.J. (2002) Physical characterization and diel dynamics of different fractions of extracellular polysaccharides in an axenic culture of a benthic diatom. *Eur J Phycol* **37**: 37-44.

de Brouwer, J.F.C., de Deckere, E.M.G.T., and Stal, L.J. (2003) Distribution of extracellular carbohydrates in three intertidal mudflats in Western Europe. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **56**: 313-324.

Decho, A.W. (2000) Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. *Cont Shelf Res* **20**: 1257-1273.

DeLeo, P.C., and Baveye, P. (1996) Enumeration and biomass estimation of bacteria in aquifer microcosm studies by flow cytometry. *Appl Environ Microbiol* **62**: 4580-4586.

DeLong, E.F. (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci* **89**: 5685-5689.

DeLong, E.F. (2009) The microbial ocean from genomes to biomes. *Nature* **459**: 200-206.

DeLong, E.F., Preston, C.M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S.J., Frigaard, N.U. et al. (2006) Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. *Science* **311**: 496-503.

Deming, J.W., and Carpenter, S.D. (2008) Factors influencing benthic bacterial abundance, biomass, and activity on the northern continental margin and deep basin of the Gulf of Mexico. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* **55**: 2597-2606.

dos Santos Furtado, A.L., and Casper, P. (2000) Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and a simple method to measure bacterial production in sediment samples. *J Microbiol Methods* **41**: 249-257.

Dray, S., and Dufour, A.-B. (2007) The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of statistical software* **22**: 1-20.

Dray, S., Legendre, P., and Blanchet, F.G. (2013). packfor: Forward Selection with permutation (Canoco p.46). R package version 0.0-8/r109. http://R-Forge.R-project.org/projects/sedar/.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* **28**: 350-356.

Duhamel, S., and Jacquet, S. (2006) Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J Microbiol Methods* **64**: 316-332.

Dyer, K.R., Christie, M.C., and Wright, E.W. (2000) The classification of intertidal mudflats. *Cont Shelf Res* **20**: 1039-1060.

Dytham, C. (2011) *Choosing and using statistics: a biologist's guide*. Berlin, Germany: John Wiley & Sons.

Edgar, R.C., Haas, B.J., Clemente, J.C., Quince, C., and Knight, R. (2011) UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* **27**: 2194-2200.

Edlund, A., Hårdeman, F., Jansson, J.K., and Sjöling, S. (2008) Active bacterial community structure along vertical redox gradients in Baltic Sea sediment. *Environ Microbiol* **10**: 2051-2063.

Eickhorst, T., and Tippkötter, R. (2008) Improved detection of soil microorganisms using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition (CARD-FISH). *Soil Biol Biochem* **40**: 1883-1891.

Einen, J., Thorseth, I.H., and Øvreås, L. (2008) Enumeration of Archaea and Bacteria in seafloor basalt using real-time quantitative PCR and fluorescence microscopy. *FEMS Microbiol Lett* **282**: 182-187.

Ellery, W., and Schleyer, M. (1984) Comparison of homogenization and ultrasonication as techniques in extracting attached sedimentary bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **15**: 247-250.

Enwall, K., Throbäck, I.N., Stenberg, M., Söderström, M., and Hallin, S. (2010) Soil resources influence spatial patterns of denitrifying communities at scales compatible with land management. *Appl Environ Microbiol* **76**: 2243-2250.

Epstein, S.S., and Rossel, J. (1995) Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. *Mar Ecol Prog Ser* **117**: 289-298.

Erdôs, L., Zalatnai, M., Morschhauser, T., Bátori, Z., and Körmöczi, L. (2011) On the terms related to spatial ecological gradients and boundaries. *Acta Biologica Szegediensis* **55**: 279-287.

Fabiano, M., and Danovaro, R. (1998) Enzymatic activity, bacterial distribution, and organic matter composition in sediments of the Ross Sea (Antarctica). *Appl Environ Microbiol* **64**: 3838-3845.

Falkowski, P., and Raven, J. (1997) *Aquatic Photosynthesis*. Malden, MA, USA: Blackwell Science.

Falkowski, P.G., Barber, R.T., and Smetacek, V. (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. *Science* **281**: 200-206.

Falkowski, P.G., Fenchel, T., and Delong, E.F. (2008) The microbial engines that drive earth's biogeochemical cycles. *Science* **320**: 1034-1039.

Fang, J., Shizuka, A., Kato, C., and Schouten, S. (2006) Microbial diversity of cold-seep sediments in Sagami Bay, Japan, as determined by 16S rRNA gene and lipid analyses. *FEMS Microbiol Ecol* **57**: 429-441.

Fazi, S., Amalfitano, S., Pernthaler, J., and Puddu, A. (2005) Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. *Environ Microbiol* **7**: 1633-1640.

Fenchel, T., and Finlay, B. (2008) Oxygen and the spatial structure of microbial communities. *Biological Reviews* **83**: 553-569.

Fernandes, S.O., Michotey, V.D., Guasco, S., Bonin, P.C., and Loka Bharathi, P.A. (2012a) Denitrification prevails over anammox in tropical mangrove sediments (Goa, India). *Mar Environ Res* **74**: 9-19.

Fernandes, S.O., Bonin, P.C., Michotey, V.D., Garcia, N., and LokaBharathi, P.A. (2012b) Nitrogen-limited mangrove ecosystems conserve N through dissimilatory nitrate reduction to ammonium. *Sci Rep* **2**: 419.

Flemming, H.-C., and Wingender, J. (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* **8**: 623-633.

Folk, R.L., and Ward, W.C. (1957) Brazos River bar (Texas); a study in the significance of grain size parameters. *Journal of Sedimentary Research* **27**: 3-26.

Forster, R.M., Creach, V., Sabbe, K., Vyverman, W., and Stal, L.J. (2006) Biodiversity-ecosystem function relationship in microphytobenthic diatoms of the Westerschelde estuary. *Mar Ecol Prog Ser* **311**: 191-201.

Francis, C.A., O'Mullan, G.D., and Ward, B.B. (2003) Diversity of ammonia monooxygenase (*amoA*) genes across environmental gradients in Chesapeake Bay sediments. *Geobiol* **1**: 129-140.

Francis, C.A., Beman, J.M., and Kuypers, M.M.M. (2007) New processes and players in the nitrogen cycle: the microbial ecology of anaerobic and archaeal ammonia oxidation. *ISME J* **1**: 19-27.

Francis, C.A., Robert, K.J., Beman, J.M., Santoro, A.E., and Oakley, B.B. (2005) Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 14683-14688.

Franco, M.A., De Mesel, I., Demba Diallo, M., van der Gucht, K., van Gansbeke, D., van Rijswijk, P. et al. (2007) Effect of phytoplankton bloom deposition on benthic bacterial communities in two contrasting sediments in the southern North Sea. *Aquat Microb Ecol* **48**: 241-254.

Friend, P., Lucas, C., and Rossington, S. (2005) Day–night variation of cohesive sediment stability. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **64**: 407-418.

Friend, P.L., Collins, M.B., and Holligan, P.M. (2003) Day–night variation of intertidal flat sediment properties in relation to sediment stability. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **58**: 663-675.

Frischer, M.E., Danforth, J.M., Healy, M.A.N., and Saunders, F.M. (2000) Whole-Cell versus Total RNA Extraction for Analysis of Microbial Community Structure with 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes in Salt Marsh Sediments. *Appl Environ Microbiol* **66**: 3037-3043.

Fuerst, J.A., and Sagulenko, E. (2011) Beyond the bacterium: *Planctomycetes* challenge our concepts of microbial structure and function. *Nat Rev Micro* **9**: 403-413.

Fuhrman, J.A., and Hagström, Å. (2008) Bacterial and archaeal community structure and its patterns. In *Microbial ecology of the oceans*: John Wiley & Sons, Inc., pp. 45-90.

Fuhrman, J.A., Griffith, J.F., and Schwalbach, M.S. (2002) Prokaryotic and viral diversity patterns in marine plankton. *Ecol Res* **17**: 183-194.

Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Sakiyama, Y., Ohuchi, M., Yokota, A., and Harayama, S. (2009) *Phycisphaera mikurensis* gen. nov., sp. nov., isolated from a marine alga, and proposal of *Phycisphaeraceae* fam. nov., *Phycisphaerales* ord. nov. and *Phycisphaerae* classis nov. in the phylum *Planctomycetes*. *J Gen Appl Microbiol* **55**: 267-275.

Garet, M.-J. (1996) Transformation bactérienne de la matière organique dans les sédiments côtiers: relation entre les métabolismes respiratoires et les activités exoprotéolytiques bactériennes Ph. D. thesis Univ. of La Rochelle. In. La Rochelle.

Garet, M.J., and Moriarty, D.J.W. (1996) Acid extraction of tritium label from bacterial DNA in clay sediment. *J Microbiol Methods* **25**: 1-4.

Gasol, J.M. (1993) Benthic flagellates and ciliates in fine freshwater sediments: calibration of a live counting procedure and estimation of their abundances. *Microb Ecol* **25**: 247-262.

Gasol, J.M., and Del Giorgio, P.A. (2000) Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sci Mar* **64**: 197-224.

Gerbersdorf, S.U., Westrich, B., and Paterson, D.M. (2009a) Microbial extracellular polymeric substances (EPS) in fresh water sediments. *Microb Ecol* **58**: 334-349.

Gerbersdorf, S.U., Bittner, R., Lubarsky, H., Manz, W., and Paterson, D.M. (2009b) Microbial assemblages as ecosystem engineers of sediment stability. *Journal of Soils and Sediments* **9**: 640-652.

Gibbons, S.M., Caporaso, J.G., Pirrung, M., Field, D., Knight, R., and Gilbert, J.A. (2013) Evidence for a persistent microbial seed bank throughout the global ocean. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 4651-4655.

Giblin, A.E., Tobias, C.R., Song, B., Weston, N., Banta, G.T., and Rivera-Monroy, V.H. (2013) The importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) in the nitrogen cycle of coastal ecosystems. *Oceanography* **26**: 124-131.

Giesy, J.P., and Allred, P. (1985) Replicability of aquatic multispecies test systems. In *Multispecies Toxicity Testing*. John Cairns, J. (ed). New York: Pergamon Press, pp. 187-247.

Gilbertson, W.W., Solan, M., and Prosser, J.I. (2012) Differential effects of microorganism–invertebrate interactions on benthic nitrogen cycling. *FEMS Microbiol Ecol* **82**: 11-22.

Girvan, M.S., Campbell, C.D., Killham, K., Prosser, J.I., and Glover, L.A. (2005) Bacterial diversity promotes community stability and functional resilience after perturbation. *Environ Microbiol* **7**: 301-313.

Glöckner, F.O., Amann, R., Alfreider, A., Pernthaler, J., Psenner, R., Trebesius, K., and Schleifer, K.-H. (1996) An *in situ* hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. *Syst Appl Microbiol* **19**: 403-406.

Glud, R.N., Thamdrup, B., Stahl, H., Wenzhoefer, F., Glud, A., Nomaki, H. et al. (2009) Nitrogen cycling in a deep ocean margin sediment (Sagami Bay, Japan). *Limnol Oceanogr* **54**: 723-734.

Gobet, A., Boetius, A., and Ramette, A. (2014) Ecological coherence of diversity patterns derived from classical fingerprinting and Next Generation Sequencing techniques. *Environ Microbiol* **16**: 2672-2681.

Gobet, A., Boer, S.I., Huse, S.M., van Beusekom, J.E., Quince, C., Sogin, M.L. et al. (2012) Diversity and dynamics of rare and of resident bacterial populations in coastal sands. *ISME J* **6**: 542-553.

Goñi-Urriza, M., de Montaudouin, X., Guyoneaud, R., Bachelet, G., and de Wit, R. (1999) Effect of macrofaunal bioturbation on bacterial distribution in marine sandy sediments, with special reference to sulphur-oxidising bacteria. *J Sea Res* **41**: 269-279.

Gough, H.L., and Stahl, D.A. (2003) Optimization of direct cell counting in sediment. *J Microbiol Methods* **52**: 39-46.

Gribaldo, S., and Brochier, C. (2009) Phylogeny of prokaryotes: does it exist and why should we care? *Res Microbiol* **160**: 513-521.

Gruber, N., and Galloway, J.N. (2008) An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* **451**: 293-296.

Hallam, S.J., Mincer, T.J., Schleper, C., Preston, C.M., Roberts, K., Richardson, P.M., and DeLong, E.F. (2006) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine *Crenarchaeota*. *PLoS Biol* **4**: e95.

Hallin, S., and Lindgren, P.-E. (1999) PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying Bacteria. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1652-1657.

Hamersley, M.R., Lavik, G., Woebken, D., Rattray, J.E., Lam, P., Hopmans, E.C. et al. (2007) Anaerobic ammonium oxidation in the Peruvian oxygen minimum zone. *Limnol Oceanogr* **52**: 923.

Hanlon, A.R.M., Bellinger, B., Haynes, K., Xiao, G., Hofmann, T.A., Gretz, M.R. et al. (2006) Dynamics of extracellular polymeric substance (EPS) production and loss in an

estuarine, diatom-dominated, microalgal biofilm over a tidal emersion-immersion period. *Limnol Oceanogr* **51**: 79-93.

Haubois, A.G., Sylvestre, F., Guarini, J.M., Richard, P., and Blanchard, G.F. (2005) Spatio-temporal structure of the epipelic diatom assemblage from an intertidal mudflat in Marennes-Oléron Bay, France. *Estuar Coast Shelf Sci* **64**: 385-394.

Hawkins, A.N., Johnson, K.W., and Bräuer, S.L. (2014) Southern appalachian peatlands support high archaeal diversity. *Microb Ecol* **67**: 587-602.

Haynes, K., Hofmann, T.A., Smith, C.J., Ball, A.S., Underwood, G.J.C., and Osborn, A.M. (2007) Diatom-derived carbohydrates as factors affecting bacterial community composition in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6112-6124.

Heip, C.H.R., Goosen, N.K., Herman, P.M.J., Kromkamp, J., Middelburg, J.J., and Soetaert, K. (1995) Production and consumption of biological particles in temperate tidal estuaries. *Oceanography and Marine Biology: an annual review Vol 33*: 1-149.

Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., and Philippot, L. (2006) Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl Environ Microbiol* **72**: 5181-5189.

Heral, M., Deslous-Paoli, J.-M., and Prou, J. (1986) Dynamiques des productions et des biomasses des huîtres creuses cultivées (*Crassostrea angulata* et *Crassostrea gigas*) dans le bassin de Marennes-Oleron depuis un siècle. In *International Council for the Exploration of the Sea*, p. 41.

Herfort, L., Schouten, S., Abbas, B., Veldhuis, M.J.W., Coolen, M.J.L., Wuchter, C. et al. (2007) Variations in spatial and temporal distribution of Archaea in the North Sea in relation to environmental variables. *FEMS Microbiol Ecol* **62**: 242-257.

Herlemann, D.P.R., Labrenz, M., Jurgens, K., Bertilsson, S., Waniek, J.J., and Andersson, A.F. (2011) Transitions in bacterial communities along the 2000 km salinity gradient of the Baltic Sea. *ISME J* **5**: 1571-1579.

Herlory, O. (2005) Etude du biofilm microalgal des vasières intertidales : dynamique spatio-temporelle à micro-échelle et performances photosynthétiques. In *University of La Rochelle*. La Rochelle: University of La Rochelle, p. 204.

Herlory, O., Guarini, J.-M., Richard, P., and Blanchard, G. (2004) Microstructure of microphytobenthic biofilm and its spatio-temporal dynamics in an intertidal mudflat (Aiguillon Bay, France). *Mar Ecol Prog Ser* **282**: 33-44.

Herman, P.M.J., Middelburg, J.J., van de Koppel, J., and Heip, C.H.R. (1999) Ecology of Estuarine Macrobenthos. In *Adv Ecol Res*. Nedwell, D.B., and Raffaelli, D.G. (eds): Academic Press, pp. 195-240.

Hewson, I., Vargo, G.A., and Fuhrman, J.A. (2003) Bacterial diversity in shallow oligotrophic marine benthos and overlying waters: effects of virus infection, containment, and nutrient enrichment. *Microb Ecol* **46**: 322-336.

Hirayama, H., Sunamura, M., Takai, K., Nunoura, T., Noguchi, T., Oida, H. et al. (2007) Culture-dependent and -independent characterization of microbial communities associated with a shallow submarine hydrothermal system occurring within a coral reef off Taketomi Island, Japan. *Appl Environ Microbiol* **73**: 7642-7656.

Hochard, S., Pinazo, C., Grenz, C., Evans, J.L.B., and Pringault, O. (2010) Impact of microphytobenthos on the sediment biogeochemical cycles: A modeling approach. *Ecol Model* **221**: 1687-1701.

Hong, Y., Xu, X., Kan, J., and Chen, F. (2014) Linking seasonal inorganic nitrogen shift to the dynamics of microbial communities in the Chesapeake Bay. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**: 3219-3229.

Hongoh, Y., Ohkuma, M., and Kudo, T. (2003) Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol Ecol* **44**: 231-242.

Hornek, R., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., Farnleitner, A.H., Kreuzinger, N., Kirschner, A., and Mach, R.L. (2006) Primers containing universal bases reduce multiple *amoA* gene specific DGGE band patterns when analysing the diversity of beta-ammonia oxidizers in the environment. *J Microbiol Methods* **66**: 147-155.

Hubas, C., Lamy, D., Artigas, L., and Davoult, D. (2007) Seasonal variability of intertidal bacterial metabolism and growth efficiency in an exposed sandy beach during low tide. *Mar Biol* **151**: 41-52.

Hubas, C., Sachidhanandam, C., Rybarczyk, H., Lubarsky, H.V., Rigaux, A., Moens, T., and Paterson, D.M. (2010) Bacterivorous nematodes stimulate microbial growth and exopolymer production in marine sediment microcosms. *Mar Ecol Prog Ser* **419**: 85-94.

Huettel, M., Berg, P., and Kostka, J.E. (2014) Benthic Exchange and Biogeochemical Cycling in Permeable Sediments. *Annual Review of Marine Science* **6**: 23-51.

Hugoni, M., Taib, N., Debroas, D., Domaizon, I., Jouan Dufournel, I., Bronner, G. et al. (2013) Structure of the rare archaeal biosphere and seasonal dynamics of active ecotypes in surface coastal waters. *Proc Natl Acad Sci* **110**: 6004-6009.

Hulcr, J., Latimer, A.M., Henley, J.B., Rountree, N.R., Fierer, N., Lucky, A. et al. (2012) A jungle in there: Bacteria in belly buttons are highly diverse, but predictable. *PLoS ONE* **7**: e47712.

Husson, F., Josse, J., Le, S., and Mazet, J. (2013). FactoMineR: multivariate exploratory data analysis and data mining with R. R package version 1.24. http://CRAN.R-project.org/package=FactoMineR.

Ifremer (2008) Réseau de suivi Lagunaire du Languedoc-Roussilon : Bilan des résultats 2008 In *Rapport RSL 08-9* p. 50.

Inagaki, F., Suzuki, M., Takai, K., Oida, H., Sakamoto, T., Aoki, K. et al. (2003) Microbial communities associated with geological horizons in coastal subseafloor sediments from the Sea of Okhotsk. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7224-7235.

Inagaki, F., Nunoura, T., Nakagawa, S., Teske, A., Lever, M., Lauer, A. et al. (2006a) Biogeographical distribution and diversity of microbes in methane hydrate-bearing deep marine sediments on the Pacific Ocean Margin. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2815-2820.

Inagaki, F., Kuypers, M.M.M., Tsunogai, U., Ishibashi, J.-i., Nakamura, K.-i., Treude, T. et al. (2006b) Microbial community in a sediment-hosted CO_2 lake of the southern Okinawa trough hydrothermal system. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 14164-14169.

Ishii, K., Mussmann, M., MacGregor, B.J., and Amann, R. (2004) An improved fluorescence *in situ* hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **50**: 203-213.

Jaspers, E., and Overmann, J. (1997) Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **63**: 3176-3181.

Jetten, M.S.M. (2008) The microbial nitrogen cycle. *Environ Microbiol* **10**: 2903-2909.

Jetten, M.S.M., van Niftrik, L., Strous, M., Kartal, B., Keltjens, J.T., and Op den Camp, H.J.M. (2009) Biochemistry and molecular biology of anammox bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 65-84.

Jones, C., Lawton, J., and Shachak, M. (1996) Organisms as Ecosystem Engineers. In *Ecosystem Management*: Springer New York, pp. 130-147.

Jorgensen, B.B., and Boetius, A. (2007) Feast and famine - microbial life in the deep-sea bed. *Nat Rev Micro* **5**: 770-781.

Joye, S.B., De Beer, D., Cook, P.L., and Perillo, G. (2009) Biogeochemical dynamics of coastal tidal flats. In *Coastal wetlands: an integrated ecosystem approach*. Perillo, G., Cahoon, D., and Brinson, M., (ed). Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, pp. 345-374.

Juck, D., Charles, T., Whyte, L.G., and Greer, C.W. (2000) Polyphasic microbial community analysis of petroleum hydrocarbon-contaminated soils from two northern Canadian communities. *FEMS Microbiol Ecol* **33**: 241-249.

Jung, M.-Y., Park, S.-J., Kim, S.-J., Kim, J.-G., Sinninghe Damsté, J.S., Jeon, C.O., and Rhee, S.-K. (2014) A Mesophilic, Autotrophic, Ammonia-Oxidizing Archaeon of Thaumarchaeal Group I.1a Cultivated from a Deep Oligotrophic Soil Horizon. *Appl Environ Microbiol* **80**: 3645-3655.

Kallmeyer, J., Smith, D.C., Spivack, A.J., and D'Hondt, S. (2008) New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments. *Limnol Oceanogr Methods* **6**: 236-245.

Karl, D.M. (2007) Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. *Nat Rev Micro* **5**: 759-769.

Kartal, B., Kuypers, M.M.M., Lavik, G., Schalk, J., Op den Camp, H.J.M., Jetten, M.S.M., and Strous, M. (2007) Anammox bacteria disguised as denitrifiers: nitrate reduction to dinitrogen gas via nitrite and ammonium. *Environ Microbiol* **9**: 635-642.

Kartal, B., Maalcke, W.J., de Almeida, N.M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W. et al. (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* **479**: 127-130.

Kates, M. (1993) In *The Biochemistry of archaea (archaebacteria)*. Kates, M., Kushner, D.J., and Matheson, A. (eds). Amsterdam: Elsevier, pp. 261-295.

Kemp, P.F., Newell, S.Y., and Hopkinson, C.S. (1990) Importance of grazing on the salt-marsh grass *Spartina alterniflora* to nitrogen turnover in a macrofaunal consumer,*Littorina irrorata*, and to decomposition of standing-dead Spartina. *Mar Biol* **104**: 311-319.

Kendall, M.M., Wardlaw, G.D., Tang, C.F., Bonin, A.S., Liu, Y., and Valentine, D.L. (2007) Diversity of *Archaea* in marine sediments from Skan Bay, Alaska, including cultivated methanogens, and description of *Methanogenium boonei* sp. nov. *Appl Environ Microbiol* **73**: 407-414.

Kim, M., Morrison, M., and Yu, Z. (2011) Evaluation of different partial 16S rRNA gene sequence regions for phylogenetic analysis of microbiomes. *J Microbiol Methods* **84**: 81-87.

Kirchman, D.L., Dittel, A.I., Malmstrom, R.R., and Cottrell, M.T. (2005) Biogeography of major bacterial groups in the Delaware Estuary. *Limnol Oceanogr* **50**: 1697-1706.

Knittel, K., Lösekann, T., Boetius, A., Kort, R., and Amann, R. (2005) Diversity and distribution of Methanotrophic Archaea at cold seeps. *Appl Environ Microbiol* **71**: 467-479.

Konneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., and Stahl, D.A. (2005) Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* **437**: 543-546.

Kozlowski, J.A., Price, J., and Stein, L.Y. (2014) Revision of N_2O-producing pathways in the ammonia-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718. *Appl Environ Microbiol*.

Kraft, B., Tegetmeyer, H.E., Meier, D., Geelhoed, J.S., and Strous, M. (2014) Rapid succession of uncultured marine bacterial and archaeal populations in a denitrifying continuous culture. *Environ Microbiol*.

Kubo, K., Lloyd, K.G., F Biddle, J., Amann, R., Teske, A., and Knittel, K. (2012) Archaea of the Miscellaneous Crenarchaeotal Group are abundant, diverse and widespread in marine sediments. *ISME J* **6**: 1949-1965.

Kuenen, J.G. (2008) Anammox bacteria: from discovery to application. *Nat Rev Micro* **6**: 320-326.

Kuwae, T., and Hosokawa, Y. (1999) Determination of Abundance and Biovolume of Bacteria in Sediments by Dual Staining with 4′,6-Diamidino-2-Phenylindole and Acridine Orange: Relationship to Dispersion Treatment and Sediment Characteristics. *Appl Environ Microbiol* **65**: 3407-3412.

Laima, M., Brossard, D., Sauriau, P.G., Girard, M., Richard, P., Gouleau, D., and Joassard, L. (2002) The influence of long emersion on biota, ammonium fluxes and nitrification in intertidal sediments of Marennes-Oléron Bay, France. *Mar Environ Res* **53**: 381-402.

Lam, P., Jensen, M.M., Lavik, G., McGinnis, D.F., Müller, B., Schubert, C.J. et al. (2007) Linking crenarchaeal and bacterial nitrification to anammox in the Black Sea. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 7104-7109.

Langenheder, S., Lindström, E.S., and Tranvik, L.J. (2006) Structure and function of bacterial communities emerging from different sources under identical conditions. *Appl Environ Microbiol* **72**: 212-220.

Lavergne, C., Beaugeard, L., Dupuy, C., Courties, C., and Agogué, H. (2014) An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. *J Microbiol Methods* **105**: 31-38.

Laverock, B., Gilbert, J.A., Tait, K., Osborn, A.M., and Widdicombe, S. (2011) Bioturbation: Impact on the marine nitrogen cycle. *Biochemical Society Transactions* **39**: 315-320.

Laverock, B., Tait, K., Gilbert, J.A., Osborn, A.M., and Widdicombe, S. (2014) Impacts of bioturbation on temporal variation in bacterial and archaeal nitrogen-cycling gene abundance in coastal sediments. *Environ Microbiol Rep* **6**: 113-121.

Laverock, B., Kitidis, V., Tait, K., Gilbert, J.A., Osborn, A.M., and Widdicombe, S. (2013) Bioturbation determines the response of benthic ammonia-oxidizing microorganisms to ocean acidification. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**.

Lebaron, P., Troussellier, M., and Got, P. (1994) Accucary of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers. *J Microbiol Methods* **19**: 89-94.

Lee, Y.K., Hong, S.G., Cho, H.H., Cho, K.H., and Lee, H.K. (2007) *Dasania marina* gen. nov., sp. nov., of the order Pseudomonadales, isolated from Arctic marine sediment. *Journal of Microbiology - Seoul-* **45**: 505.

Legendre, L., Courties, C., and Troussellier, M. (2001) Flow cytometry in oceanography 1989–1999: Environmental challenges and research trends. *Cytometry* **44**: 164-172.

Legendre, P., and Legrendre, L. (1998) *Numerical ecology. Developments in environmental modelling*: Elsevier Science & Technology.

Lei, Y., Stumm, K., Volkenborn, N., Wickham, S., and Berninger, U.-G. (2010) Impact of *Arenicola marina* (Polychaeta) on the microbial assemblages and meiobenthos in a marine intertidal flat. *Mar Biol* **157**: 1271-1282.

Leloup, J., Loy, A., Knab, N.J., Borowski, C., Wagner, M., and Jørgensen, B.B. (2007) Diversity and abundance of sulfate-reducing microorganisms in the sulfate and methane zones of a marine sediment, Black Sea. *Environ Microbiol* **9**: 131-142.

Lindahl, V., and Bakken, L.R. (1995) Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol Ecol* **16**: 135-142.

Liu, Z., Lozupone, C., Hamady, M., Bushman, F.D., and Knight, R. (2007) Short pyrosequencing reads suffice for accurate microbial community analysis. *Nucleic Acids Research* **35**: e120.

Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., and Amann, R. (1998) Microbial community composition of Wadden Sea sediments as revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2691-2696.

Llobet-Brossa, E., Rabus, R., Böttcher, M.E., Könneke, M., Finke, N., Schramm, A. et al. (2002) Community structure and activity of sulfate-reducing bacteria in an intertidal surface sediment: a multi-method approach. *Aquat Microb Ecol* **29**: 211-226.

Lloyd, K.G., Schreiber, L., Petersen, D.G., Kjeldsen, K.U., Lever, M.A., Steen, A.D. et al. (2013) Predominant archaea in marine sediments degrade detrital proteins. *Nature* **496**: 215-218.

Lorenzen, C.J. (1966) A method for the continuous measurement of *in vivo* chlorophyll concentration. *Deep-Sea Res and Oceanogr Abst* **13**: 223-227.

Lozupone, C.A., and Knight, R. (2007) Global patterns in bacterial diversity. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 11436-11440.

Lubarsky, H.V., Hubas, C., Chocholek, M., Larson, F., Manz, W., Paterson, D.M., and Gerbersdorf, S.U. (2010) The stabilisation potential of individual and mixed assemblages of natural bacteria and microalgae. *PLoS ONE* **5**: e13794.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar et al. (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Research* **32**: 1363-1371.

Luna, G.M., Manini, E., and Danovaro, R. (2002) Large Fraction of Dead and Inactive Bacteria in Coastal Marine Sediments: Comparison of Protocols for Determination and Ecological Significance. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3509-3513.

Luna, G.M., Corinaldesi, C., Rastelli, E., and Danovaro, R. (2013) Patterns and drivers of bacterial α- and β-diversity across vertical profiles from surface to subsurface sediments. *Environ Microbiol Rep* **5**: 731-739.

Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., Martens-Habbena, W., and Simon, M. (2005) An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. *Environ Microbiol* **7**: 961-968.

Lundkvist, M., Grue, M., Friend, P.L., and Flindt, M.R. (2007) The relative contributions of physical and microbiological factors to cohesive sediment stability. *Cont Shelf Res* **27**: 1143-1152.

MacIntyre, H., Geider, R., and Miller, D. (1996) Microphytobenthos: The ecological role of the "secret garden" of unvegetated, shallow-water marine habitats. I. Distribution, abundance and primary production. *Estuaries* **19**: 186-201.

MacIntyre, H.L., and Cullen, J.J. (1995) Fine-scale vertical resolution of chlorophyll and photosynthetic parameters in shallow-water benthos. *Mar Ecol Prog Ser* **122**: 227-238.

MacLean, D., Jones, J.D.G., and Studholme, D.J. (2009) Application of 'next-generation' sequencing technologies to microbial genetics. *Nat Rev Micro* **7**: 287-296.

Madigan, M.T., Clark, D.P., Stahl, D., and Martinko, J.M. (2010) *Brock Biology of Microorganisms*: Benjamin Cummings.

Madsen, E.L. (2008) *Environmental microbiology: from genomes to biogeochemistry*: Blackwell Publishing.

Magalhães, C.M., Machado, A., and Bordalo, A.A. (2009) Temporal variability in the abundance of ammonia-oxidizing bacteria vs. archaea in sandy sediments of the Douro River estuary, Portugal. *Aquat Microb Ecol* **56**: 13.

Mahaffey, C., Michaels, A.F., and Capone, D.G. (2005) The conundrum of marine N_2 fixation. *American Journal of Science* **305**: 546-595.

Mallet, C., Agogué, H., Bonnemoy, F., Guizien, K., Orvain, F., and Dupuy, C. (2014) Structures of benthic prokaryotic communities and their hydrolytic enzyme activities

resuspended from samples of intertidal mudflats: An experimental approach. *J Sea Res* **92**: 158-169.

Marchant, H.K., Lavik, G., Holtappels, M., and Kuypers, M.M.M. (2014) The Fate of Nitrate in Intertidal Permeable Sediments. *PLoS ONE* **9**: e104517.

Mardis, E.R. (2008) Next-Generation DNA Sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **9**: 387-402.

Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., and Vaulot, D. (1997) Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl Environ Microbiol* **63**: 186-193.

Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., and Brussaard, C. (2001) Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. In *Curr Protoc Cytometry*: John Wiley & Sons, Inc.

Maron, P.-A., Schimann, H., Ranjard, L., Brothier, E., Domenach, A.-M., Lensi, R., and Nazaret, S. (2006) Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. *Eur J Soil Biol* **42**: 65-73.

McKew, B.A., Dumbrell, A.J., Taylor, J.D., McGenity, T.J., and Underwood, G.J.C. (2013) Differences between aerobic and anaerobic degradation of microphytobenthic biofilm-derived organic matter within intertidal sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **84**: 495-509.

Meadows, P.S., Tait, J., and Hussain, S.A. (1990) Effects of estuarine infauna on sediment stability and particle sedimentation. *Hydrobiologia* **190**: 263-266.

Megonigal, J., Mines, M., and Visscher, P. (2005) Anaerobic metabolism: linkages to trace gases and aerobic processes. In *Biogeochemistry*. Schlesinger, W.H. (ed). Oxford, UK: Elsevier-Pergamon, pp. 317-424.

Mehta, A., and Li, Y. (1997) A PC-based short course on fine-grained sediment transport engineering. In *Coastal and Oceanographic Engineering Department*. Florida, U.o. (ed). Gainesville, FL.

Michaud, E., Aller, R.C., and Stora, G. (2010) Sedimentary organic matter distributions, burrowing activity, and biogeochemical cycling: Natural patterns and experimental artifacts. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **90**: 21-34.

Middelburg, J.J., Barranguet, C., Boschker, H.T.S., Herman, P.M.J., Moens, T., and Heip, C.H.R. (2000) The fate of intertidal microphytobenthos carbon: An *in situ* ^{13}C-labeling study. *Limnol Oceanogr* **45**: 1224-1234.

Miki, T., Yokokawa, T., and Matsui, K. (2014) Biodiversity and multifunctionality in a microbial community: a novel theoretical approach to quantify functional redundancy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**: 20132498.

Millennium Ecosystem Assessment, M. (2005) *Ecosystems and human well-being: current state and trends*. Washington D.C.: Island Press.

Minjeaud, L., Michotey, V., Garcia, N., and Bonin, P. (2009) Seasonal variation in di-nitrogen fluxes and associated processes (denitrification, anammox and nitrogen fixation) in sediment subject to shellfish farming influences. *Aquatic Sciences* **71**: 425-435.

Mohan, S.B., Schmid, M., Jetten, M., and Cole, J. (2004) Detection and widespread distribution of the *nrfA* gene encoding nitrite reduction to ammonia, a short circuit in the biological nitrogen cycle that competes with denitrification. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 433-443.

Molari, M., Giovannelli, D., d'Errico, G., and Manini, E. (2012) Factors influencing prokaryotic community structure composition in sub-surface coastal sediments. *Estuar Coast Shelf Sci* **97**: 141-148.

Montagna, P.A. (1982) Sampling design and enumeration statistics for bacteria extracted from marine sediments. *Appl Environ Microbiol* **43**: 1366-1372.

Morono, Y., Terada, T., Kallmeyer, J., and Inagaki, F. (2013) An improved cell separation technique for marine subsurface sediments: Applications for high-throughput analysis using flow cytometry and cell sorting. *Environ Microbiol* **15**: 2841-2849.

Mosier, A.C., and Francis, C.A. (2008) Relative abundance and diversity of ammonia-oxidizing archaea and bacteria in the San Francisco Bay estuary. *Environ Microbiol* **10**: 3002-3016.

Mosier, A.C., and Francis, C.A. (2010) Denitrifier abundance and activity across the San Francisco Bay estuary. *Environ Microbiol Rep* **2**: 667-676.

Mulder, A., van de Graaf, A.A., Robertson, L.A., and Kuenen, J.G. (1995) Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol Ecol* **16**: 177-184.

Musat, N., Werner, U., Knittel, K., Kolb, S., Dodenhof, T., van Beusekom, J.E.E. et al. (2006) Microbial community structure of sandy intertidal sediments in the North Sea, Sylt-Rømø Basin, Wadden Sea. *Syst Appl Microbiol* **29**: 333-348.

Mussmann, M., Ishii, K., Rabus, R., and Amann, R. (2005) Diversity and vertical distribution of cultured and uncultured Deltaproteobacteria in an intertidal mud flat of the Wadden Sea. *Environ Microbiol* **7**: 405-418.

