



HAL
open science

**Cyanobactéries diazotrophes du Pacifique Sud :
variabilité saisonnière, caractérisation
morpho-génétique/chimique et potentiel de valorisation**

Emmrick André Saulia

► **To cite this version:**

Emmrick André Saulia. Cyanobactéries diazotrophes du Pacifique Sud : variabilité saisonnière, caractérisation morpho-génétique/chimique et potentiel de valorisation. Bactériologie. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2019. Français. NNT : 2019NCAL0003 . tel-03387248

HAL Id: tel-03387248

<https://unc.hal.science/tel-03387248>

Submitted on 26 Oct 2021

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.



Ecole Doctorale du Pacifique
Thèse Pour l'obtention de grade de :
Docteur en sciences
Discipline « Biologie des populations et écologie »

Présentée et soutenue par
Emmrick Saulia

**Cyanobactéries diazotrophes du Pacifique Sud : variabilité
saisonnnière, caractérisation morpho-génétique/chimique et
potentiel de valorisation**

Pour une soutenance prévue le 29 avril 2019 devant le jury composé de :

Rapporteurs	Pr. Thomas Olivier Dr. Dupouy Cécile	Professeur des universités, NUI, Galway Chargée de recherche HDR, IRD, MIO
Examineurs	Dr. Colin Fabrice Dr. Lebouvier Nicolas	Directeur de recherche, IRD, CEREGE Maître de conférence HDR, UNC
Directeurs	Dr. Bonnet Sophie Dr. Hnawia Edouard	Directrice de recherche, IRD, MIO Maître de conférence HDR, IRD

A mes parents, à qui je dois tout et sans qui rien ne serait possible, pour leur soutien sans faille dans tous ce que j'ai pu entreprendre.

Et

A mon pays, que l'aboutissement de cet ouvrage soit le signe qu'ensemble, main dans la main, la construction du pays et du destin commun est possible.



Case de la Grande chefferie du district de Gaïca-Lifou (Feneiwewe)

Remerciements

Avant tout je tiens à remercier l'ensemble du jury d'avoir accepté de juger ce travail et plus particulièrement le Pr. Olivier Thomas et le Dr. Cécile Dupouy pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'en être les rapporteurs ainsi qu'aux examinateurs, Fabrice Colin et Nicolas Lebouvier.

Mes remerciements vont également à mes deux directeurs de thèse, Sophie Bonnet et Edouard Hnawia. Je vous suis pleinement reconnaissant et je n'oublierais jamais ses trois dernières années de travail partagées ensemble et les acquis reçus. Merci pour m'avoir accordé votre confiance et proposé un sujet aussi intéressant. Merci pour la qualité (suivi, conseils, expertise...) de cette direction de thèse, je n'aurais changé de directeurs de thèse pour rien au monde, merci également pour la rigueur, la bonne gestion du travail à acquitter, le dévouement et le travail minutieux que vous m'aviez montré ses trois dernières années.

Je tiens à remercier, l'équipe chimie de l'UNC avec Mohammed Nour et particulièrement Nicolas Lebouvier pour les interventions et échanges qui m'ont été très précieux pour la partie phytochimique de ma thèse.

Je remercie chaleureusement et amicalement le Pr. Olivier Thomas. Merci pour votre expertise phytochimique et de m'avoir accueilli dans votre laboratoire en Irlande. Ce fut un honneur d'avoir pu intégrer votre laboratoire et les échanges partagés ont été aussi intéressants que fructueux. Un grand merci également à l'équipe du laboratoire de chimie à Galway et particulièrement à Kevin Calabro et Daniel Rodrigues pour leur accueil et leur jovialité. Votre bonne humeur et joie de vivre ont rendu mon séjour en Irlande inoubliable.

Je souhaite adresser de sincères remerciements à l'équipe ISEA et particulièrement Linda Guentas, Valérie Médévielle pour leurs conseils et le travail de haute qualité dans la réalisation des tests antimicrobiens. Un remerciement, également à Thomas Crossay et Cyril Antheaume pour leur aide dans l'élaboration de protocole et expertise dans l'analyse protéomique.

Un grand merci à l'institut Pasteur de m'avoir permis d'utiliser le MALDI-TOF-MS et particulièrement Emilie Barsac qui m'a été d'une grande aide à l'établissement de ma base de données MALDI.

Un grand merci à tous mes « grands frères et vieux » de l'IRD et notamment ceux du service général de l'IRD qui m'ont très bien accueilli, toujours encouragé et avec qui mes pauses

déjeuners étaient toujours synonymes de rigolade ; aux 2 « Mama » Hnanganyan et Marcel et à tous les « vieux », Nicaise, William, Sam, Joseph, Félice et tous les autres.

Aussi un grand merci à ma « bande », Alexandre Bourles, David Bruy, Malik Oedin avec qui les fou rires et massacres sont toujours garantis et avec qui je pouvais partager et délirer sans filtre. Egalement un grand merci, à tous les collègues doctorants que j'ai rencontré, Isis Guibert, Chloé Martias, Pauline Fey, Patrick Houssard, Benjamin Metoyer et particulièrement Mathieu Caffin, un ami doté d'une très grande gentillesse avec qui j'ai beaucoup partagé.

Je tiens à remercier énormément Mercedes Camps, avec qui j'ai commencé dans l'équipe MIO et avec qui j'ai énormément appris.

Je tiens enfin à remercier affectueusement tous les membres de ma famille, qui m'ont à chaque fois apporté « équilibre et liberté ». Il m'est impossible de tous vous citer tellement la famille kanak est nombreuse. Cependant, je remercie énormément l'équipe de la maison de Koutio, merci à chacun d'entre vous pour votre soutien. Merci, aux petites familles d'Edrena (Ericka, Steeve et Typhanie), de Pelehu (Laryssa, Nicolas, Wamaie et Imano) ainsi qu'à mes deux frères Iena et Ken. Un grand merci aussi à Tati pour avoir bien voulu corriger mes nombreuses fautes d'orthographe.

Je tiens également à remercier ma petite famille, ma chérie « Wailail » et ma petite fille adorée « Ipanue » qui m'ont supporté mais surtout soutenu pendant ses 3 années de thèse. Pupu, tu étais toujours là pour moi, tu m'écoutais quand je te racontais mes soucis, tu m'encourageais quand je baissais les bras, et tu me consolais quand je subissais un échec. Tu as fait tout ça pour moi et je t'en remercie.

Pour finir, je tiens à remercier respectueusement mes parents. Je sais bien que je ne le dis pas, en tout cas pas assez, mais je ressens une gratitude infinie pour chaque chose que vous avez fait pour moi. Merci, car sans vous rien de tout cela n'aurait été possible, merci pour les sacrifices concédés, le soutien moral et les encouragements. Les valeurs de respect, d'humilité, de partage et de courage que vous m'avez inculqués, n'ont eu de cesse à chaque instant de me porter vers l'avant. Oleti atraquatr !

Table des matières

I - Introduction générale.....	1
I.1 Le phytoplancton marin.....	2
I.1.1 Généralités.....	2
I.1.2 Rôle du phytoplancton dans le cycle du carbone.....	3
I.2 Les cyanobactéries marines.....	4
I.2.1 Définition.....	4
I.2.2 Origine et évolution.....	4
I.2.3 Morphologie et organisation cellulaire.....	5
I.3 Le cas particulier des cyanobactéries fixatrices d'azote atmosphérique.....	6
I.3.1 Diazotrophie et cycle biogéochimique de l'azote dans l'océan.....	6
I.3.2 Le cas particulier du Pacifique tropical Sud-Ouest.....	8
I.3.3 Diversité des cyanobactéries diazotrophes et stratégies physiologique.....	10
I.3.4 Les facteurs contrôlant la distribution de la diazotrophie dans l'océan.....	15
I.4 Méthodes d'identification des cyanobactéries.....	16
I.4.1 Approche moléculaire.....	16
I.4.2 La spectrométrie de masse : MALDI-TOF-MS.....	17
I.5 Valorisation des cyanobactéries.....	19
I.5.1 Nutraceutique, cosmétique et pharmaceutique.....	20
I.5.2 Les cyanobactéries diazotrophes du Pacifique Sud-Ouest et Nouvelle-Calédonie : un potentiel peu exploré.....	21
I.6 Objectifs de la thèse.....	23
II - Caractérisation de l'abondance, de la distribution des phylotypes diazotrophes et des taux de fixation de N ₂ dans le lagon de nouvelle-calédonie.....	26
II.1 Introduction.....	27
II.2 Article: Variabilité des taux de fixation d'azote et des principaux protagonistes diazotrophes: tendances observées sur une série temporelle de quatre ans dans le lagon de Nouvelle-Calédonie (Pacifique Tropical Sud-Ouest).....	28
II.3 Conclusion.....	49
III - Caractérisation morpho-génétique et évaluation de la méthode MALDI-TOF-MS pour l'identification de souches cyanobactériennes diazotrophes isolées du Pacifique Sud-Ouest.....	51
III.1 Introduction.....	52
III.2 Matériels et méthodes.....	54
III.2.1 Culture des cyanobactéries.....	54
III.2.2 Identification morphologique.....	55
III.2.3 Analyses moléculaires.....	55

III.2.4	Analyse du protéome par MALDI-TOF-MS	57
III.3	Résultats	59
III.3.1	Identification morphologique.....	59
III.3.2	Identification génétique.....	64
III.3.3	Analyse taxonomique par spectrométrie de masse et comparaison taxonomique avec la méthode moléculaire.....	67
III.4	Discussion	73
III.4.1	Caractérisation morpho-génétique.....	73
III.4.2	Evaluation du potentiel de la méthode MALDI-TOF-MS.....	74
III.5	Conclusion.....	77
IV	Potentiel de valorisation des souches de cyanobactéries diazotrophes isolées du Pacifique Sud-Ouest.....	79
IV.1	Introduction	80
IV.2	Matériels et méthodes.....	82
IV.2.1	Cultures de cyanobactéries.....	83
IV.2.2	Extraction et fractionnement.....	83
IV.2.3	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	84
IV.2.4	Evaluation du potentiel cosmétique.....	87
IV.2.5	Evaluation phytochimique	90
IV.3	Résultats	92
IV.3.1	Activités antibactériennes	92
IV.3.2	Activités enzymatiques	94
IV.3.3	Evaluation phytochimique	97
IV.4	Discussion	104
IV.4.1	Activité antibactérienne	104
IV.4.2	Activités enzymatiques	105
IV.4.3	Evaluation phytochimique	107
IV.5	Conclusion.....	109
V	Conclusions et perspectives	111
V.1	Synthèse des résultats obtenus	112
V.2	Perspectives de recherche.....	113
	Références bibliographiques	115
	ANNEXE 1 : Figures supplémentaires de l'article « Variabilité des taux de fixation d'azote et des principaux protagonistes diazotrophes: tendances observées sur une serie temporelle de quatre ans dans le lagon de Nouvelle-Calédonie (Pacifique tropical Sud-Ouest) ».....	140

Chapitre 1

Introduction générale

SOMMAIRE

I - Introduction générale.....	1
I.1 Le phytoplancton marin	2
I.1.1 Généralités	2
I.1.2 Rôle du phytoplancton dans le cycle du carbone	3
I.2 Les cyanobactéries marines	4
I.2.1 Définition.....	4
I.2.2 Origine et évolution	4
I.2.3 Morphologie et organisation cellulaire.....	5
I.3 Le cas particulier des cyanobactéries fixatrices d'azote atmosphérique.....	6
I.3.1 Diazotrophie et cycle biogéochimique de l'azote dans l'océan	6
I.3.2 Le cas particulier du Pacifique tropical Sud-Ouest	8
I.3.3 Diversité des cyanobactéries diazotrophes et stratégies physiologique	10
I.3.4 Les facteurs contrôlant la distribution de la diazotrophie dans l'océan	15
I.4 Méthodes d'identification des cyanobactéries	16
I.4.1 Approche moléculaire.....	16
I.4.2 La spectrométrie de masse : MALDI-TOF-MS	17
I.5 Valorisation des cyanobactéries.....	19
I.5.1 Nutraceutique, cosmétique et pharmaceutique	20
I.5.2 Les cyanobactéries diazotrophes du Pacifique Sud-Ouest et Nouvelle-Calédonie : un potentiel peu exploré.....	21
I.6 Objectifs de la thèse	23

I.1 Le phytoplancton marin

I.1.1 Généralités

Le phytoplancton (du grec *phyton* ou plante et *planktos* ou errant) est constitué par l'ensemble du plancton végétal, c'est-à-dire des micro-organismes photosynthétiques libres, passifs et en suspension dans la colonne d'eau. Selon la définition de Hensen (1887), le terme plancton désigne l'ensemble des organismes vivant dans un environnement aquatique et ne présentant pas de mouvement propre horizontal. Le déplacement de ces organismes est majoritairement dominé par l'action des courants, traduisant un transport passif. Néanmoins, certains de ces micro-organismes, en faible proportion, sont capables de transport actif (*e.g.* présence de flagelles, migration verticale).

La taille a souvent été utilisée comme critère de classification du phytoplancton, qui regroupe le picoplancton (< 2 µm), le nanoplancton (2 µm-20 µm) et le microplancton (> 20 µm et < quelques mm). Cependant les organismes planctoniques peuvent être distingués également selon leur fonction. Le Quéré et al. (2016) ont décrit 10 types fonctionnels de plancton (PFT) dont 6 PFT sont dédiés au phytoplancton (Tab. I-1). Ainsi, les critères utilisés pour distinguer un PFT sont qu'il ait un rôle biogéochimique explicite, que le PFT soit défini par un ensemble distinct d'exigences physiologiques, environnementales ou nutritionnelles contrôlant sa biomasse et sa productivité. Les 6 PFT du phytoplancton sont présentés dans le tableau I-1. On y trouve par exemple, le phytoplancton fixateur d'azote atmosphérique (N₂) (*e.g.* *Trichodesmium* ; Capone et al. 1997) dont il est question dans cette thèse, le phytoplancton calcifiant (*e.g.* les *coccolithophoridés*) et le phytoplancton silicifiant (*e.g.* les diatomées).

Tableau I-1 : Biomasse et répartition des types fonctionnels du plancton (PFT) par taille (Le Quéré et al. 2016).

Size class	Biomass (PgC)	PFT name	Cell Size (µm)
<i>Bacteria</i>			
Pico	0.35*	Pico-heterotrophs	0.3–1.0
<i>Phytoplankton</i>			
Pico	0.28 [†]	Pico-autotrophs	0.7–2.0
		Phytoplankton N ₂ -fixers	0.5–2.0 [‡]
Nano	0.39 [†]	Phytoplankton calcifiers	5–10
		Phytoplankton DMS-producers	5 [§]
Micro	0.11 [†]	Mixed-Phytoplankton	2–200
<i>Zooplankton</i>		Phytoplankton silicifiers	20–200
Proto	0.16 [¶]	Proto-zooplankton	5–200
Meso	0.10	Meso-zooplankton	200–2000
Macro	Unknown	Macro-zooplankton	>2000

L'introduction des techniques moléculaires en écologie microbienne a considérablement enrichi nos connaissances concernant l'identification des plus petits micro-organismes aquatiques tels que le phytoplancton et ont conduit à la découverte d'une riche biodiversité (Lefranc et al. 2005 ; López-García et al. 2001 ; Sogin et al. 2006). Cette richesse du phytoplancton, tant du point de vue de l'abondance que de la diversité, est restée insoupçonnée pendant de nombreuses décennies, notamment dans les zones tropicales, pauvres en chlorophylle *a* (Chl *a*) et en éléments nutritifs (azote, phosphore et métaux traces) aussi appelées régions oligotrophes. En effet, ces régions ont longtemps été considérées comme de véritables déserts biologiques, alors qu'elles sont en fait peuplées d'une multitude de cellules photosynthétiques de petite taille, constituant le « picophytoplancton » majoritairement composé de cyanobactéries.

I.1.2 Rôle du phytoplancton dans le cycle du carbone

Depuis la révolution industrielle, la concentration en dioxyde de carbone (CO₂) dans l'atmosphère a augmenté de 280 ppm à plus de 400 ppm (<https://scripps.ucsd.edu/programs/keelingcurve>). Cette augmentation est aujourd'hui reconnue comme étant la cause majeure du dérèglement climatique actuel (IPCC, 2014). L'océan constitue un puits majeur de CO₂ anthropique pour l'atmosphère et a séquestré depuis le début de l'ère industrielle 118±19 Pg de carbone, représentant 48% des émissions de CO₂ dues à la consommation de carburants fossiles et la fabrication des ciments (Sabine et al. 2004). Cette séquestration de CO₂ se fait au moyen de la pompe thermodynamique, correspondant aux échanges de gaz à la surface de l'océan, et de la pompe biologique à carbone correspondant au transfert de carbone depuis la surface vers l'océan profond par des processus biologiques principalement assurés par les organismes phytoplanctoniques. Le carbone inorganique (CO₂) est assimilé par les organismes autotrophes (phytoplancton) lors de la photosynthèse, qui le transforment en carbone organique. La majeure partie du carbone organique produit reste dans la couche de surface éclairée (ou euphotique où se produit la photosynthèse) des océans, où il est reminéralisé dans la colonne d'eau par voie bactérienne ou transite vers des réseaux trophiques supérieurs. Une autre partie du carbone organique produit (~10 Pg C an⁻¹) est exportée hors de la couche de surface éclairée vers les couches profondes de l'océan sous forme particulaire ou dissoute (Dunne et al. 2007; Hopkinson et Vallino 2005; Siegel et al. 2014). Une petite partie du carbone organique (0,2 Pg C an⁻¹) atteint le fond de l'océan où il est séquestré durablement dans les sédiments (Ciais et al. 2013). Cet export par la pompe biologique

représente un puits durable de carbone pour l'atmosphère. On estime que la quantité de CO₂ fixé à l'échelle globale au niveau de la couche euphotique assure la moitié de la production primaire globale (~50 Pg C an⁻¹), en dépit du fait que la biomasse photosynthétique dans les océans (*i.e.* le phytoplancton) soit relativement faible par rapport à la biomasse continentale (Field et al. 1998), ce qui témoigne de la grande efficacité du phytoplancton marin dans la fixation de carbone à l'échelle globale.

I.2 Les cyanobactéries marines

I.2.1 Définition

Les cyanobactéries sont des organismes procaryotes cosmopolites de type Gram négative (Whitton et Potts 2012). Ces organismes sont très divers, allant des petites formes unicellulaires (picoplancton avec une taille inférieure à 2 µm), jusqu'à des formes de plus grandes tailles (taille comprise entre 3 à 60 µm). Elles ont la particularité de présenter des propriétés communes à la fois aux organismes photosynthétiques eucaryotes (*i.e.* les micro-algues eucaryotes) et aux bactéries. Les cyanobactéries et les micro-algues eucaryotes sont caractérisées par la présence de Chl *a* et des photosystèmes I et II intervenant dans les mécanismes de photosynthèse en absorbant les photons. Elles sont également caractérisées par l'absence de membrane nucléaire, de mitochondries, de réticulum endoplasmique et par la présence d'une paroi cellulaire caractéristique des bactéries Gram⁻. Elles possèdent des pigments photosynthétiques particuliers, communs à certaines algues (*e.g.* les Rhodophytes) appelées les phycobiliprotéines.

I.2.2 Origine et évolution

D'un point de vue systématique, les cyanobactéries représentent un groupe évolutif monophylétique au sein des eubactéries (Wilmotte et Herdman 2001). Plusieurs phylogénies réalisées à l'aide de différents marqueurs montrent que ces organismes ont été l'un des premiers groupes à diverger au sein de la lignée bactérienne ancestrale (Blank 2004). Les cyanobactéries ont une origine très ancienne et seraient apparues juste après les bactéries mésophiles réductrices de sulfates. Cependant, actuellement leur origine évolutive reste un sujet très controversé mais des traces fossiles suggèrent que les cyanobactéries soient apparues il y a 3,5 milliards d'années (Schopf et al, 1996). Entre 2,5 et 0,5 milliards d'années, les cyanobactéries constituaient l'essentiel de la biomasse vivante à la surface de la Terre ayant pour conséquence l'accroissement du taux d'oxygène et la diminution du taux de CO₂ de l'atmosphère terrestre,

responsable de l'apparition de la vie terrestre vers des formes plus évoluées (algues, plantes puis animaux).

Les cyanobactéries sont divisées en huit ordres : les Chroococcales, les Chroococciopsidales, les Gloeobacterales, les Oscillatoriales, les Nostocales, les Pleurocapsales, les Spirulinales et les Synechococcales (Komarek et al. 2014).

I.2.3 Morphologie et organisation cellulaire

Les cyanobactéries présentent une grande diversité de formes et de tailles. Elles peuvent être unicellulaires ou filamenteuses. Les cyanobactéries unicellulaires présentent des formes de type sphérique, cylindrique, ovoïde ou ellipsoïdal. Elles vivent soit sous forme libre soit en agrégats parfois formés au sein d'un biofilm (composé entre autres d'exopolysaccharides). Ces agrégats résultent de multiples divisions cellulaires et forment des colonies de structure plus ou moins régulière selon les espèces considérées. Les cyanobactéries filamenteuses (ou trichomes) peuvent être libres ou regroupées en colonies, telle que *Trichodesmium* sp. qui peut constituer des agrégats de plusieurs centaines de trichomes formant ainsi des colonies fusiformes (« Tufts ») alignées en parallèle, ou des colonies sphériques (« Puffs ») alignées radialement.

Au cours de l'évolution, les cyanobactéries ont été également les premiers organismes procaryotes dotées de deux photosystèmes (I et II) capables d'utiliser l'eau comme donneur d'électron et de produire de l'oxygène. Les photosystèmes de type I et II sont similaires chez les cyanobactéries et les micro-algues eucaryotes. Chez ces organismes, les antennes collectrices de l'énergie lumineuse (phycobilisomes) sont attachées en périphérie des membranes de thylakoïdes. Les phycobilisomes sont constitués de phycobiliprotéines. Il existe quatre types principaux de phycobiliprotéines : l'allophycocyanine, la phycocyanine, la phycoérythrine et la phycoérythrocyanine. La nature des chromophores (phycocyanobiline, phycoroubiline, phycoérythrocyanine) constituant les phycobiliprotéines détermine les longueurs d'onde de la lumière pouvant être captées puis utilisées pour la photosynthèse. De manière générale, les cyanobactéries utilisent la lumière dans l'orange et le vert (entre 500 et 660 nm (Gantt 1975)).

En plus des cellules végétatives non différenciées, il existe des formes cellulaires spécialisées qui s'ajoutent à la diversité des formes et des fonctions présentes chez les cyanobactéries. Par exemple, certaines cyanobactéries diazotrophes capables de fixer l'azote atmosphérique (N₂) possèdent des cellules spécialisées appelées hétérocystes.

I.3 Le cas particulier des cyanobactéries fixatrices d'azote atmosphérique

I.3.1 Diazotrophie et cycle biogéochimique de l'azote dans l'océan

Dans la couche euphotique océanique, c'est la disponibilité en nutriments et notamment en azote (Eppley et Peterson 1979) qui contrôle la production primaire et l'efficacité de la pompe biologique. Mis à part les zones HNLC (High Nutrient, Low Chlorophyll) caractérisées par une limitation en fer, l'azote est le principal élément limitant de la production primaire dans l'océan (Moore et al. 2013, Fig. I-1).

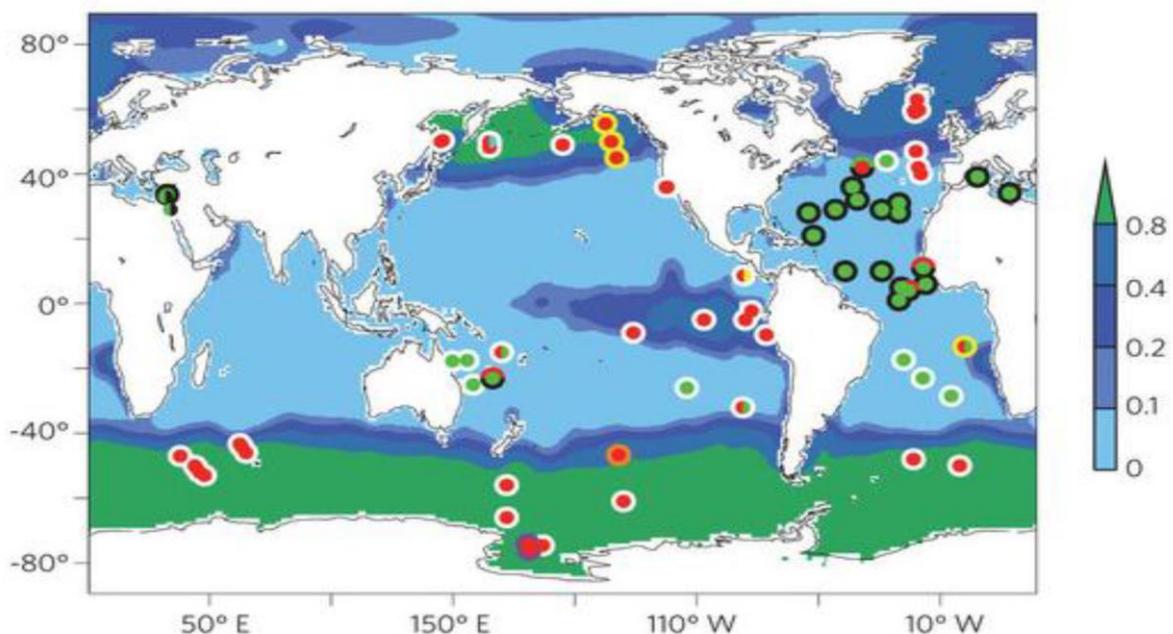


Figure I-1 : Carte de la distribution des concentrations en NO_3^- (en $\mu\text{mol kg}^{-1}$) dans l'océan de surface. Les symboles indiquent le nutriment principal (cercle central) et secondaire (cercle extérieur) limitant la production primaire d'après des expériences d'enrichissement artificielles en N (vert), P (noir), Fer (rouge), Si (orange), Co (jaune), Zn (bleu), et vitamine B12 (violet). Les cercles blancs indiquent l'absence de nutriment secondaire limitant, principalement due à l'absence de données. D'après Moore et al. (2013).

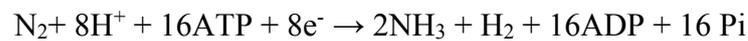
Cette limitation est plus grande dans les zones oligotrophes, caractérisée par des concentrations en azote faibles ($< 0,2 \mu\text{mol kg}^{-1}$). Elles représentent 70% de la surface des océans (Arrigo, 2005; Gruber, 2005).

La source d'azote utilisée par le phytoplancton est composée de trois catégories :

- l'assimilation de l'azote inorganique dissous (DIN) composé de plusieurs molécules : le NH_4^+ (ammonium) et le NO_3^- (nitrate) ;
- l'assimilation de l'azote organique dissous (DON) ;

- la fixation du diazote atmosphérique (N₂).

Dans l'océan, le N₂ dissous est la forme chimique majoritaire. Toutefois, la triple liaison covalente de cette molécule la rend très stable et limite donc sa biodisponibilité pour la majeure partie des organismes planctoniques. Seuls certains procaryotes appelés diazotrophes possèdent une enzyme (*i.e.* la nitrogénase), capable de cliver cette triple liaison et de métaboliser le N₂ en une forme assimilable par les cellules (NH₃) selon la réaction suivante :



Cette activité diazotrophe est très coûteuse en énergie par rapport à l'assimilation de NH₄⁺ ou de NO₃⁻ (Falkowski 1983; Gallon 1992). Ce processus est donc observé principalement dans les zones oligotrophes où la disponibilité en azote est réduite, même si ce modèle tend à être démenti (Dekaezemacker et Bonnet 2011; Knapp 2012). La source de N₂, inépuisable à la surface de la terre et dans l'océan, confère un très net avantage compétitif à ces organismes, notamment dans les environnements limités en NO₃⁻ (cas de l'océan oligotrophe) représentant 70% de la surface de l'océan global (Fig. I-2), en particulier les eaux éclairées du Pacifique Sud-Ouest.

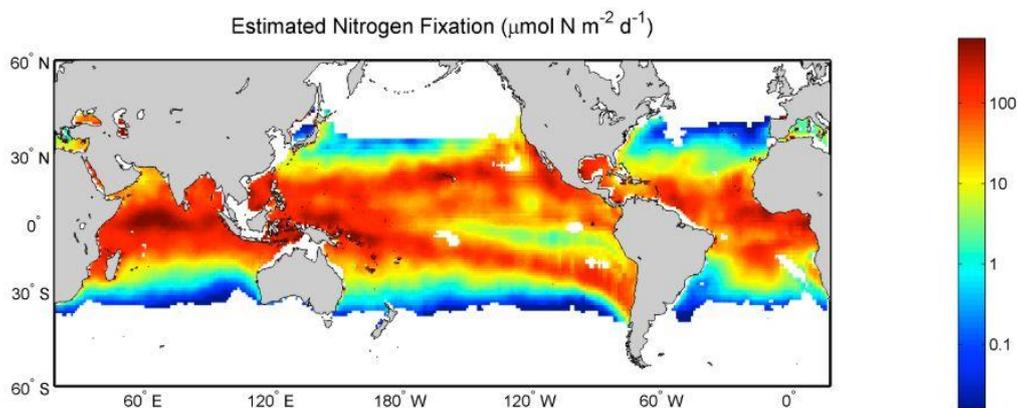


Figure I-2 : Carte des flux intégrés de fixation d'azote atmosphérique (µmol N m⁻² d⁻¹) dans l'océan global estimés à partir de l'analyse statistique des données compilé par Luo et al. (2012). D'après Luo et al. (2014).

Depuis l'apparition des outils isotopiques (Montoya et al. 1996), les données de flux de fixation d'azote ont considérablement augmenté et provoqué une ré-évaluation à la hausse des taux de fixation d'azote dans l'océan ces 30 dernières années. Elle est aujourd'hui considérée comme la source majeure d'azote externe dans l'océan, surplombant les apports d'azote par les fleuves et rivières et ceux d'origine atmosphérique (Gruber 2008). Des études ont montré que la fixation d'azote pouvait être une source d'azote nouveau aussi importante que l'apport de NO₃⁻ par

diffusion verticale dans l'Atlantique et le Pacifique tropical Nord (Capone et al. 2005; Karl et al. 1997) et 10 fois plus importante dans le Pacifique tropical Sud-Ouest (Caffin et al. 2018a). La diazotrophie soutient environ 50% de la production primaire dans les régions oligotrophes (Bonnet et al. 2009; Raimbault et Garcia 2008; Shiozaki et al. 2013) et jusqu'à 90% dans le Pacifique Sud-Ouest (Caffin et al. 2018a), également la production du zooplancton (Hunt et al., 2016 ; Caffin et al., 2018b) et structure l'ensemble de la communauté planctonique (Lenes et Heil 2010; Mulholland 2007; Bonnet et al. 2016).

I.3.2 Le cas particulier du Pacifique tropical Sud-Ouest

L'océan Pacifique tropical Sud-Ouest est une vaste région qui s'étend de l'Australie jusqu'à la limite Ouest du gyre du Pacifique Sud. Historiquement, Dupouy et al. (2000) ont attribué les efflorescences de chlorophylle observées en période estivale à des blooms de *Trichodesmium* (*i.e.* une cyanobactérie diazotrophe) dans cette région, mais la quantification précise des taux de fixation d'azote à l'échelle régionale, ainsi que la caractérisation des organismes impliqués dans ce processus étaient jusqu'à récemment très peu documentées (Luo et al. 2012) et limitées à quelques études ponctuelles en milieu hauturier (*e.g.* Garcia et al. 2007) et côtier (Rodier et Le Borgne 2010). Depuis 2012, notre équipe IRD a participé à de nombreuses campagnes océanographiques dans la région. La figure I-3 (Bonnet et al. 2017) synthétise les résultats de 6 campagnes réalisées depuis 2012 regroupant plus de 600 données. Elles révèlent des taux moyens de $570 \mu\text{mol N m}^{-2} \text{j}^{-1}$ dans cette région du Pacifique Sud-Ouest, c'est à dire des taux 3 à 4 fois supérieurs que ceux prédits par les modèles dans cette région (Gruber, 2006) et environ 10 fois plus élevés que dans les autres régions océaniques. Ces données révèlent également que ce hot spot de fixation d'azote s'étend sur une vaste région d'Ouest en Est, allant de l'Australie/Papouasie-Nouvelle-Guinée à l'ensemble des archipels mélanésiens (Nouvelle-Calédonie, Vanuatu, Fidji) jusqu'à l'archipel de Tonga à l'Est.

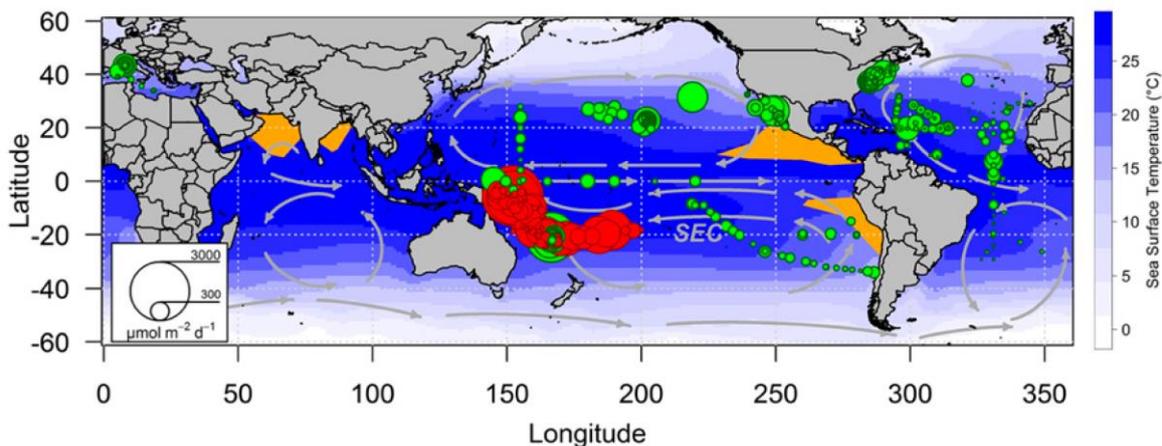


Figure I-3 : Distribution des taux de fixation d’azote dans l’océan global quantifiée à l’aide de mesures par la méthode du marquage isotopique au $^{15}\text{N}_2$. Points verts: taux de fixation d’azote intégrés ($\mu\text{mol N m}^{-2} \text{j}^{-1}$) de la base de données MAREDAT et de Knapp et al. (2016). Points rouges: taux de fixation d’azote quantifiés à 57 stations (Pacifique Sud-Ouest). Flèches grises: principaux courants de surface. Zones ombrées en orange: principales zones minimum d’oxygène. D’après (Bonnet et al. 2017 PNAS).

Actuellement, les raisons de ce succès écologique des diazotrophes dans cette région sont toujours en discussion (Bonnet et al. 2017). Bonnet et al. (2018) et Guieu et al. (2018) ont mis en évidence les facteurs les plus plausibles expliquant ces taux de fixation d’azote et notamment des processus de fertilisation en fer (*i.e.* un constituant majeur de l’enzyme nitrogénase) par l’activité volcanique sous-marine au niveau de l’archipel de Tonga. L’hypothèse émise par Bonnet et al. (2018) est la suivante : lorsque ces eaux chargées en phosphate arrivent du Pacifique Sud-Est et traversent le gyre du Pacifique Sud (Pacifique central) qui présente des températures de surface optimales pour la diazotrophie ($>25\text{ }^\circ\text{C}$), rien ne se produit (il n’y a pas de diazotrophie) car les eaux du gyre sont déplétées en fer (Blain et al. 2008). Lorsque ces eaux riches en phosphate dépassent l’arc de Tonga pour arriver dans le Pacifique Sud-Ouest (autour des archipels mélanésien), les fortes concentrations en fer dans la couche de surface associées à des températures de surface $>25\text{ }^\circ\text{C}$ et des concentrations en phosphate $>50\text{ nM}$ constituent ensemble des conditions optimales pour le développement des diazotrophes, ce qui pourrait expliquer leur succès écologique et le hot spot de fixation d’azote que nous observons dans cette région. Bien entendu les travaux doivent se poursuivre afin de comprendre en détail les mécanismes mis en jeu, et notamment afin de quantifier les processus de fertilisation en fer d’origine hydrothermale au niveau de l’arc de Tonga (Projet ANR TONGA à venir), leur distribution dans le Pacifique Sud-Ouest via l’hydrodynamisme et sa disponibilité pour la biologie.

I.3.3 Diversité des cyanobactéries diazotrophes et stratégies physiologique

Dans l'océan, la fixation d'azote est effectuée par les différents types de cyanobactéries diazotrophes:

- A/ les cyanobactéries filamenteuses hétérocystées vivant sous forme libre ou symbiotique (e.g. *Richelia* sp.; Fig. I-4A)
- B/ les cyanobactéries filamenteuses non-hétérocystées (e.g. *Trichodesmium* sp. ; Fig. I-4B)
- C/ les cyanobactéries unicellulaires (UCYN), où trois groupes distincts ont été identifiés à partir de la séquence du gène *nifH* codant pour la nitrogénase:
 - le groupe A à ce jour non-cultivé (UCYN-A) (Zehr et al. 2008) (Fig. I-4C)
 - le groupe B (UCYN-B) (e.g. *Crocospaera watsonii*) (Zehr et al. 2001) (Fig. I-4D)
 - le groupe C (UCYN-C) (e.g. *Cyanothece* sp.) (Taniuchi et al. 2012) (Fig. I-4E)

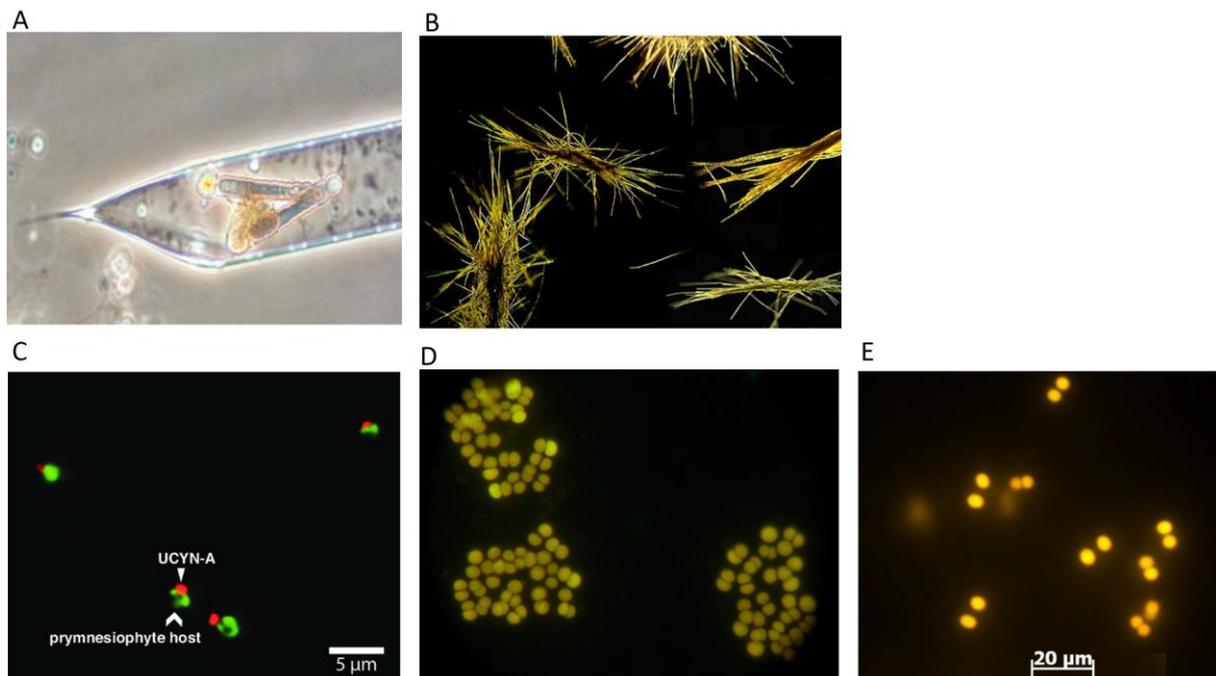


Figure I-4 : Photos des différents groupes de cyanobactéries diazotrophes. Image en microscopie à épifluorescence de *Richelia intracellularis* en association avec *Rizosolenia* spp. (A), de *Trichodesmium* sp. associées en colonies (en puff) (B) (Photo. B Bergman, Stockholm University), de la symbiose prymnesiophyte / UCYN-A ciblée par la technique FISH-SIMS (C) (photo par Cabello et al. 2015), de *Crocospaera watsonii* (D) (R Foster) et de *Cyanothece* sp. (Photo par M. Camps).

A/ Les cyanobactéries filamenteuses hétérocystées vivant sous forme libre ou symbiotique

Les cyanobactéries diazotrophes hétérocystées en association symbiotique avec des diatomées (DDAs), facilement identifiables en microscopie, sont l'un des groupes les plus

étudiés (Fay et al. 1968; Stewart 1973; Lemmerman, 1905; Sournia, 1970). Elles ont largement été identifiées dans les eaux oligotrophes et pratiquement dans tous les océans tropicaux et subtropicaux (Luo et al. 2012; Jabir et al. 2013) ainsi que dans des panaches de grands fleuves tels que l'Amazone (Subramaniam et al. 2008; Bombar et al. 2011). *Richelia intracellularis* et *Calothrix rhizosoleniae* sont les espèces les plus souvent observées, sous forme libre, mais le plus souvent en symbiose avec des diatomées du genre *Rhizosolenia* spp., *Hemiaulus* spp. et *Chaetoceros* spp. (Foster et al. 2011; 2006; Janson et al. 1999; Sournia, 1970; Tomas, 1997).

B/ Les cyanobactéries filamenteuses non-hétérocystées

Trichodesmium est la cyanobactérie filamenteuse non hétérocystée la plus étudiée. Elle est également reconnue comme un acteur majeur de la fixation d'azote et aussi l'un des plus abondants dans l'océan (Capone et al. 1997). *Trichodesmium* se regroupe en filaments (trichomes), formant des colonies visibles à l'œil nu. Elles sont présentes dans les eaux tropicales et subtropicales où la température est supérieure à 20 °C (Capone et al. 1997; Laroche et Breitbarth 2005). Elles forment aussi régulièrement dans les zones tropicales et subtropicales des efflorescences qui peuvent être observées depuis l'espace (Dupouy et al. 1988; Subramaniam et al. 2002) (Fig. I-5).

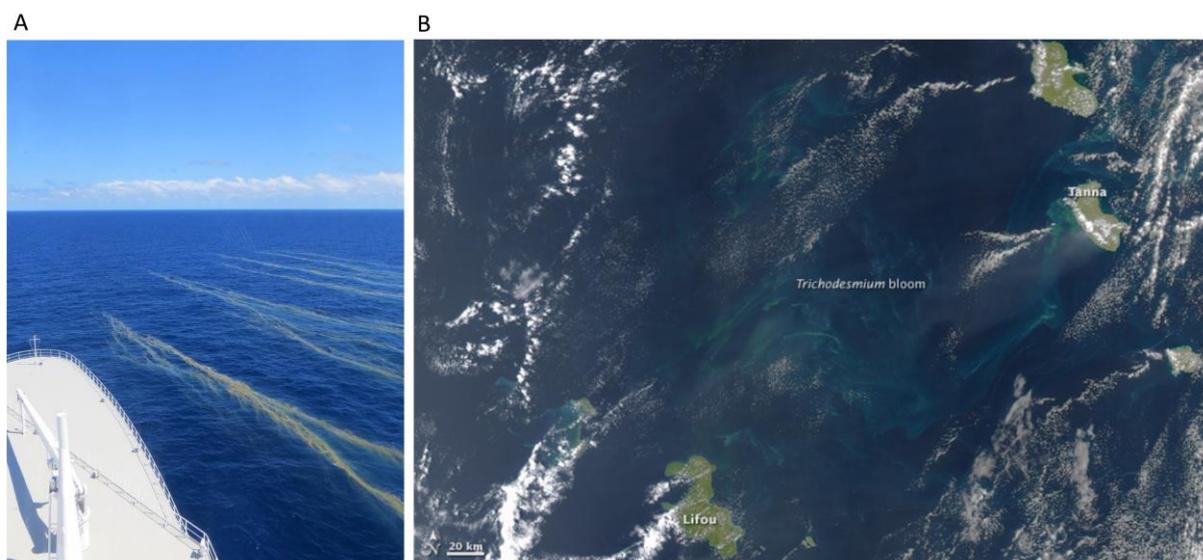


Figure I-5 : (A) Efflorescence de *Trichodesmium* observée au large de la grande barrière de corail en Australie (<https://fr.wikipedia.org/wiki/Trichodesmium>). (B) Efflorescence de *Trichodesmium* au large de la Nouvelle-Calédonie observée depuis l'espace (National Aeronautics and Space Administration).

Ces efflorescences sont aussi bien répertoriées en milieu côtier (Biddanda et Benner 1997; Rodier et Le Borgne 2010) qu'en milieu hauturier (Carpenter et Price 1977; Laroche et Breitbarth 2005) avec une saisonnalité marquée dans l'océan Indien (Bergman 2001; Burford

et al. 1995) et dans le Pacifique Sud-Ouest (Garcia et al. 2007; Dupouy et al. 2011; C Dupouy et al. 2004).

C/ les cyanobactéries diazotrophes unicellulaires (UCYN)

Historiquement, les recherches sur la fixation d'azote dans l'océan se sont focalisées sur les cyanobactéries diazotrophes hétérocystées en association symbiotique avec des diatomées DDAs et *Trichodesmium*. Toutefois, les taux élevés de fixation d'azote dans le Pacifique et des faibles abondances mesurées en *Trichodesmium* et DDAs ont permis à la communauté scientifique de soupçonner la contribution d'autres diazotrophes et notamment les UCYN. En effet, l'isolement de *Crocospaera watsonii* (Waterbury et Rippka, 1989) dans les années 80 a permis la découverte des UCYN. L'absence de méthode permettant une mesure d'abondance précise a engendré un manque de données relatives à la contribution de la fixation d'azote de ces organismes. La diversité des cyanobactéries diazotrophes dans les océans a été élargie avec la caractérisation des séquences de gènes *nifH* (Zehr et al. 1998), permettant par la suite la différenciation entre les UCYN du groupe B (e.g. *Crocospaera watsonii*) et celui du groupe C (e.g. *Cyanothece* ATCC51142). Les nouvelles méthodes d'identification moléculaire ont révélé une abondance des UCYN très souvent plus importantes que *Trichodesmium* (Luo et al. 2012; Moisander et al. 2010) et d'autres études ont mis en évidence que leur contribution à la diazotrophie totale était égale voire supérieure à celle de *Trichodesmium* dans le Pacifique (Bonnet et al. 2009) et l'Atlantique tropical (Benavides et al. 2013). Elles ont aussi rendu possible l'identification d'un nouveau groupe d'UCYN appelé *Candidatus Atelocyanobacterium Thalassa* et plus communément UCYN-A (Langlois et al. 2005; 2008) qui n'a pas encore été à ce jour isolé en culture. D'après Luo et al. (2012), le groupe des UCYN-A serait le plus abondant dans l'océan global. On les retrouve majoritairement dans des eaux plus profondes et/ou froides (<25 °C) de l'Atlantique (Langlois et al. 2005 ; 2008), du Pacifique (Church et al. 2009) et de la Méditerranée (Man-aharonovich et al. 2007) comparativement à *Trichodesmium* et *Crocospaera watsonii* qui se développent plutôt dans les eaux de surface chaudes (>25 °C) (Moisander et al. 2010; Stenegren et al. 2018; Bonnet et al. 2015; Church et al. 2005). Il a été démontré que les UCYN-A forment une association épisymbiotique avec un organisme photosynthétique du genre *Braarudosphaera* (Thompson et al. 2012) car elles ne possèdent pas de gène codant pour le photosystème II (Zehr et al. 2008). Cette association permet d'échanger le N₂ fixé par les UCYN-A et du carbone issu de la photosynthèse par l'hôte photosynthétique *Braarudosphaera* sp. (Thompson et al. 2012; Krupke et al. 2013).

Les 3 types de cyanobactéries marines diazotrophes décrites ci-dessus possèdent chacune des stratégies différentes de séparation de la fixation d'azote et de la photosynthèse. En effet, le processus de fixation d'azote qui est réalisé par l'enzyme nitrogénase est inhibé par l'oxygène produit lors de la photosynthèse. On parle ainsi d'un processus anaérobie strict contraignant les diazotrophes photosynthétiques à développer 3 stratégies de séparation de la fixation d'azote de la photosynthèse (Fig. I-6) :

1) Les DDAs possèdent des cellules non photosynthétiques en position terminale des trichomes, appelées hétérocystes, exclusivement spécialisées dans la fixation d'azote. Il s'agit de cellules anaérobies formant une ségrégation spatiale, exprimant la nitrogénase et constituées d'une membrane empêchant la diffusion de l'oxygène. Cette ségrégation permet par la faible concentration d'oxygène, l'expression du gène *nifH*, qui code pour l'enzyme nitrogénase (Fig. I-6). L'azote fixé par les symbiotes cyanobactériens est transmis par la suite aux diatomées partenaires (Foster et al. 2011).

2) Afin de protéger la nitrogénase de l'oxygène produit lors de la photosynthèse, *Trichodesmium* effectue une ségrégation spatiale et temporelle de la fixation d'azote et de la photosynthèse au sein des filaments (Berman-Frank et al. 2003) (Fig. I-6). En effet, les cellules spécialisées, appelés diazocytes, fixent activement le N₂ et assurent le transfert en azote vers les cellules non actives via l'excrétion de NH₄⁺ ou d'acides aminés (Mulholland 2007b). Il a été démontré que l'expression du gène *nifH* codant pour la nitrogénase s'effectue au plus haut, au milieu de la journée lorsque la concentration en oxygène diminue (Berman-Frank et al. 2003), causée par l'intensification des processus de respiration et réaction de Mehler (Carpenter et Roenneberg 1995; Kana 1993; Milligan et al. 2007).

3) Les UCYN possèdent la particularité de découpler temporellement la photosynthèse de la fixation d'azote en réalisant cette dernière la nuit afin de protéger la nitrogénase d'une exposition à de fortes concentrations en oxygène (Fig. I-6) (Dron et al. 2012; Hewson et al. 2009; Shi et al. 2010). Les UCYN-A, photo-hétérotrophes, ne produisent pas d'oxygène du fait de l'absence du photosystème II et peuvent donc effectuer la fixation d'azote le jour (Zehr et al. 2007).

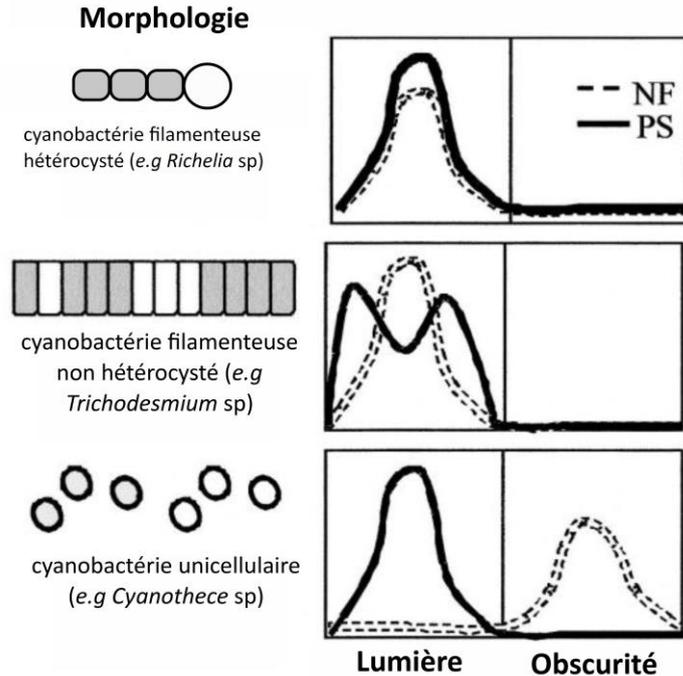


Figure I-6 : Représentation schématique des différents types de morphologie et de stratégie de ségrégation de la fixation d'azote et de la photosynthèse chez les cyanobactéries diazotrophes marines. Les cellules en couleur blanche indiquent la localisation de la nitrogénase. Sur les graphiques, sont indiquées les activités de photosynthèse (trait plein) et de fixation de N₂ (trait pointillé) pour un cycle jour:nuit de 12h:12h (Berman-frank et al. 2007).

Pendant ces dernières années, le nombre d'études sur la fixation d'azote et de ces protagonistes a considérablement augmenté. Les estimations des taux de fixation d'azote à l'échelle globale ont augmenté de près d'un facteur 10 ces 30 dernières années. Aujourd'hui encore, ces estimations sont soumises à une ré-évaluation constante. La découverte de nombreuses espèces de diazotrophes par l'utilisation de techniques moléculaires (Zehr et al. 2000 ; 2001; 2008) a modifié notre vision selon laquelle le diazotrophe majoritaire dans l'océan était *Trichodesmium* (Capone et al. 1997; Karl et al. 2002). Cela a permis de découvrir de nouvelles niches écologiques au sein desquelles les diazotrophes sont actifs (Fernandez et al. 2011; Bonnet et al. 2013). Les nombreuses campagnes effectuées dans les océans permettent de quantifier les ordres de grandeur des taux de fixation d'azote, à qualifier son aire de répartition et les organismes impliqués dans ce processus. Cependant, ces études, particulièrement dans le Pacifique Sud-Ouest sont généralement réalisées en milieu hauturier et il existe un réel manque de données en milieu côtier. En effet, malgré les forts taux de fixation d'azote et d'abondances en diazotrophes mesurés (Garcia et al. 2007; Biegala et Raimbault 2008; Rodier et Le Borgne 2008), l'effort d'échantillonnage a souvent privilégié les eaux hauturières.

I.3.4 Les facteurs contrôlant la distribution de la diazotrophie dans l'océan

La démonstration de l'importance de la diazotrophie dans les cycles biogéochimiques du carbone et de l'azote dans l'océan a généré une intensification des études liées à ce processus. Des études démontrent qu'un grand nombre de facteurs peuvent contrôler la fixation d'azote dans l'océan (Sohm et al. 2011). Cependant, le contrôle du processus de fixation d'azote dans l'océan est un sujet très débattu avec encore de nombreuses zones d'ombre. Ces facteurs de contrôle dépendent essentiellement des organismes impliqués dans le processus, qui possèdent différents préférences environnementaux et qui rendent les modèles de prédictions difficiles à définir.

Des études menées sur des cultures de cyanobactéries diazotrophes unicellulaires et filamenteuses (UCYN-B et *Trichodesmium* sp) ont démontré que la croissance et la fixation d'azote sont restreintes à un intervalle de température allant de 20 à 35 °C (Breitbarth et al. 2007; Falcón et al. 2005; Brauer et al. 2013; Fu et al. 2014; Webb et al. 2009).

Plusieurs études ont révélé que certaines cyanobactéries possèdent des niches écologiques distinctes avec des préférences de températures différentes. En exemple, l'abondance de *Trichodesmium* est restreinte à des températures d'eau de mer comprises entre 20 et 30 °C (Capone et al. 1997) avec une abondance forte à des températures élevées (> 25 °C) (Breitbarth et al. 2007; Jiang et al. 2018; White et al. 2018) tandis que les UCYN-A préfèrent des températures plus froides (<25 °C) (Henke et al. 2018; Bonnet et al. 2015).

L'activité diazotrophe est un processus très coûteux en énergie : 16 molécules d'adénosine triphosphate (ATP) sont utilisées lors de la photosynthèse pour 1 molécule de N₂ fixée. Afin de soutenir ce coût, les besoins en phosphore, élément clé de la synthèse de l'ATP, sont donc très importants. Sa faible concentration dans l'océan, particulièrement en milieu hauturier en fait un élément limitant de la croissance et de l'activité diazotrophe. Il a été démontré que la disponibilité en phosphore contrôlait la fixation d'azote en culture (Fu et al. 2005; Mulholland et al. 2002; Mulholland et Bernhardt 2005; Spungin et al. 2014) et dans les océans (Atlantique tropical Nord (Sañudo-Wilhelmy et al. 2001) ; Méditerranée (Ridame et al. 2011) ; croissance de *Trichodesmium* sp. dans l'océan Pacifique tropical Sud (Thierry Moutin et al. 2005) et Nord (Karl et al. 1992)).

