



Les peuplements bactériens associés à *Sargassum muticum* et les possibilités de leur utilisation dans la limitation de l'expansion de l'algue en Rade de Brest.

mai - décembre 1988

contrat IFREMER
n° 88 2 43 0430 DERO/EL

SOMMAIRE

Introduction

Matériel et méthodes

- 1 - Le matériel étudié
 - 1-1 *Sargassum muticum*
 - 1-2 *Laminaria digitata*
- 2 - Site d'étude et échantillonnage
 - 2-1 *Sargassum muticum*
 - 2-2 *Laminaria digitata*
- 3 - Analyse quantitative des peuplements bactériens
 - 3-1 Mise en suspension des bactéries épiphytes
 - 3-2 Numérations directes
 - 3-3 Numérations sur milieux de culture
- 4 - Analyse qualitative
 - 4-1 Caractérisation des souches
 - 4-2 Traitement des données
- 5 - Recherche de souches à activité alginolytique
 - 5-1 Technique du cup-plate
 - 5-2 Liquéfaction
- 6 - Tests d'agressivité des souches alginolytiques sur le tissu algal

Résultats et discussion

- 1 - Densité des peuplements épiphytes
 - 1-1 Microflore totale
 - 1-2 Microflore hétérotrophe viable
 - 1-2-1 sur milieu 2216E
 - 1-2-2 sur milieu à base d'alginate
 - 1-3 Comparaison des microflores viables et totale
- 2 - Caractéristiques des peuplements bactériens épiphytes
 - 2-1 Caractéristiques générales
 - 2-2 Caractéristiques métaboliques
 - 2-3 Diversités métabolique et spécifique
 - 2-4 Comparaison des peuplements épiphytes des deux espèces algales
 - 2-5 Aptitude des souches à dégrader les alginate
- 3 - Agressivité des souches alginolytiques sur le tissu algal

Conclusions

Introduction

L'apparition de la grande phéophycée *Sargassum muticum* sur les côtes de l'Europe est vraisemblablement liée à l'importation du naissain de l'huître *Crassostrea gigas*. Signalée pour la première fois à l'île de Wight (Grande Bretagne) (Farnham et al., 1973) elle n'a cessé de progresser sur les côtes de la Manche (Gruet, 1976; Cosson et al., 1977), de l'Atlantique (Critchley et al., 1983) et maintenant de la Méditerranée, (Belsher, 1983; Gerbal, 1985).

En raison de son taux de croissance très rapide (Kane et Chamberlain, 1979; Lewey et Farhnam, 1981), cette espèce constitue une réelle nuisance dans le domaine de la conchyliculture et plus anecdotiquement dans ceux de la navigation et la baignade. En ce qui concerne le premier point elles alourdissent les structures ostréicoles, arrachent les huîtres sur lesquelles elles sont fixées, entrent en compétition avec le phytoplancton pour l'utilisation des sels nutritifs et freinent la circulation des masses d'eau (Belsher et Boyen, 1983; Gerbal, 1985).

Les essais de valorisation de cette algue par la recherche de composés d'intérêt biologique et thérapeutique ne semblent pas donner jusqu'à présent de résultats suffisamment probant pour justifier l'exploitation de *Sargassum muticum*. C'est pourquoi différents moyens de lutte sont actuellement envisagés, afin de limiter son expansion.

La méthode biologique qui consiste àensemencer des brouteurs tels que des poissons herbivores ou des oursins à proximité de l'algue a été testée dans l'étang de Thau sans donner de résultats très spectaculaires. Une méthode chimique est testée sur cette même zone; elle utilise du sulfate de cuivre, qui en laboratoire s'est avéré toxique à faible dose pour l'algue; son efficacité en milieu naturel reste à prouver.

Une autre technique dite "bactériologique" pourrait être utilisée dans ce but, et fera l'objet de la présente étude. Elle consistera à isoler et à infester l'algue par des souches bactériennes susceptibles de détruire un composé vital de l'algue. Etant donné sa situation anatomique et son rôle physiologique essentiel (Mabeau, 1985; Kloareg et Quatrano, 1988) la paroi cellulaire est apparue comme la plus accessible. Chez les algues brunes, la fraction la plus abondante des polysides matriciels pariétaux est constituée d'alginate; ils représentent de 10 à 45% de la masse sèche du thalle (Black, 1954).