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

Mussmann, M., Brito, I., Pitcher, A., Sinninghe Damsté, J.S., Hatzenpichler, R., Richter, A. et al. (2011) Thaumarchaeotes abundant in refinery nitrifying sludges express amoA but are not obligate autotrophic ammonia oxidizers. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 16771-16776.

Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 695-700.

Muyzer, G., Teske, A., Wirsen, C., and Jannasch, H. (1995) Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch Microbiol* **164**: 165-172.

Nedwell, D.B., Jickells, T.D., Trimmer, M., and Sanders, R. (1999) Nutrients in Estuaries. In *Adv Ecol Res*. Nedwell, D.B., and Raffaelli, D.G. (eds): Academic Press, pp. 43-92.

Oakes, J.M., Eyre, B.D., Middelburg, J.J., and Boschker, H.T.S. (2010) Composition, production, and loss of carbohydrates in subtropical shallow subtidal sandy sediments: Rapid processing and long-term retention revealed by ^{13}C-labeling. *Limnol Oceanogr* **55**: 2126-2138.

Odum, E.P. (1984) The Mesocosm. *Bioscience* **34**: 558-562.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B. et al. (2013). vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-7. http://CRAN.R-project.org/package=vegan.

Oliveira, V., Santos, A.L., Aguiar, C., Santos, L., Salvador, Â.C., Gomes, N.C.M. et al. (2012) Prokaryotes in salt marsh sediments of Ria de Aveiro: Effects of halophyte vegetation on abundance and diversity. *Estuar Coast Shelf Sci* **110**: 61-68.

Oliveros, J.C. (2007). VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. URL http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html

Olsen, G.J., and Woese, C.R. (1996) Lessons from an Archaeal genome: what are we learning from *Methanococcus jannaschii*? *Trends Genet* **12**: 377-379.

Orvain, F., Guizien, K., Lefebvre, S., Bréret, M., and Dupuy, C. (2014a) Relevance of macrozoobenthic grazers to understand the dynamic behaviour of sediment erodibility and microphytobenthos resuspension in sunny summer conditions. *J Sea Res* **92**: 46-55.

Orvain, F., Galois, R., Barnard, C., Sylvestre, A., Blanchard, G., and Sauriau, P.G. (2003) Carbohydrate production in relation to microphytobenthic biofilm development: an integrated approach in a tidal mesocosm. *Microb Ecol* **45**: 237-251.

Orvain, F., Lefebvre, S., Montepini, J., Sébire, M., Gangnery, A., and Sylvand, B. (2012) Spatial and temporal interaction between sediment and microphytobenthos in a temperate estuarine macro-intertidal bay. *Mar Ecol Prog Ser* **458**: 53-68.

Orvain, F., De Crignis, M., Guizien, K., Lefebvre, S., Mallet, C., Takahashi, E., and Dupuy, C. (2014b) Tidal and seasonal effects on the short-term temporal patterns of bacteria, microphytobenthos and exopolymers in natural intertidal biofilms (Brouage, France). *J Sea Res* **92**: 6-18.

Pace, M.L., and Cole, J.J. (1994) Comparative and experimental approaches to top-down and bottom-up regulation of bacteria. *Microb Ecol* **28**: 181-193.

Pachiadaki, M.G., Lykousis, V., Stefanou, E.G., and Kormas, K.A. (2010) Prokaryotic community structure and diversity in the sediments of an active submarine mud volcano (Kazan mud volcano, East Mediterranean Sea). *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 429-444.

Papaspyrou, S., Smith, C.J., Dong, L.F., Whitby, C., Dumbrell, A.J., and Nedwell, D.B. (2014) Nitrate reduction functional genes and nitrate reduction potentials persist in deeper estuarine sediments. Why? *PLoS ONE* **9**: e94111.

Paradis, E., Claude, J., and Strimmer, K. (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language (version 3.1-4). *Bioinformatics* **20**: 289-290.

Park, S.S., and Jaffé, P.R. (1996) Development of a sediment redox potential model for the assessment of postdepositional metal mobility. *Ecol Model* **91**: 169-181.

Parkes, R.J., Cragg, B., Roussel, E., Webster, G., Weightman, A., and Sass, H. (2014) A review of prokaryotic populations and processes in sub-seafloor sediments, including biosphere:geosphere interactions. *Marine Geology*.

Parkes, R.J., Cragg, B.A., Banning, N., Brock, F., Webster, G., Fry, J.C. et al. (2007) Biogeochemistry and biodiversity of methane cycling in subsurface marine sediments (Skagerrak, Denmark). *Environ Microbiol* **9**: 1146-1161.

Pascal, P.Y., Dupuy, C., Richard, P., Mallet, C., Arminot du Châtelet, E., and Niquil, N. (2009) Seasonal variation in consumption of benthic bacteria by meio- and macrofauna in an intertidal mudflat. *Limnol Oceanogr* **54**: 1048-1059.

Passarelli, C., Olivier, F., Paterson, D.M., and Hubas, C. (2012) Impacts of biogenic structures on benthic assemblages: Microbes, meiofauna, macrofauna and related ecosystem functions. *Mar Ecol Prog Ser* **465**: 85-99.

Passarelli, C., Olivier, F., Paterson, D.M., Meziane, T., and Hubas, C. (2014) Organisms as cooperative ecosystem engineers in intertidal flats. *J Sea Res* **92**: 92-101.

Paterson, D.M., and Black, K.S. (1999) Water flow, sediment dynamics and benthic biology. In *Adv Ecol Res*. Nedwell, D.B., and Raffaelli, D.G. (eds): Academic Press, pp. 155-193.

Perkins, R.G., Lavaud, J., Serodio, Mouget, J.L., Cartaxana, P., Rosa, P. et al. (2010) Vertical cell movement is a primary response of intertidal benthic biofilms to increasing light dose. *Mar Ecol Prog Ser* **416**: 93-103.

Pernthaler, J., Glöckner, F.-O., Schönhuber, W., and Amann, R. (2001) Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. In *Methods Microbiol*. John, H.P. (ed): Academic Press, pp. 207-226.

Pester, M., Schleper, C., and Wagner, M. (2011) The Thaumarchaeota: an emerging view of their phylogeny and ecophysiology. *Curr Opin Microbiol* **14**: 300-306.

Petersen, D.G., Blazewicz, S.J., Firestone, M., Herman, D.J., Turetsky, M., and Waldrop, M. (2012) Abundance of microbial genes associated with nitrogen cycling as indices of biogeochemical process rates across a vegetation gradient in Alaska. *Environ Microbiol* **14**: 993-1008.

Petersen, J.E., Kemp, W.M., Bartleson, R., Boynton, W.R., Chen, C.-C., Cornwell, J.C. et al. (2003) Multiscale experiments in coastal ecology: improving realism and advancing theory. *Bioscience* **53**: 1181-1197.

Peterson, G., Allen, C.R., and Holling, C.S. (1998) Ecological resilience, biodiversity, and scale. *Ecosystems* **1**: 6-18.

Philippot, L. (2002) Denitrifying genes in bacterial and Archaeal genomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1577**: 355-376.

Piña-Ochoa, E., Høgslund, S., Geslin, E., Cedhagen, T., Revsbech, N.P., Nielsen, L.P. et al. (2010) Widespread occurrence of nitrate storage and denitrification among Foraminifera and Gromiida. *Proc Natl Acad Sci* **107**: 1148-1153.

Porter, J., Deere, D., Hardman, M., Edwards, C., and Pickup, R. (1997) Go with the flow – use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiol Ecol* **24**: 93-101.

Porter, K., and Feig, Y. (1980) The use of DAPI for identification and enumeration of bacteria and blue-green algae. *Limnol Oceanogr* **25**: 943-948.

Prosser, J.I., Bohannan, B.J.M., Curtis, T.P., Ellis, R.J., Firestone, M.K., Freckleton, R.P. et al. (2007) The role of ecological theory in microbial ecology. *Nat Rev Microbiol* **5**: 384-392.

Prou, J., and Héral, M. (1998) Le marais salé des pertuis charentais : à la recherche d'un développement durable. In *Marais maritime et aquaculture : activitité durable pour la préservation et l'exploitation des zones humides littorales*. Hussenot, J., and Buchet, V. (eds). Rochefort, France: Ifremer, pp. 33-39.

Pruesse, E., Peplies, J., and Glöckner, F.O. (2012) SINA: Accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics* **28**: 1823-1829.

Pusceddu, A., Gambi, C., Corinaldesi, C., Scopa, M., and Danovaro, R. (2014) Relationships between meiofaunal biodiversity and prokaryotic heterotrophic production in different tropical habitats and oceanic regions. *PLoS ONE* **9**: e91056.

Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P. et al. (2013) The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research* **41**: D590-D596.

Raskin, L., Stromley, J.M., Rittmann, B.E., and Stahl, D.A. (1994) Group-specific 16S rRNA hybridization probes to describe natural communities of methanogens. *Appl Environ Microbiol* **60**: 1232-1240.

Redfield, A.C. (1958) The biological control of chemical factors in the environment. *Am Sci* **46**: 205-221.

Reeburgh, W.S. (1997) Figures summarizing the global cycles of biogeochemically important elements. *Bull Ecol Soc Am* **78**: 260-267.

Richards, F. (1965) Anoxic basins and fjords. In *Chemical Oceanography*. Ripley, J., and Skirrow, G. (eds): London and New York: Academic Press, pp. 611-643.

Riemann, F., and Schrage, M. (1978) The mucus-trap hypothesis on feeding of aquatic nematodes and implications for biodegradation and sediment texture. *Oecologia* **34**: 75-88.

Riera, P., and Richard, P. (1996) Isotopic determination of food Sources of *Crassostrea gigas* along a trophic gradient in the estuarine Bay of Marennes-Oléron. *Estuar Coast Shelf Sci* **42**: 347-360.

Riis, V., Lorbeer, H., and Babel, W. (1998) Extraction of microorganisms from soil: evaluation of the efficiency by counting methods and activity measurements. *Soil Biol Biochem* **30**: 1573-1581.

Risgaard-Petersen, N. (2003) Coupled nitrification-denitrification in autotrophic and heterotrophic estuarine sediments: On the influence of benthic microalgae. *Limnol Oceanogr* **48**: 93-105.

Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A.M., Ingvardsen, S., Schmid, M.C., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M. et al. (2006) Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* **443**: 93-96.

Robertson, B.R., and Button, D.K. (1989) Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. *Cytometry* **10**: 70-76.

Robertson, C.E., Harris, J.K., Spear, J.R., and Pace, N.R. (2005) Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr Opin Microbiol* **8**: 638-642.

Rotthauwe, J.H., Witzel, K.P., and Liesack, W. (1997) The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4704-4704.

Rousk, J., Baath, E., Brookes, P.C., Lauber, C.L., Lozupone, C., Caporaso, J.G. et al. (2010) Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *ISME J* **4**: 1340-1351.

Roussel, E.G., Sauvadet, A.-L., Allard, J., Chaduteau, C., Richard, P., Bonavita, M.-A.C., and Chaumillon, E. (2009) Archaeal methane cycling communities associated with gassy subsurface sediments of Marennes-Oléron Bay (France). *Geomicrobiology Journal* **26**: 31-43.

Rusch, D.B., Halpern, A.L., Sutton, G., Heidelberg, K.B., Williamson, S., Yooseph, S. et al. (2007) The *Sorcerer II* Global Ocean Sampling expedition: Northwest Atlantic through Eastern Tropical Pacific. *PLoS Biol* **5**: e77.

Ryabenko, E. (2013) Stable Isotope Methods for the Study of the Nitrogen Cycle. *Edited by Enrico Zambianchi*: 49.

Saburova, M.A., and Polikarpov, I.G. (2003) Diatom activity within soft sediments: behavioural and physiological processes. *Mar Ecol Prog Ser* **251**: 15-126.

Sahm, K., and Berninger, U.-G. (1998) Abundance, vertical distribution, and community structure of benthic prokaryotes from permanently cold marine sediments (Svalbard, Arctic Ocean). *Mar Ecol Prog Ser* **165**: 71-80.

Saint-Béat, B., Dupuy, C., Bocher, P., Chalumeau, J., De Crignis, M., Fontaine, C. et al. (2013) Key features of intertidal food webs that support migratory shorebirds. *PLoS ONE* **8**: e76739.

Saint-Béat, B., Dupuy, C., Agogué, H., Carpentier, A., Chalumeau, J., Como, S. et al. (2014) How does the resuspension of the biofilm alter the functioning of the benthos–pelagos coupled food web of a bare mudflat in Marennes-Oléron Bay (NE Atlantic)? *J Sea Res* **92**: 144-157.

Sander, B., and Kalff, J. (1993) Factors controlling bacterial production in marine and freshwater sediments. *Microb Ecol* **26**: 79-99.

Sanford, R.A., Wagner, D.D., Wu, Q., Chee-Sanford, J.C., Thomas, S.H., Cruz-García, C. et al. (2012) Unexpected nondenitrifier nitrous oxide reductase gene diversity and abundance in soils. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 19709-19714.

Santoro, A.E., Boehm, A.B., and Francis, C.A. (2006) Denitrifier community composition along a nitrate and salinity gradient in a coastal aquifer. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2102-2109.

Santoro, A.E., Francis, C.A., De Sieyes, N.R., and Boehm, A.B. (2008) Shifts in the relative abundance of ammonia-oxidizing bacteria and archaea across physicochemical gradients in a subterranean estuary. *Environ Microbiol* **10**: 1068-1079.

Schäfer, H., Bernard, L., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., Pukall, R. et al. (2001) Microbial community dynamics in Mediterranean nutrient-enriched seawater mesocosms: changes in the genetic diversity of bacterial populations. *FEMS Microbiol Ecol* **34**: 243-253.

Schleper, C., and Nicol, G.W. (2010) Ammonia-oxidising archaea : physiology, ecology and evolution. *Adv Microb Physiol* **57**: 1-41.

Schmid, M.C., Hooper, A.B., Klotz, M.G., Woebken, D., Lam, P., Kuypers, M.M.M. et al. (2008) Environmental detection of octahaem cytochrome c hydroxylamine/hydrazine oxidoreductase genes of aerobic and anaerobic ammonium-oxidizing bacteria. *Environ Microbiol* **10**: 3140-3149.

Schneiderheinze, J., Armstrong, D., Schulte, G., and Westenberg, D. (2000) High efficiency separation of microbial aggregates using capillary electrophoresis. *FEMS Microbiol Lett* **189**: 39-44.

Schöttner, S., Pfitzner, B., Grünke, S., Rasheed, M., Wild, C., and Ramette, A. (2011) Drivers of bacterial diversity dynamics in permeable carbonate and silicate coral reef sands from the Red Sea. *Environ Microbiol* **13**: 1815-1826.

Seeberg-Elverfeldt, J., Schlüter, M., Feseker, T., and Kölling, M. (2005) Rhizon sampling of porewaters near the sediment-water interface of aquatic systems. *Limnol Oceanogr Methods* **3**: 361-371.

Seitzinger, S., Gardner, W., and Spratt, A. (1991) The effect of salinity on ammonium sorption in aquatic sediments: Implications for benthic nutrient recycling. *Estuaries* **14**: 167-174.

Seitzinger, S.P. (1988) Denitrification in freshwater and coastal marine ecosystems: ecological and geochemical significance. *Limnol Oceanogr* **33**: 702-724.

Selje, N., Brinkhoff, T., and Simon, M. (2005) Detection of abundant bacteria in the Weser estuary using culture-dependent and culture-independent approaches. *Aquat Microb Ecol* **39**: 17-34.

Shade, A., and Handelsman, J. (2012) Beyond the Venn diagram: the hunt for a core microbiome. *Environ Microbiol* **14**: 4-12.

Shokralla, S., Spall, J.L., Gibson, J.F., and Hajibabaei, M. (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* **21**: 1794-1805.

Sinninghe Damste, J.S., Strous, M., Rijpstra, W.I.C., Hopmans, E.C., Geenevasen, J.A.J., van Duin, A.C.T. et al. (2002) Linearly concatenated cyclobutane lipids form a dense bacterial membrane. *Nature* **419**: 708-712.

Smith, C.J., Nedwell, D.B., Dong, L.F., and Osborn, A.M. (2007) Diversity and abundance of nitrate reductase genes (*narG and napA*), nitrite reductase genes (*nirS and nrfA*), and their transcripts in estuarine sediments. *Appl Environ Microbiol* **73**: 3612-3622.

Smith, D.J., and Underwood, G.J.C. (1998) Exopolymer production by intertidal epipelic diatoms. *Limnol Oceanogr* **43**: 1578-1591.

Smith, D.J., and Underwood, G.J.C. (2000) The production of extracellular carbohydrates by estuarine benthic diatoms: the effects of growth phase and light and dark treatment. *Journal of Phycology* **36**: 321-333.

Smith, J.M., Mosier, A., and Francis, C.A. (2014a) Spatiotemporal relationships between the abundance, distribution, and potential activities of ammonia-oxidizing and denitrifying microorganisms in intertidal sediments. *Microb Ecol*: 1-12.

Smith, J.M., Casciotti, K.L., Chavez, F.P., and Francis, C.A. (2014b) Differential contributions of archaeal ammonia oxidizer ecotypes to nitrification in coastal surface waters. *ISME J* **8**: 1704-1714.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D. et al. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**: 76-85.

Stahl, D.A., and Amann, R. (1991) Development and application of nucleic probes In *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E., and Goodfellow, M. (eds). Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd., pp. 205-248.

Stal, L.J. (2010) Microphytobenthos as a biogeomorphological force in intertidal sediment stabilization. *Ecological Engineering* **36**: 236-245.

Stamatakis, A. (2014) RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312-1313.

Starkenburg, S., Spieck, E., and Bottomley, P. (2011) Metabolism and genomics of nitrite-oxidizing bacteria: emphasis on studies of pure cultures and of Nitrobacter species. In *Nitrification*. Ward, B., Arp, D.J., and Klotz, M.G. (eds). Washington: ASM Press, pp. 267-294.

Starkenburg, S.R., Arp, D.J., and Bottomley, P.J. (2008) Expression of a putative nitrite reductase and the reversible inhibition of nitrite-dependent respiration by nitric oxide in *Nitrobacter winogradskyi* Nb-255. *Environ Microbiol* **10**: 3036-3042.

Stauffert, M., Duran, R., Gassie, C., and Cravo-Laureau, C. (2014) Response of archaeal communities to oil spill in bioturbated mudflat sediments. *Microb Ecol* **67**: 108-119.

Stevens, H., Stübner, M., Simon, M., and Brinkhoff, T. (2005) Phylogeny of Proteobacteria and Bacteroidetes from oxic habitats of a tidal flat ecosystem. *FEMS Microbiol Ecol* **54**: 351-365.

Strickland, J.D.H., and Parsons, T.R.A. (1972) Practical handbook of sea water analysis. *Bull Fish Res Board of Canada* **167**: 207-211.

Strous, M., Fuerst, J.A., Kramer, E.H.M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K.T. et al. (1999) Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature* **400**: 446-449.

Stutz, M.L., and Pilkey, O.H. (2002) Global distribution and morphology of deltaic barrier island systems. *J Coast Res* **36**: 694-707.

Swift, M.J., Heal, O.W., and Anderson, J.M. (1979) *Decomposition in terrestrial ecosystems*: Univ of California Press.

Taib, N., Mangot, J.-F., Domaizon, I., Bronner, G., and Debroas, D. (2013) Phylogenetic affiliation of SSU rRNA genes generated by massively parallel sequencing: new insights into the freshwater protist diversity. *PLoS ONE* **8**: e58950.

Takahashi, E., Ledauphin, J., Goux, D., and Orvain, F. (2009) Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. *Mar Freshw Res* **60**: 1201-1210.

Team, R.C. (2013) R: a language and environment for statistical computing. In. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.

Thamdrup, B., and Dalsgaard, T. (2008) Nitrogen Cycling in sediments In *Microbial Ecology of the Oceans*. Kirchman, D.L. (ed). Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, p. 593.

Tholosan, O., Lamy, F., Garcin, J., Polychronaki, T., and Bianchi, A. (1999) Biphasic Extracellular Proteolytic Enzyme Activity in Benthic Water and Sediment in the Northwestern Mediterranean Sea. *Appl Environ Microbiol* **65**: 1619-1626.

Thornton, D.C.O., Underwood, G.J., and Nedwell, D.B. (1999) Effect of illumination and emersion period on the exchange of ammonium across the estuarine sediment-water interface. *Mar Ecol Prog Ser* **184**: 11-20.

Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, Å., and Hallin, S. (2004) Reassessing PCR primers targeting *nirS, nirK* and *nosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol Ecol* **49**: 401-417.

Tiedje, J.M. (1988) Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In *Biology of anaerobic microorganisms*. Zehnder, A. (ed). New York, NY: John Wiley and Sons, pp. 179-244.

Tilman, D., Knops, J., Wedin, D., Reich, P., Ritchie, M., and Siemann, E. (1997) The influence of functional diversity and composition on ecosystem processes. *Science* **277**: 1300-1302.

Tolhurst, T.J. (2009) Weak diurnal changes in the biochemical properties and benthic macrofauna of urbanised mangrove forests and mudflats. *Hydrobiologia* **636**: 101-117.

Torsvik, V., and Øvreås, L. (2002) Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* **5**: 240-245.

Treusch, A.H., Leininger, S., Kletzin, A., Schuster, S.C., Klenk, H.-P., and Schleper, C. (2005) Novel genes for nitrite reductase and Amo-related proteins indicate a role of uncultivated mesophilic crenarchaeota in nitrogen cycling. *Environ Microbiol* **7**: 1985-1995.

Troussellier, M., Courties, C., and Zettelmaier, S. (1995) Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: fixation and storage effects. *Estuar Coast Shelf Sci* **40**: 621-633.

Troussellier, M., Courties, C., Lebaron, P., and Servais, P. (1999) Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. *FEMS Microbiol Ecol* **29**: 319-330.

Tso, S.F., and Taghon, G.L. (1997) Enumeration of Protozoa and Bacteria in muddy sediment. *Microb Ecol* **33**: 144-148.

Underwood, G.J.C. (1997) Microalgal colonization in a saltmarsh restoration scheme. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **44**: 471-481.

Underwood, G.J.C., and Smith, D.J. (1998) *In situ* measurements of exopolymer production by intertidal epipelic diatom-dominated biofilms in the Humber estuary. *Geological Society, London, Special Publications* **139**: 125-134.

Underwood, G.J.C., and Kromkamp, J. (1999) Primary production by phytoplankton and microphytobenthos in estuaries. In *Adv Ecol Res*. Nedwell, D.B., and Raffaelli, D.G. (eds): Academic Press, pp. 93-153.

Underwood, G.J.C., and Paterson, D.M. (2003) The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelic diatoms. In *Adv Bot Res*, pp. 183-240.

Underwood, G.J.C., Boulcott, M., Raines, C.A., and Waldron, K. (2004) Environmental effects on exopolymer production by marine benthic diatoms: Dynamics, changes in composition, and pathways of production. *Journal of Phycology* **40**: 293-304.

Urakawa, H., Yoshida, T., Nishimura, M., and Ohwada, K. (2000) Characterization of depth-related population variation in microbial communities of a coastal marine sediment using 16S rDNA-based approaches and quinone profiling. *Environ Microbiol* **2**: 542-554.

van der Maarel, E. (1990) Ecotones and ecoclines are different. *J Veg Sci* **1**: 135-138.

van Duyl, F.C., and Kop, A.J. (1994) Bacterial production in North Sea sediments: clues to seasonal and spatial variations. *Mar Biol* **120**: 323-337.

Van Duyl, F.C., De Winder, B., Kop, A.J., and Wollenzien, U. (1999) Tidal coupling between carbohydrate concentrations and bacterial activities in diatom-inhabited intertidal mudflats. *Mar Ecol Prog Ser* **191**: 19-32.

van Duyl, F.C., Winder, B.d., Kop, A.J., and Wollenzien, U. (2000) Consequences of diatom mat erosion for carbohydrate concentrations and heterotrophic bacterial activities in intertidal sediments of the Ems-Dollard estuary. *Cont Shelf Res* **20**: 1335-1349.

van Niftrik, L.A., Fuerst, J.A., Damsté, J.S.S., Kuenen, J.G., Jetten, M.S.M., and Strous, M. (2004) The anammoxosome: an intracytoplasmic compartment in anammox bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 7-13.

Vanaverbeke, J., Merckx, B., Degraer, S., and Vincx, M. (2011) Sediment-related distribution patterns of nematodes and macrofauna: Two sides of the benthic coin? *Mar Environ Res* **71**: 31-40.

Vaulot, D., Courties, C., and Partensky, F. (1989) A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. *Cytometry* **10**: 629-635.

Velji, M., and Albright, L. (1986) Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. *Can J Microbiol* **32**: 121-126.

Venter, J.C., Remington, K., Heidelberg, J.F., Halpern, A.L., Rusch, D., Eisen, J.A. et al. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**: 66-74.

Verger, F., and Ghirardi, R. (2009) *Les zones humides du littoral français*. Paris: Belin.

Veuger, B., Middelburg, J.J., Boschker, H.T., and Houtekamer, M. (2005) Analysis of ^{15}N incorporation into D-alanine: A new method for tracing nitrogen uptake by bacteria. *Limnol Oceanogr Methods* **3**: 230-240.

Veuger, B., Middelburg, J.J., Boschker, H.T.S., and Houtekamer, M. (2007) Update of "Analysis of ^{15}N incorporation into D-alanine: A new method for tracing nitrogen uptake by bacteria" (Veuger et al. 2005, Limnol. Oceanogr. Methods 3:230-240). *Limnol Oceanogr Methods* **5**: 192-194.

Vieira, S., Ribeiro, L., Jesus, B., Cartaxana, P., and Silva, J.M.d. (2013) Photosynthesis assessment in microphytobenthos using conventional and imaging pulse amplitude modulation fluorometry. *Photochem Photobiol* **89**: 97-102.

Volis, S., Dorman, M., Blecher, M., Sapir, Y., and Burdeniy, L. (2011) Variation partitioning in canonical ordination reveals no effect of soil but an effect of co-occurring species on translocation success in Iris atrofusca. *J Appl Ecol* **48**: 265-273.

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.

Wang, Y., and Qian, P.-Y. (2009) Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE* **4**: e7401.

Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., and Boon, N. (2010) Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends in Biotechnology* **28**: 416-424.

Ward, B.B., Arp, D.J., and Klotz, M.G. (2011) *Nitrification*. Washington: ASM Press.

Webster, G., Rinna, J., Roussel, E.G., Fry, J.C., Weightman, A.J., and Parkes, R.J. (2010) Prokaryotic functional diversity in different biogeochemical depth zones in tidal sediments of the Severn Estuary, UK, revealed by stable-isotope probing. *FEMS Microbiol Ecol* **72**: 179-197.

Wemheuer, B., Taube, R., Akyol, P., Wemheuer, F., and Daniel, R. (2013) Microbial diversity and biochemical potential encoded by thermal spring metagenomes derived from the Kamchatka peninsula. *Archaea* **2013**: 13.

Wentworth, C.K. (1922) A scale of grade and class terms for clastic sediments. *The Journal of Geology* **30**: 377-392.

Whiteley, A.S., Griffiths, R.I., and Bailey, M.J. (2003) Analysis of the microbial functional diversity within water-stressed soil communities by flow cytometric analysis and CTC+ cell sorting. *J Microbiol Methods* **54**: 257-267.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 6578-6583.

Whittaker, R.H. (1967) Gradient analysis of vegetation. *Biological Reviews* **42**: 207-264.

Williamson, K., Corzo, K., Drissi, C., Buckingham, J., Thompson, C., and Helton, R. (2013) Estimates of viral abundance in soils are strongly influenced by extraction and enumeration methods. *Biology and Fertility of Soils*: 1-13.

Wilms, R., Sass, H., Köpke, B., Köster, J., Cypionka, H., and Engelen, B. (2006) Specific bacterial, archaeal, and eukaryotic communities in tidal-flat sediments along a vertical profile of several meters. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2756-2764.

Wilson, J.G., Brennan, M., and Brennan, B. (1993) Horizontal and vertical gradients in sediment nutrients on mudflats in the Shannon estuary, Ireland. *Neth J Aq Ecol* **27**: 173-180.

Woese, C.R., and Fox, G.E. (1977) Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: The primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5088-5090.

Woese, C.R., Kandler, O., and Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 4576-4579.

Wuchter, C., Abbas, B., Coolen, M.J.L., Herfort, L., van Bleijswijk, J., Timmers, P. et al. (2006) Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci* **103**: 12317-12322.

Yallop, M.L., Paterson, D.M., and Wellsbury, P. (2000) Interrelationships between rates of microbial production, exopolymer production, microbial biomass, and sediment stability in biofilms of intertidal sediments. *Microb Ecol* **39**: 116-127.

Yamamoto, N., and Lopez, G. (1985) Bacterial abundance in relation to surface area and organic content of marine sediments. *J Exp Mar Biol Ecol* **90**: 209-220.

Yan, S., Fuchs, B.M., Lenk, S., Harder, J., Wulf, J., Jiao, N.-Z., and Amann, R. (2009) Biogeography and phylogeny of the NOR5/OM60 clade of Gammaproteobacteria. *Syst Appl Microbiol* **32**: 124-139.

Yilmaz, P., Parfrey, L.W., Yarza, P., Gerken, J., Pruesse, E., Quast, C. et al. (2014) The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Research* **42**: D643-D648.

Yoon, W.B., and Rosson, R.A. (1990) Improved method of enumeration of attached bacteria for study of fluctuation in the abundance of attached and free-living bacteria in response to diel variation in seawater turbidity. *Appl Environ Microbiol* **56**: 595-600.

You, J., Das, A., Dolan, E.M., and Hu, Z. (2009) Ammonia-oxidizing archaea involved in nitrogen removal. *Water Research* **43**: 1801-1809.

Young, J. (1992) Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. In *Biological nitrogen fixation*. Stacey, G., Burris, R.H., and Evans, H.J. (eds). New York, NY,USA: Chapman and Hall, pp. 43-86.

Zhang, X., Agogué, H., Dupuy, C., and Gong, J. (2013) Relative abundance of ammonia oxidizers, denitrifiers, and anammox Bacteria in sediments of hyper-nutrified estuarine tidal flats and in relation to environmental conditions. *CLEAN – Soil, Air, Water* **41**: 1-9.

Zhao, X., Yang, L., Yu, Z., Peng, N., Xiao, L., Yin, D., and Qin, B. (2008) Characterization of depth-related microbial communities in lake sediment by denaturing gradient gel electrophoresis of amplified 16S rRNA fragments. *J Environ Sci* **20**: 224-230.

Zinger, L., Amaral-Zettler, L.A., Fuhrman, J.A., Horner-Devine, M.C., Huse, S.M., Welch, D.B.M. et al. (2011) Global patterns of bacterial beta-diversity in seafloor and seawater ecosystems. *PLoS ONE* **6**: e24570.

Zumft, W. (1992) The denitrifying prokaryotes. In *The Prokaryotes*. Blows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. (eds). New-York, NY: Springer-Verlag, pp. 554-582.

Zumft, W.G. (1997) Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 533-616.

Annexes

Liste des Annexes

Annexe 1. Lavergne C., Beaugeard L., Dupuy C., Courties C., and Agogué H. (2014) An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. Journal of Microbiological Methods 105: 31-38 383
Annexe 2. B. Kientz, H. Agogué, C. Lavergne, P. Marié, E. Rosenfeld (2013) Isolation and distribution of iridescent Cellulophaga and other iridescent marine bacteria from the Charente-Maritime coast, French Atlantic. Systematic and Applied Microbiology 36: 244–25 391
Annexe 3. Poster présenté du 19 au 24 Août 2012 à Copenhague (Danemark) durant la conférence internationale ISME (International Society for Microbial Ecology) : "*The Power of the Small*". 400
Annexe 4. Présentation orale réalisée le 24 Octobre 2013 à Clermont-Ferrand au VIème colloque de l'Association Francophone d'Ecologie microbienne (AFEM), session III : Dynamique de la biodiversité et fonctionnement des écosystèmes 402
Annexe 5. Présentation orale réalisée le 12 Septembre 2014 à Ghent (Belgique) au 19ème meeting ENC (European Nitrogen Cycle), session 6: Ecology & ecophysiology III 404
Annexe 6. Poster présenté du 10 au 12 Septembre 2014 à Ghent (Belgique) au 19ème meeting ENC (European Nitrogen Cycle) 406
Annexe 7. Curriculum vitae 408
Annexe 8. Valorisation des compétences acquises au cours de la thèse : NCT® 412
Annexe 9. Mesure de la teneur en eau et de la masse volumique du sédiment 427
Annexe 10. Dosage de la chlorophylle *a* dans les sédiments 428
Annexe 11. Mesure du pH et de la salinité de l'eau interstitielle 429
Annexe 12. Mesure des quantités de carbone et d'azote organique particulaire dans les sédiments 430
Annexe 13. Dosage ses sels nutritifs par système en flux continu (SFA=Segmented Flow Analysis) 431
Annexe 14. Préparation des échantillons pour analyse de granulométrie 439
Annexe 15. Dosage des protéines par la méthode de Lowry (Total Protein kit, Micro-Lowry, Peterson's modification, TP 0300 L3540) 440
Annexe 16. Extraction des EPS du sédiment et dosages des glucides et des protéines des EPS 442
Annexe 17. Mesure des Activités enzymatiques extracellulaires dans les sédiments 445
Annexe 18. Protocole de mesure de production bactérienne 449
Annexe 19. Evaluation des proportions d'archées et de bactéries dans les sédiments par Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 451
Annexe 20. Création de standards pour la quantification de gènes fonctionnels, exemple du gène *nirS* 454
Annexe 21. Protocole de préparations d'échantillons de sédiments pour l'évaluation de la diversité bactérienne et archéenne présente par pyroséquençage 454 458
Annexe 22. Protocole de préparations d'échantillons de sédiments pour l'évaluation de la diversité active bactérienne et archéenne par pyroséquençage 454 461
Annexe 23. Abondance de la méiofaune benthique 465
Annexe 24. Evaluation de la production primaire par la méthode des cloches benthiques .. 466

Annexe 1. Lavergne C., Beaugeard L., Dupuy C., Courties C., and Agogué H. (2014) An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. Journal of Microbiological Methods 105: 31-38

Journal of Microbiological Methods 105 (2014) 31–38

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry

Céline Lavergne [a,*], Laureen Beaugeard [a], Christine Dupuy [a], Claude Courties [b], Hélène Agogué [a]

[a] LIENSs, UMR 7266 Université de La Rochelle, CNRS, 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France
[b] Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMS 2348, Laboratoire d'Océanographie Microbienne, Observatoire Océanologique, F-66650 Banyuls/Mer, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 March 2014
Received in revised form 1 July 2014
Accepted 1 July 2014
Available online 10 July 2014

Keywords:
Prokaryotes
Cell enumeration
Flow cytometry
Coastal sediments

ABSTRACT

Flow cytometry offers an easy and powerful way to assess multi-parametric data in different domains, notably in the environmental sciences. Because evaluating heterotrophic prokaryotic abundance is crucial to understand an ecosystem's functioning, we propose a quick and efficient protocol for (1) cell's detachment in muddy coastal sediments followed by (2) enumeration of prokaryotes by flow cytometry compared to epifluorescence microscopy and (3) a type of storage adapted for benthic samples. First, sample preparation by incubation in a detergent mix containing sodium pyrophosphate (0.01 M final concentration) and Tween 80 (0.1% final concentration) drastically increased cell detachment from sediment particles (+130.40%) compared to extraction with sodium pyrophosphate only. Cell sorting allowed to control the efficiency of the extraction as few cells were found attached to sediment particles in epifluorescence microscopy after sorting. Flow cytometry gave consistent results with strong reliability by counting 1.81 times more cells compared to epifluorescence microscopy. Thirdly, results revealed that sediment samples fixed with formaldehyde and then liquid-N_2 frozen and directly stored at −80 °C can be analyzed within 3 months. In routine, our method of extraction and counting allowed to evaluate 83.67% of the real abundance in a sediment sample. Finally, this optimized technique was applied on sandy and muddy coastal and freshwater sediments and allowed us to prove the high efficiency of this new method. Flow cytometry is a fast, replicable and low-cost method for counting heterotrophic prokaryotes, even for sediment samples. The two-step method that we developed enables high frequency analyses (30 samples in less than 4 h).
© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Microorganisms dominate marine ecosystems (DeLong et al., 2006) and were often considered as a "Black Box" by scientists (Fuhrman et al., 2002). To investigate this "Black Box," many studies have focused on new technologies and advances in molecular biology methods, allowing researchers to acquire a huge quantity of phylogenetic and potential physiologic information from oceans and marine coastal ecosystems. But these revolutionary "omics" data need to be completed by single-cell analysis, metabolic studies, and basic determination of prokaryotic abundances. Prokaryotes (Bacteria and Archaea) are key organisms in biogeochemical cycles in all marine environments (Azam and Malfatti, 2007; DeLong, 2009) and the first step to study these communities is to estimate their abundance within the microbial assemblage. Estimations of abundance showed that prokaryotes are as abundant as 10^6 cells mL^{-1} in ocean water (Whitman et al., 1998) and more than 10^8 cells mL^{-1} in marine surface sediments (Jorgensen and Boetius, 2007). In sediments, prokaryotes play a crucial role in the food web as they remineralize organic matter and lead major cycles such as nitrogen and carbon cycles. Most specifically, heterotrophic prokaryotes are a majority throughout the whole sediment depth and can be present until almost 2 km below the surface (Ciobanu et al., 2014).