Le fer est également un élément limitant le développement des diazotrophes. En effet, le fer est un élément essentiel de l'enzyme nitrogénase, composée de 38 à 50 atomes de fer (Howard et Rees 2006; Küpper et al. 2008; Kustka et al. 2003; Whittaker et al. 2011). Plusieurs études affirment que le fer contrôle la croissance et la fixation d'azote de *Trichodesmium* sp. en

culture (Berman-frank et al. 2001; Rochelle-newall et al. 2014). Dans le Pacifique subtropical, des expériences en microcosmes ont montré que la biodisponibilité en fer contrôlait l'abondance des UCYN (Moisander et al. 2012). Le rôle limitant du fer chez les cyanobactéries diazotrophes est accentué du fait des faibles concentrations (<1 nM) retrouvées dans la couche euphotique en milieu hauturier (Toulza et al. 2012). Dans le Pacifique Sud-Ouest, Guieu et al. (2018) ont signalé des concentrations élevées de fer dissous dans les eaux des archipels mélanésiens allant de $0,2$ à $66,2$ nmol L⁻¹ avec une moyenne dans la couche euphotique de $1,7$ nmol L⁻¹. Ces concentrations élevées de fer dissous mesurées dans les eaux tropicales du Pacifique Sud-Ouest étaient auparavant non documentées et plusieurs maxima relevés (> 50 nmol L⁻¹) indiquent des processus de fertilisation intenses dans cette région. Ils ont également constaté que les dépôts atmosphériques mesurés dans cette région étaient trop faibles pour expliquer les fortes concentrations de fer dissous dans la colonne d'eau de surface. Guieu et al. (2018) émettent, toutefois, l'hypothèse que les concentrations élevées de fer dissous dans les eaux des archipels mélanésiens sont dues à des apports peu profonds d'origines hydrothermales (zone de subduction Tonga – Kermadec qui s'étend sur 2500 km de la Nouvelle-Zélande à l'archipel des Tonga) ainsi qu'à des apports potentiels en fer des îles elles-mêmes (Shiozaki et al. 2014).

I.4 Méthodes d'identification des cyanobactéries

I.4.1 Approche moléculaire

Avant l'apparition des techniques de biologie moléculaire, les cyanobactéries ont principalement été identifiées par microscopie ou à l'œil nu (*i.e.* description morphologique). A la fin des années 1960, l'avènement des méthodes génétiques a permis d'affiner la taxonomie bactérienne et cyanobactérienne, et ces méthodes sont aujourd'hui couramment utilisées (Vandamme et al. 1996). Généralement, les informations génétiques des souches bactériennes peuvent être obtenues à partir de liens de parenté (hybridation ADN-ADN), du contenu en G+C et d'analyses de séquences comparatives (*e.g.* le gène de l'ARNr 16S) (Thompson et al. 2013). L'utilisation de l'ARN ribosomal (ARNr 16S) est largement connue comme étant l'un des outils permettant la classification et l'identification des bactéries et ce pour plusieurs raisons. Tout d'abord, le gène de l'ARNr est extrêmement bien conservé et universellement présent chez les procaryotes, ce qui permet de l'utiliser pour la comparaison phylogénétique d'espèces et de genres (Olsen et al. 1986). Deuxièmement, le gène de l'ARNr 16S est relativement stable et le transfert latéral de gènes est moins fréquent chez les procaryotes, ce qui est très utile pour les

études évolutives (Schleifer 2009). De plus, le gène d'ARNr 16S est facilement extrait à partir de cultures pures ou de prélèvements en milieu naturel, facilitant l'identification des bactéries cultivables ou non (Ward et al. 1990; Schleifer 2009). En outre, les séquences génétiques de l'ARNr 16S de nombreux taxons sont facilement disponibles dans des bases de données en ligne (e.g. NCBI), ce qui permet une identification facile par comparaison et analyse des séquences.

L'identification et la classification des procaryotes par l'analyse de la séquence génétique de l'ARNr 16S reposent sur le critère de seuil de 97%, selon lequel les isolats partageant un nombre égal ou supérieur à 97% de similarité de la séquence génétique d'ARNr 16S seront classés dans la même espèce (Rosselló-Mora et Amann 2001; Tindall et al. 2010). A ce jour, la communauté scientifique s'aperçoit que cette valeur seuil semble peu satisfaisante à cause de l'augmentation exponentielle du nombre de données de séquençage et de la conservation de ce gène (Rosselló-Mora et Amann 2001). Un nouveau seuil de 98,7% a été proposé en 2006, dans lequel il était recommandé de réaliser une expérience d'hybridation ADN-ADN lorsque la similarité de la séquence du gène de l'ARNr 16S se situait entre 98,7 et 99,0% (Stackebrandt et Ebers 2006). Dans la taxonomie bactérienne actuelle, l'analyse de la séquence génétique de l'ARNr 16S joue toujours un rôle important dans l'identification des genres, où les isolats peuvent facilement être classés dans des genres différents selon les séquences génétiques de l'ARNr 16S. Cependant, des études sur les relations phylogénétiques des cyanobactéries basées sur des séquences d'ARNr 16S ont souligné la difficulté de définir les relations taxonomiques de certains taxons. A titre d'exemple, les cyanobactéries filamenteuses non hétérocystées ne forment pas un groupe monophylétique bien défini (Giovannoni et al. 1990). Une approche moléculaire basée sur l'utilisation du gène *nifH* en complément des séquences d'ARNr 16S s'est révélée extrêmement utile dans la classification systématique des cyanobactéries diazotrophes (Zehr et al. 1997). En effet, même s'ils sont largement distribués dans les genres bactériens et archaïens, les gènes *nifH* ont été hautement conservés au cours de l'évolution (Young, 1992).

Il apparaît donc essentiel de noter l'importance de la confirmation au niveau de l'espèce avec des données génétiques supplémentaires comme celles du gène *nifH* ainsi que des informations complémentaires provenant des analyses phénotypique et chimiotaxonomique.

I.4.2 La spectrométrie de masse : MALDI-TOF-MS

Récemment, des techniques de spectrométrie de masse et notamment celle du MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) est

utilisée en chimiotaxonomie pour classifier les bactéries. La spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS est basée sur la différenciation masse/charge (m/z) pour générer une empreinte protéique et qui peut être utilisée pour la classification des micro-organismes (Baumann et al. 2005; Freiwald et Sauer 2009). Le processus consiste à déposer une petite quantité d'échantillon (*e.g.* une colonie cellulaire) sur une plaque cible conductrice puis de la recouvrir avec une couche de matrice (*e.g.* l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), acide sinapique (SA)) (Lay 2000). La plaque cible est ensuite placée dans le MALDI-TOF-MS sous vide, où des impulsions laser irradient une petite région de l'échantillon, provoquant la désorption de la matrice contenant les échantillons piégés (*i.e.* co-cristallisés) à partir de la plaque cible. Ces molécules de matrice désorbées sont ionisées et propulsées par un fort champ électrique vers un détecteur d'ions via le tube à temps de vol (TOF), au cours desquelles elles sont séparées sur la base de leur rapport masse sur charge (Fig. I-7). Le temps nécessaire à chaque molécule pour atteindre le détecteur d'ions dépend strictement du rapport masse sur charge des molécules ionisées, qui quantifie et traduit ensuite le signal en un profil spectral de masse caractéristique (Sauer et Kliem, 2010).

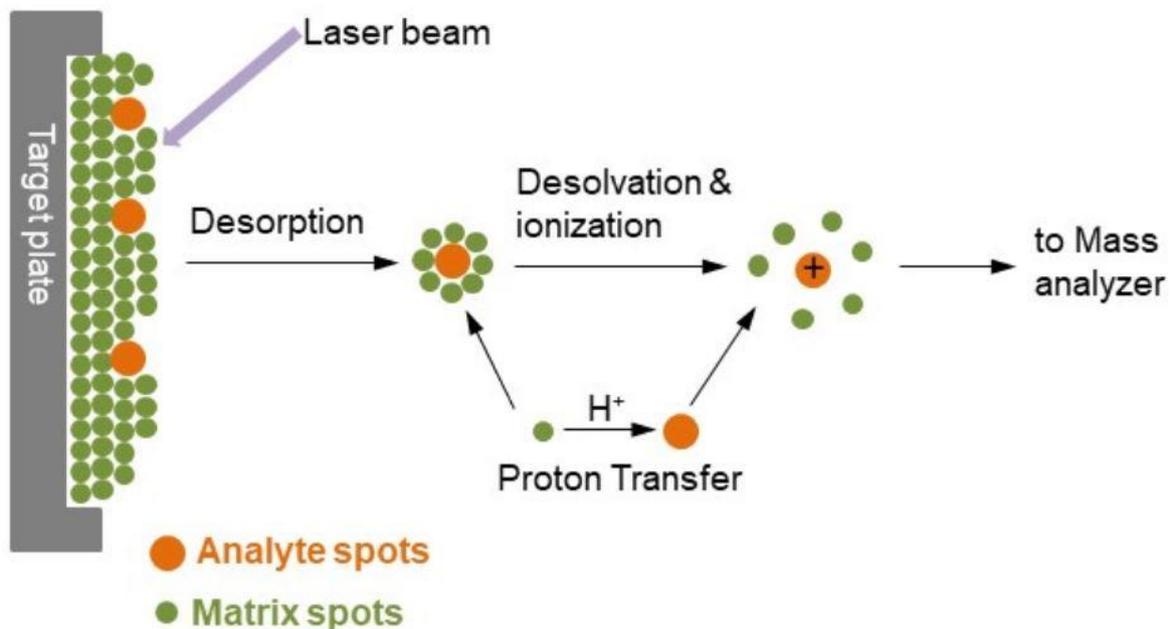


Figure I-7 : Schéma explicatif de l'ionisation des échantillons par MALDI-TOF-MS (<https://www.creative-proteomics.com/technology/maldi-tof-mass-spectrometry.htm>).

Les avantages de la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS ont été démontrés dans diverses études qui indiquent que cette méthode est capable de détecter un large spectre de protéines à partir de cellules bactériennes entières sans séparation extensive (Ruelle et al. 2004;

Maier et al. 2006) et capable d'identifier avec précision les bactéries au niveau du genre, de l'espèce et de la sous-espèce (Barbuddhe et al. 2008; Dieckmann et al. 2008; Ayyadurai et al. 2010; Stephan et al. 2010). C'est une technique fiable car elle a montré dans certaines études une variabilité minimale dans le spectre, n'affectant pas la fiabilité de l'identification, lorsque différents milieux de cultures et phases de croissance cellulaire ont été testés (Lay 2001; Maier et al. 2006).

MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Brême, Allemagne) et VITEK[®] MS (bioMérieux, Marcy'Etoile, France) sont les deux systèmes disponibles dans le commerce. Ils sont utilisés comme outils dans les tests de routine pour le diagnostic en milieu médical où elle permet l'identification rapide et précise de souches pathogènes de bactéries et de champignons (Murray 2010; Mellmann et Müthing 2013). En ce qui concerne les bactéries environnementales, le nombre de souches répertoriées dans les bases de données des deux systèmes est relativement faible. Cependant, avec le nombre croissant d'études environnementales impliquant la technique MALDI-TOF-MS, les bases de données sont en pleine expansion, ce qui offrira de nouvelles opportunités et des informations fiables pour la définition d'espèces en bactériologie (Welker et Moore, 2011).

I.5 Valorisation des cyanobactéries

En plus de leur rôle biogéochimique important dans le cycle du carbone et de l'azote, les cyanobactéries possèdent un potentiel de valorisation lié à leur capacité de produire une très large diversité de métabolites primaires et secondaires à haute valeur ajoutées (*e.g.* pigments, polysaccharides, vitamines, acides gras à longue chaîne polyinsaturés, anti-oxydants). En effet, les composés bioactifs qu'elles produisent avec une grande diversité de structures représentent un potentiel biotechnologique diversifié (Fig. I-8).

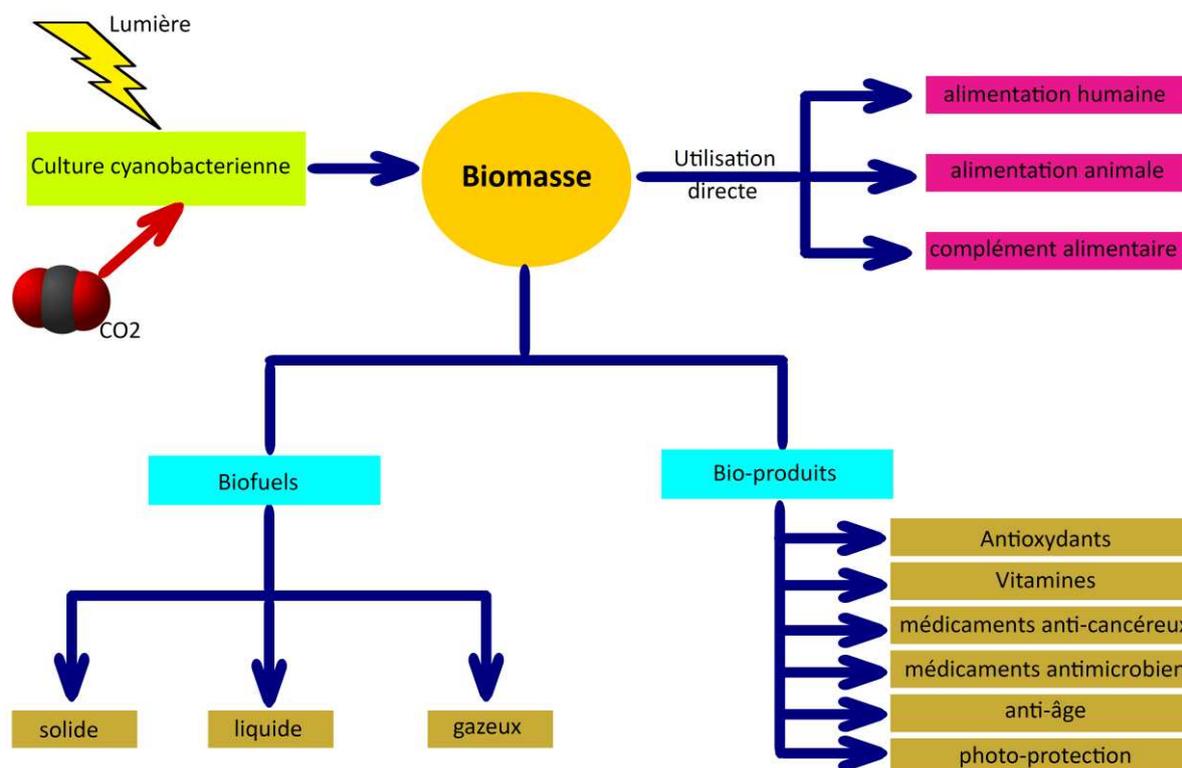


Figure I-8 : Potentiel de valorisation des cyanobactéries marines.

Ces dernières décennies, la culture industrielle des micro-algues incluant les cyanobactéries a considérablement augmenté (Spolaore et al. 2006). Elles sont produites en masse et l'accent est actuellement tourné vers les matières premières telles que la bioénergie, la nutraceutique (alimentation humaine/animal, complément alimentaire) (Beal et al. 2018; Becker 2003), la biopharmaceutique (Borowitzka 1995) et la cosmétique (Mourelle et al. 2017) (Fig. I-8).

I.5.1 Nutraceutique, cosmétique et pharmaceutique

Les cyanobactéries sont connues depuis des milliers d'années pour leurs qualités nutritives. Certaines espèces (*i.e. Nostoc, Spirulina*) ont été consommées en Chine (Gao 1998) et au Tchad (Dangeard 1940) pour survivre à la famine. A titre d'exemple, la spiruline possède une teneur en protéines de 62 à 68% du poids sec (Clement et al. 1967), ce qui est très fort en comparaison au bœuf qui n'en contient que 22% et sert notamment à lutter contre la malnutrition (Vonshak, 1997). La spiruline possède également des concentrations élevées de nombreux autres nutriments (*e.g.* thiamine, riboflavine) sous une forme facilement assimilable (Ohmori et Ehira 2014).

Aujourd'hui, plus de 120 exemples d'ingrédients cosmétiques provenant de microalgues (dont les cyanobactéries) sont disponibles dans la base de données https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/cosing_es, avec des applications très diverses (*e.g.* anti-oxydant, anti-âge, photo-protection) (Mourelle et al. 2017). Parmi les principes actifs extraits de cyanobactéries qui ont des applications potentielles dans les produits cosmétiques, on citera les pigments photosynthétiques tels que les caroténoïdes avec comme exemple les β -carotènes ou la zéaxanthine qui peuvent être utilisés comme anti-oxydant mais aussi comme colorants naturels (Fiedor et Burda 2014; Mourelle et al. 2017). D'autres composés bioactifs moins connus comme la glucoside bioptérine (un chromophore absorbant les UV-A), pigment produit à partir de cyanobactéries (*Oscillatoria* sp.), protège la peau contre les effets néfastes du rayonnement UV-A, d'où son utilisation en tant qu'ingrédient dans des produits cosmétiques (Matsunaga et al. 1993). De plus, le scytonemine est un caroténoïde produit par des cyanobactéries marines (*e.g.* *Scytonema* sp.) qui peut également être utilisé comme ingrédient cosmétique pour écran solaire UV, car il a démontré une activité anti-oxydante dans différents dosages (Takamatsu et al. 2003).

Les cyanobactéries sont également une source de composés bioactifs dans le domaine de la biopharmaceutique. Une grande diversité d'interactions biologiques a déjà été décrite entre les composés de cyanobactéries marines et plusieurs groupes d'organismes, tels que les bactéries (Volk and Furkert 2006), les champignons (Shishido et al. 2015), les parasites (Tripathi et al. 2010) et les invertébrés (Capper et al. 2006). Elles ont également montré des activités anti-tumorales (Mooberry et al. 2003) telle que l'apratoxine D, produite par des espèces de *Lyngbya*, et qui est potentiellement cytotoxique sur les cellules cancéreuses du poumon humain (Gutierrez et al. 2008) et les cellules de neuroblastome (*i.e.* cancer au niveau de cellules nerveuses) (Linington et al. 2008). En exemple, plus de 120 alcaloïdes cyanobactériens publiés entre 2001 et 2006 présentent une grande diversité structurale et des activités biologiques variées, telles que la cytotoxicité, la lutte contre les champignons et l'inhibition des protéases. Cependant, la majorité de ces molécules a été isolée de cyanobactéries filamenteuses de l'ordre des Nostocales, en particulier des genres *Lyngbya*, *Oscillatoria* et *Symploca* (Tan 2007).

I.5.2 Les cyanobactéries diazotrophes du Pacifique Sud-Ouest et Nouvelle-Calédonie : un potentiel peu exploré

Comme indiquée précédemment, la région du Pacifique Sud-Ouest incluant la Nouvelle Calédonie est un hot spot de fixation d'azote au niveau de l'océan global, et présente des taux

de fixation d'azote très importants (Bonnet et al., 2017), et des abondances en cyanobactéries diazotrophes également très importantes (*e.g.* Moisaner et al. 2010 ; Tenorio et al. 2018). De plus, la biodiversité des eaux tropicales du Pacifique Sud-Ouest et en particulier celle de la Nouvelle-Calédonie est considérée comme la plus importante de la planète (Myers et al. 2000). La Nouvelle-Calédonie, entourée de l'une des barrières de corail la plus longue au monde, possède un lagon (1 450 000 km²) inscrit au patrimoine de l'UNESCO depuis 2008. L'île possède une grande diversité géologique avec notamment la présence de sols riches en métaux, particulièrement en nickel et pauvres en minéraux. Ces sols très caractéristiques sont peuplés par l'une des flores les plus riches du monde avec un taux d'endémisme d'environ 77%. La Nouvelle-Calédonie possède également une biodiversité marine exceptionnelle avec plus de 9000 espèces identifiées dont de nombreuses espèces sont rares et endémiques (Richer de Forges and Pascal 2008). Toutefois, cette biodiversité au niveau planctonique n'a été jusqu'alors que très peu explorée. L'insularité de la Nouvelle-Calédonie, la diversité géologique, la biodiversité terrestre et marine, nous laisse suggérer des possibles adaptations pouvant entraîner un endémisme au niveau planctonique et notamment des cyanobactéries diazotrophes mesurées en abondance dans le lagon calédonien (Biegala et Raimbault 2008).

I.6 Objectifs de la thèse

Les campagnes océanographiques menées dans le Pacifique Sud-Ouest par les équipes IRD depuis 2012 ont permis de réaliser des isoléments de souches de cyanobactéries diazotrophes de la région. Ces isoléments ont été motivés par :

(1) **Un intérêt biogéochimique** : Les nouvelles souches isolées pourront faire l'objet d'études approfondies au niveau physiologique lesquelles permettront de mieux comprendre les facteurs environnementaux qui les contrôlent et leurs rôles dans les cycles biogéochimiques. L'isolement de nouvelles souches de cyanobactéries diazotrophes a conduit notre équipe à s'interroger sur la distribution et l'abondance de ces organismes dans le lagon calédonien, jusque là, peu étudiée.

(2) **Un intérêt écologique** : Le maintien en culture de nouvelles souches de cyanobactéries diazotrophes contribue au recensement de la biodiversité des eaux tropicales du Pacifique Sud-Ouest mais aussi celui du patrimoine mondial d'espèces vivantes. Néanmoins, la pérennisation d'une souchothèque passe obligatoirement par une étape d'identification précise des espèces grâce aux différentes méthodes d'identification disponibles (*i.e.* morphologique, génétique, chimiotaxonomique).

(3) **Un intérêt de valorisation** : Le potentiel de molécules naturelles provenant des cyanobactéries dans différents secteurs de valorisation (*e.g.* cosmétique, pharmaceutique) est largement documenté. De nouvelles souches avec d'éventuelles adaptations particulières pourraient être de bons candidats à la valorisation.

Dans ce contexte, les trois grands objectifs de cette thèse étaient les suivants:

(i) Le premier objectif était de caractériser l'abondance, la distribution des phylotypes diazotrophes et des taux de fixation d'azote en milieu côtier dans le lagon de la Nouvelle-Calédonie.

Dans le chapitre 2, afin de répondre au premier objectif, un suivi spatio-temporel a été réalisé le long d'un transect côte-large dans le lagon calédonien pendant 4 ans où les taux de fixation d'azote et l'abondance des diazotrophes ont été quantifiés. Les résultats sont présentés dans le **chapitre 2**.

(ii) Le second objectif était divisé en 2 parties : Tout d'abord, il était de caractériser et d'identifier les souches de cyanobactéries diazotrophes isolées dans la région tropicale du

Pacifique Sud-Ouest. Enfin, le but était également d'évaluer la caractérisation protéomique par MALDI-TOF-MS des cyanobactéries en tant que méthode d'identification.

Dans le chapitre 3, grâce aux campagnes réalisées dans la région tropicale du Pacifique Sud-Ouest incluant la Nouvelle-Calédonie, des souches de cyanobactéries diazotrophes ont été isolées. Dans le but d'améliorer les connaissances sur la diversité de ces organismes dans la région, les souches pures de cette souchothèque ont été dans un premier temps caractérisées morphologiquement et génétiquement. Dans un second temps, la technique d'identification par analyse des spectres protéomique obtenus par MALDI-TOF-MS a été testée sur les cyanobactéries diazotrophes isolées et comparées à la méthode morphologique et génétique. Les résultats sont présentés dans le **chapitre 3**.

(iii) Le troisième objectif était d'évaluer le potentiel de valorisation des souches de cyanobactéries diazotrophes isolées du Pacifique Sud-Ouest pour les secteurs de la pharmaceutique et de la cosmétique.

Afin d'évaluer le potentiel de valorisation, des tests antibactériens et cosmétiques (*i.e.* test anti-oxydant, test enzymatique et de cytotoxicité) ont été réalisés sur des extraits de souches pures issues de la souchothèque de Nouvelle-Calédonie. Une analyse phytochimique de 4 extraits cyanobactériens a aussi été réalisée dans le cadre d'un stage effectué dans le laboratoire de chimie d'Oliver THOMAS au sein de l'Université de Galway en Irlande. Les résultats de l'évaluation du potentiel de valorisation sont présentés dans le **chapitre 4**.

Chapitre 2

Caractérisation de l'abondance, de la distribution des phylotypes diazotrophes et des taux de fixation de N₂ dans le lagon de Nouvelle-Calédonie

SOMMAIRE

II.1	Introduction	27
II.2	Article: Variabilité des taux de fixation d'azote et des principaux protagonistes diazotrophes: tendances observées sur une série temporelle de quatre ans dans le lagon de Nouvelle-Calédonie (Pacifique Tropical Sud-Ouest)	28
II.3	Conclusion.....	49

Contributions: Sophie Bonnet (SB), Martine Rodier (MR) et Cécile Dupouy (CD) ont conçu l'étude; SB, Emmrick Saulia (ES), CD ont acquis les données; ES, Mar Benavides (MB), Kendra Turk-Kubo (KT), Hailey Cooperguard (HC), Britt Henke (BH), SB, MR, Olivier Grosso et CD ont analysé les données; ES, MB, KAT, BH, LR, JPZ et SB ont interprétés les données; ES, MB et SB ont écrit le manuscrit; et tous les auteurs ont révisé le manuscrit.

II.1 Introduction

Si la fixation d'azote atmosphérique dans l'océan est connue depuis les années 1960 (Dugdale et al. 1961 ; 1964), ce n'est que depuis les années 1990 que son rôle majeur dans les cycles biogéochimiques a été reconnu (*e.g.* Karl et al. 1997). Aujourd'hui elle fait l'objet d'une recherche intensive au niveau international, mais de nombreuses incertitudes demeurent quant à l'ampleur de ce processus dans l'océan global et les facteurs contrôlant la distribution des différents groupes de diazotrophes. Durant les deux dernières décennies, les recherches sur la fixation d'azote se sont intensifiées mais de façon très hétérogène sur l'ensemble de l'océan mondial. Les efforts ont été importants dans l'hémisphère Nord et notamment dans les océans Atlantique tropical Nord (Benavides et Voss 2015) et Pacifique tropical Nord (*e.g.* Böttjer et al. 2017) où des Time-Series stations (BATS en Atlantique et HOT dans le Pacifique) ont été mises en place permettant de suivre à long terme l'évolution des processus biogéochimiques dans ces régions. Récemment, des campagnes océanographiques effectuées dans les eaux hauturières de la région du Pacifique Sud-Ouest ont permis de caractériser cette région comme hot spot mondial de fixation d'azote. En effet, ces nouvelles données ont montré des taux plus forts que ceux prédits par les modèles dans cette région et dans la gamme haute voire supérieure aux taux recensés dans la base de données mondiale MAREDAT (Bonnet et al 2017). Mais si le nombre d'études sur la fixation d'azote augmente dans le Pacifique Sud-Ouest, en milieu côtier et notamment en Nouvelle Calédonie, l'intensité des flux de fixation d'azote, la diversité des organismes diazotrophes et leur variabilité saisonnière en lien avec les paramètres environnementaux ne sont que très peu documentées. Ce manque de données nous a conduit à la mise en place d'un suivi temporel pendant 4 années dans le lagon calédonien, qui fait l'objet d'un article soumis à ISME Journal en janvier 2019.

II.2 Article: Variabilité des taux de fixation d'azote et des principaux protagonistes diazotrophes: tendances observées sur une série temporelle de quatre ans dans le lagon de Nouvelle-Calédonie (Pacifique Tropical Sud-Ouest)

Auteurs et contributions:

Saulia Emmrick, Benavides Mar, Henke Britt, Turk-Kubo Kendra., Cooperguard Haley, Grosso Olivier, Rodier Martine, Dupouy Cécile, Riemann Lasse, Bonnet Sophie.

Cet article a été soumis dans le journal *ISME-Nature*

le 14 janvier 2019.

Résumé en français

La région du Pacifique tropical Sud-Ouest a été identifiée comme un hot spot de fixation d'azote. Cependant, les facteurs environnementaux expliquant la variabilité temporelle de l'abondance, de la diversité et de l'activité des diazotrophes sont encore mal compris, en particulier pendant la saison hivernale. Dans cette étude, nous avons quantifié les taux de fixation d'azote et l'abondance de cinq phylotypes de diazotrophes principaux (UCYN-A, UCYN-B, UCYN-C, *Trichodesmium*, Het-1) pendant deux années complètes (2012 à 2014) sur une base mensuelle à quatre stations situées le long d'un transect côte-large dans le lagon de Nouvelle-Calédonie, et deux années supplémentaires (2015-2017) au niveau de l'une des stations. Les diazotrophes étaient détectables tout au long de l'année avec des abondances moyennes généralement élevées (10^4 - 10^7 copies du gène *nifH* L⁻¹). Les groupes d'UCYN ont clairement dominé la communauté diazotrophe lors des suivis 2012-2014 (dominé par UCYN-A) et 2015-2017 (dominé par UCYN-C). Les taux de fixation d'azote étaient plus élevés en été ($8,8 \pm 6,6$ nmol N L⁻¹ d⁻¹) par rapport à ceux mesurés en hiver ($5,7 \pm 5,7$ nmol N L⁻¹ d⁻¹) au cours des deux premières années, ce qui n'était pas le cas lors du second suivi. Les caractéristiques physico-chimiques des eaux du lagon conduisent à une hétérogénéité des populations diazotrophes à l'échelle saisonnière et annuelle et soulignent que la dynamique des populations de diazotrophes est complexe et difficile à prédire.

Seasonal shifts in diazotroph players and N₂ fixation rates: patterns observed over a four-year time series in the New Caledonian lagoon (Western Tropical South Pacific Ocean)

Saulia, E., Benavides, M., Henke, B., Turk-Kubo, K., Cooperguard, H., Grosso, O., Rodier, M., Dupouy, C., Riemann, L., Bonnet, S.

Abstract

The Western Tropical South Pacific has been identified as a hotspot of N₂ fixation. However, the environmental factors explaining the temporal variability of abundance, diversity and activity of diazotrophs is still poorly understood, especially during the winter season. In this study, we quantified N₂ fixation rates and the abundance of five diazotroph phylotypes (UCYN-A, UCYN-B, UCYN-C, *Trichodesmium*, Het-1) during two full years (2012 to 2014) on a monthly basis at four stations along a coast to open ocean transect in the New Caledonian lagoon, and two additional years (2015-2017) at one station. Diazotrophs were detectable throughout the year with generally high average abundances (10^4 - 10^7 *nifH* gene copies L⁻¹). UCYN groups clearly dominated the diazotrophic community over the 2012-2014 survey (dominated by UCYN-A) and 2015-2017 (dominated by UCYN-C). N₂ fixation rates were higher during summer (8.8 ± 6.6 nmol N L⁻¹ d⁻¹) as compared to winter (5.7 ± 5.7 nmol N L⁻¹ d⁻¹) during the two first years, which was not the case at the end of the survey. The physicochemical characteristics of lagoon waters lead to the heterogeneity of diazotrophic populations both at seasonal and annual timescales and underscore that the dynamics of diazotroph populations are complex and difficult to predict.

Introduction

The balance between fixed nitrogen (N) input and its remineralization in the ocean maintains the reservoir that contributes to carbon sequestration via the biological pump. The main source of fixed N to the oceans is biological dinitrogen (N₂) fixation, performed by a suite of specialized cyanobacteria, bacteria and archaea called “diazotrophs” (J. P. Zehr 2011). Fixed N input fluxes on a global basis vary between 106-120 Tg N y⁻¹ (Galloway et al., 2004; Gruber 2008; Jickells et al., 2017). The accuracy of those estimates is inevitably affected by the temporal and spatial resolution of such measurements. Only few studies have addressed how

the paucity of data on spatial and temporal distribution of N₂ fixation may affect global fixed N input estimates. For instance, the global database compiled in Luo et al., (2012) contain 2480 data points on volumetric seawater N₂ fixation from the northern hemisphere, while samples from the southern hemisphere only amount to 502. The temporal distribution of these data points also suffers from a strong seasonal bias as >65% of the N₂ fixation measurements are recorded during spring-summer conditions. Hence, most of our recapitulative knowledge of marine N₂ fixation stems from the northern hemisphere in spring-summer conditions, largely from the sunlit layer of open ocean regions of the North Atlantic and North Pacific Oceans (Benavides and Voss 2015; Böttjer et al., 2017).

Although the number of N₂ fixation studies has increased in recent years, the temporal and spatial resolution remains coarse, as oceanographic cruises commonly sample transects with stations separated by tens of nautical miles, and typically monthly or seasonal time scales. For instance, N₂ fixation rates varied four- to nine-fold between summer and winter at Station ALOHA in the Pacific Ocean between 2005 and 2013 (Böttjer et al., 2017). If higher diazotrophic activity during summer prevails among the available datasets it could cause an overestimation of basin-wide estimates, which illustrates the need for conducting sampling programs at fine temporal scale. Indeed, Robidart et al., (2014) showed that certain diazotroph phylotypes vary in abundance by three orders of magnitude within spatial scales <30 km and temporal scales <2 days, using an automated *in situ* DNA sampler in the vicinity of Station ALOHA. If diazotroph abundances reflect the magnitude of N₂ fixation rates to some extent, it follows that such short-term variability in diazotroph abundance may impact fixed N inputs to the system.

Recent intensive sampling of the Western tropical South Pacific (WTSP) Ocean revealed this region as a hotspot of N₂ fixation with some of the highest rates ever recorded (Bonnet et al., 2017; Messer et al., 2015; Berthelot et al., 2017). However, most of our understanding of diazotrophic activity and diversity in the WTSP derives from open ocean cruises, the majority of which took place in austral summer, while little sampling effort has been devoted to coastal environments. In the Australian Great Barrier Reef, Hewson et al., (2007) reported *nifH* gene sequences corresponding to usual open-ocean diazotroph phylotypes such as UCYN-A, UCYN-B and the diatom-diazotroph association (DDA) Het-1 (*Richelia* associated with *Rhizosolenia*). Also in the Great Barrier Reef, Messer et al., (2017) found *Trichodesmium erythraeum* to be the dominant diazotroph in their *nifH* gene libraries and measured N₂ fixation rates from 3 to 68 nmol N L⁻¹ d⁻¹. The only other coastal N₂ fixation studies in the WTSP are those from New Caledonia, an island lying between 19 and 22°S

surrounded by a coral reef that encloses a 24,000 km² lagoon. The lagoon waters are shallow (25 m on average), and mostly oligotrophic, although inorganic nutrients remain above analytical detection year-round in the waters affected by the river and anthropogenic discharges near Nouméa city (Neveux et al., 2009; Ouillon et al., 2010). Previous studies have documented high N₂ fixation rates (1.9-29.3 nmol N L⁻¹ d⁻¹, Garcia et al., 2007; Bonnet et al., 2016), occurrence of large *Trichodesmium* blooms (Rodier and Le Borgne, 2008; Tenorio et al., 2018), and occurrence of other common oceanic diazotrophs such as DDAs, UCYN-A/haptophyte symbioses, and *Crocospaera* (UCYN-B) (Biegala and Raimbault 2008; Turk-Kubo et al., 2015). An interesting feature of the New Caledonian lagoon environment in comparison with open ocean waters of the WTSP is the presence of UCYN-C (Turk-Kubo et al., 2015), a phylotype considered to be more widely represented in coastal environments (Berthelot et al., 2017; Taniuchi et al., 2012).

Here we examine N₂ fixation rates and diazotroph phylotype abundance at four stations along a coast to open-ocean transect in the New Caledonian lagoon during two full years (2012 to 2014) on a monthly basis ('Grand Observatoire de l'environnement et de la biodiversité terrestre et marine du Pacifique Sud' or GOPS survey). Our analysis also includes the continuation of the monitoring program that took place at one out of the four GOPS stations (2015 and 2017; Rodier, 2012; 'MOuillage InStrumenté biogEochimique' or MOISE survey) observation station, <http://www.observatoire-gops.org/fr/moise>). Henke et al. (2018) examined the seasonal variability and diversity of UCYN-A/haptophyte symbioses in relation with environmental factors during the GOPS survey. In the current study we sought to expand our knowledge on the broader diazotroph community for the GOPS time series (2012 to 2014), adding two more years (2015 to 2017) and N₂ fixation data. We hypothesized that the abundance, diversity and activity of diazotrophs in the New Caledonian lagoon would vary seasonally and geographically. To address this, we (i) quantified N₂ fixation rates and the abundances of five diazotroph phylotypes on a monthly basis along four annual cycles, (ii) determined their spatial distribution along a lagoon-large transect, and (iii) identified the major environmental drivers explaining the observed distributions.

Materials and methods

Sampling, hydrographic and meteorological parameters

Between July 2012 and April 2014 (GOPS survey), seawater samples were collected from the near surface (~1 m) on a monthly basis in the New Caledonian lagoon along a transect

running from the reef barrier (Dumbea Pass) to the shore (Dumbea Bay), consisting of four stations (L2, M09, M99 and D39; Fig. 1). Seawater was collected by means of a trace metal clean Teflon pump connected to polyethylene tubing. Between November 2015 and November 2017, samples were only obtained from station M99 (MOISE survey) using a Niskin bottle. Hydrographic data were obtained at each station by casting a Seabird SBE19 CTD equipped with additional turbidity (Seapoint optical back scatter) and *in situ* fluorescence (Wet Lab Wetstar) sensors. Rainfall, wind direction and velocity daily values were obtained from the Météo-France station at Faubourg Blanchot (Nouméa, 22°16.30' S–166°27.06' E). Here we used averages of the data from the preceding week.

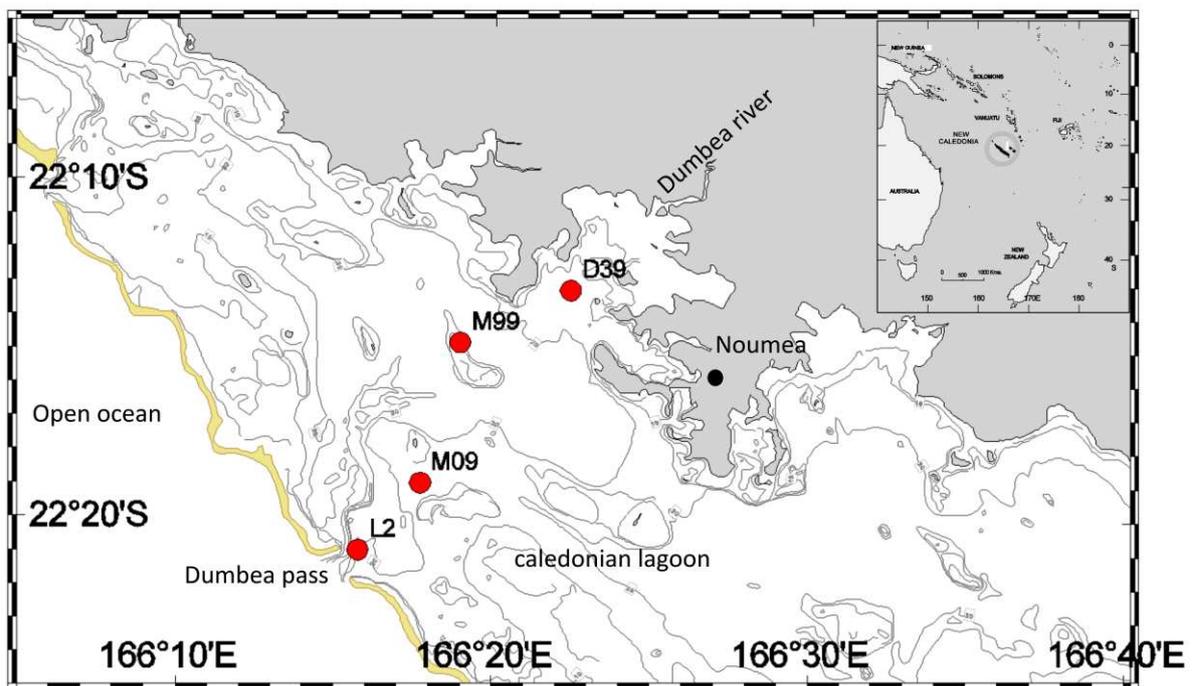


Figure 1: Map of the study site in the New Caledonian lagoon (Western Tropical South Pacific), including stations L2, M09, M99 and D39.

Nutrient and Chlorophyll a analyses

Seawater samples for nutrient analyses were collected in acid-washed scintillation vials, poisoned with HgCl_2 ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ final concentration) and maintained in the dark at 4°C until analysis. Soluble reactive phosphorus (PO_4^{3-}) (detection limit = $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$) and NO_x (nitrite (NO_2^-) + nitrate (NO_3^-); detection limit = $0.01 \mu\text{mol L}^{-1}$) concentrations were determined according to Aminot and K erouel (2007). Silicate concentrations were measured according to (Mullin and Riley 1955) as modified by (Fanning and Pilson 1973) (detection limit = $0.05 \mu\text{mol L}^{-1}$). All assays were performed with a Bran+Luebbe AA3 autoanalyzer. Chlorophyll *a*

(Chl *a*) and phaeopigment (Pheo) concentrations were determined fluorimetrically (Lorenzen, 1966) using a Turner Designs fluorometer (Trilogy module Chl *a* Acid-040) calibrated with a pure Chl *a* standards (Sigma-Aldrich).

N₂ fixation rates

Seawater samples for N₂ fixation measurements were collected in transparent polycarbonate bottles equipped with septum screw caps (Nalgene) of 4.5 L for the GOPS project, and of 2.3 L for MOISE. One replicate (for GOPS) and three replicates (for MOISE) bottles were filled to overflow and amended with 98.9 atom% ¹⁵N₂ (Cambridge isotopes) either by directly injecting the tracer as a bubble (Montoya et al., 1996) (5 mL ¹⁵N₂ in 4.5 L bottles and 2 mL in 2.3 L bottles) or as dissolved in a subset of seawater previously N₂ degassed (Mohr et al., 2010) according to the methodology fully described in Bonnet et al., (2016) and Berthelot et al., (2015). A comparison between the two methods did not show any significant difference ($p > 0.05$) between N₂ fixation estimates (Supplementary Information; Fig. S1 in Annex 1). To ensure accurate rate calculations, the ¹⁵N/¹⁴N ratio of the dissolved N₂ pool in the incubation bottles was measured regularly whatever the method used. 12 mL were subsampled after incubation into Exetainers[®] fixed with HgCl₂ (final concentration 10 µg L⁻¹), that were preserved upside down in the dark at 4°C until analyzed by membrane inlet mass spectrometry (MIMS) according to Kana et al., (1994). Lastly, time zero (not ¹⁵N-enriched) samples were collected at each station and time point to determine the natural N isotopic signature of ambient particulate N (PN). As some commercial ¹⁵N₂ gas stocks are contaminated with ¹⁵N-labeled ammonium, nitrate, nitrite, and nitrous oxide (Dabundo et al., 2014), we checked the purity of our ¹⁵N₂ Cambridge isotopes stocks as described by Benavides et al. (2015) and Bonnet et al. (2016). They were found to be lower than 2×10^{-8} mol:mol of ¹⁵N₂, leading to a potential overestimation of N₂ fixation rates by <1%.

DNA Extraction and quantitative PCR

For DNA analyses, seawater samples were collected in 2.3 L polycarbonate bottles and 930-2350 mL were filtered within 1 h through 0.2 µm Supor filters (Pall Gelman). Filters were stored in bead beater tubes containing a mixture of 0.1-mm and 0.5-mm diameter glass beads (BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) at -80°C. DNA was extracted from the filters using the Qiagen Plant kit, with additional steps for enhanced DNA recovery from cyanobacteria (Moisander et al., 2008) before automated on-column purification and elution using a Qiacube

(Qiagen). All DNA samples were quantified by NanoDrop ND-1000 Spectrophotometry (Thermo Scientific).

The abundance of diazotrophs was determined using TaqMan® qPCR assays on either an ABI 7500 or StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems), with primer-probe sets for *Trichodesmium* (Church et al., 2005), UCYN-A1 (Thompson et al., 2014), UCYN-B (Moisander et al., 2010), UCYN-C (Church et al., 2005), the putative gammaproteobacterium γ -24774A11 (Moisander et al., 2008), and Het-1 (*Richelia-Rhizosolenia* DDAs) (Church et al., 2005). For GOPS samples, UCYN-A1 and UCYN-A2/A3 abundances were determined as described in Henke et al. (2018); these have been summed for the purpose of this study yielding total UCYN-A abundances. For the samples taken during MOISE, each reaction (25.5 μ L) consisted of 12.5 μ L TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 μ L of each primer (at 10 μ M, HPLC purified, TAG Copenhagen, Denmark), 0.5 μ L probe (at 20 μ M, TAG Copenhagen), 8 μ L PCR grade water, 0.25 μ L bovine serum albumin (BSA), and 2 μ L standard or sample. The thermal cycling conditions were 2 min at 50°C, 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. Standard dilutions (10^7 - 10^1) were run in duplicate, samples and no-template controls (NTCs) in triplicate. NTCs were undetectable. The efficiency of the primer-probe sets was 82-102%. Inhibition tests were carried out on all samples and each primer-probe set by adding 2 μ L of 10^5 standard to each sample. No inhibition was detected. The limit of detection (LOD) and detected but not quantifiable (DNQ) limits used were 1 and 8 gene copies per reaction, respectively. Samples that were below LOD were designated a value of 0 in the data set, whereas gene copies higher than LOD but less than DNQ were designated a conservative value of 1 *nifH* gene copy L⁻¹.

Statistical analyses

Only the numerically dominant diazotroph groups, UCYN-A, UCYN-C, *Trichodesmium* and Het-1, were used in statistical analysis. UCYN-B ($2.94 \pm 23.8 \times 10^6$ *nifH* gene copies L⁻¹), Het-2 ($1.08 \pm 6.43 \times 10^1$ *nifH* copies L⁻¹; one appearance at station M09 and L2 in June 2013), Het-3 ($1.05 \pm 3.95 \times 10^2$ *nifH* copies L⁻¹; during September 2013 at L2, M09, M99 station) and γ -24774A11 ($3.41 \pm 15.9 \times 10^4$ *nifH* gene copies L⁻¹) were quantified but not included in the statistical analyses as their abundances were low and/or episodic.

Normal distribution tests by descriptive statistics were performed on the following parameters: Temperature, salinity, Pheo, Si(OH)₄, NO_x, PO₄³⁻, turbidity, rainfall, wind speed, wind direction and *nifH* gene copy abundance of UCYN-A, UCYN-C, *Trichodesmium* and Het-

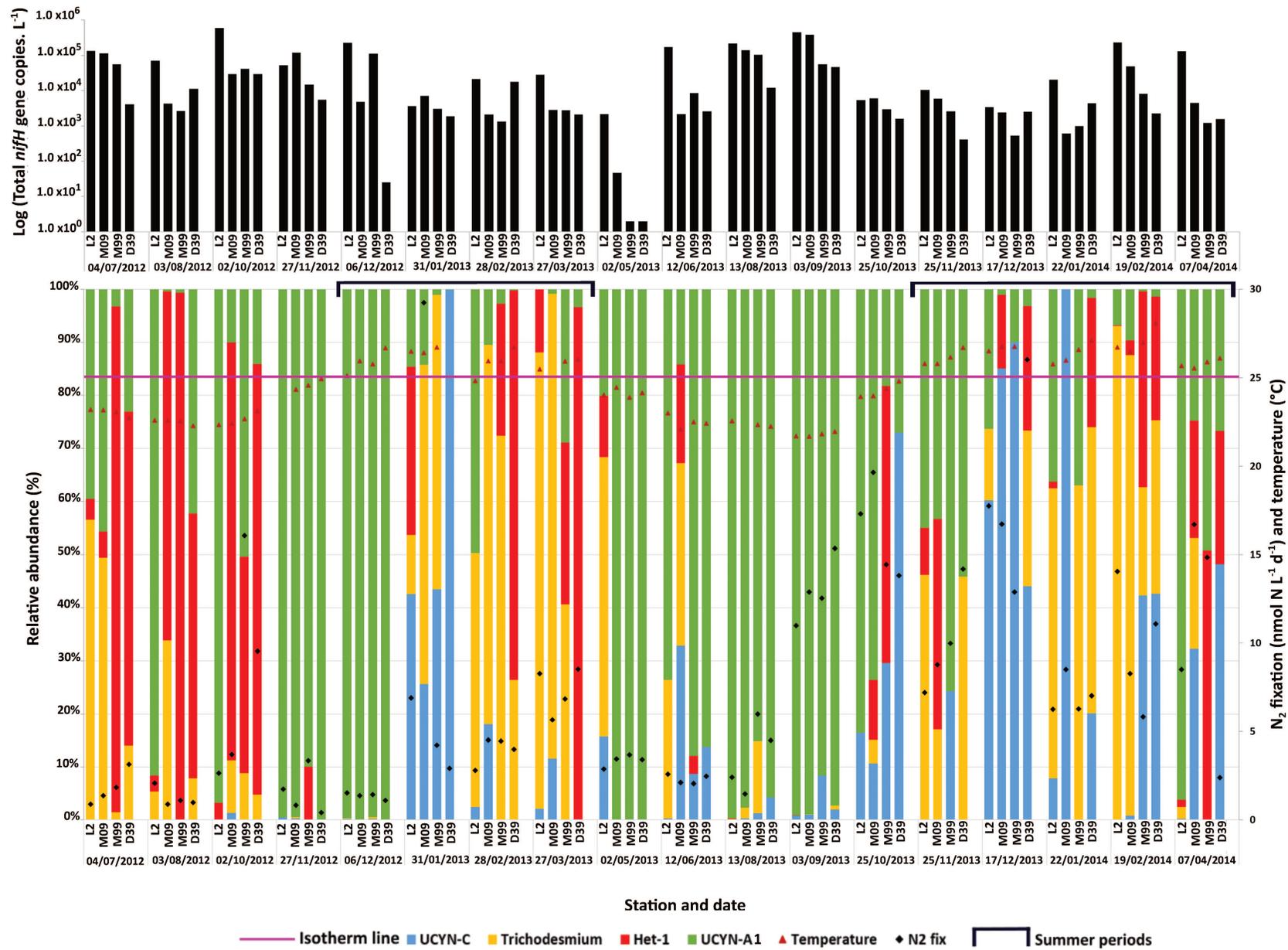
1. For GOPS, three targets (UCYN-C, *Trichodesmium*, and Het-1) and seven environmental parameters (PO_4^{3-} , rainfall, wind speed, wind direction, NO_x , salinity and temperature) were not normal distributed. For MOISE, even after transformation (LOG10), three targets (UCYN-C, *Trichodesmium*, and Het-1) and one environmental parameter (PO_4^{3-}) were significantly skewed. Non parametric Spearman's rank correlation tests were therefore carried out to examine correlations between diazotroph targets and environmental parameters. The results of the correlation matrix were put in the form of heatmaps (XLSTAT, version 2018.5). Principal component analysis (PCA) was performed with all diazotrophs targets and environmental parameters to complete the heat map. To test if the distribution of diazotrophs was different between stations and seasons, two non-parametric tests were used: the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney test, respectively, with 72 observations for GOPS (18 per station) and 24 for MOISE.

Results

Environmental conditions

During both surveys sea surface temperature (SST) varied between 21.69°C and 28.53°C along the seasonal cycle (Fig. 2A-B). Maximum temperatures were measured between December and February (range 25-28°C), and minimum temperatures (range 21-22°C) between August and September. Chl *a* concentrations ranged from 0.13 to 0.99 $\mu\text{g L}^{-1}$ during both surveys, with no clear seasonal trend. NO_x and PO_4^{3-} concentrations ranged from their detection limit to 0.22 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and to 0.38 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, during GOPS (2012-2014) (Henke et al., 2018; Fig. S2 in Annex 1). During MOISE (2015-2017), the NO_x concentrations were quite similar (0.07 to 0.30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), but PO_4^{3-} concentrations were higher (0.13 to 0.57 $\mu\text{mol L}^{-1}$, Fig. S3 in Annex 1). During both surveys, the average monthly wind direction ranged between east and southwest (90°–230°) and the wind speed ranged from 5.80 to 11.77 m s^{-1} (Fig. S2 and S3 in Annex 1).

A



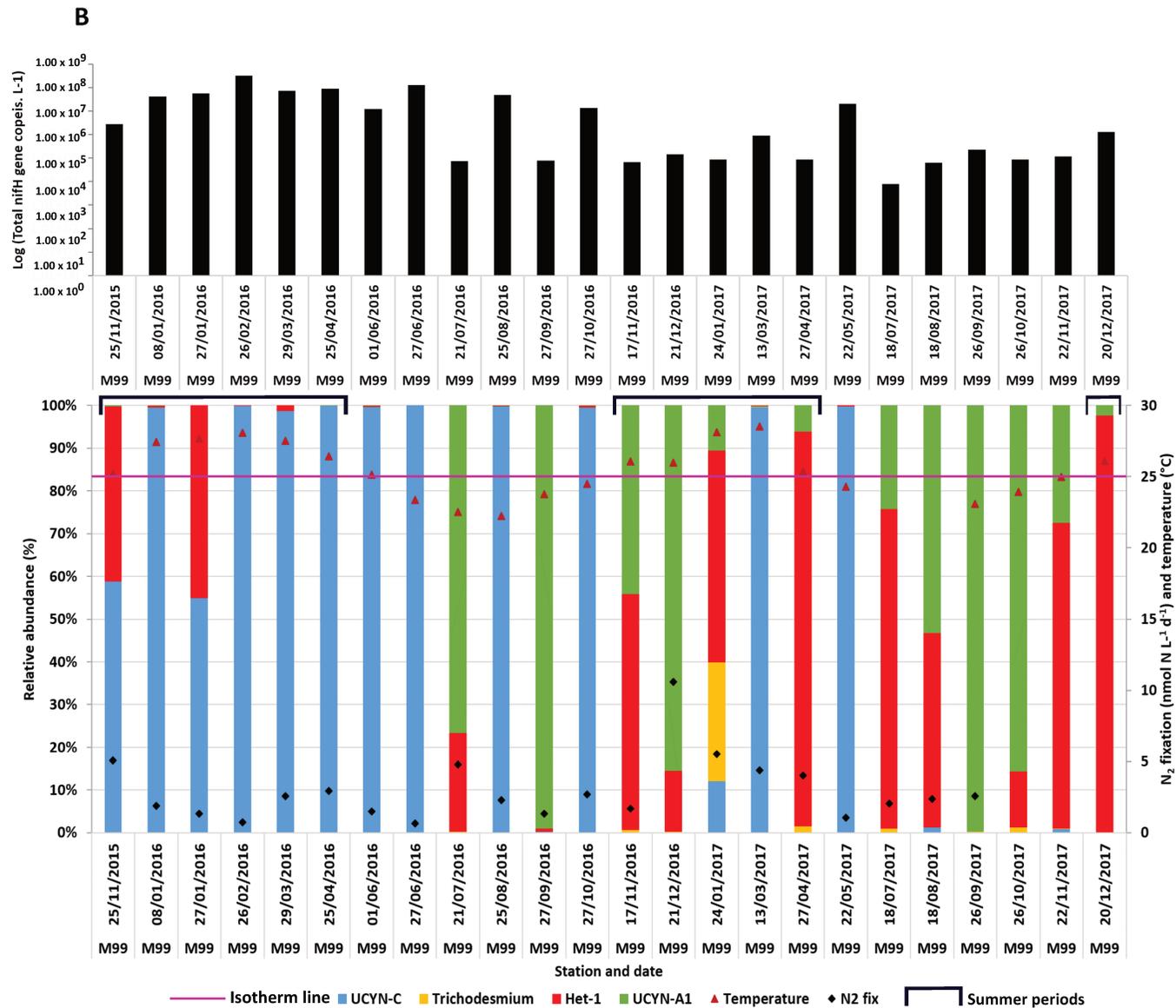


Figure 2: General graph representing the temporal dynamics of total *nifH* gene counts, relative abundance of each diazotroph group targeted in this study, sea surface temperature (SST, red triangles) and N₂ fixation rates (black diamonds) during the GOPS (A) and MOISE (B) surveys. The isotherm line separating cold (SST < 25°C) and warm (SST > 25°C) is indicated in purple.