Les alginates sont des copolymères reliés par des ponts 1-4 et constitués par des blocs d' β -D-mannuronate, d' α -L-guluronate et de séquences mélangées dans lesquelles se rencontrent tous les résidus (Haug

et al., 1967). Des enzymes dépolymérisant ces alginates ont été mises en évidence dans les glandes digestives d'invertébrés marins herbivores, de divers microorganismes le plus souvent d'origine marine, ainsi que chez les algues brunes elles mêmes. Ces enzymes sont en général des lyases, qui produisent la rupture de liaisons glycosidiques par élimination d'une molécule d'eau. Ces lyases, lorsqu'elles sont d'origine bactérienne coupent préférentiellement les blocs polyguluronates, alors que celles extraites des mollusques sont spécifiques des liaisons polymannuronates. Toutefois des spécificités différentes peuvent être notées au sein d'un même organisme entre autre en relation avec la localisation intra ou extra cellulaire de l'enzyme.

Des souches bactériennes capables de dégrader ces alginates seront recherchées sur *Sargassum muticum* puis leur effet testé en laboratoire sur le tissu de l'algue.

Préalablement, la microflore épiphyte de *Sargassum muticum* sera analysée quantitativement et qualitativement et comparée à celle d'une autre phéophycée, *Laminaria digitata* ; ce de façon à caractériser l'ensemble des peuplements épiphytes de l'algue et à mieux cerner les possibilités d'utilisation de tels procédés de lutte en milieu naturel.

Matériel et méthodes

1 - Le matériel étudié

1 - 1 *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt

L'algue typique de cette Fucale est constituée d'un disque de fixation suivi d'une base pérennante à partir de laquelle se développent des rameaux primaires, puis secondaires et tertiaires (voire quaternaires : Critchley, 1983). Ces rameaux sont porteurs d'organes foliacés et de vésicules aérifères (aérocystes).

Le thalle présente un mode de croissance apicale; la cellule apicale étant située au fond d'une crypte. Les zones les plus âgées de l'algue se situent au niveau du disque de fixation.

Cette espèce pérennante (Critchley, 1983) présente une évolution saisonnière assez marquée. Ainsi la perte des aérocystes en période estivale provoque une chute des rameaux secondaires et tertiaires et

s'accompagne d'une sénescence progressive des rameaux primaires. Avant la chute complète de ces derniers, de nouveaux rameaux primaires débutent leur croissance sur la partie pérennante. Ces observations effectuées dans le sud de l'Angleterre (Jephston et Gray, 1977) semblent effectives sur nos côtes.

Sargassum muticum colonise l'étage infralittoral ainsi que les cuvettes et les zones d'écoulement de l'étage médiolittoral (Gruet, 1976; Cosson et al., 1977).

1-2 Laminaria digitata (L.) Lamouroux

Le sporophyte de cette Phéophycée de l'ordre des Laminariales, qui constitue l'algue typique, se différencie en un système de crampons ou haptères surmonté d'un stipe auquel fait suite une lame ou fronde divisée en lanières.

La formation des tissus du stipe et de la lame est assurée par un méristème intercalaire situé à la jonction stipofrondale. Au niveau de la lame, le fonctionnement de cette zone repousse les tissus les plus anciens vers les extrémités distales de l'algue. Sur les côtes bretonnes la croissance active de l'algue a lieu entre les mois de décembre et juillet.

Laminaria digitata est une espèce de faciès rocheux et de zone moyennement battues et/ou à fort courant (Lewis, 1964). Elle colonise l'étage infralittoral (Feldmann, 1978).

2 - Site d'étude et échantillonnage

2-1 Sargassum muticum

Les prélèvements ont été réalisés en Rade de Brest sur le site de Loumergat à trois périodes de l'année: le 17 mai, le 1 août et le 26 septembre 1988.