The first advances in heterotrophic prokaryotic enumeration were made using epifluorescence microscopy (EFM) (Porter and Feig, 1980). Fluorochromes combined with EFM have been used to develop standardized methods to successfully count bacteria in freshwater and marine water columns (Daley, 1979). The most widespread way of staining cells is to target DNA with a fluorescent dye such as DAPI (4′,6-diamidino-2-phenylindole), currently used in microscopy (Porter and Feig, 1980). Montagna (1982) showed under acridine orange (AO)–EFM observation that bacteria in muddy sediments occur at levels two orders of magnitude greater than in sandy sediments. Nowadays, EFM is still the most widespread technique for estimating the abundance of prokaryotes (see Supplementary Information Table 1 for references). Nevertheless, Robertson and Button (1989) were the first to use flow cytometry (FCM) to enumerate heterotrophic prokaryotic cells by DAPI-staining in marine and freshwater samples. Even if FCM seemed to be an accurate and rapid method for determining heterotrophic prokaryotic cells, advances were needed in storage conditions or fixative effects on benthic samples. These fixatives were known to permeate cells (Troussellier et al., 1995); consequently, the interactions between dyes

* Corresponding author. Tel.: +33 5 46 50 76 44; fax: +33 5 46 50 76 63.
E-mail address: celine.lavergne@univ-lr.fr (C. Lavergne).

http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.002
0167-7012/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

and fixatives needed to be taken into account when choosing dyes. During the exponential phase of FCM utilization for environmental marine samples, many dyes have been reported in the literature such as DAPI, Hoechst 33342, TO-PRO-1, SYBR Green (I or II), and SYTO13 (details are reviewed by Gasol and Del Giorgio (2000)). With technological advances, FCM became more and more useful in marine microbiology and offered new challenges to scientists, such as the prokaryotic enumeration in soils and sediments and the use of specific probes (fluorescence in situ hybridization (FISH)) (Llobet-Brossa et al., 1998). For sediment and soil analysis, the dye mostly used to stain DNA is SYBR Green I (Kallmeyer et al., 2008), and many authors fixed cells with formaldehyde (Epstein and Rossel, 1995) preferentially, but the best temperature for long time storage is still unclear.

FCM is now widely used for water column samples, but sediment samples carry the difficulties of a solid matrix rich in detritus, minerals and exopolymeric substances (EPS). Indeed, sediments are particularly hard to study because dyes (e.g. AO or DAPI) can produce a high fluorescence background with clay and silt-rich sediments containing a high quantity of detritus and EPS (Kuwae and Hosokawa, 1999). Additionally, in such environments, prokaryotic cells are often attached to sediment particles by EPS (Decho, 2000), creating a complex with organic and mineral particles (Epstein and Rossel, 1995; Kallmeyer et al., 2008). The point of divergence between microbiologists remains the separation method to detach cells from the solid matrix. In order to improve counting yield in sediment, chemical dispersion and physical detachment should be applied. Physical detachment can be achieved by isoelectric method (Jaspers and Overmann, 1997), capillary electrophoresis (Schneiderheinze et al., 2000), sonication bath (Duhamel and Jacquet, 2006; Ellery and Schleyer, 1984; Gasol, 1993), or probes (Albright et al., 1986; Epstein and Rossel, 1995; Kallmeyer et al., 2008), vortexing (Frischer et al., 2000; Whiteley et al., 2003), or by blender homogenization (Lindahl and Bakken, 1995; Maron et al., 2006; Yamamoto and Lopez, 1985). The sonication probes appear to be the best way to mechanically detach prokaryotic cells from sediment particles, and applying it with an intensity of 60 W for 30 s has been shown to be a good compromise between high counting yield and avoiding lysing cells (Garet, 1996; Lei et al., 2010). Concerning the chemical dispersion solution, the most cited is the sodium pyrophosphate (NaPp), which is often found in detergent solutions in combination with Tween 20 (Amalfitano and Puddu, 2009) or Tween 80 (Duhamel and Jacquet, 2006; Epstein and Rossel, 1995), the phosphate buffer saline (PBS) solution (Barra Caracciolo et al., 2005), the sodium chloride (Fazi et al., 2005), or methanol (Kallmeyer et al., 2008; Lunau et al., 2005). Moreover, it is possible to apply a density gradient (Kallmeyer et al., 2008; Morono et al., 2013) after the chemical separation in order to improve the time and reliability of the counting (Fazi et al., 2005). However, in the literature, it remains unclear which best dilution and detergent mix need to be applied to sediment samples in order to detach the maximum of aggregates and cells adsorbed on particles.

Nowadays, no simple and standardize method existed to study microorganisms in different type of sediments. On that basis, this study aims at optimizing sediment fixation and storage, cell separation and comparing two analysis methods (EFM and FCM) to count benthic heterotrophic prokaryotes.

2. Materials and procedures

2.1. Sample collection, fixation and storage

Muddy sediments from the French Atlantic coast were sampled in the Moëze Bay and the Aiguillon Bay from the surface to 10 cm-deep. The sediment samples were collected in 2012 and 2013 at low tide using cores (15 cm diameter). Back in the laboratory (less than 1 h), the sediments were homogenized, and sub-samples were put in containers using sterile 50 mL syringes with cutoff tips. Finally, subsamples were fixed with 0.2 μm-filtered formaldehyde solution (vol/vol, 2% final concentration) and kept according to two conditions: at +4 °C in the dark or frozen in liquid-N_2 directly followed by storage at −80 °C. Different storage times were tested on five different muddy samples in duplicates: 1 week, 1 month, 3 months, and 6 months after sampling.

2.2. Protocol development

Here, we described the proceedings of the protocol development. Different steps of the procedure were investigated in order to improve the enumeration of prokaryotes in sediment: (1) sample preparation before mechanical extraction; (2) utility of centrifugation to remove sediment particles; (3) repetitive steps of extraction to improve cell counting yield.

2.2.1. Sample preparation before mechanical extraction

First tests were achieved by preparing sediment slurries with a solution of NaPp 0.01 M (Pascal et al., 2009; Tso and Taghon, 1997). Then, in order to disaggregate the attached cells, Tween 80 (0.1% final concentration) was added to the NaPp solution (0.01 M). Indeed, Tween 80 is a non-ionic surfactant known to decrease particle aggregates and to enhance detachment of cells from particles in sediment samples (Velji and Albright, 1986; Yoon and Rosson, 1990). The influence of Tween 80 addition on the cell recovery efficiency was evaluated on 55 samples. According to preliminary tests, using NaPp solution or NaPp + Tween 80 mixture, slurries were prepared by processing to successive dilutions until 1:2000 (1:10, 1:100, 1:500, 1:1000 and 1:2000) to reduce sediment background (dos Santos Furtado and Casper, 2000; Duhamel and Jacquet, 2006). A vortexing step of 5 s was applied before and after each successive dilution.

According to Epstein and Rossel (1995) and Velji and Albright (1986) recommendations, 30 min of incubation at +4 °C was used to detach cells from sediment particles. Then, mechanical extraction consisted of sonicating samples 30 s at 60 W in ice with a sonicator probe (Branson, SLPE-150, 1/8" or 3 mm microtip, 40KHz) (Lei et al., 2010).

2.2.2. Utility of centrifugation to remove sediment particles

The impact of a centrifugation step was tested by applying or not a low speed centrifugation. The first part of extracted samples was centrifuged at 1000g at +4 °C during 1 min, after which supernatant was transferred and then stained for EFM and FCM analysis (see below for staining settings). On the second part of extracted samples, a proportion was mixed, transferred and then stained for EFM and FCM analysis and centrifugation was applied on the remaining proportion to collect sediment and attached cells for a second extraction step.

In any case, after centrifugation step, the remaining supernatant was discarded and the pellet was re-suspended in the detergent mix [0.01 M NaPp and Tween 80 (0.1% final conc.)] with the same volume of supernatant. By this way, the cells remaining attached to the sediment particles in the pellet can be detached and counted in a second step.

2.2.3. Repetitive steps of extraction to improve cell counting

Because cells can be still attached to sediment particles even after the first extraction, we evaluated the number of repetitive extraction steps needed to improve cell counting yield. The second step was processed as the first one, by incubating the samples in the detergent mix [0.01 M NaPp and Tween 80 (0.1% final conc.)] for 30 min at +4 °C. Then, sonication was repeated (same settings as above) before the analysis.

Aiming at evaluating how many steps were needed, extraction process was repeated until cells recovery reaches a plateau on 15 different samples. Thus, the total prokaryotic cell abundance corresponded to the sum of all the counting values obtained in each extraction step.

2.3. Microscopic count

Extracted samples were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 250 μg ml^{-1}, 15 min, +4 °C) and filtered through black polycarbonate membrane (0.2 μm pore size, 25 mm, Nucleopore) (Porter and Feig, 1980). Next, filters were mounted on slides using anti-fading oil type F (Olympus, Japan), and conserved at −20 °C until counting. Finally, counts were made with an epifluorescence microscope (Axioskop2, Carl Zeiss Microscopy, LLC, United-States) at 1000× magnification under UV excitation (Filter set 01, 397 nm – Zeiss). For each sample, a minimum of 20 fields (>600 cells) were counted and averaged (Lebaron et al., 1994).

2.4. Flow cytometric and cell sorting analysis

For each extraction step, the flow cytometric analysis consisted of SYBR Green I-stained (1:10,000 final concentration) extracted sample during 15 min in the dark at room temperature. Fluorescent beads (Fluoresbrite Multi fluorescent microsphere 1.0 μm, Polysciences, Germany) were added simultaneously to each sample in order to analyze cell fluorescence and scatter properties of samples. Each sample was analyzed for 30 s at low flow speed with FacsCanto II cytometer (3-laser, 8-color (4-2-2), BD Biosciences) equipped with a 20-mW 488-nm coherent sapphire solid state blue laser. Data were acquired using DIVA software provided by BD-Biosciences.

A cell sorter (FACSAria BD-Biosciences) was used to control extraction yield on prokaryotic population. Then, sorted fraction was observed using EFM (BX300, Olympus) to take pictures.

Stained cells were discriminated according to green fluorescence (FL1) from SYBR Green I staining and side scatter properties (SSC). Picophytoplanktonic cells are also discriminated based on their red fluorescence (FL3) and SSC properties and excluded from final prokaryotic counts measured on a gate SSC-FL1 (Marie et al., 2001).

Accurate cell concentrations were performed using TruCount beads from BD-Biosciences (excitation: red laser 633 nm; emission: FL5 660/20 nm).

2.5. Statistical analysis

All statistical analysis was performed using R software (R Core Team, 2013). The effect of the addition of Tween 80 was tested with a paired *t*-test. The influence of the parameters tested or percentage of sand in samples was evaluated by applying a Kruskal–Wallis rank sum test for one sample and Wilcoxon test for two paired samples on cell abundance values. The relationship between FCM and EFM was shown by fitting a significant linear regression. Effects of storage conditions were tested with a 2-way analysis of variance (ANOVA), residuals were tested for application validation and a Tukey HSD post-hoc test was used.

3. Results

Hereby, we described the results of the protocol development proceedings and then the final protocol that we succeed to establish.

3.1. Sample preparation

First, slurries were prepared with NaPp 0.01 M alone, and cell sorting flow cytometry followed by EFM observations was used to visualize the extracted populations. Two populations were observed: free prokaryotic cells population and attached-prokaryotic cells population. The NaPp alone at 0.01 M was apparently not efficient enough to separate cells from sediment particles, because attached prokaryotic cells were still present in the samples and represented 27.7% of the total abundance. On this basis, the effect of adding Tween 80 was evaluated to minimize cell aggregation (Yoon and Rosson, 1990). Both FCM and EFM counting revealed a higher cell counting yield (Fig. 1), with an increase of 130.40% ± 12.49 SE and 176.79% ± 14.25 SE, respectively, compared to the treatment without Tween 80. Adding Tween 80 to NaPp in the mixture significantly improve the number of cells counted in FCM (paired *t*-test: $t = -9.6127$, df = 54, $p < 0.001$) and EFM (paired *t*-test: $t = -27.1056$, df = 35, $p < 0.001$). After two repetitive steps, cell recovery efficiency rose from 43.3% ± 2.0 SE without Tween to 92.5% ± 2.0 SE with addition of Tween 80. Moreover, microscopic analysis on sorted populations confirmed that the counted cells were free cells, clearly separated from sediment particles when Tween 80 was added to the mixture. Consequently, it appears that Tween 80 disaggregated efficiently benthic cells and therefore improved the cell counting results (Fig. 1). The recommended protocol is thus to use sodium pyrophosphate (NaPp) and Tween 80 treatment to prepare sediment samples for heterotrophic prokaryotes enumeration by FCM (Fig. 5).

3.2. Utility of centrifugation

The utility of a centrifugation step before counting analysis was tested by performing an experiment with and without low speed centrifugation (1000*g*, 1 min, +4 °C). Experiments showed that centrifugation moderately decreased cell counts (−1.71%) in FCM and EFM because cells that remained attached to the particles were removed (data not shown). Settling velocities of sands have been calculated according to Soulsby (1997), and we evaluated that the settling time of particles is inferior to the standing step applying on cytometer to acquire data before recording. Indeed, particles of 62 μm will take 4.8 s to settle in the tube and the cytometer takes 5 s to acquire and 10 s to record. The particles cannot collapse the flow cell chamber. Thus, we proposed to analyze samples without the centrifugation step and then to centrifuge samples afterward to proceed to a second cell extraction on the pellet.

3.3. Repetitive steps of extraction

After the first extraction, 57.04% ± 2.58 SE of cells were extracted and counted. The cumulative cell recovery increased strongly and reached a plateau after the fourth extraction (Fig. 2), showing that in routine analysis it will not be necessary to do more than four extractions. The coefficient of variation of the first extraction was the highest, reaching 17.52%. The strongest decrease in CV was observed between the first and the second extraction (Fig. 2) showing that the second extraction allowed counting a higher number of cells (83.67% ± 0.94 SE) with a lower imprecision (CV < 5%). After that, the CV continued to decrease with lower range values. Doing eight extractions can be time consuming and expensive. In our case, with sediment samples, eight extractions were not necessary. Thus, for routine analysis of benthic samples by FCM, we propose a 2-step extraction as a good compromise among (1) cell recovery efficiency (83.67% ± 0.94 SE) and accuracy (CV = 4.34) and (2) analysis time (4 h for 30 samples) and cost.

3.4. Microscopy versus flow cytometry

Fifty-five muddy samples were tested and highly significant correlations were found between EFM and FCM counts (Fig. 3; *t*-test: $R^2 = 0.615$, df = 53, $p < 0.001$). Moreover, cell abundance estimated by FCM was always higher than cell abundance counted by EFM, by a factor of 1.81. Thus, EFM and FCM results followed the same trends but FCM always allowed detecting more cells than EFM. We prove by this way that the traditional method by EFM need to be re-evaluated and that FCM can be a better method to assess the heterotrophic prokaryotic abundance.

3.5. Which type of storage?

The influence of storage conditions on prokaryotic cells was studied. After the first month of storage, a loss of 24.46% ± 4.5 SE of cells was

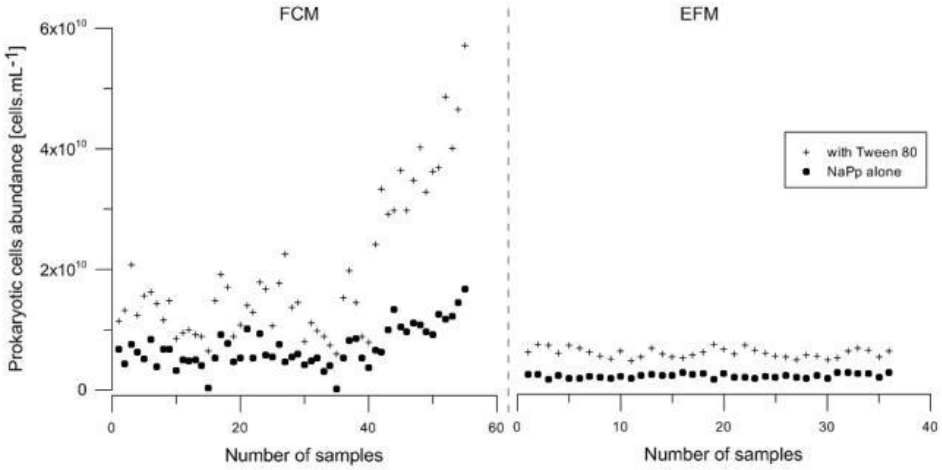


Fig. 1. Effects of the addition of Tween 80 to sodium pyrophosphate (NaPp) on prokaryotic cell abundance in sediment samples (FCM counts from SYBR Green: $n = 55$; EFM counts from DAPI: $n = 36$). Values for all the samples tested are presented. Crosses represented samples extracted with Tween 80 and NaPp, and circles represented samples extracted with NaPp alone.

observed under the two storage conditions (−80 °C and +4 °C). After that, prokaryotic abundances remained stable until 6 months (−4%; Fig. 4). High standard error bars on Fig. 4 were due to the differences in prokaryotic abundances between sample depths, but the results brought out that prokaryotic abundances in samples stored at −80 °C tend to be higher than in those conserved at +4 °C. A significant difference was detected between T0 and 12 weeks after sampling (Tukey HSD; $p < 0.05$); nevertheless, neither the temperature of storage nor the interaction with time influenced the abundance of prokaryotes counted (2-way ANOVA, $p > 0.05$). After 3 months, the abundances measured with the final protocol were more variable. The recommended protocol is to store fixed sediment samples at −80 °C (as for water samples (Marie et al., 1997)) and to analyze samples within 3 months after sampling.

3.6. Final protocol

All the assessments above resulted in a final protocol. This final protocol (Fig. 5) detached and homogenized cells in sediment samples thanks to 2 successive extractions (§ 3.3) and allowed to count the prokaryotic cells using FCM.

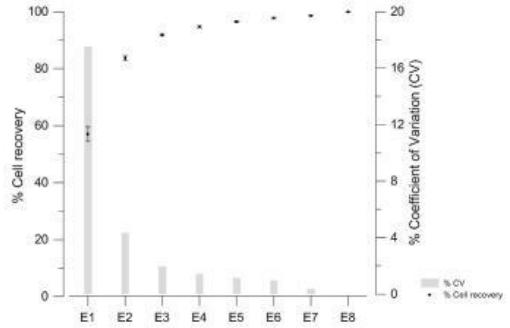


Fig. 2. Cumulative percentage of cell recovery using the final extraction protocol (extended to eight extractions), counting by flow cytometry (FCM) and percentage coefficient of variation (% CV) ($n = 15$). Black dots represent cell recovery efficiency with standard errors and grey bars represent % CV. E = extraction number.

(1) Samples were prepared and extracted using a dilution (1:1000 to 1:2000) in a detergent mix (§ 3.1) [sodium pyrophosphate (0.01 M) + Tween 80 (0.1%)] and a vortexing step and 30 min of incubation at +4 °C. After the vortexing step, a sonication separation for 30 s (60 W) in ice with a sonication probe (3 mm) was applied. Without any centrifugation step (§ 3.2), an aliquot of the sample was stained with SYBR Green I (1:10,000) 15 min in the dark and analyzed by flow cytometry (FCM).
(2) the remaining part of the sample was centrifuged at low speed (1 min at 1000g at +4 °C); the pellet was then resuspended in the detergent mix and step 1 was repeated once more.

Using this two-step protocol, 83.67% ± 3.63 SD (§ 3.3) of total cells can be extracted from a solid matrix and counted by SYBR Green I-stained FCM.

3.7. Application on different types of sample

To validate the protocol, the method for FCM analysis was applied to sandy, sandy–mud and muddy sediments from different locations with different values of sand contents (from 0 to 90%) following a range of silt/sand content. For each sample, the cell recovery percentages of the first step extraction were high, by mean 61% ranging from 55% to 68% (Fig. 6; Supplementary Information Table 2). The cell recovery efficiencies of these samples were in the same range and there were no significant effects of the sand content on the cell recovery of the first extraction (Kruskal–Wallis test; $\chi^2 = 5$; df = 5; $p = 0.4159$). These results showed that our developed method is efficient for sandy, sandy–mud and muddy sediments tested whatever the location and sand content or composition.

4. Discussion and conclusions

Flow cytometry (FCM) is now widely used for water column analysis in order to estimate autotrophic diversity and abundance, and to enumerate heterotrophic prokaryotes (Legendre et al., 2001). For sediment analysis, technical advances have been made but not well optimized to

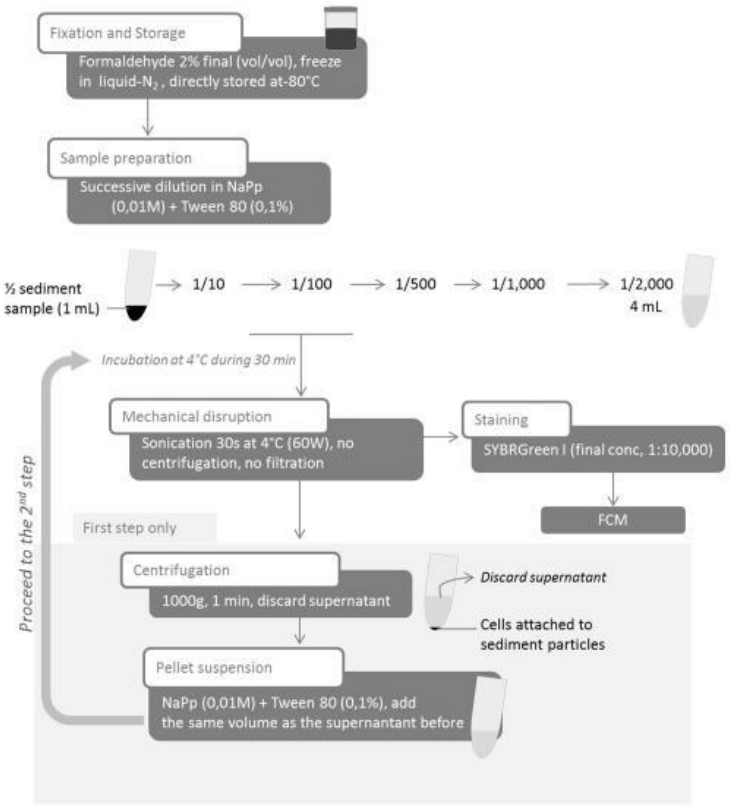


Fig. 5. Final protocol of the improved two-step separation method. FCM = flow cytometry; NaPp = sodium pyrophosphate.

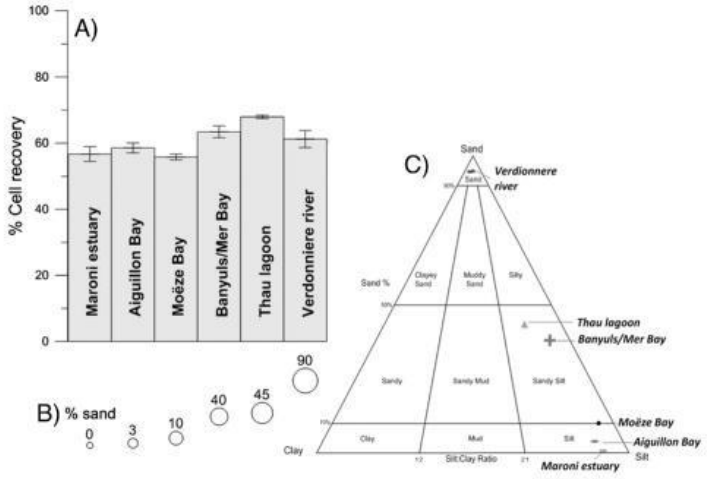


Fig. 6. (A) Percentage of cells extracted after the first step by applying our two-step extraction method followed by FCM heterotrophic prokaryotic enumeration on sandy and muddy sediment samples from diverse locations with a range of sand percentages. (B) Sand percentages for each sample. (C) Sand/silt/clay diagram for each sample.

rapid and easy protocol, we proposed to analyze samples without the centrifugation step and then to centrifuge samples afterward to proceed to the second extraction (on the pellet).

Taking into considerations all these features, the development of the protocol focused on a method of cell separation to define a simple, inexpensive, and rapid method to enumerate prokaryotes in sediment.

Kallmeyer et al. (2008) extracted between 65 and 100% of prokaryotic cells in deep subsurface sediments by applying a bilayer density gradient. In soil, Barra Caracciolo et al. (2005) also used a bilayer gradient density as well, and were able to extract up to 77% of total prokaryotic cells. More recently, Morono et al. (2013) applied a multilayer density gradient on samples from marine subsurface and obtained from 50 to 80% cell recovery. Lunau et al. (2005) worked on muddy and sandy sediments and opted for a low-speed centrifugation method combined with a methanol purification step; by an EFM analysis, they achieved 54–114% cell recovery. Even if the cell recovery had been found to be variable among the physico-chemical parameters of a solid matrix (Maron et al., 2006), we confirmed that our method is consistent and quicker, and can be applied to different kind of benthic samples. It allows the extraction of a large quantity of prokaryotic cells (between 10^8 and 10^{10} cells mL^{-1}) and the possibility of determining prokaryotic abundances (83.67% mean cell recovery).

Nevertheless, it is clear that some optimization details must be done for each type of samples. We suggest staining cells with more concentrated SYBR Green I (1:5000 final concentration) if the prokaryotic population is not easily distinguishable from background noise due to organic and mineral matter. Obviously, during the FCM analysis, threshold and fluorescent parameters must be adapted to population characteristics as well as the dilution of the sample.

Our two-step extraction method is simple to apply, as it allows the estimation of heterotrophic prokaryotic abundance of 30 sediment samples within 4 h. This method was applied successfully on different types of sediments (muddy and sandy, coastal marine sediments and freshwater sediment) and among the different types of sediments, our method was reproducible. Moreover, these applications showed that our method was suitable not only for coastal sediments but also for freshwater sediment (from the Verdonniere river streambed, France). Aiming at finding a method suitable for a large range of sediments samples, this study prove that our optimized method offers a better efficiency for different marine sediment types even for freshwater sediments. In soils, Williamson et al. (2013) showed a strong influence of clay content and recommended testing the influence of the extraction mixture prior to analyze the samples. Further analyses remain possible to establish whether our two-step protocol is efficient on clay-containing sediments.

This fast protocol using FCM is a methodological issue but is also crucial for ecological studies by allowing in the end a better understanding of marine benthic ecosystems. Finally, we can confirm that our protocol worked well for turbid water with high organic matter content in a study on prokaryotic community distribution among a salinity gradient in the Charente River (France). For this study, the dilution was adapted because prokaryotic abundance was between two and three orders of magnitude less than in the sediment samples.

In the future, we are convinced that our study can be useful for assessing activity, productivity or diversity analysis in sediments. Although the abundance of prokaryotes is a central parameter to measure in all ecosystems, the next step to understand the functioning is evaluating the unknown genetic diversity (DeLong, 2009; Karl, 2007). Activity and productivity are powerful indices to characterize the community and are needed to show the key role of prokaryotic community in biogeochemical cycles. The combinations of our protocol and cell sorting (Wang et al., 2010) can be a great progress for sediment analysis. With cell sorting, it will be possible to sort cells according to their average side-angle-scattered (SSC) light (Bernard et al., 2000) (proxy of size-class) for example and then do diverse analysis on different population of the prokaryotic community.

Acknowledgments

This research was supported by a PhD grant from the Charente Maritime Department, by the CPER 2006–2013 (Contrat Projet Etat Région) of Charente Maritime and by EC2CO project (CAPABIOC, CNRS and INSU, 2013–2014). We are grateful to the cytometry and imaging platform that provided organization and service in our lab. We also appreciate the cytometry platform of Banyuls/Mer, which allows us to use cell-sorting cytometry. The authors are grateful to E. Pante (LIENSs, La Rochelle) for his help. In our study, we analyzed various sediments and the authors would like to thank all those who provided the environmental samples: P. Bocher (LIENSs, La Rochelle) in collaboration with D.S. Mizrahi (project supporting by the US Fish and Wildlife Service and the Western Hemisphere Shorebird Reserve Network, New Jersey Audubon Society), K. Guizien and S. Lucas (DynDiagHyd project, EC2CO - LECOB, Banyuls/Mer), H. Montanie (Biofilms Project, FREDD - LIENSs, La Rochelle) and F. Rossi (CHARM project, EC2CO - ECOSYM, Montpellier). The authors are grateful to the anonymous reviewers for their thorough evaluations which help us to improve the quality of manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2014.07.002.

References

Aakra, A., Hesselsoe, M., Bakken, L.R., 2000. Surface attachment of ammonia-oxidizing bacteria in soil. Microb. Ecol. 39, 222–235.
Albright, L.J., McCrae, S.K., May, B.E., 1986. Attached and free-floating bacterioplankton in Howe Sound, British Columbia, a coastal marine Fjord-Embayment. Appl. Environ. Microbiol. 51, 614–621.
Amalfitano, S., Fazi, S., 2008. Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. J. Microbiol. Methods 75, 237–243.
Amalfitano, S., Puddu, S.F., 2009. Flow cytometric analysis of benthic prokaryotes attached to sediment particles. J. Microbiol. Methods 79, 246–249.
Azam, F., Malfatti, F., 2007. Microbial structuring of marine ecosystems. Nat. Rev. Microbiol. 5, 782–791.
Barra Caracciolo, A., Grenni, P., Cupo, C., Rossetti, S., 2005. In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. FEMS Microbiol. Lett. 253, 55–58.
Bernard, L., Courties, C., Servais, P., Troussellier, M., Petit, M., Lebaron, P., 2000. Relationships among bacterial cell size, productivity, and genetic diversity in aquatic environments using cell sorting and flow cytometry. Microb. Ecol. 40, 148–158.
Bouvier, T., Troussellier, M., Anzil, A., Courties, C., Servais, P., 2001. Using light scatter signal to estimate bacterial biovolume by flow cytometry. Cytometry 44, 188–194.
Ciobanu, M.-C., Burgaud, G., Dufresne, A., Breuker, A., Redou, V., Ben Maamar, S., Gaboyer, F., Vandenabeele-Trambouze, O., Lipp, J.S., Schippers, A., Vandenkoornhuyse, P., Barbier, G., Jebbar, M., Godfroy, A., Alain, K., 2014. Microorganisms persist at record depths in the subseafloor of the Canterbury Basin. ISME J. 8, 1370–1380.
Daley, R., 1979. Direct epifluorescence enumeration of native aquatic bacteria: uses, limitations, and comparative accuracy. In: Costerton, J.W., Colwell, R.R. (Eds.), Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology. , vol. 605. American Society for Testing Materials, pp. 29–45.
Decho, A.W., 2000. Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. Cont. Shelf Res. 20, 1257–1273.
DeLong, E.F., 2009. The microbial ocean from genomes to biomes. Nature 459, 200–206.
DeLong, E.F., Preston, C.M., Mincer, T., Rich, V., Hallam, S.J., Frigaard, N.U., Martinez, A., Sullivan, M.B., Edwards, R., Brito, B.R., Chisholm, S.W., Karl, D.M., 2006. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. Science 311, 496–503.
dos Santos Furtado, A.L., Casper, P., 2000. Different methods for extracting bacteria from freshwater sediment and a simple method to measure bacterial production in sediment samples. J. Microbiol. Methods 41, 249–257.
Duhamel, S., Jacquet, S., 2006. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. J. Microbiol. Methods 64, 316–332.
Ellery, W., Schleyer, M., 1984. Comparison of homogenization and ultrasonication as techniques in extracting attached sedimentary bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser. 15, 247–250.
Epstein, S.S., Rossel, J., 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria: search for optimal protocol. Mar. Ecol. Prog. Ser. 117, 289–298.
Fazi, S., Amalfitano, S., Pernthaler, J., Puddu, A., 2005. Bacterial communities associated with benthic organic matter in headwater stream microhabitats. Environ. Microbiol. 7, 1633–1640.
Frischer, M.E., Danforth, J.M., Healy, M.A.N., Saunders, F.M., 2000. Whole-cell versus total RNA extraction for analysis of microbial community structure with 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes in salt marsh sediments. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3037–3043.