Spatial and temporal variability of N₂ fixation rates

N₂ fixation rates ranged from 0.4 to 29.3 nmol N L⁻¹ d⁻¹, and did not show any spatial variability among the four stations sampled during GOPS (2012-2014) ($p > 0.05$). However, a marked temporal variability was observed since N₂ fixation rates were significantly ($p < 0.05$) higher during the warm season (8.8 ± 6.6 nmol N L⁻¹ d⁻¹) than during the cold one (5.7 ± 5.7 nmol N L⁻¹ d⁻¹; Fig. 2A) (seasons were divided by threshold of 25°C based on previous studies; Moisander et al., 2010; Bonnet et al., 2015), which was not the case during MOISE (2015-2017) (average summer rates = 3.7 ± 2.8 nmol N L⁻¹ d⁻¹, average winter rates = 2.1 ± 1.2 nmol N L⁻¹ d⁻¹ ($p > 0.05$; Fig. 2B)). The average annual rates during GOPS were significantly ($p < 0.0001$) higher during the second year of sampling (11.1 ± 5.6 nmol N L⁻¹ d⁻¹) than during the first one (4.2 ± 5.1 nmol N L⁻¹ d⁻¹), which was also the case for the MOISE survey despite not being statistically significant ($p > 0.05$) (average second year = 4.1 ± 3.0 nmol N L⁻¹ d⁻¹; average first year = 2.2 ± 1.4 nmol N L⁻¹ d⁻¹).

Spatial and temporal variability of diazotroph phylotype abundances

During the GOPS survey, total *nifH* counts (sum of all phylotypes targeted by qPCR assays) did not vary significantly among the four stations ($p > 0.05$), but variability was observed between groups: UCYN-A was the most abundant group and was always detected at all four stations, accounting for 79% of the total *nifH* gene copy counts along the transect (average abundance $4.2 \pm 10.3 \times 10^4$ *nifH* gene copies L⁻¹). The next most abundant groups were *Trichodesmium* ($7.7 \pm 28.2 \times 10^3$ *nifH* gene copies L⁻¹), Het-1 ($2.9 \pm 7.9 \times 10^3$ *nifH* gene copies L⁻¹), and finally UCYN-C ($6.4 \pm 9.7 \times 10^2$ *nifH* gene copies L⁻¹) (Fig. 2A). The average abundance of *Trichodesmium* and UCYN-A increased significantly ($p < 0.05$) from the coast (station D39; 6.7×10^2 and 4.2×10^3 *nifH* gene copies L⁻¹ respectively) to the open-ocean (station L2; 2.2×10^4 and 1.1×10^5 *nifH* gene copies L⁻¹, respectively).

Total *nifH* gene copy counts showed limited temporal variability within each survey and were on average $5.3 \pm 10.7 \times 10^4$ *nifH* gene copies L⁻¹ during GOPS and $8.5 \pm 3.7 \times 10^7$ *nifH* gene copies L⁻¹ during MOISE (Figs. 2A-B). While the total *nifH* gene count did not differ between seasons, the abundance of *nifH* gene copies per target group showed a pronounced variability (Fig. 2). During GOPS (2012-2014), a clear dominance of UCYN-A during the cold season was observed (Henke et al., 2018; Fig. 3A), which accounted for 65-90% of the total diazotroph phylotypes targeted in this study. UCYN-A *nifH* counts were significantly ($p < 0.05$) higher (by a factor of 4.8) in the cold than in the warm season (except at the coastal station D39), when *Trichodesmium* and Het-1 dominated the diazotroph community at most stations.

This was especially the case at the stations close to the reef barrier (L2 and M09), where *Trichodesmium* was the most abundant phylotype. There, it accounted for 40-67% of the total *nifH* counts and overall for 37% of the average total community at all stations during the summer (Fig. 3A). However, UCYN-A still accounted for 57% of the total diazotroph community targeted in our qPCR assays at all stations in summer (Fig. 2A).

Different patterns were observed during MOISE (2015-2017), where UCYN-C was the dominant group (average abundance $3.3 \pm 7.0 \times 10^7$ *nifH* gene copies L⁻¹). They were mainly present at the beginning of the survey (November 2015 to April 2016; Fig. 2B, 3B) and accounted for almost all *nifH* gene counts. They were followed by Het-1 ($1.3 \pm 5.3 \times 10^6$ *nifH* copies L⁻¹), UCYN-A ($3.7 \pm 5.1 \times 10^4$ *nifH* copies L⁻¹), and *Trichodesmium* ($1.6 \pm 4.8 \times 10^3$ *nifH* gene copies L⁻¹) (Fig. 2B). In general terms, the phylotype abundance rank observed during GOPS was opposite to that observed during MOISE.

Unlike during the GOPS survey, during MOISE UCYN-A were not significantly more abundant ($p > 0.05$) over the winter than over the summer, while Het-1 abundance was significantly higher ($p < 0.05$) in summer than in winter. Due to the very high UCYN-C abundances at MOISE, they appear to dominate both in summer and winter (Fig. 2B).

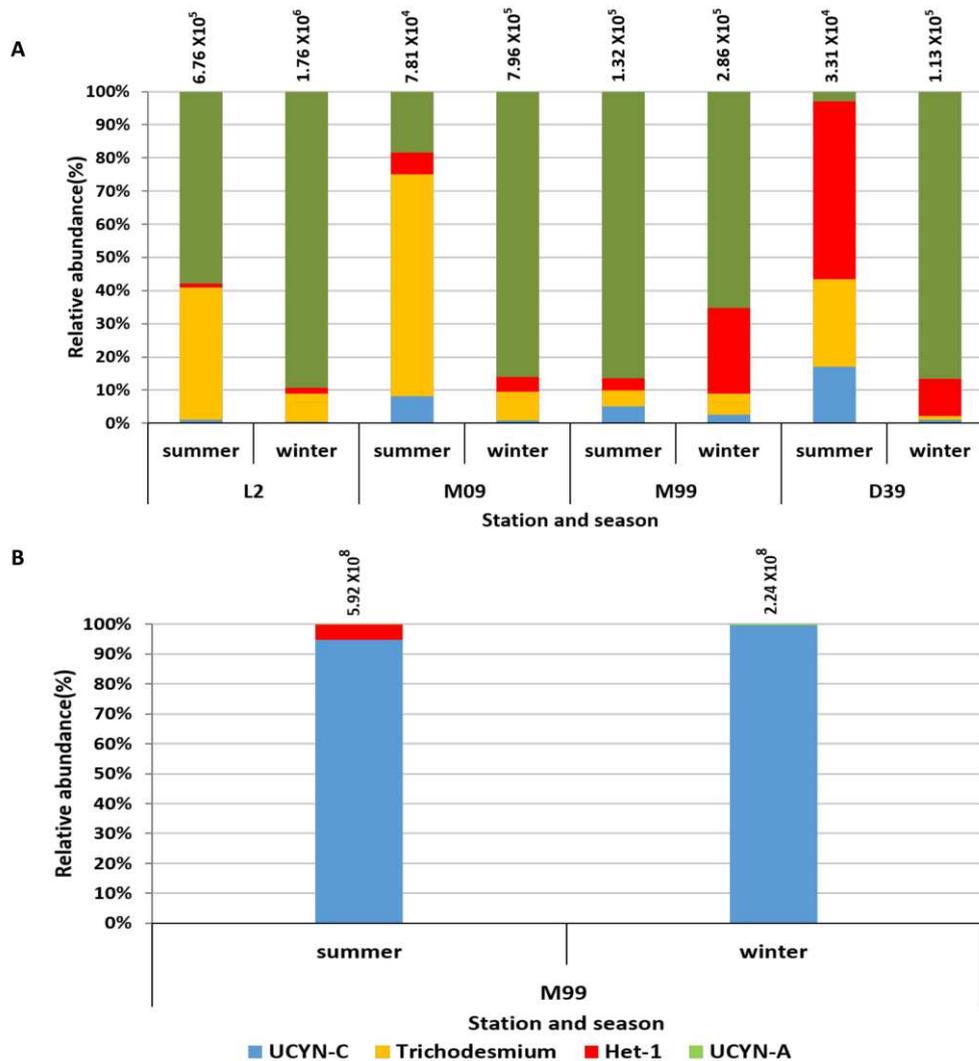


Figure 3: Relative abundance targeted during the cold (SST<25°C) and warm (SST>25°C) seasons during the GOPS (A) and MOISE (B) surveys. Total abundance is at the top of both histograms.

Relationship with environmental variables

The *nifH* gene abundance of UCYN-A was negatively correlated with temperature, Chl *a* and silicate concentrations (Fig. 4A), and positively correlated with salinity, PO₄³⁻ concentration, and wind direction (Fig. 4A). *Trichodesmium* abundance was negatively correlated with silicate concentration and positively correlated with wind direction and the abundance of Het-1 (Fig. 4A). UCYN-C abundance was positively correlated with turbidity, wind speed and N₂ fixation rates and negatively correlated with Het-1 abundance. Finally, Het-1 abundance was negatively correlated with wind speed.

During MOISE, UCYN-A1 abundance was negatively correlated with temperature, phaeopigments, silicate concentration, and rainfall (Fig. 4C). *Trichodesmium* abundance was positively correlated with temperature and PO₄³⁻ concentration (Fig. 4C). UCYN-C abundance

was positively correlated with Chl *a* concentrations (Fig. 4C). Finally, Het-1 abundance was positively correlated with SST, PO₄³⁻ concentration, and rainfall.

The results from the Spearman's rank correlations were further confirmed and visualized by the PCA (Figure 4B, 4D). During the GOPS survey, most of the observed variance was explained by the two axes F1 (23%) and F2 (14%), indicative of wind direction and N₂ fixation, respectively (Fig. 4B). UCYN-A clustered with the explanatory variables salinity, PO₄³⁻ and wind direction (Fig. 4B). *Trichodesmium* abundance was positively grouped with wind direction and Het-1, while UCYN-C abundances clustered with N₂ fixation, turbidity, and wind speed. During MOISE, most of the observed variance was explained by the two axes F1 (32%) and F2 (15%), indicative of temperature and wind direction, respectively (Fig. 4D). *Trichodesmium* clustered with temperature and PO₄³⁻ and UCYN-A1 been isolated from different parameters. UCYN-C clustered positively with Chl *a*, while Het-1 clustered with rainfall, then with two explanatory environmental variables similar to *Trichodesmium* (Fig. 4D).

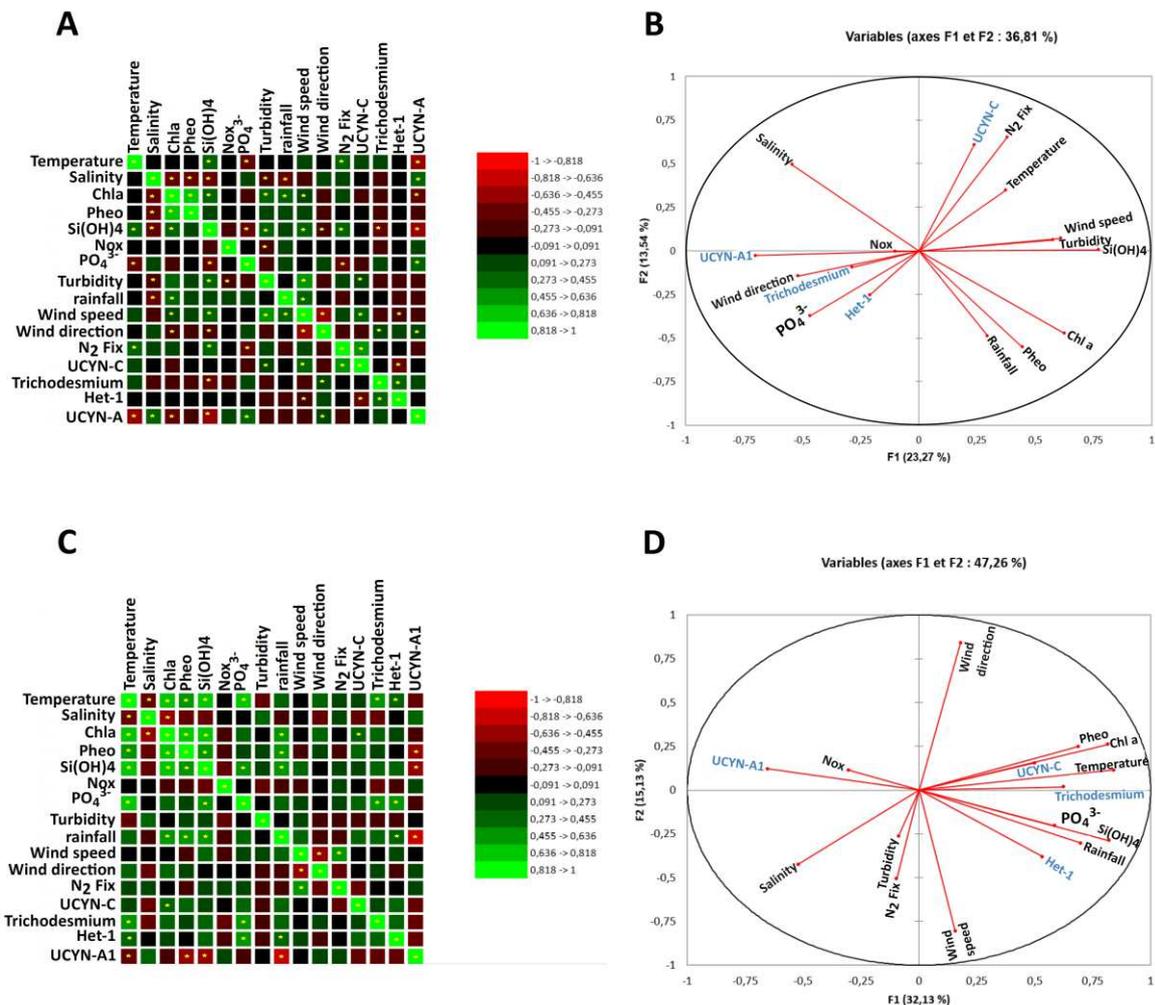


Figure 4: Heat maps showing the Spearman correlation and principal component analysis (PCA) coefficients between diazotroph phylotype *nifH* gene counts and environmental/biogeochemical parameters. The heat map shows negative (red) and positive (green) values of correlation strength between parameters measured during the GOPS (A; 2012-2014) and MOISE (C; 2015-2017) surveys. Stars within cells mark significant correlations ($p < 0.05$). PCA variables – representation of the variables as a function of axes 1 and 2 from the PCA for GOPS (B) and MOISE (D) surveys. The diazotroph phylotype *nifH* gene abundance is represented in blue.

Discussion

Here we present a spatiotemporal study of diazotrophic community composition and N_2 fixation rates over four years in the New Caledonian lagoon. Diazotrophs were detectable throughout the year with generally high average abundances (10^4 to 10^7 *nifH* gene copies L^{-1}), dominated by UCYN-A in 2012-2014 (GOPS) and UCYN-C in 2015-2017 (MOISE). These results contrast with open ocean waters around Melanesian archipelagos, where *Trichodesmium* and UCYN-B outnumber other groups and UCYN-A are almost absent in surface waters and only develop deeper in the water column (Bonnet et al., 2015; Berthelot et al., 2017; Stenegren et al., 2018), at least during austral summer conditions. However, Moisander et al. (2010) found high abundances of UCYN-A close to New Caledonia ($>10^6$ *nifH* gene copies L^{-1}), coinciding with a local upwelling system characterized by colder temperatures ($\sim 25^\circ C$) compared with surrounding waters at the same latitude ($27-30^\circ C$). Bonnet et al. (2015) also reported high UCYN-A abundances in the Coral Sea off New Caledonia but during austral winter conditions (SST $\sim 22^\circ C$). These studies show that there is a niche partitioning between surface warm ($>25^\circ C$) waters where *Trichodesmium* and UCYN-B thrive, and cooler ($<25^\circ C$) waters preferred by UCYN-A. We observed the same pattern in the inner lagoon waters, where UCYN-A were ~ 5 times more abundant during the winter season (SST $< 25^\circ C$), but to a lesser extent compared to open ocean waters. Indeed, UCYN-A still accounted for $\sim 60\%$ of the diazotroph community during the summer season (SST $> 25^\circ C$), which is not the case in the surrounding open ocean waters (Stenegren et al., 2018; Moisander et al., 2010). The dominance of UCYN-A in the New Caledonian lagoon also contrasts strongly with recent studies (Messer et al., 2017; Messer et al., 2015), which report a dominance of *Trichodesmium* and low abundances of UCYN-A in Great Barrier Reef and in the adjacent Coral Sea waters off Australia, especially during the winter season.

UCYN-A dominated the diazotrophic community at the four stations sampled during the GOPS survey, over both the austral summer and winter seasons, suggesting the lagoon waters provide favourable conditions for their development. Henke et al. (2018) found that SST and Chl *a* concentrations were negative predictors of the abundance of UCYN-A1, and NO_x concentrations were a positive predictor, which is consistent with the correlations reported in

the present study. This may be explained by the southeast winds which trigger a localized upwelling off the southwestern coast of New Caledonia that decreases seawater temperature by 5°C in summer and 1°C in winter (Hénin and Cresswell 2005), and would affect the lagoon SST by incoming tides. Indeed, the positive correlation between UCYN-A and south and southeast winds during GOPS and MOISE (Henke et al., 2018; this study) supports this hypothesis. NO_x concentrations are an order of magnitude higher in the lagoon than in open ocean waters (Moutin et al., 2018) and over the Great Barrier Reef (Messer et al., 2017), which may also explain why UCYN-A thrive in the New Caledonian lagoon compared to other more oligotrophic ecosystems of the WTSP. Finally, due to the inability of UCYN-A to fix inorganic carbon (Tripp et al., 2010), it is likely that their high abundance in lagoon waters is sustained by photosynthates of their host and/or labile dissolved organic matter input from the Dumbéa River (Fig. 1). Indeed, a recent study reported an increase in N₂ fixation rates and UCYN-A *nifH* gene expression in the mouth of the Dumbéa River compared to waters located close to the reef (Benavides et al., 2018).

Surprisingly, *Trichodesmium* abundances were lower than those of UCYN-A during both surveys. *Trichodesmium* has been routinely studied in the New Caledonian lagoon and surrounding waters during summer conditions using satellite observations (Dupouy et al., 2000, 2011, 2018) and direct field measurements (Rodier and Le Borgne 2008 2010, Turk-Kubo et al., 2015), revealing higher abundances in summer ($\sim 14\,000$ cells L⁻¹ and $\sim 10^4$ *nifH* genes copies L⁻¹, respectively) than during our surveys (GOPS and MOISE = 7.7×10^3 - 1.6×10^3 *nifH* genes copies L⁻¹, respectively; note that microscope cell counts do not equal *nifH* counts; White et al., 2018). *Trichodesmium* abundances gradually increased from the coast to the open ocean (D39 = 6.66×10^2 ; M99 = 1.4×10^3 ; M09 = 6.89×10^3 ; L2 = 2.19×10^4 *nifH* genes copies L⁻¹), suggesting that they have an open-ocean origin and were advected towards the coast with rising tide currents that flow over the reef (Jarrige et al., 1975; Rougerie, 1986). This is in agreement with the positive correlation between wind direction and *Trichodesmium* abundance reported here. The abundance of *Trichodesmium* was higher during the summer, and SST clustered positively with the abundance of *Trichodesmium*, in agreement with Tenorio et al. (2018). This is consistent with former studies showing that *Trichodesmium* is constrained by SST (20-30°C) (Capone et al., 1997) and thrives at temperatures of 25°C or warmer (Breitbarth et al., 2007; Fu et al., 2014; Jiang et al., 2018; White et al., 2018). The distribution pattern of *Trichodesmium* determined in this study is opposite to that of UCYN-A, whose abundances peaked during the winter. This points towards an ecological niche partitioning between the two phylotypes, a temporal segregation that mirrors the spatial segregation observed in open ocean waters where

Trichodesmium thrives in warm surface waters and UCYN-A develops deeper in the water column (Moisander et al., 2010; Bonnet et al., 2015; Stenegren et al., 2018).

UCYN-C was the least abundant group during GOPS (6.38×10^2 *nifH* gene copies L⁻¹), but the most abundant during MOISE (up to 2.6×10^7 *nifH* gene copies L⁻¹). During GOPS, UCYN-C abundances did not show any spatial variability among the four stations sampled (Fig. 3). Comparing the meteorological conditions between both surveys, we found that MOISE coincided with a strong episode of El Niño and an increase in SST (Fig. 2B; Fig. S3). This is consistent with the warm temperatures (28-38°C) required for the growth of Pacific UCYN-C isolates (Taniuchi et al., 2012; Saulia et al., Pers. Comm.), and the presence of UCYN-C in the warm waters (30°C) of the Solomon Sea (Berthelot et al., 2017) and tropical North Atlantic (Langlois et al., 2008). However, temperature alone may not explain the high abundances of UCYN-C, which could be due to PO₄³⁻ concentrations that were 4.5 times higher during MOISE than during GOPS (Fig. S2; S3 in Annex 1). This is consistent with a mesocosm experiment conducted within the New Caledonian lagoon where a PO₄³⁻ fertilization triggered a bloom of UCYN-C (Turk-Kubo et al., 2015). Similarly, the decrease observed of Het-1 and UCYN-A together with an increase of UCYN-C after the PO₄³⁻ fertilization (Turk-Kubo et al., 2015) is consistent with a negative correlation between Het-1 and UCYN-C during GOPS.

Het-1 was present almost throughout both the GOPS and MOISE surveys, with abundances up to 5.31×10^4 and 2.62×10^7 *nifH* gene copies L⁻¹ for GOPS and MOISE, comparable to other sites in the WTSP (Bonnet et al., 2015; Stenegren et al., 2018). These relatively high abundances contrast with previous studies conducted in the New Caledonian lagoon reporting low concentrations of Het-1 (Turk-Kubo et al., 2015) and other heterocystous symbionts of diatoms (Biegala and Raimbault 2008, Rodier and Le Borgne 2010). During GOPS, Het-1 abundances were poorly correlated to the environmental parameters tested here (only negatively correlated with wind speed). However, their abundances were higher at the two most coastal stations (close to the Dumbéa river mouth), which would indicate that they thrive in waters impacted by nutrient input. This hypothesis is in accordance with the positive correlation existing between Het-1 abundance, rainfall and PO₄³⁻ concentration at the M99 station during MOISE, which is known to be impacted by nutrients from the Dumbéa River (Faure et al., 2010, Neveux et al., 2009). During GOPS, the Het-1 abundances did not differ significantly between the two seasons, while they were slightly higher in winter than in summer during MOISE. We observed that Het-1 is more influenced by nutrient availability than by SST and therefore these results did not allow us to conclude regarding the seasonal variability of Het-1.

N₂ fixation rates measured during GOPS and MOISE (0.4-29.3 and 0.6-10.6 nmol N L⁻¹ d⁻¹, respectively) are in line with those measured previously in the lagoon (8.0-27.7 nmol N L⁻¹ d⁻¹; Biegala and Raimbault 2008; Berthelot et al 2015; Bonnet et al., 2016) and open ocean mixed layer waters around Melanesian archipelagos (Bonnet et al., 2018; Bonnet et al., 2015; Berthelot et al., 2017), but lower than those off the tropical north-northeast coast of Australia (32.0 nmol N L⁻¹ d⁻¹; Messer et al., 2017). When compared with Pacific surface water rates at similar latitudes, including the Eastern tropical South Pacific (0.9 nmol N L⁻¹ d⁻¹; DeKaetzmacker et al., 2013) and the tropical South Pacific Gyre (~0.5 nmol N L⁻¹ d⁻¹; Raimbault and Garcia 2008; Bonnet et al., 2018), the rates reported here are high. Indeed, our observations, along with those previously reported in the WTSP (Messer et al., 2015; 2017; Montoya et al., 2004; Bonnet et al., 2009; 2015; 2018; Berthelot et al., 2017), reinforce the view of the WTSP region as a hotspot of diazotroph activity within the Southern Hemisphere (Bonnet et al., 2017).

N₂ fixation rates were higher (not always statistically significant) during summer, but they were notably high throughout the year. With a few exceptions (Garcia et al., 2007; Bonnet et al., 2015; Biegala and Raimbault 2008), previous N₂ fixation studies from the New Caledonian lagoon and the WTSP were conducted over the austral summer, which is considered the main N₂ fixation season in the region (Garcia et al., 2007), as well as in the boreal summer at station ALOHA (Böttjer et al., 2017; Dore et al., 2002). The GOPS and MOISE datasets suggest that seasonality is less pronounced than previously thought, and that relatively high N₂ fixation rates are maintained in the New Caledonian lagoon all year long, despite seasonal changes in the dominant diazotrophs.

During the cold season, UCYN-A accounted for 65-90% of the total *nifH* counts during the GOPS survey. Considering published cell-specific rates of UCYN-A1 (Martinez-Perez et al., 2016) and the abundances reported here, their potential contribution to bulk N₂ fixation would be ~23% during the winter season (we note that these calculations must be considered with caution as all diazotrophs are not necessarily active). During MOISE, UCYN-C dominated the diazotroph community, and their contribution to bulk N₂ fixation considering cell-specific rates (Bonnet et al., 2016) would be ~84% over the winter. This suggests that UCYN groups are significant contributors to “off-season” N₂ fixation in New Caledonia, which is in accordance with previous data showing that pico- and nano-sized diazotrophs account for ~78% of N₂ fixation during the cold season (Biegala and Raimbault 2008). During the warm season, *Trichodesmium* was the second most abundant group during GOPS and the least abundant during MOISE. Considering *Trichodesmium* cell-specific rates (Bonnet et al., 2018), *Trichodesmium* would contribute only ~7-11% over the summer, indicating that other groups

(targeted in this study or not) drive N₂ fixation during the warm season in New Caledonia. This is an unexpected result, as in most oceanic areas where UCYN groups dominate, N₂ fixation rates are lower than those where *Trichodesmium* dominates (Bonnet et al., 2015; Shiozaki et al., 2018).

N₂ fixation rates were higher during GOPS than during MOISE, while total *nifH* counts showed the opposite pattern. This difference may be due to a change in the diazotrophic community structure. While the abundance of *Trichodesmium* and UCYN-A did not vary much between the two surveys, the abundance of UCYN-C and Het-1 increased by an order of magnitude from GOPS to MOISE, which did not translate into an increase in N₂ fixation rates. The low N₂ fixation rates measured during MOISE compared to GOPS differ from previous studies finding that increased rates coincided with El Niño events (Dekaezemaker et al., 2013) and high PO₄³⁻ availability (Moutin et al., 2008; 2005). This suggests that factors other than temperature and PO₄³⁻ were limiting N₂ fixation in UCYN-C and Het-1 during MOISE.

Conclusions

This study reports on the spatiotemporal composition of the diazotrophic community and N₂ fixation rates in the New Caledonian lagoon. Several studies have pinpointed the importance of N₂ fixation for sustaining both planktonic (Berthelot et al., 2015) and benthic (Benavides et al., 2016) productivity during the summer season in the lagoon, but here we document that high fixed N inputs can also take place during the cold season. Our analyses suggest that the physicochemical characteristics of New Caledonian lagoon waters lead to the heterogeneity of diazotrophic populations both at seasonal and annual timescales. UCYN-A dominated the diazotrophic community during the two first years of the survey (GOPS) throughout the year and UCYN-C during the second part of the survey (MOISE), indicating that typical winter and summer patterns in terms of diazotroph phylotype dominance cannot be assumed and that the dynamics of diazotroph populations are complex and difficult to predict. However, this study highlights the importance of time-series studies with a fine geographic resolution to identify the interactions between environmental variables and the diazotrophic community and to improve calculations of marine N budgets at local and regional scales.

Author contribution statement

SB, MR and CD conceived the study; SB, ES, CD acquired data; ES, MB, KAT, HC, BH, SB, MR, OG and CD analysed the data; ES, MB, KAT, BH, LR, JPZ and SB interpreted the data; ES, MB and SB wrote the manuscript; and all authors revised the manuscript.

Acknowledgments

This research is a contribution of the GOPS project funded by the Institut de Recherche pour le Développement. The authors thank the crew of the R/V Coris and Archamia, as well as the Laboratoire des Moyens Analytiques (IMAGO, Noumea) for nutrient analyses and *in situ* support during surveys. KAT, BH and HC were supported by a grant from the Simons Foundation (SCOPE Award ID 329108, to Jonathan Zehr) and MB and LR were supported by grant 6108-00013 from the Danish Council for independent research. The lagoon figure 1 was realized with the MapCamelia software developed by P. Douillet (M.I.O.).

II.3 Conclusion

Cette étude a permis de caractériser et quantifier pour la première fois la distribution spatio-temporelle de 5 phylotypes cyanobactériens diazotrophes (UCYN-A, UCYN-C, UCYN-B, *Trichodesmium* et DDAs (Het-1)) ainsi que les taux moyens de fixation d'azote dans le lagon calédonien au cours de 4 années de suivi mensuel. Elle a montré que les cyanobactéries diazotrophes étaient présentes tout au long de l'année dans le lagon, avec des abondances moyennes élevées (10^4 à 10^7 copies du gène *nifH* L⁻¹), dominées par les UCYN et notamment les UCYN-A et les UCYN-C. Ces résultats contrastent avec ceux observés en milieu hauturier autour des archipels mélanésiens où les cyanobactéries filamenteuses telles que *Trichodesmium* dominant (Stenegren et al. 2018). Nos résultats indiquent également que les taux de fixation d'azote sont élevés même en saison hivernale, ce qui contraste également avec le milieu hauturier.

Pour aller plus loin, il serait intéressant de réaliser le séquençage de l'ensemble de la communauté diazotrophe à différentes saisons pour estimer la possible contribution d'autres groupes non ciblés dans cette étude à l'aide de la qPCR (qui cible uniquement des groupes choisis). En effet, il existe des diazotrophes non cyanobactériens (*i.e.* gamma protéobactérie non cultivées) qui pourraient contribuer à l'activité diazotrophe du lagon et qui ont déjà montré des abondances non négligeables (10^2 - 10^4 *nifH* copies L⁻¹) dans la région, en milieu hauturier (Moisander et al. 2014) et côtier dans les eaux calédoniennes (Turk-kubo et al. 2015) et australiennes (*i.e.* grande barrière de corail) (Messer et al. 2017).

Les fortes abondances d'UCYN ont suscité un vif intérêt dans notre équipe. En effet, depuis 2012 nous avons initié une bio-prospection dans le but d'isoler de nouvelles souches de cyanobactéries diazotrophes. Actuellement, à notre connaissance, moins d'une dizaine de représentants d'UCYN-B et C marins sont disponibles en culture (Webb et al. 2009 ; Ohki et al. 2008 ; Reddy et al. 1993 ; Mitsui et al. 1978 ; Taniuchi et al. 2011) (les UCYN-A ne sont toujours pas isolées). Il est donc apparu important d'accroître le nombre de souches disponibles en culture pour la communauté scientifique afin de pouvoir étudier leur physiologie dans le but de mieux comprendre leur contribution dans les cycles biogéochimiques de l'azote et du carbone et leur potentiel de valorisation. Avant cela, la première phase consiste à caractériser les souches isolées et déterminer "qui sont-elles ?". Pour cela, nous avons utilisé une panoplie d'outils incluant des analyses morphologiques, génétiques et protéomiques, ce qui fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 3

Caractérisation morpho-génétique et évaluation de la méthode MALDI-TOF-MS pour l'identification de souches cyanobactériennes diazotrophes isolées du Pacifique Sud-Ouest

SOMMAIRE

III.1	Introduction	52
III.2	Matériels et méthodes.....	54
III.2.1	Culture des cyanobactéries	54
III.2.2	Identification morphologique.....	55
III.2.3	Analyses moléculaires	55
III.2.4	Analyse du protéome par MALDI-TOF-MS	57
III.3	Résultats	59
III.3.1	Identification morphologique.....	59
III.3.2	Identification génétique	64
III.3.3	Analyse taxonomique par spectrométrie de masse et comparaison taxonomique avec la méthode moléculaire.....	67
III.4	Discussion	73
III.4.1	Caractérisation morpho-génétique	73
III.4.2	Evaluation du potentiel de la méthode MALDI-TOF-MS.....	74
III.5	Conclusion.....	77

Contributions: Sophie Bonnet (SB), Nicolas Lebouvier (NL) et Emmrick Saulia (ES) ont conçu l'étude. Les isolements de souches de cyanobactéries ont été effectués par SB et Mercedes Camps (MC). ES a réalisé les cultures, les extractions et les analyses MALDI-TOF-MS. ES, SB et Véronique Berteaux-Lecellier (VB) ont réalisé les extractions d'ADN et MACROGEN a effectué les PCR et le séquençage ADN. VB a nettoyé les séquences et réalisé les arbres phylogénétiques. Les photos des cyanobactéries ont été prises par ES, SB et MC.

III.1 Introduction

Au cours des dernières décennies, les chercheurs en chimie de substances naturelles ont porté leur attention sur l'environnement marin en tant que source de biomolécules d'intérêt issues d'algues, d'animaux, de micro-organismes et notamment de cyanobactéries (Kiuru et al. 2014). Selon le Ministère de l'Écologie en France, le marché des biotechnologies marines connaît une croissance de 10% par an et se présente comme l'un des secteurs les plus prometteurs en matière de création d'emplois et de richesses dans les années à venir (<http://www.developpement-durable.gouv.fr/Biotechnologie-marine-quels.html>).

Les cyanobactéries sont parmi les principaux acteurs biologiques à l'origine de nombreux cycles biogéochimiques, particulièrement celui du carbone et de l'azote (Galloway et al. 2004; Worden et al. 2015). Ces organismes sont également connus pour produire, selon les espèces, une très grande diversité de métabolites à haute valeur ajoutée pouvant intéresser plusieurs secteurs d'applications (*e.g.* bio-énergie, nutraceutique, pharmaceutique et cosmétique) (Mourelle et al. 2017; Burja et al. 2001; Singh et al. 2017). Cependant, l'une des étapes indispensables à la valorisation des cyanobactéries est la bio-prospection permettant l'isolement et l'identification de nouvelles souches d'intérêt industriel.

Ainsi, la détermination précise des espèces de micro-organismes reste un défi et les techniques actuelles restent onéreuses et chronophages. Deux types principaux d'approches ont été utilisés jusqu'à présent pour caractériser les cyanobactéries à savoir : 1/ des études morphologiques basées sur plusieurs caractéristiques dont la majorité concerne la taille, l'organisation cellulaire (unicellulaire *vs.* filamenteuse), la forme (*e.g.* ovoïde ou ellipsoïdale chez les unicellulaires, effilée ou spiralée chez les filamenteuses) et la présence de cellules spécialisées (*e.g.* hétérocystes, akinètes) (Broady et Kibblewhite, 1991.; Rippka et Cohen-Bazire 1983) ; 2/ des études génétiques (barcoding moléculaire) avec notamment l'examen des structures secondaires de l'ARNr 16S ainsi que la région ITS (Internal Transcribed Spacer), qui ont révolutionné la systématique des cyanobactéries (Nubel et al. 1997; Janse et al. 2003). Actuellement, « l'approche polyphasique » qui se traduit par la combinaison des données morphologiques, écologiques et moléculaires est privilégiée dans la détermination et la description des taxons de cyanobactéries (*e.g.* Komarek 2010; Siegesmund et al. 2008).

L'approche protéomique par MALDI-TOF-MS : une nouvelle méthode d'identification des cyanobactéries diazotrophes marines ?

Une approche alternative à l'identification morphologique et génétique des micro-organismes consiste en un bio-typage chimiotaxonomique basé sur le protéome, utilisant la spectrométrie de masse MALDI-TOF-MS. L'utilisation de la spectrométrie de masse pour caractériser les micro-organismes a débuté en 1975. Elle est aujourd'hui utilisée en routine pour l'identification de pathogènes (*i.e.* bactéries, levures, champignons) en milieu médical (Hsieh et al. 2008; Carbonnelle et al. 2011). Le bio-typage MALDI-TOF-MS a également été utilisé avec succès pour l'identification d'insectes (Kaufmann et al., 2011), de mollusques (Stephan et al. 2014) et de poissons (Volta et al. 2012). Néanmoins, cette technique est encore très peu utilisée pour le bio-typage du phytoplancton. Quelques rares études se sont intéressées aux micro-algues eucaryotes (Emami et al. 2015; Murugaiyan et al. 2011; von Bergen et al. 2009) et aux cyanobactéries marines et celles d'eau douce (Imanishi et al. 2017; Sebela et al. 2018; Sun et al. 2016).

Dans l'étude d'Emami et al. (2015), le bio-typage par MALDI-TOF-MS a permis de mettre en évidence une diversité de souches bien supérieure par rapport à la méthode du barcoding de l'ARNr 18S, en particulier dans la collection de CCAP *Dunaliella*. L'application de la méthode MALDI-TOF-MS sur les cyanobactéries est apparue très récemment avec la première étude d'identification du profil protéomique de cyanobactéries (*e.g.* *Microcystis*, *Anabaena*) (Imanishi et al. 2017). Elle a démontré le potentiel de discrimination spécifique de la méthode sur les cyanobactéries (Imanishi et al. 2017).

Une étude similaire à celle d'Emami et al. (2015), réalisée sur des cyanobactéries, a également mis en évidence que le bio-typage protéomique révélait une diversité de souches *Choococidiopsis* bien supérieure à celle reconnue par la méthode de l'ARNr 16S (Sebela et al. 2018).

En d'autres termes, ces deux études ont démontré que le barcoding moléculaire ainsi que le bio-typage par MALDI-TOF-MS devraient être considérés comme une approche polyphasique dans la caractérisation des micro-algues et des cyanobactéries (Emami et al. 2015; Sebela et al. 2018). De plus, cette technologie est moins onéreuse, plus simple d'utilisation et plus rapide que l'identification basée sur des critères génétiques (Tran et al. 2015). Cependant, pour les cyanobactéries mais également pour les micro-algues eucaryotes, aucune base de données de « fingerprinting » (*i.e.* signature protéomique spécifique) n'existe actuellement pour l'identification des espèces. Malgré les études récentes sur l'identification et la classification de

cyanobactéries (Imanishi et al. 2017; Sun et al. 2016; Sebela et al. 2018), la méthode d'identification par MALDI-TOF-MS doit encore progresser par rapport à son application en milieu médical entre autre pour la détection de pathogènes pour l'homme. Il existe encore un déficit de connaissances sur l'optimisation du protocole de préparation des échantillons ainsi que sur la reproductibilité, notamment l'évaluation de l'impact des phases de croissance cellulaire et du type de milieu de culture utilisé pour la croissance des souches étudiées.

Dans cette étude, nous avons dans un premier temps caractérisé sur la base de critères morphologiques et génétiques (ARNr 16S), 16 souches de cyanobactéries diazotrophes isolées du Pacifique Sud-Ouest. Dans un second temps, nous avons analysé ces mêmes souches par bio-typage MALDI-TOF-MS afin de comparer les deux approches (moléculaire vs protéomique) et d'évaluer sa compatibilité comme méthode d'identification alternative à la technique moléculaire. Nous avons également réalisé des tests de sensibilité afin d'évaluer l'impact du milieu de culture utilisé et des différentes phases de cycle cellulaire.

III.2 Matériels et méthodes

III.2.1 Culture des cyanobactéries

16 souches de cyanobactéries diazotrophes, isolées par l'IRD dans l'Océan Pacifique Sud-Ouest hauturier et le lagon calédonien mais non caractérisées ont été utilisées pour notre étude. Nous avons utilisé également 2 souches connues et disponibles dans les souchothèques internationales (*Crocospaera watsonii* WH0003 et WH0002) comme témoins positifs pour les analyses moléculaires. Ces souches ont été cultivées en mode batch dans des erlenmeyers de 250 ml contenant 120 ml de milieu de culture et agitées à l'aide d'un agitateur magnétique à faible vitesse.

Différents milieux ont été utilisés en fonction de ceux qui avaient permis d'isoler ces souches : le milieu YBC II (Chen et al. 1996), le milieu F/2 (Guillard, 1975), le milieu ATCC 616 (BG11, modifié selon Stanier et al. (1971), sans NaNO₃), le milieu ATCC 957 (MN, modifié selon Borowitzka et Borowitzka (1988), sans NaNO₃) et le milieu EL (pour « eau du lagon ») basé sur de l'eau de mer naturelle prélevée dans le lagon de Nouméa, filtrée à 0,45 puis 0,2 µm, autoclavée et enrichie en nutriments, métaux et vitamines dans les mêmes proportions que celles du YBC II.

Les souches ont été cultivées en conditions non-axéniques dans une enceinte climatique (AqualyticTM) avec un cycle jour : nuit 12 h:12 h, une intensité lumineuse de 100 µmol photons.

m⁻². s⁻¹ et une température de 27 °C. La croissance des cultures en batch a été suivie tous les deux jours par fluorescence in vivo : 2 ml de culture ont été prélevés dans des cuves en méthacrylate et la fluorescence in vivo a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre (TRILOGY Turner Designs équipé d'un kit optique modèle N°041 UV CDOM/AM).

III.2.2 Identification morphologique

L'observation des souches et leur description morphologique ont été réalisées à l'aide d'un microscope Carl Zeiss Imager A2 relié à une lampe HBO 100. Le filtre épifluorescent Cy3 a permis d'observer les souches par fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 543 nm. Les objectifs utilisés pour la prise de photos ont été les objectifs 10x /0,3 et 40x /1,3.

III.2.3 Analyses moléculaires

✓ Extraction de l'ADN

Chaque souche de cyanobactéries a été culotée dans des tubes eppendorf (1,5 ml) à partir des cultures liquides par centrifugation à une vitesse de 14 000 rpm pendant 5 minutes. L'ADN a été extrait à l'aide d'un kit d'extraction Qiagen (QIAmp Qiagen) conformément au protocole décrit par Moisaner et al. (2010) modifié pour accroître l'efficacité de lyse des parois cellulaires.

Tout d'abord, les culots de chaque échantillon dans lesquels ont été ajoutés 400 µl de tampon AP1 du kit, ont été soumis à un choc thermique à l'azote liquide trois fois consécutives. Entre chaque passage à l'azote liquide, les échantillons ont été placés à 65 °C pendant 10 minutes et vortexés. Il a été ajoutée une étape de lyse des cellules avec un broyeur à billes (instrument «Fastprep») composé de quatre cycles de 20 s et une vitesse de 6 m.s⁻¹. 5 µl de solution de Proteinase-K de Qiagen ont été ajoutés à chaque tube, préalablement incubés pendant une nuit entière à 55 °C au lieu de 1 h dans le protocole originel. Le lendemain, 4 µl de RNase A (Qiagen) ont été ajoutés à chaque échantillon qui a été vortexé vigoureusement puis incubé à 65 °C pendant 10 minutes. 130 µl de tampon P3 ont été ajoutés au lysat et les échantillons ont été incubés dans la glace pendant 10 minutes. Ils ont ensuite été centrifugés dans une colonne de purification (2 minutes à 14 000 rpm) et nettoyés avec différents tampons de lavage (AW1 et AW2) avant d'être élués dans le tampon d'éluion AE. L'ADN ainsi extrait de chaque cyanobactérie a été stocké à -20°C jusqu'à l'envoi à MACROGEN.

✓ PCR et séquençage

Les amplifications PCR ainsi que le séquençage des amplicons ont été réalisés par MACROGEN selon le protocole mis en place par Nubel et al. (1997). Les amorces utilisées ont été pour l'amorce sens, CYA359F, alors que l'amorce antisens, était CYA781R, un mélange équimolaire de CYA781R(a) et CYA781R(b) (Tab. III-1). La taille attendue de chaque amplicon était d'environ 450 pb (paire de bases). Les conditions utilisées pour la PCR sont les suivantes : après une étape de dénaturation de 5 min à 94 °C, 35 cycles d'incubation ont suivi, chacun consistant en 1 minute à 94 °C, 1 minute à 60 °C, 1 minute à 72 °C. A la suite de ces 35 cycles, une extension finale de 7 minutes à 72 °C a été réalisée. Ensuite, les produits PCR (amplicons) ont été purifiés puis séquencés sur les deux brins à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification. Les chromatogrammes et les séquences ont été récupérés sur le site internet de MACROGEN (<http://www.dna.macrogen.com/>). Les séquences ont été vérifiées et éventuellement corrigées à l'aide des chromatogrammes fournis. La partie correspondante aux amorces a été éliminée.

Tableau III-1 : Séquences des amorces et site cible. Les désignations F (« forward » sens) R (« reverse » antisens) et font référence à l'orientation des amorces sur le gène de l'ARNr 16S.

Amorce	Séquence (5' à 3')	Site cible
CYA359F	GGG GAA TYT TCC GCA ATG GG	359–378
CYA781R(a)	GAC TAC TGG GGT ATC TAA TCC CAT T	781–805
CYA781R(b)	GAC TAC AGG GGT ATC TAA TCC CTT T	781–805

✓ Analyses phylogénétiques

Pour corroborer l'origine cyanobactérienne des échantillons séquencés mais distinguer les espèces les plus proches, un BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a été réalisé à l'aide du programme «blastn» avec la base de données «collection de nucléotides (nr/nt)».

Les analyses évolutives ont été menées dans MEGA 7 (Kumar et al. 2016). L'analyse phylogénétique moléculaire a été réalisée par la méthode du maximum de vraisemblance. L'historique évolutif a été déduit en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le modèle général réversible dans le temps (Nei et Kumar 2000). Le pourcentage d'arbres dans lesquels les taxons associés sont regroupés est indiqué à côté des branches. L'arbre initial

a été obtenu automatiquement en appliquant les algorithmes Neighbor-Join et BioNJ à une matrice de distances par pair, estimée à l'aide de la méthode MCL (Maximum Composite Likelihood), par MEGA 7, après alignement des séquences, recherche des paramètres du meilleur modèle (dans MEGA 7 « find best model ») et ensuite application des paramètres pour construire l'arbre. L'arbre obtenu a été dessiné à l'échelle, la longueur des branches étant mesurée en nombre de substitutions par site. L'analyse a porté sur 68 séquences de nucléotides. Toutes les positions contenant des gaps et des données manquantes ont été éliminées. Il y avait ainsi un total de 313 positions dans le jeu de données final.

III.2.4 Analyse du protéome par MALDI-TOF-MS

Le MALDI-TOF-MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time of Flight) est un spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) et un analyseur à temps de vol (TOF, time-of-flight mass spectrometry).

Le principe général du MALDI-TOF-MS est le suivant : des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique se déplacent, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge (m/z). La première étape consiste à déposer directement sur la plaque cible l'échantillon (ou extrait) et de recouvrir après séchage d'une matrice conduisant à la co-cristallisation de la matrice avec l'échantillon. Une fois les échantillons déposés sur la cible, celle-ci est introduite dans le spectromètre de masse et chaque dépôt est soumis à l'action du rayon laser. Le rôle de la matrice est d'absorber l'énergie provenant du laser provoquant la vaporisation de l'échantillon avec formation d'ions de masses différentes.

✓ Préparation des échantillons

La récolte de chaque culture a été systématiquement effectuée au début de la phase stationnaire, correspondant à une culture d'environ 20-25 jours, par centrifugation de 1 ml de culture à 14 000 rpm pendant 5 minutes. Les culots ont été lavés deux fois avec de l'eau de mer naturelle filtrée à 0,2 μm puis stockés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ jusqu'à analyse. Chaque culot a été incubé pendant 5 minutes dans 30 μL d'acide formique (70:30 [vol/vol]) / ACN (Sigma-Aldrich, Lyon, France), et homogénéisé pendant 30 secondes en utilisant un pilon. Par la suite, ils ont été incubés pendant 5 minutes à température ambiante et immergés dans un bain à ultrasons

pendant 15 minutes. 1 μ L de l'extrait a été transféré sur une plaque MSP 96 en acier poli (Bruker), séché à température ambiante puis recouvert de 1 μ L d'une solution matricielle saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) dans 50% d'ACN-2,5% d'acide trifluoroacétique (Bruker). La matrice HCCA a permis la mesure en MALDI-TOF-MS des protéines qu'elle a cristallisée après dépôt et séchage sur le spot.

✓ **Acquisition des données**

Les mesures ont été effectuées à l'aide d'un système Biotyper CA doté du logiciel Bruker benchtop microflex™ MALDI-TOF-MS. Le laser utilisé pour l'ionisation des molécules possède deux sources : la source d'ion 1, réglée sur 20 kV et la source d'ion 2, fixée à 16,7 kV avec une fréquence laser de 20 Hz. Les spectres ont été ainsi enregistrés en mode linéaire positif pour la plage de masse de 2 000 à 18 000 m/z. Les spectres ont été calibrés en externe en utilisant le standard de test bactérien (BTS0000218558; Bruker).

✓ **Traitement des données**

Les spectres étudiés ont été enregistrés en tant que référence MSP (Main Spectrum Patterns) à l'aide de la fonctionnalité automatisée du package MALDI Biotyper (logiciel Bruker MBT 3.1). Une sélection de 20 spectres de masse pour chaque souche a été importée dans le logiciel, afin de définir un spectre de référence. Ensuite, le logiciel a effectué la normalisation, le lissage, la correction de la ligne de base et la sélection des pics, en générant une liste des pics les plus significatifs. Le logiciel a aussi calculé le spectre principal contenant la masse de pic moyen (m/z: m masse et z représente le nombre de charge des ions), l'intensité de pic moyen et les informations de fréquence.

Un dendrogramme a été généré à partir des différents MSP de souches cyanobactériennes diazotrophes et du logiciel MALDI Biotyper. Les souches dont le niveau de distance était inférieur à 500 (unités arbitraires) ont été décrites comme conspécifiques (*i.e.* appartenant à la même espèce) de manière fiable et les souches dont le niveau de distance était inférieur à 100 ont été considérées comme des clones (Sauer et al. 2008).

✓ **Interprétation des données et blind-tests**

Le MALDI Biotyper CA System Sample Workflow (logiciel interne) compare chaque spectre de masse d'échantillons aux spectres de masse de référence de la base de données MSP. Le logiciel calcule une valeur de score unitaire (score de modèle principal ou score de MP) comprise entre 0 et 3, indiquant le degré de similarité entre l'échantillon et le spectre de référence. Comme spécifié par le fabricant (Bruker) pour l'identification des bactéries, les scores $\geq 2,0$ sont généralement acceptés pour une identification fiable au niveau de l'espèce, et les scores $\geq 1,7$ et $< 2,0$ sont utilisés pour l'identification au niveau du genre. Cependant, certaines études ont suggéré que ce score pouvait être réduit à 1,5 (Crossay et al. 2017; Nonnemann et al. 2013).

✓ **Etude d'impact du cycle cellulaire et du milieu de culture sur les spectres**

Afin d'évaluer si la phase du cycle cellulaire (*i.e.* latence, stationnaire, exponentielle) avait un impact sur les spectres, des analyses MALDI-TOF-MS ont été réalisées par nos soins à différentes phases du cycle de croissance de deux souches (une filamenteuse, Cassiopée 73.1 et une unicellulaire, Necta). Pour cela, elles ont été cultivées pendant 25 jours en duplicats dans un milieu F/2 stérile dans des erlenmeyers de 250 ml et dans les mêmes conditions que celles décrites dans la section III.2.1. Les échantillons ont été recueillis environ tous les 2 jours et ont été préparés pour l'analyse MALDI comme décrits précédemment.

Afin d'évaluer l'influence du milieu de culture sur les spectres MALDI-TOF-MS, les deux mêmes souches ont été cultivées dans trois milieux différents : le milieu F/2 dans lequel elles ont été isolées et conservées en culture, et les milieux EL et MN. Les échantillons ont été récoltés en début de phase stationnaire comme précédemment et les échantillons ont été préparés comme décrit dans la section III.2.4.1.

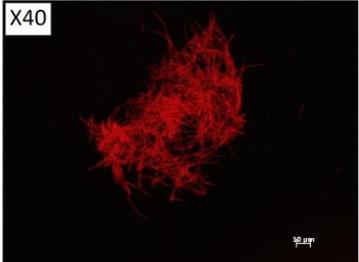
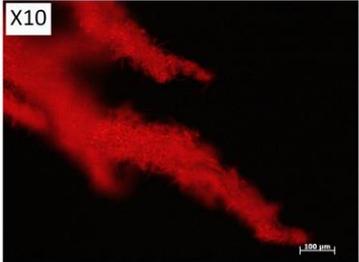
III.3 Résultats

III.3.1 Identification morphologique

Les campagnes de prospection ont permis de générer une collection de 16 isolats cyanobactériens marins prélevés en zone côtière dans le lagon de Nouméa, ou en zone hauturière dans la Zone Economique Exclusive (ZEE) de la Nouvelle Calédonie et dans les eaux internationales du Pacifique Sud-Ouest, central et équatorial. A partir des premières

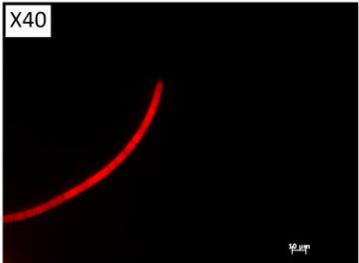
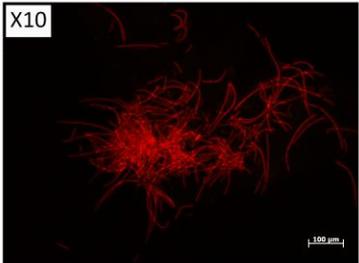
souches isolées, la première étape consistait à identifier les souches. Dans cette perspective, plusieurs outils ont été utilisés et en premier lieu la microscopie optique à épifluorescence afin de décrire les morphologies et organisations cellulaires. Pour chaque isolat, les planches de photos avec les descriptions phénotypiques sont présentées dans la figure III-1.

A



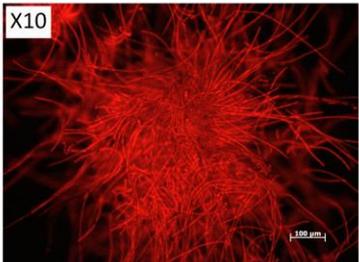
GOPS18

Trichomes hétérocystés lamellés avec une polarité basale-apicale. Hétérocyste en position apicale. Trichomes très éffilés, avec une largeur de 0.5-2 μm et une longueur de 10-30 μm. Colonie très dense allongée.



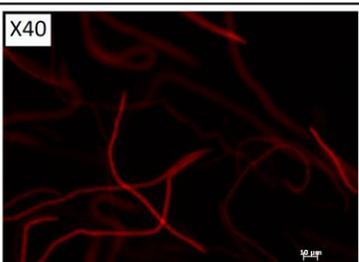
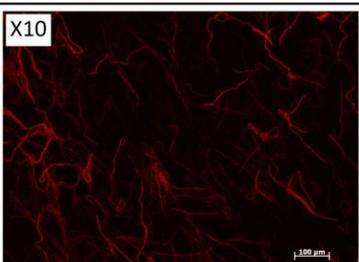
SD12

Trichomes hétérocystés lamellés avec une polarité basale-apicale. Hétérocyste en position apicale. Trichomes très éffilés, avec une largeur de 0.5-10 μm et une longueur de 20-250 μm. Colonie plus ou moins dense.



ST69

Trichomes hétérocystés lamellés avec une polarité basale-apicale. Hétérocyste en position apicale. Trichomes éffilés, avec une largeur de 4-10 μm et une longueur de 20-450 μm. Colonie concentrique très dense.



Spiruline

Trichomes non hétérocystés en hélice ouverte avec une largeur de 2-3 μm et une longueur allant de 100 à plus de 200 μm. Phénotype similaire au genre *Spirulina*.



M99

Trichomes hétérocystés lamellés avec une polarité basale-apicale. Hétérocyste en position apicale. Trichomes éffilés.