Fuhrman, J.A., Griffith, J.F., Schwalbach, M.S., 2002. Prokaryotic and viral diversity patterns in marine plankton. Ecol. Res. 17, 183–194.
Garet, M.-J., 1996. Transformation bactérienne de la matière organique dans les sédiments côtiers: relation entre les métabolismes respiratoires et les activités exoprotéolytiques bactériennes(Ph. D. thesis) Univ. of La Rochelle.
Gasol, J.M., 1993. Benthic flagellates and ciliates in fine freshwater sediments: calibration of a live counting procedure and estimation of their abundances. Microb. Ecol. 25, 247–262.
Gasol, J.M., Del Giorgio, P.A., 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. Sci. Mar. 64, 197–224.
Jaspers, E., Overmann, J., 1997. Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3176–3181.
Jorgensen, B.B., Boetius, A., 2007. Feast and famine – microbial life in the deep-sea bed. Nat. Rev. Microbiol. 5, 770–781.
Kallmeyer, J., Smith, D.C., Spivack, A.J., D'Hondt, S., 2008. New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments. Limnol. Oceanogr. Methods 6, 236–245.
Karl, D.M., 2007. Microbial oceanography: paradigms, processes and promise. Nat. Rev. Microbiol. 5, 759–769.
Kuwae, T., Hosokawa, Y., 1999. Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4',6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange: relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3407–3412.
Lebaron, P., Troussellier, M., Got, P., 1994. Accuracy of epifluorescence microscopy counts for direct estimates of bacterial numbers. J. Microbiol. Methods 19, 89–94.
Legendre, L., Courties, C., Troussellier, M., 2001. Flow cytometry in oceanography 1989–1999: environmental challenges and research trends. Cytometry 44, 164–172.
Lei, Y., Stumm, K., Volkenborn, N., Wickham, S., Berninger, U.-G., 2010. Impact of Arenicola marina (Polychaeta) on the microbial assemblages and meiobenthos in a marine intertidal flat. Mar. Biol. 157, 1271–1282.
Lindahl, V., Bakken, L.R., 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. FEMS Microbiol. Ecol. 16, 135–142.
Llobet-Brossa, E., Rosselló-Mora, R., Amann, R., 1998. Microbial community composition of Wadden sea sediments as revealed by fluorescence in situ hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2691–2696.
Lunau, M., Lemke, A., Walther, K., Martens-Habbena, W., Simon, M., 2005. An improved method for counting bacteria from sediments and turbid environments by epifluorescence microscopy. Environ. Microbiol. 7, 961–968.
Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaulot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. Appl. Environ. Microbiol. 63, 186–193.
Marie, D., Partensky, F., Vaulot, D., Brussaard, C., 2001. Enumeration of phytoplankton, bacteria, and viruses in marine samples. Curr Protoc CytometryJohn Wiley & Sons, Inc.
Maron, P.-A., Schimann, H., Ranjard, L., Brothier, E., Domenach, A.-M., Lensi, R., Nazaret, S., 2006. Evaluation of quantitative and qualitative recovery of bacterial communities from different soil types by density gradient centrifugation. Eur. J. Soil Biol. 42, 65–73.
Montagna, P.A., 1982. Sampling design and enumeration statistics for bacteria extracted from marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. 43, 1366–1372.
Morono, Y., Terada, T., Kallmeyer, J., Inagaki, F., 2013. An improved cell separation technique for marine subsurface sediments: applications for high-throughput analysis using flow cytometry and cell sorting. Environ. Microbiol. 15, 2841–2849.
Pascal, P.Y., Dupuy, C., Richard, P., Mallet, C., Arminot du Châtelet, E., Niquil, N., 2009. Seasonal variation in consumption of benthic bacteria by meio- and macrofauna in an intertidal mudflat. Limnol. Oceanogr. 54, 1048–1059.
Porter, K., Feig, Y., 1980. The use of DAPI for identification and enumeration of bacteria and blue-green algae. Limnol. Oceanogr. 25, 943–948.
Porter, J., Deere, D., Hardman, M., Edwards, C., Pickup, R., 1997. Go with the flow – use of flow cytometry in environmental microbiology. FEMS Microbiol. Ecol. 24, 93–101.
R Core Team, 2013. R: A Language and Environment for Statistical Computing. In. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
Robertson, B.R., Button, D.K., 1989. Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry. Cytometry 10, 70–76.
Schneiderheinze, J., Armstrong, D., Schulte, G., Westenberg, D., 2000. High efficiency separation of microbial aggregates using capillary electrophoresis. FEMS Microbiol. Lett. 189, 39–44.
Soulsby, R., 1997. Dynamics of marine sands: a manual for practical applications: Thomas Telford (editor).
Troussellier, M., Courties, C., Zettelmaier, S., 1995. Flow cytometric analysis of coastal lagoon bacterioplankton and picophytoplankton: fixation and storage effects. Estuar. Coast. Shelf Sci. 40, 621–633.
Troussellier, M., Courties, C., Lebaron, P., Servais, P., 1999. Flow cytometric discrimination of bacterial populations in seawater based on SYTO 13 staining of nucleic acids. FEMS Microbiol. Ecol. 29, 319–330.
Tso, S.F., Taghon, G.L., 1997. Enumeration of protozoa and bacteria in muddy sediment. Microb. Ecol. 33, 144–148.
Vaulot, D., Courties, C., Partensky, F., 1989. A simple method to preserve oceanic phytoplankton for flow cytometric analyses. Cytometry 10, 629–635.
Velji, M., Albright, L., 1986. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. Can. J. Microbiol. 32, 121–126.
Wang, Y., Hammes, F., De Roy, K., Verstraete, W., Boon, N., 2010. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. Trends Biotechnol. 28, 416–424.
Whiteley, A.S., Griffiths, R.I., Bailey, M.J., 2003. Analysis of the microbial functional diversity within water-stressed soil communities by flow cytometric analysis and CTC + cell sorting. J. Microbiol. Methods 54, 257–267.
Whitman, W.B., Coleman, D.C., Wiebe, W.J., 1998. Prokaryotes: the unseen majority. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 6578–6583.
Williamson, K., Corzo, K., Drissi, C., Buckingham, J., Thompson, C., Helton, R., 2013. Estimates of viral abundance in soils are strongly influenced by extraction and enumeration methods. Biol. Fertil. Soils 1–13.
Yamamoto, N., Lopez, G., 1985. Bacterial abundance in relation to surface area and organic content of marine sediments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 90, 209–220.
Yoon, W.B., Rosson, R.A., 1990. Improved method of enumeration of attached bacteria for study of fluctuation in the abundance of attached and free-living bacteria in response to diel variation in seawater turbidity. Appl. Environ. Microbiol. 56, 595–600.

Annexe 2. B. Kientz, H. Agogué, C. Lavergne, P. Marié, E. Rosenfeld (2013) Isolation and distribution of iridescent Cellulophaga and other iridescent marine bacteria from the Charente-Maritime coast, French Atlantic. Systematic and Applied Microbiology 36: 244–25

Author's personal copy

Systematic and Applied Microbiology 36 (2013) 244–251

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Systematic and Applied Microbiology

journal homepage: www.elsevier.de/syapm

Isolation and distribution of iridescent *Cellulophaga* and other iridescent marine bacteria from the Charente-Maritime coast, French Atlantic

Betty Kientz*, Hélène Agogué, Céline Lavergne, Pauline Marié, Eric Rosenfeld*

UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSs Laboratory, University of La Rochelle, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 September 2012
Received in revised form 19 February 2013
Accepted 19 February 2013

Keywords:
Iridescence
Iridescent bacteria
Marine bacteria
Bacteroidetes
Flavobacteriaceae
Cellulophaga
Tenacibaculum
Aquimarina
Epibiont
Rocky shore

ABSTRACT

An intense colored marine bacterium, identified as *Cellulophaga lytica*, was isolated previously from a sea anemone surface on the Charente-Maritime rocky shore (Atlantic Coast, France), and iridescence of its colonies under direct light was recently described. In addition, iridescence intensities were found to differ strongly between *C. lytica* strains from different culture collections. However, importantly, the occurrence and distribution of iridescent bacteria in the marine environment were still unknown. Therefore, in this study, a search was undertaken for marine iridescent bacterial strains in different biotopes of the Charente-Maritime coast. Various marine samples (water, sediment, macroalgae, other macroorganisms and detritus) were collected from seven biotopes using a direct plate inoculation method. As a result, 34 iridescent strains related to the genus *Cellulophaga*, as well as 63 iridescent strains affiliated to the genera *Tenacibaculum* and *Aquimarina*, were isolated. Iridescent colors were different according to the genera but iridescent marine bacteria were widely distributed. However, a majority of strains were isolated from rocky shores and, in particular, red seaweed surfaces and mollusks. The data from the study suggested that isolates with iridescent properties were well conserved in stressful environments such as the coastal shoreline. This origin may provide an insight into the ecological and biological functions of iridescence.
© 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Different color processes are present in the natural environment. Pigmentation, a biochemical coloration, can be generated by molecular absorption of specific wavelengths. The exhibited color is uniform. A very different coloration process corresponding to structural colorations is referred as iridescence. An intense coloration with angle-dependent color changes is produced due to micron- and submicron-sized periodic structures interfering with light [8,33]. This appearance has been well studied in higher organisms, particularly in insects [10,29] and birds [28], but iridescence is also encountered in marine organisms such as fishes [21], ctenophores [35], macroalgae [5,9] and diatoms [24].

Bacterial iridescence to date has been a vague and poorly documented concept. However, a marine bacterium, *Cellulophaga lytica* CECT 8139, exhibiting a unique intense iridescence in reflected light on solid media has been described recently [17]. Colonies had colored centers of varying brightness distributed across the biofilm that appeared with a glitter-like character. Iridescent green was described as the dominant color, but red and blue-violet were also observed at the peripheral edges of the colonies. Iridescence of the colonies was proved using physical methods and the phenomenon was named glitter-like iridescence. Since this type of iridescence occurred under direct natural light exposure it was described as a more natural coloration effect compared to other bacterial iridescences.

We recently demonstrated that the iridescent "*Cellulophaga lytica*" CECT 8139 belonged to the species *Cellulophaga lytica* by DNA-DNA hybridization against *C. lytica* LIM-21^T (88.9% similarity, unpublished data obtained from the DSMZ collection). The *C. lytica* species is adapted to a wide range of marine biotopes in free-living, biofilm and associated forms [2,19]. Diverse intensities of iridescence have been found within the *C. lytica* strains [17]. Non-iridescent or less iridescent *C. lytica* strains Cy I2 (DSM 2039), LIM-21^T (CIP 103822 and DSM 7489) were all isolated from muddy sediment of Costa Rica beaches [13,19]. In contrast, iridescent strains *C. lytica* WFB 21 (DSM 2040) and ACEM 21 were isolated from seawater in an aquarium outflow and an estuary, respectively [19,30]. The iridescent *C. lytica* CECT 8139 was isolated from the surface of the red anemone *Actinia equine* along the rocky shore of Oléron Island on the Charente-Maritime coast, France [17]. Therefore, different ecotypes exist and, unlike the benthic origin, the epibiontic and planktonic origins seemed favorable for the

* Corresponding authors at: UMR 7266 CNRS-ULR, LIENSS, University of la Rochelle, Bâtiment Marie Curie, Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, Cedex 1, France. Tel.: +33 5 46 45 82 28; fax: +33 5 46 45 82 65.
E-mail addresses: betty.kientz@gmail.com (B. Kientz), eric.rosenfeld@univ-lr.fr (E. Rosenfeld).

0723-2020/$ – see front matter © 2013 Elsevier GmbH. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.02.004

Author's personal copy

iridescent trait. However, an extended study concerning the origins and biotopes favoring the iridescence trait has not yet been performed. In addition, even if bacterial iridescence has not yet been directly observed in the marine environment, investigating the specific distribution of iridescent strains could be of major importance for determining the possible roles of marine bacterial iridescence.

In this work, the occurrence and distribution of iridescent bacterial strains were studied on the Charente-Maritime coast, France, with special attention being paid to the *C. lytica* species. A specific observation device was employed in order to detect iridescent colonies, and isolated strains were affiliated to a genus by sequence analysis of the 16S rRNA gene.

Materials and methods

Sample collection and bacterial isolation

The sampling was performed between October and December 2011. The seven sites chosen were located on the Charente-Maritime coast in France (Fig. 1). Diverse biotopes, such as rocky shore, mudflats and rocky-sandy shore, were included (Table 1). A total of 139 samples were collected at low tide for bacterial isolation from seawater (11), sediments (20), red macroalgae (Rhodophyta) (16), green macroalgae (Chlorophyta) (11), brown macroalgae (Phaeophyta) (20), decomposed macroalgae (7), marine plants (4), sponges (5), cnidarians (8), worms (3), crustaceans (7), mollusks (19), echinoderms (6) and detritus (2).

A "fresh" inoculation protocol was defined in order to isolate environmental strains and to avoid population changes during transport. For seawater samples, a side of the agar plate was immersed directly in the water and the Petri dish was rapidly closed. For solid samples, a fragment was rinsed in artificial sterile seawater (ASW) Instant Ocean© (30 g L^{-1} in pure water) in order to remove loosely attached epibionts and it was then scraped onto the agar plate [17]. For sediment samples, approximately 1 mL was added directly onto the agar. Three days incubation at 20 °C were needed in order to observe iridescent colonies. Picked colonies were then subcultured, purified and stored at −80 °C in Cryovials© (Dutscher).

Culture conditions of iridescent marine bacteria

The solid medium Cytophaga (CYT) was used to isolate iridescent marine bacteria [13]. CYT medium contained 1 g tryptone, 0.5 g yeast extract, 0.5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, and 15 g agar in 1 L of artificial seawater (ASW) Instant Ocean© (30 g L^{-1} in pure water). The incubation temperature was fixed at 20 °C.

Iridescence observation

Plates from the cultured samples were observed using a direct illumination set up (see below) designed to elicit iridescent colonies. Additionally, iridescence of the pure strains was observed using a streaking procedure. One colony from a 24 h-old plate was subcultured onto triplicate plates by drawing thin 5 cm-linear streaks. Cultures were photographed after 24 h and 72 h growth in a dark room using an experimental arrangement of oblique epi-illumination at a fixed illumination angle of 60° [17]. The light source was an 18 watt, 5400 Kelvin lamp (Kaiser RB 218N HF copy lighting unit), and the operating voltage corresponded to AC 220–240 V at 50 Hz with an operating frequency of 40 kHz. The camera was a Nikon D1500 18–55VR using the Av program with f22, a macro lens, and large resolution (12.1 megapixels) in superfine mode.

Molecular characterization of the strains

Identification of each iridescent isolate was determined by 16S rRNA gene sequencing. The DNA suspension for the PCR consisted of colonies picked from agar plates and resuspended in 500 μL sterile water. Before carrying out PCR, three heat (incubation at 60 °C for 2 min) and cold (incubation in liquid nitrogen for 2 min) shocks were applied to the bacterial suspension in order to lyse the cells and liberate the DNA. The primers used for 16S RNA full length gene sequencing were 27F (5′-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3′), and 1492R (5′-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3′) [18,22]. Reaction mixtures of 50 μL contained 20 μL of PCR master mix (DyNAzyme II, Finnzymes), 100 pmol of each primer, 2 μL of washed cells and MilliQ water to the 50 μL final volume. PCR reactions were carried out in a Labcycler SensoQuest. The thermal PCR profile was as follows: initial denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing at 60 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min. The final elongation step was 9 min at 72 °C. The 16S rDNA products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gels. The 16S rDNA products were then sequenced with an automatic DNA analysis system (Genoscreen, Lille, France and GATC, Konstanz, Germany). Sequences were compared with those available in the GenBank database by using the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) service to determine their approximate phylogenetic affiliations [1]. Sequences of

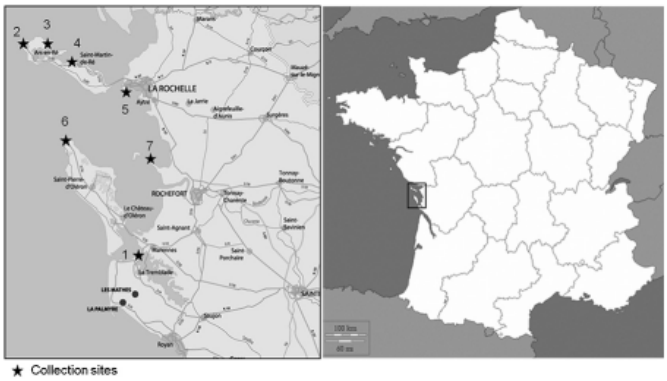


Fig. 1. Maps of the Charente-Maritime coast in France and the locations of the different sampling sites (see details in Table 1).

Author's personal copy

Table 1
Sampling sites with specified biotopes.

	Site	Location	Sampling date	Nature of biotope	Number of samples[a]
1	Mus du Loup Beach	Ronce les Bains, La Tremblade	29.09.11	Sand and rocks	6
2	Baleines Lighthouse	St Clément des Baleines, Ré Island	24.10.11	Rocks	51
3	Eelgrass Park	Loix, Ré Island	3.11.11	Silt with eelgrass	10
4	Arnérault Beach	La Flotte, Ré Island	3.11.11	Sand and rocks	7
5	Belvedère	Chef de Baie, La Rochelle	3.11.11	Sand and rocks	9
6	Chassiron Lighthouse	Chassiron, Oléron Island	15.11.11	Rocks	31
7	Fumée Point	Fouras	29.11.11	Silt and sand with oysters	25

[a] Total number of samples: 139.

representative strains were deposited in the GenBank database under accession numbers JX454520 to JX454530.

Phylogeny

Sequences were analyzed using the ARB software package (November 2011 version) [20] and the corresponding SILVA 16S RNA-based LTP release 106 SSU database [36]. After importing, all sequences were automatically aligned according to the SILVA SSU [7] reference alignment using the online tool SINA. Manual refinement of the alignment was carried out taking into account the secondary structure information of the rRNA in ARB. Tree reconstruction used the neighbor-joining (ARB), maximum parsimony (PHYLIP DNA-Parsimony v 3.6a3 [7]) and maximum likelihood (PHYML v2.4.5 [12]) methods. Tree topology was further tested by the application of bacterial positional variability filters, and by the application of 30%, 40% and 50% positional conservatory filters. The final tree was calculated with PHYML (model: GTRGAMMA) using 43 sequences based on 1274 valid columns (50% filtering). Partial sequences were added to the tree using the ARB parsimony tool.

Results

Collection and isolation of iridescent marine bacteria

For isolation of iridescent marine bacteria, the CYT medium was preferred to rich media, such as marine agar, in order to avoid too rapid growth. Using the collection and isolation procedures, several iridescent marine strains from diverse origins on the Charente-Maritime coast could be easily observed. Diverse bacterial colonies grew on CYT plates but iridescent colonies were only visible after three days incubation and, interestingly, various visual effects were observed under direct illumination (Fig. 2, arrows). Large green or red iridescent colonies were mostly present but small red pigmented colonies with red iridescence were also observed.

Iridescence and distribution of novel strains of Cellulophaga

Iridescence in the *Cellulophaga* strains was characterized by a green bright effect with red/violet edges. This type of iridescence was observed on several plates with diverse origins (Fig. 2), and colonies resembling *C. lytica* were isolated and then identified by molecular analysis. The 34 strains belonging to the genus *Cellulophaga* were grouped in OTU 1 (Table 2). Different iridescent intensities and color variations were visible, and some colonies exhibited yellow or blue colors (Fig. 3). Most of the strains were positive for agarolysis and showed gliding motility. The rocky shore biotope was found to contain a lot of iridescent *Cellulophaga* species (Fig. 4). These strains were isolated from a wide range of samples but mostly from macroalgae, particularly Rhodophyta and Phaeophyta, and from mollusks. Most intense iridescent strains were isolated from the surface of Rhodophyta and mollusks (Fig. 4).

Genotypic diversity of other iridescent bacteria

While searching for *Cellulophaga* iridescent strains, other colonies were observed with a bright effect but they had different types of iridescence (Fig. 2). A total of 97 strains (including strains of *Cellulophaga*) were isolated and were affiliated to a genus by sequencing of the 16S rRNA gene (Table 2). Similarity values for the 16S rRNA gene sequences compared to previously isolated species reported in the public databases are presented in Table 2. Overall, 11 different OTUs were found. For three OTUs (5, 7 and 9), the isolated strains showed sequence similarities of lower than 97% to previously reported species, suggesting the possible presence of new species. All isolates belonged to the phylum *Bacteroidetes* and formed two clusters (Fig. 5). The isolates forming OTUs 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11 clustered with the genus *Tenacibaculum*, and exhibited between 96 and 99% 16S rRNA sequence similarities (Table 2). In the other cluster, isolates belonging to OTU 1 had 99% similarity with *C. lytica*, and isolates belonging to OTU 2 had 98% similarities with *Aquimarina latercula* (Table 2).

The iridescent strains belonging to the genus *Cellulophaga* (OTU 1) were the most representative strains with 35.1% (Table 2), followed by 59.8% of the isolated strains (OTUs 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 and 11) that belonged to the genus *Tenacibaculum*. Finally, 5.2% of isolated strains belonged to the genus *Aquimarina*.

Phenotypic diversity of other iridescent strains

Different iridescent colonies were visible on the original plates (Fig. 2). Identified strains showed diversity in iridescence coloration and intensity when cultivated by the streaking method. Green or red iridescence was often observed (Fig. 6). The majority of *Tenacibaculum* strains expressed bright angle-dependent green iridescence, except for OTUs 5 and 7, and a few strains from OTUs 8 and 9 that expressed a red iridescence. The red iridescence of OTU 5 could be observed on colony edges only after three days incubation. Strains from OTUs 3 and 4 expressed a particular iridescence that resembled holograms with multicolor effects observed by eye which were difficult to photograph (Fig. 6 c,d). Strains affiliated to *Aquimarina* sp. (OTU 2) were red-pigmented with red iridescence. Most isolated strains were motile by gliding, especially for the bright iridescent isolates.

Source of isolation of iridescent bacteria

Iridescent bacteria were isolated from all types of marine biotopes and samples, except from the mudflat environment where no iridescent strains were isolated. The rocky shore ecosystem contained most iridescent bacteria of *Cellulophaga* species (Fig. 4). Efficient sources for the isolation of iridescent bacteria were mollusks, Rhodophyta, Phaeophyta, seawater and cnidarians. Rhodophyta species that possessed iridescent bacteria on their surface were, for example, *Palmaria palmata*, *Chondrus crispus* or *Corallina officinalis*. Mollusk samples and, in particular, gastropods contained a wide diversity of iridescent species within the same

Author's personal copy

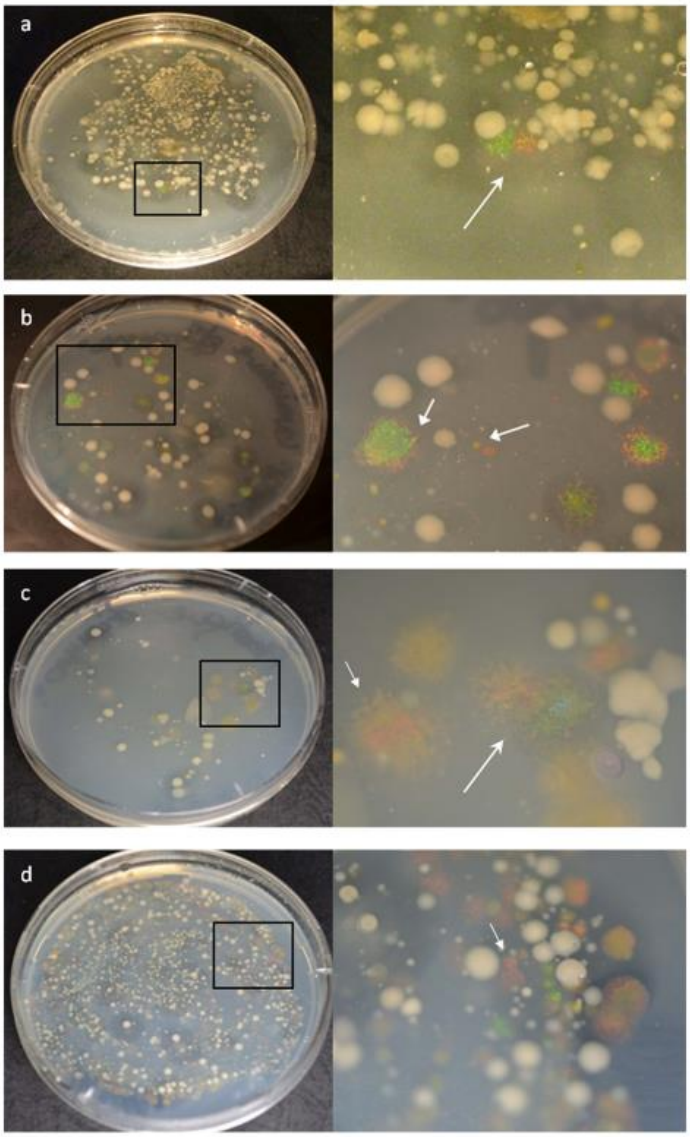


Fig. 2. Observation under direct illumination of CYT isolation plates incubated for three days at 20 °C. The origins of the samples collected were (a) *Palmaria palmata* rhodophyta at Baleines Lighthouse, (b) holdfast of an unattached *Saccorhiza polyschides* phaeophyta at Chassiron Lighthouse, (c) plastic detritus at Fumée Point, and (d) a limpet at Fumée Point. White arrows indicate red or green iridescent colonies.

sample. For example, six different OTUs (1, 3, 4, 6, 10, and 11) comprising three genera were isolated from the same decomposed oyster shell. The original source of the isolated species is shown in the phylogenic tree (Fig. 5). All isolates related to the genus *Aquimarina* (OTU 2) were from the surface of red macroalgae. The strains belonging to OTU 5 were isolated from the same brown macroalgae *Fucus vesiculosus*. The two isolates from OTU 6 were isolated from the surface of different gastropods (winkle).

Discussion

Bacterial iridescence has either been ambiguously described or ignored in the literature. However, we have recently isolated and reported an intensively iridescent marine bacterium, *C. lytica* CECT 8139, from a rocky shore of the Charente-Maritime department [17]. This discovery raised the question of whether iridescent marine bacteria were widely distributed in coastal biotopes.

Author's personal copy

Table 2
Affiliation of isolated iridescent strains.

OTU	Representative strain	Accession number	Number (%) of isolates	Closest relative strain Closest relative type strain (T)	% Sequence similarity	Accession number of the closest relative
OTU 1	Strain 14	JX454529	34 (35.1%)	*Cellulophaga lytica*	99	AB032512
				Cellulophaga lytica DSM7489^T	98	CP002534
OTU 2	Strain 46	JX454530	5 (5.2%)	*Aquimarina latercula*	98	AB681002
				Aquimarina latercula ATCC23177^T	97	M58769
OTU 3	Strain 35	JX454522	18 (18.6%)	*"Flexibacter aurantiacus* subsp. *copepodarum"*	99	AB078044
				Tenacibaculum aiptasiae a4^T	98	EF416572
OTU 4	Strain 116	JX454523	6 (6.2%)	*"Flexibacter aurantiacus* subsp. *copepodarum"*	98	AB078044
				Tenacibaculum aiptasiae a4^T	97	EF416572
OTU 5	Strain 66	JX454528	2 (2.1%)	*Tenacibaculum ovolyticum*	97	AB681005
				Tenacibaculum ovolyticum IFO 15947^T	97	AB078058
OTU 6	Strain 70	JX454527	2 (2.1%)	*Tenacibaculum soleae*	99	AM989479
				Tenacibaculum soleae LL04 12.1.7^T	99	AM746476
OTU 7	Strain 103	JX454524	1 (1.0%)	*Tenacibaculum discolor*	97	JQ231117
				Tenacibaculum aiptasiae a4^T	96	EF416572
OTU 8	Strain 68	JX454521	19 (19.6%)	*Tenacibaculum gallaicum* A37.1^T	99	AM746477
OTU 9	Strain 4	JX454520	1 (1.0%)	*"Flexibacter aurantiacus* subsp. *copepodarum"*	96	AB078044
				Tencibaculum litopenaei B-I^T	95	DQ822567
OTU 10	Strain 82	JX454526	1 (1.0%)	*Tenacibaculum aiptasiae*	98	NR044202
				Tenacibaculum aiptasiae a4^T	98	EF416572
OTU 11	Strain 105	JX454525	8 (8.2%)	*Tenacibaculum aestuarii* SMK-4^T	99	DQ314760

OTU, Operational taxonomic unit.

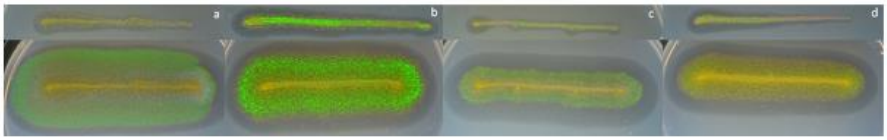


Fig. 3. Glitter-like iridescence appearance under direct illumination of different *Cellulophaga*-affiliated isolates (OTU 1) after one day (upper line) and four days (bottom line) incubation at 20 °C on CYT medium. Strains were isolated from: (a) dry sand at Ronce les Bains, (b) *Palmaria palmata* rhodophyta at Baleines Lighthouse, (c) *Fucus vesiculosus* phaeophyta at Ronce les Bains, and (d) *Ectocarpus siliculosis* chlorophyta at Chassiron Lighthouse. Gliding motility can be identified as the spreading zone originating from the colony center. Agarolysis corresponds to the dark halo visible on the colony edges.

In this study, iridescent strains belonging to the genus *Cellulophaga* were isolated for a second time on the Charente-Maritime coast. These strains were the most representative iridescent isolates in the resulting collection but diverse bacterial strains belonging to other genera were also isolated. In total, iridescent strains were affiliated to four different genera, and all isolated strains belonged to the *Bacteroidetes* phylum. Three groups of isolates (OTUs 5, 7 and 9) had 16S rRNA sequence similarity equal to or lower than 97%. Therefore, putative new species were discovered

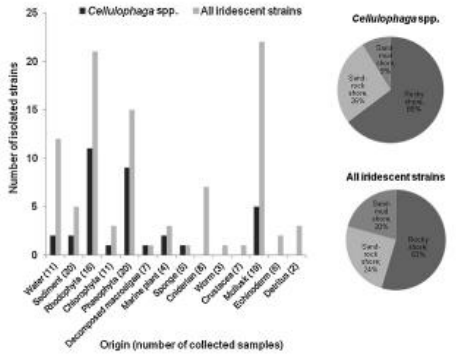


Fig. 4. Distribution of all isolated iridescent strains within the diverse biotopes and samples.

Fig. 5. Phylogenetic tree constructed using the maximum likelihood method from the 16S rDNA genes of isolates and related species of the Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides group. Bar indicates 1% dissimilarity sequence. Selected sequences from the *Rikenellaceae* family of CFB bacteria were used to root the tree. Bootstrap percentages were obtained using 1000 replicates, and values >50% are indicated at the nodes. * indicates branches that were also found using the neighbor-joining and the maximum parsimony methods.

Author's personal copy

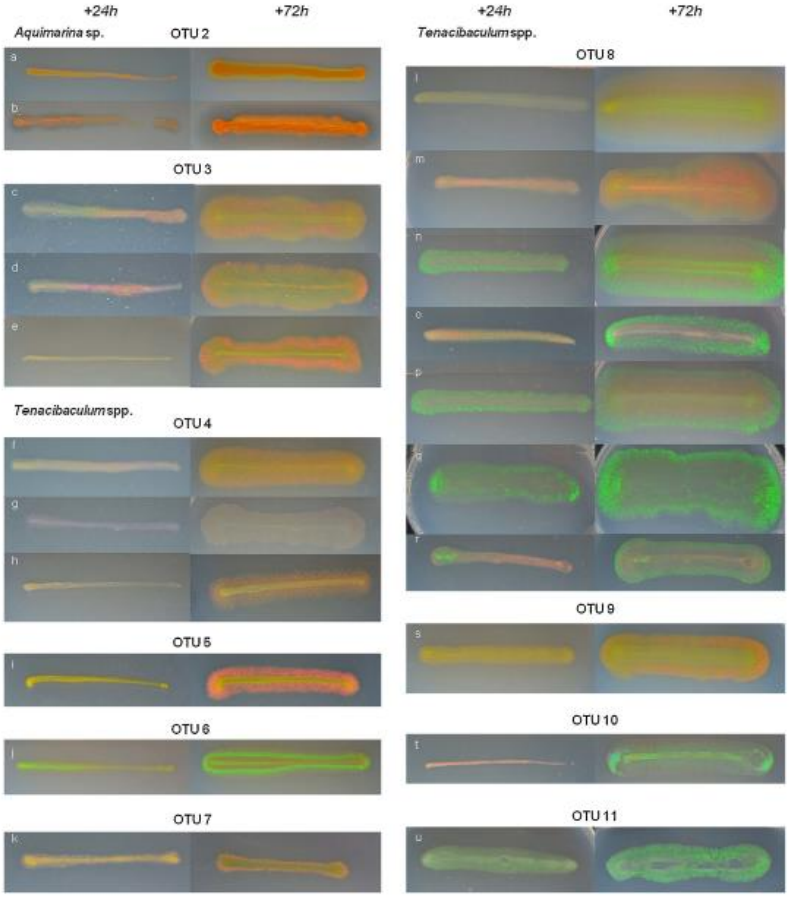


Fig. 6. Iridescence of the isolated marine bacteria after 24 h (left) and 72 h (right) incubation at 20 °C on CYT medium. OTU 2 (a and b) were isolated from *Chondrus crispus* red macroalgae. Strains belonging to OTU 3 were isolated from *Pterocladia* sp. red macroalgae (c), an unknown hydroid (d), and the seastar *Asterina gibosa* (e). Strains belonging to OTU 4 were from a decomposed oyster (f), seawater (g), and a limpet (h). OTUs 5, 6 and 7 were isolated respectively from *Fucus vesiculosus* (i), a winkle (j), and seawater (k). Strains grouped in OTU 8 were isolated from *Pterocladia* sp. red macroalgae (l), an unattached laminaria (m), sand (n), *Corallina officinalis* red macroalgae (o), a worm sand formation (p), seawater (q), and a crab (r). OTUs 9, 10 and 11 were isolated respectively from *Zostera marina* (s), a decomposed oyster (t), and an unattached *Saccharina*(u) sp. brown macroalgae.

from the genus *Tenacibaculum* that had never been detected before using either cultivation or culture-independent studies, and these could have interest for future research. However, since the resolution of 16S rRNA sequence analysis is insufficient to distinguish between closely related organisms [4,31], more precise phylogenetic analyses of the DNA gyrase B subunit gene or the ITS region, as well as determination of the DNA-DNA hybridization values, should be used to confirm the findings [31,32]. In addition, the iridescent bacterial strains must be further characterized by a polyphasic approach, including genetic, phenotypic and biochemical studies.

This study precisely illustrated and described colony coloration effects on agar plates, and different iridescence effects were observed among new isolates of *Cellulophaga*. This data confirmed that these strains could be differentiated phenotypically on the basis of iridescence. Different iridescent appearances were also identified in the other isolates belonging to the *Bacteroidetes* phylum. For a few species, vague or ambiguous descriptions of the phenomenon have been reported previously in the literature but the occurrence of a true iridescent trait has to date remained unclear. The red pigmentation effect has been used to differentiate between *Aquimarina* species but no information has been presented to describe iridescence [23]. To our knowledge, the only description of iridescence was provided for *Tenacibaculum discolor* isolated from the surface of a sole: "*On marine agar 2216 (Difco), colonies also appear bright yellow from the front, but appear bright green when viewed at an angle of 30–45°*" [27]. Nevertheless, optical effects have been mentioned for other *Tenacibaculum* strains, such as a greenish glistening for *T. litoreum* [3] and *T. aestuarii* [14], and glistening and pale yellow for *T. lutimaris* [37], but no description was given for other species [26,27,34]. The iridescence phenomenon in marine bacteria, and more generally in prokaryotes, has usually been omitted from reports in the literature and therefore it still remains

Author's personal copy

poorly recognized from a taxonomic point of view. Nevertheless, our data suggest that iridescence is potentially widespread and represents an interesting criterion to consider for new marine bacteria.

Gliding motility was observed for most iridescent strains isolated. Moreover, fast gliding (fast spreading edges) was typical of intensely iridescent colonies. A strong link between gliding motility and iridescence could therefore exist in several members of the *Bacteroidetes* phylum. As recently proposed [15], gliding motility may be involved in the establishment, in time and space, of the necessary periodic structures responsible for the iridescent appearance. Such structures are still uncharacterized but they are under investigation by electron microscopy in our laboratory. Since mostly green and red iridescences were observed for the isolated strains, similar periodic structures, with minor dimension and periodicity variations, are therefore likely to be responsible for the iridescent appearances observed. *Flavobacteriales* are common in the marine environment [2], and we found that iridescent strains were particularly abundant on rocky shores (53%) but this biotope was comprised of a higher biodiversity of organisms than that of muddy environments. The presence of iridescent bacteria in rocky shore ecosystems that combine stressful conditions caused by solar exposure and desiccation with great fluctuations in salinity, may provide preliminary indications for the possible biological roles of iridescence (e.g. thermoregulation, UV protection, light filtering and desiccation prevention [6,29]). Moreover, we recently showed that iridescence of *C. lytica* CECT 8139 was conserved under environmental stress conditions, such as low temperature and high salinity [16]. Interestingly, the majority of isolated species were associated with the marine flora (macroalgae) and fauna (mollusks and cnidarians). For several macroorganisms, recruitment of an epibiontal community with protection activities has been proved [11,25]. Iridescence may therefore provide selective advantages for bacterial populations and/or their hosts. Moreover, several strains, especially strains of *Cellulophaga* sp., were isolated from the surfaces of red macroalgae. For the isolates belonging to the genus *Aquimarina* showing a red pigmentation, their origin was exclusively the surface of Rhodophytae (i.e. red macroalgae). These observations might be of major importance since a few red macroalgae have been previously described to exhibit iridescence. In fact, *Chondrus crispus* and *Irideae* spp. possess iridescent multilayered fronds [5,9]. Moreover, iridescence of *Irideae* has been supposed to prevent desiccation [9]. Therefore, it can be hypothesized that iridescent epibiontic bacteria might play beneficial roles in some red macroalgae. More generally, iridescent marine *Bacteroidetes* might have biological or ecological functions and play important roles in rocky shore ecosystems. Nevertheless, these hypotheses have to be examined further in the future in order to confirm these potential relationships.

References

[1] Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410.

[2] Bernardet, J.-F., Nakagawa, Y. (2006) An introduction to the family *Flavobacteriaceae*, in: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds.), The Prokaryotes, vol. 7, third ed, Springer, New York, pp. 455–480.

[3] Choi, D.H., Kim, Y.-G., Hwang, C.Y., Yi, H., Chun, J., Cho, B.C. (2006) *Tenacibaculum litoreum* sp. nov., isolated from tidal flat sediment. Int. J. Syst. Bacteriol. 56, 635–640.

[4] Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S., Bult, C., Fields, C. (1995) Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 595–599.

[5] Craigie, J.S., Correa, J.A., Gordon, M.E. (1992) Cuticules from *Chondrus crispus* (Rhodophyta). J. Phycol. 28, 777–786.

[6] Doucet, S.M., Meadows, M.G. (2009) Iridescence: a functional perspective. J. R. Soc. Interface 6 (Suppl. 2), S115–S132.

[7] Felsentein, J. 2004 Inferring Phylogenies, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts.