		<p style="text-align: right;">VAHI</p> <p style="text-align: right;">B</p> <p>Cellules de forme ellipsoïdale regroupées en colonies (agrégats). Cellules avec une largeur de 2-3,5 µm et une longueur de 3-5 µm.</p>
		<p style="text-align: right;">IBO</p> <p>Cellules libres et homogènes de forme ellipsoïdale. Cellules avec une largeur de 4-6 µm et une longueur de 5-7 µm.</p>
		<p style="text-align: right;">IMA</p> <p>Cellules de forme ellipsoïdale. Cellules avec une largeur de 3-4 µm et une longueur de 3-5 µm.</p>
		<p style="text-align: right;">Cassiopée 63.1</p> <p>Cellules de forme ellipsoïdale formant des colonies très denses. Cellules avec une largeur de 3-4 µm et une longueur de 3-5 µm.</p>
		<p style="text-align: right;">Cassiopée 63.2</p> <p>Cellules de forme ellipsoïdale. Cellules avec une largeur de 3-4 µm et une longueur de 3-5 µm. Cellules regroupées en colonies très denses de plusieurs amas avec un aspect cotoneux.</p>
		<p style="text-align: right;">NECTA</p> <p>Cellules libres de forme ellipsoïdale. Cellules avec une largeur de 3-4 µm et une longueur de 3-5 µm. Cellules libres.</p>

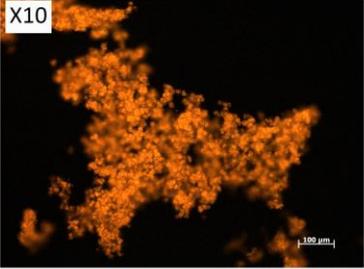
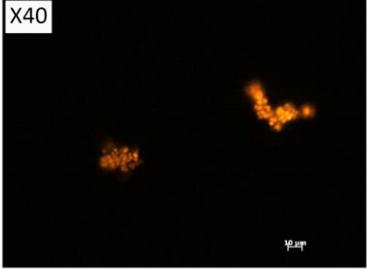
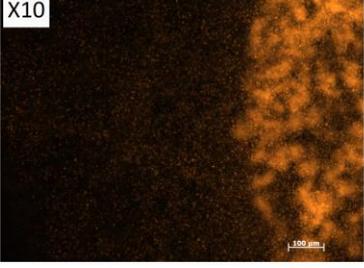
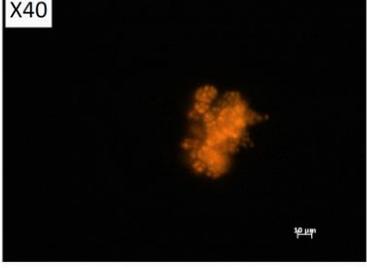
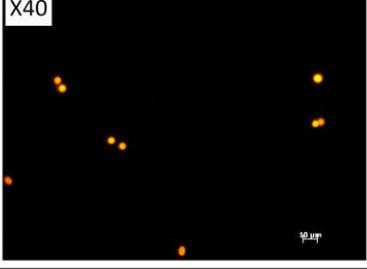
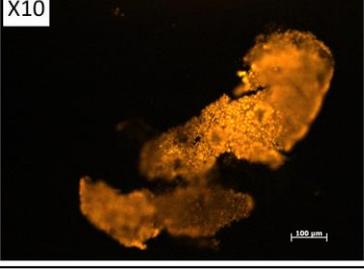
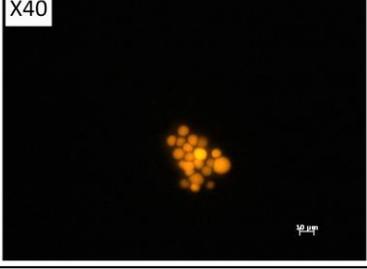
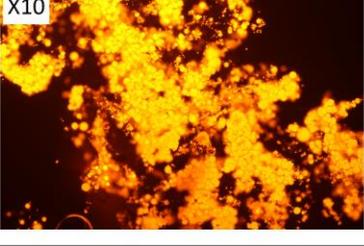
		<p>ST71 C</p> <p>Cellules de forme ellipsoïdale regroupés en colonies plus ou moins denses (agrégats). Cellules avec une largeur de 2-3,5 µm et une longueur de 3-5 µm.</p>
		<p>ST37</p> <p>Cellules de forme ellipsoïdale libres ou en colonies de tailles variables. Cellules avec une largeur de 3-4 µm et une longueur de 3-5 µm.</p>
		<p>ST55</p> <p>Cellules de forme ellipsoïdale libres et homogènes. Cellules avec une largeur de 4-6 µm et une longueur de 5-7 µm.</p>
		<p>Prony</p> <p>Cellules de forme plus ou moins ronde à ovale irrégulier. Cellules dont le diamètre peut aller de 4 µm à plus de 15-20 µm. Cellules solitaires ou en colonies de tailles variables (agrégats).</p>
		<p>Dumbéa bis</p> <p>Cellules de forme plus ou moins ronde à ovale irrégulier. Cellules dont le diamètre peut aller de 4 µm à plus de 15-20 µm. Cellules solitaires ou en colonies de tailles variables (agrégats).</p>

Figure III-1 : Photos des souches de cyanobactéries diazotrophes observées en microscopie à épifluorescence. Les souches filamenteuses sont présentées dans la planche A et les souches unicellulaires dans les planche B et C (Photos : M. Camps et S. Bonnet).

Les observations ont révélé deux types d'organisation soient 5 souches filamenteuses et 11 unicellulaires. Au niveau des filamenteuses, deux phénotypes ont été observés : un phénotype se rapprochant d'une *Spirulina* (Spiruline) avec des trichomes libres non-hétérocystés de forme spiralée et 5 souches se rapprochent de l'ordre des Nostocales,

particulièrement aux genres *Rivularia* et *Calothrix* (SD12, ST69, GOPS18 et Calo) avec des filaments hétéro-polaires, hétérocystés en position apicale avec des couleurs, formes (*e.g.* effilés) et organisations cellulaires distinctes (Fig. III-1). Pour les souches unicellulaires, l'organisation cellulaire variait selon les souches mais la forme majoritairement retrouvée était ellipsoïdale, similaire à celle observée dans l'ordre des Chroococcales avec des tailles moyennes de 3 à 7 μm (*e.g.* *Cyanothece*). Seules deux souches (Prony et Dumbéa) avaient des formes plus ou moins sphériques à ovale et une taille $> 7 \mu\text{m}$ et dépassant parfois 15 μm .

III.3.2 Identification génétique

L'analyse des séquences d'ARNr 16S a été réalisée avec succès sur les 16 souches isolées. Les blasts des séquences de l'ARNr 16S des souches sont présentés dans le tableau III-2 et montrent des similarités plus ou moins proches (97 à 100%) avec des séquences de souches cyanobactériennes présentes dans la base de données NCBI GenBank. Selon les souches, les taux de similarité les plus élevés ont été relevés sur des souches cultivées et non-cultivées.

Concernant les filamenteuses, la Spiruline est proche d'une souche non cultivée (uncultured prokaryote clone 50782 (99%)) et d'une souche cultivée *Spirulina subsalsa* CCAP 1410/5 (98%). Pour les 4 autres souches filamenteuses hétérocystées, M99 est étroitement liée à une souche non cultivée, uncultured bacterium clone AN3_H01 (100%) et une souche cultivée, *Rivulariaceae cyanobacterium* FCME-C923-M12 (99%). Cassiopée 73.1, SD12, et GOPS18 sont proches de souches cultivées, *Rivulariaceae cyanobacterium* FCME-C923-M12 (99%), *Rivulariaceae cyanobacterium* C1290_M9 (99%), ainsi que *Calothrix* sp. 1410/5 (100%), respectivement.

Les souches unicellulaires de formes ellipsoïdales ST37, ST71, Cassiopée 63.1/63.2, IBO, ST55, et Necta, sont très similaires aux souches non cultivées uncultured cyanobacterium clone H3-10M (99%) et uncultured bacterium clone EDWOCTH12 (99%), et proches de souches cultivées du genre *Cyanothece* telles que *Cyanothece* sp. SKTU126 (99%), *Cyanothece* sp. PCC802 (97%). Les souches IMA et VAHI sont proches de souches cultivées *Gloeotheca* sp. SK40 (98%) et *Gloeotheca* sp. KO68DGA (99%). IMA est également proche d'une souche non cultivée, uncultured cyanobacterium clone CMME06 (99%). Les souches Prony et Dumbéa bis présentent 100% de similarité avec une souche non cultivée (uncultured prokaryote clone OTU368676 (100%)) et 98% avec une souche cultivée (*Xenococcus* sp. PCC 7307 (98%)) (Tab. III-2).

Tableau III-2 : La similarité entre les séquences de gènes d'ARNr 16S obtenues à partir de souches de cyanobactéries de la souchothèque du Pacifique sud-ouest et les parents les plus proches déposés dans la base de données NCBI GenBank.

Souches	Type	Souche la plus proche de GenBank (% similarité)	Souche cultivée la plus proche (% similarité)
Spiruline	Filamenteuse	Uncultured prokaryote clone 50782 (99)	<i>Spirulina subsalsa</i> CCAP 1475/1 (98)
M99	Filamenteuse	Uncultured bacterium clone AN3_H01 (100)	Rivulariaceae cyanobacterium FCME-C923-M12 clone 4 (99)
GOPS18	Filamenteuse		<i>Calothrix</i> sp. CCAP 1410/5 (100)
SD12	Filamenteuse		Rivulariaceae cyanobacterium C1290_M9 clone C1290 M9 clone3 (99)
Cassiopée 73.1	Filamenteuse		Rivulariaceae cyanobacterium FCME-C923-M12 clone 4 (99)
Dumbéa bis	UCYN	Uncultured prokaryote clone New.CleanUp.ReferenceOTU368676 (100)	<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7307 (98)
Prony	UCYN	Uncultured prokaryote clone New.CleanUp.ReferenceOTU368676 (100)	<i>Xenococcus</i> sp. PCC 7307 (98)
ST37	UCYN	Uncultured cyanobacterium clone: H3-10m-Mar_4 (99)	<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126 (99)
ST71	UCYN	Uncultured cyanobacterium clone: H3-10m-Mar_4 (99)	<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126 (99)
Necta	UCYN	Uncultured cyanobacterium clone: H3-10m-Mar_4 (99)	<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126 (99)
Cassiopée 63.1	UCYN	Uncultured cyanobacterium clone: H3-10m-Mar_4 (99)	<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126 (99)
Cassiopée 63.2	UCYN	Uncultured cyanobacterium clone: H3-10m-Mar_4 (99)	<i>Cyanothece</i> sp. SKTU126 (99)
IMA	UCYN	Uncultured cyanobacterium clone CMME06 (99)	<i>Gloeotheca</i> sp. KO68DGA (99)
VAHI	UCYN		<i>Gloeotheca</i> sp. SK40 (98)
IBO	UCYN	Uncultured bacterium clone EDWOCTH12 (99)	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802 (97)
ST55	UCYN	Uncultured bacterium clone EDWOCTH12 (99)	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802 (97)

L'analyse phylogénétique portant sur le gène de l'ARNr 16S a été effectuée sur les 16 séquences des souches d'études et sur 52 séquences de GenBank pour comparaison (Fig. III-2). On observe que les souches isolées appartiennent à 4 clades distincts au sein de l'arbre phylogénétique représentant 4 ordres cyanobactériens : l'ordre (1) des Nostocales, (2) des Spirulinales, (3) des Chroococcales et (4) des Pleurocapsales.

-(1) Les souches SD12, M99, Cassiopée 73.1 et GOPS18 de l'ordre des Nostocales sont proches de *Calothrix* sp. CCAP1410/5, *Phyllonema ansata* C58-M5 et *Rivularia* sp. XP3A appartenant à la famille des Rivulariaceae avec nœud robuste de 98%.

-(2) Au sein de l'ordre des Spirulinales, la souche Spiruline est étroitement liée à la souche *Spirulina* sp. P7 et *Spirulina subsalsa* CCAP 1475/1 avec une valeur robuste au nœud de 99%.

-(3) Les souches ST37, ST71, Cassiopée 63.1/63.2, IBO, ST55, Necta, VAHI et IMA se classent dans l'ordre des Chroococcales, comprenant les genres *Cyanothece*, *Crocospaera* et *Gloeotheca*. On note un degré de parenté étroit entre les souches ST37, ST71, Cassiopée 63.1/63.2, Necta, VAHI et IMA qui sont proches des souches du genre *Gloeotheca* (*Gloeotheca* sp. SK40, *Gloeotheca* sp. KO11DG, *Gloeotheca* sp. KO68DGA) et une appartenant au genre *Cyanothece* (*Cyanothece* sp. SKTU126) avec une valeur au nœud de 74%. Les souches IBO et ST55 largement isolées sont proches des souches *Cyanothece* sp. PCC 8802 et *Cyanothece* sp. PCC 8801 avec une valeur au nœud de 83%.

-(4) Enfin, les souches Prony et Dumbéa bis sont étroitement liées au genre *Xenococcus* (ordre des Pleurocapsales) et notamment à la souche *Xenococcus* sp. PCC7307 avec un nœud robuste de 99%.

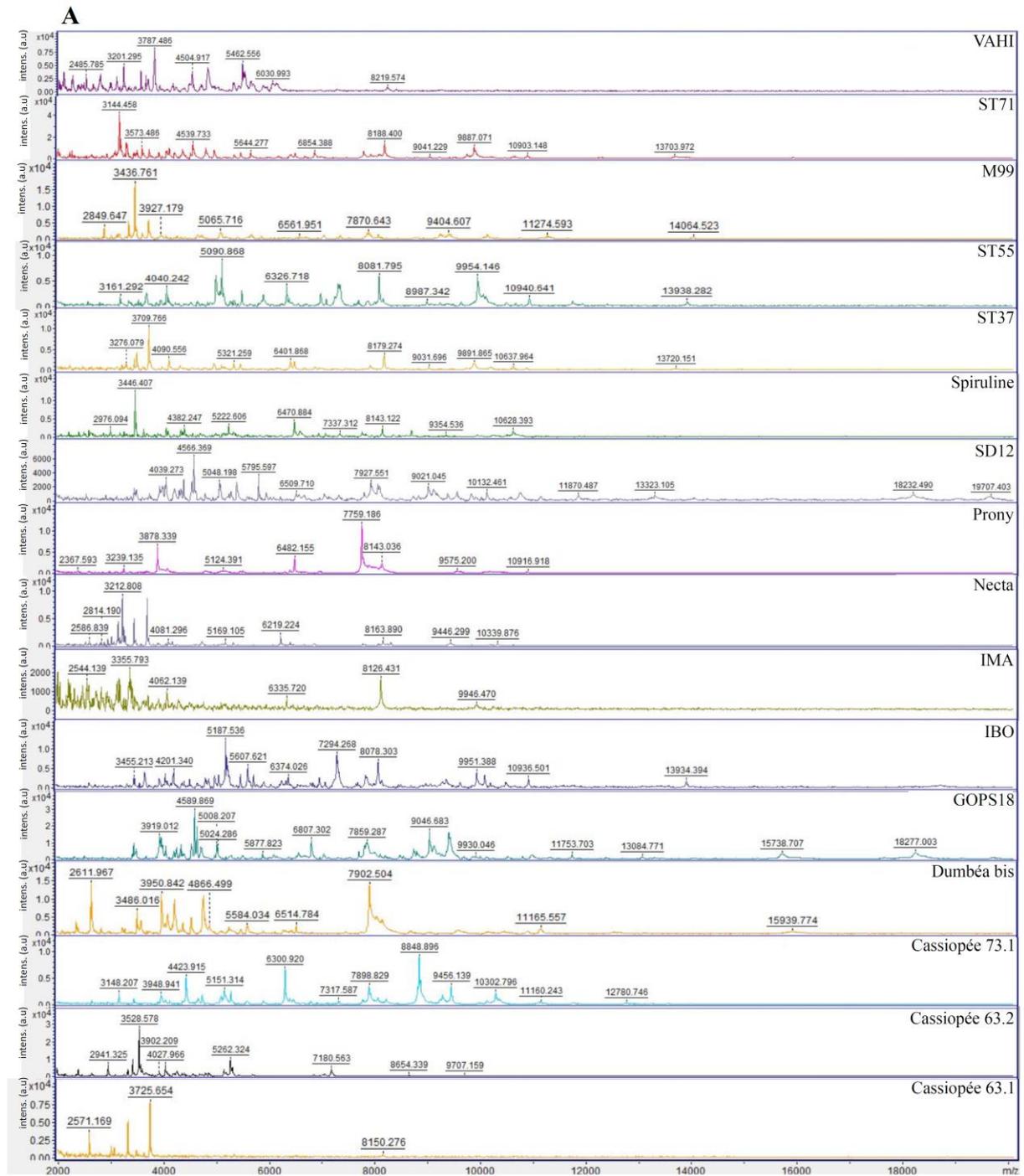


Figure III-2 : Arbre phylogénétique basé sur l'ARNr 16S. L'analyse phylogénétique a été réalisée par la méthode du maximum de vraisemblance basée sur le modèle général réversible dans le temps (Nei et Kumar 2000). Les souches encadrées en rouges représentent les souches filamenteuses et celles encadrées en vert représentent les UCYN.

III.3.3 Analyse taxonomique par spectrométrie de masse et comparaison taxonomique avec la méthode moléculaire

L'analyse protéomique au MALDI-TOF-MS des 16 souches cyanobactériennes a généré des spectres dans une fourchette de masse de 2 000-20 000 m/z pour chaque souche. Les spectres de chaque souche étaient uniques (Fig. III-3). Les analyses ont donné des spectres de qualité suffisante pour générer des spectres de références (MSP) qui étaient distincts entre chaque souche. Les MSP des souches étudiées sont tous distincts entre eux, mais présentent néanmoins des pics en commun entre certaines souches (*e.g.* pic à 9 954, 10 940 et 13 938 m/z chez les souches IBO et ST55 ; Fig. III-3).

Grâce à la base de données générée, le logiciel « real time identification » de Bruker, généralement utilisé pour le diagnostic clinique, a été employé afin d'évaluer la robustesse de l'identification des cyanobactéries diazotrophes du point de vue de la certification des souches. En effet, toutes les souches ont été ré-analysées à l'aveugle afin d'observer si l'identification des souches correspondaient bien à leurs MSP respectifs. Le taux d'identification des souches cyanobactériennes étudiées était à chaque fois de 100% avec un score qui était compris entre 1,68 et 2,46. Même lorsque des scores <1,7 ont été obtenus, l'identification de l'espèce correspondait aux spectres de référence de la souche qui lui était identique.



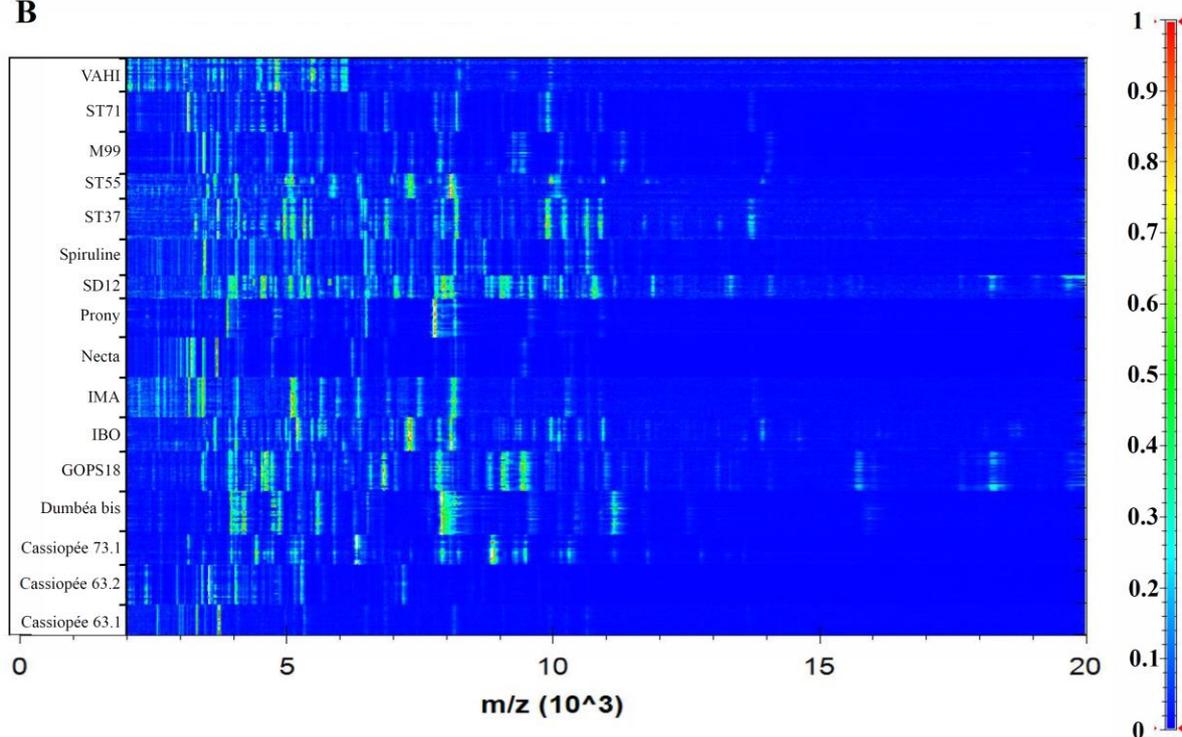
B

Figure III-3 : Comparaison des spectres de masse MALDI-TOF-MS des 16 souches de cyanobactéries étudiées (A) et Pseudo-gel des spectres de masse moyens des cyanobactéries (B). Sur la figure B, l'intensité des pics est comprise entre 0 (couleur bleue) et 1 (couleur rouge) avec code couleur associé. Chaque spectre de masse était nettement différent, ce qui démontre que le bio-typage par MALDI-TOF-MS permet facilement de distinguer les genres de cyanobactéries.

La robustesse de la méthode MALDI-TOF-MS et l'impact des différentes phases de cycle cellulaire et du type de milieu de culture sur les spectres de masses ont été étudiés à l'aide du logiciel « real time identification » de Bruker. Une expérience de 25 jours avec un échantillonnage aux différentes phases sur les souches Necta et Cassiopée 73.1, n'a montré aucune différence significative sur les spectres MALDI-TOF-MS. En effet, l'échantillonnage et l'analyse à des phases de cycles différentes de Necta et Cassiopée 73.1, (lors des phases de latence, exponentielle et stationnaire) ont montré des scores d'identification >2 avec leurs spectres MSP respectifs (Tab. III-3). Au niveau du type de milieu de culture, la souche Necta a montré un score d'identification de 2,31 et Cassiopée 73.1 a eu un score d'identification de 1,98 et 2,12 avec leurs spectres de référence respectifs (Tab. III-3). Cependant, la souche Necta ne s'est pas développée dans le milieu EL. Ces expériences révèlent ainsi que ni la phase de cycle cellulaire, ni le type de milieu de culture, n'affectaient la précision des identifications MALDI-TOF-MS.

Tableau III-3 : Score d'identification par « real time identification » de Bruker après analyse des spectres MALDI-TOF-MS des extraits de la souche Necta et Cassiopee 73.1. J+n correspond à des cycles cellulaires différents avec n représentant le nombre de jour de culture ; EL et MN correspond à 2 types de milieux de culture.

Souche	Milieu de culture et temps de culture	Valeurs de scores MP
Necta	EL	pas de croissance
	MN	2.31
	J+5	-
	J+14	2.31
	J+17	2.24
	J+20	2.32
	J+25	2.24
Cassiopee 73.1	EL	1.98
	MN	2.12
	J+6	2.06
	J+13	2.16
	J+15	2.19
	J+18	2.13
	J+20	2.23
J+25	2.14	

Les spectres résumés et représentés ci-dessus (Fig. III-3) ont permis de réaliser un dendrogramme (Fig. III-4A). Celui-ci indique que les spectres de cyanobactéries étudiées sont clairement séparés (Fig. III-4B).

Nous avons également effectué une analyse en dendrogramme des séquences d'ARNr 16S comme réalisé précédemment mais ne contenant que nos souches (Fig. III-4). Le dendrogramme basé sur l'ARNr 16S (Fig. III-4A) comprenait donc les 4 mêmes ordres cyanobactériens représentés dans l'arbre phylogénétique précédemment décrit (Fig. III-2), à savoir :

- Chroococcales représenté par les souches Cassiopee 63.1, Necta, ST71, Cassiopee 63.2, ST37, VAHI, IMA, IBO et ST55 (Fig. III-4A).
- Spirulinales représenté par la souche Spiruline qui était isolée.
- Pleurocapsales représenté par les souches Prony et Dumbéa bis.
- Nostocales avec les souches SD12, M99, Gops18 et Cassiopee 73.1.

La structure du dendrogramme basé sur l'analyse du protéome est très proche de celle basée sur l'ARNr 16S, excepté pour la Spiruline qui se positionne entre les souches de l'ordre des Chroococcales. En effet, elle se retrouve très proche de Cassiopée 63.1, une cyanobactérie unicellulaire plutôt qu'en position isolée, comme dans le dendrogramme basé sur l'ARNr 16S.

On observe que les données des séquences d'ARNr 16S sont pour certaines très proches voire identiques et ne permettent pas une séparation claire des souches entre elles, comme c'est le cas pour les souches IBO et ST55, pour les souches Prony et Dumbéa bis, puis pour les 5 souches unicellulaires Cassiopée 63.1, Necta, ST71, Cassiopée 63.2 et ST37 (Fig. III-4A). En revanche, le dendrogramme basé sur l'analyse MALDI-TOF-MS (Fig. III-4B) sépare clairement les souches y compris celles qui ne le sont pas avec le dendrogramme basé sur l'ARNr 16S. A noter que certaines souches très proches, voire identiques dans le dendrogramme réalisé à partir de l'ARNr 16S (IBO-ST55 ; Prony-Dumbéa bis et ST71-ST37), montrent également une similarité au niveau du protéome avec un niveau de distance inférieure à 500 (Fig. III-4).

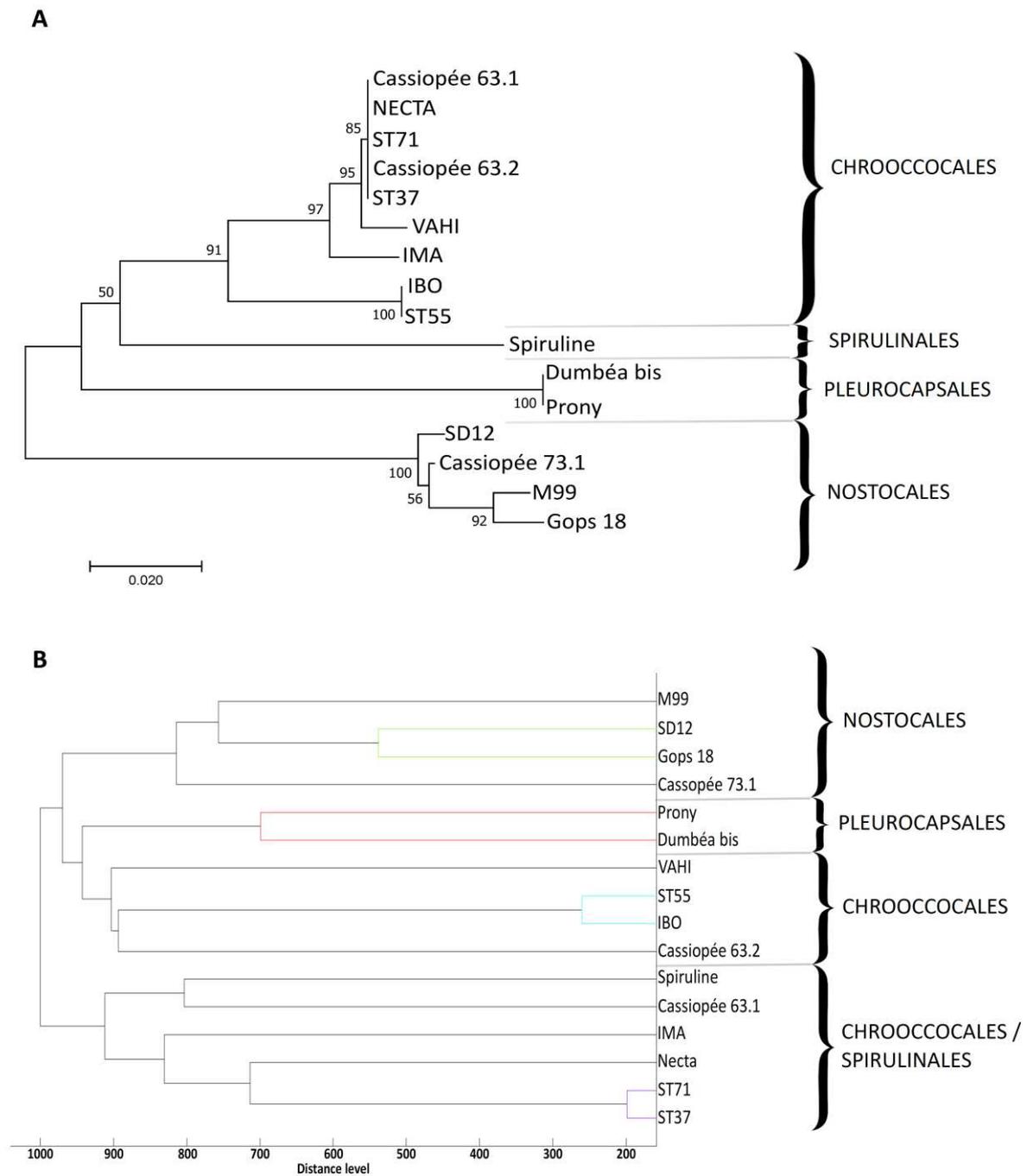


Figure III-4 : Dendrogrammes basés sur la similarité représentant les séquences d'ARNr 16S (A) et les spectres MALDI-TOF-MS (B) des 16 souches étudiées. La distance est affichée en unités relatives. Les distances inférieures à 500 sont utilisées pour définir de manière fiable les souches appartenant à la même espèce (Sauer et al. 2008).

III.4 Discussion

III.4.1 Caractérisation morpho-génétique

L'utilisation de séquences d'ARNr 16S pour résoudre la taxonomie des cyanobactéries diazotrophes au niveau des espèces est largement acceptée et leurs analyses menées sur les souches isolées du Pacifique Sud ont montré la fiabilité des amorces décrites par Nubel et al. (1997). Il a été caractérisé d'un point de vue morphologique et génétique 16 souches cyanobactériennes diazotrophes. En combinant les descriptions morphologiques aux données génétiques, les ordres attribués et les genres suggérés après le blast des séquences d'ARNr 16S et l'analyse phylogénétique semblent cohérents. En effet, au niveau phénotypique, la forme spiralée du trichome de la souche *Spirulina* et les filaments hétéro-polaires et hétérocystés des souches M99, SD12, GOPS18 et Cassiopée 73.1 sont conformes avec l'analyse génétique qui les rapproche des genres *Spirulina* et *Calothrix/Rivularia*, respectivement (Komárek 1992). Il en est de même pour les souches unicellulaires : la description morphologique des souches concorde avec les genres les plus proches déterminées avec l'approche génétique, c'est-à-dire les genres *Cyanothece* et *Gloeothece* pour les souches IBO, ST55, ST37, Cassiopée 63.1/63.2, NECTA, ST71, IMA, VAHI et le genre *Xenococcus* pour les souches Prony et Dumbéa bis (Komárek 1992).

En résumé, la souchothèque de cyanobactéries du Pacifique Sud se composent de :

- 5 souches filamenteuses dont 1 serait attribuée au genre *Spirulina* (*Spirulina* sp. P7 et *Spirulina subsalsa* CCAP 1475/1) et 4 souches filamenteuses hétérocystées de l'ordre des Nostocales. Les 4 souches de l'ordre des Nostocales se rapprochent de la famille des Rivulariaceae et particulièrement des genres *Calothrix* (*Calothrix* sp. 1410/5) et *Rivularia* (Rivulariaceae cyanobacterium, *Rivularia* sp. XP3A).

-11 souches unicellulaires (IBO, ST55, ST37, Cassiopée 63.1/63.2, Necta, ST71, IMA et VAHI) de l'ordre des Chroococcales dont 9 seraient attribuées aux genres *Cyanothece* (*Cyanothece* sp. SKTU126, *Cyanothece* sp. PCC8802, *Cyanothece* sp. 8801) et *Gloeothece* (*Gloeothece* sp. SK40) et 2 (Prony et Dumbéa bis) seraient attribuées au genre *Xenococcus* (*Xenococcus* sp. PCC 7307).

Afin de poursuivre l'identification jusqu'au niveau de l'espèce et connaître si ces souches sont nouvelles, un marqueur génétique supplémentaire tel que le gène *nifH* devrait être utilisé. En effet, l'utilisation du gène *nifH* a été le plus largement utilisé pour étudier la diversité et la composition des communautés de diazotrophes (Zehr et al 1997; 2006). En complément à

l'analyse du gène de l'ARNr 16S, l'analyse du gène *nifH* affinera l'identification des souches afin de déterminer si celles-ci constituent de nouveaux isolats par rapport à celles actuellement disponibles en culture globalement.

Il est important de rappeler que la totalité de souches étudiées sont diazotrophes. Or, il est clairement mentionné dans la littérature que *Spirulina* est un genre cyanobactérien non-fixateur d'azote. En effet, le genre *Spirulina* aurait perdu cette capacité à fixer le N₂ dans l'évolution (Larsson et al. 2011). La découverte de cette Spiruline est un résultat particulièrement intéressant en termes d'évolution. Cela permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle la capacité à fixer le N₂ atmosphérique de cette Spiruline aurait été perdue puis de nouveau acquise durant l'évolution, ou qu'elle aurait été tout simplement conservée chez cette souche. Cela pourra faire l'objet d'études ultérieures.

III.4.2 Evaluation du potentiel de la méthode MALDI-TOF-MS

Les analyses ont montré que les profils protéomiques obtenus à partir de souches de cyanobactéries diazotrophes sont hautement reproductibles. Les données de la littérature font état de conclusions contradictoires concernant l'effet du milieu de culture et de l'âge de la culture sur les spectres de masse des protéines bactériennes. Certaines études (Wieme et al. 2013 ; Pennanec et al. 2010; Ruelle et al. 2004) n'ont montré aucun changement significatif dans les spectres d'analyse MALDI-TOF-MS tandis que d'autres ont relevé des différences significatives dans les spectres de bactéries cultivées sur des milieux différents (Balazova et al. 2014 ; Valentine et al., 2005 ; Wunschel et al., 2005 ; Mazzeo et al., 2006; Sauer et al., 2008) ou collectés lors de phases différentes de culture (Mazzeo et al., 2006; Parisi et al., 2008). Salaün et al. (2010) ont même noté que le milieu de culture affectait la signature spectrale chez les bactéries, mais que l'âge de la culture n'avait aucun effet. Les tests effectués sur les souches Necta et Cassiopée 73.1 ont montré que le motif spectral était identique pour chaque souche à différentes phases de cycle de croissance cellulaires et dans les milieux de cultures différents. Les scores quasiment toujours >2, permettent une identification précise de la souche correspondante. Par conséquent, dans le cas de nos souches cyanobactériennes diazotrophes, il semblerait que la reproductibilité des spectres soit indépendante de l'âge et du type de milieu de culture. Cela confirme que notre méthode basée sur un prélèvement de la culture en début de phase stationnaire était valide.

Un autre paramètre important à prendre en compte est la présence de bactéries dans les cultures étant donné que celles de cyanobactéries dans nos travaux ne sont pas axéniques. Dans l'étude d'Emami et al. (2015), il a été montré que les spectres obtenus à partir de nombreuses bactéries isolées et à partir de deux cultures de *Dunaliella polymorpha* ne se chevauchent pas avec les pics de micro-algues. En effet, cela suggérait que la biomasse bactérienne par rapport à la biomasse de micro-algues au sein des cultures de *Dunaliella polymorpha* était trop faible pour avoir un impact réel sur l'empreinte spectrale de la micro-algue. Il en est de même dans nos cultures de diazotrophes non axéniques : la biomasse associée aux bactéries est généralement inférieure à 2% de la biomasse des cyanobactéries et n'interfère probablement que très peu avec les spectres.

L'analyse du protéome par MALDI-TOF-MS de chaque souche étudiée a révélé des spectres uniques et de bonne qualité comme cela a été démontré dans la littérature pour plusieurs espèces de cyanobactéries (*e.g. Arthrospira platensis, Chroococcidiopsis* sp., *Microcystis* sp. et *Anabaena* sp., Emami et al. 2015; Imanishi et al. 2017; Sebela et al. 2018).

Par cette méthode, nous avons également clairement distingué des souches qui étaient étroitement apparentées voire identiques avec la méthode génétique telles que IBO-ST55, Prony-Dumbéa bis, ou même Cassiopée 63.1-Necta-Cassiopée 63.2-ST37-ST71 (Fig. III-4). En appliquant, le seuil établi par Sauer et al. (2008) (*i.e.* souches bactériennes avec niveau de distance < 500 seraient de la même espèce), les analyses du protéome suggèrent que les paires de souches IBO-ST55 et ST71-ST37 seraient de la même espèce mais que les souches Prony et Dumbéa bis seraient distinctes (distance >500), tout comme les souches Cassiopée 63.1, Necta et Cassiopée 63.2. En comparant aux données de l'ARNr 16S, on remarque donc une meilleure résolution de la diversité dans l'arbre de la méthode MALDI-TOF-MS (Fig. III-4). En effet, dans une étude antérieure, le bio-typage protéomique avait déjà révélé une diversité bien supérieure des souches *Choococcidiopsis* à celle reconnue par la méthode de l'ARNr 16S (Sebela et al. 2018).

Concernant l'analyse morphologique, excepté celles de IBO-ST55 et Prony-Dumbéa bis ayant un phénotype très similaire, celles des souches Cassiopée 63.1, Necta, Cassiopée 63.2, ST37 et ST71 ont montré pour chacun un phénotype distinct par rapport à l'analyse de l'ARNr 16S. Ces résultats suggèrent que l'analyse du protéome concorde bien pour certaines souches avec les différences morphologiques observées. De plus, cette méthode a discriminé des souches morphologiquement et génétiquement très proches. En effet, si on compare les données des séquences du gène de l'ARNr 16S obtenues pour ST37, ST71, Cassiopée 63.1/63.2 et Necta,

on remarque qu'elles sont toutes similaires à 100%. Or, la méthode MALDI-TOF-MS a su différencier ces souches entre elles en démontrant par leurs spectres qu'elles n'appartenaient pas à la même espèce et que seules ST71 et ST37 seraient conspécifiques si on se basait sur le seuil de Sauer et al. (2008). En outre, le bio-typage MALDI-TOF-MS s'est avéré bien supérieur à l'analyse basée sur l'ARNr 16S actuellement utilisée pour distinguer les souches cyanobactériennes isolées.

Ces résultats sont en accord avec ceux observés chez des isolats de même espèce de cyanobactéries comme *Microcystis aeruginosa* (Sun et al. 2016; Imanishi et al. 2017). Néanmoins, on observe que les souches phénotypiquement similaires se regroupent dans des ordres identiques au sein du dendrogramme réalisé à partir de l'analyse de l'ARNr 16S. Dans le dendrogramme basé sur l'analyse du protéome, on observe que la souche Spiruline (*i.e.* une filamenteuse) se positionne avec la souche Cassiopée 63.1, qui est une cyanobactérie unicellulaire. Cela suggère que le dendrogramme basé sur les données de séquences génétiques (ici l'ARNr 16S) posséderait une organisation plus robuste en matière de taxonomie par rapport au dendrogramme basé sur l'analyse MALDI-TOF-MS tel qu'il a été rapporté antérieurement (Barbano et al. 2015; Lee et al. 2015).

Les résultats de cette étude indiquent que l'identification des cyanobactéries diazotrophes par MALDI-TOF-MS pourrait constituer une méthode alternative à la méthode moléculaire. En effet, la force de cette technique réside dans sa capacité à discriminer des espèces de cyanobactéries étroitement apparentées. Cependant, en terme de phylogénie (*i.e.* liens de parentés) la méthode moléculaire reste une technique incontournable mais la combinaison de données moléculaires, morphologiques et chimiotaxonomique permet par « l'approche polyphasique », qui s'avère actuellement la voie la plus respectée, une détermination et une description précise des taxons de cyanobactéries. Il serait également intéressant de constituer, à l'image des bactéries et champignons pathogènes des bases de données partagées permettant à la communauté scientifique de comparer des spectres à ceux archivés dans la base. En effet, si cette base de données est disponible en libre accès comme celle de GenBank avec un protocole standard de référence, cela permettrait des études de comparaisons plus globales. La méthode par MALDI-TOF-MS est intéressante pour une identification et elle est également moins onéreuse et chronophage par rapport à l'identification par séquençage d'ADN. En effet, la préparation d'un échantillon biologique en vue de l'identification d'un isolat nécessite plusieurs heures de travail (extraction d'ADN, PCR, séquençage) alors que l'identification par bio-typage MALDI-TOF-MS ne nécessite que quelques minutes. Des techniques

chimiotaxonomiques telles que le bio-typage MALDI-TOF-MS sont aujourd'hui couramment utilisées dans de nombreux laboratoires de microbiologie et sont capables de détecter des différences très mineures dans l'expression des gènes majeurs du ribosome et de gènes qui assurent les fonctions indispensables à la cellule (*i.e.* de ménage) (Mari Rode et al. 2009; Uzbekova et al. 2015). La méthode a été étendue massivement à l'identification et à la caractérisation des bactéries/champignons en milieu clinique mais aussi des eucaryotes (Murugaiyan et al. 2011; Volta et al. 2012; von Bergen et al. 2009). Cependant, elle reste une technique sous-utilisée dans l'étude des cyanobactéries, en particulier du point de vue des problèmes de santé publique qu'elle provoque lors d'efflorescences et d'un point de vue biotechnologique (Hartmann et al. 2014).

III.5 Conclusion

Pour conclure, l'identification des cyanobactéries diazotrophes par le bio-typage MALDI-TOF-MS pourrait avoir une valeur considérable, pas seulement pour la recherche mais aussi pour le secteur environnemental. La détermination rapide et précise des masses moléculaires et la possibilité d'automatisation place la méthode de MALDI-TOF-MS comme une véritable alternative aux méthodes morphologiques et moléculaires conventionnelles pour l'identification des cyanobactéries. L'objet de recherche de ma thèse a permis de caractériser morphologiquement la totalité des souches isolées mais aussi de les identifier génétiquement à partir du gène de l'ARNr 16S. Cette caractérisation à la fois génétique et protéomique constitue un premier inventaire et une première ébauche de travail d'identification des souches cyanobactériennes du Pacifique Sud-Ouest. Cependant, il est essentiel de poursuivre ces travaux d'identification à partir de nouveaux marqueurs génétiques afin de déterminer si ces souches sont « nouvelles » et possiblement endémiques de la région. Il est également primordial de continuer la bio-prospection afin d'augmenter les chances d'isolement de nouvelles souches.

Ces souches étudiées constituent une ressource ayant un potentiel de valorisation pour la région. Pour rappel, l'activité économique de la Nouvelle-Calédonie repose essentiellement de l'exploitation minière du nickel. De ce fait, la diversification des secteurs d'activité économique est primordiale pour le territoire calédonien qui souhaite s'orienter vers l'économie dite « bleue » avec entre autre le potentiel de valorisation des cyanobactéries. L'évaluation de ce potentiel pour les secteurs pharmaceutique (*i.e.* activité antibactérienne) et cosmétique (*i.e.* activité anti-oxydante, enzymatique et cytotoxicité) fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 4

Potentiel de valorisation des souches de cyanobactéries diazotrophes isolées du Pacifique Sud-Ouest.

SOMMAIRE

IV.1	Introduction	80
IV.2	Matériels et méthodes.....	82
IV.2.1	Cultures de cyanobactéries	83
IV.2.2	Extraction et fractionnement.....	83
IV.2.3	Evaluation de l'activité antibactérienne.....	84
IV.2.4	Evaluation du potentiel cosmétique	87
IV.2.5	Evaluation phytochimique	90
IV.3	Résultats	92
IV.3.1	Activités antibactériennes	92
IV.3.2	Activités enzymatiques	94
IV.3.3	Evaluation phytochimique	97
IV.4	Discussion	104
IV.4.1	Activité antibactérienne	104
IV.4.2	Activités enzymatiques	105
IV.4.3	Evaluation phytochimique	107
IV.5	Conclusion.....	109

Contributions : Les tests enzymatiques (anti-tyrosinase et anti-élastase), TEAC et tests d'activités antimicrobiens ont été réalisés par Emmrick SAULIA (ES). Le Test XTT de cytotoxicité a été réalisé par Mme Chantal Pichon au laboratoire du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans en France. La phytochimie (HPLC, RMN) a été réalisée par ES en collaboration avec le laboratoire de Olivier Thomas (NUI, Galway) et en particulier Kévin Calabro et Nicolas Lebouvier de l'Université de la Nouvelle-Calédonie.

IV.1 Introduction

Depuis les dernières décennies, les produits naturels et procédés issus des cyanobactéries retiennent de plus en plus l'attention des chercheurs et des industriels. Historiquement, les cyanobactéries sont connues pour leurs qualités nutritives (Dangeard 1940, Gao, 1998) mais aussi pour certaines pour la production des métabolites secondaires toxiques constituant une menace pour la santé humaine (Codd 1995). Cependant, il a été montré ces dernières années que les cyanobactéries produisaient une multitude de produits naturels en plus de ces toxines, dont beaucoup ont des activités biologiques intéressantes pour une potentielle valorisation économique (Burja et al. 2001; Mourelle et al. 2017).

La diversité chimique connue des produits naturels issus des cyanobactéries comprend plus de 1 100 métabolites secondaires présentant des structures chimiques très diverses issues de 39 genres de cyanobactéries (Dittmann et al. 2015). Toutefois, plus des deux tiers des molécules décrites sont produits par seulement trois genres bien étudiés que sont *Lyngbya* pour le milieu marin, *Microcystis* et *Nostoc* pour les milieux d'eaux douces (Dittmann et al. 2015). Mis à part *Microcystis* qui est une espèce unicellulaire, les produits naturels sont majoritairement issus de cyanobactéries filamenteuses telles que *Lyngbya majuscula* au niveau de laquelle 300 métabolites secondaires ont été isolés (Blunt et Munro 2017). Cependant, malgré la grande diversité de cyanobactéries, trop peu de souches sont à ce jour étudiées pour espérer la découverte de nouvelles molécules. Toutefois, le potentiel que renferment les cyanobactéries fait aujourd'hui partie des sources de molécules naturelles, lesquelles intéressent les secteurs de la pharmaceutique et cosmétique (Burja et al. 2001; Mourelle et al. 2017; Ariede et al. 2017).

Pour le secteur pharmaceutique, la découverte des propriétés médicinales des cyanobactéries remonte à 1500 av. JC avec l'utilisation de *Nostoc* pour traiter la goutte et plusieurs formes de cancers (Pietra 1990). Actuellement, du fait de l'utilisation anarchique et abusive des antibiotiques en santé humaine et vétérinaire, le monde fait face à l'émergence de bactéries multi-résistantes (Neu 1992). Une course contre la montre s'est donc mise en marche pour la recherche de nouveaux antibiotiques permettant de lutter contre les bactéries multi-résistantes, et notamment chez les cyanobactéries. De nombreuses études ont déjà révélé un grand nombre de composés naturels issus des cyanobactéries ayant une activité antimicrobienne (antibactérienne, antifongique, antivirale, antiprotozoaire) (Burja et al. 2001). Les substances antibactériennes sont diverses et nombreuses et comprennent des acides gras (Mundt et al. 2003), des lipopeptides (Ghasemi et al. 2008; Swain et al. 2017; Shaala et al. 2013), des

alcaloïdes (Raveh et Carmeli 2007; Mo et al. 2009; Jaki et al. 2001; Prinsep et al. 1992), des terpenoïdes (Perez Gutierrez et al. 2008; Jaki et al. 2000; Trombetta et al. 2005), des composés phénoliques (Raveh et Carmeli 2007; Volk et Furkert 2006; Falch et al. 1995), des polysaccharides (Challouf et al. 2011; Kanekiyo et al. 2005) et plusieurs autres classes de composés (Swain et al. 2017).

Dans le secteur de la cosmétique, et notamment en France qui est le premier pays dans ce secteur (11,2 milliards d'euros de chiffre d'affaires en 2015), les cyanobactéries émergent mais seulement 10% sont identifiées et décrites à ce jour (Couteau et Coiffard 2018) et très peu de genres sont produits à l'échelle industrielle (*Spirulina* et *Aphanizomenon*). Les utilisations possibles de molécules issues de cyanobactéries en cosmétique sont nombreuses (Couteau et Coiffard 2018) : polysaccharides (hydratant, anti-oxydant etc. (Li et al. 2011; Tamaru et al. 2005; Bloch et Tardieu-guigues 2014), pigments tels que les caroténoïdes (*e.g.* zéaxanthine) et phycobiliprotéines (*e.g.* phycocyanine) (photo-protection, anti-oxydant, anti-âge (Hamed 2016; Torregrosa-crespo et al. 2018)), et acides aminés de type mycosporine (photo-protection, renouvellement de la peau (Chrapusta et al. 2017)). Cependant, le potentiel chimique des cyanobactéries n'est encore qu'en émergence et les études disponibles ne reflètent pas la grande diversité de ces organismes. De plus, la production de métabolites secondaires chez les cyanobactéries est très sensible aux conditions environnementales (Trabelsi et al. 2014; Burja et al. 2002), et les conditions de culture doivent être prises en compte pour appréhender la diversité chimique des molécules qu'elles produisent.

La région du Pacifique Sud-Ouest tropical incluant la Nouvelle-Calédonie constitue notre zone d'étude et a été caractérisée de « hot spot » de fixation de N₂ (Bonnet et al. 2017b), indiquant que les cyanobactéries, particulièrement les cyanobactéries diazotrophes, y sont extrêmement abondantes. La Nouvelle-Calédonie avec sa zone économique exclusive de 1 740 000 km² (décret n°78- 142 du 3 février 1978) dont le lagon est inscrit au patrimoine mondial de l'UNESCO depuis 2008, possède une biodiversité marine unique dont l'endémicité peut atteindre 10 % pour les espèces marines connues (Richer de Forges et Pascal 2008). Cela peut suggérer une très grande diversité de micro-organismes marins dont les cyanobactéries, et par conséquent une grande diversité chimique de composés, mais cela n'a encore jamais été exploré.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons évalué le potentiel de valorisation de plusieurs souches de cyanobactéries diazotrophes issues de la biodiversité néo-calédonienne et de l'océan du Pacifique Sud-Ouest. Des tests de bio-criblages ont été réalisés afin de mesurer le potentiel

antibactérien et cosmétique de ces souches. De plus, une analyse phytochimique a été réalisée afin d'identifier les grandes familles de molécules présentes dans certaines fractions de certaines souches spécifiques.

IV.2 Matériels et méthodes

L'évaluation du potentiel de valorisation des cyanobactéries a été réalisée en trois parties:

1/ des tests antimicrobiens ont été réalisés sur 22 extraits cyanobactériens afin d'évaluer leur activité sur 4 pathogènes bactériens,

2/ le potentiel cosmétique de 22 souches a ensuite été évalué. Les activités visées lors de cette étude étaient l'activité anti-oxydante, anti-élastase, anti-tyrosinase puis la cytotoxicité. Ces tests ont été choisis car il a été montré que la vitamine A (acide ascorbique) était un moyen de compenser et de renforcer la protection endogène de la peau et de prévenir les dommages oxydatifs (Kaur et al. 2007). Les anti-oxydants ont par ailleurs été intégrés dans la formulation des soins anti-âge pour leur capacité à piéger les radicaux libres (Laguerre et al. 2007). De nombreuses études ont déjà montré des activités anti-oxydantes très fortes d'extrait bruts et de molécules isolées (*e.g.* phycocyanine) issus de cyanobactéries (Renugadevi et al. 2018; Geethu et Shamina 2018; Hossain et al. 2016), ce qui suggère que les cyanobactéries constituent un potentiel prometteur. De plus, le processus de vieillissement de la peau met en jeu plusieurs enzymes telles que la tyrosinase et l'élastase. L'élastase est une enzyme responsable de la dégradation de l'élastine et d'autres protéines (*e.g.* collagène) qui sont fondamentales pour les propriétés élastiques de la peau (Imokawa et Ishida 2015). Quant à la tyrosinase, elle catalyse l'oxydation des phénols comme la tyrosine induisant la synthèse de la mélanine (Pillaiyar et al. 2017). Les cyanobactéries sont également une source prometteuse de molécules anti-âge. En effet, des études ont mis en évidence des molécules issues de cyanobactéries avec des activités anti-élastase et anti-tyrosinase (Yabuta et al. 2014; Salvador et al. 2013) mais reste à ce jour peu documentées.

3/ une analyse phytochimique a été réalisée sur certaines fractions issues de certaines souches de cyanobactéries, afin d'identifier les grandes familles de molécules responsables des activités trouvées.

IV.2.1 Cultures de cyanobactéries

Pour les parties 1/, 2/ et 3/, les cyanobactéries ont été cultivées dans les mêmes conditions de lumière, température et de disponibilité nutritive que dans le chapitre III (Voir section III.2.1).

IV.2.2 Extraction et fractionnement

Les cellules ont été récoltées par centrifugation en début de phase stationnaire de croissance. La culture a été centrifugée dans des tubes FALCON à 4000 rpm (rotation par minute) pendant 10 minutes (ou parfois 6000 rpm pendant 20 minutes pour certaines lorsqu'elles formaient des agrégats entourés d'un biofilm important qui augmentait la flottabilité), puis conservé à -80 °C jusqu'à l'étape de lyophilisation (lyophilisateur CryotecTM) d'une durée de 24h.

Les échantillons ont ensuite été placés dans un erlenmeyer de 250 ml dans lequel un mélange de 100 ml de CH₂Cl₂/MeOH (1:1) a été ajouté. L'ensemble a été ultrasoniqué pendant 15 minutes, puis a été filtré sur papier Wattman n°2. Le même procédé a ensuite été reproduit à l'identique une seconde fois. Le filtrat obtenu a été évaporé au rotavapor afin d'obtenir l'extrait brut à l'état solide, qui a été pesé puis conservé au réfrigérateur jusqu'à analyse.

Au début de la thèse, seulement 3 souches unicellulaires (*i.e.* IBO, IMA, VAHI) avaient été caractérisées génétiquement. A cela s'ajoutaient, 2 souches dont la pureté avait été confirmée : l'une était filamenteuse (CALO) et l'autre unicellulaire (NECTA). C'est donc ces premières souches disponibles que nous avons cultivées en grands volumes dans le but d'obtenir de la biomasse pour la partie 3/ (analyse phytochimique approfondie en UPLC-ELSD ainsi qu'en RMN du proton ¹H.). Lors de la seconde moitié de la deuxième année de thèse 18 autres souches mono-spécifiques ont été cultivées afin d'élargir le panel de souches pour les parties 1/ et 2/. La pureté des souches a été vérifiée et nous avons confirmé le caractère mono-spécifique des cultures. Les cultures des 18 autres souches cyanobactériennes ont été réalisées dans des volumes de 1L, ce qui a permis ainsi d'obtenir une biomasse nécessaire à la réalisation des différents tests.

Les 5 souches citées précédemment, ont été cultivées en grande quantité pour obtenir une biomasse suffisante. Leurs extraits bruts ont ensuite été fractionnés sur une cartouche SPE (Chromobond) C18 (15 ml/2000 mg) munie d'un magnifold d'extraction. Le magnifold est une

chambre à vide où plusieurs cartouches peuvent être branchées et qui permet grâce au vide d'y faire circuler les solvants. Cinq solvants (100 ml) ou mélanges de solvants de polarité décroissante ont été utilisés : H₂O distillée, H₂O/MeOH (1:1), MeOH, MeOH/CH₂Cl₂ (1:1) et CH₂Cl₂. Les cinq différentes fractions obtenues, ont été évaporées au rotavapor puis ont été pesées et conservées au réfrigérateur jusqu'aux tests ou analyses phytochimiques.