[8] Fox, D.L. 1976 Animal Biochromes and Structural Colors: Physical, Chemical, Distributional and Physiological Features of Colored Bodies in the Animal World, second ed., University of California Press, Berkeley, CA.

[9] Gerwick, W.H., Lang, N.J. (1977) Structural, chemical and ecological studies on iridescence in *Iridaea* (Rhodophyta). J. Phycol. 13, 121–127.

[10] Ghiradella, H. (1991) Light and color on the wing: structural colors in butterflies and moths. Appl. Opt. 30, 3492–3500.

[11] Goecke, F., Labes, A., Wiese, J., Imhoff, J.F. (2010) Chemical interactions between marine macroalgae and bacteria. Mar. Ecol. Prog. Ser. 409, 267–300.

[12] Guindon, S., Gascuel, O. (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst. Biol. 52, 696–704.

[13] Johansen, J.E., Nielsen, P., Sjøholm, C. (1999) Description of *Cellulophaga baltica* gen. nov., sp. nov. and *Cellulophaga fucicola* gen. nov., sp. nov. and reclassification of [*Cytophaga*] *lytica* to *Cellulophaga lytica* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 49, 1231–1240.

[14] Jung, S.Y., Oh, T.K., Yoon, J.H. (2006) *Tenacibaculum aestuarii* sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 1577–1581.

[15] Kientz, B., Ducret, A., Luke, S., Vukusic, P., Mignot, T., Rosenfeld, E. (2012) Glitter-like iridescence within the *Bacteroidetes* especially *Cellulophaga* spp.: optical properties and correlation with gliding motility. PLoS ONE 7 (12), e52900, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052900.

[16] Kientz, B., Marié, P., Rosenfeld, E. (2012) Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of *Cellulophaga lytica*. FEMS Microbiol. Lett. 333, 101–108.

[17] Kientz, B., Vukusic, P., Luke, S., Rosenfeld, E. (2012) Iridescence of a marine bacterium and classification of prokaryotic structural colors. Appl. Environ. Microbiol. 78, 2092–2099.

[18] 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, NY, pp. 115–175.

[19] Lewin, R.A., Lounsbery, D.M. (1969) Isolation, cultivation and characterization of flexibacteria. J. Gen. Microbiol. 58, 145–170.

[20] Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadhukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Forster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., Konig, A., Liss, T., Lussmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A., Schleifer, K.-H. (2004) ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res. 32, 1363–1371.

[21] Lythgoe, J.N., Shand, J. (1989) The structural basis for iridescent color changes in dermal and corneal iridophores in fish. J. Exp. Biol. 141, 313–325.

[22] Muyzer, G., De Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59, 695–700.

[23] Nedashkovskaya, O.I., Vancanneyt, M., Christiaens, L., Kalinovskaya, N.I., Mikhailov, V.V., Swings, J. (2006) *Aquimarina intermedia* sp. nov., reclassification of *Stanierella latercula* (Lewin 1969) as *Aquimarina latercula* comb. nov. and *Gaetbulimicrobium brevivitae* (Yoon et al, 2006) as Aquimarina brevivitae comb. nov. and emended description of the genus Aquimarina. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 56, 2037–2041.

[24] Noyes, J., Sumper, M., Vukusic, P. (2008) Light manipulation in a marine diatom. J. Mater. Res. 23, 3229–3232.

[25] Patel, P., Callow, M.E., Joint, I., Callow, J.A. (2003) Specificity in the settlement-modifying response of bacterial biofilms towards zoospores of the marine alga *Enteromorpha*. Environ. Microbiol. 5, 338–349.

[26] Piñeiro-Vidal, M., Carballas, C.G., Gómez-Barreiro, O., Riaza, A., Santos, Y. (2008) *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 881–885.

[27] Piñeiro-Vidal, M., Riaza, A., Santos, Y. (2008) *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 21–25.

[28] Prum, R.O., Torres, R. (2003) Structural coloration of avian skin: convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. J. Exp. Biol. 206, 2409–2429.

[29] Seago, A.E., Brady, P., Vigneron, J.-P., Schultz, T.D. (2009) Gold bugs and beyond: a review of iridescence and structural color mechanisms in beetles (Coleoptera). J. R. Soc. Interface 6 (Suppl. 2), S165–S184.

[30] Skerratt, J.H., Bowman, J.P., Hallegraeff, G., James, S., Nichols, P.D. (2002) Algicidal bacteria associated with blooms of a toxic dinoflagellate in a temperate Australian estuary. Mar. Ecol. Prog. Ser. 244, 1–15.

[31] Stackebrandt, E. (2006) In: Stackebrandt, E. (Ed.), Molecular Identification, Systematics, and Population Structures of Prokaryotes, Springer-Verlag, Berlin.

[32] Suzuki, M., Nakagawa, Y., Harayama, S., Yamamoto, S. (2001) Phylogenetic analysis and taxonomic study of marine *Cytophaga*-like bacteria: proposal for *Tenacibaculum* gen. nov. with *Tenacibaculum maritimum* comb. nov. and *Tenacibaculum ovolyticum* comb. nov., and description of *Tenacibaculum mesophilum* sp. nov. and *Tenacibaculum amylolyticum* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 1639–1652.

[33] Vukusic, P., Sambles, J.R., Lawrence, C.R., Wootton, R.J. (2001) Structural color: now you see it-now you don't. Nature 410, 36.

Author's personal copy

[34] Wang, J.-T., Chou, Y.-J., Chou, J.-H., Chen, C.A., Chen, W.-M. (2008) *Tenacibaculum aiptasiae* sp. nov., isolated from a sea anemone *Aiptasia pulchella*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 58, 761–766.
[35] Welch, V., Vigneron, J.-P., Lousse, V., Parker, A. (2006) Optical properties of the iridescent organ of the comb-jellyfish *Beroë cucumis* (Ctenophora). Phys. Rev. E 73, 0419161–0419167.
[36] Yarza, P., Richter, M., Peplies, J., Euzeby, J., Amann, R., Schleifer, K.-H., Ludwig, W., Glöckner, F.O., Rosselló-Móra, R. (2008) The All-Species Living Tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains. Syst. Appl. Microbiol. 31, 241–250.
[37] Yoon, J.-H., Kang, S.-J., Oh, T.-K. (2005) *Tenacibaculum lutimaris* sp. nov., isolated from a tidal flat in the Yellow Sea. Korea. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 793–798.

Annexe 3. Poster présenté du 19 au 24 Août 2012 à Copenhague (Danemark) durant la conférence internationale ISME (International Society for Microbial Ecology) : "*The Power of the Small*".

N-related prokaryotic communities diversity among depth gradient in an Atlantic intertidal mudflat

190 A

Lavergne Céline[1*], Agogué Hélène[1], Beaugeard Laureen[1], Dupuy Christine[1]

[1] Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS – Université de La Rochelle, 17000 La Rochelle, France

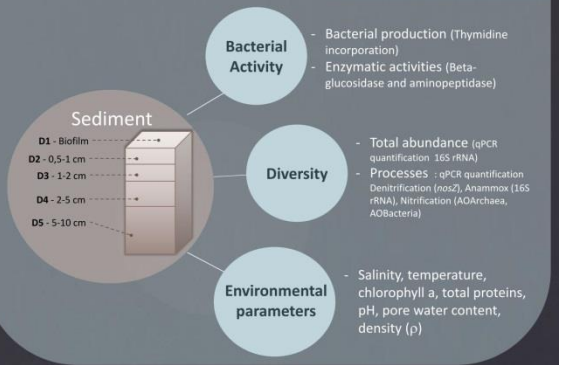
- Intertidal mudflats without vegetation exhibit a high primary production, thanks to **microphytobenthos** (MPB) development at sediment surface during the low tide, forming a dense and complex biofilm (Decho, 2000).
- European intertidal mudflats are the seat of high uptake of inorganic nitrogen and phosphate in coastal waters attenuating high loads from the land to the sea.
- N-related prokaryotic communities (Bacteria and Archaea) are key organisms in intertidal mudflats. They enhance nitrogen biodisponibility by remineralization of inorganic nutrients for primary production (Thamdrup & Dalsgraad, 2008).

Aim of study

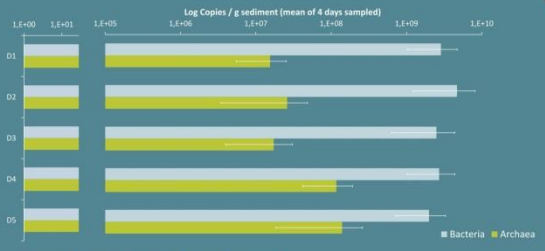
Is there any structure of prokaryotic activity and functional role in nitrogen cycle among depth gradient in intertidal mudflat ?

Sampling site and methods

- Bay of Marennes Oléron = 196 km² with more than 110 km² of intertidal mudflat.
- Sampling site = Brouage mudflat
- Sampling at low tide during **4 consecutive days** with increasing tidal coefficient during **Spring** (April 2012).



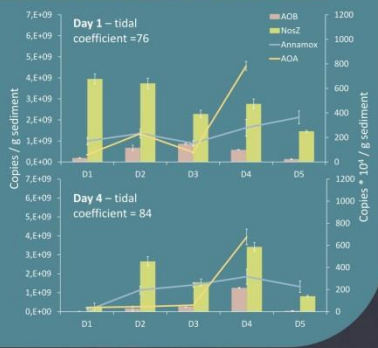
Prokaryotes distribution among depth



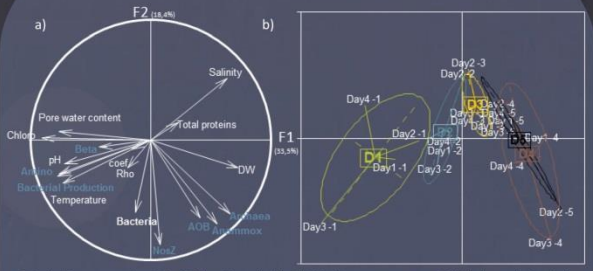
- Archaea (from 0.5 % to 7 %) << Bacteria
- Archaea ⇗ with depth
- High variability among each day of sampling (standard error)

Evolution of N-related functional genes abundance

- Denitrification is particularly high (from 2.10^8 to 6.10^9 copies / g sediment)
- NosZ >> AOB >> AOA ~Anammox
- D1 (biofilm) = most variable depth



Multivariate analysis

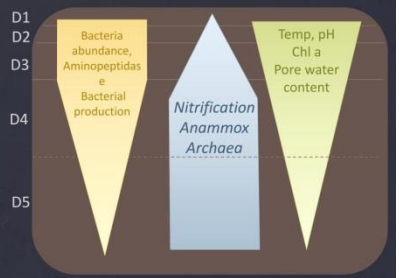


Principal Component Analysis (PCA) performed with R (R development core team, 2011). a) correlation circle, F1 contribution = 33,5% and F2 contribution = 18,4 %, b) Factorial map with representation of point classes (D = Depth)

- Bacterial production and aminopeptidase activity are correlated with :
  + temperature, chlorophyll a and pore water content
  - salinity
- Anammox is linked to Archaeal abundance
- Factorial map shows the structuration of the variables among depth gradient with high discrimination of D1 (biofilm), D2 (0,5-1 cm) and D3 (1-2 cm). But D4 and D5 (i.e., from 2 cm to 10 cm depth) seem to be quite similar

Conclusions

- Copies of nosZ gene seem to be very high in our samples with maximum values closed to 6. 10^9 copies / g sediment. An inventory of the denitrifying prokaryotes diversity is needed to understand this high abundance of denitrification gene copies in the Brouage mudflat .
- N-related functional genes abundance, prokaryotic total abundance and activity, and environmental parameters show strong structuration among the different depth sampled.
- Rainfall can modify salinity, pH, temperature and biofilm complexity. In fact, weather and Microphytobentic production during low tide can be determining factors .
- **Perspectives :** Nutrient concentrations, dissolved carbon and nitrogen, ExoPolymeric Subtances and RNA analysis are in progress and will permit to understand our preliminary results. This study is the beginning of a seasonal survey



PS06 – Microbial Gradient Communities – Poster 190A
ISME14 Copenhagen, Denmark, August 19-24, 2012 – * celine.lavergne@univ-lr.fr

Annexe 4. Présentation orale réalisée le 24 Octobre 2013 à Clermont-Ferrand au VIème colloque de l'Association Francophone d'Ecologie microbienne (AFEM), session III : Dynamique de la biodiversité et fonctionnement des écosystèmes

ROLE DES COMMUNAUTES PROCARYOTES LIEES AU CYCLE DE L'AZOTE DANS UNE VASIERE INTERTIDALE DU LITTORAL ATLANTIQUE : ETUDE SAISONNIERE ET STRUCTURATION VERTICALE

LAVERGNE Céline[1], AGOGUE Hélène[1], DUPUY Christine[1]

[1] *Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSS) UMR 7266 CNRS – Université de La Rochelle, La Rochelle, France*

Les vasières intertidales sont le siège d'une forte production primaire à la base du réseau trophique et cruciale pour les systèmes adjacents. Dans la zone des vasières intertidales nues, la turbidité de l'eau ne permet pas une forte production primaire d'origine pélagique, la majorité de cette production est donc assurée par le microphytobenthos se développant à la surface du sédiment. Dans les sédiments intertidaux, les microalgues du microphytobenthos ne sont pas limitées en azote et profitent d'une forte activité des procaryotes (bactéries et archées). En effet, de nombreux processus d'origine procaryotique comme la dénitrification et l'anammox produisent du diazote élément indispensable dans les cycles biogéochimiques.

Dans cet écosystème particulier, l'implication des procaryotes dans le cycle de l'azote n'est plus à démontrer mais certains processus sont encore peu connus notamment ceux impliquant les archées et le processus de l'anammox.

Cette étude s'intéresse aux rôles des procaryotes dans le cycle de l'azote à différentes saisons et à différentes profondeurs du sédiment (surface, 0.5-1, 1-2, 2-5 et 5-10 cm) dans une vasière intertidale (Vasière de Brouage, Charente Maritime).

Notre étude montre que la structuration verticale des procaryotes impliqués dans le cycle de l'azote est fortement variable selon les saisons considérées. L'analyse par des méthodes de biologie moléculaire des gènes impliqués dans le cycle de l'azote montre une modification des processus selon les profondeurs. En effet, les communautés les plus actives sont recensées entre 0.5 et 1 cm de profondeur, là ou des processus anaérobies et aérobies se réalisent en parallèle et se stimulent mutuellement.

Mots clés : cycle de l'azote, vasières, procaryotes, écologie microbienne, biologie moléculaire

Bibliographie :

Bertrand, J.-C., P. Caumette, P. Lebaron, R. Matheron, and P. Normand. 2011. Ecologie microbienne : Microbiologie des milieux naturels et anthropisés. Presses universitaires de Pau et des pays de l'Adour.

Thamdrup, B., and T. Dalsgaard. 2002. Production of N2 through Anaerobic Ammonium Oxidation Coupled to Nitrate Reduction in Marine Sediments. Applied and Environmental Microbiology 68: 1312-1318.

Annexe 5. Présentation orale réalisée le 12 Septembre 2014 à Ghent (Belgique) au 19ème meeting ENC (European Nitrogen Cycle), session 6: Ecology & ecophysiology III

ACTIVE NITROGEN-RELATED PROKARYOTIC COMMUNITIES SHIFT IN INTERTIDAL MUDDY SEDIMENT, A MESOCOSM STUDY

Lavergne C.[1], Hugoni M.[2,3], Dupuy C.[1], Agogué H.[1]

[1] *Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSS) UMR 7266 CNRS – Université de La Rochelle, La Rochelle, France*

[2] *"Microorganismes: Génome et Environnement" laboratory, Clermont University, Université Blaise Pascal, F-63000 Clermont-Ferrand, France*

[3] *Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Unité Mixte de Recherche (UMR) 6023, F-63171 Aubière, France*

In diatoms-dominated intertidal mudflats, the primary production is particularly high and microphytobenthos that can be limited by nitrogen-related nutrients is linked with N-related prokaryotic communities. The differential activities of N-related microbial communities between day and night among a depth gradient are poorly known in mudflats. We conducted a semi-controlled approach at night and day among depth gradient during low tide. Sediment samples originated from Marennes-Oleron mudflat (Atlantic coast, France) were collected and incubated according to 5 layers: 0-0.5 cm, 0.5-1 cm, 1-2 cm, 2-5 cm and 5 to 10 cm below sediment surface (bsf).

Specific prokaryotic gene expressions involved in nitrification, denitrification or anammox processes (*i.e.* Archaeal *amoA*, Bacterial *amoA*, *nirS* genes) were monitored. In this work, N-related prokaryotes were globally more active from surface to 2 cm bsf at day. In contrast at night for all considered N-related genes, expression was lower. During the day, between 2 and 10 cm bsf, anammox activity seemed resulting in a quick nitrite removal in this horizon.

The active diversity of Archaeal community evaluated through 16S rRNA transcripts 454 pyrosequencing, revealed a shift after 5 cm bsf. Between the surface and 5 cm bsf the Thaumarchaeota known to be implied largely in the nitrogen cycle, dominated the active community. Deeper, between 5 and 10 cm bsf, the Crenarchaeota group C3 was highly active. This group is poorly characterized as there is no cultivated member yet. Our work highlighted the importance of focusing further studies on rare prokaryotic groups that might be involved in ecosystem functioning.

Annexe 6. Poster présenté du 10 au 12 Septembre 2014 à Ghent (Belgique) au 19ème meeting ENC (European Nitrogen Cycle)

Functional Diversity of Nitrogen-Related Prokaryotic Community in an Intertidal Mudflat

Lavergne Céline[1], Hugoni Mylène[2], Dupuy Christine[1] and Agogué Hélène[1]

[1] Littoral, Environnement et Sociétés (LIENSs) UMR 7266 CNRS – Université de La Rochelle, 17000 La Rochelle, France

[2] Laboratoire Microorganismes: Génome et Environnement (LMGE) UMR 6023 CNRS – Université Blaise Pascal, 63000 Clermont-Ferrand, France

Intertidal mudflats without vegetation exhibit a high primary production, thanks to **microphytobenthos** (MPB) development at sediment surface during the low tide, forming a dense and complex biofilm.

In particular, european intertidal mudflats are considered as highly productive systems where MPB interact largely with nitrogen-related prokaryotic communities (Bacteria and Archaea). These communities are distributed vertically throughout the whole sediment but their taxonomic and functional diversity are still largely unknown.

Aim of study

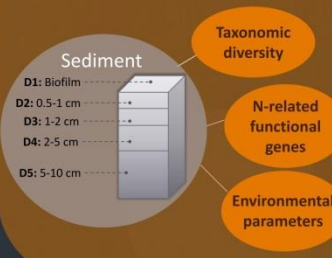
Among vertical sediment depth :

Do Bacteria and Archaea have different ecological niches ?

Is their diversity associated with different genetic potential ?

Sampling site and methods

- Bay of Marennes-Oléron = 196 km² with more than 110 km² of intertidal mudflat.
- Sampling site = Brouage mudflat
- Sampling at low tide in July 2012 (high temperature and irradiance) and in February 2013 (low temperature and irradiance)

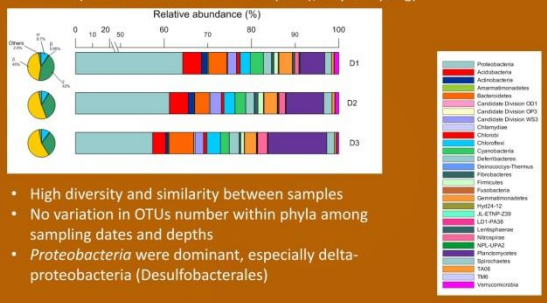


- 454 pyrosequencing (V3-V5 region) 16S rRNA gene of Bacteria and Archaea (97% similarity threshold)
- Total abundance (qPCR quantification 16S rRNA)
- Processes : qPCR quantification Denitrification (*nirS*, *nirK*, *nosZ*), Anammox (16S rRNA gene), Nitrification (Archaea *Amoa*, Bacteria *Amoa*)
- Salinity, temperature, chlorophyll *a*, nutrient concentrations, total proteins, pH, pore water content

Prokaryotic diversity among depth

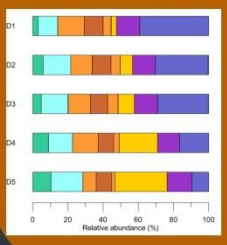
(16S rRNA gene relative abundance and affiliation of Operational Taxonomic Units)

Bacteria (1 000 most abundant OTUs (97%), July sampling)



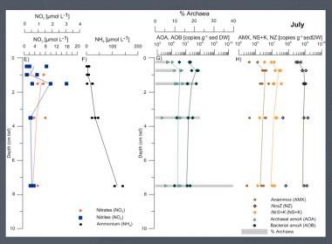
- High diversity and similarity between samples
- No variation in OTUs number within phyla among sampling dates and depths
- *Proteobacteria* were dominant, especially delta-proteobacteria (Desulfobacterales)

Archaea (total OTUs, July sampling)

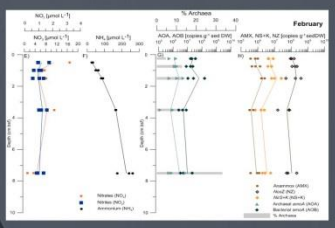


- No difference between July and February
- All major taxa were retrieved in all samples
- *Thaumarchaeota* MGI decreased with depth
- *Euryarchaeota* increased with depth

N-related functional genes distribution among depth



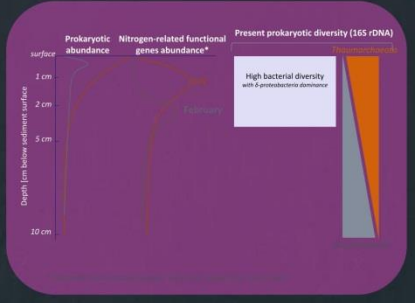
- Denitrification: High concentration *nosZ >> NirS+K*
- Nitrification: AOB > > AOA negatively correlated with $[NH_4^+]$
- Maximum abundance between 0.5 and 1 cm below sediment surface



- Same trends in winter (Denitrification >> Nitrification)
- Denitrification and anammox less abundant than in summer
- Nitrification = no difference
- Maximum abundance between 1 and 2 cm below sediment surface

Conclusions

- Depth-related structuration of the archaeal community with a dominance of *Thaumarchaeota* in surface and a community shift layers with a dominance of the *Euryarchaeota*.
- High bacterial diversity and potential functional redundancy of the community. The bacterial composition didn't exhibit any changes among depth and was dominated by the Desolfubacterale order.
- Denitrifiers dominated the N-related prokaryotic community: *nosZ* genes were the most abundant denitrifying gene whatever the sampling date and depth.
- Nitrifying community was largely dominated by Ammonia Oxidizing Bacteria (AOB) in both sampling dates as AOB were always one order of magnitude more abundant than Ammonia Oxidizing Archaea.
- Weak congruence was found between the prokaryotic community structure and the nitrogen-related functional traits



19 th European Nitroegn Cycle meeting , Ghent, Belgium, September 10-12, 2014

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Charente Maritime Department to C.L. and by the CPER (Contrat Projet Etat Région). We thanks all the people of the DYFEA team for help during the field campaign.

Annexe 7. Curriculum vitae

LAVERGNE Céline
30 rue du Brave Rondeau
17000 La Rochelle
25 ans
Mail : celine.lavergne@univ-lr.fr

Ecologue Microbienne Marine

Phylogénie et diversité des procaryotes
Ecologie microbienne
Ecologie littorale
Microbiologie

Organisée, dynamique, rigoureuse, sociable

Vulgarisation scientifique
Organisation d'évènements
Gestion de projet, Management

FORMATIONS

Depuis Octobre 2011	**Thèse de Doctorat** (Université de La Rochelle) spécialité Biologie de l'environnement, des populations, écologie - LIENSs UMR 7266 : « *Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais : Influence des facteurs biotiques et abiotiques par une approche multi-échelle*»
	Directrices de thèse : Christine DUPUY (PR) Hélène AGOGUE (CR CNRS)
2011	**Master Sciences pour l'Environnement (SPE)** spécialité Approches intégrées des Ecosystèmes Littoraux (AIEL), mention Très Bien. *Gestion de projets, analyses statistiques, modélisation, océanographie, écologie*
2009	**Licence mention Biologie** spécialité Biologie des Organismes, des Populations et des Ecosystèmes (BOPE), mention Assez-Bien. Participation au projet *« Global Ocean Sampling Expedition »* (Craig Venter)

EXPERIENCES PROFESSIONNELLES

Depuis Octobre 2011 — **Thèse de Doctorat** (Université de La Rochelle) spécialité Biologie de l'environnement, des populations, écologie - LIENSs UMR 7266

- Formations
  - Formation logiciel ARB (Max Planck Institute, Brême, Allemagne)
  - Cytométrie en flux (plateforme imagerie, LIENSs UMR 7266)
  - « Diversité bactérienne et biogéochimie de l'océan » (Laboratoire ARAGO, Banyuls-sur-mer, Université Pierre et Marie-Curie)
  - « Communication orale » (Formation transversale ULR)
  - « Comment évaluer les étudiants à l'Université ? » (CPMEC, ULR)
  - « Les statistiques en environnement » (Formation thématique, Ecole doctorale Gay Lussac)
- Compétences acquises
  - Microbiologie : énumération de procaryotes par cytométrie en flux, mesures d'activités enzymatiques, production bactérienne
  - Physico –chimie : dosages protéines, sucres,
  - Terrain : organisation de sorties terrain, gestion des personnes impliquées
  - Expérimental : montage de dispositif expérimental recréant un écosystème vasière subit à une alternance jour/nuit et marée haute/marée basse
  - Biologie moléculaire : extraction (ADN, ARN), PCR (Polymérase Chain Reaction), RT-PCR (Reverse Transcriptase), PCR quantitative, clonage, pyroséquençage, Fluorescence in situ hybridization (FISH, CARD-FISH)
- Encadrement de
  - Clément Chaigneau (**IUT Industries Alimentaires et Biologiques**, IUT de La Rochelle). « *La production d'exopolymeric substances au sein du biofilm microphytobenthique naturel, une dynamique circadienne ? »*. (3 mois, encadrement : 50%)
  - Trystan Lefevbre (**BTS bio-analyses et contrôles**, Lycée Valin). « *Evaluation d'une proportion d'archées et de bactéries au sein d'un sédiment vaseux »*. (2 mois, encadrement : 100%)
  - Claire Dussud (**M1 SPE** Université de La Rochelle). « *Structure verticale du sédiment de la vasière de Brouage (Charente-Maritime) : influence du biofilm micophytobenthique* ». (2 mois, encadrement : 100 %)
- Implications
  - Membre nommée **au Conseil de L'école Doctorale Gay Lussac** ED 523
  - Membre élu à la **commission de la recherche** (ancien Conseil Scientifique) de l'Université de La Rochelle
  - **Secrétaire d'examen** (Aide aux étudiants en situation de handicap, Université de La Rochelle)

Janvier à Juillet 2011 — **Stage M2 au LIENSs UMR 7266 – projet** ALTANBA

« Diversité bactérienne et impact des cyanobactéries dans les marais de Charente-Maritime»

Encadrement	Valérie DAVID (MCF)	Hélène AGOGUE (CR CNRS)

Mai à Juillet 2010	**Stage M1 non obligatoire au LIENSs UMR 7266 – projet** ALTANBA (ALTération ANthropique de la fonction « épuratoire » des marais littoraux de Charente-Maritime : rôle des cyanobactéries et des BActéries fécales, PRES) *« Mesure de la production primaire globale dans les marais de Charente-Maritime : Appréhension de la biomasse et de la diversité fonctionnelle et spécifique »* Encadrement Valérie DAVID (MCF)
Mars 2007 à Juillet 2009	**Conseillère de Vente OKAIDI** en CDI à temps partiel choisi *Gestion des flux et du compte d'exploitation, Responsable du rayon bébé*

EXPERIENCES ASSOCIATIVES

2013: **Vice-Présidente de l'association ADocs** (Association des Doctorants et Jeunes-chercheurs de La Rochelle)

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

Octobre 2013 : ***Rencontres « Sciences et citoyens »*** organisées par le CNRS au Futuroscope du 18 au 20 Octobre 2013.

Octobre 2013 : ***Fête de La Science*** organisées par l'Université de La Rochelle à la Maison de l'Etudiant.

Octobre 2013 : *Festival de court métrage de vulgarisation scientifique :* 12ème édition du Festival du film [pas trop] scientifique, organisation via avec l'association ADocs.

Mai 2013 : **Colloque des doctorants de 2ème année** à La Rochelle, présentation orale. *L'azote est cher dans la vasière*

Février 2013 : ***Journée Portes Ouvertes de l'UMR LIENSs 7266***, encadrement des visites de LIENSs.

Avril 2012 : ***Marché du littoral***, animation de l'atelier 'De la production photosynthétique au consommateur' avec l'Aquarium La Rochelle.

PUBLICATION SCIENTIFIQUES

Lavergne C., C. Dupuy, M. Hugoni, H. Agogué *Bacterial and archaeal structure coupled to nitrogen-related functional traits highlighted the influence of fine sediment depth stratification in mudflat*. Molecular Ecology (soumis)

Lavergne, C., L. Beaugeard, C. Dupuy, C. Courties, and H. Agogué. 2014. An efficient and rapid method for the enumeration of heterotrophic prokaryotes in coastal sediments by flow cytometry. J. Microbiol. Methods 105: 31-38. (IF: 2.161)

Kientz B., H. Agogué, **C. Lavergne**, P. Marié, E. Rosenfeld (2013). *Isolation and distribution of iridescent Cellulophaga and further iridescent marine bacteria in the Charente Maritime coast, French Atlantic coast*. Systematic and Applied Microbiology 36(4):244-251. (IF : 3.288)

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

- **Présentations orales**

Lavergne C., Hugoni M., Dupuy C., Agogué H. (Septembre 2014) « Active nitrogen-related prokaryotic communities shift in intertidal muddy sediments, a mesocosm study » : 19ème meeting ENC (European Nitrogen Cycle) à Ghent (Belgique).

Lavergne Céline, Hélène Agogué et Christine Dupuy (Octobre 2013) *« Rôle des communautés procaryotes liées au cycle de l'azote dans une vasière intertidale du littoral Atlantique : étude saisonnière et structuration verticale* » : congrès AFEM (Association Francophone d'Ecologie Microbienne) à Clermont-Ferrand (63).

- **Posters**

Lavergne C., Hugoni M., Dupuy C., Agogué H. (Septembre 2014) « Functionnal diversity of nitrogen-related prokaryotic community in an intertidal mudflat » : 19ème meeting ENC (European Nitrogen Cycle) à Ghent (Belgique).

Lavergne Céline (Mai 2013) *Ils sont déjà 10 milliards*. Colloque des doctorants de 2ème année de l'Université de La Rochelle

Lavergne C., Agogué H., Beaugeard L., Dupuy C. (Août 2012*). N-related prokaryotic communities diversity among depth gradient in an Atlantic intertidal mudflat*. "The Power of the Small" ISME14 (International Society of Microbial Ecology) (in Copenhague, Danemark)

Beaugeard L., **Lavergne C.**, Agogué H., Dupuy C. and Courties C. (Juin 2012) *Improvement of Protocols for Counting Prokaryotes from Marine Sediment in Flow Cytometry by Multivariable Optimizations*. XXVII Congress of International Society for Advancement of Cytometry (in Leipzig, Germany)

DIVERS

- Maîtrise des outils informatiques Classiques (Excel, Word, Publisher, PowerPoint), Internet
- Permis B, Permis bateau côtier
- Danse, piscine, escalade, voyages

Annexe 8. Valorisation des compétences acquises au cours de la thèse : NCT®

Valorisation des compétences, NCT®

Céline, Lavergne

Ecole doctorale Gay Lussac (ED 523)
Université de La Rochelle
Mentor : Frédérique Deloffre-Vye

Ecologie des micro-organismes dans une vasière intertidale : quelles implications dans le cycle de l'azote ?

Sujet académique de la thèse : Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais : Influence des facteurs biotiques et abiotiques par une approche multi-échelle

Directrice de thèse : Christine Dupuy, Pr, LIENSs UMR 7266
Encadrante scientifique : Hélène Agogué, CR1, LIENSs UMR 7266
Date probable de la soutenance de thèse : Décembre 2014

Cadre général et enjeux de mes recherches

1.1 Le projet

Le littoral charentais est constitué de ce que l'on appelle une mosaïque d'écosystèmes interconnectés rendant de nombreux services économiques et écologiques notamment. En particulier, les Pertuis Charentais sont le siège de la plus forte production d'huîtres en France et ce service rendu à l'homme est en partie possible par la présence de vasières. A la surface de ces vasières, se développe un biofilm, une couche brune correspondant à l'accumulation d'algues microscopiques (micro-algues). Ces micro-algues servent de base à la chaine alimentaire (réseau trophique) de tout le système des Pertuis Charentais et donc maintient le développement des huîtres dans cette zone. Suite aux avancées scientifiques réalisées grâce à divers projets de recherche, de nouvelles questions apparaissent. Notamment, il a été prouvé que les algues ont besoin de nutriments azotés (contenant de l'azote) pour se développer. La disponibilité de ces nutriments peut être contrôlée par de plus petits organismes, les bactéries et les archées qui, regroupées, forment ce que l'on appelle le domaine des procaryotes.

1.2 Ce projet dans son contexte

Le laboratoire LIENSs (pour Littoral Environnement et Sociétés) est un laboratoire de recherche regroupant des chercheurs de domaines divers tels que la biologie, la géologie, l'histoire, ou la géographie. Les chercheurs de ce laboratoire dont je fais partie ont pour intérêt commun 'le Littoral' et l'étudient sous tous ses aspects dans le but d'intégrer les différentes dimensions que suppose ce système. En effet, impossible d'étudier le fonctionnement écologique d'un système urbanisé sans considérer l'impact des populations humaines ni l'histoire de l'installation de l'Homme sur ce territoire. De même, il apparaît primordial d'étudier les activités humaines au cours des siècles en ayant une connaissance poussée de l'évolution du trait de côte et des conséquences sur le territoire littoral. Dans ce laboratoire, depuis plusieurs années, de nombreux projets ont œuvrés à mieux comprendre le rôle du biofilm dans le système des Pertuis Charentais et plus particulièrement dans un site atelier : la vasière de Brouage. Ces projets représentent un enjeu majeur pour le développement économique de la région. Notamment, le projet VASIREMI porté de 2005 à 2008 par Christine Dupuy a été financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) soulignant l'importance et les enjeux de ce système même au niveau national.

Mon projet de recherche s'intègre donc dans une équipe du laboratoire axée sur le dysfonctionnement des écosystèmes anthropisés (DYFEA) et plus particulièrement à l'axe s'intéressant au fonctionnement trophique des systèmes anthropisés. Au sein de cet axe, mon projet se positionne dans une section traitant des processus microbiens en domaines benthiques et pélagiques et plus particulièrement à la structure du biofilm. Par ailleurs, une partie de mon projet de recherche correspond au projet CAPABIOC (Caractérisation fonctionnelle et rôle des Procaryotes Associés au Biofilm microphytobenthique des vasières intertidales dans les Cycles de l'azote et du carbone) porté par Hélène Agogué qui est un projet EC2CO (Écosphère Continentale et Côtière) financé par le CNRS.

1.3 Moi dans ce contexte

Ce projet a été pensé par Christine Dupuy, ma directrice de thèse et Hélène Agogué, mon encadrante scientifique. Elles ont ensemble, identifié ce point encore inconnu de leur écosystème clé qu'il fallait développer. Suite à l'acceptation par l'Université de faire financer ce projet de thèse par le Conseil Général de Charente Maritime, elles ont cherché un candidat pour mener à bien ce projet. A cette époque, j'étais en stage de Master 2 encadrée notamment par H. Agogué. Les connaissances que j'avais réussi à acquérir pouvaient contribuer à la réalisation de leur projet et celui-ci représentait un challenge pour moi car éloigné de mes domaines de compétences initiales. Embarquée dans le monde de la recherche une année auparavant par Valérie David (EPOC, Bordeaux), l'envie de faire une thèse était devenue évidente, j'avais envie de devenir un jour Docteur et j'avais besoin de me confronter au challenge que représente la réalisation d'une thèse. A la suite de divers processus de sélection, j'ai finalement été retenue pour prendre en charge à leur côté le projet ainsi proposé. J'allais donc m'engager à élucider le rôle de certains micro-organismes (les bactéries et les archées) dans un sédiment vaseux des côtes Charentaises. Plus précisément, chercher à identifier quelles sont leurs implications dans le cycle de l'azote indispensable à la vie au sein de cette vasière. Ceci dans le but de mieux comprendre comment fonctionne ce système qui est à l'origine de la production d'huîtres dans le bassin de Marennes-Oléron.