IV.2.3 Evaluation de l'activité antibactérienne

Les cyanobactéries testées sont détaillées dans le Tableau IV-1. Au total, 22 souches cyanobactériennes ont fait l'objet de tests antibactériens. Pour la majorité, ce sont les extraits bruts (MeOH:CH₂Cl₂ (1:1)) qui ont été testés, mais pour certaines dont la production de biomasse a été plus importante (IMA, VAHI, NECTA et CALO), quatre types d'extraits (H₂O; H₂O:MeOH (1:1); MeOH et MeOH:CH₂Cl₂ (1:1)) ont été testés, ce qui fait un total de 33 extraits.

Tableau IV-1 : Cyanobactéries dont les extraits ont fait l'objet d'essais antimicrobiens.

Nom de la souche	Identification phénotypique	Extraits utilisés pour les tests
IMA	UCYN	H ₂ O; H ₂ O:MeOH (1:1); MeOH; MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
VAHI	UCYN	H ₂ O; H ₂ O:MeOH (1:1); MeOH; MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
NECTA	UCYN	H ₂ O; H ₂ O:MeOH (1:1); MeOH; MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
ST47	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
ST 37	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
CASSIOPEE 63.2	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
ST71	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
ST48	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
WH0003	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
CASSIOPEE 63.1	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
Prony	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
WH0002	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
Dumbéa bis	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
ST55	UCYN	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
SD12	Filamenteuse	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
ST8	Filamenteuse	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
CALO	Filamenteuse	H ₂ O; H ₂ O:MeOH (1:1); MeOH; MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
GOPS 18	Filamenteuse	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
CASSIOPEE 73.1	Filamenteuse	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
ST69	Filamenteuse	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
SPIRULINE	Filamenteuse	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)
M99	Filamenteuse	MeOH:CH ₂ Cl ₂ (1:1)

✓ Souches bactériennes

Les quatre souches de bactéries pathogènes (Tab. IV-2) utilisées pour les tests antibactériens proviennent de la collection de l'Institut Pasteur (CIP) et sont référencées dans la collection américaine ATCC (American Type Culture Collection).

Tableau IV-2 : Références des souches bactériennes cibles testées.

Germe	Phénotype	CIP	ATCC
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sauvage	7625	25923
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sauvage	6821	12228
<i>Escherichia coli</i>	Sauvage	7624	25922
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sauvage	7611	27853

Les souches bactériennes ont été conservées à -80 °C dans des cryotubes stériles (souchiers) contenant un mélange de suspension bactérienne et de glycérol (50% (v/v)).

✓ Tests antibactériens en milieu liquide

L'activité antibactérienne des extraits cyanobactériens a été évaluée par la méthode en milieu liquide. Le principe général consiste à mettre une souche pathogène en culture dans un milieu nutritif en présence de l'extrait cyanobactérien et la croissance est suivie grâce à une lecture de turbidité.

Les témoins positifs des tests antibactériens ont été choisis selon les recommandations du Comité Européen sur les Tests de Sensibilité aux Antimicrobiens (EUCAST) : La gentamicine (sulfate de gentamicine, Biological industries, Kibbutz beit Haemek) contre *S. aureus* et *S. epidermidis* et le chloramphénicol (Sigma, St Louis, USA) contre *E. coli* (EUCAST 2018). Les concentrations des témoins positifs sont de 1 µg/ml pour la gentamicine (*S. aureus* et *S. epidermidis*) et de 8 µg/ml pour le chloramphénicol (*E. coli*) (Thieury 2016). La concentration des extraits de 50 µg/ml a été choisie par rapport à la valeur des CI50 (concentration inhibitrice médiane) des antibiotiques de référence utilisés lors de la mise au point du protocole que nous avons établi avec l'équipe d'accueil ISEA (Institut de sciences exactes et appliquées) de l'Université de la Nouvelle-Calédonie.

Afin de préparer les extraits cyanobactériens, des solutions mères ont été préparées à une concentration de 5 mg/ml dans du DMSO, qui a servi dans un premier temps à solubiliser

l'extrait. Ensuite, des solutions filles à 500 µg/ml ont été obtenues par dilution dans du milieu Lysogeny Broth (LB, le milieu nutritif de culture) (1% de DMSO). Ces solutions filles ont servi à ensemercer les puits de microplaques lors des tests antibactériens avec une concentration finale de 50 µg/ml.

Avant la réalisation du test, les souches pathogènes ont été mises en pré-culture par ensemencement d'une colonie dans 5 ml de milieu LB puis incubées pendant une nuit à 37 °C sous agitation rotative (120 rpm). L'absorbance à 600 nm de la pré-culture a été mesurée (spectrophotomètre Thermo scientist, Evolution 201) puis amenée à 0,3 par dilution dans du LB. Cette suspension fille a été utilisée pour ensemercer les microplaques.

Les essais se sont déroulés dans des microplaques stériles (polystyrène) 96 puits à fond plat avec couvercle (Falcon®, Becton Dickinson, USA), qui comportent 8 lignes et 12 colonnes. Les colonnes 1 et 12 ont été uniquement remplies de milieu de culture LB afin d'éviter les effets de bord. Les données exploitées concernent les colonnes 2 à 11, et les lignes A et H ont été exclusivement réservées aux blancs (milieu de culture additionné de la solution à tester). Les puits B2 à H2 ont été dédiés au témoin négatif (milieu de culture additionné de suspension bactérienne) et les cellules A11 à H11 au témoin positif (milieu de culture additionné de suspension microbienne et antibiotique de référence). Pour chaque extrait testé, un blanc et trois réplicats ont été réalisés. Deux essais indépendants ont été effectués pour chaque souche.

Les essais antimicrobiens ont été testés à dose unique et les microplaques ont été remplies comme indiqué sur la Figure IV-1. Seize extraits (E1 à E16) différents au maximum ont été testés sur une microplaque.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C			E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8		
D											+	
E												
F			E9	E10	E11	E12	E13	E14	E15	E16		
G												
H												

Légende

200 µl LB
180 µl LB + 20 µl d'extrait E _n
160 µl + 20 µl d'extrait E _n + 20 µl de suspension bactérienne
160 µl + 20 µl bactérie + 20 µl antibiotique = témoin +
180 µl LB + 20 µl d'antibiotique
180 µl LB + 20 µl de suspension bactérienne

Figure IV-1 : Procédure de remplissage d'une microplaque pour les essais en dose unique.

L'incubation de la microplaque et la lecture de la turbidité a été mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaque (EPOCH 2 microplate reader; BioTek Instruments®, Winooski, Vermont, USA) à 610 nm tous les 30 minutes, avec une agitation de 125 rpm pour homogénéiser le milieu, à une température d'incubation de 37 °C. La lecture de la turbidité à 610 nm sert à suivre la croissance des bactéries cibles.

Le suivi de croissance des bactéries pathogènes a été réalisé jusqu'à la phase de plateau du témoin négatif. Les données sont visualisées via le logiciel Excel et le taux de croissance μ (h^{-1}) a été calculé selon l'équation suivante:

$$N=N_0*e^{\mu t}$$

N = nombre de bactéries au temps t

N_0 = nombre de bactéries au temps t_0

μ = taux de croissance

Le pourcentage d'inhibition de croissance est calculé grâce à l'équation ci-dessous:

$$(\mu_i - \mu_0 / \mu_0) * 100$$

μ_i = taux de croissance pour un extrait à une concentration donnée (C_i)

μ_0 = taux de croissance de la bactérie seule

IV.2.4 Evaluation du potentiel cosmétique

Tous les extraits cyanobactériens testés ont été solubilisés avec de l'éthanol à 99% afin d'obtenir une solution mère à 0,9 mg/ml excepté pour le test XTT. La liste de cyanobactéries testées est décrite dans la section **IV.2.3.1**.

✓ Test d'inhibition de l'élastase

L'inhibition de l'élastase a été testée en utilisant comme substrat le N-Succinyl-Ala-Ala-Ala-p-nitroanilide (SANA), en suivant la libération de p-nitroaniline par la méthode décrite de Chompoo et al. (2012) avec quelques modifications. L'activité inhibitrice a été déterminée par l'intensité de la couleur libérée lors du clivage de SANA par l'action de l'élastase.

Du tampon Tris – HCl a été préparé à 0,1 M avec un pH ajusté à 8,0. Ensuite du SANA à 1 mM a été préparé dans un tampon Tris – HCl 0,1 M (pH 8,0) et l'élastase est préparé de sorte à obtenir une concentration de 0,3 unité/ml.

15 µl de l'extrait cyanobactérien à 0,9 mg/ml a été placé dans un tube eppendorf, puis 640 µl de SANA a été ajoutée. Le mélange a été vortexé et pré-incubé à 25 °C pendant 10 minutes puis 20 µl d'élastase (0,3 unité/ml) ont été ajoutés. Après passage au vortex, chaque solution a été placée dans un bain marie à 25 °C pendant 10 minutes et l'absorbance a été mesurée à 410 nm sur une microplaque de 96 puits avec 200 µl pour chaque solution en triplicats.

Le contrôle négatif a été de l'eau tandis que l'acide oléanolique a été utilisé comme contrôle positif.

Le pourcentage d'inhibition de la tyrosinase a été calculé comme suit:

$$\text{Inhibition de l'élastase (\%)} = (1 - B/A) \times 100$$

où A est l'activité de l'enzyme sans l'échantillon et B est l'activité en présence de l'échantillon.

✓ **Test d'inhibition de la tyrosinase**

L'inhibition de l'activité de la tyrosinase a été déterminée par le procédé décrit dans Chompoo et al. (2012) en mesurant le DOPA (3,4-dihydroxyphénylalaninechrome) formé par l'action de l'enzyme tyrosinase sur un substrat de tyrosine.

Du tampon phosphate a été préparé à une concentration de 20 mM avec de l'eau milliQ puis le pH a été ajusté à 6,8. Une solution de tyrosinase a été préparée à 500 unités/ml avec du tampon phosphate (20 mM; pH 6,8). La L-tyrosine a ensuite été dissoute dans de l'eau milliQ afin d'obtenir une concentration de 0,85 mM

Une microplaque de 96 puits a été préparée de la manière suivante : 120 µl de tampon phosphate (20 mM, pH 6,8), 20 µl d'extrait et 20 µl de tyrosinase (500 unités/ml dans du tampon phosphate à 20 mM). Après une incubation de 15 minutes à 25 °C, la réaction a été initiée en ajoutant 20 µl de solution de L-tyrosine à 0,85 mM à chaque puits. L'activité enzymatique a été déterminée en mesurant l'absorbance à 470 nm. L'acide kojic a été utilisé comme contrôle positif et le contrôle négatif a été de l'eau milliQ.

Le pourcentage d'inhibition de la tyrosinase a été calculé comme suit:

$$\text{Inhibition de la tyrosinase (\%)} = [(A - B) - (C - D)] / (A - B) \times 100$$

où A est l'absorbance du contrôle avec l'enzyme, B est l'absorbance du contrôle sans l'enzyme. C est l'absorbance de l'échantillon testé avec l'enzyme et D est l'absorbance de l'échantillon testé sans l'enzyme.

✓ **Test d'activité anti-oxydante par la méthode de réduction du radical-cation ABTS (Test TEAC)**

La méthode de radical-cation ABTS est l'un des tests utilisés pour mesurer la capture des radicaux libres. Il est basé sur la neutralisation d'un radical-cation résultant de l'oxydation monoélectronique du chromophore synthétique acide 2,2'- azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS).

Une solution d'ABTS⁺ a été préparée à une concentration de 7 mM et une solution de potassium persulfate à 2,45 mM avec de l'eau milliQ, puis les deux solutions ont été mélangées et placées dans l'obscurité à température ambiante pendant 16 h pour favoriser l'oxydation complète de l'ABTS. Avant utilisation, la solution ABTS⁺ a été diluée avec de l'éthanol pour obtenir une absorbance de $0,700 \pm 0,050$ à 734 nm. 980 µl de solution ABTS⁺ ont été ajoutés à 20 µl d'extraits de cyanobactéries à tester et soigneusement mélangés. Le Trolox a été utilisé comme contrôle positif et le solvant éthanol comme contrôle négatif. Le mélange réactif a été incubé à température ambiante pendant 6 min et l'absorbance a été immédiatement enregistrée à 734 nm.

La capacité anti-oxydante a été calculée comme suit:

$$\text{Capacité anti-oxydante} = [(A0 - A1) / A0] * 100\%$$

A0 = Contrôle négatif₀ - Blanc Ethanol₀

A1 = Absorbance de l'essai₀ - Blanc Ethanol₀

✓ **Test XTT**

Les tests XTT (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5- sulfophenyl)-2h-tetrazolium-5-carboxanilide) ont été réalisés par le Pr. Chantal Pichon au laboratoire du Centre de Biophysique Moléculaire d'Orléans en France. C'est une méthode qui permet d'évaluer la cytotoxicité de molécules et/ou d'extraits sur des cellules humaines de l'épiderme, les

kératinocytes (HaCaT). Ce test est basé sur le clivage du XTT de couleur jaune par des déshydrogénases conduisant à la formation de formazan de couleur orange.

La viabilité cellulaire et la prolifération cellulaire ont été évaluées à l'aide d'un kit de prolifération cellulaire II (Roche). C'est une méthode efficace pour mesurer la croissance cellulaire. Le protocole du test XTT est similaire à celui décrit dans Ansel et al. (2016).

Les cellules HaCaT ont été étalées à une densité de 5×10^4 par puits. Après 24 h, les cellules HaCaT ont été incubées à 37 °C en présence des dilutions d'extraits de cyanobactéries pendant 24, 48 ou 72 h.

Par la suite, le milieu a ensuite été retiré des puits contenant les cellules HaCaT et une solution de XTT à une concentration finale de 0,3 mg/ml a été ajoutée à chaque puits et l'incubation a été réalisée pendant 4 h à 37 °C. Au cours de cette incubation, une solution orange de formazan s'est formée, résultant de la conversion du sel de tétrazolium jaune XTT par des cellules viables. L'intensité de la coloration a été quantifiée en mesurant l'absorbance avec un filtre d'absorbance spécifique à 450 nm en utilisant un spectrophotomètre.

IV.2.5 Evaluation phytochimique

Les analyses ont été réalisées sur les fractions méthanoliques des 3 souches unicellulaires, IMA, VAHI et NECTA et une souche filamenteuse, CALO.

✓ Chromatographie liquide ultra haute performance couplée à un détecteur à diffusion de lumière par évaporation (UHPLC-ELSD)

L'UHPLC est une méthode de chromatographie en phase liquide à haute pression. C'est une technique de séparation analytique et/ou préparative de molécules présentes dans un mélange. L'UHPLC est couplée à un ELSD qui est un détecteur à base d'aérosol qui convient à la détection de composants d'échantillons non volatils dans un éluant volatil.

Les fractions méthanoliques des 4 souches étudiées ont été analysées en UHPLC-ELSD. L'appareillage est équipé d'un appareil Ultimate 3000 (ThermoScientific, MA, USA) et d'un détecteur UV couplé à un ELSD (Sedere, Alfortville, France) dont l'ensemble est piloté par le logiciel Choméléon. Les chromatogrammes obtenus par analyse UHPLC-ELSD ont permis d'identifier la nature des molécules présentes dans les fractions et notamment leur polarité.

L'élution de des échantillons s'est fait à travers une colonne de type C18 avec un gradient de solvant MeOH et d'acétonitrile (ACN) (sigma Aldrich, chromasolv). Le débit de phase mobile est de 0,5 ml/min avec le gradient de polarité décroissante MeOH/ACN : 90% MeOH-10% ACN a 100%. ACN pendant 8 min puis 4 min a 100% ACN.

✓ **Chromatographie liquide haute performance semi-préparative (HPLC semi-prep)**

La chromatographie HPLC semi-prep est une technique de chromatographie utilisée pour purifier et récupérer des échantillons.

Les séparations par HPLC semi-prép sont réalisées sur un appareil Jasco LC Net II/ADC piloté par le logiciel ChromNAV. La colonne utilisée est de type phenyl-hexyl (5 μm ; 10 x 2500 mm column Xselect CSHTM). Les échantillons sont élués avec un gradient eau milliQ et ACN (sigma Aldrich, chromasolv). Le débit d'élution est de 5 ml/min avec le gradient de polarité décroissante eau/ACN sur un temps de 28 min : 5 min 60% ACN, 15-22 min 100% ACN puis 23-28 min 60% ACN.

✓ **Résonance magnétique nucléaire (RMN)**

La spectroscopie RMN est une technique qui exploite les propriétés magnétiques de certains noyaux atomiques. Les applications les plus importantes pour la chimie organique sont la RMN du proton ^1H et du carbone 13 (^{13}C) effectuée sur des solutions liquides. Cette technique permet d'élucider la structure d'une molécule.

Les expériences de résonance magnétique nucléaire ont été réalisées sur un spectromètre de 500 MHz (Advance, Bruker, Billerica, MA, USA). Les fractions sont mises en solution dans du chloroforme deutéré (CDCl_3) ou du méthanol deutéré (CD_3OD) selon les extraits pour les analyses du proton ^1H en RMN. Les extraits purs ont également subi une analyse bidimensionnelle HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation). L'analyse HSQC a permis d'associer un carbone protoné aux hydrogènes qu'il porte. Les spectres RMN obtenus ont été analysés avec le logiciel Mestrenova 12.0.4.

IV.3 Résultats

IV.3.1 Activités antibactériennes

Afin de déterminer le pourcentage d'inhibition des différents extraits cyanobactériens sur les souches pathogènes cibles, le taux de croissance de chaque bactérie a d'abord été mesuré. Les bactéries cibles (Fig. IV-2) atteignent des phases de plateau à environ 3 h de cultures, tandis que les 2 staphylocoques l'atteignent entre 5 et 6 h de croissance. Les taux de croissance des souches cibles *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis* et *P. aeruginosa* sont résumés dans le Tableau IV-3.

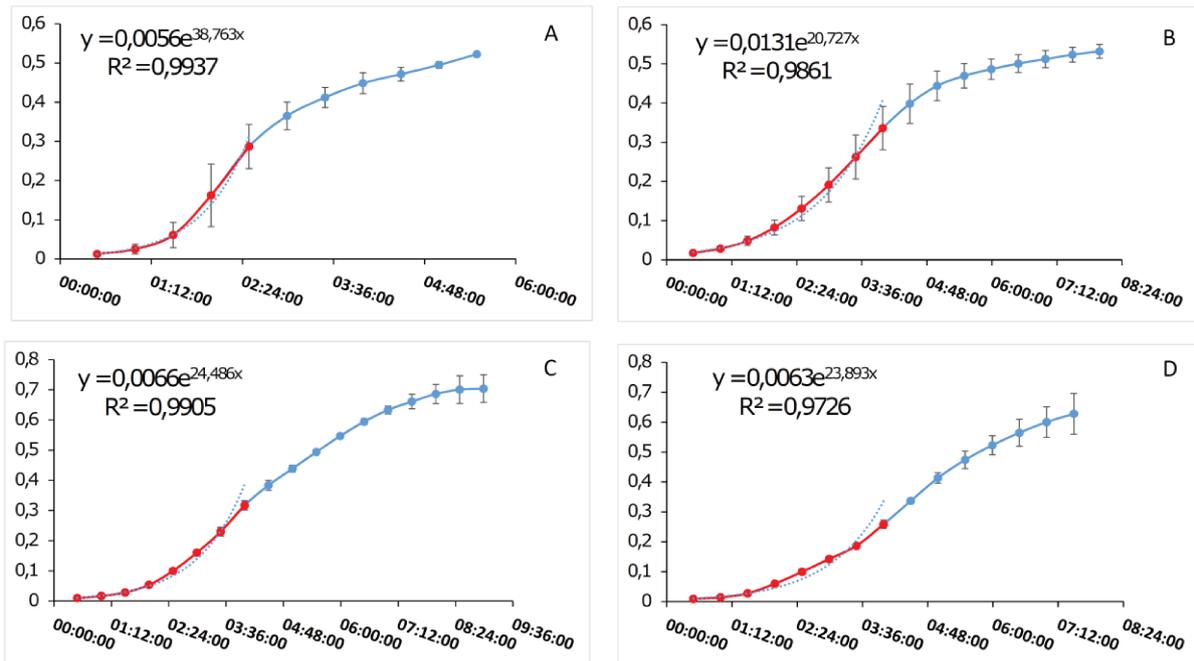


Figure IV-2 : Courbes de croissance microbienne (courbe rouge et bleue) et de modélisation des phases exponentielles (courbe rouge) de la souche *E. coli* (A), *S. aureus* (B), *S. epidermidis* (C), *P. aeruginosa*. Les courbes en bleues correspondent au suivi de croissance entier des souches pathogènes et les courbes en rouges correspondent à la phase exponentielle de croissance.

Tableau IV-3 : Taux de croissance des souches pathogènes.

Courbe	Souche	Taux de croissance (μ)
A	<i>E. coli</i>	38,763 h ⁻¹
B	<i>S. aureus</i>	20,727 h ⁻¹
C	<i>S. epidermidis</i>	24,486 h ⁻¹
D	<i>P. aeruginosa</i>	23,893 h ⁻¹

Les activités des 33 extraits ont été testées sur les 4 souches bactériennes et au total 116 tests ont été réalisés. Une grande majorité des extraits testés ont montré une activité inhibitrice inférieure à 20%. 65% des extraits ont même montré une inhibition inférieure à 10% contre les souches pathogènes étudiées. Les activités antibactériennes les plus élevées (> 20% d'inhibition) dans notre étude ont été relevées 5 fois contre les 2 staphylocoques (IMA.13, VAHI.13 et M99) et une fois contre *E. coli* (ST8). En effet, on a observé chez les fractions méthanoliques d'IMA et VAHI une activité inhibitrice de $27,3 \pm 3,9$ % et $26,5 \pm 8,7$ % contre la souche *S. aureus* et une inhibition de $35,5 \pm 12,1$ % et $25,1 \pm 3,9$ % contre la souche *S. epidermidis*, respectivement. Au niveau des extraits bruts, on a reporté une inhibition de $20,7 \pm 23,9$ % de l'extrait brut de M99 contre *S. aureus* et une activité inhibitrice de $23,2 \pm 4,9$ % de l'extrait brut de ST8 contre *S. epidermidis* (Tab. IV-4).

Tableau IV-4 : Pourcentage d'inhibition (\pm écart type) des extraits cyanobactériens à 50 μg / ml. *** courbe de croissance proche du témoin négatif (valeurs négatives) ; la partie grisée représente l'absence de test effectué et les données surlignées en vert représentent les activités supérieures à 20%.

échantillon	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	
IMA.11	5,5 \pm 6,1	3,6 \pm 4,6	7,2 \pm 4,3		
IMA.12	8,0 \pm 11,3	6,0 \pm 3,3	3,2 \pm 1,0		
IMA.13	27,3 \pm 3,9	35,5 \pm 12,1	***		
IMA.14	8,7 \pm 9,2	8,1 \pm 0,8	3,8 \pm 4,2		
VAHI.11	10,0 \pm 0,003	5,2 \pm 2,7	3,4 \pm 4,8		
VAHI.12	3,6 \pm 5,1	7,6 \pm 3,4	3,8 \pm 5,4		
VAHI.13	26,5 \pm 8,7	25,1 \pm 3,9	3,9 \pm 5,5		
VAHI.14	7,7 \pm 10,1	7,3 \pm 0,6	3,0 \pm 4,2		
CALO.11	9,4 \pm 5,3	0,2 \pm 0,2	3,3 \pm 4,0		
CALO.12	12,7 \pm 8,3	5,5 \pm 1,9	2,7 \pm 1,8		
CALO.13	7,0 \pm 9,9	11,2 \pm 0,4	10,0 \pm 7,9		
CALO.14	7,2 \pm 8,1	9,9 \pm 14,0	16,1 \pm 14,5		
NECTA.11	8,2 \pm 11,5	1,9 \pm 2,7	12,3 \pm 3,4		
NECTA.12	13,7 \pm 6,0	9,0 \pm 2,5	5,5 \pm 4,2		
NECTA.13	9,5 \pm 3,0	13,3 \pm 0,4	1,3 \pm 1,9		
NECTA.14	10,5 \pm 14,9	5,6 \pm 6,8	2,0 \pm 2,7		
Spiruline	13,6 \pm 9,7	7,3 \pm 7,5	12,8		17,1 \pm 6,1
SD12	2,0 \pm 2,8	12,8 \pm 9,2	13,8		19,8 \pm 2,9
ST71	5,0 \pm 7,1	9,3 \pm 13,2	7,8		13,8 \pm 7,9
Dumbéa bis	4,6 \pm 6,6	5,4 \pm 5,4	4,6		8,0 \pm 11,3
ST69	***	5,3 \pm 7,5	***		7,0 \pm 9,9
ST47	0,8 \pm 1,1	9,3 \pm 13,2	2,5		16,7 \pm 8,2
Cassiopée 63.1	***	10,6 \pm 14,9	13,1		13,3 1,1
Prony	***	***	***		8,5
M99	20,7 \pm 23,9	2,1 \pm 3,0	5,9 \pm 8,4		5,0 \pm 5,8
Cassiopée 73.1	1,4 \pm 2,0	7,5 \pm 10,6	13,5 \pm 0,9		17,7 \pm 0,5
GOPS18	1,3 \pm 0,2	7,1 \pm 10,0	5,0 \pm 4,9		14,5 \pm 2,1
ST55	8,8	2,2	10,6		10,8 \pm 0,2
ST8	***	6,0 \pm 8,5	23,2 \pm 4,9		12,9 \pm 1,5
Cassiopée 63.2	2,9 \pm 4,1	7,1 \pm 10,0	11,0 \pm 2,3		11,4
ST37	0,9	***	11,5		15,2
WH0002	1,1	***	11,6		6,9
WH0003	***	12,8 \pm 18,0	14,6		15,7

IV.3.2 Activités enzymatiques

Activité anti-tyrosinase

Au total, 29 extraits ont été testés pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de la tyrosinase (Fig. IV-3). Le témoin positif avait une activité inhibitrice de 96 ± 0.02 %. 6 extraits n'ont montré aucune activité, 22 extraits ont montré une activité inhibitrice inférieure à 20%, et l'extrait de la souche *Crocospaera watsonii* WH0002 a montré une activité anti-tyrosinase de 50 ± 0.02 % (Fig. IV-3).

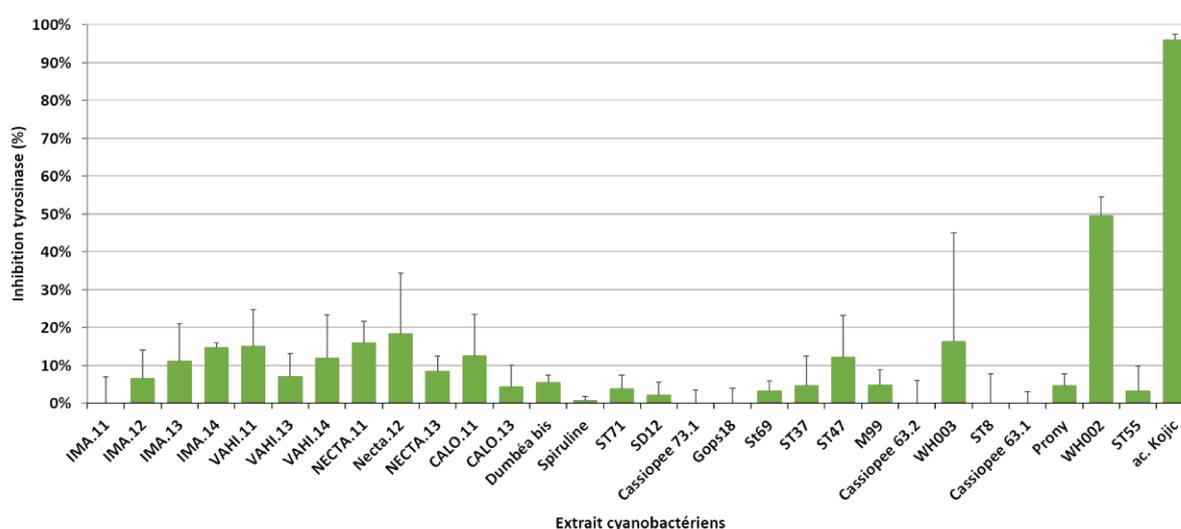


Figure IV-3 : Activité inhibitrice de la tyrosinase des extraits cyanobactériens.

Activité anti-élastase

13 extraits ont été testés pour l'évaluation de l'activité inhibitrice de l'élastase (Fig. IV-4). Le témoin positif a montré une activité de $62 \pm 0,6$ %. L'ensemble des extraits a montré une activité inhibitrice de l'élastase supérieure à 40% sauf pour l'extrait CALO.13 qui a montré une activité de 29 ± 1.0 %. 7 extraits ont montré une activité inhibitrice supérieure à 50% (IMA.11, VAHI.11/13, NECTA.13, M99, Cassiopée 73.1, ST47,) dont l'extrait méthanolique VAHI.13 qui a montré une inhibition atteignant 64 ± 2 % (Fig. IV-4), supérieure au témoin acide oléanolique.

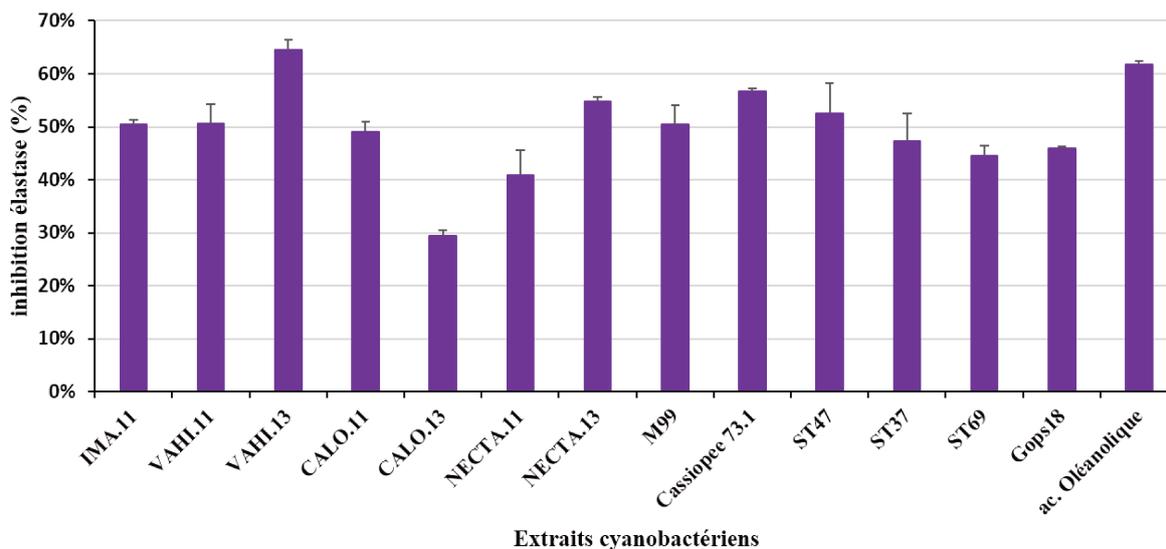


Figure IV-4 : Activités inhibitrices de l'élastase par les extraits cyanobactériens.

Activité anti-oxydante (test TEAC)

31 extraits ont été testés pour l'évaluation de l'activité anti-oxydante (Fig. IV-5). Le témoin positif (Trolox) a montré une activité de $99 \pm 0.5\%$. Les 3 fractions VAHL.13, NECTA.13, CALO.12 et l'extrait brut de ST47 ont montré les activités anti-oxydantes les plus importantes avec $66 \pm 1,9$, $52 \pm 4,4$, $64 \pm 2,1$ et $51 \pm 4,3\%$, respectivement. Ensuite, les activités moyennement élevées ont été celles des fractions IMA.12,13,14 ; VAHI.12 ; CALO.13 et NECTA.12 avec une activité comprise entre 30-45%. Pour le reste, 3 extraits (VAHI.14 ; GOPS18 et Dumbéa bis) avaient une activité comprise entre 20-30% et les 18 autres avaient des activités inférieures à 20% (Fig. IV-5).

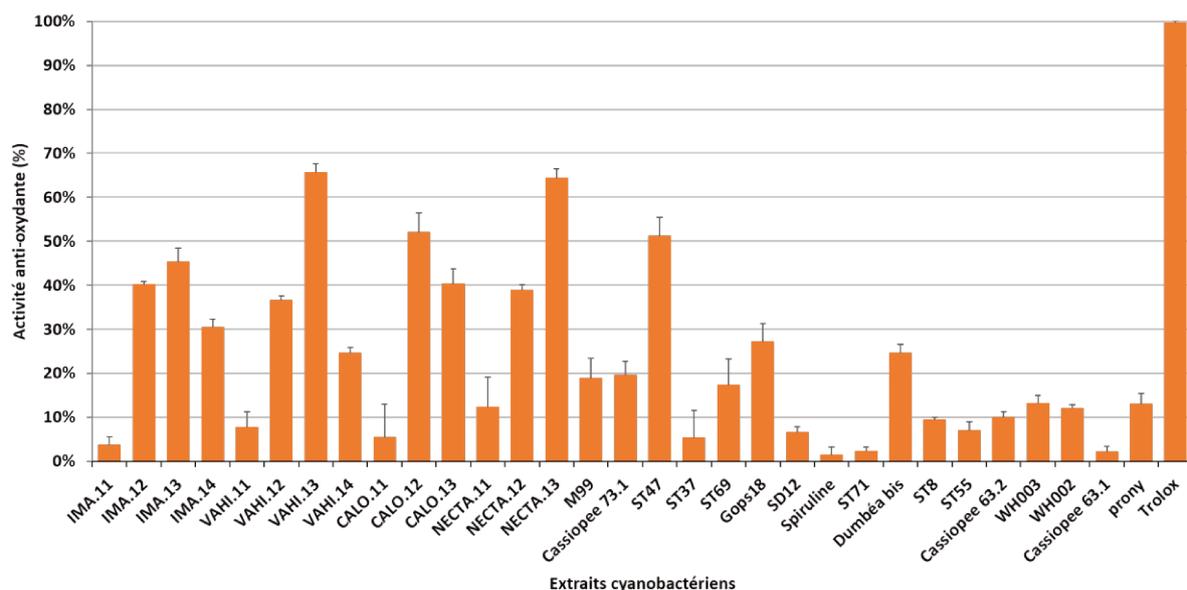


Figure IV-5 : Activités anti-oxydantes des extraits cyanobactériens.

Test XTT

7 extraits bruts cyanobactériens ont été testés sur la viabilité des kératinocytes humains (Fig. IV-6). Ces cellules ont été traitées avec différentes concentrations (1, 5, 25 $\mu\text{g/ml}$) d'extraits cyanobactériens. Comme le montre la figure IV-6, les extraits n'ont aucun effet cytotoxique sur les kératinocytes, quelles que soient les concentrations et le temps d'incubation utilisés. Cependant, une prolifération cellulaire a été observée à des fractions de masse plus élevées pendant les temps d'incubation le plus long (48h-72h). Les meilleures augmentations de prolifération ont été obtenues avec 25 $\mu\text{g/ml}$ d'extraits bruts de Cassiopee73.1, ST69 et ST37 avec un pourcentage de viabilité dépassant les 180% (>80% que les cellules témoins) (Fig. IV-6).

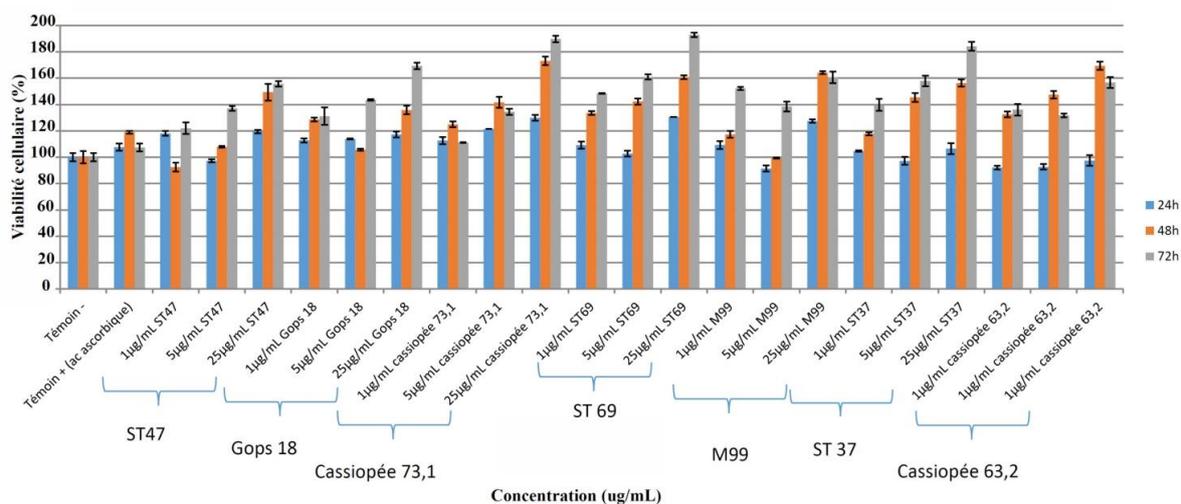


Figure IV-6 : Viabilité cellulaire des kératinocytes humains (cellules HaCaT) traités avec des extraits de cyanobactéries pendant 24 h (barres blanches), 48 h (barres grises) et 72 h (barres noires) à 37 °C. Le contrôle négatif correspond aux cellules traitées avec des émulsions libres. Le contrôle positif correspond aux cellules traitées avec 25 µg / ml de vitamine C. Les données ont été calculées en% de la valeur obtenue avec des cellules non traitées.

IV.3.3 Evaluation phytochimique

L'étude phytochimique des 4 extraits méthanoliques IMA.13, VAHI.13, NECTA.13 et CALO.13 a permis d'identifier les grandes familles de molécules présentes dans celles-ci.

L'analyse UHPLC-ELSD des 4 extraits est présentée dans la Figure IV-7. On observe des produits majoritaires qui diffèrent entre les 4 extraits. Cependant, les chromatogrammes des 4 extraits montrent des sorties de pics en ELSD et aux 4 longueurs d'ondes d'analyse après un temps de rétention de 9 minutes, ce qui indique la présence de produits apolaires.

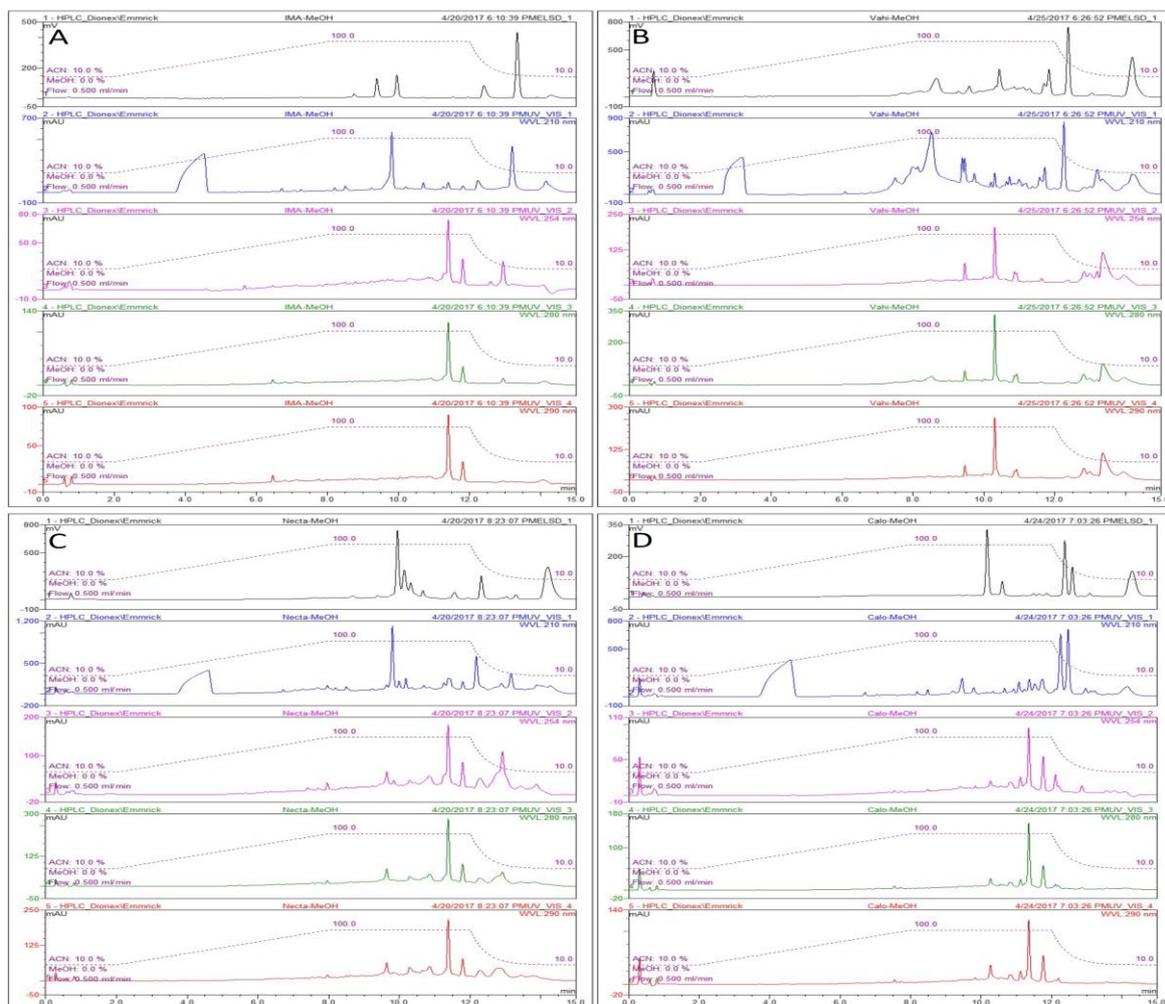


Figure IV-7 : Chromatographes des extraits cyanobactériens après analyse en UHPLC-ELSD. A : extrait IMA.13 ; B : extrait VAHI.13 ; C : extrait NECTA.13 et D : extrait CALO.13.

Après analyse en UHPLC-ELSD, les fractions IMA.13 et VAHI.13 ont subi une étape de séparation par HPLC semi-préparative avant l'analyse en RMN (Fig. IV-8). 15 pics ont été récoltés correspondant à la fraction IMA.13 (Fig. IV-8A) et 17 pics correspondant à la fraction VAHI.13 (Fig. IV-8B). Par la suite, les pics analysés en RMN ont été majoritairement les pics analysés avec une masse supérieure à 1 mg et sont présentés dans le tableau IV-5.

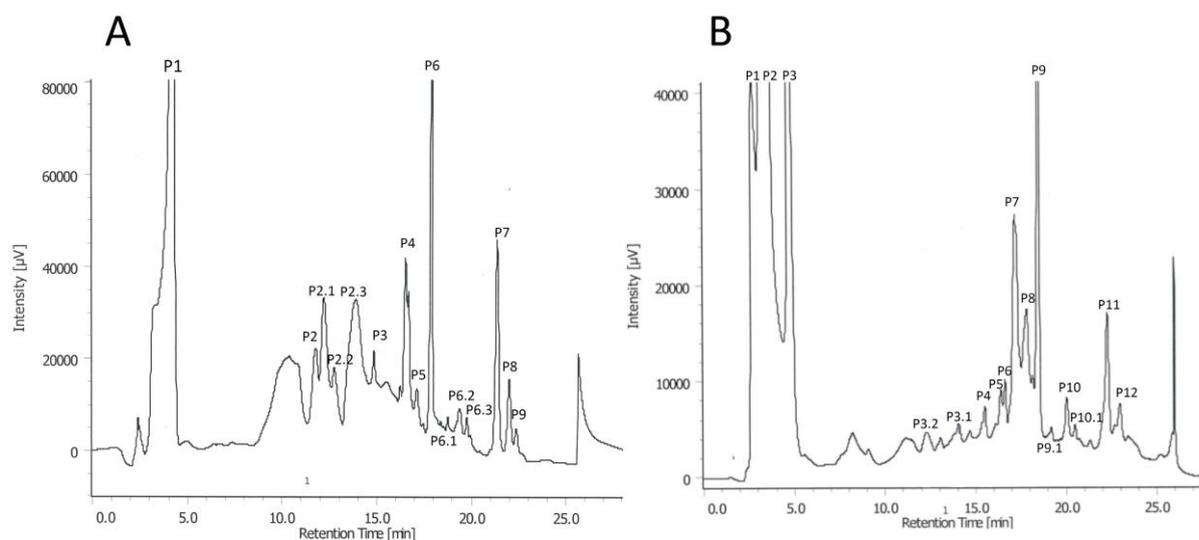


Figure IV-8 : Chromatogramme des extraits cyanobactériens analysés en HPLC semi-préparative (A : IMA.13 ; B : VAHI.13).

Tableau IV-5 : Tableau récapitulatif des masses de pics récoltés en HPLC semi-préparative des fractions IMA.13 et VAHI.13. Les espaces vides correspondent à des masses de pics très faibles, proche de 0).

Souche	Pics	Masse des pics récoltés (mg)
IMA	IMA_P1	
	IMA_P2	
	IMA_P2.1	1.41
	IMA_P2.2	
	IMA_P2.3	1.99
	IMA_P3	1.73
	IMA_P4	5.77
	IMA_P5	1.65
	IMA_P6	8.58
	IMA_P6.1	0.76
	IMA_P6.2	0.94
	IMA_P6.3	
	IMA_P7	1.32
VAHI	VAHI_P8	0.93
	VAHI_P9	0.52
	VAHI_P1	4.6
	VAHI_P2	6.36
	VAHI_P3	3.4
	VAHI_P3.1	3.92
	VAHI_P3.2	
	VAHI_P4	0.67
	VAHI_P5	0.52
	VAHI_P6	0.44
	VAHI_P7	2.41
	VAHI_P8	1.38
	VAHI_P9	4.32
VAHI_P9.1	0.34	
VAHI_P10	0.63	
VAHI_P10.1	0.14	
VAHI_P11	0.69	
VAHI_P12	0.43	
VAHI_P13	0.41	

Quatre grandes familles de molécules apolaires ont été identifiées dans les pics récoltés des deux fractions VAHI.13 et IMA.13 après analyse des spectres de proton ^1H (Tab. IV-6). Parmi ces familles de molécules, il y a des glycéroglycolipides, des glycérolipides, des acides gras avec ou sans insaturations puis des caroténoïdes. On observe une majorité de glycéroglycolipides et d'acides gras dans les fractions méthanoliques. Le pic P4 de IMA.13 et P9 de VAHI.13 se sont révélés être les seuls pics correspondant à des molécules pures isolées (Tab. IV-6). Les familles de molécules ont été déterminées grâce à des signaux distinctifs de chaque famille (Annexe 2). Les extraits avec des glycéroglycolipides ont été identifiés avec 4 signaux distinctifs :

- Des signaux de protons liés à des carbones oxygénés (CH-OH) entre 3,3 et 5 ppm qui correspondent à ceux du sucre et du glycérol.
- Des signaux à 5,3 ppm qui sont les protons oléfiniques (CH=C) qui montrent que la ou les chaînes grasses sont insaturées.
- Un pic énorme à 1.3 ppm correspondant aux nombreux CH_2 (chaîne grasse aliphatique).
- Un ou deux méthyls terminaux (triplet) à 0,85 ppm selon les pics (Fig. 1, 5, 6, 9, 10, 15, 16; Annexe 2).

Les pics correspondant à des acides gras ont été identifiés par la présence de signaux distinctifs tels que :

- Un massif à 1,3 ppm indiquant de nombreux CH_2 d'une chaîne aliphatique
- Un méthyl triplet à 0,85 ppm.
- La présence pour certains pics d'insaturations présentes à 5,3 ppm (Fig. 2, 3, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17; Annexe 2)

Enfin, l'identification de caroténoïdes s'est faite avec la présence de :

- Méthyls singulet à 1,05, 1,7 et 1,95 ppm
- Signaux très déblindés entre 6 et 6,7 ppm qui correspondent à des protons oléfiniques de doubles liaisons conjuguées (Fig. 4, 8, 14; Annexe 2).

Tableau IV-6 : Tableau représentant les familles de molécules présentes dans les pics récoltés grâce à l'analyse RMN du proton ^1H . +++ représente une molécule pure ; ++ représente une molécule majoritaire dans le pic récolté, + représente une molécule minoritaire et +/- représente une incertitude entre 2 familles de molécules.

Extraits	Noms des pics récoltés	Glycéroglycolipide	Glycérolipide	acide gras	acide gras insaturé	caroténoïde
IMA.13	P2-1	++				
	P2-3				++	
	P3				++	
	P4					+++
	P5					++
	P6	+/-	+/-			
	P6-1	+/-	+/-			
	P6-2			++		
VAHL.13	P7					++
	P3	+			++	
	P3-1	+			++	
	P4				++	
	P5				++	
	P6				++	
	P7					++
	P8	++		++		
	P9	+++				
	P10			++		

Parmi les pics purifiés de l'extrait IMA.13, un pic s'est révélé pur et a fait l'objet d'une identification de la structure. Les spectres du proton ^1H et de l'analyse bidimensionnelle (HSQC) de IMA.P4 sont présentés dans les figures IV-9 et IV-10, respectivement. Les déplacements chimiques du proton sont résumés dans le tableau IV-6 et les déplacements des carbones protonés sont dans le tableau IV-7. Les analyses ont permis de montrer que la molécule pure présente dans l'extrait IMA.13 est un pigment caroténoïde connu, la zéaxanthine (structure dans la fig. IV-9). En effet, les déplacements chimiques des protons ^1H de la zéaxanthine issus de la cyanobactérie IMA est comparable à ceux des publications de Englert et al. (1991) et Khachik et al. (1992) (Tab. IV-6). Quant aux carbones protonés, les déplacements chimiques sont comparables à ceux retrouvés dans l'étude de (Baranyai et al. 1976).

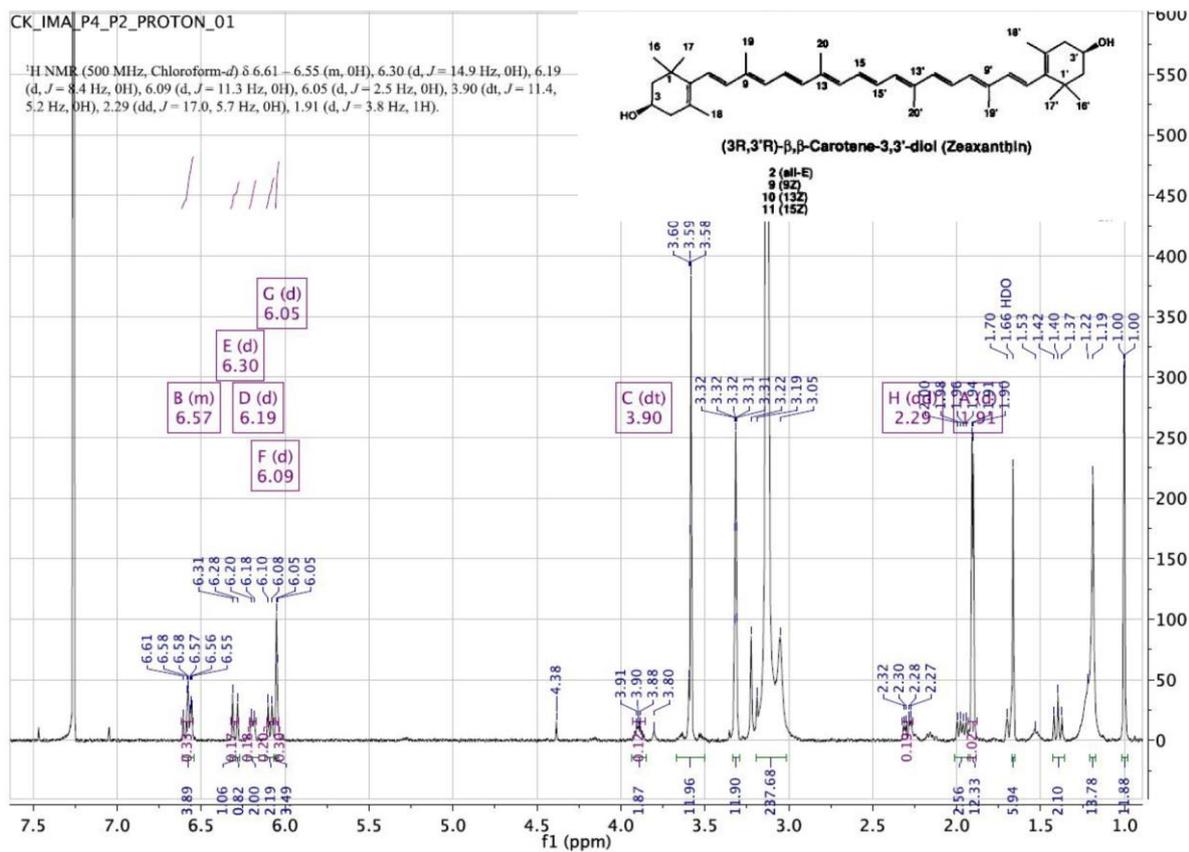


Figure IV-9 : Spectre proton ¹H et structure de la molécule zéaxanthine (pic P4 de l'extrait IMA.13).

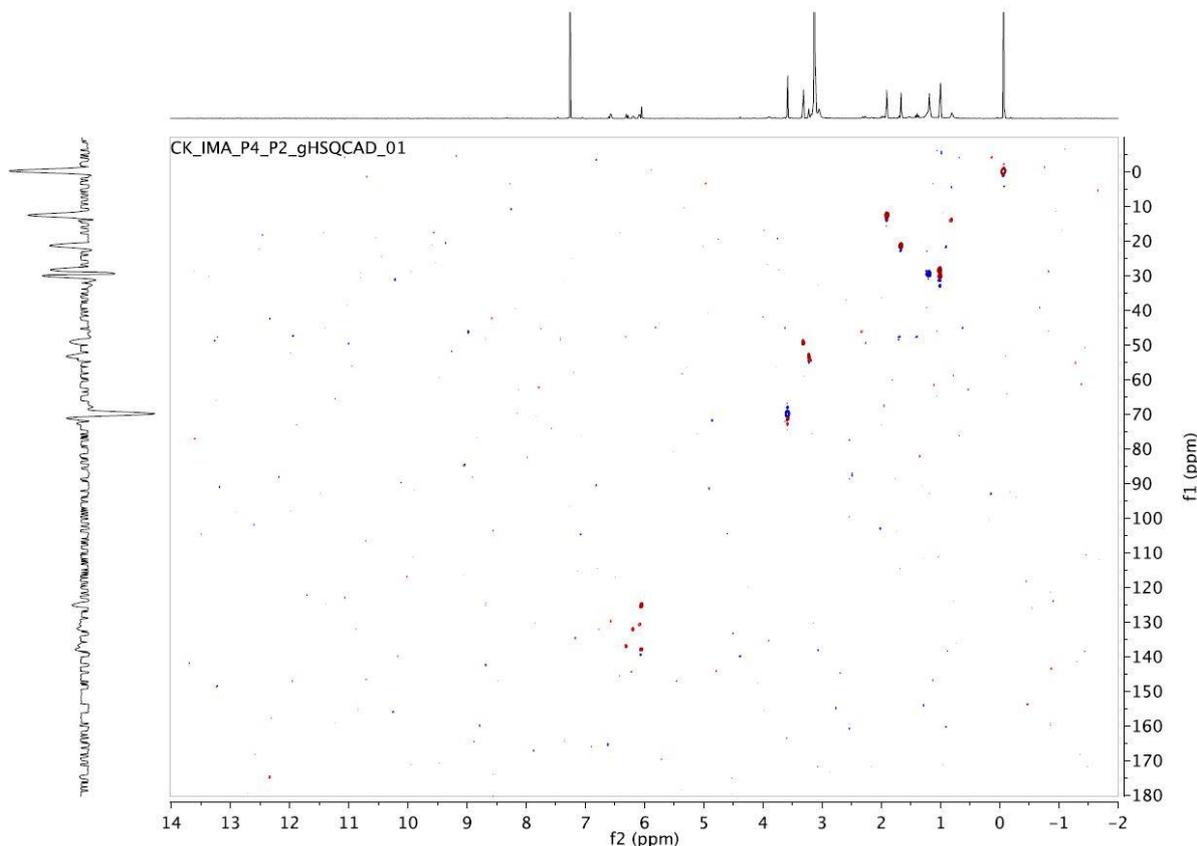


Figure IV-10 : Spectre HSQC le la zéaxanthine (pic P4 de l'extrait IMA.13).