Déroulement, gestion et coût de mon projet

2.1 Préparation et cadrage du projet

L'ambition du projet repose sur trois points :

1. le caractère écologique du projet qui implique un grand nombre de paramètres à considérer et donc un grand nombre de techniques à maîtriser
2. la nécessité de personnels lors des prélèvements sur le terrain et en laboratoire ce qui implique une logistique rigoureuse
3. le coût élevé des dernières techniques de biologie moléculaire envisagées dans ce projet

Ces points sont à la fois les principaux facteurs de risques qui peuvent amener à un échec du projet mais ils constituent également l'originalité du projet et participent donc à sa réussite. Afin de le mener à bien, plusieurs stratégies ont été envisagées et appliquées. Notamment le recul et l'expérience apportés par le projet VASIREMI a permis de faire des choix quant aux paramètres à considérer pour répondre aux questions scientifiques de la thèse. Par ailleurs, ce projet a permis également de former le personnel technique indispensable aux prélèvements et de créer des contacts avec des collègues et entreprises nécessaires. Par exemple, les prélèvements sur la vasière (à 1 km de la plage) peuvent se faire à pied mais lorsque les prélèvements sont trop rapprochés, il est nécessaire d'utiliser un aéroglisseur (une seule entreprise prestataire en France). L'organisation des sorties terrain demande une logistique importante (en 2012, 20 personnes de 6 laboratoires différents réquisitionnés sur 4 jours sur le site de Brouage avec la nécessité de créer un « laboratoire itinérant» près du point de prélèvement).

Enfin, la thèse ne reposant pas intégralement sur un projet financé, les coûts associés aux méthodes récentes et coûteuses de biologie moléculaire ont nécessité la réduction des échantillons à analyser. Ainsi, au cours du projet, celui-ci a été modifié, réorienté au fur et à mesure des prélèvements et de l'expérience que j'arrivai à acquérir.

2.2 Conduite du projet

Le projet scientifique et ma propre évolution ont été évalués lors de deux comités de thèse à la fin de la première et de la deuxième année. Ces comités surtout organisés pour que les

doctorants mènent à bien des projets de recherche a également permis de recadrer le projet dans son ensemble, ils font partie des étapes clés de la thèse.

Les étapes clés de la thèse

2.2.1 Le premier congrès

J'ai réalisé mon premier congrès scientifique international à la fin de la première année du 19 au 24 août 2012 à Copenhague. Cette semaine de congrès a été très difficile à gérer pour moi : l'envie de rencontrer des gens, l'envie d'apprendre, l'envie de découvrir … Mes encadrantes souhaitaient profiter de cette semaine loin du laboratoire pour communiquer avec moi, échanger, mieux me connaître. Au lieu de cela, j'ai rencontré d'autres collègues, j'ai été peu présente avec elles et cela a créé une situation conflictuelle. J'ai manqué de maturité mais aujourd'hui je suis consciente que cela a été un tournant dans ma thèse car il a fallu retrouver la confiance de mes encadrantes, il a fallu leur prouver qu'elles avaient eu raison de me choisir et que j'allais mener le projet à bien.

2.2.2 Le premier comité de thèse + premier bilan du projet avec les acteurs

Quelques semaines après le congrès à Copenhague été programmé une semaine importante pour moi.

1) deux jours de réunion bilan avec les différents acteurs qui avaient participé à la première campagne de terrain que j'avais en partie organisée

2) la tenue de mon premier comité de thèse

Tout cela a permis de faire un bilan de l'année passée mais également de recadrer mon projet de recherche selon les résultats obtenus. Des jours de prélèvements prévus ont donc été jugés inutiles et supprimés, des techniques d'analyses ont été préférées à d'autres etc…

2.2.3 La fin des prélèvements

Le 15 Mai 2013 a été le dernier jour de prélèvement pour mon projet de recherche. Il ne restait donc « plus qu'à » analyser tous les échantillons récoltés au laboratoire. C'est une étape importante car cela représente un aboutissement. C'est primordial de sentir que l'on avance lorsque l'on voit s'approcher la troisième année. Ainsi cette fin des prélèvements marquait l'étape à laquelle j'allais passer mes journées en laboratoire mais qu'importe car tous les échantillons étaient récoltés !

2.2.4 Le deuxième comité de thèse

Le deuxième comité de thèse a été comme un soulagement pour moi. J'étais anxieuse car le nombre d'échantillons prévu au cours de ma thèse était élevé et je savais que l'analyse des prélèvements durerait tout au long de la troisième année avec peu de temps libre pour la rédaction du manuscrit. J'ai réussi à exprimer cette inquiétude et les membres de mon comité m'ont aidé à faire des choix, à développer une stratégie afin d'obtenir les données nécessaires pour publier dans un premier temps et rédiger ma thèse ensuite.

2.2.5 Les données de pyroséquençage

J'attendais avec impatience c'est données. Il s'agissait des données novatrices qui pourraient me permettre de donner une dimension supplémentaire à ma thèse et auxquelles je tenais particulièrement. L'acquisition de ces données a été surtout limitée par les financements et des problèmes techniques liés à la méthode. Mais mes directrices de thèse ont fait le choix de me faire passer en priorité sur mes collègues et sur leurs propres projets pour me permettre d'obtenir ces données si importantes pour ma thèse.

2.2.6 Le premier papier accepté ?

Cela reste hypothétique mais le jour où mon premier papier sera publié sera certainement une étape clé de la thèse puisqu'il est obligatoire dans notre école doctorale d'avoir un papier publié en premier auteur pour soutenir. Mais aussi parce que cela représente un objectif au cours de la thèse. Pour être reconnu dans le monde de la recherche, publier ses travaux est indispensable et le format du manuscrit de thèse ne permet pas toujours de s'ouvrir à la communauté internationale puisque trop longue et souvent rédigée en français. La publication d'un papier sera primordiale.

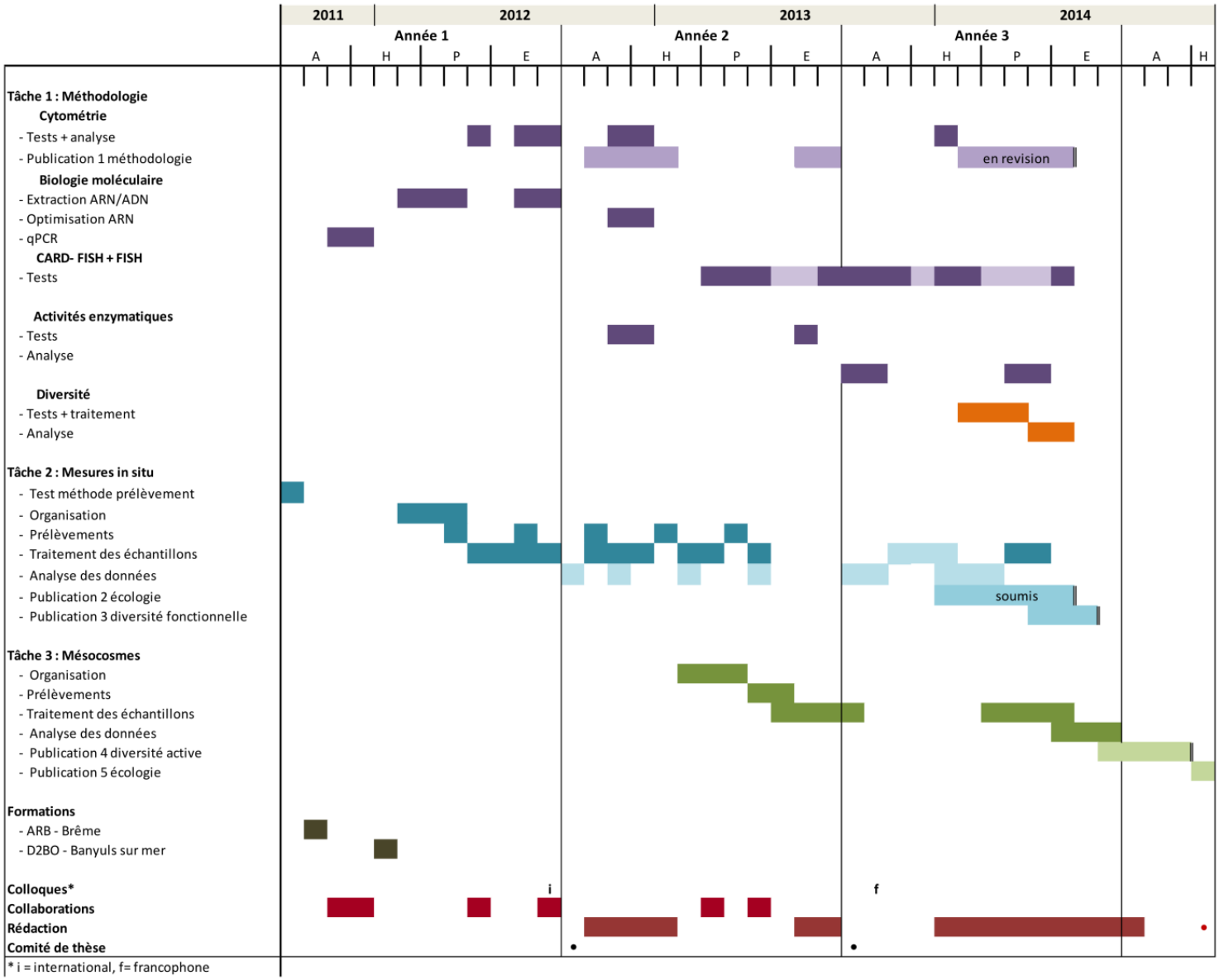


Diagramme des tâches réelles au cours de la thèse (au 23 juin 2014).

2.3 Coût consolidé du projet

Montants en euros TTC

	Nature de la dépense	Détails *		Coûts totaux (euros TTC)			
				Nombre d'unités	Coût unitaire moyen	Quote-part utilisation	Total
1	**Ressources Humaines**	**Salaire brut**	**charges**				
1.1	Doctorant	1684,93	505	36	2190	1	78854,724
1.2	Encadrant 1	4400	1320	36	5720	0,2	41184
1.3	Prime Encadrement	7300		3	7300	0,33	7227
1.4	Encadrant 2	2341	702	36	3043	0,2	21911,76
1.6	Autre personnel (hors sous-traitance)						
	M. Bréret	2398,49	720	2	3118	1	6236,074
	N. Lachaussée	1720,12	516	1	2236	1	2236,156
	P. Pineau	2491,09	747	2	3238	1	6476,834
	L. Beaugeard	2278,1	683	3	2962	1	8884,59
	P. Caillat-Mousse	1488,61	447	0,5	1935	1	967,5965
	Stagiaires	436,05	131	3	567	2	3401,19
1.7	Sous-traitance						
	Sous-total Ressources Humaines						**177 379,92 €**
2	**Consommables**						
2.1	Fournitures expérimentales						
		Terrain		1	3500	1	3500
		Rhizons		1	1800	1	1800
		DET		1	610	1	610
		Mésocosmes		1	2535,82	1	2535,82
		Microbio		1	3000	1	3000
		Cytométrie		500	10	1	5000
		FISH		1	4000	1	4000
		Radioactivité		1	2200	1	2200
		Biologie moléculaire	(voir détails)	1	12512,5	1	12512,5
		Autres	Sels nut 5, chloro 1, particulaire 5, granulo 1	240	12	1	2880
2.2	Fournitures de bureau			1	200	1	200
2.3	Autres achats						
		Pyroséquençage		1	9000	1	9000
	Sous-total Consommables						**47 238,32 €**
3	**Infrastructures**						
3.1	Entretien, gardiennage, secrétariat						
3.2	Loyers des locaux						
3.3	Electricité, eau, chauffage, … (si non inclus dans les charges locatives)						
3.4	Autres						
	Sous-total Infrastructures	4% des charges directes			7 095,20		**7 095,20 €**
4	**Matériel (amortissements)**						
4.1	Matériel d'expérimentation (dont les ordinateurs et logiciels spécialisés)		Microscope epi-fluorescence	1	58593	0,083	4882,8
		(uniquement coût de maintenance)	Spectrophotomètre	3	2000	0,3	1800

			Forfait biomol	3	700	1	2100
			Congélateur	1	384	0,8	307,2
			Sonde oxygène	1	20000	0,2	4000
4.2	Ordinateur de bureau			1	745	1	745
4.3	Logiciels de bureau			1	400	1	400
4.4	Autre						
	Sous-total Matériel						**14 234,95 €**
5	**Déplacements**						
5.1	Missions en France	Transport 50	Hébergement + autres frais 50	2	100	1	200
	Missions terrain	aéroglisseur 1000/jour		6	1100	1	6600
5.2	Missions à l'étranger	Transport	Hébergement + autres frais				
5.3	Congrès en France	Transport 100	Hébergement + autres frais 130	1	230	1	230
5.4	Congrès à l'étranger	Transport 300	Hébergement + autres frais 700	1	1000	1	1000
	Sous-total Déplacements						**8 030,00 €**
6	**Formation**						
6.1	Formations		ARB/SILVA Workshop	1	1500	1	1500
			D2BO Paris VI	1	605	1	605
			formation thématique	1	250	1	250
			formations transv	3	300	0,1	90
			NCT	1	956	0,33	315,48
6.2	Autres frais (Inscription à l'Université, Sécurité Sociale étudiante, etc.)			3	412	1	1236
	Sous-total Formation						**3 996,48 €**
7	**Documentation et communication**						
7.1	Affranchissements, Internet, téléphone			36	20	1	720
7.2	Publicité, communication, impressions	Direct	Sous-traitance agence	3	50	1	150
7.3	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque, etc.)			1	100	1	100
7.4	Autres		comité de thèse	2	400	1	800
			Frais de publication	1	750	1	750
			soutenance de thèse	1	1500	1	1500
	Sous-total Documentation et communication						**4 020,00 €**
8	**Charges financières (intérêts des emprunts)**						
	Sous-total Charges financières						
9	**Charges exceptionnelles**						
	Sous-total Charges exceptionnelles						
10	**TOTAL**						**261 994,87 €**

Compétences, savoir-faire, qualités professionnelles et personnelles

3.1 Savoir

Savoir	Exemple
Scientifique	Phylogénie des procaryotes
	Ecologie des procaryotes
	Fonctionnement du cycle de l'azote
	Fonctionnement vasière
Informatique	R
	ARB/SILVA
	MEGA phylogeny
	Grapher
	Endnote
	Pack office
Linguistique	Anglais (lu, écrit, parlé)

3.2 Savoir-faire

Savoir-faire	Exemple
Gestion de projet	Projet doctoral, Festival du film
Sens du réseau	Se créer un réseau via les congrès scientifiques
Savoir convaincre	Contact presse lors du Festival du film
Communication à l'oral	Congrès, Vulgarisation scientifique
Développemement de protocole	Mise au point de divers protocoles
Management	Encadrement de stagiaires
Programmation et sens de l'organisation	Organisation de toutes les campagnes de terrain. Coordination d'un projet, Festival du film [pas trop] scientifique : coordination de l'équipe
Savoir se former	Formation à des méthodes utilisées en routine
Sens du marketing	Festival du film [pas trop] scientifique : mise en place d'un budget et démarchage
Sens de la vulgarisation	Vulgarisation de mes recherches sous différentes formes et pour différents publics

3.3 Savoir faire-faire

Savoir faire-faire	Exemple
Gestion de groupe, management	20 personnes lors de la première campagne terrain. 15 personnes lors du second projet
Apprendre à déléguer en formant	Formation de stagiaires

3.4 Savoir-être

Savoir-être	Exemple
Dynamique	
Sociable	Intégration dans le laboratoire
Sens de la négociation	Recherche de financement
Enthousiaste	Trouve une motivation pour chaque tâche
Aisance à l'oral	Intégration au sein du laboratoire
Conciliante	Accepter de ne pas faire certaines choses pour conserver de bonnes relations avec les personnes qui nous entourent
Sens du résultat	Beaucoup de données à acquérir
Etre passionné	Mes travaux de recherche
Autonomie	S'approprier son projet de recherche, mener le projet

3.5 Points faibles

Ces compétences et savoir être me poussent à analyser les points faibles qui peuvent en découler et que la thèse m'a fait réaliser ou que la thèse m'a poussé à acquérir et ce qui n'est toujours pas acquis : Manque de créativité, ne pas savoir dire non, ne pas savoir gérer son temps, naïveté, manque de transparence parfois.

Résultats, impacts de mes recherches

Les résultats de mon projet de recherche devraient apporter de la visibilité sur le thème de l'écologie des vasières pour le laboratoire. Mon projet devrait se concrétiser par le manuscrit de thèse, au moins 4 publications ainsi qu'une communication orale à un congrès international. Ceci apporte ainsi également une preuve d'expertise dans le domaine pour mon équipe ainsi que pour mes directrices de thèse. Par ailleurs, les publications sont importantes pour l'évaluation AERES du laboratoire et pour les carrières de mes directrices. De même, l'encadrement de doctorants me paraît valorisant pour mes directrices puisque c'est à mon sens toujours une expérience riche scientifiquement et humainement. Ensuite, j'ai développé des protocoles d'analyse pendant ma thèse qui pourront être utilisés par la suite par les collègues de mon équipe ainsi que d'autres collègues avec qui nous avons l'occasion de collaborer. Enfin, cela va apporter une base de données riche, utile pour de nombreuses études de comparaison avec d'autres systèmes pour toute la communauté scientifique concernée.

D'un point de vue personnel, la thèse m'a fait grandir. Je dirai que ce sont surtout grâce aux rencontres que l'on fait qui sont toujours enrichissantes car l'on a toujours quelque chose à apprendre de quelqu'un. J'ai fait de nombreuses rencontres pendant ma thèse et beaucoup ont influencé celle que je suis devenue. J'aurai aimé peut-être échanger avec plus de personnes mais j'ai dû faire des choix parce qu'on me l'a imposé et par manque d'audace. J'ai été aidée et soutenue pendant cette thèse mais lorsque l'on fait une thèse avec un grand nombre de données à acquérir en laboratoire, on passe un grand nombre d'heures seule et cela forge un caractère à mon sens. Je me sens à présent presque maître de mon sujet. J'ai acquis un savoir-faire sur de nombreuses techniques d'analyses, j'ai progressé humainement, j'ai changé.

Pistes professionnelles

5.1 Responsable communication scientifique (Roche, Clarens, Chanel …)

Le responsable communication scientifique coordonne une équipe et mène la politique de communication de l'entreprise. Il est question de communiquer en interne et en externe (potentiels acheteurs, médias, …) les dernières avancées technologiques ainsi que les politiques scientifiques d'une entreprise afin d'augmenter sa visibilité et sa crédibilité sur le marché. Un responsable communication scientifique doit pouvoir allier compétences techniques et communication efficace et attrayante.

J'ai des compétences en vente et en négociation qui pourront être un point fort combiné à mes connaissances scientifiques. Ce poste satisferait mon besoin de travailler et d'évoluer au quotidien en équipe. Par ailleurs, il me permettrait de plus communiquer de mettre en avant des produits et cela représenterait un bon challenge pour moi que d'essayer de promouvoir des produits avec un lien avec la science. C'est un poste qui me paraît très valorisant et bien placé. C'est un milieu encore inconnu pour moi et j'ai donc du mal à savoir à quelles pressions je vais être soumises.

Mon mentor connaît ce milieu et pourrait donc m'apporter de solides pistes pour obtenir un entretien. De mon côté, j'ai cru voir que beaucoup d'entreprises cherchent des responsables communication scientifique ('Roche' notamment).

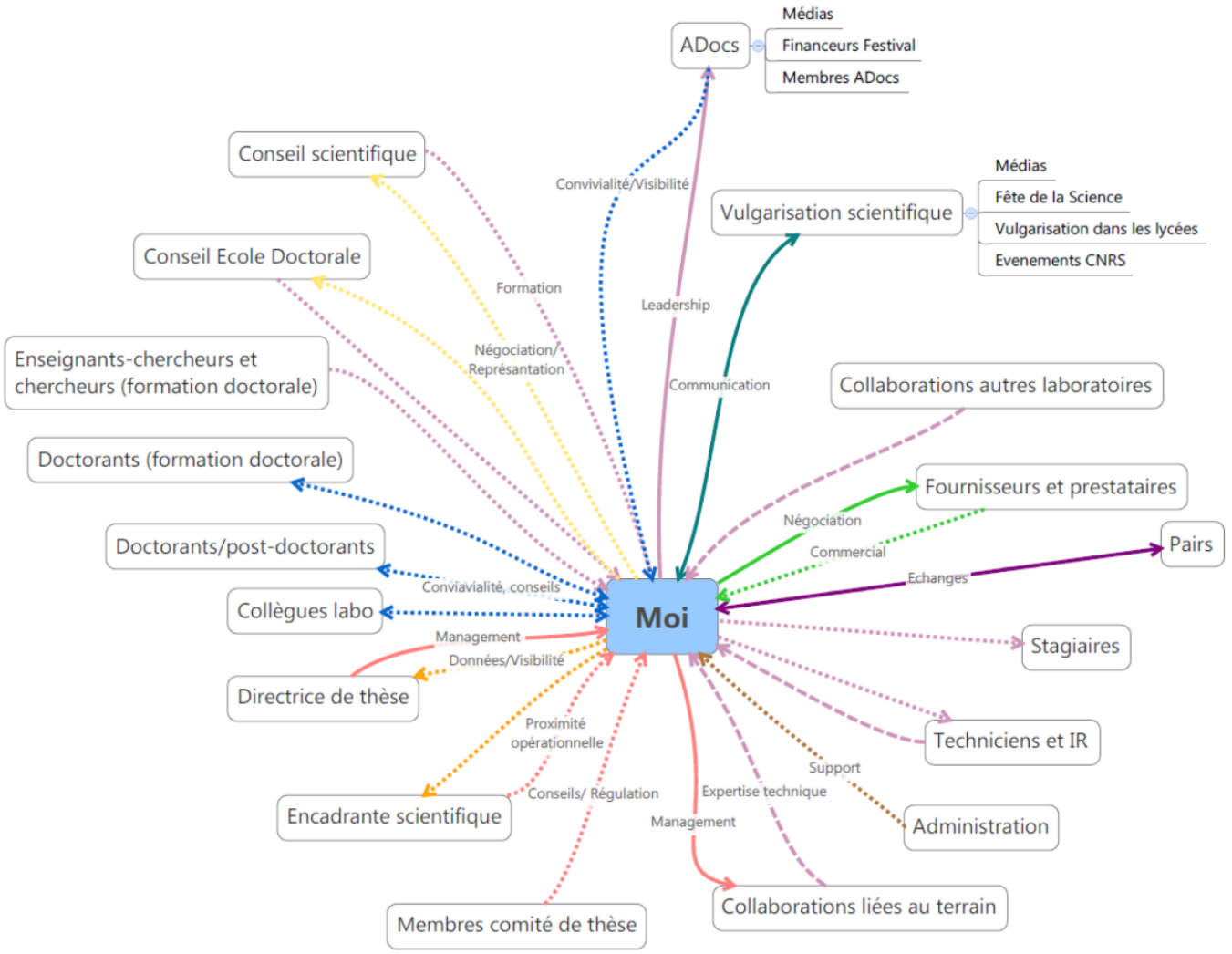
5.2 Chargé de mission en environnement dans un bureau d'étude

Il s'agit pour ce poste de concevoir et monter un projet dans le but de mettre en œuvre une politique environnementale émanant de l'Etat. Afin de monter ce projet, le chargé de mission environnementale doit réaliser les analyses techniques et les enquêtes sur le terrain. Enfin, il est chargé de promouvoir le projet auprès des différents acteurs afin de le faire adopter. Pour ce poste, il faut faire preuve de diplomatie, avoir le sens du relationnel et savoir convaincre.

J'ai l'expérience de l'établissement d'un protocole de terrain et des qualités relationnelles qui peuvent être utiles à ce poste. Ce poste semble très intéressant et permet d'allier terrain et promotion d'un projet mais le travail en équipe n'est peut-être pas toujours privilégié et les évolutions de carrière me semblent limitées.

Dans la région, j'ai des contacts au sein de l'Unima ainsi que du bureau d'études Créocéan qui peuvent être utilisées pour obtenir un entretien.

Annexe 2. Carte des relations au cours de la thèse



Annexe 9. Mesure de la teneur en eau et de la masse volumique du sédiment

1. Matériel

Pots de 100 mL
Seringue coupée ras
Balance de précision
Etuve à 60°C

2. Marche à suivre

- Etiqueter les pots et les peser
- Déposer un volume connu (ex : 50 mL) de sédiment dans le pot préalablement pesé.
- Une fois au laboratoire, peser le pot avec la même balance.
- Sécher le sédiment à l'étuve à 60°C, couvercles ouverts pendant 48h (minimum).
- Peser le pot avec le sédiment sec avec la même balance.

3. Calculs

$$masse\ volumique\ (g\ mL^{-1}) = {}^{m_h}/_{V_i}$$

$$teneur\ en\ eau\ (\%) = {}^{m_h - m_s}/_{m_h}$$

Avec : m_h = Matière humide en g
m_s = Matière sèche en g
V_i = Volume initial de sédiment en mL

Annexe 10. Dosage de la chlorophylle *a* dans les sédiments

1. Matériel

HCl à 0,33 N
Seringue coupée 5 mL
Acétone 90%
Distributeur pour acétone
Pot de 40 mL
Tubes en verre de 10 mL
Tube pour fluorimètre
Pipette automatique de 100 µL

Centrifugeuse
Agitateur tournant
Mortier et pilon
Lyophilisateur
Réfrigérateur 4°C
Congélateur -20°C

2. Marche à suivre

- Prélever 10 mL de sédiment et congeler à -20 °C
- Lyophiliser le sédiment et ensuite broyer le sédiment à l'aide d'un mortier, conserver à -20 °C
- Disposer 50 mg de sédiment lyophilisé et broyé dans un tube en verre de 10 mL.
- Ajouter 8 mL d'acétone 90%
- Placer les tubes bien fermés au minimum 8 heures (idéal, la nuit : stable 24h) sur agitateur par retournement (40 oscillations par minute) à 4°C au noir.
- Centrifuger les tubes 10 min à 3 500 g à 8°C
- Transvaser doucement l'acétone dans des tubes passant dans le fluorimètre. Lire l'absorption [excitation : 430-450 nm ; émission : 650-675 nm]
- Acidifier avec de l'acide chlorhydrique (HCl) 0,33N à raison de 10µL par ml d'acétone
- Relire l'absorption au fluorimètre après quelques minutes.

3. Calculs

$$Chlorophylle\ a\ [\mu g\ g^{-1}PS] = \frac{(F - F_a) * v}{(K - K_a) * m}$$

et

$$Phéopigments\ [\mu g.g^{-1}PS] = \frac{(K * F_a - K_a * F) * v}{\left(K_a * (K - K_a)\right) * m}$$

Avec : F et F_a : valeur de la fluorescence avant et après acidification
K et K_a : coefficient calculé lors de l'étalonnage du fluorimètre avant et après acidification
v : volume d'acétone en mL
m : masse de sédiment pesé en g

Annexe 11. Mesure du pH et de la salinité de l'eau interstitielle

1. Matériel

Pot à centrifugation de 300 mL (Nalgène, Thermo Fischer scientific, Waltham, MA, États-Unis)
Spatule
Becher
Centrifugeuse
Sonde pH (Eutech Instruments PC150, Etats-Unis)
Sonde salinité (Cond 3110, TetraCon 325, WTW, Weilheim, Allemagne)

2. Marche à suivre

- Remplir un pot à centrifuger (300 mL) avec du sédiment (ex : 150 mL). Conserver au froid
- Une fois au laboratoire, centrifuger le pot 10 min à 3 500 g à 8°C
- Transvaser doucement l'eau surnageante (eau interstitielle) dans un bécher
- A l'aide d'un pHmètre, mesurer le pH et mesurer la salinité à l'aide d'une sonde WTW.

Annexe 12. Mesure des quantités de carbone et d'azote organique particulaire dans les sédiments

Ces analyses ont été réalisées par le service commun d'analyses du LEMAR (UMR 6539) à Brest (France).

3. Matériel (succint)

Capsule en argent
Microplaque
Blance
Lyophilisateur
Mortier
Pillon
Analyseur élémentaire CHN (Thermo Fischer Flash EA 1112, Waltham, MA, Etats-Unis)

4. Marche à suivre

- le sédiment lyophilisé est pesé dans des capsules en argent puis disposés dans des microplaques de façon espacée de manière à éviter toute contamination inter-échantillon
- Dans chaque capsule, on ajoute 50 µL d'HCl 10%, puis les microplaques sont placées à l'étuve à 60°C pendant une heure
- Cette étape est répétée 2 fois au minimum (au dernier ajout d'HCl, il ne doit plus y avoir de bulles qui se forment)
- Les microplaques sont ensuite laissées une nuit à l'étuve pour éliminer l'acide
- Le lendemain, les capsules sont fermées. Elles peuvent alors être analysées. Les blancs sont faits avec des capsules d'argent vides qui subissent exactement le même traitement que les échantillons.

Les échantillons sont analysés avec un analyseur élémentaire CHN (Thermo Fischer Flash EA 1112, Waltham, MA, Etats-Unis) par combustion/oxydation, réduction et détection après séparation chromatographique.

Annexe 13. Dosage ses sels nutritifs par système en flux continu (SFA=Segmented Flow Analysis)

D'après Aminot A, Kérouel R (2007). Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu. Ifremer.

1. Dosage colorimétrique du nitrite

a) Principe

La méthode repose sur la réaction de Griess adaptée à l'eau de mer : le composé coloré final (rose) est obtenu par réaction du nitrite tout d'abord avec la sulfanilamide, puis avec le N-naphtyl-éthylènediamine (NED) en milieu acide (pH>2).

b) Réactifs et solutions étalons

** Réactif R1 : solution de sulfanilamide*

- Diluer 50 mL d'acide chlorhydrique fumant (37%) dans 500 mL d'eau déminéralisée
- Ajouter et dissoudre 5 g de sulfanilamide ($C_6H_8N_20_2S$; M=172 g mol^{-1})
- Compléter à 1L et homogénéiser

Conservée à l'abri de la lumière, cette solution est stable plusieurs mois à température ambiante.

Réactif R1 de travail : ajouter le Brij 35 à 30% (agent mouillant) dans la solution précédente à raison de 400µL par litre (conserver ce réactif R1 un mois maximum à 4°C)

** Réactif R2 : solution de N-naphtyl-éthylènediamine (NED)*

- Dissoudre 0,25 g de NED ($C_{12}H_{14}N_2$, 2HCl ; M=259 g mol^{-1}) dans 1 L d'eau déminéralisée

Conserver R2 au froid et à l'abri de la lumière. Renouveler ce réactif tous les mois ou s'il prend une coloration brune.

** Solution étalon concentrée de nitrite à 5 000 µmol L^{-1}*

- Sécher du nitrite de sodium (105°C, une heure) ; le laisser refroidir au dessiccateur
- Peser 0,345 g de nitrite de sodium anhydre ($NaNO_2$; M=69 g mol^{-1}, pureté 100%) pour 1 L de solution préparée en fiole jaugée avec de l'eau déminéralisée. S'assurer que le sel est totalement dissous, bien homogénéiser la solution puis la transférer dans un flacon en verre ou en plastique : 1 mL contient 5 µmol de nitrite

Conserver cette solution à TA, à l'abri de la lumière et la renouveler tous les mois. Ne pas ajouter d'acide ni de sel mercurique.

** Solution étalon diluée de nitrite à 500 µmol L^{-1}*

Diluer 10 fois la solution étalon concentrée pour obtenir la solution étalon diluée : 1 mL contient 0,5 µmol de nitrite

Conserver cette solution à TA, à l'abri de la lumière, renouveler la solution chaque semaine.

c) Mode opératoire

Préparation des étalons de travail

Préparer une gamme étalon, correspondant aux concentrations usuelles, par dilution de la gamme étalon à 500 µmol L^{-1} dans de l'eau déminéralisée.

Pour réaliser la gamme de concentrations 0,1-0,2-0,3-0,5 µmol L^{-1} en fioles jaugées de 500 ml, il faut 100-200-300-500 µL de solution étalon à 500 µmol L^{-1}. Compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Préparation des échantillons
Cf §F-
Le maintien des échantillons légèrement frais (10-15°C) aussi longtemps que possible avant l'analyse réduit les risques d'altération des concentrations de nitrites par l'activité biologique.

2. Dosage colorimétrique du nitrate

a) Principe
Faute de méthode colorimétrique directe satisfaisante pour toute gamme de salinités marines, le nitrate est dosé après réduction quantitative en nitrite. La réduction est effectuée en milieu hétérogène par contact avec du cadmium « amalgamé » au cuivre. Cette réduction sur colonne de cadmium-cuivre, est simplifiée par l'automatisation mais reste une étape critique. Le nitrite ainsi formé est dosé selon la méthode colorimétrique.

Remarque : La présence de nitrite dans l'échantillon constitue une interférence puisque ce nitrite s'ajoute au nitrite issu de la réduction du nitrate. La méthode dose donc en réalité, la somme nitrate et nitrite. Pour obtenir la concentration en nitrate seul, il faut corriger le résultat du précédent dosage (cf § C) en mesurant séparément le nitrite et en les soustrayant.

b) Préparation et maintenance de la colonne réductrice
(cf Aminot & Kérouel, 2007)

c) Réactifs et solutions étalons
** Réactif de réaction sur colonne RC1 : solution de chlorure d'ammonium*
- Dissoudre 11 g (0,206 mol) de chlorure d'ammonium anhydre (NH_4CL ; M=53,5 g mol^{-1}) dans de l'eau déminéralisée et compléter à 1 litre (cette solution se conserve indéfiniment à TA)

** Réactif de réaction sur colonne RC2 : solution d'hydroxyde de sodium*
- Dissoudre 9 g (0,225 mol) de soude (NaOH ; M = 40 g mol^{-1}) dans de l'eau déminéralisée et compléter à un litre (cette solution se conserve indéfiniment en flacon en plastique à TA)

** Réactifs R1 et R2 pour le dosage du nitrite formé et solution étalon à 5 000 µmol L^{-1}*
Cf § C 2)

** Solution étalon de nitrate à 5 000 µmol L^{-1}*
- Sécher du nitrate de potassium anhydre pur (KNO_3 ; M=101,11 g mol^{-1}) à 105°C pendant une heure et le laisser refroidir au dessiccateur.
- Dissoudre 0,5056 g de nitrate de potassium pour 1 L de solution préparée en fiole jaugée, avec de l'eau déminéralisée : 1 mL contient 5 µmol de nitrate
Conservée en flacon en verre ou de plastique, cette solution est stable au moins un an à TA et à l'abri de la lumière, sous réserve d'éviter l'évaporation.

d) Mode opératoire

Préparation des étalons de travail
Etalon de nitrite :
Préparer un étalon de nitrite à 10 µmol L^{-1} : en fiole jaugée de 500 mL, diluer au volume 1 000 µL de solution à 5 000 µmol L^{-1} de nitrite. Utiliser le même milieu que celui servant à préparer es étalons de nitrate, dans notre cas, de l'eau déminéralisée.

Etalon de nitrate
Préparer une gamme étalon correspondant aux concentrations usuelles en diluant la solution à 5 000µmol L^{-1} dans de l'eau déminéralisée. Pour réaliser la gamme de concentrations 1-2-3-5-µmol L^{-1} en fioles jaugées de 500 ml il faut 100-200-300-500 µL de l'étalon à 5 000 µmol L^{-1}. Compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Préparation des échantillons
Cf §F- et particularités relatives à la colonne réductrice

3. Dosage fluorimétrique de l'ammonium

a) Principe
La méthode repose sur la réaction de l'ammonium avec l'orthophtaldialdéhyde (OPA) en présence d'un réducteur soufré en milieu légèrement basique. Cette réaction utilise un tampon borate.

b) Réactifs et solutions étalons
** Solution stock de borate*
- Dissoudre 30 g de tétraborate de sodium décahydraté ($Na_2B_4O_7$ $10H_2O$; M=381,4 g mol^{-1}) dans 900 mL d'eau déminéralisée et compléter à 1 L. La solution se conserve à TA plusieurs mois.