Tableau IV-6 : Déplacements chimiques des protons ¹H de zéaxanthine.

¹ H-NMR Zéaxanthine		
400 MHz, CDCl ₃	400 MHz, CDCl ₃	500 MHz, CDCl ₃
Englert et al. (1991)	Khachik et al. (1992)	IMA.P4
9.46 (s, H-C(12'))	6.64 [2H, H-C(11) and H-C(11')]	6.55-6.61 (2H, m, CH, CH, C(11) C(15))
7.04 (dd, J = 14.8, 11.5, H-C(15))	6.63 [2H, H-C(15) and H-C(15')]	6.30 (1H, d, J= 14.9, CH, C(12))
6.97 (d, J=12, H-C(14))	6.36 [2H, H-C(12) and H-C(12')]	6.19 (1H, d, J=8.4, CH, C(14))
6.80(dd, J=14.8, 11.6, H-C(11))	6.26 [2H, H-C(14) and H-C(14')]	6.09 (1H, d, J=5.98, CH, C(10))
6.69(dd, J=14.5, 11.8, H-C(15'))	6.17 [2H, H-C(10) and H-C(10')]	6.07 (1H, d, J=, CH, C(8))
6.38(d, J=15, H-C(12))	6.14 [2H, H-C(8) and H-C(8')]	6.03(1H, d, J=, CH, -C(7))
6.18 (d, J 5 12, H-C(10))	6.12 [2H, H-C(7) and H-C(7')]	3.90 (1H, m, CH, -C(3))
6.19, 6.14 (AB, J = 16.5, H-C(7), H-C(8))	4.00 [2H, H _x -C(3) and H _a -C(3')]	2.29(1H, dd, J = 17, J = 5.7, CH, -C(4))
4.00 (m, H-C(3))	2.39 [2H, H _q -C(4) and H _q -C(4')]	1.91(3H, s, CH ₃ , (19))
2.40 (dd, J = 16.5, 6, H-C(4))	2.04 [2H, H _x -C(4) and H _a -C(4')]	1.90(3H, s, CH ₃ , (20))
2.06 (dd, J = 16.5, 9, H _a -C(4))	1.974 [12H, H ₃ C (19,19',20,20')]	1.97(1H, dd, J=17, J=9,7, CH, -C(4))
2.046 (s, CH ₃ (20))	1.77 [2H, H _{eq} -C(2) and H _{eq} -C(2')]	1.69 (1H, m, -C(2))
1.993 (s, CH, (19))	1.738 [6H, H ₃ C(18,18')]	1.66(3H, s, CH ₃ , (18))
1.885 (s, CH, (20))	1.48 [2H, H _{ax} -C(2) and H _a -C(2')]	1.40(1H, m, CH, -C(2))
1.78 (ddd, J = 12,3, 1.5, H _a -C(2))	1.36 [2H, OH-C(3) and OH-C(3')]	1.19(br, OH-C(3))
1.78 (s, CH, (18))	1.074 [12H, H ₃ C(16,16',17,17')]	1.00(6H, s, CH ₃ (16), CH ₃ , (17))
1.48 (m, H-C(2))		
1.44(br. s, OH-C(3))		
1.078 (s, CH, (16), CH, (17))		

Tableau IV-7 : Déplacements chimiques des ^{13}C protonés de zéaxanthine déterminés par HSQC. Les parties grises représentent l'absence de données à cause de la faible résolution et les parties noires les carbones non protonés.

Position carbone de zéaxanthine	Déplacement chimique ^{13}C de zéaxanthine	
	Baranyai et al. (1976)	IMA,P4
1	36,73	
2	44,24	
3	68,47	
4	38,57	
5	125,66	
6	138,03	
7	125,36	125,14
8	138,73	138,07
9	135,55	
10	131,52	130,73
11	124,96	129,55
12	137,74	136,89
13	136,46	
14	132,68	132
15	130,18	129,7
16	28,58	28,34
17	30,07	30,16
18	21,4	21,38
19	12,75	12,6
20	12,75	12,6

IV.4 Discussion

IV.4.1 Activité antibactérienne

Dans notre étude, les extraits cyanobactériens testés n'ont pas montré d'activité inhibitrice significative contre les souches cibles de bactéries testées (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli* et *P. aeruginosa*) Les activités inhibitrices les plus fortes (> 20%) ont été recensées avec les fractions méthanoliques de la souche IMA et VAHI contre 2 staphylocoques et les extraits bruts de la souche M99 contre *S. aureus* et ST8 contre *E. coli*.

Ces résultats peuvent suggérer que les extraits cyanobactériens ne possèdent aucune activité antibactérienne. Cependant, les faibles activités mesurées peuvent aussi suggérer un effet « dilution » de molécules potentiellement actives présentes dans le mélange. En effet, les extraits bruts contiennent un mélange complexe de biomolécules et il est possible que les faibles activités inhibitrices mesurées dans cette étude peuvent être attribuables à une ou des molécules minoritaires dans nos extraits bruts. Les extraits bruts obtenus à partir du mélange moyennement polaire MeOH/CH₂Cl₂ contiennent des molécules de polarité large. Quant au méthanol, un solvant polaire, il permet d'extraire théoriquement une diversité chimique plus importante. Pour aller plus loin, il faudrait faire un fractionnement bio-guidé, isoler des groupes

de molécules par HPLC semi-prep et évaluer alors leur activité afin d'identifier les fractions intéressantes qui seront alors moins complexes avec un effet « dilution » atténué.

IV.4.2 Activités enzymatiques

Au cours de nos travaux, les extraits de souches disponibles ont été testés pour leurs activités inhibitrices potentielles de la tyrosinase et de l'élastase, leur pouvoir anti-oxydant ainsi que leur cytotoxicité.

En ce qui concerne le test anti-tyrosinase, en comparaison au témoin positif qui affichait une inhibition de l'enzyme tyrosinase de 96%, la majorité des extraits excepté l'extrait brut de WH0002 (activité inhibitrice de 50%) avait une activité inhibitrice inférieure à 20%. Ces résultats peuvent suggérer qu'une grande partie de nos extraits n'ont pas d'activité anti-tyrosinase. Peu de test anti-tyrosinase ont été réalisés sur les cyanobactéries (Sano et Kaya 1996; Yabuta et al. 2014). En comparaison à notre étude, l'étude Sano et Kaya (1996) a réalisé le test anti-tyrosinase sur molécule pure (Oscillapeptin G) isolée chez l'espèce toxique *Oscillatoria agardhii* avec une activité de 55%. Cela peut indiquer une potentielle molécule à forte activité présente dans l'extrait brut de WH002. Il serait donc intéressant dans un premier temps de mesurer la CI50 et le résultat de la CI50 déterminera par la suite la poursuite d'une étude phytochimique plus approfondie de l'extrait.

Quant au test anti-élastase réalisé sur 13 extraits cyanobactériens, la majorité sauf CALO.13 (29%) a montré une activité inhibitrice de l'enzyme supérieure à 40% avec l'extrait méthanolique VAHI.13 (64%) dépassant légèrement celle de l'acide oléanolique (62%). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui montre que les cyanobactéries marines notamment les filamenteuses ont déjà révélé une activité anti-élastase de plusieurs peptides tels que les lynbyastatines 7, 8,9 et 4 issues de *Lynbya* sp. (Okino et al. 1997; Kwan et al. 2009; Shin et al. 1995; Salvador et al. 2013; Mehner et al. 2008; Taori et al. 2007). Effectivement peu d'évaluations ont été réalisées sur des souches unicellulaires et pourtant notre étude montre bien un potentiel réel des unicellulaires (VAHI, IMA, NECTA, ST47 et ST37). Ces résultats encourageants, nous permettent d'indiquer qu'il serait intéressant de poursuivre ce test enzymatique sur un plus grand nombre de souches mais également d'identifier les molécules responsables de l'activité anti-élastase. Des hypothèses peuvent être émises quant aux activités rencontrées et à la nature des familles de molécules identifiés dans notre étude phytochimique des extraits méthanoliques IMA.13 et VAHI.13. Dans plusieurs pics de ses 2 extraits, il a été

identifié à chaque fois une majorité d'acide gras et plusieurs études ont révélé leur activité anti-élastase avec en exemple l'acide oléique, linoléique (Rennert et Melzig 2002; Hwang et al. 2009; Ying et al. 1991).

Pour l'activité anti-oxydante la quasi-totalité des extraits (31 extraits cyanobactériens) a été évaluée. Les 3 fractions VAHI.13, NECTA.13, CALO.12 et l'extrait brut de ST47 ont montré des activités intéressantes avec 66, 52, 64 et 51%, respectivement. Ces résultats sont encourageants, et ici aussi la détermination de la CI50 des extraits actifs permettront une meilleure visibilité de l'activité. Au niveau de la méthode choisie dans notre étude, le test TEAC est une méthode employée dans de nombreux laboratoires en raison de sa simplicité, de sa rapidité et de sa corrélation avec l'activité biologique des antioxydants, néanmoins il a été montré la difficulté de comparaison avec d'autres études parce que la technique n'est pas standardisée (Sánchez-Moreno 2002). Cependant, cette méthode détermine l'activité anti-oxydante des composés hydrophiles et lipophiles (Sánchez-Moreno 2002) et notre étude phytochimique sur nos 4 extraits a démontré une majorité de molécules apolaires, avec notamment des acides gras insaturés dont l'activité anti-oxydante a déjà été décrite (Richard et al. 2008). Cela suggère une activité anti-oxydante potentielle des acides gras présents dans les extraits. Pour ne pas manquer une activité anti-oxydante des extraits cyanobactériens et pour comparer nos résultats avec la littérature, il serait préférable de réaliser l'évaluation de l'activité anti-oxydante avec un autre test et notamment le test ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) qui a pour avantage d'être sensible, standardisée et adaptée aux matrices hydrophiles et lipophiles.

Enfin, concernant l'action des cyanobactéries sur la viabilité des kératinocytes humains, 7 extraits bruts ont été évalués. Les extraits ont montré aucune cytotoxicité mais ils ont provoqué une prolifération cellulaire à des temps d'incubation plus long (48 h-72 h). Dans la littérature, les études de cytotoxicité des cyanobactéries ont été réalisées en grande partie sur des cellules cancéreuses. Effectivement un grand nombre de molécules issues de cyanobactéries sont connues pour leur cytotoxicité sur des cellules anti-cancéreuses comme la acutiphycine de la souche *Oscillatoria acutissima*, la cryptophycine de *Nostoc* sp. ou encore l'oscillatoxine d'*Oscillatoria nigroviridis* (Burja et al. 2001). La grande majorité des études de cytotoxicité sont réalisés sur les toxines des souches responsables d'efflorescences, sur l'intensité de leur toxicité (Kozdeba et al. 2014; Palus et al. 2007). Quelques études ont toutefois relevé un effet positif sur la prolifération cellulaire de cellules épidermiques associé à un potentiel cicatrisant de la peau des extraits bruts de *Spirulina* sp. et de la C-phycoyanine un pigment typique de

cyanobactéries (Parwani et Bhatnagar 2013; Gunes et al. 2017; Syarina et al. 2015; Gur et al. 2013). Dans l'étude de Gunes et al. (2017), l'extrait brut de *Spirulina* sp. a produit une prolifération supérieure à celle du groupe témoin avec 198% de viabilité cellulaire après 3 jours. De même qu'une crème pour la peau comprenant 1,125% d'extrait brut de *Spirulina platensis* a montré un effet cicatrisant accru sur la lignée cellulaire de kératinocytes. Gur et al. (2013). Ces extraits bruts de *Spirulina* sp ont également présenté une activité *in vitro* et *in vivo* sur la cicatrisation des plaies. Son étude suggère que l'activité semble être directement associée à la C-phycocyanine et/ou d'autres molécules potentiellement non identifiés. Dans notre étude, la prolifération cellulaire des kératinocytes provoquée par les extraits cyanobactériens indique qu'ils auraient également une activité cicatrisante. Afin de mieux comprendre son mode d'action, il serait donc pertinent d'effectuer des tests spécifiques pour évaluer les effets potentiellement cicatrisant des extraits cyanobactériens et leur mode d'action en plus du test XTT tels que :

- le test sur la prolifération glycosaminoglycanes (Test de glycosaminoglycanes sulfatés) qui sont des polysaccharides jouant un rôle très important dans l'hydratation des tissus de l'épiderme.
- le test sur la production de collagène (*e.g.* dosage du collagène soluble), une famille de protéines spécifiques qui confèrent à la peau une résistance élastique.
- l'activité de cicatrisation des plaies (*e.g.* Test de migration de cicatrisation).

IV.4.3 Evaluation phytochimique

L'évaluation phytochimique des extraits méthanoliques (IMA.13, VAHI.13, NECTA.13 et CALO.13) réalisée en UHPLC-ELSD a affiché des pics en ELSD et aux 4 longueurs d'ondes d'analyse avec des temps rétentions supérieurs à 9 minutes. Cela nous permet d'avoir une idée sur la nature des molécules présentes dans les extraits. En effet, un temps de rétention élevé nous permet d'affirmer que la grande majorité des composants présents dans les extraits méthanoliques sont de nature apolaires.

Le fractionnement par HPLC semi-préparative et l'analyse RMN proton ^1H des extraits IMA.13 et VAHI.13 a permis de mettre en évidence les principales familles de molécules qui les composent. La majeure partie des pics récoltés ne se sont pas révélés purs après le fractionnement en HPLC semi-préparative et analyse des spectres RMN. Toutefois, les familles de molécules ont été clairement identifiées. Les extraits IMA.13 et VAHI.13 sont composés

majoritairement de glycéroglycolipides, d'acide gras (saturés, insaturés et polyinsaturés), de caroténoïdes et de glycérolipides retrouvés seulement chez IMA.13. Cependant, le pic 9 de VAHI.13 et le pic 4 de IMA.13 se sont révélés être purs. Après analyse du spectre proton ^1H et celui du ^{13}C , le pic 4 d'IMA.13 a été caractérisée comme étant la molécule de zéaxanthine, une molécule de la famille des caroténoïdes. Faute de temps le pic 9 de VAHI.13 n'a pas encore été élucidé.

Toutes les familles de molécules élucidées dans nos analyses ainsi que la zéaxanthine (IMA.P4) ont toutes déjà été décrites dans la littérature. En effet, les acides gras, les glycérolipides, les glycolipides et particulièrement les glycéroglycolipides sont les principaux lipides membranaires (*e.g.* membrane des thylakoides) chez les organismes photosynthétiques dont les cyanobactéries (Thelen et Ohlrogge 2002; Ohta et al, 2000; Guedes et al. 2011; Boudière et al. 2014; Deng et al. 2007; Block et al. 2007). Ensuite, les cyanobactéries contiennent nécessairement pour se développer par photosynthèse plusieurs pigments dont des chlorophylles et des caroténoïdes tels que la zéaxanthine, dont les principales fonctions sont la récupération de la lumière et la photo-protection (Goodwin, 1980; Takaichi et Mochimaru 2007; Hertzberg et al, 1971; Zhu et al. 2010; Bidigare et al, 1989).

Pour résumer, nous avons mesuré sur les extraits IMA.13 et VAHI.13 une activité antibiotique de $27 \pm 4 \%$ – $36 \pm 12 \%$ pour IMA.13 et 27 ± 9 – $25 \pm 4 \%$ pour VAHI.13 contre les souches *S.aureus* et *S.epidermidis*, respectivement. Nous avons également relevé une activité anti-oxydante des extraits IMA.13 et VAHI.13 de 45 ± 3 et $66 \pm 2 \%$ et une inhibition de l'enzyme élastase de $64 \pm 2 \%$ par VAHI.13. Après analyse phytochimique nous pouvons émettre l'hypothèse que ces activités biologiques pourraient être dues aux groupes de familles de molécules que nous avons identifiés. En effet, les caroténoïdes sont connues depuis longtemps comme étant des molécules anti-oxydantes et anti-âge (Lademann et al. 2011; Ismaiel et al, 2013; Fiedor et Burda 2014). Alors que les molécules glycéroglycolipides et les acides gras sont connus pour avoir avec des activités antibactériennes (Qiu et al. 2001; Mundt et al. 2003; Campbell et Cronan 2001; Najdenski et al. 2013). Cependant, l'identification précise des molécules responsables de ces différentes activités biologiques doit être poursuivie sur des molécules isolées.

IV.5 Conclusion

En conclusion, les premiers résultats sur les tests réalisés sur les extraits de cyanobactéries diazotrophes isolées du Pacifique Sud-Ouest semblent prometteurs quant à leur utilisation comme ingrédients dans les cosmétiques. Les familles de molécules retrouvées dans les extraits méthanoliques des souches IMA et VAHI sont majoritairement des métabolites primaires dont certaines sont impliquées dans le processus de photosynthèse. Toutefois, ces métabolites primaires de cyanobactéries ne sont pas pour autant inintéressants, car certains d'entre eux possèdent des propriétés et/ou activités à fort potentiel (Martínez-Francés et Escudero-Onate 2018). Il serait donc intéressant de poursuivre l'analyse phytochimique sur les autres souches isolées et notamment des filamenteuses afin d'élargir le spectre de recherche et d'augmenter les chances d'isolement de nouveaux métabolites secondaires. Mais aussi, grâce à l'implication de nos partenaires, il serait très intéressant de continuer d'évaluer les activités de ces extraits sur des tests très spécifiques pour mesurer, par exemple, leur pouvoir cicatrisant. Parallèlement, ces souches doivent être cultivées dans de plus grands volumes afin d'obtenir de la biomasse en grande quantité. Cela permettra un fractionnement plus spécifique et des études biochimiques supplémentaires pour isoler et identifier les structures chimiques des composés bioactifs. La grande diversité des organismes dans la région calédonienne révèle un fort potentiel de valorisation en cosmétique. Il serait donc très judicieux de poursuivre les analyses biologiques et phytochimiques sur un maximum de souches disponibles et espérer à moyen terme la mise sur le marché d'un futur produit cosmétique issu de cyanobactéries du Pacifique Sud-Ouest ou de Nouvelle-Calédonie.

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

SOMMAIRE

V.1	Synthèse des résultats obtenus	112
V.2	Perspectives de recherche.....	113

V.1 Synthèse des résultats obtenus

Ce chapitre présente une synthèse de ce travail de thèse avec quelques perspectives. Les différentes études menées au cours de cette thèse ont permis de répondre aux objectifs scientifiques fixés en début de thèse:

Dans le chapitre 2, nous avons mis en évidence au travers d'une série temporelle de 4 ans :

- De forts taux de fixation d'azote dans le lagon calédonien durant toute l'année qui semblent peu influencés par la saisonnalité contrairement en milieu hauturier
- Des fortes abondances de cyanobactéries diazotrophes, dont la distribution spatio-temporelle est influencée par plusieurs paramètres physico-chimiques tels que la température, la concentration en phosphate ou encore la direction du vent.

Ces données supplémentaires viennent soutenir la qualification de « Hot Spot » de fixation d'azote donnée à la région tropicale du Pacifique Sud-Ouest où l'on retrouve la Nouvelle-Calédonie.

Ces travaux de thèse ont également révélé que les UCYN dominaient la communauté diazotrophe au sein du lagon et particulièrement les UCYN-A et UCYN-C. Cette particularité marquée par de très fortes concentrations en UCYN et notamment en UCYN-C a rarement été décrite en Nouvelle-Calédonie et plus globalement dans l'océan oligotrophe. Cela est d'autant plus intéressant, du fait que peu de représentants de ce type d'UCYN (*i.e.* *Cyanothece* et *Crocospharea*) sont disponibles en culture à ce jour (Reddy et al. 1993 ; Mitsui et al. 1988 ; Taniuchi et al. 2011 ; Webb et al. 2009 ; Ohki et al. 2008).

Dans le chapitre 3, deux méthodes de caractérisation (*i.e.* morphologique et génétique) ont été réalisées sur 16 souches de cyanobactéries diazotrophes récemment isolées par notre équipe. Nous avons ensuite évalué le potentiel d'utilisation d'une troisième méthode d'identification (*i.e.* MALDI-TOF-MS). Les analyses morpho-génétique ont montré que les 16 souches isolées sont composées de 5 souches filamenteuses dont 1 se rapprochant du genre *Spirulina* et 4 proches des genres *Calothrix* et *Rivularia*, et 11 unicellulaires dont 2 comparables au genre *Xenococcus* et 9 proche des genres *Cyanothece* et *Gloeothece*. L'analyse de nos souches cyanobactériennes par MALDI-TOF-MS a révélé que cette méthode pouvait constituer une alternative à la méthode moléculaire dans l'identification rapide des cyanobactéries et devrait être considéré comme faisant partie d'une approche polyphasique pour caractériser les cyanobactéries (en association avec les deux méthodes précédentes).

Dans le chapitre 4, nous avons évalué pour la première fois le potentiel de valorisation de ces souches cyanobactériennes nouvellement isolées en réalisant des tests antibactériens et cosmétiques (anti-oxydants, enzymatiques et de cytotoxicité). Les résultats obtenus n'ont pas révélé d'activité antibactérienne significative. Néanmoins, les extraits issus de nos souches ont révélé des activités intéressantes pour le secteur cosmétique, notamment au niveau des tests anti-élastase et de cytotoxicité. En effet, les tests anti-élastase étaient très actifs dépassant parfois l'activité du témoin positif. Pour le test de cytotoxicité, aucune souche n'était cytotoxique mais on notait une action de prolifération cellulaire des cellules de peau (*i.e.* kératinocytes) suggérant un potentiel cicatrisant des extraits.

V.2 Perspectives de recherche

L'étude de la diazotrophie en milieu côtier dans le chapitre 2 a permis pour la première fois en Nouvelle-Calédonie une caractérisation spatio-temporelle rigoureuse de son activité ainsi que des organismes impliqués dans ce processus. Toutefois, notre étude n'a ciblé qu'une partie des diazotrophes et nos résultats suggèrent la contribution d'autres phylotypes non ciblés lors du suivi. A titre d'exemple, les diazotrophes non cyanobactériens (*i.e.* gamma protéobactérie non cultivées) pourraient être un potentiel acteur au niveau de la fixation d'azote biologique dans le Pacifique Sud (Moisander et al. 2014). En ce qui concerne les suivis de terrain, il serait donc intéressant de quantifier l'abondance de la communauté diazotrophe avec une diversité plus large de groupes ciblée par séquençage génétique de l'ensemble des communautés dans le but de désigner de nouvelles amorces pour réaliser de la quantification par qPCR. Associé à des analyses isotopiques à l'échelle individuelle des cellules comme récemment développé par Bonnet et al. (2016), cela permettrait de définir plus précisément la contribution des différents groupes à la fixation d'azote totale dans le lagon calédonien.

L'évaluation de la technique d'identification par MALDI-TOF-MS sur des souches de cyanobactéries diazotrophes a été un succès. Cependant, si cette technique permet d'identifier une souche de cyanobactérie marine pure en culture, l'identification en milieu naturel n'apportera pas les mêmes conditions d'analyses avec un mélange complexe de micro-organismes. Une étude supplémentaire sur ce sujet serait nécessaire, avec dans un premier temps un test d'identification à partir d'un mélange de 2 à plusieurs souches puis dans un second temps, procéder au test des logiciels actuellement utilisés (et algorithmes) dans la distinction des souches. Le cas échéant, il conviendrait de mettre en place un protocole spécifique afin

d'obtenir une meilleure résolution et de distinguer les pics majoritaires de souches répertoriées dans notre base de données. Enfin, la mise en place d'une base de données « open access » avec tous les spectres de références des souches disponibles en cultures apporterait un avantage dans la description taxonomique des cyanobactéries. Cette base de données pourrait également faciliter l'identification rapide des cyanobactéries toxiques lorsque leurs efflorescences présentent des risques de santé publique telle que *Lyngbya majuscula*.

Les cyanobactéries diazotrophes marines sont pratiquement toujours étudiées pour leur rôle dans les cycles biogéochimiques. C'est l'une des premières fois à travers cette thèse que l'on s'intéresse à la perspective de valorisation des cyanobactéries diazotrophes. Tout d'abord, la poursuite de la bio-prospection serait judicieuse dans le lagon calédonien afin d'augmenter les chances de valorisation et d'isoler un grand nombre de cyanobactéries potentiellement nouvelles. Ensuite, les résultats positifs obtenus sur nos extraits cyanobactériens ont démontré un grand potentiel en cosmétique. De ce fait, la voie la plus intéressante serait de poursuivre les tests d'activité anti-élastase et de cytotoxicité sur un plus grand nombre de souches. De plus, le potentiel cicatrisant des cyanobactéries est aussi très prometteur mais des études complémentaires (*e.g.* dosage du collagène, test de migration de cicatrisation) sont nécessaires pour certifier la capacité de cicatrisation des extraits. In fine, l'objectif de ces tests d'évaluation étant bien sûr la mise sur le marché d'un produit cosmétique et/ou cicatrisant dont l'ingrédient serait issu d'extraits de cyanobactéries diazotrophes marines du Pacifique sud.

Pour finir, ce travail de thèse a permis d'identifier un potentiel de valorisation intéressant de la part de ces organismes et spécialement dans la cosmétique. Marquée par une prépondérance de l'industrie du Nickel, la Nouvelle-Calédonie s'était bâtie autour de cette ressource minière dont l'exploitation a provoqué des conséquences désastreuses sur son environnement (*e.g.* érosion, pollution du lagon). Néanmoins, il existe dans ce pays un désir de changer de modèle économique motivé principalement par une prise de conscience écologique. Ces travaux de thèse pourront fournir des pistes de réflexion à un développement économique alternatif pour mon pays et pourquoi pas, faire des cyanobactéries diazotrophes marines la source d'un futur secteur économique porteur pour la Nouvelle-Calédonie participant ainsi à « l'après Nickel ».

Références bibliographiques

- Agawin NSR, Benavides M, Busquets A, Ferriol P, Stal LJ and Arístegui J. (2014). Dominance of unicellular cyanobacteria in the diazotrophic community in the Atlantic Ocean. *Limnology and Oceanography* **59**: 623–637.
- Aminot A and Kérouel R. (2007). *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines : Méthodes En Flux Continu*. Ifremer Ed. Méthodes d'analyse En Milieu Marin. Ifremer.
- Ansel JL, Lupo E, Mijouin L, Guillot S, Butaud JF, Ho R, Lecellier G, Raharivelomanana P and Pichon C. (2016). Biological Activity of Polynesian *Calophyllum inophyllum* Oil Extract on Human Skin Cells. *Planta Medica* **82**: 961–966.
- Ariede MB, Candido TM, Lucia A, Jacome M, Valéria M, Velasco R, Carlos J, Carvalho M De and Rolim A. (2017). Cosmetic attributes of algae - A review. *Algal Research* **25**: 483–487.
- Arrigo KR. (2005). Marine microorganisms and global nutrient cycles. *Nature* **437**: 349–355.
- Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M (2010). Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiology* **10**:285.
- Balazova T, Makovcova J, Sedo O, Slany M, Faldyna M and Zdrahal Z. (2014). The influence of culture conditions on the identification of Mycobacterium species by MALDI-TOF MS profiling. *Federation of European Microbiological Societies* 1–8.
- Baranyai M, Szabolcs J and Toth G. (1976). A ¹³C NMR study of monocys zeaxanthins and monocis capsorubins. *Tetrahedron* 3–6.
- Barbano D, Diaz R, Zhang L, Sandrin T and Gerken H. (2015). Rapid Characterization of Microalgae and Microalgae Mixtures Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *PLoS ONE*, 1–13.
- Barbuddhe SB, Maier T, Schwarz G, Kostrzewa M, Hof H, Domann E, Chakraborty T, Hain T (2008). Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* **74** :5402-5407.
- Baumann S, Ceglarek U, Fiedler GM, Lembcke J, Leichtle A, Thiery J (2005). Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **51** :973-980.
- Beal CM, Gerber LN, Supis T, Phromkunth W, Kiron V, Granados J, Archibald I, Greene CH and Huntley ME. (2018). Marine microalgae commercial production improves sustainability of global fisheries and aquaculture. *Scientific Reports* **8**: 1–8.
- Becker E.W., 2003. Microalgae in Human and Animal Nutrition. In A. Richmond (Ed.), *Handbook of Microalgal Culture* 312–351.
- Benavides M, Martias C, Elifantz H, Berman-Frank I, Dupouy C and Bonnet S. (2018). Dissolved organic matter influences N₂ Fixation in the New Caledonian Lagoon (Western

- Tropical South Pacific). *Frontiers in Marine Science* **5**.
- Benavides M, Moisander P, Berthelo, H, Dittmar T, Grosso O, and Bonnet S. (2015). Mesopelagic N₂ fixation related to organic matter composition in the Solomon and Bismarck Seas (Southwest Pacific). *PLoS ONE* **10**: 1-19.
- Benavides M and Voss M. (2015). Five decades of N₂ fixation research in the North Atlantic Ocean. *Frontiers in Marine Science* **2**: 1–20.
- Bentzon-Tilia M, Severin I, Hansen LH, and Riemann L. (2015) Genomics and ecophysiology of heterotrophic nitrogen-fixing bacterial isolated from estuarine surface water. *Am. Soc. Microbiol.* **6**: 1–11.
- Bergen M von, Eidner A, Schmidt F, Murugaiyan J, Wirth H, Binder H, Maier T and Roesler U. (2009). Identification of harmless and pathogenic algae of the genus *Prototheca* by MALDI-MS. *Prot. Clin. Appl.* **3**: 774–784.
- Bergman B. (2001). Nitrogen-fixing cyanobacteria in tropical oceans , with emphasis on the Western Indian Ocean. *South African Journal of Botany* **67**: 426–432.
- Bergman B, Sandh G, Lin S, Larsson J and Carpenter EJ. (2012). *Trichodesmium* – a widespread marine cyanobacterium with unusual nitrogen fixation properties. *Federation of European Microbiological Societies* 1–17.
- Berman-frank I, Cullen JT, Sherrell RM and Falkowski PG. (2001). Iron availability , cellular iron quotas , and nitrogen fixation in *Trichodesmium* **46**: 1249–1260.
- Berman-frank I, Quigg A, Finkel ZV, Irwin AJ, Haramaty L. (2007). Nitrogen-fixation strategies and Fe requirements in cyanobacteria. *Limnol. Oceanogr.* **52**: 2260–2269.
- Berman-Frank I, Lundgren P and Falkowski P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology* **154**: 157–164.
- Berthelot H, Benavides M, Moisander PH, Grosso O and Bonnet S. (2017). High-nitrogen fixation rates in the particulate and dissolved pools in the Western Tropical Pacific (Solomon and Bismarck Seas). *Geophysical Research Letters* **44**: 8414–8423.
- Berthelot H, Moutin T, L’Helguen S, Leblanc K, Hélias S, Grosso O, Leblond N, Charrière B and Bonnet S. (2015). Dinitrogen fixation and dissolved organic nitrogen fueled primary production and particulate export during the VAHINE mesocosm experiment (New Caledonia lagoon). *Biogeosciences* **12**: 4099–4112.
- Biddanda B and Benner R. (1997). Carbon , nitrogen , and carbohydrate fluxes during the production of particulate and dissolved organic matter by marine phytoplankton. *Lirmol. Oceanogr.* **42**: 506–518.
- Bidigare RR, Schofield OM and Prézelin BB. (1989). Influence of zeaxanthin on quantum yield of photosynthesis of *Synechococcus* clone WH7803 (DC2). *Marine Ecology Progress Series* **56**: 177–88.
- Biegala I and Raimbault P. (2008). High abundance of diazotrophic picocyanobacteria (<3 µm) in a Southwest Pacific coral lagoon. *Aquatic Microbial Ecology* **51**: 45–53.
- Blain S, Bonnet S, Guieu C (2008) Dissolved iron distribution in the tropical and subtropical South Eastern Pacific. *Biogeosciences* **5**:269–280.
- Blank CE. (2004). Evolutionary timing of the origins of mesophilic sulphate reduction and

- oxygenic photosynthesis: a phylogenomic dating approach. *Geobiology* **2**: 1–20.
- Bloch J and Tardieu-guigues E. (2014). Marine biotechnologies and synthetic biology , new issues for a fair and equitable profit-sharing commercial use. *Marine Genomics* **17**: 79–83.
- Block MA, Douce R, Joyard J and Rolland N. (2007). Chloroplast envelope membranes: A dynamic interface between plastids and the cytosol. *Photosynthesis Research* **92**: 225–244.
- Bombar D, Moisaner PH, Dippner JW and Foster RA. (2011). Distribution of diazotrophic microorganisms and *nifH* gene expression in the Mekong River plume during intermonsoon. *Marine Ecology Progress Series* **424**: 39–52.
- Bonnet S, Berthelot H, Turk-Kubo K, Cornet-Barthaux V, Fawcett S, Berman-Frank I, Barani A, et al. (2016). Diazotroph derived nitrogen supports diatom growth in the South West Pacific: A quantitative study using nanoSIMS. *Limnology and Oceanography* **61**: 1549–1562.
- Bonnet, S., Dekaezemacker, J., Turk-Kubo, K. a, Moutin, T., Hamersley, R. M., Grosso, O., Zehr, J. P. and Capone, D. G. (2013). Aphotic N₂ fixation in the Eastern Tropical South Pacific Ocean., *PLoS One*, **8**.
- Bonnet S, Biegala IC, Dutrieux P, Slemmons LO and Capone DG. (2009). Nitrogen fixation in the western equatorial Pacific: Rates, diazotrophic cyanobacterial size class distribution, and biogeochemical significance. *Global Biogeochemical Cycles* **23**: 1–13.
- Bonnet S, Caffin M, Berthelot H, Grosso O, Benavides M, Helias-Nunige S, Guieu C, Stenegren M and Foster RA. (2018). In depth characterization of diazotroph activity across the Western Tropical South Pacific hot spot of N₂ fixation. *Biogeosciences* **15**: 4215–4232.
- Bonnet S, Caffin M, Berthelot H and Moutin T. (2017). Hot spot of N₂ fixation in the western tropical South Pacific pleads for a spatial decoupling between N₂ fixation and denitrification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**: 2800–2801.
- Bonnet S, Rodier M, Turk-Kubo KA, Germineaud C, Menkes C, Ganachaud A, Cravatte S, et al. (2015). Contrasted geographical distribution of N₂fixation rates and *nifH* phylotypes in the Coral and Solomon Seas (southwestern Pacific) during austral winter conditions. *Global Biogeochemical Cycles* **29**: 1874–1892.
- Borowitzka MA. (1995). Microalgae as sources of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Phycology* **7**: 3–15.
- Borowitzka MA and Borowitzka LJ. (1988) Micro-algal biotechnology, *Cambridge University Press*.
- Böttjer D, Dore JE, Karl DM, Letelier RM, Mahaffey C, Wilson ST, Zehr J and Church MJ. (2017). Temporal variability of nitrogen fixation and particulate nitrogen export at Station ALOHA. *Limnology and Oceanography* **62**: 200–216.
- Boudière L, Michaud M, Petroustos D, Rébeillé F, Falconet D, Bastien O, Roy S, et al. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* **1837**: 470–480.
- Brauer VS, Stomp M, Rosso C, Beusekom SAM Van, Emmerich B, Stal LJ and Huisman J. (2013). Low temperature delays timing and enhances the cost of nitrogen fixation in the

- unicellular cyanobacterium Cyanothece. *ISME Journal* **7**: 2105–2115.
- Breitbarth E, Oschlies A, Laroche J. (2007). Physiological constraints on the global distribution of *Trichodesmium*? effect of temperature on diazotrophy. *Biogeosciences* **4**: 53–61.
- Broady PA and Kibblewhite AL. n.d. Morphological characterization of Oscillatoriales (Cyanobacteria) from Ross Island and southern Victoria Land, Antarctica. *Antarctic Science* **3**: 35–45.
- Burford MA, Rothlisberg PC and Wang Y. (1995). Phytoplankton species and biomass in the Gulf of Carpentaria, Australia. *Marine Ecology Progress Series* **118**: 255–266.
- Burja AM, Abou-mansour E, Banaigs B, Payri C and Burgess JG. (2002). Culture of the marine cyanobacterium, *Lyngbya majuscula* (Oscillatoriaceae), for bioprocess intensified production of cyclic and linear lipopeptides. *Journal of Microbiological Methods* **48**: 207–219.
- Burja AM, Banaigs B, Abou-mansour E, Grant J, Wright PC, Bellevaux A De, Neucha C- and Chimie I De. (2001). Marine cyanobacteria - a prolific source of natural products **57**: 9347–9377.
- C. Kaufmann; D. Ziegler; F. Schaffner; S. Carpenter; V. Pfluger; A. Mathis. (2011). Evaluation of matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry for characterization of *Culicoides nubeculosus* biting. *Medical and Veterinary Entomology* **25**: 32–38.
- Cabello AM, Cornejo-Castillo FM, Raho N, Blasco D, Vidal M, Audic S, Vargas C De, Latasa M, Acinas SG and Massana R. (2015). Global distribution and vertical patterns of a prymnesiophyte-cyanobacteria obligate symbiosis. *ISME Journal* **10**: 693–706.
- Caffin M, Moutin T, Ann Foster R, Bouruet-Aubertot P, Michelangelo Doglioli A, Berthelot H, Guieu C, et al. (2018a). N₂ fixation as a dominant new N source in the western tropical South Pacific Ocean (OUTPACE cruise). *Biogeosciences* **15**: 2565–2585.
- Caffin M, Berthelot H, Cornet-barthaux V, Barani A and Bonnet S. (2018b). Transfer of diazotroph-derived nitrogen to the planktonic food web across gradients of N₂ fixation activity and diversity in the western tropical South Pacific Ocean. *Biogeosciences* **15**: 3795–3810.
- Campbell JW and Cronan JE. (2001). Bacterial fatty acid biosynthesis: targets for antibacterial drug discovery. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 305–332.
- Capone DG, Burns JA, Montoya JP, Subramaniam A, Mahaffey C, Gunderson T, Michaels AF and Carpenter EJ. (2005). Nitrogen fixation by *Trichodesmium* spp.: An important source of new nitrogen to the tropical and subtropical North Atlantic Ocean. *Global Biogeochemical Cycles* **19**: 1–17.
- Capone DG, Zehr JP, Paerl HW, Bergman B and Carpenter EJ. (1997). A Globally Significant Marine Cyanobacterium. *Science* **276**: 1221-1229.
- Capper A, Cruz-rivera E, Paul VJ and Tibbetts IR. (2006). Chemical deterrence of a marine cyanobacterium against sympatric and non-sympatric consumers. *Hydrobiologia* **553**: 319–326.
- Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, Dauphin B, Beretti J, Ferroni A, Gutmann L and Nassif X. (2011). MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in

- clinical microbiology laboratory. *Clinical Biochemistry* **44**: 104–109.
- Carpenter EJ and Price Iv CC. (1977). Nitrogen fixation , distribution , and production of *Oscillatoria* spp . in the western Sargasso and Caribbean Seas. *Limnology and Oceanography* **22**.
- Carpenter EJ and Roenneberg T. (1995). The marine plankton measurements in the SW Atlantic Ocean. *Marine Ecology Progress Series* **118**: 267–273.
- Challouf R, Trabelsi L, Dhieb R Ben, Abed O El, Yahia A, Ammar J Ben, Omran H and Ouada H Ben. (2011). Evaluation of cytotoxicity and biological activities in extracellular polysaccharides released by cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Brazilian archives of biology and technology* **54**: 831–838.
- Chien YT and Zinder SH. (1996). Cloning, functional organization, transcript studies, and phylogenetic analysis of the complete nitrogenase structural genes (*nifHDK2*) and associated genes in the archaeon *Methanosarcina barkeri* 227. *Journal of Bacteriology* **178**: 143–148.
- Chompoo J, Upadhyay A, Fukuta M and Tawata S. (2012). Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**: 1.
- Chrapusta E, Kaminski A, Duchnik K, Bober B, Adamski M and Bialczyk J. (2017). Mycosporine-like amino acids : potential health and beauty ingredients. *Marine Drugs* **15**: 1–29.
- Church MJ, Jenkins BD, Karl DM and Zehr JP. (2005). Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Stn ALOHA in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **38**: 3–14.
- Church MJ, Mahaffey C, Letelier RM, Lukas R, Zehr JP and Karl DM. (2009). Physical forcing of nitrogen fixation and diazotroph community structure in the North Pacific subtropical gyre. *Global Biogeochemical Cycles* **23**: 19.
- Church MJ, Jenkins BD, Karl DM and Zehr JP. (2005). Vertical distributions of nitrogen-fixing phylotypes at Stn ALOHA in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Aquatic Microbial Ecology* **38**: 3–14.
- Church MJ, Short CM, Jenkins BD, Karl DM and Zehr JP. (2005). Temporal patterns of nitrogenase gene (*nifH*) expression in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5362–5370.
- Ciais P, Sabine C, Bala G, Bopp L, Brovkin V, Canadell J, Chhabra A, et al. (2013). Carbon and Other Biogeochemical Cycles in : Climate change 2013 : the physical science basis 6. *Panel Clim. Chang.*, 465–570.
- Clément, G., Giddey, G., and Menzi, R. (1967). Amino acid composition and nutritive value of the alga *Spirulina maxima*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **18**: 497–501.
- Codd GA. (1995). Cyanobacterial toxins : occurrence , properties and biological significance. *Water Science and Technology* **32**: 149–156.
- Couteau C and Coiffard L. (2018). Microalgal Application in Cosmetics. *Microalgae in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc.
- Crossay T, Antheau C, Redecker D, Bon L, Chedri N, Guentas L, Cavaloc Y and Amir H.

- (2017). New method for the identification of arbuscular mycorrhizal fungi by proteomic-based biotyping of spores using MALDI-TOF-MS. *Scientific Reports* **7**: 1–16.
- Dabundo R, Lehmann MF, Treibergs L, Tobias CR, Altabet MA, Moisaner PH and Granger J. (2014). The contamination of commercial $^{15}\text{N}_2$ gas stocks with ^{15}N -labeled nitrate and ammonium and consequences for nitrogen fixation measurements. *PLoS ONE* **9**.
- Dangeard, P. (1940) Sur une algue bleue alimentaire pour l'homme: *Arthrospira platensis* (Nordst.). *Gomont Actes Soc Linn.*
- Dekaezemacker J and Bonnet S. (2011). Sensitivity of N_2 fixation to combined nitrogen forms (NO_3^- and NH_4^+) in two strains of the marine diazotroph *Crocospaera watsonii* (Cyanobacteria) **438**: 33–46.
- Dekaezemacker J, Bonnet S, Grosso O, Moutin T, Bressac M and Capone DG. (2013). Evidence of active dinitrogen fixation in surface waters of the eastern tropical South Pacific during El Niño and la Niña events and evaluation of its potential nutrient controls. *Global Biogeochemical Cycles* **27**: 768–779.
- Deng DG, Xie P, Zhou Q, Yang H and Guo LG. (2007). Studies on temporal and spatial variations of phytoplankton in lake Chaohu. *Journal of Integrative Plant Biology* **49**: 409–418.
- Dieckmann R, Helmuth R, Erhard M, Malorny B (2008). Rapid classification and identification of *Salmonellae* at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* **74** :7767-7778.
- Dittmann E, Gugger M, Sivonen K and Fewer DP. (2015). Natural Product Biosynthetic Diversity and Comparative Genomics of the Cyanobacteria. *Trends in Microbiology* **23**: 642–652.
- Dore JE, Brum JR, Tupas L and Karl DM. (2002). Seasonal and interannual variability in sources of nitrogen supporting export in the oligotrophic subtropical North Pacific Ocean. *Limnol. Oceanogr.* **47**: 1595–1607.
- Dron, A., Rabouille, S., Claquin, P., Le Roy, B., Talec, A. and Sciandra, A.: Light-dark (12:12) cycle of carbon and nitrogen metabolism in *Crocospaera watsonii* WH8501: relation to the cell cycle., *Environ. Microbiol.* **14** : 967–981.
- Dugdale, R. C., Goering, J. J. and Ryther, J. H. (1964). High nitrogen fixation rates in the Sargasso Sea and the Arabian Sea. *Limnol. Ocean* **9**: 507–510.
- Dugdale, R. C., Menzel, D. W. and Ryther, J. H. (1961). Nitrogen fixation in the Sargasso Sea, *Deep Sea Res.* **7**:298–300.
- Dunne JP, Sarmiento JL and Gnanadesikan A. (2007). A synthesis of global particle export from the surface ocean and cycling through the ocean interior and on the seafloor. *Global Biogeochemical Cycles* **21**: 1–16.
- Dupouy C, Benielli-Gary D, Neveux J, Dandonneau Y and Westberry TK. (2011). An algorithm for detecting *Trichodesmium* surface blooms in the South Western Tropical Pacific. *Biogeosciences* **8**: 3631–3647.
- Dupouy, C, Neveux J, Subramaniam A, Mulholland MR, Montoya JP, Campbell L, Carpenter EJ, Capone DG (2000). Satellite captures *Trichodesmium* blooms in the southwestern

- tropical Pacific. *Eos* **81**: 15–16.
- Dupouy C, Dirberg G, Tenorio Barbosa M, Neveux J and Bouteiller A Le. (2004). Surveillance des *Trichodesmium* autour de la Nouvelle-Calédonie, du Vanuatu, de Fidji et de Tonga (1998-2004). *Archives sciences de la mer oceanographie*.
- Dupouy C, Petit M and Dandonneau Y. (1988). Satellite detected cyanobacteria bloom in the southwestern tropical Pacific Implication for oceanic nitrogen fixation. *Int. J. Remote Sensing* **9**: 389–396.
- Dupouy C., Lefèvre J., Wattelez G., Martias C., Andreoli R, Lille D., 2018. Suivi par satellite de l'environnement des lagons et récifs. In Payri Claude (ed.), Moatti Jean-Paul (pref.). Nouvelle-Calédonie : archipel de corail, Marseille (FRA), Nouméa : IRD, Solaris. 33-38.
- Emami K, Hack E, Nelson A, Brain CM, Lyne FM, Mesbahi E, Day JG and Caldwell GS. (2015). Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection : An example using *Dunaliella*. *Nature Publishing Group* **5**: 1–15.
- Englert G, Noack K, Broger EA, Glinz E, Vecchil M, Zell R, Ag FHR and Basel CH. (1991). Synthesis, isolation, and full spectroscopic characterization of eleven (2)-isomers of (3R,3'R)-Zeaxanthin. *Helvetica chimica acta* **74**.
- Eppley RW and Peterson BJ. (1979). Particulate organic matter flux and planktonic new production in the deep ocean. *Nature* **282**: 677–680.
- Falch BS, König GM, Wright AD, Sticher O, Angerhofer CK, Pezznto JM and Bachmann H. (1995). Biological Activities of Cyanobacteria: Evaluation of Extracts and Pure Compounds. *Planta Med* **61**: 321–328.
- Falcón LI, Pluvinage S and Carpenter EJ. (2005). Growth kinetics of marine unicellular N₂ - fixing cyanobacterial isolates in continuous culture in relation to phosphorus and temperature. *Marine Ecology Progress Series* **285**: 3–9.
- Falkowski, P. G. (1983). Enzymology of nitrogen assimilation. In J. Carpenter and D. G. Capone [eds.], 839–868.
- Fanning KA and Pilson MEQ. (1973). On the spectrophotometric determination of dissolved silica in natural waters. *Analytical Chemistry* **45**: 136–140.
- Faure V, Pinazo C, Torréton J and Douillet P. (2010). Modelling the spatial and temporal variability of the SW lagoon of New Caledonia II : Realistic 3D simulations compared with in situ data. *Marine Pollution Bulletin* **61**: 480–502.
- Fay, P., Stewart, W. D. P., Walsby, A. E. and Fogg GE. (1968). Is the Heterocyst the Site of Nitrogen Fixation in Blue-green Algae ? *Nature* **220**: 1–3.
- Fernandez, C., Farías, L. and Ulloa, O. (2011) Nitrogen fixation in denitrified marine waters., *PLoS One*, **6**.
- Fernandez C, Gonzalez ML, Munoz C, Molina V and Farias L. (2015). Temporal and spatial variability of biological nitrogen fixation off the upwelling system of central Chile (35–38.58°S). *Journal of Geophysical Research: Oceans* **120**: 3330–3349.
- Fiedor J and Burda K. (2014). Potential Role of Carotenoids as Antioxidants in Human Health and Disease. *Nutrients*, 466–488.
- Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT and Fallowski P. (1998). Primary Production of the

- Biosphere : Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* **281**: 237–241.
- Foster R a, Kuypers MMM, Vagner T, Paerl RW, Musat N and Zehr JP. (2011). Nitrogen fixation and transfer in open ocean diatom-cyanobacterial symbioses. *The ISME Journal* **5**: 1484–1493.
- Foster RA, Carpenter EJ and Bergman B. (2006). Unicellular cyanobionts in open ocean dinoflagellates , radiolarians , and tintinnids : ultrastructural characterization and immunolocalization of phycoerythrin and nitrogenase. *J. Phycol* **463**: 453–63.
- Freiwald A, Sauer S (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols* **4** :732-742.
- Fu F-X, Zhang Y, Bell PRF and Hutchins DA. (2005). Phosphate uptake and growth kinetics of *Trichodesmium* (cyanobacteria) isolates from the north atlantic ocean and the great barrier reef, australia. *J. Phycol* **73**: 62–73.
- Fu F, Yu E, Garcia N, Gale J, Luo Y, Webb E and Hutchins D. (2014). Differing responses of marine N₂ fixers to warming and consequences for future diazotroph community structure. *Aquatic Microbial Ecology* **72**: 33–46.
- Gallon JR. (1992). Reconciling the Incompatible: N₂ Fixation and O₂. *New Phytologist* **122**: 571–609.
- Galloway JN, Dentener FJ, Capone DG, Boyer EW, Howarth RW, Seitzinger SP, Asner GP, et al. (2004). Nitrogen cycles: Past, present, and future. *Biogeochemistry* **70**: 153–226.
- Gao K. (1998). Chinese studies on the edible blue-green alga , Nostoc flagelliforme : a review. *Journal Of Applied Phycology* **1**: 37–49.
- Garcia N, Raimbault P and Sandroni V. (2007). Seasonal nitrogen fixation and primary production in the Southwest Pacific: Nanoplankton diazotrophy and transfer of nitrogen to picoplankton organisms. *Marine Ecology Progress Series* **343**: 25–33.
- Geethu V and Shamina M. (2018). Antioxidant activity of cyanobacterium *Nostoc spongiaeforme* C . Agardh ex Born . *J. Algal Biomass Utiln.* **9**: 26–30.
- Ghasemi Y, Yazdi MT, Shafiee A, Amini M, Shokravi S, Zarrini G, Ghasemi Y, et al. (2008). Parsiguine , A Novel Antimicrobial Substance from *Fischerella ambigua*. *Pharmaceutical Biology* **42**: 318–322.
- Giovannoni SJ, Delong EF, Schmidt TM and Pace NR. (1990). Tangential Flow Filtration and Preliminary Phylogenetic Analysis of Marine Picoplankton **56**: 2572–2575.
- Goodwin TW (1980). The biochemistry of carotenoids, 2nd edn, vol 1. *Plants. Chapman and Hall, London.*
- Großkopf T, Mohr W, Baustian T, Schunck H, Gill D, Kuypers MMM, Lavik G, Schmitz RA, Wallace DWR and Laroche J. (2012). Doubling of marine dinitrogen-fixation rates based on direct measurements. *Nature* **488**: 361–364.
- Gruber N. (2005). A bigger nitrogen fix. *Nature* **436**: 786–787.
- Gruber N. (2008). The Marine Nitrogen Cycle. *Microbe Magazine* **3**: 186–192.
- Guedes AC, Amaro HM, Barbosa CR, Pereira RD and Malcata FX. (2011). Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on

- eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International* **44**: 2721–2729.
- Guieu C, Bonnet S, Petrenko A, Menkes C, Chavagnac V, Desboeufs K, Maes C and Moutin T. (2018). Iron from a submarine source impacts the productive layer of the Western Tropical South Pacific (WTSP). *Scientific Reports* **8**: 1–9.
- Guillard, R. R. (1975). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In: Culture of marine invertebrate animals, *Springer*.
- Gunes S, Tamburaci S, Dalay MC and Gurhan ID. (2017). In vitro evaluation of *Spirulina platensis* extract incorporated skin cream with its wound healing and antioxidant activities. *Pharmaceutical Biology* **55**: 1824–1832.
- Gur CS, Erdogan DK, Onbasilar I, Atilla P and Cakar N. (2013). In vitro and in vivo investigations of the wound healing effect of crude *Spirulina* extract and C-phycoerythrin. *Journal of Medicinal Plants Research* **7**: 425–433.
- Gutierrez M, Suyama TL, Engene N, Wingerd JS and Matainaho T. (2008). Apratoxin D , a Potent Cytotoxic Cyclodepsipeptide from Papua New Guinea Collections of the Marine Cyanobacteria *Lyngbya majuscula* and *Lyngbya sordida*. *J. Nat. Prod.* **71**: 1099–1103.
- Hamed I. (2016). The Evolution and Versatility of Microalgal Biotechnology : A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 1–20.
- Hartmann EM, Durighello E, Pible O, Nogales B, Beltrametti F, Bosch R, Christie-oleza JA and Armengaud J. (2014). Marine Genomics Proteomics meets blue biotechnology : A wealth of novelties and opportunities. *Marine Genomics*.
- Hashimoto R, Watai H, Miyahara K and Sako Y. (2016). Spatial and temporal variability of unicellular diazotrophic cyanobacteria in the eastern Seto Inland Sea **82**: 459–471.
- Hénin C and Cresswell GR. (2005). Upwelling along the western barrier reef of New Caledonia. *Marine and Freshwater Research* **56**: 1005–1010.
- Henke BA, Turk-Kubo KA, Bonnet S and Zehr JP. (2018). Distributions and abundances of sublineages of the N₂-fixing cyanobacterium *Candidatus Atelocyanobacterium thalassa* (UCYN-A) in the New Caledonian coral lagoon. *Frontiers in Microbiology* **9**: 1–14.
- Hénin C and Cresswell GR. (2005). Upwelling along the western barrier reef of New Caledonia. *Marine and Freshwater Research* **56**: 1005–1010.
- Hensen V. (1887). Über die Bestimmung des Planktons oder des im Meere treibenden Materials an Pflanzen und Tieren. *Bet. Komm. Wiss. Unters. dr. Meere* **5**: 1-108.
- Hertzberg S, Liaaen-Jensen S and Siegelman HW. (1971). The carotenoids of blue-green algae. *Phytochemistry* **10**: 3121–3127.
- Hewson I, Moisander PH, Morrison AE and Zehr JP. (2007). Diazotrophic bacterioplankton in a coral reef lagoon: Phylogeny, diel nitrogenase expression and response to phosphate enrichment. *ISME Journal* **1**: 78–91.
- Hewson, I., Poretsky, R. S., Beinart, R. a, White, A. E., Shi, T., Bench, S. R., Moisander, P. H., Paerl, R. W., Tripp, H. J., Montoya, J. P., Moran, M. A. and Zehr, J. P.: In situ transcriptomic analysis of the globally important keystone N₂-fixing taxon *Crocospaera watsonii*., *ISME* **3**: 618–631.

- Hopkinson CS and Vallino JJ. (2005). Efficient export of carbon to the deep ocean through dissolved organic matter. *Nature* **433**: 715–717.
- Hossain MF, Ratnayake RR, Meerajini K and Wasantha Kumara KL. (2016). Antioxidant properties in some selected cyanobacteria isolated from fresh water bodies of Sri Lanka. *Food Science and Nutrition* **4**: 753–758.
- Howard JB and Rees DC. (2006). How many metals does it take to fix N₂? A mechanistic overview of biological nitrogen fixation. *PNAS* **103**: 17088–17093.
- Hsieh S, Tseng C, Lee Y, Kuo A, Sun C, Lin Y and Chen J. (2008). Highly Efficient Classification and Identification of Human Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF, 448–456.
- Hunt BP V, Bonnet S, Berthelot H, Conroy BJ, Foster RA and Pagano M. (2016). Contribution and pathways of diazotroph-derived nitrogen to zooplankton during the VAHINE mesocosm experiment in the oligotrophic New Caledonia lagoon. *Biogeochemistry* **13**: 3131–3145.
- Hwang T, Su Y, Chang H, Leu Y and Chung P. (2009). Suppression of superoxide anion and elastase release by C18 unsaturated fatty acids in human neutrophils. *Journal of Lipid Research* **50**: 1395–1409.
- Imanishi SY, Nakayama T, Asukabe H and Harada K. (2017). Application of MALDI Biotyper to cyanobacterial profiling. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **31**: 325–332.
- Imokawa G and Ishida K. (2015). biological mechanisms underlying the ultraviolet radiation-induced formation of skin wrinkling and sagging I: reduced skin elasticity , highly associated with enhanced dermal elastase activity , triggers wrinkling and sagging. *International Journal of Molecular Sciences* **16**: 7753–7775.
- Ismail MMS, El-Ayouty YM and Piercey-Normore MD. (2013). Antioxidants characterization in selected cyanobacteria. *Ann Microbiol* **64**: 1223–1230.
- Jabir T, Dhanya V, Jesmi Y, Prabhakaran MP, Saravanane N, Gupta GVM and Hatha AAM. (2013). Occurrence and distribution of a diatom-diazotrophic cyanobacteria association during a *trichodesmium* bloom in the southeastern arabian sea. *international journal of oceanography* **2013**.
- Jaki B, Orjala J, Heilmann J, Linden A, Vogler B and Sticher O. (2000). Novel Extracellular Diterpenoids with Biological Activity from the Cyanobacterium *Nostoc commune*. *J. Nat. Prod.* **63**: 339–343.
- Jaki B, Zerbe O, Heilmann J, Sticher O and Zu C-. (2001). Two Novel Cyclic Peptides with Antifungal Activity from the Cyanobacterium *Tolypothrix byssoidea* (EAWAG 195). *J. Nat. Prod.* **64**: 154–158.
- Janse I, Meima M, Kardinaal WEA and Zwart G. (2003). High-resolution differentiation of cyanobacteria by using rRNA-internal transcribed spacer denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**: 6634–6643.
- Janson S, Wouters J and Bergman B. (1999). Host specificity in the *Richelia*-diatom symbiosis revealed by *hetR* gene sequence analysis. *Environmental Microbiology* **1**: 431–438.
- Jarrige, F, Radok, R, Krause, G, Rual, P (1975). Courants dans le lagon de Nouméa, Nouvelle Calédonie. *Rapp. ORSTOM (Nouméa)*, 6 pp.

- Jiang Z, Li H, Zhai H, Zhou F, Chen Q, Chen J, Zhang D and Yan X. (2018). Seasonal and spatial changes in *Trichodesmium* associated with physicochemical properties in East China Sea and southern Yellow Sea. *Journal of Geophysical Research: Biogeosciences* **123**: 509–530.
- Jickells TD, Buitenhuis E, Altieri K, Baker AR, Capone D, Duce RA, Dentener F, et al. (2017). A reevaluation of the magnitude and impacts of anthropogenic atmospheric nitrogen inputs on the ocean. *Global Biogeochemical Cycles* **31**: 289–305.
- Kana TM. (1993). Rapid oxygen cycling in *Trichodesmium thiebautii*. *Limnology and Oceanography* **38**: 18–24.
- Kana TM, Darkangelo C, Hunt MD, Oldham JB, Bennett GE and Cornwell JC. (1994). Membrane Inlet Mass Spectrometer for Rapid Environmental Water Samples **66**: 4166–4170.
- Kanekiyo K, Lee J, Hayashi K, Takenaka H, Hayakawa Y, Endo S and Hayashi T. (2005). Isolation of an Antiviral Polysaccharide, Nostoflan, from a Terrestrial Cyanobacterium, *Nostoc flagelliforme*. *J. Nat. Prod.* **68**: 1037–1041.
- Karl D, Letelier R, Tupas L, Dore J, Christian J and Hebel D. (1997). The role of nitrogen fixation in biogeochemical cycling in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* **388**: 533–538.
- Karl, D., Michaels, A. and Bergman, B. (2002). Dinitrogen fixation in the world's oceans.
- Karl, D. M., Letelier, R. M., Hebel, D. V, Bird, D. F. and Winn, C. D. (1992). *Trichodesmium* blooms and new nitrogen in the North Pacific Gyre, in *Marine Pelagic Cyanobacteria: Trichodesmium and other Diazotrophs*, edited by E. J. Carpenter, D. G. Capone, and J. G. Rueter, pp. 219–237, Kluwer Academic Publishers.
- Kaur IP, Kapila M and Agrawal R. (2007). Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Research Reviews* **6**: 271–288.
- Khachik F, Englert G, Daitch CE, Beecher GR, Tonucci LH and Lusby WR. (1992). Isolation and structural elucidation of the geometrical isomers of lutein and zeaxanthin in extracts from human plasma. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **582**: 153–166.
- Klawonn I, Lavik G, Böning P, Marchant HK, Dekaezemacker J, Mohr W and Ploug H. (2015). Simple approach for the preparation of ¹⁵⁻¹⁵N₂-enriched water for nitrogen fixation assessments: Evaluation, application and recommendations. *Frontiers in Microbiology* **6**: 1–11.
- Knapp AN and Campagna SR. (2012). The sensitivity of marine N₂ fixation to dissolved inorganic nitrogen **3**: 1–14.
- Knapp AN, Casciotti KL, Berelson WM, Prokopenko MG and Capone DG. (2016). Low rates of nitrogen fixation in eastern tropical South Pacific surface waters. *PNAS* 1–6.
- Knapp AN, McCabe K, Grosso O, Leblond N, Moutin T and Bonnet S. (2018). Distribution and rates of nitrogen fixation in the tropical southwest Pacific Ocean constrained by nitrogen isotope budgets **3**: 2619–2628.
- Komárek, J. and Komárková-Legnerová, J. (1992), Variability of some planktic gomphosphaerioid cyanoprocaroyotes in northern lakes. *Nordic Journal of Botany*, **12**: 513-

- Komarek J. (2010). Recent changes (2008) in cyanobacteria taxonomy based on a combination of molecular background with phenotype and ecological consequences (genus and species concept). *Hydrobiologia* **639**: 245–259.
- Komarek J, Kastovsky J, Mares J and Johansen JR. (2014). Taxonomic classification of cyanoprokaryotes (cyanobacterial genera) 2014, using a polyphasic approach. *Preslia* **86**: 295–335.
- Kozdeba M, Borowczyk J, Zimola E, Wasylewski M, Dziga D, Madeja Z and Drukala J. (2014). Toxicon Microcystin-LR affects properties of human epidermal skin cells crucial for regenerative processes Marcin Kozde. *Toxicon* **80**: 38–46.
- Krupke A, Musat N, LaRoche J, Mohr W, Fuchs BM, Amann RI, Kuypers MMM and Foster RA. (2013). In situ identification and N₂ and C fixation rates of uncultivated cyanobacteria populations. *Systematic and Applied Microbiology* **36**: 259–271.
- Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870–1874.
- Küpper H, Šetlík I, Seibert S, Prášil O, Šetlikova E, Strittmatter M, Levitan O, et al. (2008). Iron limitation in the marine cyanobacterium *Trichodesmium* reveals new insights into regulation of photosynthesis and nitrogen fixation. *New Phytologist* **179**: 784–798.
- Kustka A, Sañudo-wilhelmy S, Carpenter EJ and Raven JA. (2003). A revised estimate of the iron use efficiency of nitrogen fixation, with special reference to the marine cyanobacterium *Trichodesmium* spp. (cyanophyta). *J. Phycol* **25**: 12–25.
- Kwan JC, Taori K, Paul VJ and Luesch H. (2009). Lyngbyastatins 8-10, elastase inhibitors with cyclic depsipeptide scaffolds isolated from the marine cyanobacterium *Lyngbya semiplena*. *Marine Drugs* **7**: 528–538.
- Lademann J, Meinke MC, Sterry W and Darvin ME. (2011). Carotenoids in human skin. *Experimental Dermatology* **20**: 377–382.
- Laguerre M, Lecomte J and Villeneuve P. (2007). Progress in lipid research evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation : existing methods , new trends and challenges. *Progress in Lipid Research* **46**: 244–282.
- Langlois RJ, Hümmer D and LaRoche J. (2008). Abundances and distributions of the dominant *nifH* phylotypes in the Northern Atlantic Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **74**: 1922–1931.
- Langlois RJ, LaRoche J and Raab P a. (2005). diazotrophic diversity and distribution in the tropical and subtropical atlantic ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7910–7919.
- Langlois RJ, Mills MM, Ridame C, Croot P and LaRoche J. (2012). Diazotrophic bacteria respond to Saharan dust additions. *Marine Ecology Progress Series* **470**: 1–14.
- Laroche J and Breitbarth E. (2005). Importance of the diazotrophs as a source of new nitrogen in the ocean. *Journal of Sea Research* **53**: 67–91.
- Larsson J, Nylander JAA and Bergman B. (2011). Genome fluctuations in cyanobacteria reflect evolutionary , developmental and adaptive traits. *BMC Evolutionary Biology* **11**.

- Lay JO (2001). MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria. *Mass Spectrometry Reviews* **20**:172-194.
- Lee H, Woon S, Cho K, Kim K, Cha I, June K, Seon H, et al. (2015). Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. *Talanta* **132**: 630–634.
- Lefranc M, Thénot A, Lepère C and Debroas D. (2005). Genetic diversity of small eukaryotes in lakes differing by their trophic status. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 5935–5942.
- Lemmerman E (1905) Sandwich-islen. Ergebnisse einer reise nach dem Pacific. H. Schauinsland 1896/97. *Bot Jahrb Syst Pflanzengesch Planzengeogr* **34**:607–663.
- Lenes JM and Heil CA. (2010). A historical analysis of the potential nutrient supply from the N₂ fixing marine cyanobacterium *Trichodesmium* spp. to *Karenia brevis* blooms in the eastern Gulf of Mexico. *Journal of Plankton Research* **32**: 1421–1431.
- Li H, Xu J, Liu Y, Ai S, Qin F, Li Z, Zhang H and Huang Z. (2011). Antioxidant and moisture-retention activities of the polysaccharide from *Nostoc commune*. *Carbohydrate Polymers* **83**: 1821–1827.
- Linington RG, Edwards DJ, Shuman CF, Mcphail KL, Matainaho T and Gerwick WH. (2008). Symplocamide A, a Potent Cytotoxin and Chymotrypsin Inhibitor from the Marine Cyanobacterium *Symploca* sp. *J. Nat. Prod.* **71**: 22–27.
- Lopez-Garcia P, Rodriguez-Valera F, Pedros-Alio C and Moreira D. (2001). Unexpected diversity of small eukaryotes in deep-sea Antarctic plankton. *Nature* **409**: 603–7.
- Luo Y-W, Doney SC, Anderson LA, Benavides M, Berman-Frank I, Bode A, Bonnet S, et al. (2012). Database of diazotrophs in global ocean: abundance, biomass and nitrogen fixation rates. *Earth System Science Data* **4**: 47–73.
- Luo YW, Lima ID, Karl DM, Deutsch CA and Doney SC. (2014). Data-based assessment of environmental controls on global marine nitrogen fixation. *Biogeosciences* **11**: 691–708.
- Maier T, Klepel S, Renner U, Kostrzewa M (2006). Fast and reliable MALDI-TOF MS based microorganism identification. *Nature Methods* **3**.
- Man-aharonovich D, Kress N, Zeev EB, Berman-frank I and Béjà O. (2007). Molecular ecology of *nifH* genes and transcripts in the eastern Mediterranean Sea. *Environmental Microbiology* **9**: 2354–2363.
- Mari Rode T, Berget I, Langsrud S, Møretrø T and Holck A. (2009). MALDI-TOF mass spectrometry for quantitative gene expression analysis of acid responses in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Microbiological Methods* **78**: 86–93.
- Martínez-Francés E and Escudero-Onate C. (2018). Cyanobacteria and microalgae in the production of valuable bioactive compounds. *IntechOpen* **12**: 11–17.
- Mazzeo MF, Sorrentino A, Gaita M, Cacace G, Stasio M Di, Facchiano A, Comi G, Malorni A and Siciliano RA. (2006). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry for the Discrimination of Food-Borne Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 1180–1189.
- Mehner C, Müller D, Kehraus S, Hautmann S, Gütschow M and König GM. (2008). New peptolides from the cyanobacterium *Nostoc insulare* as selective and potent inhibitors of

- human leukocyte elastase. *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology* **9**: 2692–2703.
- Mellmann A, Mühling J (2013). MALDI-TOF mass spectrometry-based microbial identification. In: Tang Y-W, Stratton CW (eds) *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology*. Springer US 187-207.
- Messer LF, Brown M V., Furnas MJ, Carney RL, McKinnon AD and Seymour JR. (2017). Diversity and activity of diazotrophs in great barrier reef surface waters. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1–16.
- Messer LF, Mahaffey C, Robinson CM, Jeffries TC, Baker KG, Isaksson JB, Ostrowski M, Doblin MA, Brown M V. and Seymour JR. (2015). High levels of heterogeneity in diazotroph diversity and activity within a putative hotspot for marine nitrogen fixation. *ISME Journal* **10**: 1499–1513.
- Milligan AJ, Berman-Frank I, Gerchman Y, Dismukes GC and Falkowski PG. (2007). Light-dependent oxygen consumption in nitrogen-fixing Cyanobacteria plays a key role in nitrogenase protection. *Journal of Phycology* **43**: 845–852.
- Mo S, Kronic A, Chlipala G and Orjala J. (2009). Antimicrobial Ambiguine Isonitriles from the Cyanobacterium *Fischerella ambigua*. *J. Nat. Prod.* **72**: 894–899.
- Mohr W, Großkopf T, Wallace DWR and LaRoche J. (2010). Methodological underestimation of oceanic nitrogen fixation rates. *PLoS ONE* **5**: 1–7.
- Moisander PH, Beinart RA, Hewson I, White AE, Johnson KS, Carlson CA, Montoya JP and Zehr JP. (2010). Unicellular cyanobacterial distributions broaden the oceanic N₂ fixation domain. *Science* **327**: 1512–1514.
- Moisander PH, Beinart RA, Voss M and Zehr JP. (2008). Diversity and abundance of diazotrophic microorganisms in the South China Sea during intermonsoon. *ISME Journal* **2**: 954–967.
- Moisander PH, Serros T, Paerl RW, Beinart RA and Zehr JP. (2014). Gammaproteobacterial diazotrophs and *nifH* gene expression in surface waters of the South Pacific Ocean. *ISME Journal* **8**: 1962–1973.
- Moisander PH, Zhang R, Boyle EA, Hewson I, Montoya JP and Zehr JP. (2012). Analogous nutrient limitations in unicellular diazotrophs and *Prochlorococcus* in the South Pacific Ocean. *ISME Journal* **6**: 733–744.
- Montoya JP, Voss M, Kahler P and Capone DG. (1996). A simple , high-precision , high-sensitivity tracer assay for N₂ fixation . *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 986–993.
- Montoya JP, Holl C, Zehr JP, Hansen A, Villareal T, and Capone DG. (2004) High rates of N₂ fixation by unicellular diazotrophs in the oligotrophic Pacific Ocean. *Nature* **430**: 1027–1032
- Mooberry SLM, Eal RML, Inley TLT, Uesch HL, Oore REM and Orbett THC. (2003). The molecular pharmacology of symplostatin 1 : a new antimitotic dolastatin 10 analog. *Int. J. Cancer* **521**: 512–521.
- Moore CM, Mills MM, Arrigo KR, Berman-Frank I, Bopp L, Boyd PW, Galbraith ED, et al. (2013). Processes and patterns of oceanic nutrient limitation. *Nature Geoscience* **6**: 701–

- Mourelle M, Gómez C and Legido J. (2017). The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics* **4**: 46.
- Moutin T, Broeck N Van Den, Beker B and Dupouy C. (2005). Phosphate availability controls *Trichodesmium* spp . biomass in the SW Pacific Ocean. *Marine Ecology Progress Series* **297**: 15–21.
- Moutin T, Karl D and Duhamel S. (2008). Phosphate availability and the ultimate control of new nitrogen input by nitrogen fixation in the tropical Pacific Ocean. *Biogeosciences* **5**: 95–109.
- Mulholland MR, Bernhardt PW, Blanco-Garcia JL, Mannino A, Hyde K, Mondragon E, Turk K, Moisaner PH and Zehr JP. (2012). Rates of dinitrogen fixation and the abundance of diazotrophs in North American coastal waters between Cape Hatteras and Georges Bank. *Limnology and Oceanography* **57**: 1067–1083.
- Mulholland MR. (2007). The fate of nitrogen fixed by diazotrophs in the ocean. *Biogeosciences* **4**: 37–51.
- Mulholland MR and Bernhardt PW. (2005). The effect of growth rate, phosphorus concentration, and temperature on N₂ fixation, carbon fixation, and nitrogen release in continuous cultures of *Trichodesmium* IMS101. *Limnology and Oceanography* **50**: 839–849.
- Mulholland MR, Flöge S, Carpenter EJ and Capone DG. (2002). Phosphorus dynamics in cultures and natural populations of *Trichodesmium* spp . *Marine Ecology Progress Series* **239**: 45–55.
- Mullin JB and Riley JP. (1955). The colorimetric determination of silicate with special reference to sea and natural waters. *Analytica Chimica Acta* **12**: 162–176.
- Mundt S, Kreitlow S and Jansen R. (2003). Fatty acids with antibacterial activity from the cyanobacterium *Oscillatoria redekei* HUB 051. *Journal of Applied Phycology* **15**: 263–67.
- Murray PR (2010). Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: usefulness for taxonomy and epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection* **16** :1626-1630.
- Murugaiyan J, Ahrholdt J, Kowbel V and Roesler U. (2011). Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of- flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus *Prototheca*. *Clin Microbiol Infec* **18**: 461–467.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB da and Kent J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**: 853–58.
- Najdenski HM, Gigova LG, Iliev II, Pilarski PS, Lukavský J, Tsvetkova I V., Ninova MS and Kussovski VK. (2013). Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria. *International Journal of Food Science and Technology* **48**: 1533–1540.
- Nei M. and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. *Oxford University Press, New York*.
- Neu HC. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science* **257**: 1064–1073.

- Neveux J, Tenório MMB, Jacquet S, Torrétion JP, Douillet P, Ouillon S, C Dupouy (2009). Chlorophylls and phycoerythrins as markers of environmental forcings on phytoplankton in the southwest lagoon of New Caledonia and oceanic adjacent area, *International J. Oceanography* 1-19.
- Neveux, J., Tenório, M., Dupouy, C., T. Villareal (2006). Spectral diversity of phycoerythrins and diazotrophs abundance in tropical South Pacific. *Limnology and Oceanography* **51**: 1689-1698.
- Nonnemann B, Tvede M and Bjarnsholt T. (2013). Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption / ionization time of flight mass spectrometry. *APMIS* **5**: 871–877.
- Nubel U, Garcia-pichel F and Muyzer G. (1997). PCR primers to amplify 16S rna genes from cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 3327–3332.
- Ohki K, Kamiya M, Honda D, Kumazawa S and Ki Ho K. (2008). Morphological and phylogenetic studies on unicellular diazotrophic cyanobacteria (cyanophytes) isolated from the the coastal waters around singapore . *J. Phycol* **44**: 142–151.
- Ohmori M and Ehira S. (2014). Chapter 7 Spirulina: an example of cyanobacteria as nutraceuticals 103–18.
- Ohta H, Awai K and Takamiya K. (2000). Glyceroglycolipids of photosynthetic organisms - Their biosynthesis and evolutionary origin. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology* **12**: 241–253.
- Okino T, Qi S, Matsuda H, Murakami M and Yamaguchi K. (1997). Nostopeptins A and B, elastase inhibitors from the cyanobacterium *Nostoc minutum*. *Journal of Natural Products* **60**: 158–161.
- Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Review of Microbiology* **40**:337-365.
- Ouillon S, Douillet P, Lefebvre JP, Gendre R Le, Jouon A, Bonneton P, Fernandez JM, et al. (2010). Circulation and suspended sediment transport in a coral reef lagoon: The south-west lagoon of New Caledonia. *Marine Pollution Bulletin* **61**: 269–296.
- Palus J, Dziubałtowska E, Stańczyk M, Lewińska D, Zalewski M and Wąsowicz W. (2007). Biomonitoring of cyanobacterial blooms in polish water reservoir and the cytotoxicity and genotoxicity of selected cyanobacterial extracts. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* **20**: 48–65.
- Parisi D, Magliulo M, Nanni P, Casale M, Forina M and Roda A. (2008). Analysis and classification of bacteria by matrix-assisted laser desorption / ionization time-of-flight mass spectrometry and a chemometric approach. *Anal Bioanal Chem* **391**: 2127–2134.
- Parwani L and Bhatnagar M. (2013). Antioxidant and iron-chelating activities of cyanobacterial exopolymers with potential for wound healing. *J Appl Phycol* **26**: 1473–1482.
- Paula Kiuru, M. Valeria D’Auria, Christian D. Muller, Päivi Tammela, Heikki Vuorela JY-K. (2014). Exploring Marine Resources for Bioactive Compounds. *Planta Med*, 1234–1246.
- Perez Gutierrez RM, Flores AM, Solis RV and Jimenez JC. (2008). Two new antibacterial norabietane diterpenoids from cyanobacteria , *Microcoleus lacustris*. *Japanese Society of Pharmacognosy* **62**: 328–331.

- Pietra E. (1990) *A Secret World : Natural Products of Marine Life*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland. 279.
- Pillaiyar T, Manickam M and Namasivayam V. (2017). Skin whitening agents : medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **32**: 403–425.
- Prinsep MR, Caplan FR, Moore RE, Patterson GML and Smith CD. (1992). Tolyporphin, a Novel Multidrug Resistance Reversing Agent from the Blue-Green Alga *Tolypothrix nodosa*. *J. Am. Chem. SOC* **114**: 385–387.
- Qiu J, Xiu Q, Yang C, Yang L and Li Y. (2001). Glyceroglycolipids from *Serratula strangulata*. *Phytochemistry* **58**: 1305–1309.
- Le Quéré C, Harrison S, Prentice C, Buitenhuis E, Aumont O, Bopp L, Claustrel H and Wolf-Gladrow D. (2016). Ecosystem dynamics based on plankton functional types for global ocean biogeochemistry models. *Global Change Biology* **11**: 2016–2040.
- Raimbault P and Garcia N. (2008). Evidence for efficient regenerated production and dinitrogen fixation in nitrogen-deficient waters of the South Pacific Ocean: Impact on new and export production estimates. *Biogeosciences* **5**: 323–338.
- Raveh A and Carmeli S. (2007). Antimicrobial ambiguines from the cyanobacterium *Fischerella* sp. collected in Israel. *Journal of Natural Products* **70**: 196–201.
- Reddy, K. J., Haskell, J. B., Sherman, D. M. and Sherman, L. A. (1993). Unicellular, aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria of the genus *Cyanothece*, *J. Bacteriol.* **175**: 1284–1292.
- Rennert B and Melzig MF. (2002). Free fatty acids inhibit the activity of *Clostridium histolyticum* collagenase and human neutrophil elastase. *Planta Medica* **68**: 767–769.
- Renugadevi K, Valli Nachiyar C, Sowmiya P and Sunkar S. (2018). Antioxidant activity of phycocyanin pigment extracted from marine filamentous cyanobacteria *Geitlerinema* sp TRV57. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **16**: 237–242.
- Richard D, Kefi K, Barbe U, Bausero P and Visioli F. (2008). Polyunsaturated fatty acids as antioxidants. *Pharmacological Research* **57**: 451–455.
- Richer de Forges B and Pascal M. (2008). La Nouvelle-Calédonie , un « point chaud » de la biodiversité mondiale gravement menacé par l ’ exploitation minière. *Le Journal de La Société Des Océanistes*, 126–27.
- Ridame C, Moal M Le, Guieu C, Biegala I, Helguen L and Pujo-pay M. (2011). Nutrient control of N₂ fixation in the oligotrophic Mediterranean Sea and the impact of Saharan dust events. *Biogeosciences* **8**: 2773–2783.
- Rippka R and Cohen-Bazire G. (1983). The cyanobacteriales : a legitimate order based on the type strain cyanobacterium *Stanieri*? *Ann. Microbiol.* **134**: 21–36.
- Robidart JC, Church MJ, Ryan JP, Ascani F, Wilson ST, Bombar D, Marin R, et al. (2014). Ecogenomic sensor reveals controls on N₂-fixing microorganisms in the North Pacific Ocean. *ISME Journal* **8**: 1175–1185.
- Rochelle-newall EJ, Ridame C, Dimier-huguene C and Helguen SL. (2014). Impact of iron limitation on primary production (dissolved and particulate) and secondary production in cultured *Trichodesmium* sp . *Aquatic Microbial Ecology* **72**: 143–53.

- Rodier M and Borgne R Le. (2008). Population dynamics and environmental conditions affecting *Trichodesmium* spp. (filamentous cyanobacteria) blooms in the south-west lagoon of New Caledonia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **358**: 20–32.
- Rodier M and Le Borgne R. (2010). Population and trophic dynamics of *Trichodesmium thiebautii* in the SE lagoon of New Caledonia. Comparison with *T. erythraeum* in the SW lagoon. *Marine Pollution Bulletin* **61**: 349–359.
- Rosselló-Mora R, Amann R (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* **25** :39-67.
- Rougerie, F (1986). Le lagon sud-ouest de la Nouvelle-Calédonie: spécificité hydrologique et productivité. *ORSTOM-Etudes et thèses, Paris*. 231 pp.
- Ruelle V, El Moulaj B, Zorzi W, Ledent P, Pauw ED (2004). Rapid identification of environmental bacterial strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **18** :2013-2019.
- Sabine CL, Feely RA, Gruber N, Key RM, Lee K, Bullister JL, Wanninkhof R, et al. (2004). The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science* **305**: 367–371.
- Salaün S, Kervarec N, Potin P, Haras D, Piotto M and La S. (2010). Whole-cell spectroscopy is a convenient tool to assist molecular identification of cultivatable marine bacteria and to investigate their adaptive metabolism. *Talanta* **80**: 1758–1770.
- Salvador LA, Taori K, Biggs JS, Jakoncic J, Ostrov DA, Paul VJ and Luesch H. (2013). Potent elastase inhibitors from cyanobacteria: Structural basis and mechanisms mediating cytoprotective and anti-inflammatory effects in bronchial epithelial cells. *Journal of Medicinal Chemistry* **56**: 1276–1290.
- Sánchez-Moreno C. (2002). Food science and technology international review : methods used to evaluate the free radical scavenging. *Food Science and Technology International* **8**: 121–137.
- Sano T and Kaya K. (1996). Oscillapeptin G, a tyrosinase inhibitor from toxic *Oscillatoria agardhii*. *Journal of Natural Products* **59**: 90–92.
- Sañudo-Wilhelmy SA, Kustka AB, Gobler CJ, Hutchins DA, Yang M, Lwiza K, Burns J, Capone DG, Raven J a and Carpenter EJ. (2001). Phosphorus limitation of nitrogen fixation by *Trichodesmium* in the central Atlantic Ocean. *Nature* **411**: 66–69.
- Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M and Geider K. (2008). Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* **3**.
- Sauer S, Kliem M (2010). Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **8** :74-82.
- Saulia E, Turk-Kubo K, Camps M, Bonnet S (in press). Isolation and characterization of a marine unicellular diazotrophic cyanobacterium Cyanothece from the Western tropical South Pacific Ocean.
- Schleifer KH (2009). Classification of bacteria and archaea: past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* **32**:533-542.
- Schopf J.W. (1993). Microfossils of the early Archean Apex chert: New evidence of the

antiquity of life, *Science* **260**: 640–646.

- Sebela M, Jahodarova E, Raus M, Lenobel R and Hasler P. (2018). Intact cell MALDI-TOF mass spectrometric analysis of *Chroococcidiopsis* cyanobacteria for classification purposes and identification of possible marker proteins. *PLoS ONE* **13**: 1–21.
- Shaala LA, Youssef DTA, Mcphail KL and Elbandy M. (2013). Phytochemistry Letters Malylgamide 4 , a new lipopeptide from the Red Sea marine cyanobacterium *Moorea producens* (formerly *Lyngbya majuscula*). *Phytochemistry Letters* **6**: 183–188.
- Chen, Y. B., Zehr, J. P., and Mellon, M. (1996). Growth and nitrogen fixation of the diazotrophic filamentous nonheterocystous cyanobacterium *Trichodesmium* sp IMS 101 in defined media: Evidence for a circadian rhythm. *Journal of Phycology*, **32**: 916-923.
- Shi, T., Ilikchyan, I., Rabouille, S. and Zehr, J. P. (2010) Genome-wide analysis of diel gene expression in the unicellular N₂-fixing cyanobacterium *Crocospaera watsonii* WH 8501, *ISME J.* **5**.
- Shin HJ, Murakami M, Matsuda H and Ishida K. (1995). OsciUapeptin, an Elastase and Chymotrypsin Inhibitor from the Cyanobacterium *Oscillatoria agardhii* **36**: 5235–5238.
- Shiozaki T, Kodama T, Kitajima S, Sato M and Furuya K. (2013). Advective transport of diazotrophs and importance of their nitrogen fixation on new and primary production in the western Pacific warm pool. *Limnology and Oceanography* **58**: 49–60.
- Shiozaki, T., Kodama, T. and Furuya, K. (2014). Large-scale impact of the island mass effect through nitrogen fixation in the western South Pacific Ocean, *Geophys. Res. Lett.*, **41**: 2907–2913.
- Shiozaki T, Bombar D, Riemann L, Hashihama F, Takeda S, Yamaguchi T, Ehama M, Hamasaki K and Furuya K. (2017). Basin scale variability of active diazotrophs and nitrogen fixation in the North Pacific, from the tropics to the subarctic Bering Sea. *Global Biogeochemical Cycles* **31**: 996–1009.
- Shiozaki T, Fujiwara A, Ijichi M, Harada N, Nishino S, Nishi S, Nagata T and Hamasaki K. (2018). Diazotroph community structure and the role of nitrogen fixation in the nitrogen cycle in the Chukchi Sea (western Arctic Ocean). *Limnology and Oceanography*.
- Shishido TK, Humisto A, Jokela J, Liu L, Wahlsten M, Tamrakar A, Fewer DP, et al. (2015). Antifungal compounds from cyanobacteria. *Marine Drugs* **13**: 2124–2140.
- Short SM and Zehr JP. (2007). Nitrogenase gene expression in the Chesapeake Bay Estuary. *Environmental Microbiology* **9**: 1591–1596.
- Siegel DA, Buesseler KO, Doney SC, Sailley SF, Behrenfeld MJ and Boyd PW. (2014). Global assessment of ocean carbon export by combining satellite observations and food-web models. *Global Biogeochemical Cycles* **28**: 1–16.
- Siegesmund MA, Johansen JR, Wissenschaften B and Friedl T. (2008). *Coleofasciculus* gen . Nov . (cyanobacteria): morphological and molecular criteria for revision of the genus *microcoleus gomont*. *J. Phycol.* **44**: 1572–1585.
- Singh R, Parihar P, Singh M, Bajguz A, Kumar J, Singh S, Singh VP and Prasad SM. (2017). Uncovering potential applications of cyanobacteria and algal metabolites in biology, agriculture and medicine: Current status and future prospects. *Frontiers in Microbiology* **8**: 1–37.

- Sipler RE, Gong D, Baer SE, Sanderson MP, Roberts QN, Mulholland MR and Bronk DA. (2017). Preliminary estimates of the contribution of Arctic nitrogen fixation to the global nitrogen budget. *Limnology and Oceanography Letters* **2**: 159–166.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, Welch DM, Huse SM, Neal PR, Arrieta JM and Herndl GJ. (2006). Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere.” *PNAS* **103**: 12115–12120.
- Sohm JA, Webb EA and Capone DG. (2011). Emerging patterns of marine nitrogen fixation **9**.
- Sournia A. (1970). Les cyanophyces dans le plancton marin. *Année Biologique* **11**: 64-76.
- Spungin D, Berman-frank I and Levitan O. (2014). *Trichodesmium*'s strategies to alleviate phosphorus limitation in the future acidified oceans. *Environ Microbiol* **16**: 1935–1947.
- Stephan R, Ziegler D, Pfluger V, Vogel G, Lehner A (2010). Rapid genus- and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* **48** :2846-2851.
- Stenegren M, Caputo A, Berg C, Bonnet S and Foster RA. (2018). Distribution and drivers of symbiotic and free-living diazotrophic cyanobacteria in the western tropical South Pacific. *Biogeosciences* **15**: 1559–1578.
- Stephan R, Johler S, Oesterle N, Näumann G, Vogel G and Valentin P. (2014). Rapid and reliable species identification of scallops by MALDI-TOF mass spectrometry **46**: 6–9.
- Stewart WDP. (1973). Nitrogen fixation by photosynthetic microorganisms. *Annu. Rev. Microbiol.* **27**: 283–316.
- Subramaniam A, Brown CW, Hood RR, Carpenter EJ and Capone DG. (2002). Detecting *Trichodesmium* blooms in SeaWiFS imagery. *Deep-Sea Research* **49**: 107–121.
- Subramaniam A, Yager PL, Carpenter EJ, Mahaffey C, Bjorkman K, Cooley S, Kustka AB, Montoya JP, Shipe R and Capone DG. (2008). Amazon River enhances diazotrophy and carbon sequestration in the tropical North Atlantic Ocean. *PNAS* **105**: 1460–1465.
- Sun L, Jiang W, Sato H, Kawachi M and Lu X. (2016). Rapid Classification and Identification of *Microcystis aeruginosa* Strains Using MALDI–TOF-MS and Polygenetic Analysis. *PLoS ONE* **11**: 1–14.
- Stackebrandt E, Ebers J (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology* **33**:152-155.
- Stanier, R., Kunisawa, R., Mandel, M., and Cohen-Bazire, G. (1971). Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales), *Bacteriological reviews*, **35**: 171.
- Swain SS, Paidasetty SK and Padhy RN. (2017). Antibacterial, antifungal and antimycobacterial compounds from cyanobacteria. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* **90**: 760–776.
- Syarina NPA, Karthivashan G, Abas F, Arulselvan P, Fakurazi S, Sciences H, Sciences H and Putra U. (2015). Wound healing potential of spirulina platensis extracts on human dermal fibroblast cells. *EXCLI Journal* **14**: 385–393.
- Tadashi Matsunaga, J. Grant Burgess, Noriko Yamada, Kazuo Komatsu, Seiichi Yoshida YW. (1993). An ultraviolet (UV-A) absorbing biopterin glucoside from the marine planktonic

- cyanobacterium *Oscillatoria* sp. Tadashi. *Appl Microbiol Biotechnol* **39**: 250–253.
- Takaichi S and Mochimaru M. (2007). Carotenoids and carotenogenesis in cyanobacteria: Unique ketocarotenoids and carotenoid glycosides. *Cellular and Molecular Life Sciences* **64**: 2607–2619.
- Takamatsu S, Hodges TW, Rajbhandari I, Gerwick WH, Mark T and Nagle DG. (2003). Marine Natural Products as Novel Antioxidant Prototypes. *J Nat Prod.* **66**: 605–608.
- Tamaru Y, Takani Y, Yoshida T and Sakamoto T. (2005). Crucial Role of Extracellular Polysaccharides in Desiccation and Freezing Tolerance in the Terrestrial Cyanobacterium *Nostoc commune*. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 7327–7333.
- Tan LT. (2007). Bioactive natural products from marine cyanobacteria for drug discovery. *Phytochemistry* **68**: 954–979.
- Taniuchi Y, Chen YLL, Chen HY, Tsai ML and Ohki K. (2012). Isolation and characterization of the unicellular diazotrophic cyanobacterium Group C TW3 from the tropical western Pacific Ocean. *Environmental Microbiology* **14**: 641–654.
- Taori K, Matthew S, Rocca JR, Paul VJ and Luesch H. (2007). Lyngbyastatins 5-7, potent elastase inhibitors from Floridian marine cyanobacteria, *Lyngbya* spp. *Journal of Natural Products* **70**: 1593–1600.
- Tenório, M., Dupouy C., Rodier, M., Neveux, J. (2018.) *Trichodesmium* and other Filamentous Cyanobacteria in New Caledonian waters (South West Tropical Pacific) during an El Niño Episode. *Aquatic Microbial Ecology* **81**: 219-241.
- Thelen JJ and Ohlrogge JJ. (2002). Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants. *Metabolic Engineering* **4**: 12–21.
- Thieury C. (2016). Recherche de composés anticancéreux dans la biodiversité végétale de la Nouvelle-Calédonie. <http://www.theses.fr>. Available from <http://www.theses.fr/s83876>.
- Thompson A, Carter BJ, Turk-Kubo K, Malfatti F, Azam F and Zehr JP. (2014). Genetic diversity of the unicellular nitrogen-fixing cyanobacteria UCYN-A and its prymnesiophyte host. *Environmental Microbiology* **16**: 3238–3249.
- Thompson AW, Foster RA, Krupke A, Carter BJ, Musat N, Vaultot D, Kuypers MMM and Zehr JP. (2012). Unicellular cyanobacterium symbiotic with a single-celled eukaryotic alga. *Science* **337**: 1546–1550.
- Thompson CC, Chimetto L, Edwards RA, Swings J, Stackebrandt E, Thompson FL (2013). Microbial genomic taxonomy. *BMC Genomics* **14** :913.
- Tindall BJ, Rossello-Mora R, Busse HJ, Ludwig W, Kampfer P (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60** :249-266.
- Tomas C. R. (1997) Identifying Marine Phytoplankton. *Academic Press, San Diego*.
- Torregrosa-crespo J, Montero Z, Fuentes JL, Reig M and Carlos V. (2018). Exploring the Valuable Carotenoids for the Large-Scale Production by Marine Microorganisms. *Marine Drugs* **16**: 2–25.
- Toulza E, Tagliabue A, Blain S and Piganeau G. (2012). Analysis of the Global Ocean Sampling (GOS) Project for Trends in Iron Uptake by Surface Ocean Microbes. *PLoS*

ONE 7.

- Trabelsi L, Ouada H Ben and Bacha H. (2014). Function of light intensity and glucose concentration using factorial design Combined effect of temperature and light intensity on growth and extracellular polymeric substance production by the cyanobacterium *Arthrospira platensis*. *Journal Appl Phycol*, no. May.
- Tran, A., Alby, K., Kerr, A., Jones, M. & Gilligan, P. H. (2015). Cost savings realized by implementation of routine microbiological identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **53**: 2473–2479.
- Tripathi A, Puddick J, Prinsep R, Rottmann M and Tan LT. (2010). Lagunamides A and B : Cytotoxic and Antimalarial Cyclodepsipeptides from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya majuscula*. *J. Nat. Prod.* **73**: 1810–1814.
- Tripp HJ, Bench SR, Turk KA, Foster RA, Desany BA, Niazi F, Affourtit JP and Zehr JP. (2010). Metabolic streamlining in an open-ocean nitrogen-fixing cyanobacterium. *Nature* **464**: 90–94.
- Trombetta D, Castelli F, Grazia M, Venuti V, Cristani M, Saija A, Mazzanti G, et al. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: 2474–2478.
- Turk-Kubo KA, Frank IE, Hogan ME, Desnues A, Bonnet S and Zehr JP. (2015). Diazotroph community succession during the VAHINE mesocosm experiment (New Caledonia lagoon). *Biogeosciences* **12**: 7435–7452.
- Uzbekova S, Elis S, Desmarchais A, Maillard V and Labas V. (2015). MALDI Mass Spectrometry imaging of lipids and gene expression reveals differences in fatty acid metabolism between follicular compartments in porcine ovaries. *Biology* **4**: 216–236.
- Valentine N, Wunschel S, Wunschel D, Petersen C and Wahl K. (2005). Effect of Culture Conditions on Microorganism Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 58–64.
- Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews* **60**: 407-438.
- Volk RB and Furkert FH. (2006). Antialgal, antibacterial and antifungal activity of two metabolites produced and excreted by cyanobacteria during growth. *Microbiological Research* **161**: 180–86.
- Volta P, Riccardi N, Lauceri R and Tonolla M. (2012). Discrimination of freshwater fish species by Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS): **71**: 164–69.
- Vonshak, A. (1997). *Spirulina platensis (Arthrospira)*: Physiology, Cell-biology and Biotechnology, Taylor and Francis, London.
- Wannicke N, Benavides M, Dalsgaard T, Dippner JW, Montoya JP and Voss M. (2018). New perspectives on nitrogen fixation measurements using ¹⁵N₂ gas. *Frontiers in Marine Science* **5**: 1-10.
- Ward DM, Weller R, Bateson MM (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* **345** :63-65.

- Waterbury J.B. and Rippka R. (1989). Subsection I. order Chroococcales. In: Buchanan RE, Gibbons NE (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 3rd edition. Baltimore, Williams and Wilkins, 1728-1745.
- Webb E a, Ehrenreich IM, Brown SL, Valois FW and Waterbury JB. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of multiple strains of the diazotrophic cyanobacterium, *Crocospaera watsonii*, isolated from the open ocean. *Environmental Microbiology* **11**: 338–348.
- Welker M, Moore ERB (2011). Applications of whole-cell matrix-assisted laserdesorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in systematic microbiology. *Systematic and Applied Microbiology* **34** :2-11.
- Wen Z, Lin W, Shen R, Hong H, Kao S-Ji, and Shi D (2017). Nitrogen fixation in two coastal upwelling regions of the Taiwan Strait, *Scientific Reports* **7**: 1-10.
- White AE, Watkins-Brandt KS and Church MJ. (2018). Temporal Variability of *Trichodesmium* spp. and Diatom-Diazotroph Assemblages in the North Pacific Subtropical Gyre. *Frontiers in Marine Science* **5**: 1–12.
- Whittaker S, Bidle KD, Kustka AB and Falkowski PG. (2011). Quantification of nitrogenase in *Trichodesmium* IMS 101 : implications for iron limitation of nitrogen fixation in the ocean. *Environmental Microbiology Reports* **3**: 54–58.
- Whitton BA and Potts M. (2012). Ecology of cyanobacteria II: Their diversity in space and time **9789400738**: 1–760.
- Wieme, A. D., Spitaels, F., Aerts, M., De Bruyne, K., Van Landschoot, A., & Vandamme, P. (2014). Effects of growth medium on matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectra: a case study of acetic acid bacteria. *Applied and environmental microbiology*, **80** : 1528-1538.
- Wilmotte A and Herdman M. (2001). Phylogenetic relationships among the cyanobacteria based on 16S rRNA sequences. *Bergey's Manual Of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–9.
- Wilson ST, Böttjer D, Church MJ and Karl DM. (2012). Comparative assessment of nitrogen fixation methodologies, conducted in the oligotrophic North Pacific Ocean. *Applied and Environmental Microbiology* **78**: 6516–6523.
- Worden AZ, Follows MJ, Giovannoni SJ, Wilken S, Zimmerman AE and Keeling PJ. (2015). Rethinking the marine carbon cycle: Factoring in the multifarious lifestyles of microbes. *Science* **347**.
- Wunschel DS, Hill EA, Mclean JS, Jarman K, Gorby YA, Valentine N and Wahl K. (2005). Effects of varied pH , growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on Matrix Assisted Laser Desorption / Ionization whole cell protein fingerprints. *Journal of Microbiological Methods* **62**: 259–271.
- Taori Y, Hashimoto E, Takeuchi T, Sakaki S, Yamaguchi Y, Takenaka H and Watanabe F. (2014). Characterization of a hot water extract of an edible cyanobacterium *Nostochopsis* sp. for use as an ingredient in cosmetics. *Food Science and Technology Research* **20**: 505–507.
- Ying Q, Rinehart AR, Sanford R and Cheronist JC. (1991). Inhibition of human leucocyte elastase by ursolic acid Evidence for a binding site for pentacyclic triterpenes. *Biochem.*

- J.* **277**: 521–526.
- Young, J. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. *Biol. Nitrogen Fixation* **4**.
- Zehr J, Waterbury J, Turner P, Montoya J, Omoregie E, Steward G, Hansen A and Karl D. (2001). Unicellular cyanobacteria fix N₂ in the subtropical North Pacific Ocean. *Nature* **715**: 25–28.
- Zehr JP. (2011). Nitrogen fixation by marine cyanobacteria. *Trends in Microbiology*, 1–12.
- Zehr JP, Bench SR, Carter BJ, Hewson I, Niazi F, Shi T, Tripp HJ and Affourtit JP. (2008). Globally distributed uncultivated oceanic N₂-fixing cyanobacteria lack oxygenic photosystem II. *Science* **322**: 1110–1113.
- Zehr JP, Church MJ and Moisander PH. (2006). Diversity, distribution and biogeochemical significance of nitrogen-fixing microorganisms in anoxic and suboxic ocean environments. *Past and Present Water Column Anoxia* **64**: 337–369.
- Zehr JP, Mellon MT and Hiorns WD. (1997). Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes : evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology* **143**: 1443–1450.
- Zehr JP, Mellon MT, Zani S and York N. (1998). New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3444–3450.
- Zehr JP, Montoya JP, Jenkins BD, Hewson I, Mondragon E, Short CM, Church MJ, Hansen A and Karl DM. (2007). Experiments linking nitrogenase gene expression to nitrogen fixation in the North Pacific subtropical gyre. *Limnology and Oceanography* **52**: 169–183.
- Zhu Y, Graham JE, Ludwig M, Xiong W, Alvey RM, Shen G and Bryant DA. (2010). Roles of xanthophyll carotenoids in protection against photoinhibition and oxidative stress in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **504**: 86–99.

Annexe 1 : Figures supplémentaires de l'article « Variabilité des taux de fixation d'azote et des principaux protagonistes diazotrophes: tendances observées sur une série temporelle de quatre ans dans le lagon de Nouvelle-Calédonie (Pacifique Tropical Sud-Ouest) »

Supplementary Methods.

In order to determine if injecting the $^{15}\text{N}_2$ tracer as a bubble or previously dissolved in filtered seawater had an impact of N_2 fixation rates, we sampled 12 gallons of surface seawater at one occasion. Six of them were amended with 5 ml of $^{15}\text{N}_2$ (98.9% Cambridge isotope) using a gas tight syringe, and six were amended with 5% vol : vol of $^{15}\text{N}_2$ -enriched seawater prepared as described in Berthelot et al., (2015). Briefly, lagoon seawater was first degassed through a degassing membrane (Membrana, Minimodule®, flow rate fixed at 450 mL min^{-1}) connected to a vacuum pump ($< 200 \text{ mbar}$ absolute pressure) for at least 1 h. It was then tightly closed with no head space with a silicone septum cap and amended with 1 mL of $^{15}\text{N}_2$ (98.9% Cambridge isotope) per 100 mL. The bottle was then shaken vigorously to promote $^{15}\text{N}_2$ dissolution. Bottles were then incubated altogether in deck incubators as described in the Method section. In both cases, the ^{15}N enrichment of the dissolved N_2 pool was measured in the incubation bottles after incubation by membrane inlet mass spectrometry (MIMS) according to Kana et al., (1994).

Results.

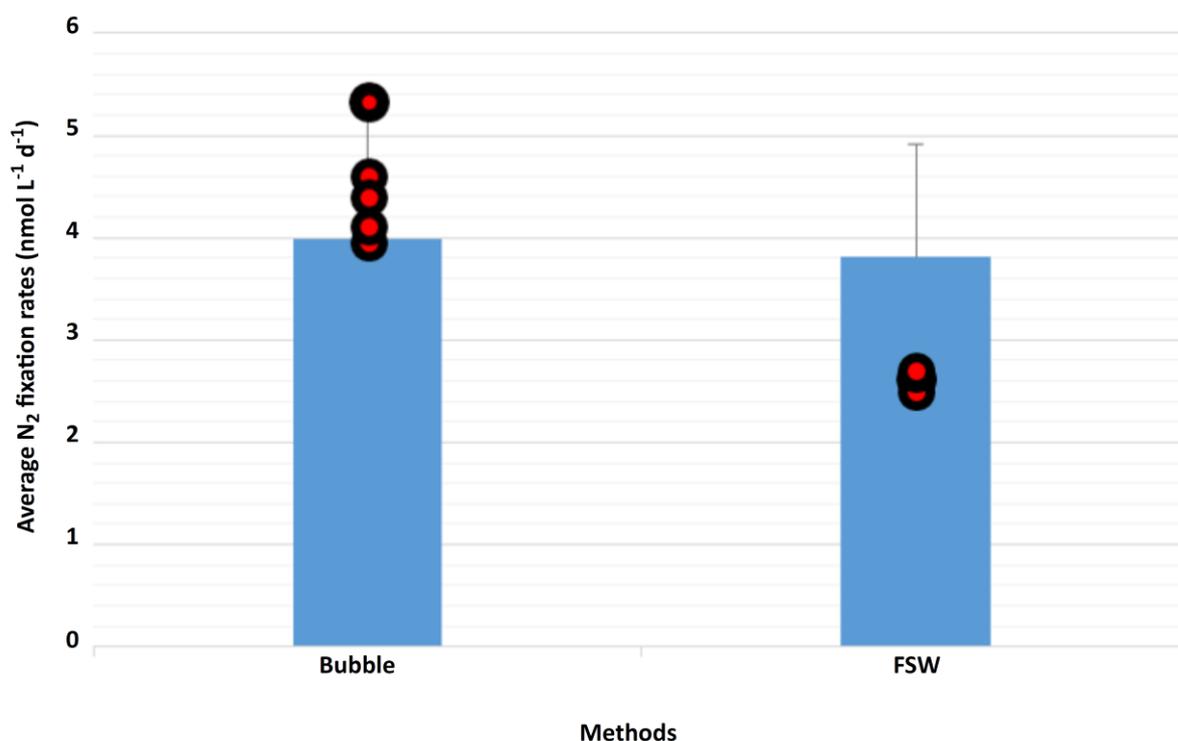


Figure S1: Average N_2 fixation rates (blue bars) and ^{15}N enrichment of the dissolved N_2 pool (red dots) ($n=6$) in both methods (left: addition of $^{15}\text{N}_2$ as a bubble ('bubble'); right: addition of $^{15}\text{N}_2$ as $^{15}\text{N}_2$ -enriched seawater 'FSW')

The ^{15}N enrichment of the dissolved N_2 pool measured in the first set of bottles (bubble method) was 4.41 ± 0.51 (n=6) atom%, while it was 2.63 ± 0.06 (n=6) atom% in the second set of bottles ($^{15}\text{N}_2$ enriched seawater). The ^{15}N enrichment of particulate N in the first set of bottles was 0.382 ± 0.03 (n=6) atom%, and 0.372 ± 0.05 (n=6) atom% in the second set (data not shown). However, the resulting calculated N_2 fixation rates were 4.0 ± 1.4 $\text{nmol N L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (n=6) in the first set (bubble method) and 3.8 ± 0.51 $\text{nmol N L}^{-1} \text{d}^{-1}$ (n=6). Both distributions were not significantly different ($p > 0.05$). This result is consistent with previous studies conducted in the WTSP (Bonnet et al., 2016) and another recent extensive meta-analysis (13 studies, 368 observations) between bubble and enriched amendment experiments to measure $^{15}\text{N}_2$ rates reported that underestimation of N_2 fixation is negligible in experiments that last 12–24 h (e.g., error is ~0.2%) (Wannicke et al., 2018). We thus considered that the use of two different methods did not affect the resulting rates in our time series.

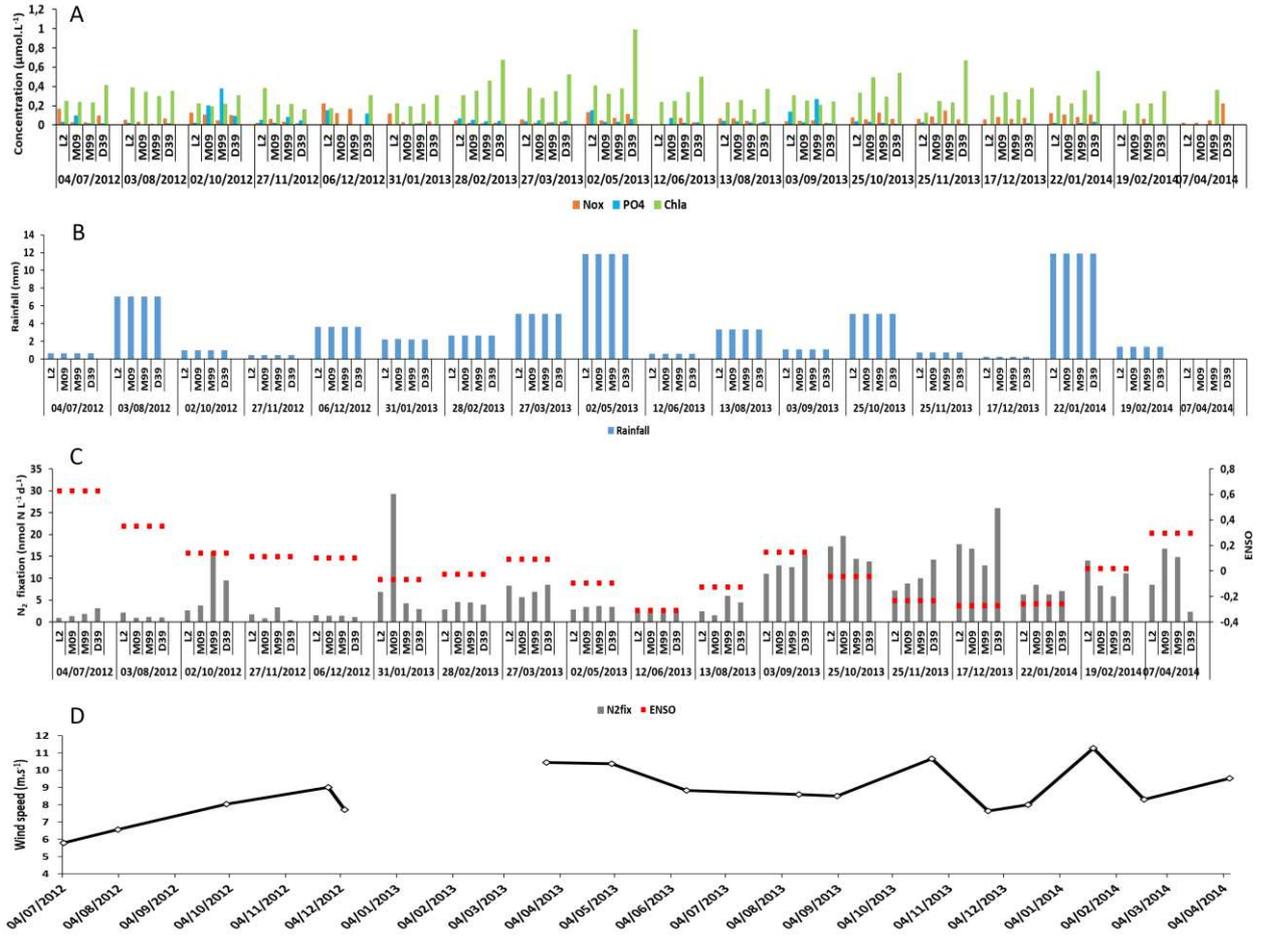


Figure S2: Supplementary data representing the nutrient and Chl *a* concentrations (A), rainfall (B), N_2 fixation and ENSO index (C) and the wind speed (D) during the GOPS survey (all stations averaged).