** Solution stock d'OPA dans l'éthanol*
-Dissoudre 5 g d'OPA (orthophtaldialdéhyde ; C8H6O2 ; M=134,1 g mol^{-1}) dans 125 ml d'éthanol (éthanol absolu de grande pureté). La dissolution complète peut prendre plusieurs minutes : agiter de temps en temps. La solution se conserve à l'abri de la lumière plus d'un an dans un flacon de verre hermétiquement bouché.

**Solution stock de sulfite*
- Dissoudre 200 mg de sulfite de sodium (Na_2SO_3 ; M=126 g mol^{-1}) dans 25 ml d'eau déminéralisée.
Cette solution, en flacon hermétiquement bouché, peut se conserver au moins une semaine à TA. Cependant il est préférable de la préparer le jour de la fabrication du réactif de travail (risque d'oxydation du sulfite par l'oxygène de l'air).

**Réactif de dosage R1 (utiliser un flacon opaque de 1 L)*
- Rincer le flacon à l'eau déminéralisée
- Y introduire 1 L de solution stock de borate
- Ajouter 20 mL de solution stock d'OPA et homogénéiser
- Ajouter 2 mL de solution stock de sulfite et homogénéiser

- Ajouter 500 µL de Brij 35 (à 30% agent mouillant) et homogénéiser
En flacon hermétiquement bouché, ce réactif se conserve à TA au mois un mois.

** Solution étalon concentrée d'ammonium à 10 000 µmol L^{-1}*
-Sécher du sulfate d'ammonium ($(NH_4)_2SO_4$; M=132,14 g/mol, pureté garantie) pendant 1 h à 105°C et le laisser refroidir au dessiccateur.
- Peser 660,7 mg de sulfate d'ammonium pour 1 L de solution préparée en fiole jaugée avec de l'eau déminéralisée fraichement soutirée. Transférer dans un flacon en verre ou en plastique : 1 mL contient 10 µmol d'ammonium
Cette solution est très stable à TA, sous réserve d'éviter l'évaporation. La renouveler de préférence annuellement.

** Solution étalon diluée d'ammonium à 1 000 µmol* L^{-1}
Diluer 10 fois la solution étalon concentrée avec de l'eau déminéralisée fraichement soutirée pour obtenir la solution étalon diluée : 1 mL contient 1 µmol d'ammonium
Cette solution peut se conserver pendant un an à TA, à l'abri de la lumière, sous réserve d'éviter l'évaporation.

c) Mode opératoire
Préparation des étalons de travail
Préparer une gamme étalon correspondant aux concentrations usuelles en diluant la solution à 1 000 µmol L^{-1} de préférence dans de l'eau déminéralisée. Pour réaliser la gamme de concentrations 2,5-5-10-15 µmol L^{-1} en fioles jaugées de 500 ml il faut 1 250-2 500-5 000-7 500 µL de l'étalon à 1 000 µmol L^{-1}. Compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Préparation des échantillons
Cf §F-
Le maintien des échantillons légèrement frais (10-15°C) aussi longtemps que possible avant l'analyse réduit les risques d'altération des concentrations d'ammonium par l'activité biologique.

4. Dosage colorimétrique du phosphate

a) Principe
La méthode repose sur la réaction du phosphate avec la molybdate, en présence d'antimoine, pour former le complexe phosphomolybdique, qui est ensuite réduit pas l'acide ascorbique en un composé bleu. La réaction se déroule en milieu acide (pH ~0,8).

b) Réactifs et solutions étalons
**Solution stock d'acide sulfurique (utilisable aussi pour le dosage des silicates)*
- Pour un litre de solution, ajouter lentement, en agitant constamment, 85 mL d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4 concentré, 1,84 kg L^{-1} ; M=98 g mol^{-1} ; 18 mol L^{-1}) dans environ 800 m d'eau déminéralisée et compléter à 1 L après refroidissement (utiliser un flacon en Pyrex).
Cette solution se conserve indéfiniment, on peut en préparer plusieurs litres.

**Solution stock de molybdate d'ammonium (utilisable aussi pour le dosage des silicates)*

- Dissoudre 40 g d'heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}$, $4H_20$; M=1236 g mol^{-1}) dans environ 800 ml d'eau déminéramlisée (utiliser un flacon en plastique), puis compléter à 1 L.
Cette solution se conserve plusieurs semaines à TA à l'abri de la lumière.

**Solution stock d'oxytartrate d'antimoine*
-Dissoudre 1,5 g d'oxytartrate potassique d'antimoine (III) hémihydraté ($K(SbO)C_4H_6O_6$, $1/2H_2O$; M=334 g mol^{-1}) dans 500 ml d'eau déminéralisée.
Conserver au réfrigérateur, cette solution est stable 1 à 2 mois.

**Réactif R1 : solution d'acide ascorbique*
- Dissoudre 2 g d'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$; M= 176 g mol^{-1}) dans 500 mL d'eau déminéralisée.
-Ajouter 0,5 mL d'agent mouillant Aérosol 22 (Sigma A-9753)
Ce réactif doit être renouvelé chaque jour.

** Réactif R2 : solution acide au molybdène et à l'antimoine*
- Dans un flacon en verre brun, introduire 800 mL de solution stock d'acide sulfurique
- Ajouter 150 mL de solution stock de molybdate et mélanger
- Ajouter 50 mL de solution stock d'oxytartrate d'antimoine et mélanger
Ce réactif se conserve environ 1 mois au réfrigérateur

** Solution étalon de phosphate à 5 000 µmol L^{-1}*
- Sécher du dihydrogénophosphate de potassium anhydre (KH_2PO_4 ; M=136,09 g mol^{-1}, pureté garantie) à 105°C pendant une heure et le laisser refroidir au dessiccateur.
- Peser 680,5 mg pour 1 L de solution préparée en fiole jaugée avec de l'eau déminéralisée.
- Transférer la solution dans un flacon en verre ou en plastique : 1 mL contient 5 µmol de phosphate.

** Solution étalon diluée de phosphate à 500 µmol* L^{-1}
Diluer 10 fois la solution étalon concentrée avec de l'eau déminéralisée pour obtenir la solution étalon diluée : 1 mL contient 0,5 µmol de phosphate.
Cette solution peut se conserver pendant plus un an à TA, à l'abri de la lumière, sous réserve d'éviter l'évaporation.

c) Mode opératoire
Préparation des étalons de travail
Préparer une gamme étalon correspondant aux concentrations usuelles en diluant la solution à 500 µmol L^{-1} dans de l'eau déminéralisée. Pour réaliser la gamme de concentrations 0,25-0,5-0,75-1 µmol L^{-1} en fioles jaugées de 500 ml il faut 250-500-750-1 000 µL de l'étalon à 500 µmol L^{-1}. Compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Remarque : La gamme étalon ci-dessus a été valable pour la plupart des échantillons (in situ et mésocosmes. Cependant une gamme étalon différente a été utilisée pour les échantillons d'automne du suivi in situ (P3, P4 et P5) : gamme de concentrations 5-10-15-20 µmol L^{-1}.

Préparation des échantillons
Cf §F-
Le maintien des échantillons légèrement frais (10-15°C) aussi longtemps que possible avant l'analyse réduit les risques d'altération des concentrations d'ammonium par l'activité

biologique. L'attention est attirée sur l'importance de centrifuger ou de filtrer les échantillons afin d'éliminer l'interférence due à la réaction du phosphate du matériel particulaire (minéral ou organique) même en très faible concentration.

5. Dosage colorimétrique des silicates

a) Principe

La méthode repose sur la réaction du silicate avec le molybdate en milieu acide (pH~1,5) pour former le complexe β-silicomolybdique, ce dernier étant ensuite réduit par l'acide ascorbique en un composé bleu. Le phosphate réagit également mais le composé phosphomolybdique formé est détruit pas l'acide oxalique avant l'étape de réduction.

b) Réactifs et solutions étalons

**Solution stock d'acide sulfurique (utilisée pour les phosphates, cf §F 2))*

**Solution stock de molybdate d'ammonium (utilisée pour les phosphates, cf §F 2))*

**Réactif R1 : solution d'acide de molybdtate*

-Introduire dans un flacon en plastique, 12 mL de solution stock d'acide sulfurique

-Ajouter 120 mL de solution de molybdate d'ammonium et compléter à 500 mL avec de l'eau pure

Ce réactif qui a tendance à précipiter lentement, doit être préparé chaque jour.

** Réactif R2 : solution acide oxalique et sulfurique*

-Introduire 800mL d'eau pure dans un flacon en Pyrex ou en Téflon et ajouter lentement, avec précautions, 100 mL d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4 concentré, 1,84 kg L^{-1} ; M=98 g/mol ; 18 mol L^{-1}) puis mélanger.

-Ajouter 30 g d'acide oxalique dihydraté ($(COOH)_2$, $2H_2O$; M=126,1 g mol^{-1}), dissoudre, compléter à un litre et homogénéiser.

Transvaser le réactif en flacon en plastique, il se conserve environ un mois à TA.

**Réactif R3 : solution d'acide ascorbique*

- Dissoudre 7,5 g d'acide ascorbique ($C_6H_8O_6$; M=176 g mol^{-1}) dans 250 ml d'eau pure

-Ajouter 0,5 mL d'agent mouillant Aérosol 22 (Sigma A-9753)

Ce réactif doit être renouvelé chaque jour.

** Solution étalon de silicate à 5 000 µmol L^{-1}*

- Sécher du hexafluorosilicate de sodium anhydre (Na_2SiF_6 ; M=188,06 g mol^{-1}, pureté garantie, en poudre fine) à 105°C pendant une heure et le laisser refroidir au dessiccateur.
- Peser 0,9403g d'hexafluorosilicate et les entrainer dans un bécher en plastique, contenant un barreau aimanté, avec un peu d'eau pure.
- Ajouter environ 800 mL d'eau pure (température 20±1°C) ; en cas de présence d'agrégats, les écraser pour faciliter la dissolution.
- Placer sous agitation magnétique jusqu'à dissolution complète, ce qui peut prendre plusieurs heures.
- Transférer dans une fiole jaugée en plastique de 1 L en rinçant plusieurs fois le bécher, ajuster au volume et homogénéiser
- Transvaser dans un flacon en plastique bien hermétique.

Cette solution se conserve plusieurs années à TA et à l'abri de la lumière, sous réserve d'éviter l'évaporation.
1ml contient 5 µmol de silicate

c) Mode opératoire
Préparation des étalons de travail
Préparer une gamme étalon correspondant aux concentrations usuelles en diluant la solution à 5 000 µmol L^{-1} dans de l'eau déminéralisée. Pour réaliser la gamme de concentrations 5-10-15-20-25 µmol L^{-1} en fioles jaugées en plastique de 500 ml il faut 500-1 000-1 500-2 000-2 500 µl de l'étalon à 500 µmol L^{-1}. Compléter au volume avec de l'eau déminéralisée.

Préparation des échantillons
Cf §F-

6. Préparations des échantillons pour l'analyse

Si les échantillons ont été congelés, les décongeler en respectant des règles : avant l'analyse ou le prélèvement d'une partie aliquote, tout échantillon doit être intégralement décongelé, parfaitement homogénéisé et exempt de particules susceptibles d'interférer.
En résumé :
- toujours maintenir les flacons debout et fermement bouchés pendant la décongélation;
- éviter toute surchauffe des échantillons; pour cela, plusieurs méthodes peuvent s'appliquer : soit les laisser décongeler à température ambiante, soit les mettre au réfrigérateur la veille de l'analyse, puis, le lendemain, les placer à température ambiante, protégés de la lumière, soit utiliser un four à micro-ondes (à très faible puissance);
- agiter régulièrement les flacons pour homogénéiser les échantillons et accélérer la fonte du résidu de glace; la manipulation des flacons, humides de condensation, se fera toujours avec des gants (à cette occasion, il est conseillé de les essuyer avec du papier absorbant);
- une fois la glace totalement fondue, homogénéiser parfaitement les échantillons;
- maintenir les échantillons au frais, protégés de la lumière, jusqu'à l'analyse;
- si les échantillons contiennent des particules, on peut les laisser décanter, mais il est conseillé de les centrifuger (appareil réfrigéré). On centrifugera de préférence directement les flacons contenant les échantillons, ceci afin d'éviter tout transvasement inutile, source de contamination;
- après centrifugation, les flacons peuvent être placés tels quels sur l'échantillonneur mais, si une aliquote doit être transvasée, prendre garde de ne pas entraîner de particules.
Dans le cas où des échantillons pour le dosage du silicate auraient été décongelés (déconseillé), il faut les laisser revenir à température ambiante pendant un certain temps avant l'analyse afin d'accélérer la dépolymérisation. Attendre au moins une heure si les échantillons sont strictement marins (S>33), de préférence 24h aux salinités 20-30 (aux plus basses salinités la dépolymérisation est rarement complète, quel que soit la durée).

Dans le cas de nos analyses, nos échantillons ont été généralement dilués dans de l'eau déminéralisée au 1/20 (entre 1/10 et 1/50). Dans certains cas « extrêmes » notamment pour les silicates où peu de volume d'échantillon était disponible, des dilutions jusqu'au 1/200 ont été effectuées.

7. Analyse d'une série d'échantillons

Préparer les étalons de travail de la série analytique
Commencer l'analyse des étalons et des échantillons. Si l'analyse est informatisée, prévoir l'échantillon de démarrage « primer », suivi, de préférence, par un « zéro » constitué d'eau déminéralisée. Analyser si possible les échantillons par concentrations croissantes.
Inclure dans la série analytique :
- en début de série : plusieurs étalons de concentrations différentes couvrant la gamme attendue
- à intervalles réguliers : un étalon de milieu de gamme et le blanc correspondant (ou un matériau de référence) pour le contrôle de la stabilité
- à intervalles réguliers : un « échantillon » de référence de concentrations zéro (généralement eau déminéralisée, fraichement soutirée)
- à intervalles réguliers dans le cas où il n'y a pas de retour à la ligne de base entre les pics : un arrêt de prélèvement d'eau de lavage
- en fin de série : un ou des étalon(s) fraichement préparé(s)

Annexe 14. Préparation des échantillons pour analyse de granulométrie

1. Matériel

Eau distillée
Hexametaphosphate de sodium (HMP) à 1g L^{-1}
Eau oxygénée diluée 1/10^{e}
Seringue coupée 5 mL
Falcon 15 mL (1/ech)
Falcon 50 ml (1/ech)
Pot 100 ml (1/ech)
Becher (1/ech)
Tige en verre
Mortier et pilon
Pinceau ou pince
Centrifugeuse
Etuve à 60 °C
Balance
Plaque chauffante

2. Prélèvement

Prélever 10 mL de sédiment dans un Falcon 15 mL. Conserver à température ambiante.

3. Marche à suivre

- Transférer l'échantillon en homogénéisant dans un Falcon 50 mL
- Elimination des sels
    - Réaliser trois rinçages à l'eau distillée (3500 g pendant 5 minutes) en homogénéisant à chaque ajout d'eau
    - Une fois les rinçages terminés, homogénéiser et laisser sécher 48h environ à 40-60°C dans une étuve
- Elimination de la matière organique :
    - Dans un mortier, bien détacher tous les grains en effritant un peu avec un pinceau ou une pince (sans broyer !)
    - Peser 2 g de sédiment sec dans un bécher et ajouter 60 mL d'eau oxygénée diluée au 1/10^{e}
    - Faire frémir (à 60°C environ) le tout sans faire déborder sur une plaque chauffante en remuant de temps en temps avec une tige en verre. Il faut que le liquide soit évaporé
- Ajouter un tout petit peu d'eau et transférer dans un pot (100 mL). Le sédiment peut être conservé à température ambiante
- Recouvrir d'hexametaphosphate de sodium, homogénéiser en remuant
- Analyser les échantillons par mesure laser grâce à un Mastersizer2000 (Malvern Instruments Ltd, Works, R.U.)
- Grâce au logiciel Gradistat (Blott and Pye 2001) les données peuvent être analysées simplement. La taille moyenne du grain est calculée en µm par la méthode Folk and Ward (1957).

Blott, S. J., and K. Pye. 2001. GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. Earth Surf. Proc. Land. **26:** 1237-1248.

Folk, R. L., and W. C. Ward. 1957. Brazos River bar (Texas); a study in the significance of grain size parameters. Journal of Sedimentary Research **27:** 3-26.

Annexe 15. Dosage des protéines par la méthode de Lowry (Total Protein kit, Micro-Lowry, Peterson's modification, TP 0300 L3540)

1. Matériel

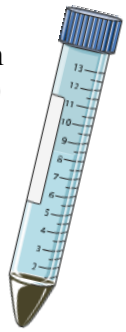
Eau distillée
Réactif de Lowry (dans le kit)
Réactif de Folin (dans le kit)
Solution BSA (dans le kit)
Eau de mer filtrée sur 0,2 µm
Seringue coupée 5 mL
Tubes Falcon 15 mL
Tubes 2 mL
Tubes de 1,5 mL

Microplaque 96 puits
Pipettes automatiques 10 mL, 5 mL et 1 mL
Vortex
Agitateur à retournement
Centrifugeuse
Spectrofluorimètre
Réfrigérateur 4°C
Congélateur -20°C

2. Marche à suivre

- Prélever 1 mL de sédiment avec une seringue coupée de 5 mL, conserver dans un Falcon 15 mL à -20°C.

3. Extraction des EPS sur le sédiment congelé



- Faire décongeler le sédiment et ajouter 9 mL d'eau de mer filtrée sur 0,2 µm
- Extraire au noir à 4°C pendant 30 min avec agitation par retournement (40 oscillations par minute)

4. Dosage des protéines totales du sédiment

Pendant le temps d'extraction, préparer la gamme étalon dans des tubes de 2 ml

Standard (mL)	Eau distillée (mL)	Concentration [µg mL^{-1}]
0	**1,000**	**0**
0,125	0,875	50
0,250	0,750	100
0,500	0,500	200
0,750	0,250	300
1,000	0	400

Une fois l'incubation terminée :

- Prélever 0,5 mL d'échantillon (en vortexant pour homogénéiser) et transférer dans un tube de 2 mL. Transférer de même 0,5 mL de chaque étalon dans un tube de 2 mL

- ***Ajouter dans chaque tube : 0,5 mL de Réactif de Lowry***

- Vortexer et incuber **20 min** à température ambiante
- ***Ajouter 250 µL de Réactif de Folin***
- Vortexer et incuber **30 min** à température ambiante au noir

- Centrifuger 7000 g, 5 min à température ambiante
- Diluer les échantillons au besoin dans de l'eau distillée. Dans ce travail, il a été nécessaire de réaliser une dilution au ¼ (250 µL de surnageant dans 750 µL d'eau distillée),
- Une fois dilués, transférer les échantillons et la gamme étalon en microplaque selon le plan de plaque établi (200 µL par puits)
- Lire la plaque à 750 nm

NB : lecture du surnageant dans des plaques dans la demi-heure qui suit la fin d'incubation,

Exemple de plan de plaque

Pour 15 échantillons

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		P1r1	P1r1	P1r1	P1r2	P1r2	P1r2	P1r3	P1r3	P1r3	GE 300	
C		P2r1	P2r1	P2r1	P2r2	P2r2	P2r2	P2r3	P2r3	P2r3	GE 300	
D		P3r1	P3r1	P3r1	P3r2	P3r2	P3r2	P3r3	P3r3	P3r3	GE 300	
E		P4r1	P4r1	P4r1	P4r2	P4r2	P4r2	P4r3	P4r3	P4r3	GE 400	
F		P5r1	P5r1	P5r1	P5r2	P5r2	P5r2	P5r3	P5r3	P5r3	GE 400	
G		GE 50	GE 50	GE 50	GE 100	GE 100	GE 100	GE 200	GE 200	GE 200	GE 400	
H		GE 0	GE 0	GE 0								

5. Calculs

Tracer la courbe de la gamme étalon, calculer la pente (P), puis :

$$concentration\ en\ protéines\ totales\ [\mu g\ g^{-1} PS] = \frac{DO \times dilution}{P}$$

Annexe 16. Extraction des EPS du sédiment et dosages des glucides et des protéines des EPS

1. Matériel

Kit BCA1 (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit,Sigma-Aldrich)
Résine Dowex
Tampon PBS
Eau de mer artificielle stérile
BSA
Glucose
Solution aqueuse de phénol à 5%
Acide sulfurique à 95-98%
Seringue 5 mL
Grand bécher
Barreau aimanté
Filtre type filtre à café
Tubes Falcon 50 mL et 15 mL
Spatule
Balance
Tubes 2 mL
Tubes à hémolyse en verre
Microplaque 96 puits
Pipettes automatiques 1 mL, 5 mL
Vortex
Agitateur magnétique
Agitateur à retournement
Evaporateur sous vide (Maxi Dry plus, Heto, Danemark)
Spectrofluorimètre
Centrifugeuse
Congélateur -20°C
Réfrigérateur 4°C

2. Extraction des EPS sur le sédiment frais

La veille du prélèvement sur le terrain ou au laboratoire, il faut activer la résine (DOWEX Marathon C, Na^+; Sigma-Aldrich), compter 1 g de Dowex par échantillon,

- dans un récipient large et bas en verre, peser la quantité de Dowex voulue, recouvrir de Tampon PBS 1X et mettre en agitation (avec barreau aimanté) au noir à 4°C pendant1h
- Filtrer la résine sur un filtre type filtre à café et la faire sécher 5 minutes (attention si plus, elle éclate)
- Conserver la Dowex activée jusqu'à 48h, à 4°C dans des tubes 50 mL au noir

Jusqu'à 24h après le prélèvement :

- Prélever 5 mL de sédiment dans des tubes falcon 15 mL et ajouter 5 mL d'eau de mer artificielle stérile, boucher fermement et vortexer. Mettre en agitation par retournement (40 oscillations par minute) pendant 1h à 4 °C,
- Centrifuger 10 min à 3500 g à 4°C, Récupérer le surnageant qui constitue la fraction colloïdale des EPS et le placer à -20°C (aliquoter un volume connu, par exemple 1,5 mL dans 2 tubes 2 ml (*a* et *b*) – le surplus est stocké en réserve dans un tube supplémentaire),
- Resuspendre le culot dans 5 mL d'eau de mer artificielle stérile avec un peu de résine DOWEX (une pointe de spatule) dans le culot. Bien mélanger mais ne pas vortexer après avoir ajouté la Dowex. Mettre sous agitation (40 oscillations par minute) à 4 °C pendant 1h,
- Centrifuger 10 min à 3500 g à 4°C et récupérer le surnageant qui constitue la fraction liée des EPS et le placer à -20°C (aliquoter un volume connu, par exemple 1,5 mL dans 2 tubes Epp 2 mL (*a* et *b*) – le surplus est stocké en réserve dans un tube

supplémentaire). Le culot contenant les EPS internes est placé à -20 °C pour une éventuelle analyse.

3. Concentration des échantillons

Sans décongeler les échantillons (ou l'eau de mer artificielle, pour la gamme étalon, § 4 et 5), les concentrer à l'aide d'un évaporateur sous vide (Maxi Dry plus, Heto, Denmark) pendant 6h, il doit seulement rester entre 200 et 500 µL d'échantillon. Pooler les duplicats (*a* et *b*) puis mesurer le volume (le taux de concentration est différent selon les échantillons).

4. Dosage des protéines – BCA en microplaques – Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA1, Sigma-Aldrich)

- Préparer une gamme de BSA (Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich) de 0 à 1 g L^{-1} (10 points). Cette gamme est à réaliser dans de l'eau de mer artificielle concentrée (voir § 3),
- Préparer le réactif selon les instructions du kit : diluer 50 fois la solution de $CuSO_4$ dans l'acide bicinchoninique, conserver la solution à 4°C pendant 48h maximum et à l'obscurité,
- Déposer 200 µL de réactif dans chaque puits puis ajouter 25 µL d'échantillon à doser et agiter en pipetant 2/3 fois. Travailler à l'abri de la lumière,
- Incuber la microplaque 30 minutes à 37°C

Lire l'absorbance à 562nm avec un spectrophotomètre.

Plan de plaque type :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		GE 0	GE 0,1	GE 0,2	GE 0,3	GE 4	GE 0,5	GE 0,6	GE 0,7	GE 0,8	GE 0,9	
C		GE 1	GE 0,1	GE 0,2	GE 0,3	GE 5	GE 0,5	GE 0,6	GE 0,7	GE 0,8	GE 0,9	
D		GE 1	1	1	1	2	2	2	3	3	3	
E		GE 1	4	4	4	5	5	5	6	6	6	
F			7	7	7	8	8	8	9	9	9	
G			10	10	10	11	11	11	12	12	12	
H												

5. Dosage des glucides – méthode de Dubois

- Préparation d'une gamme de glucose de 0 à 3 g L^{-1} (12 points). Cette gamme est à réaliser dans de l'eau de mer artificielle concentrée (voir § 3),
- Dans des tubes à hémolyse en verre, déposer 100 µL d'échantillon à doser,
- Ajouter 100 µL d'une solution aqueuse de phénol à 5%, (agiter en pipetant ~7 fois)
- Ajouter avec beaucoup de précaution 500 µL d'acide sulfurique à 95-98%. L'acide sulfurique chauffe donc agiter en pipetant (~7 fois) mais avec précaution pour éviter l'évaporation
- Incuber les tubes à l'obscurité, 30 minutes, à température ambiante.

Lire l'absorbance à 485nm avec un spectrophotomètre. La lecture peut se faire soit en cuve, soit en microplaque 96 puits (200µL du mélange est déposé dans un puits).

Plan de plaque type :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		GE 0	GE 0,0125	GE 0,025	GE 0,05	GE 0,1	GE 0,2	GE 0,3	GE 0,5	GE 0,6	GE 0,7	
C		GE 1	GE 0,0125	GE 0,025	GE 0,05	GE 0,1	GE 0,2	GE 0,3	GE 0,5	GE 0,6	GE 0,7	
D		GE 0,8	1	1	1	2	2	2	3	3	3	
E		GE 0,8	4	4	4	5	5	5	6	6	6	
F		GE 1	7	7	7	8	8	8	9	9	9	
G		GE 1	10	10	10	11	11	11	12	12	12	
H												

6. Calculs

Quel que soit le dosage, le calcul est le même. Tracer la courbe de la gamme étalon, calculer la pente (P), puis :

$$concentration\ en\ EPS\ [\mu g\ g^{-1}PS] = \frac{DO \times dilution}{P}$$

Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. **28:** 350-356.

Takahashi, E., J. Ledauphin, D. Goux, and F. Orvain. 2009. Optimising extraction of extracellular polymeric substances (EPS) from benthic diatoms: comparison of the efficiency of six EPS extraction methods. Mar. Freshw. Res. **60:** 1201-1210.

Annexe 17. Mesure des Activités enzymatiques extracellulaires dans les sédiments

1. Matériel

Eau distillée
Eau de mer filtrée sur 0,2 µm
Ethanol
Cellusolve
Pastille de NaOH
L-Leucine β-naphthylamide hydrochloride
2-Napthylamine
MUF alpha ou 4-Methylumbelliferyl α-D-glucoside
4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside
4-Methylumbelliferone
Methoxyethanol
Tubes 50 mL
Seringues coupées 50 mL
Tubes eppendorf 2 mL
Pipette de 1 mL et de 5 mL et cônes tronqués
Bac d'incubation
Centrifugeuse
Vortex
Microplaque
Spectrofluorimètre
Congélateur -20°C
Réfrigérateur 4°C

2. Préparation des substrats

Aminopeptidase (L-Leucine β-naphthylamide hydrochloride)

SM (10 mM) : 29,28 mg dans 9,8 ml d'eau + 200 µL d'éthanol
Par exemple, SF1 à 6 mM [c° finale 300 µM] : 4,2 mL SM dans 2,8 ml d'eau

Beta-glucosidase (4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside)

SM : 338,2 mg dans 9,7 mL d'eau + 100 µL cellusolve + 1 pastille NaOH
Par exemple, SF1 à 10 mM [c° finale 500 µM] : 700 µL SM dans 6,3 mL d'eau

3. Réalisation de la gamme étalon

Aminopeptidase (substrat fluorogène : 2-Napthylamine) à préparer chaque jour
SM1 à 10mM : **7,16 mg de substrat dans 5 mL de CelluSolve**

	Concentration [µM]	**Concentration finale dans réaction [µM]**	**Quantité [S] dans 83 µL [nmol]**
SM	1000	50	**83**
SF1	500	25	**41,5**
SF2	250	12,5	**20,75**
SF3	125	10	**16,6**
SF4	100	5	**8,3**
SF5	50	2,5	**4,15**

Solution à utiliser	**Volume solution [mL]**	**Volume H_2O [mL]**
SM1	0,5	4,5
SM	1	1
SF1	0,5	0,5
SM	0,2	0,8
SF1	0,2	0,8
SM	0,1	0,9

Beta glucosidase (substrat fluorogène : 4-Methylumbelliferone)

S1 à 10mM : **16, 92 mg de substrat dans 10 ml d'eau**
S2 à 1mM : 1 ml de S1 dans 9 ml d'eau
S3 à 200 µM : 2 ml de S2 dans 8 ml d'eau

	Concentration [µM]	**Concentration finale dans réaction [µM]**	**Quantité [S] dans 83 µL [nmol]**
SM	20	1	**1,66**
SF1	10	0,5	**0,83**
SF2	4	0,2	**0,33**
SF3	2	0,1	**0,166**
SF4	1	0,05	**0,083**

Solution à utiliser	**Volume solution [mL]**	**Volume H_2O [mL]**
S3	1	9
SM	2,5	2,5
SF1	2	3
SF1	1	4
SF1	0,5	4,5

Aliquoter 1 ml dans 5 tubes, Conserver à -20°C

4. Protocole échantillons environnementaux

Le jour du prélèvement, prélever 5 mL de sédiment avec une seringue coupée 5 mL. Dans un pot 40 mL, ajouter 10 mL de sédiment de chaque triplicat de prélèvement pour réaliser les gammes de standards. Conserver à -20°C.

Temps d'incubation
Aminopeptidase : 10 min, 30 min et 1h,
Beta glucosidase : 15 min, 45 min et 1h15

Préparer un bac d'incubation à la température du milieu, mettre la centrifugeuse à 4°C, se munir de cônes tronqués

- Décongeler l'échantillon et préparer un slurry de sédiment avec de l'eau de mer filtrée sur 0,2 µm (1:1)

- Préparer 5 tubes (blanc, To et 3 temps d'incubations) avec 200 µl de slurry sédiment pour chaque activité enzymatique (tube Eppendorf 2 ml) et ajouter 1,3 ml d'eau de mer. La dilution finale est donc au 1/15ème.

A partir de cette étape, travailler à l'obscurité

- Rajouter 83 µl de substrat pour le To, T1, T2 et T3 et 83 µL d'eau pour le blanc
- Agiter à la main ou vortex 5 s
- Incuber à température *in situ* les échantillons (placer les tubes si possible à l'horizontal avec une agitation d'au moins 100 rpm afin que le slurry reste homogène pendant l'incubation) - pour le T0 et le Blanc, ne pas incuber, passer directement à l'étape suivante
  - Pour la gamme étalon, ajouter 83 µL de substrat fluorogène et passer à l'étape suivante
- Centrifuger 10 000g, 2 min à 4°C
- Prélever 1 ml de surnageant dans un nouveau tube (1,5 mL)
- Vortexer les surnageants et remplir les microplaques pour la lecture (200 µL par puits en triplicats)

5. Lecture de la fluorescence au spectrofluorimètre

Longueurs d'onde :

Aminopeptidase : excitation 340 nm, émission 410 nm ; BP=20 nm, avec agitation orbitale ; PM=500

β-glucosidase : excitation 365 nm, émission 460 nm ; BP= 20 nm avec agitation orbitale PM = 400

6. Calculs et fichiers nécessaires

Exemple pour calculer l'activité enzymatique (aminopeptidase) d'un échantillon

Réaction : Leu-MCA -> Leu + MCA ✦

Produit fluorescent

Retirer la valeur des blancs à chaque valeur

- pour les échantillons :
  - Tracer la courbe de l'absorbance en fonction du temps (en minutes)
  - Calculer la pente exprimée en absorbance. min^{-1} – p1
- pour la gamme étalon :
  - Tracer la courbe de l'absorbance en fonction de la quantité de substrat ajouté (en nmol)
  - Calculer la pente exprimée en absorbance. nmol^{-1} – p2
- Calculer V la vitesse de production du produit en [nmol min^{-1}] dans chaque tube

$$V_1\ [nmol, min^{-1}] = {}^{p1}\!/_{p2}$$

- Calculer V en [nmol g sédiment sec^{-1} h^{-1}]

Dans chaque tube, 200 µL de sédiment dilué ½ a été ajouté et dilué dans 1,3 mL d'eau de mer, Il y a donc 100µL de sédiment dans chaque tube, et Rho DW [mL g sédiment sec^{-1}] indique le volume de sédiment contenu par gramme de sédiment sec,

$$V\ [nmol, g\ sédiment\ sec^{-1}, h^{-1}] = \frac{V_1 \times 60 \times 10}{Rho\ DW}$$

7. Tableaux utiles

Tableau à remplir pour noter les temps :

Amino

	T1 (+10 min)	T2 (+30 min)	T3 (+1h)
heure start			
heure stop			

Concentration (µM) 300

Références produits chimiques :

	Nom	***Ref Sigma***
Leucine Aminopeptidase	L-Leucine β-naphthylamide hydrochloride	L0376-5G
Substrat fluorogène	2-Napthylamine	N8381-1G
Beta glucosidase	4-Methylumbelliferyl β-D-glucopyranoside	M3633-1G
Substrat fluorogène	4-Methylumbelliferone	M1381-100G
Cellusolve	Methoxyethanol	185469-1L

Annexe 18. Protocole de mesure de production bactérienne

Attention, cette expérimentation requiert l'utilisation de substances radioactives et demande une manipulation contrôlée dans un laboratoire spécifique et agréé pour l'utilisation de produits radioactifs.

1. Matériel

TCA à 5% (stocké dans la glace)
Ethanol à 80% contenant 100mg/l de thymidine froide (stocké dans la glace)
HCl 0.5 M contenant 242 mg de thymidine froide pour 100 ml
Pissette d'eau distillée
Pissette de Décon à 5%
Tubes en polypropylène 15 ml à fermeture hermétique
Filtres en polycarbonate de 0,2µm de porosité
Pinces
Flacons à scintillations
Pipettes automatiques + embouts,
Dispositif de filtration 3 postes plus filtreurs munis de couvercles (pour éviter évaporation)
Centrifugeuse
Réfrigérateur 4°C
Bacs, poubelle déchets, papier, gants, blouse

2. Incubation sur le sédiment frais

- Sortir un tube de thymidine ^{3}H (9,25 MBq) sous la sorbonne
- Faire un slurry sédiment (1:1 sédiment :eau de mer préfiltrée sur 0,2 µm). Homogénéiser le slurry.

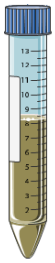
Préparer :

- 3 tubes pour la mesure de production
- 1 à 2 tubes témoin

- Dans chaque tube, ajouter 30 µL de slurry + 20 µL de thymidine ^{3}H (0,74 MBq). Fermer hermétiquement.
- Les tubes témoins sont immédiatement arrêtés par ajout de 8 mL d'éthanol froid 80 %.
- Incuber les autres tubes pendant 30 min à 1 h à la température du milieu.
- A la fin de l'incubation, stopper les réactions par ajout de 8 mL d'éthanol froid 80 %.
- Stocker à 4°C jusqu'à l'étape suivante

3. Analyse et mesure de radioactivité

- Sous la sorbonne, homogénéiser les tubes



15 min 3 000 g (acc/dec 9)

Déchets LS

+ 8 ml Ethanol 80%

Vortexer pour resuspendre le culot, au besoin, utiliser une pipette

15 min 3 000 g (acc/dec 9)

A faire 3 fois

+ 2 ml TCA 5%

Vortexer pour resuspendre le culot

Verser les échantillons sur les filtres 0,2 µm (diam = 0,25)

Rincer deux fois les tubes avec 2 ml de TCA en versant dans les tourelles puis filtrer (! Pression <10)

Lorsque les échantillons sont passé, faire deux autres **rinçage des tourelles avec 2 ml de TCA**

Déchets LA

Disposer les filtres dans des fioles à scintillation

+ 2 ml HCl 0,5M

Incuber 16h à 95°C (P2, ventilation 100)

Prélever 0,5 ml de surnageant dans une nouvelle fiole

+ 5 ml liquide scintillant

Trier les déchets, séparer les surnageants des déchets solides et les distribuer dans les containers de déchets adaptés. Déchets générés : solutions aqueuses **LA « acide »**, solvants **LS**, solides incinérables **SI**, flacons à scintillations en polyéthylène **SL.**

Vérifier la non contamination des plans de travail et du matériel (frottis), le ranger et prévenir la personne compétente en radioprotection pour qu'il ferme la salle, lui communiquer la quantité d'isotope utilisé.

Annexe 19. Evaluation des proportions d'archées et de bactéries dans les sédiments par Fluorescence *in situ* hybridization (FISH)

1. Matériel

Eau stérile
Ethanol :PBS (1:1)
PFA 8%
Filtre Nuclépore 0,22 µm
Filtre Nuclépore à 0,8 µm
Ethanol à 50%, 80% et 96 %
Mix de sonde
Tampon de lavage
Citifluor
Vectashield
DAPI
Falcon 15 mL
Falcon 50 mL
Seringue coupée
Boite de Pétri
Ciseau
Papier absorbant
Papier Benchkote
Tampon d'hybridation
Lame de verre et lamelle
Pipettes automatiques 1 mL
Glace pilée
Parafilm
Vortex
Plaque de culture à puits
Agitateur à retournement
Sonicateur avec sonde (Branson, SLPE-150, 1/8" microtip, 40KHz)
Etuve (46°C)
Etuve (48°C)
Centrifugeuse
Réfrigérateur 4°C
Congélateur -20°C

2. Le jour du prélèvement selon Llobet-Brossa et al. (1998)

Préparer une solution de PFA (se conserve une semaine à 4°C).
PFA 8% (pour 50 mL) :

- 4g PFA
- 50 mL PBS 1X pH 7,4
- + 1 pastille NaOH
- Agiter à 60°C jusqu'à dissolution
- Ajuster jusqu'à pH 7
- filtrer sur 0,2 µm et faire des aliquots de 750 µL dans tubes 2 mL

- Fixer 3 mL de sédiment frais dans 3 mL PFA 8% (concentration finale 4%) pendant 1-2h à température ambiante ou maximum 24h à 4°C.
- Centrifuger 5 min à 16 000g, jeter le surnageant (! le PFA est classé CMR). Puis resuspendre le sédiment avec 3 mL PBS 1X pH 7,6. Bien homogénéiser, si besoin à l'aide d'une spatule stérile
- Répéter le lavage deux fois
- Ajouter finalement 3 mL d'un mélange de PBS et d'éthanol (1:1)
- Stocker à -20°C ou -80°C jusqu'à l'analyse

3. Préparation des échantillons

- Faire décongeler les échantillons, homogénéiser et prélever 100 µL dans un tube 2 mL
- Ajouter 900 µL d'un mélange de PBS et d'éthanol (1:1)
- Agiter 30 min at 4°C ; 40 oscillations/min
- Vortex + Sonication à 4 x 30 s (1 pulse/s 30W) avec pause de 30 s entre chaque (à réaliser dans la glace)
- Prélever 100 µL de l'échantillon homogénéisé et ajouter 900 µL d'un mélange de PBS

et d'éthanol (1:1). Filtrer le tout sur un filtre 0,22 µm déposé par-dessus un filtre 0,8 µm (le filtre 0,8 µm n'est pas conservé ensuite, il permet uniquement une meilleure répartition du flux d'air sur le filtre
- Laver le filtre 0,22 µm 3 min dans 3mL d'eau stérile, puis 50% eth, 80% eth, 96 % eth
- Laisser sécher sur du papier Benchkote
- Conserver dans une boite de Petri à -20°C

4. Préparation des réactifs nécessaires

Tampon d'hybridation Bactéries (2 mL)
Dans un tube 2 mL,
360 µL NaCl 5M
+40 µL Tris HCl 1M
+600 µL H_2O milliQ stérile
+1 mL formamide
+2 µl SDS 10%

Tampon d'hybridation Archées (2 mL)
Dans un 2,2 mL tube,
Ajouter 360 µL NaCl 5M
+40 µL Tris/HCl 1M
+500 µL H_2O milliQ stérile
+1,1 mL formamide
+2 µl SDS 10%

Les tampons d'hybridation peuvent être préparés en plus grande quantité, aliquotés (2 mL) et conservés à -20°C, mais ne jamais recongeler un aliquot décongelé. Attention, ils sont spécifiques aux sondes utilisées.

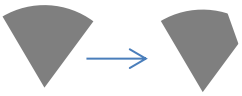
Tampon de lavage Bactéries (100 mL) à préparer tous les jours
360 µl NaCl 5M
2 mL Tris/HCl 1M
1 mL EDTA 0,5M
+96,640 mL H_2O milliQ stérile
+100 µL SDS 10%

Tampon de lavage Archées (100 mL) à préparer tous les jours
200 µl NaCl 5M
2 mL Tris/HCl 1M
1 mL EDTA 0,5M
+96,800 mL H_2O milliQ stérile
+100 µL SDS 10%

5. Marquage par hybridation avec une sonde oligonucléotidique+Cy3 Glöckner et al. (1996)

- Couper les filtres en 8 et découper l'angle supérieur pour se rappeler du sens,

Allumer l'étuve (46°C), toujours travailler dans le noir.



- Préparer la chambre d'incubation comme suit : imbiber un papier absorbant de 1 mL de tampon d'hybridation dans un tube 50 mL prévu à cet effet
- Sur une lame avec du parafilm (ne pas trop étirer le parafilm), déposer des gouttes de 20 µL d'un mix de sonde frais (2 µL sonde 50 ng/µL + 20 µL tampon d'hybridation par filtre) jusqu'à 4 gouttes par lame
- Déposer les portions de filtres face sup vers le haut sur chaque goutte
- Mettre la lame dans le tube 50 mL (chambre d'incubation), refermer le tube et incuber 3h à 46°C
- Préparer le tampon de lavage pour chaque sonde, le répartir dans des plaques (environ 5 mL par puits) et préchauffer à 48 °C, (12 ech/plaque)
- A la fin de l'incubation, transférer rapidement les filtres dans le tampon de lavage

préchauffé et les laver exactement 15 minutes à 48°C
- Laver 5 secondes dans 5 mL d'eau stérile (température ambiante)
- Laisser sécher sur du papier Benchkote
- Déposer sur une lame parafilmée, 20 µL de DAPI (1µg mL^{-1})
- Incuber 3 minutes à température ambiante
- Laver 1 minute dans 5 mL d'eau stérile (température ambiante)
- Puis 1 minute dans 5 mL d'éthanol 80% (température ambiante)
- Laisser sécher sur un papier Benchkote dans une boite de petri
- Préparer un mix de Citifluor/Vectashield 4:1 (ex : soit 7,2 µL de Citifluor et 1,8 µL de Vectashield)
- Déposer une goutte du mélange sur la lame, les portions de filtre (entre 2 et 3 portions de filtre par lame possible) puis le reste du mix par-dessus le filtre et déposer la lamelle

Bien appuyer sur la lamelle et l'entourer avec du vernis à ongles, laisser sécher

Observer au microscope à épifluorescence (x100) avec filtre Cy3 et DAPI. Comptage de 20 champs par filtre. Pour chaque champ, le comptage est réalisé pour le marquage au DAPI puis pour le marquage au Cy3, le plus rapidement possible.

Pour chaque échantillon, 3 filtres sont nécessaires pour notre étude :

- Un filtre pour le comptage des Bactéries avec un mélange de sondes (voir tableau)
- Un filtre pour le comptage des organismes non bactériens (voir tableau). Ce filtre permet de rectifier les erreurs d'hybridation des sondes bactériennes
- Un filtre pour le comptage des Archées (voir tableau)

Organisme cible	Nom de la sonde	Modification	Sequence (5'->3')	Longueur (nucléotides)
Bactéries	EUB338 I	5'-Cy3	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	18
	EUB 338 II	5'-Cy3	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	18
	EUB 338 III	5'-Cy3	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	18
Archées	ARCH 915	5'-Cy3	GTG CTC CCC CGC CAA TTC CT	20
Non bactérien	NON EUB	5'-Cy3	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	18

A noter que pour chaque filtre, les abondances sont exprimées en relatif par rapport au comptage en DAPI représentant tous les procaryotes. Si tous les filtres sont préparés dans les mêmes conditions (dilutions), aucun calcul supplémentaire n'est nécessaire.

Glöckner, F. O. and others 1996. An in situ hybridization protocol for detection and identification of planktonic bacteria. Syst. Appl. Microbiol. **19:** 403-406.

Llobet-Brossa, E., R. Rosselló-Mora, and R. Amann. 1998. Microbial Community Composition of Wadden Sea Sediments as Revealed by Fluorescence In Situ Hybridization. Appl. Environ. Microbiol. **64:** 2691-2696.

Annexe 20. Création de standards pour la quantification de gènes fonctionnels, exemple du gène *nirS*

1. Matériel

Kit d'extraction d'ADN Power Soil MOBIO
Kit PCR GoTaq® HotStart Polymerase
Kit de purification NucleoSpin (Macherey Nagel)
Kit de clonage Promega (pGEM Vector + T4 DNA ligase + Cellules compétentes JM109)
Kit d'extraction plasmidique NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel)
qPCR master Mix SybrGreen/ROX (Maxima)
Amorces (F et R)

Milieu de culture SOC (Difco) et LB (Difco)
Agar
Solution d'IPTG 200 mM (Sigma I1284=
XGal en poudre (Sigma B9146)
Ampicilline en poudre (Sigma A9393)
Dimethylformamide (DMSO, Sigma D4551)
Eau déionisée
Pipettes automatiques
Tube de 2 mL
Boite de Pétri
Microplaques 96 puits
Cure-dent
Nanodrop
Centrifugeuse
Glace
Bain-marie agitant
Congélateur -80°C
Thermocycler Mx Pro 3000 (avec le logiel Mx Pro)

1. Prélèvement

La vase prélevée a été homogénéisée puis aliquotée dans un pot stérile et congelée à -20°C jusqu'à analyse.

2. Extraction ADN –UltraClean Soil DNA isolation kit (MOBIO)

- Peser 1g de sédiment dans les tubes prévus à cet effet et préalablement tarés
- Suivre le protocole suivant les recommandations du fournisseur prévues pour améliorer les rendements
- Réaliser l'élution dans 30 µL
- Doser l'ADN extrait au Nanodrop
- Conserver à -20°C jusqu'à la prochaine étape

2. PCR (jour 1)

PCR conditions

Date	25/09/2012
Forward Primer (10µM)	Cd3aF
Reverse Primer (10µM)	R3cd
Number of reactions	6
Volume template (µl)	**1**
Mix volume (µl)	50
Total volume mix (µl)	294

Component	*1 reaction*	*X reaction*
PCR H2O	33,7	202,2
PCR Buffer 10x	5	30
dNTP's	1	6
Cd3aF	2,5	15
R3cd	2,5	15
MgCl2	2	12
BSA (20 µg)	2	12
HotStart (5U/µl)	0,3	1,8
Samples	1	

selon (Throbäck et al., 2004)

PCR program

Cycles	*Time (min)*	*Temperature (°C)*
1	15	95
35	**0,5**	**94**
	1	**57**
	1	**72**
1	9	72
	15	4
	∞	15

PCR machine	SenSoquest

Gel running conditions

Agarose %	1,0
Voltage	100 V
Time	30 min
Size Marker	Smart Ladder

- Amplification avec le kit PCR GoTaq® HotStart Polymerase (Promega)
- Migration des produits PCR (5 µL). Si une seule bande nette correspondant à la taille attendue est observée, passage à l'étape suivante. Si deux bandes apparaissent, déposer l'intégralité des produits PCR, refaire migrer et découper à l'aide d'une lame de rasoir la bande d'intérêt, la réserver dans un tube 2 mL préalablement pesé et repeser le tube.

3. Purification (jour 1)

- Purification des produits PCR par le Kit NucleoSpin (Macherey Nagel) suivant les recommandations du fournisseur. Si une portion de gel a été découpé, suivre les recommandations du fournisseur pour la purification de gel.

Dosage de l'ADN au Nanodrop : déposer 1,3 µL d'échantillon par mesure, réaliser la mesure en triplicats. La mesure est satisfaisante si le ratio 260/280 est de 1,8.

4. Clonage Kit Promega

4.1 Ligation (jour 1)

- Centrifuger le pGEM Vector
- Réaliser le mix suivant (avec 50 ng d'ADN)

Buffer 2X	5 µL
pGEM Vector	1 µL
produit PCR	= 50 / [Concentration ADN échantillon]
T4 DNA ligase	1 µL
Ajout d'eau déionisée jusqu'à	10 µL

- Agiter en pipetant doucement

Incuber 1h à TA ou une nuit à 4°C

4.2 Transformation (jour 2)

- Préparer les boites LB (à TA)
- Centrifuger les produits de ligation rapidement
- Transférer 2 µl de réaction dans un tube 1,5 ml dans la glace
- Sortir les cellules compétentes (JM109 à -80°C) dans la glace environ 5 minutes. Agiter doucement en tapotant le tube
- Ajouter 50 µl de cellules compétentes au produit de ligation. Agiter doucement

Incuber 20 minutes dans la glace

- Réaliser un choc thermique en les plongeant dans un bain-marie à 42°C (exactement) pdt 45-50 secondes ! Ne pas remuer !
- Plonger à nouveau les tubes dans la glace 2 minutes
- Ajouter 950 µl de milieu SOC (à TA)

Incuber 1h30 à 37°C avec agitation à 150 rpm

- Préparer 5 boîtes par clonage : étaler 40 µL d'IPTG (100 mM) puis 40 µL de Xgal (40 mg mL^{-1})
- Etaler au rateau 100 µl dans 3 boîtes et 50 µl dans 2 boites

Attendre à l'endroit 2 minutes puis retourner les boites.

Incuber une nuit à 37°C

- **jour 3 :** Sélectionner les colonies blanches sur des boîtes préparées avec du Xgal et IPTG + Grille numérotée

Incuber une nuit à 37°C

- **jour 4** : Transférer les colonies blanches dans 1,6 ml de LB liquide + ampicilline=
- Incuber 18h à 37°C (agitation = 135 rpm)

5. Sauvegarde et Extraction plasmidique (J+4)

- Sauvegarde de 100 µl de culture dans 5 µl de DMSO, à conserver à -80°C
- Centrifugation des cultures 11 000 g, 30 s
- Jeter le surnageant dans de l'eau de javel (le culot peut être conservé à -20°C pour extraction ultérieure).

Extraction plasmidique avec le kit NucleoSpin Plasmid ® (Macheney-Nagel) suivant les recommandations du fournisseur.

6. qPCR (jour 4)

Une qPCR a enfin été réalisée avec les clones obtenus et quelques échantillons environnementaux. Chaque mix de réaction (20 µL) a été préparée comme suit : 1x qPCR master Mix SybrGreen/ROX (Maxima, SYBRGreen/ROX, Fermentas) (10µL), 0,3 µM de chaque primer (1 µL à 10µM), 1 µL d'échantillon et 7 µL d'eau ultra-pure (*i.e.* RNase et DNase-free). Le cycle d'amplification (**Figure 24**) a été réalisé dans un thermocycleur qPCR MxPro 3000P (Agilent Technologies, Santa-Clara, CA, Etats-Unis) équipé du logiciel MxPro (Version 4.10).

7. Préparation de standards (exemple du gène *nirS*)

Puis, la quantité d'ADN est dosée et rapportée à la masse du fragment. Tout d'abord, les longueurs du fragment inséré et du vecteur sont calculées:

$$Longueur\ du\ fragment\ total(lgf) = longueur\ du\ Vecteur\ pGEM + longueur\ de\ l'insert\ nirS\ (425)$$

Ensuite, on calcule la masse du fragment utilisé :

$$Masse\ du\ fragment\ total(m_f) = lgf * poids\ des\ bases * poids\ H * 10^{21}$$

Enfin la concentration en ADN du plasmide extrait a été dosée au Nanodrop et le nombre de copies du gène n*irS* par µL d'échantillon a été évalué:

$$Nombre\ de\ Copies\ par\ \mu l\ du\ fragment\ (nCf) = \frac{Concentration\ du\ fragment\ total\ \left[\frac{ng}{\mu l}\right] * 10^9}{m_f}$$

Il a été possible de déduire le volume contenant un nombre de 10^{10} copies du gène cible et réaliser les dilutions.

$$Volume\ (10^{10}\ copies) = \frac{10^{10}}{nCf}$$

Une gamme de standard a été préparée par dilution successives à partir d'une solution contenant 10^{10} copies.

Annexe 21. Protocole de préparations d'échantillons de sédiments pour l'évaluation de la diversité bactérienne et archéenne présente par pyroséquençage 454

3. Matériel

Pot de prélèvement
Seringue coupée
Congélateur -20°C
Extraction ADN – UltraClean Soil DNA isolation kit (MOBIO)
Nanodrop
Eau ultra pure
Boite de Pétri
Filtre 0,045 µm
MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)
Tubes 2,2 mL
Bain-Marie
Tampon QG
Tampon PE
Vortex
Isopropanol (100%),
Centrifugeuse
Ethanol
Tube 1,5 mL stérile

4. Prélèvement

La vase prélevée a été homogénéisée puis aliquotée dans un pot stérile et congelée à -20°C jusqu'à analyse.

5. Extraction ADN –UltraClean Soil DNA isolation kit (MOBIO)

- Peser 1g de sédiment dans les tubes prévus à cet effet et préalablement tarés
- Suivre le protocole suivant les recommandations du fournisseur prévues pour améliorer les rendements
- Réaliser l'élution dans 30 µL
- Doser l'ADN extrait au Nanodrop
- Conserver à -20°C jusqu'à la prochaine étape

6. Dialyse

- Diluer les extraits pour obtenir la même concentration pour tous les échantillons (5 ng/µL, 30 µL minimum),
- Dans une boîte de Petri, déposer 30 µL d'eau ultra pure
- Disposer le filtre 0,045 µm (ou une portion de filtre) sur la goutte d'eau
- Déposer une goutte de 30 µL de l'échantillon extrait dilué
- Refermer la boîte et laisser 30 min, les sels diffusent par osmolarité au travers la membrane
- Récupérer l'échantillon
- Dosage au Nanodrop
- Diluer si nécessaire

8. PCR

PCR conditions

Date	30/03/2014	
Forward Primer (5 mM)	519F	tag Mylène
Reverse Primer (10 mM)	915R	reçu le 26/2/14
Number of reactions	8	
Volume template (µl)	1	
Mix volume (µl)	30	
Total volume mix (µl)	216	

PCR program

Cycles	*Time (min)*	*Temperature (°C)*
1	15	95
35	50 sec	95
	30 sec	57
	30 sec	72
1	10	72
	15	4
	∞	15

PCR machine: SenSoquest

Component	*1 reaction*	*X reaction*
PCR H2O	17,1	136,8
PCR Buffer 10x	3	24
dNTP's	0,6	4,8
519F	2	
915R	2	16
MgCl2	2	16
BSA (20 µg)	**2**	16
Hot start (5U/µl)	0,3	2,4
Samples	**1**	

Gel running conditions

Agarose %	1,0
Voltage	75 V
Time	70 min
Size Marker	Smart Ladder

Position in PCR tube	*Sample*			*Concentration*	*Tag*
1	Fev-P4r1	dialysé	dilué	1/5	19
2	Fev-P4r2	dialysé	dilué	1/5	19
3	Fev-P4r3	dialysé	dilué	1/5	19
4	Fev-P4r1	dialysé	dilué	1/10	19
5	Fev-P4r2	dialysé	dilué	1/10	19
6	Fev-P4r3	dialysé	dilué	1/10	19
7	T+ (116 st qPCR)				
8	T-				

9. Purification – MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)

- Peser les tubes 2,2 mL vides, sortir les colonnes à température ambiante 30 minutes avant de commencer, allumer le bain marie à 50°C
- Découper dans le gel les bandes correspondant à chaque échantillon et pooler les triplicats dans un même tube 2,2 ml
- Peser à nouveau les tubes
- Ajouter 3 volumes de tampon QG pour 100mg de gel (100 mg ~ 100 µL), Ne jamais dépasser 400 mg de gel par colonne
- Incuber 10 minutes à 50°C dans un bain marie et vortexer environ toutes les 3 minutes, Le liquide doit être jaune (indicateur de pH)
- Ajouter 1 volume (de gel) d'isopropanol (100%), inverser les tubes 8-10 fois
- Charger la colonne avec 700 µl d'échantillon, centrifuger 1 minute à 10 000g et jeter le reflux
- Recommencer l'opération jusqu'à avoir fait passé tout le volume d'échantillon
- Ajouter 500 µL de tampon QG à la colonne et centrifuger 1 min à 10 000g, jeter le reflux
- Pour laver, ajouter 750 µL de tampon PE et incuber à température ambiante 5 minutes, centrifuger ensuite 1 min à 10 000 g et jeter le reflux
- Centrifuger à nouveau 1 min à 10 000g pour éliminer totalement l'éthanol

- Placer la colonne dans un tube Eppendorf 1,5 mL stérile préalablement annoté
- Eluer l'ADN en ajoutant 6 µL d'eau stérile, incuber à température ambiante 10 minutes
- Centrifuger 1 min à 10 000g
- Ajouter 6 µL d'eau stérile à nouveau et incuber 5 min
- Centrifuger 1 min à 10 000g
- Vérifier que l'élution s'est bien faite (volume ok au fond du tube) et jeter la colonne
- Doser au Nanodrop
- Etiquetter les échantillons et stocker à -20°C jusqu'à envoi auprès de GATC

Annexe 22. Protocole de préparations d'échantillons de sédiments pour l'évaluation de la diversité active bactérienne et archéenne par pyroséquençage 454

1. Matériel

Seringues coupées
Container azote liquide
Sachets plastiques stériles
Congélateur -80°C et – 20°C
ARN – MOBIO PowerSoil Total RNA isolation kit
Boite de Pétri
Scalpel ou spatule fine
Eau ultra pure
Tube falcon 15 mL
Nanodrop
DNase Turbo AMBION (Life technologies, California)
Tampon Turbo
Thermocycleur
Centrifugeuse
Agitateur
RT-PCR Superscript III first-strand system (Invitrogen, 18080-051)
Purification – MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)
Bain-marie
Tubes de 2,2 mL
Tampon QG
Vortex
Sodium acetate 3M
Isopropanol
Tampon QG
Tampon PE
Ethanol
Tubes Eppendorf 1,5 mL

2. Prélèvement

La vase prélevée a été homogénéisée puis répartie dans 2 seringues stériles plongées dans l'azote liquide et stockées dans des sachets stériles pour conservation à -80°C. Si possible, l'analyse est à faire dans les 6 mois (jusqu'à l'étape de RT, les cDNA sont ensuite plus stables).

3. Extraction ARN – MOBIO PowerSoil Total RNA isolation kit

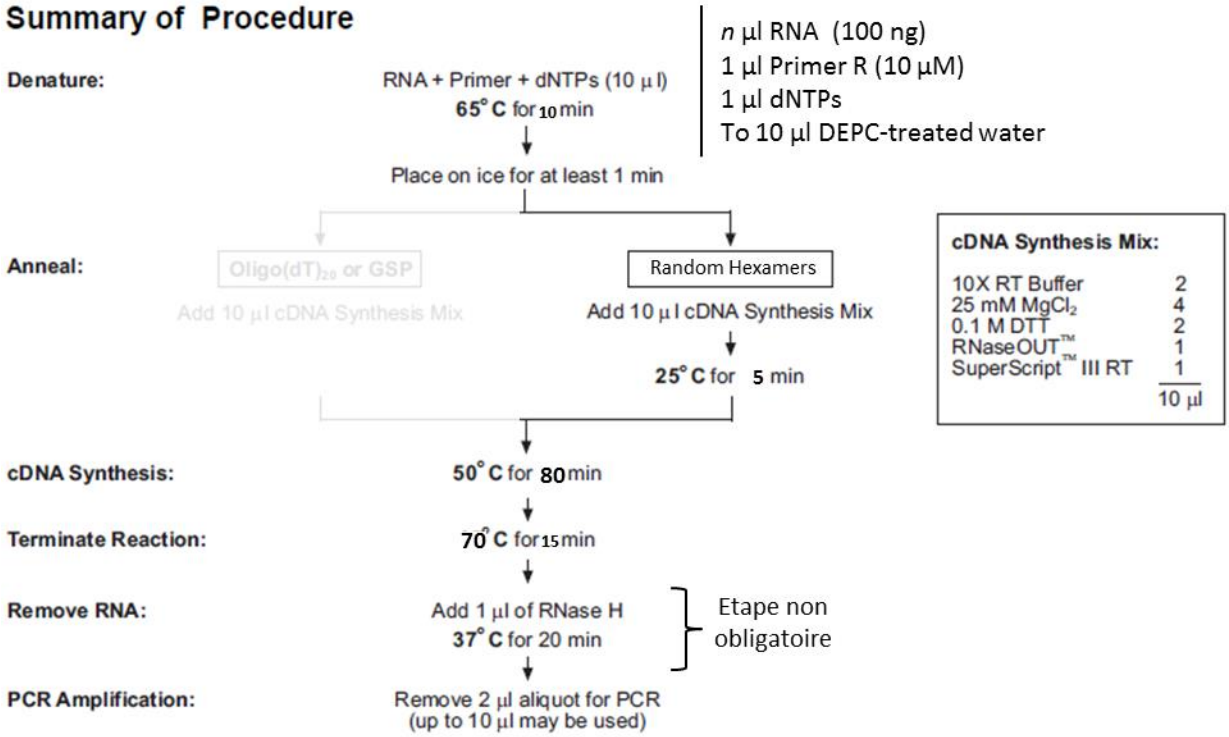
- Sortir une seringue et disposer la carotte de vase encore congelée dans une boîte de Petri traitée (eau DEPC), à l'aide d'un scalpel ou d'une spatule fine (traités eau DEPC).La mini-carotte de vase est découpée aux extrémités puis pesée, 5g sont ajoutés au tube 15 mL fourni avec les billes dans le kit,
- Suivre les recommandations du fournisseur adaptées pour obtenir un meilleur rendement et adaptées aux gros volumes de sédiment
- Elution dans 50 µl
- Dosage de l'ARN total extrait au Nanodrop

4. DNase Turbo AMBION (Life technologies, California)

Echantillons à 100 ng/µL, volume final 50 µL

- Ajouter 5µL de tampon Turbo (10X) et 1µL de DNase
- Incuber 30 min à 37°C (Thermocycleur)
- Ajouter 5 µL de réaction d'inactivation (bien vortexer ce réactif avant utilisation)
- Incuber 2 min à TA en agitant régulièrement (le réactif sédimente au fond du tube)
- Centrifuger 10 000g 1min30
- Récupérer le surnageant et doser au Nanodrop
- Diviser en deux aliquots (un réserve -80°C, un travail -20°C)

5. RT-PCR Superscript III first-strand system (Invitrogen, 18080-051)



Conserver les réactions dans les barrettes (8 tubes) à -20°C. Utiliser de préférence les réactions pures et ne pas les diluer.

6. PCR

PCR conditions

Date	30/03/2014	
Forward Primer (10 mM)	563F	tag Mylène
Reverse Primer (10 mM)	907R	reçu le 26/2/14
Number of reactions	22	
Volume template (µl)	**1**	
Mix volume (µl)	30	
Total volume mix (µl)	594	

PCR program

Cycles	*Time (min)*	*Temperature (°C)*
1	2	95
35	50 sec	95
	30 sec	52
	30 sec	72
1	10	72
	15	4
	∞	15

PCR machine: SenSoquest

Component	*1 reaction*	*X reaction*
PCR H2O	19	418
PCR Buffer 10x	3	66
dNTP's	0,6	13,2
563F	2	
907R	2	44
MgCl2	0	0
BSA (20 µg)	**2**	44
PicoMaxx (2,5U/µl)	0,4	8,8
Samples	1	

le F se rajoute dans chaque réaction

Position in PCR tube	*Sample*	*Concentration*	*Tag*
1	LGT L2 P1r1	n	**2**
2	LGT L2 P1r2	n	**2**
3	LGT L2 P2r1	n	**3**
4	LGT L2 P2r3	n	**3**
5	LGT L2 P3r1	n	**4**
6	LGT L2 P3r2	n	**4**
7	LGT L2 P4r1	n	**5**
8	LGT L2 P4r2	n	**5**
9	LGT L2 P5r1	n	**6**
10	LGT L2 P5r2	n	**6**
11	NGT L2 P1r1	n	**7**
12	NGT L2 P1r2	n	**7**
13	NGT L2 P2r1	n	**8**
14	NGT L2 P2r2	n	**8**
15	NGT L2 P3r1	n	**10**
16	NGT L2 P3r2	n	**10**
17	NGT L2 P4r1	n	**11**
18	NGT L2 P4r2	n	**11**
19	NGT L2 P5r1	n	**13**
20	NGT L2 P5r2	n	**13**
21	T+ (souche betty 43)		
22	T-		

7. Purification – MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen)

Toutes les centrifugations sont à réaliser à tempéarture ambiante

- Peser les tubes vides (2,2 mL), sortir les colonnes à température ambiante 30 minutes avant de commencer, allumer le bain marie à 50°C
- Découper dans le gel les bandes correspondant à chaque échantillon et pooler les triplicats dans un même tube 2,2 ml
- Peser à nouveau les tubes
- Ajouter 3 volumes de tampon QG pour 100mg de gel (100 mg ~ 100 µL). Ne jamais dépasser 400 mg de gel par colonne
- Incuber 10 minutes à 50°C dans un bain marie et vortexer environ toutes les 3 minutes. Le liquide doit être jaune (indicateur de pH). Si il vire au violet, ajouter 10 µL de sodium acetate 3M
- Ajouter 1 volume (de gel) d'isopropanol (100%), inverser les tubes 8-10 fois
- Charger la colonne avec 700 µl d'échantillon, centrifuger 1 minute à 10 000g et jeter le reflux
- Recommencer l'opération jusqu'à avoir fait passé tout le volume d'échantillon
- Ajouter 500 µL de tampon QG à la colonne et centrifuger 1 min à 10 000g, jeter le reflux
- Pour laver, ajouter 750 µL de tampon PE et incuber à température ambiante 5 minutes, centrifuger ensuite 1 min à 10 000 g et jeter le reflux
- Centrifuger à nouveau 1 min à 10 000g pour éliminer totalement l'éthanol
- Placer la colonne dans un tube Eppendorf safe lock 1,5 mL stérile préalablement annoté
- Eluer l'ADN en ajoutant 6 µL d'eau stérile, incuber à température ambiante 10 minutes
- Centrifuger 1 min à 10 000g
- Ajouter 6 µL d'eau stérile à nouveau et incuber 5 min, centrifuger 1 min à 10 000g
- Vérifier que l'élution s'est bien faite (volume ok au fond du tube) et jeter la colonne
- Doser au Nanodrop (exporter le fichier CSV)
- Etiquetter les échantillons et stocker à -20°C jusqu'à envoi auprès de GATC

Annexe 23. Abondance de la méiofaune benthique

1. Matériel

Pot 140 ml
Seringue 60 mL découpée
Ethanol pur
Seringue coupée 5 mL
Rose bengale
Tamis (50 µm)
Loupe binoculaire (Zeiss)

2. Prélèvement

Prélever 60 mL de sédiment dans un pot 140 mL, ajouter 60 mL d'éthanol pur. Bien mélanger. Conserver à température ambiante.

3. Marche à suivre

- Tamiser l'ensemble de l'échantillon
- Le refus de tamis est récupéré et marqué au rose Bengale pendant 24h minimum
- Une fois les organismes marqués, les grands groupes sont comptés (foraminifères, nématodes, copépodes, ostracodes, gastéropodes, petits bivalves …) à l'aide d'une loupe binoculaire. Si le nombre d'organismes est élevé, un sous-échantillonnage est réalisé par dilution de l'échantillon (dans le cas des foraminifères, tous les individus sont comptés).

$$nombre\ d'individus\ cm^{-3} = \frac{nombre\ d'individus\ comptés * dilution}{volume\ échantillon\ (cm^3)}$$

Annexe 24. Evaluation de la production primaire par la méthode des cloches benthiques

1. Matériel

Cloche claire
Cloche noire
Data logger
Valise terrain

2. Marche à suivre

- Placer la cloche claire sur le sédiment, le signal doit chuter, attendre 10 min
- La ligne de base doit être à 380 ppm
- La mesure en cloche claire permet de quantifier la diminution de CO_2 due à la production primaire (Production nette, PN)
- Une fois la mesure effectuée, enlever la cloche claire et la remplacer par la cloche noire, opaque. Procéder à la mesure de la même façon qu'avec la cloche claire.Cette mesure permet de quantifier la consommation de CO_2 due à la respiration (R)

Le flux de CO_2 est ensuite calculé par la variation de pression partielle en CO_2, du temps d'incubation, du volume de la chambre et de la surface de sédiment enfermée par celle-ci. La production brute du microphytobenthos (en mg C. m^{-2}. h^{-1}) est ensuite calculée par la somme de la production nette et de la respiration.

$$Production\ nette\ (PN) + Respiration\ (R) = Production\ brute$$

Rôle (structure et fonction) des communautés procaryotes (bactéries et archées) dans le cycle de l'azote d'une vasière littorale du Pertuis Charentais : Influence des facteurs biotiques et abiotiques par une approche multi-échelles

Dans les vasières intertidales dominées par les diatomées, la production primaire est particulièrement forte à marée basse. Ce microphytobenthos peut être limité par les nutriments azotés en lien avec les communautés de procaryotes impliquées dans le cycle de l'azote. Ainsi, ce travail de thèse cherche, via une approche écologique, à décrire le rôle des communautés de procaryotes benthiques notamment liées au cycle de l'azote et ce, suivant différentes échelles temporelles liées aux cycles du microphytobenthos. Des échantillons de sédiment ont été prélevés dans la baie de Marennes-Oléron (Côte Atlantique, France) entre 0 et 10 cm de profondeur suivant 5 couches (0-0,5 cm, 0,5-1 cm, 1-2cm, 2-5 cm, 5-10 cm). Différents facteurs biotiques et abiotiques ont été mesurés et mis en relation avec la production bactérienne, les activités enzymatiques et les gènes fonctionnels liés au cycle de l'azote (impliqués dans la nitrification, la dénitrification et l'anammox). De plus, la diversité bactérienne et archéenne a été évaluée par pyroséquençage 454 afin de caractériser les communautés et leurs dynamiques en lien avec les facteurs forçants biotiques et abiotiques. Dans le but d'évaluer l'influence des paramètres abiotiques et de la production du microphytobenthos, des mesures *in situ* ont été couplées avec des mesures en conditions semi-contrôlées.

Mots-clés : bactéries, archées, cycle de l'azote benthique, vasières intertidales, rôle fonctionnel, diversité

Role (structure and function) of nitrogen-related prokaryotic communities in an intertidal mudflat of the Marennes-Oleron bay: multi-scale influence of biotic and abiotic drivers

In diatoms-dominated intertidal mudflats, at low tide the primary production is particularly high and microphytobenthos that can be limited by nitrogen-related nutrients is linked with N-related prokaryotic communities. Thus, this PhD thesis aim at describing by ecological approach, the role of benthic prokaryotic communities especially N-related ones, at various temporal scales linked to microphytobenthos life cycles. Sediment samples from Marennes-Oleron mudflat (Atlantic coast, France) were collected according to 5 layers: 0-0.5 cm, 0.5-1 cm, 1-2 cm, 2-5 cm and 5 to 10 cm below sediment surface (bsf). Various biotic (i.e. chlorophyll a) and abiotic parameters (i.e. nutrients, exopolymeric substances, water content, salinity, pH, temperature …) were recorded and linked with benthic bacterial production, enzymatic activities and N-related functional genes (i.e. implied in nitrification, denitrification, and anammox). Furthermore, the bacterial and archaeal diversity was assessed by 454 pyrosequencing in order to characterize the communities and shift in link with biotic and abiotic drivers. Aiming at evaluating the influence of abiotic parameters and microphytobenthic activities on the prokaryotic communities, *in situ* measurements were coupled to a semi-controlled approach.

Keywords: *Bacteria, Archaea,* benthic nitrogen cycle, interidal mudflats, functional role, diversity