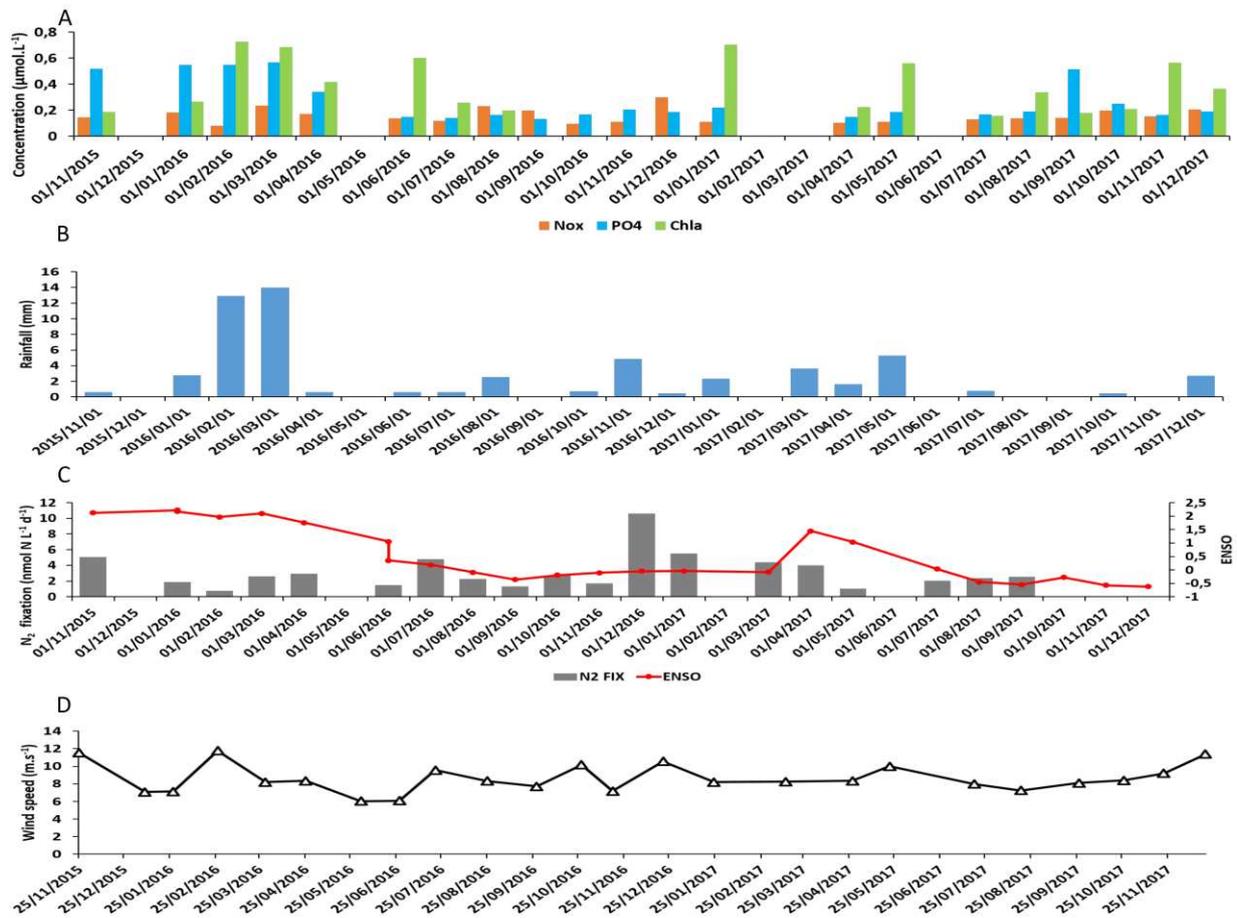


Figure S3: Supplementary data representing the nutrient and Chl *a* concentrations (A), rainfall (B), N_2 fixation and ENSO index (C) and the wind speed (D) during the MOISE survey.

Annexe 2 : Spectres RMN ^1H

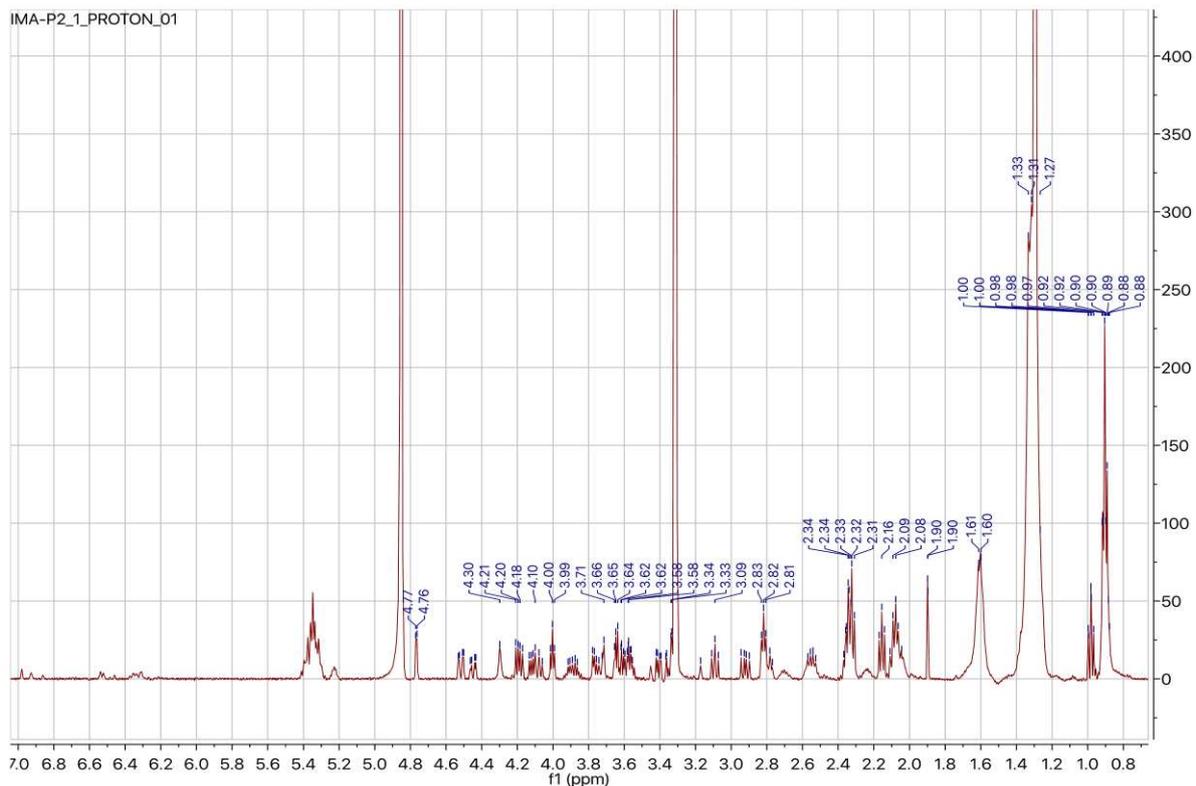


Figure 1 : Spectre du proton ^1H du pic P2-1 de l'extrait IMA.13.

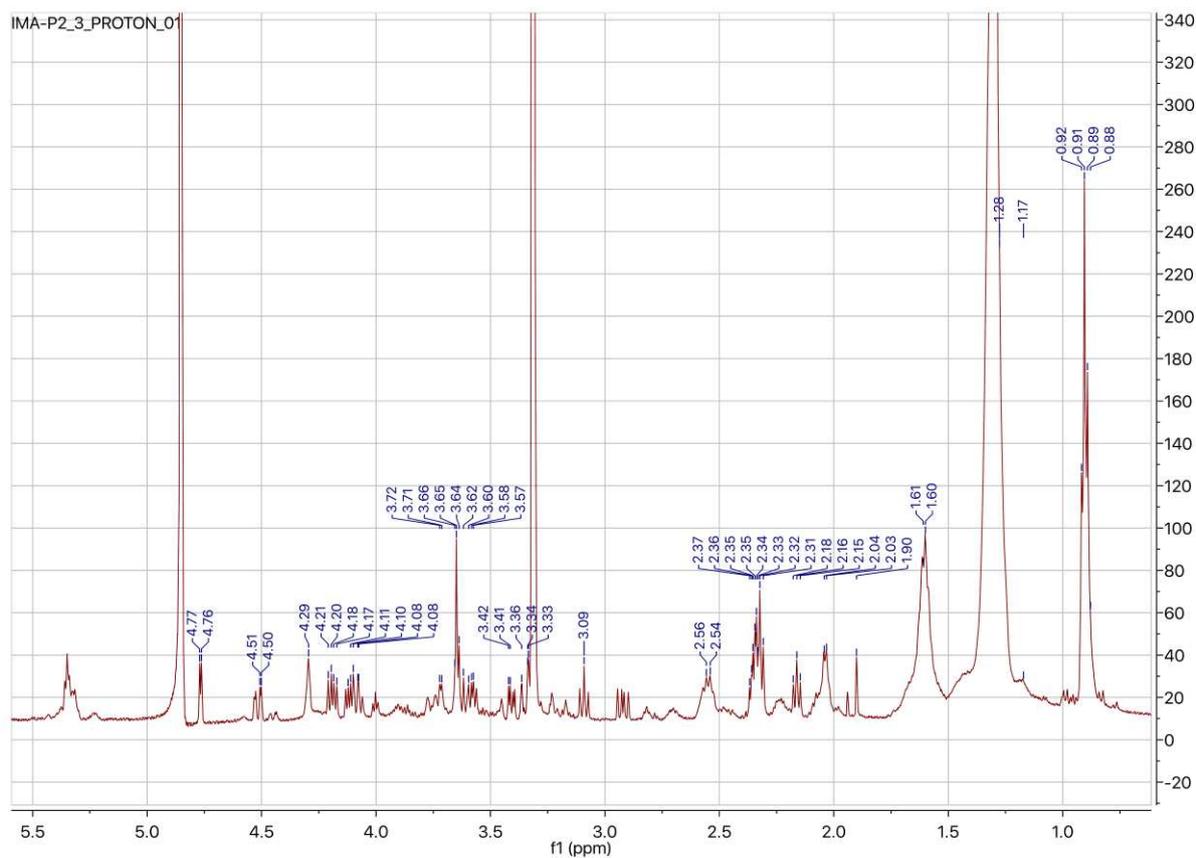


Figure 2 : Spectre du proton ^1H du pic P2-3 de l'extrait IMA.13.

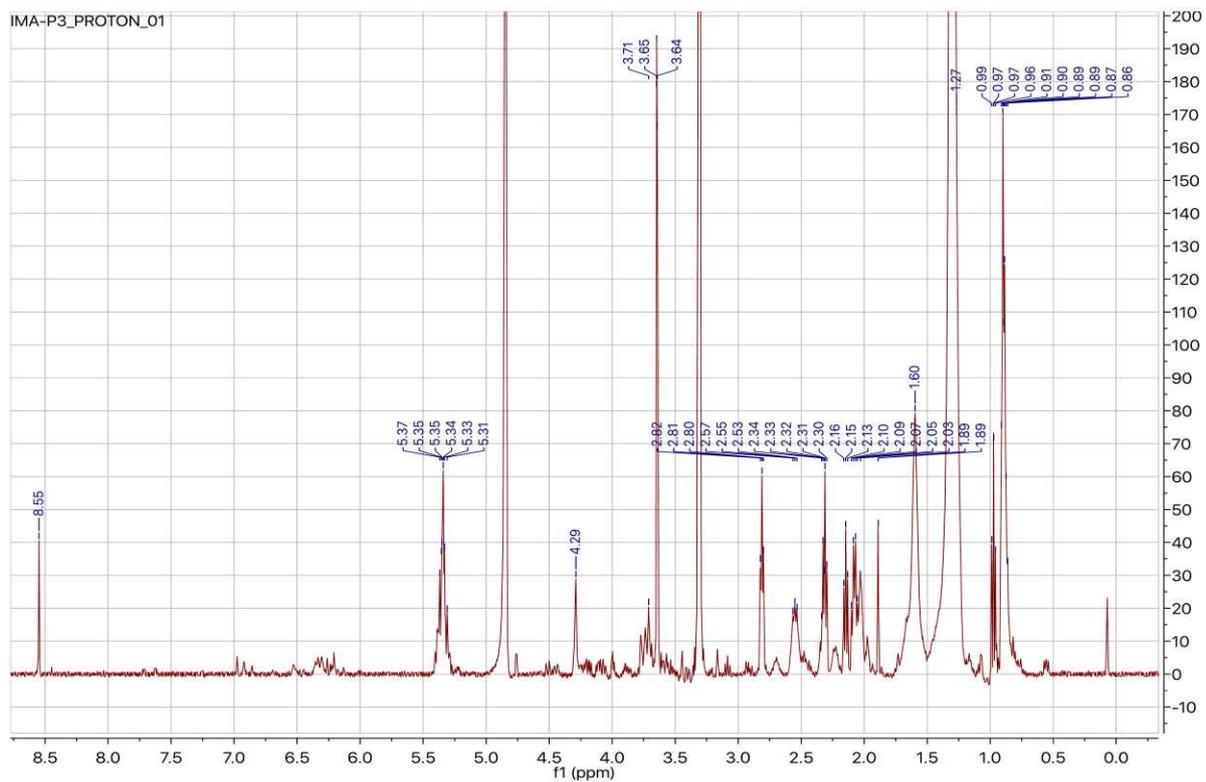


Figure 3 : Spectre du proton ^1H du pic P3 de l'extrait IMA.13.

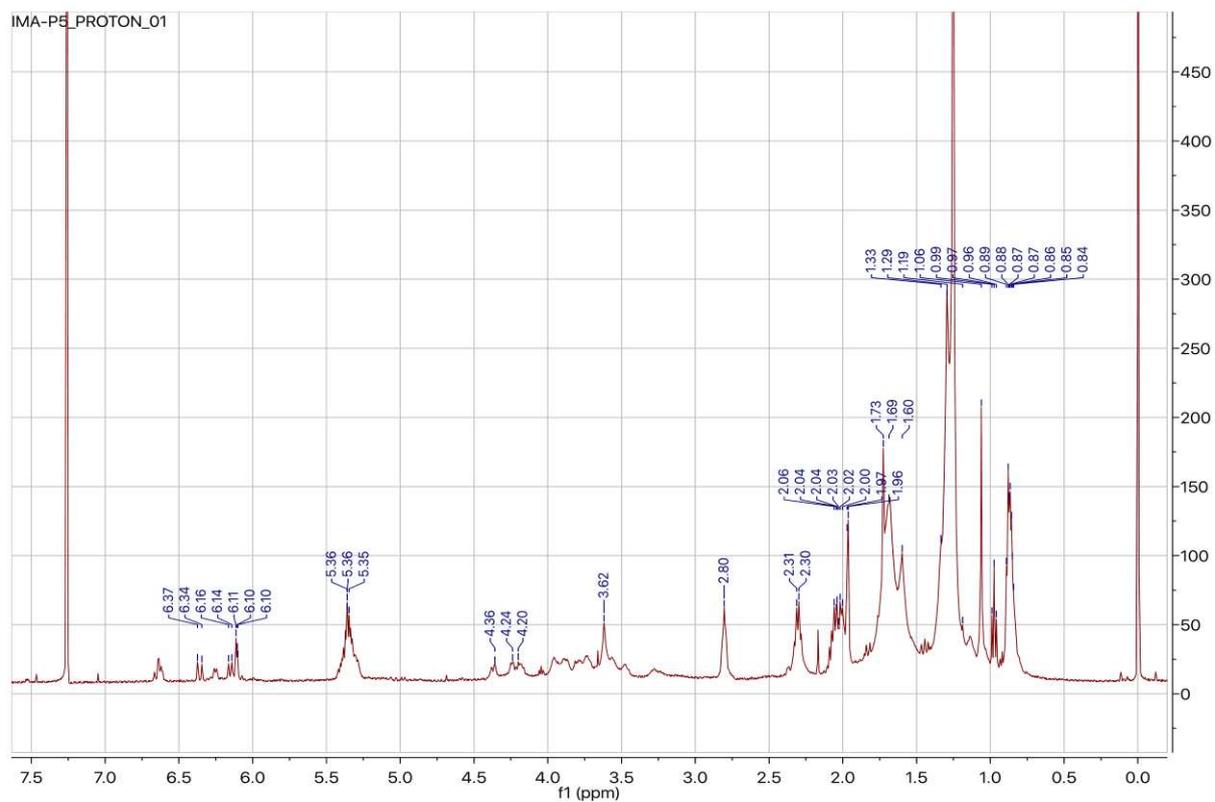


Figure 4 : Spectre du proton ^1H du pic P5 de l'extrait IMA.13.

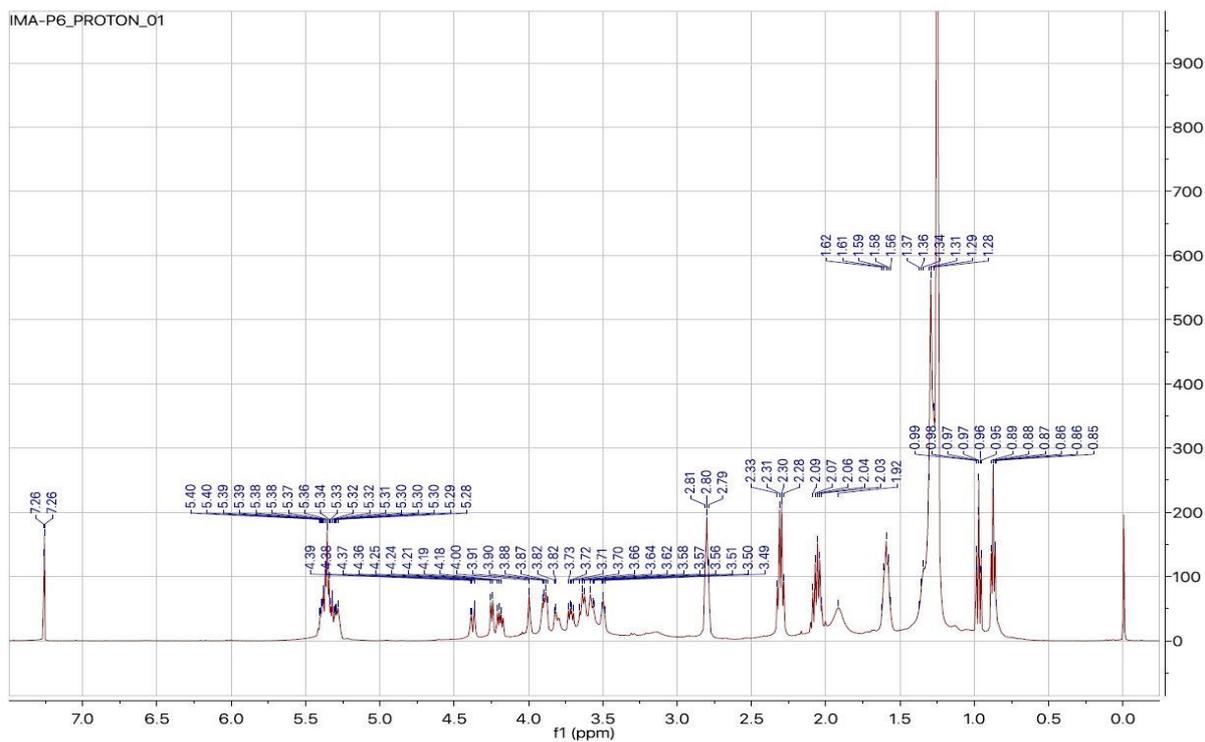


Figure 5 : Spectre du proton ^1H du pic P6 de l'extrait IMA.13.

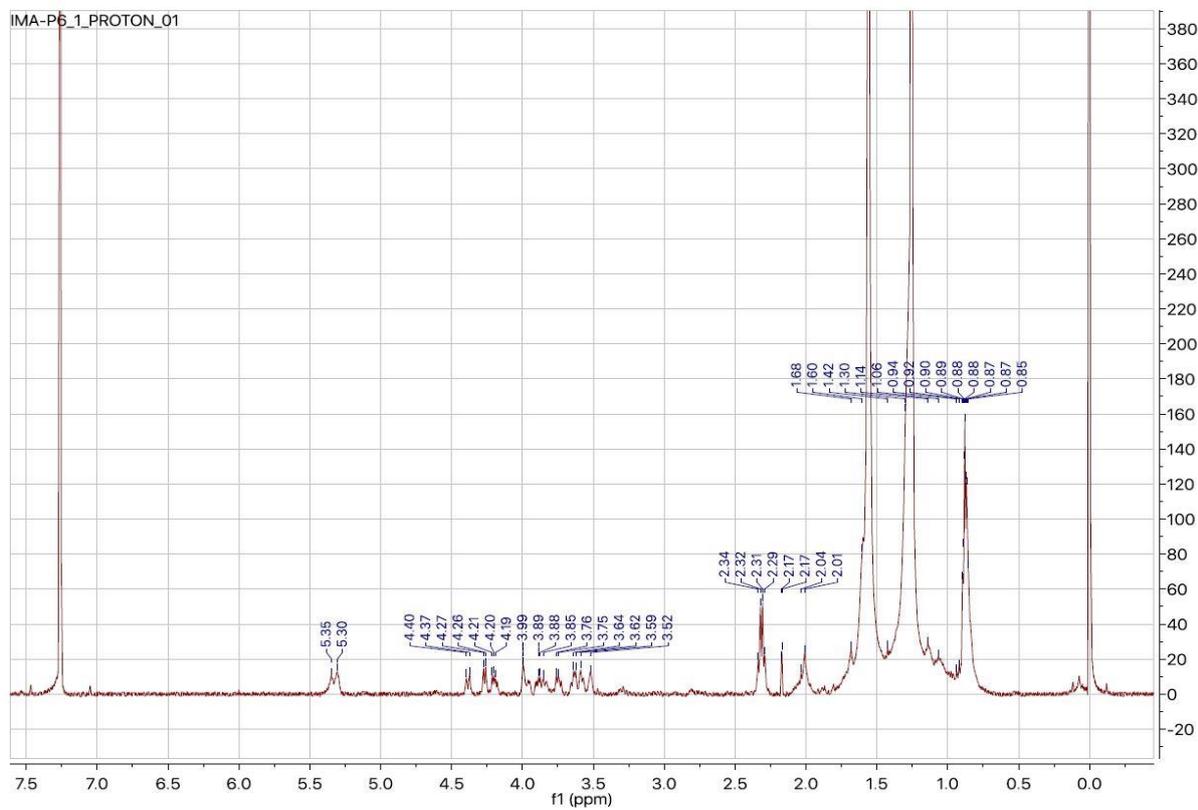


Figure 6 : Spectre du proton ^1H du pic P6-1 de l'extrait IMA.13.

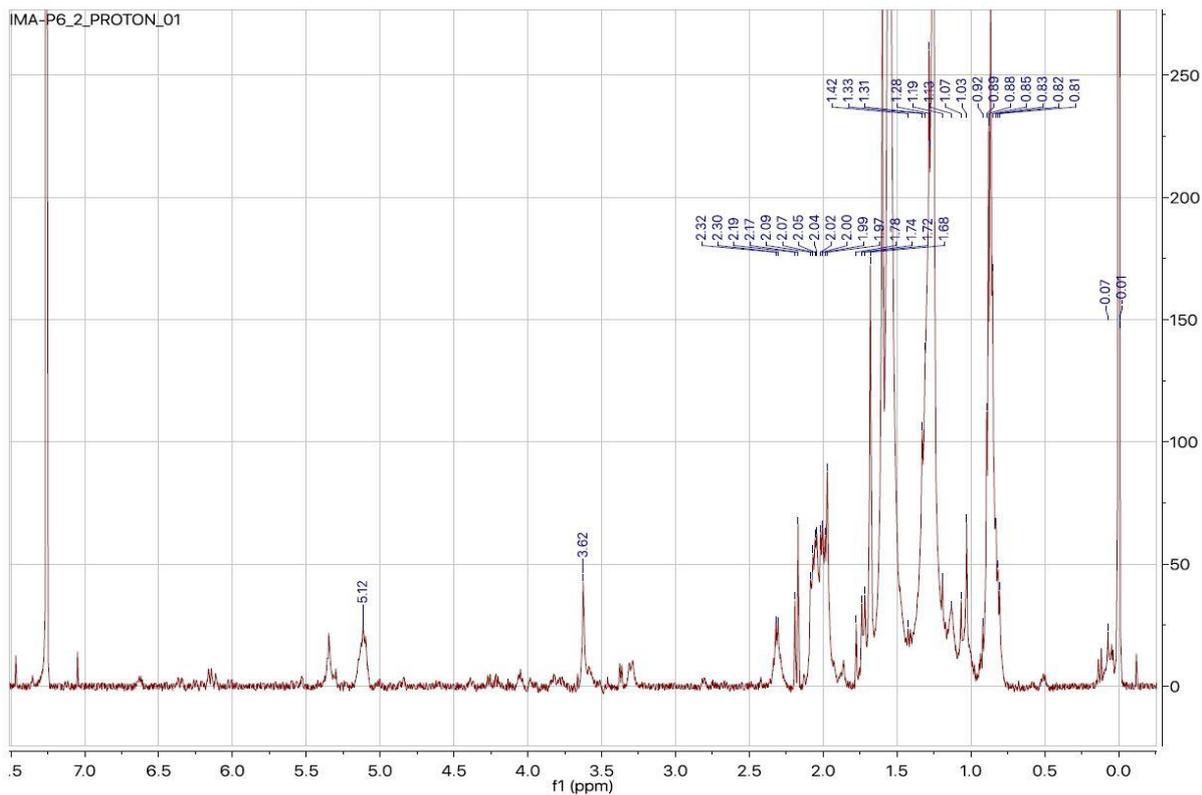


Figure 7 : Spectre du proton ^1H du pic P6-2 de l'extrait IMA.13.

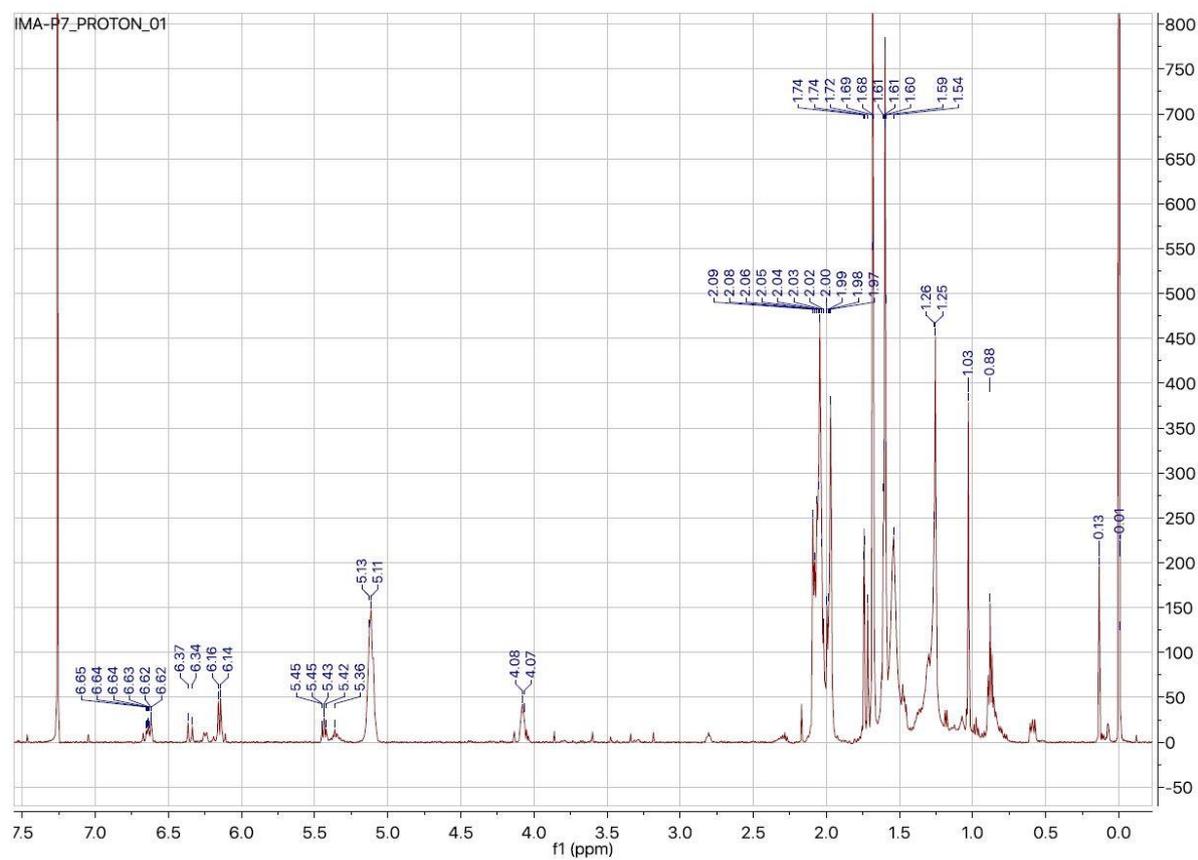


Figure 8 : Spectre du proton ^1H du pic P7 de l'extrait IMA.13.

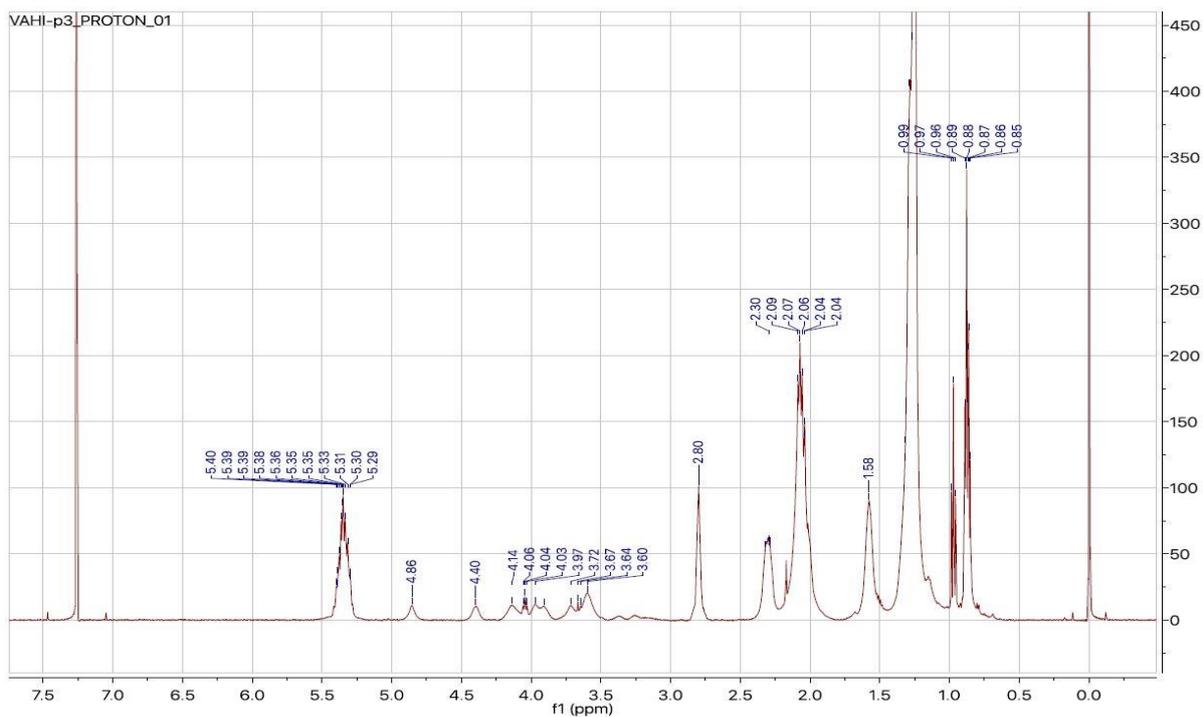


Figure 9 : Spectre du proton ^1H du pic P3 de l'extrait VAHI.13.

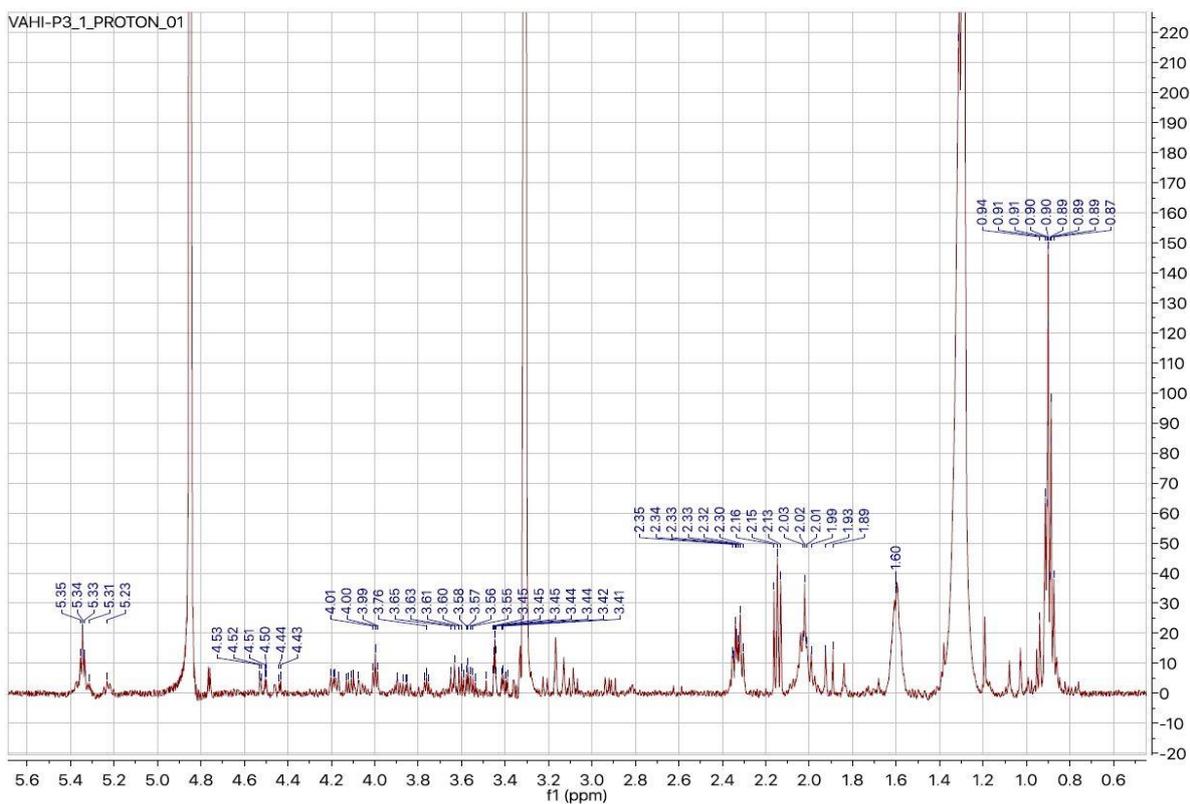


Figure 10 : Spectre du proton ^1H du pic P3-1 de l'extrait VAHI.13.

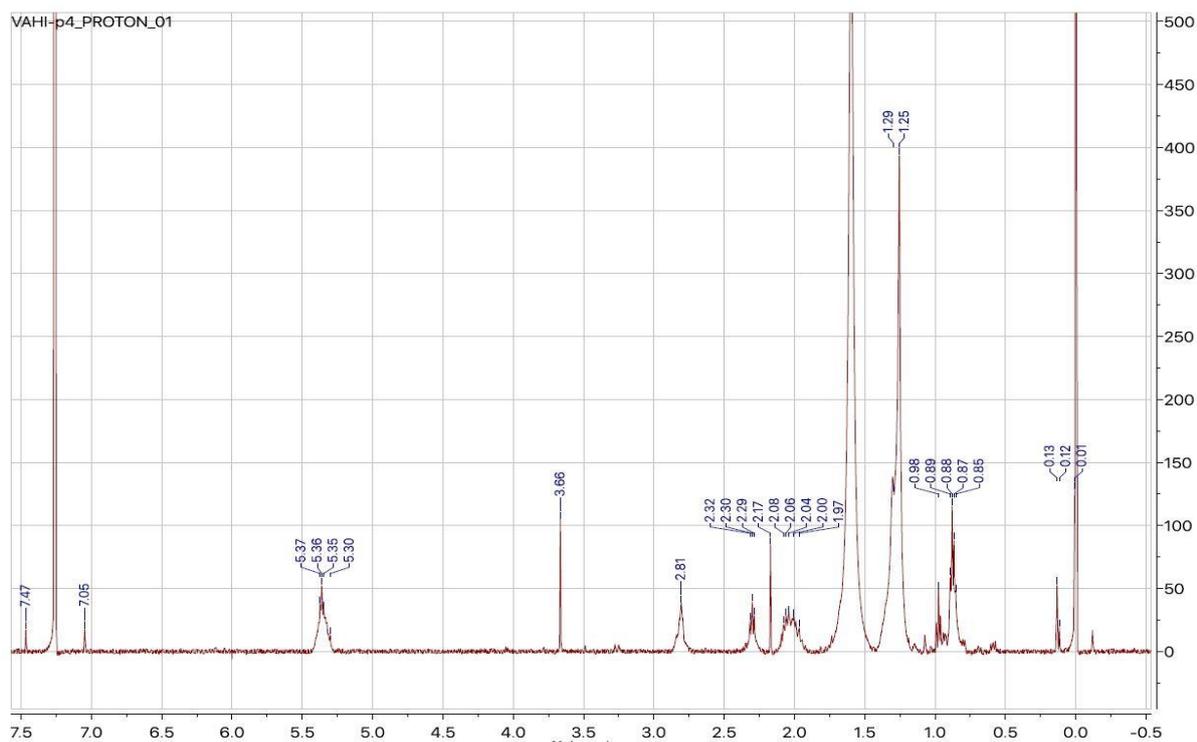


Figure 11 : Spectre du proton ^1H du pic P4 de l'extrait VAHI.13.

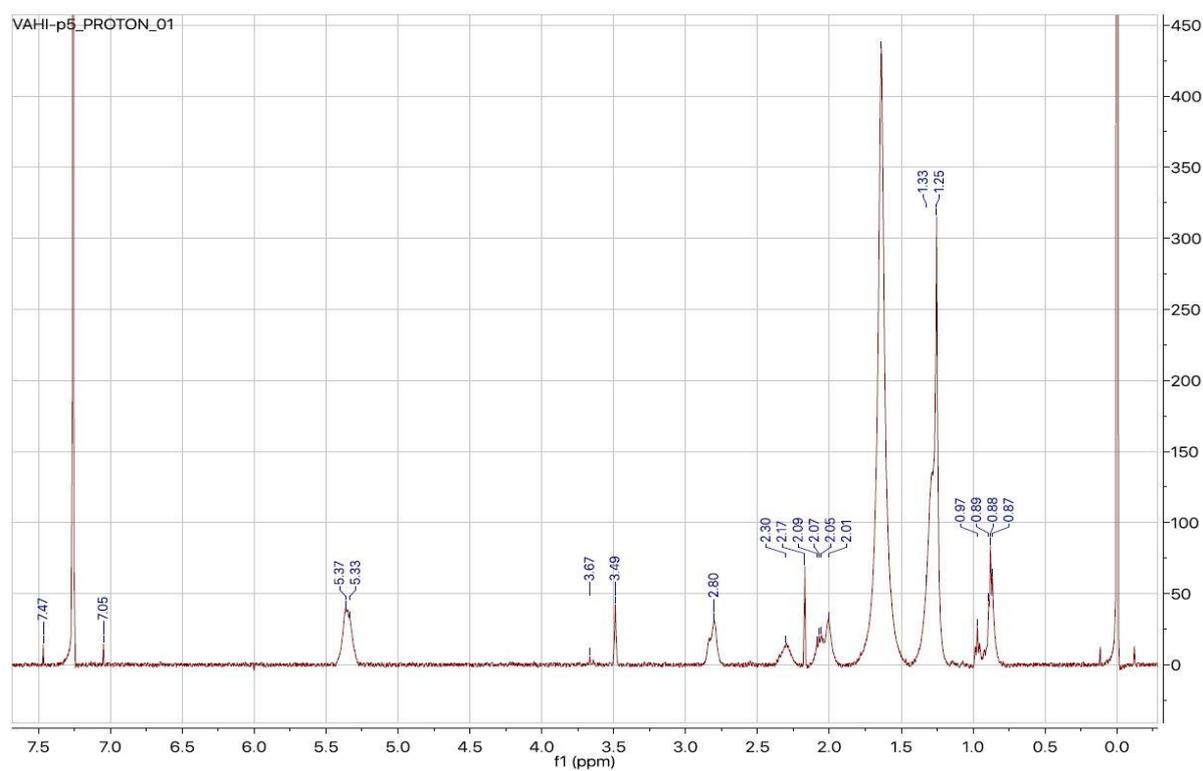


Figure 12 : Spectre du proton ^1H du pic P5 de l'extrait VAHI.13.

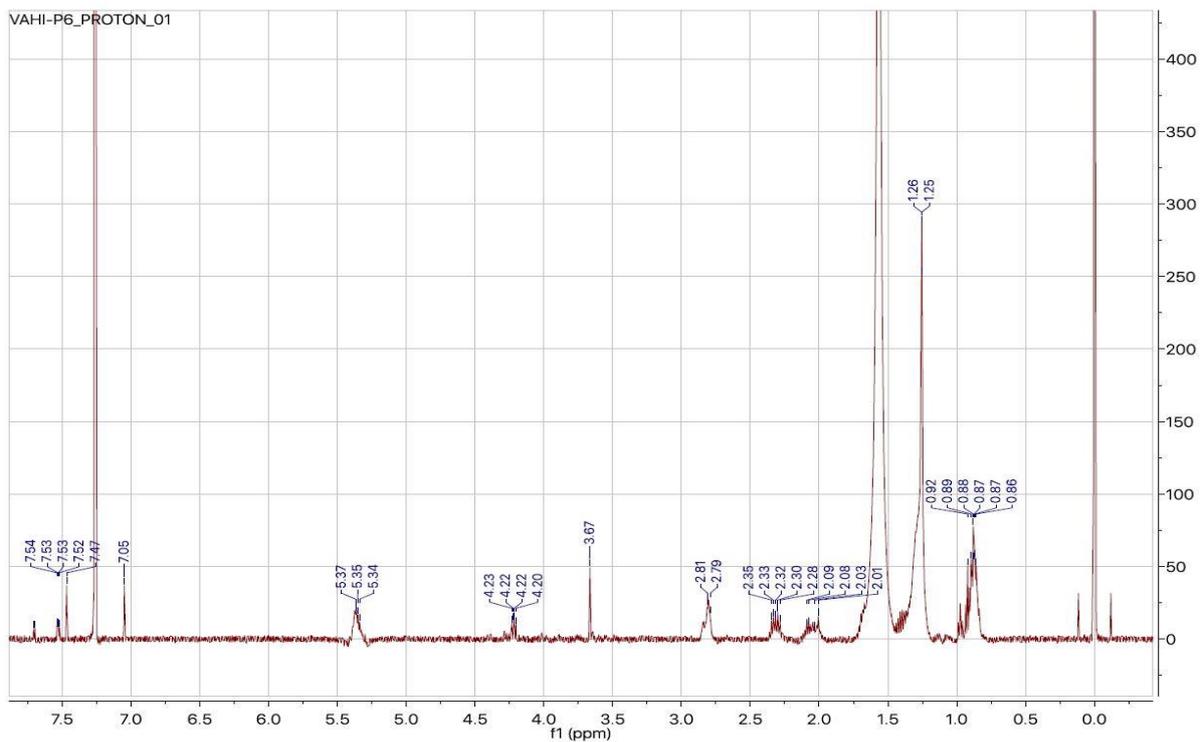


Figure 13 : Spectre du proton ^1H du pic P6 de l'extrait VAHI.13.

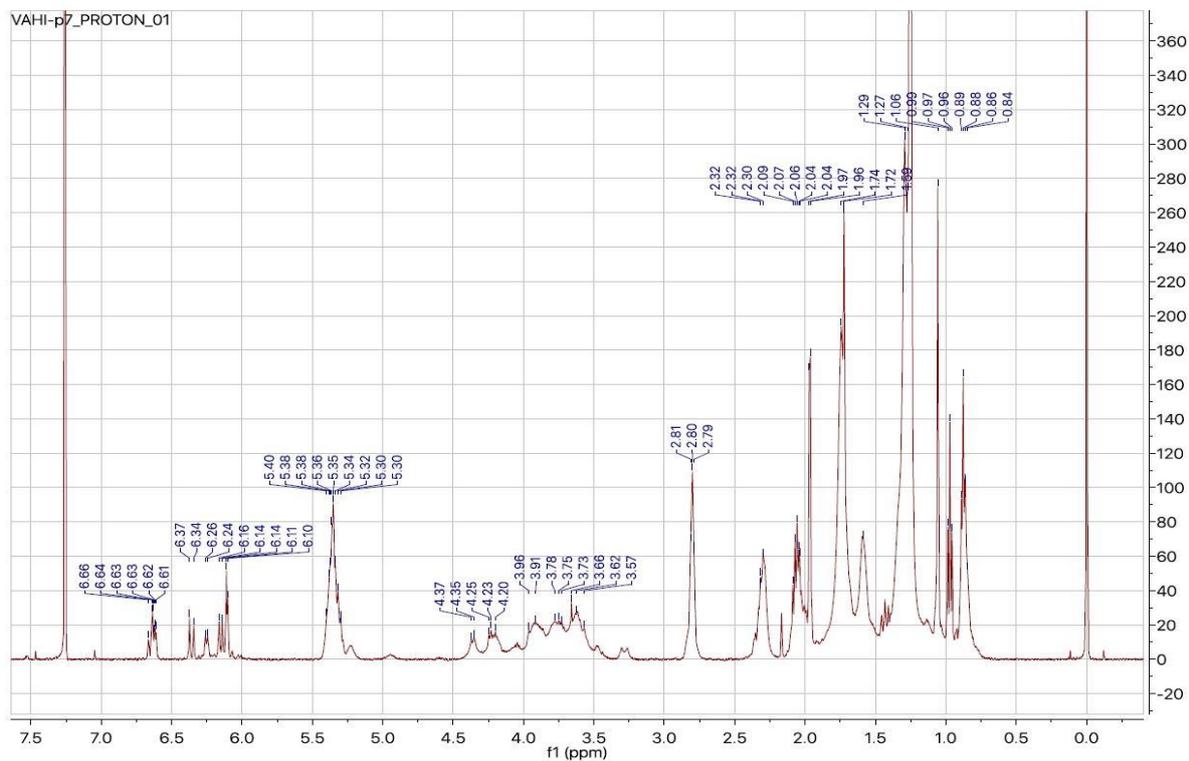


Figure 14 : Spectre du proton ^1H du pic P7 de l'extrait VAHI.13.

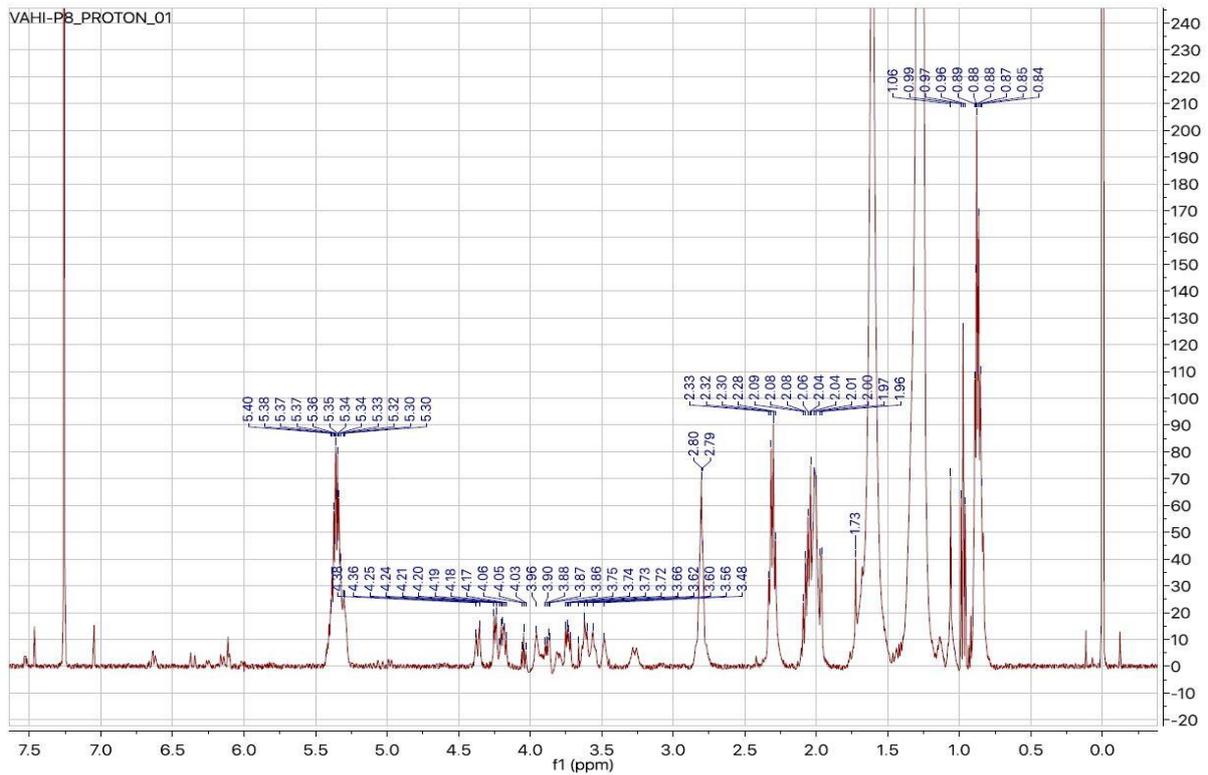


Figure 15 : Spectre du proton ^1H du pic P8 de l'extrait VAHI.13.

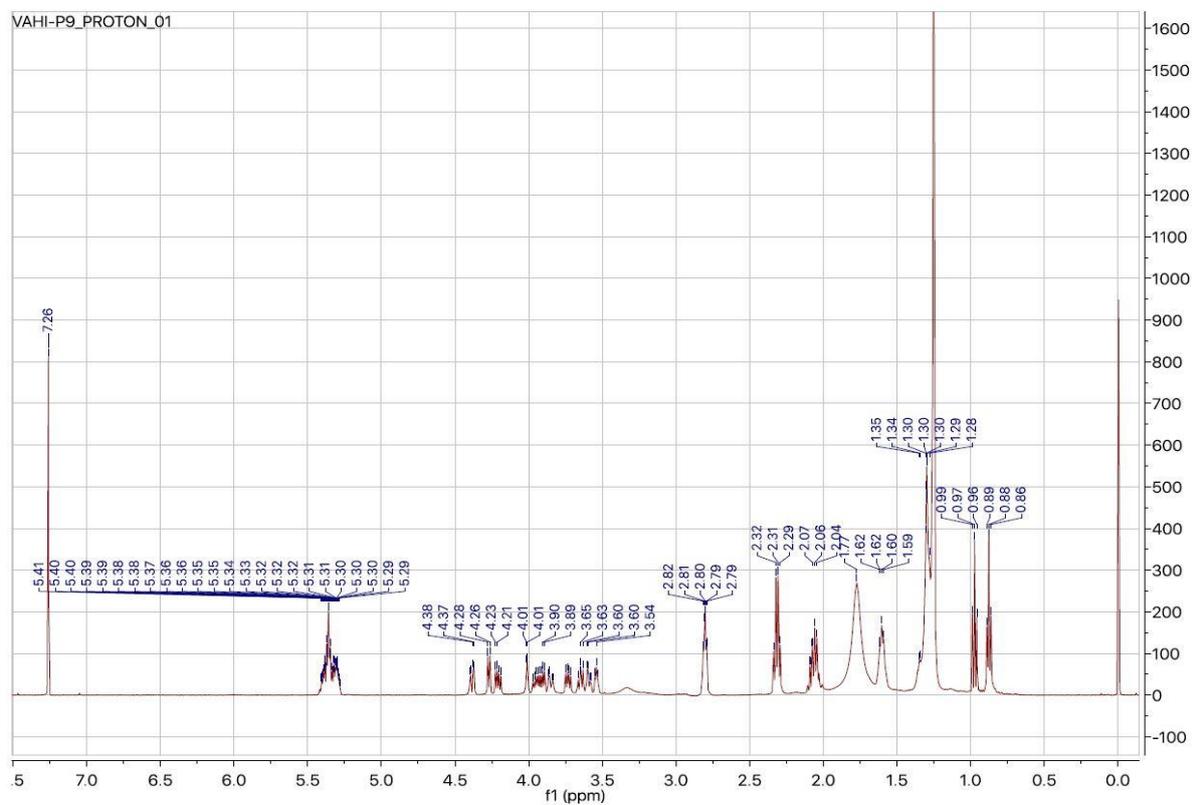


Figure 16 : Spectre du proton ^1H du pic P9 de l'extrait VAHI.13.

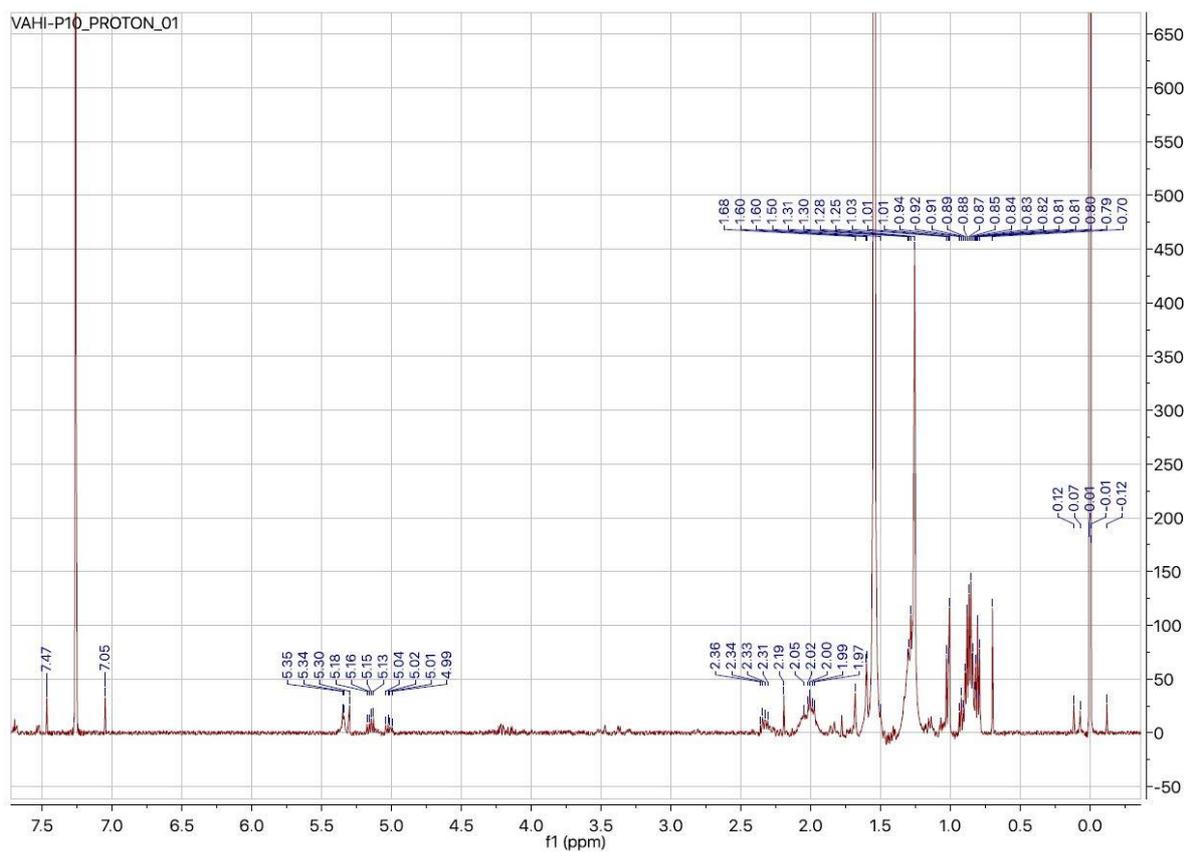


Figure 17 : Spectre du proton ^1H du pic P10 de l'extrait VAHI.13.