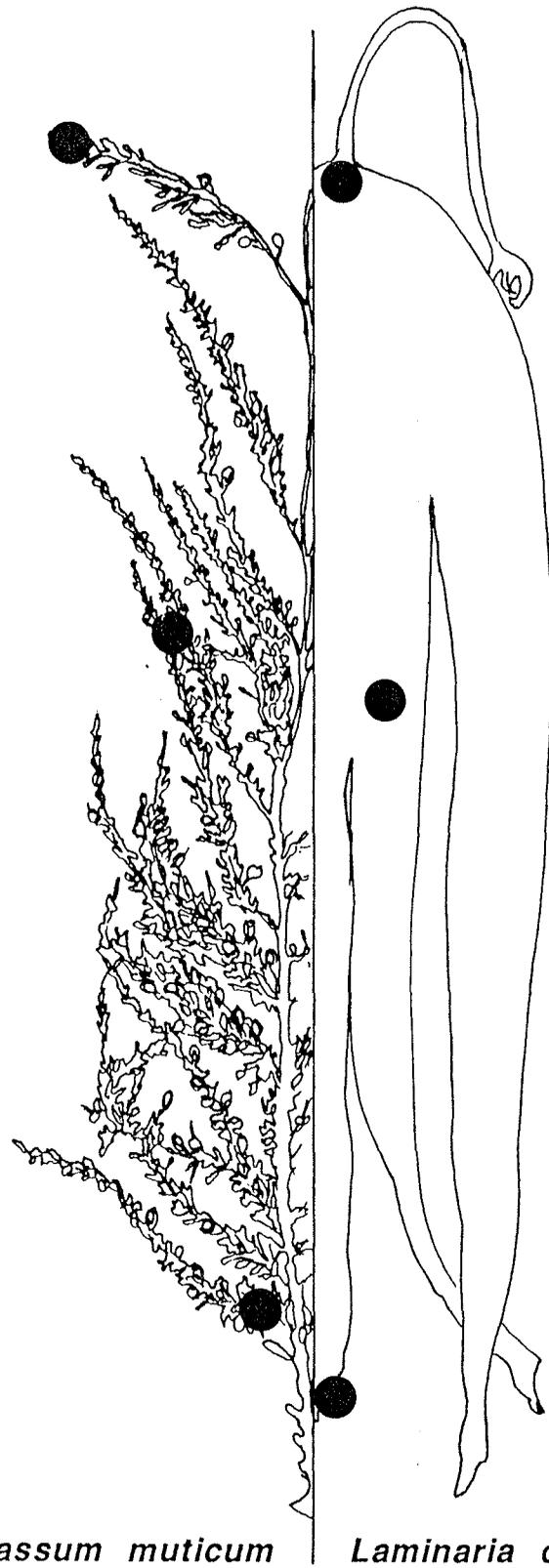
Au mois de mai, l'échantillonnage porte sur les rameaux secondaires et tertiaires situés en zones jeune, médiane et âgée (figure 1). Certains rameaux du mois de mai sont laissés à macérer en eau de mer pendant trois semaines; cette suspension d'algues en putréfaction a servi à rechercher des souches bactériennes présentant une activité alginolytique.

Au mois d'août, seuls les aérocystes ont été prélevés afin de dénombrer et de rechercher les souches utilisant les alginates.

tissu jeune

tissu médian

tissu âgé



Sargassum muticum

Laminaria digitata

figure 1 : Niveaux échantillonnés sur les thalles de *Sargassum muticum* et *Laminaria digitata*.

Au mois de septembre, suite à la chute des aérocystes, seules les zones jeune et âgée ont pu être étudiées: la zone jeune correspond, à cette époque, à la nouvelle génération de rameaux primaires, qui se développent à partir de la base pérennante du thalle; la zone âgée est représentée par les rameaux secondaires et tertiaires encore présents à la base de l'algue.

2 - 2 Laminaria digitata

Les prélèvements ont été effectués sur la zone infralittorale de l'île de Molène.

Des pièces d'algue ont été découpées sur le terrain, en zones jeune (stipofrontale), médiane (au niveau des lanières) et âgée (extrémités distales de la fronde) (figure 1).

Les différents prélèvements sont réalisés dans des conditions d'aseptie compatibles avec une étude bactériologique. Les échantillons d'algues sont transportés dans un flacon contenant de l'eau de mer stérile maintenue à une température d'environ 12°C.

3- Analyse quantitative des peuplements bactériens

3 - 1 Mise en suspension des bactéries épiphytes

Au laboratoire, les échantillons d'algues sont rincés dans de l'eau de mer stérile de façon à débarasser la surface algale du film d'eau susceptible de contenir des bactéries libres, pélagiques ou de contamination.

Les bactéries épiphytes sont ensuite décrochées par une méthode de stomaching (Fry et Humprey, 1978).

Les échantillons d'algue sont placés dans un sac stérile contenant 40ml d'eau de mer stérile; l'onde de choc provoquée par l'action mécanique de deux palettes métalliques et propagée dans un volume total d'environ 200ml, décroche les bactéries incrustées à la surface de l'algue. La durée du traitement est de 10 mn et le modèle utilisé un stomacher LABBLENDER 400.

3 - 2 Numérations directes

3 - 2 - 1 Microscopie photonique à épifluorescence

(*Sargassum muticum*)

Un échantillon de la suspension récupérée après stomaching est fixé au formaldéhyde à 2%. Cinq ml sont ensuite colorés à l'acridine orange (concentration finale: 0,01%) pendant 2 mn et les bactéries sont récupérées sur un filtre Nuclepore (porosité 0,2 μ m), préalablement noirci au noir Irgalan (Hobbie et al., 1977).

Les numérations sont effectuées en épifluorescence sur un microscope Olympus BH2, au grossissement x1000, par comptage de 20 champs pris au hasard à la surface d'un filtre.

3-2-2 Microscopie électronique à balayage (*Laminaria digitata* et *Sargassum muticum*)

Cette technique a été retenue pour *Laminaria digitata* en raison des difficultés que posait l'utilisation de la microscopie photonique. En effet, les bactéries décrochées des surfaces algales avaient tendance à s'agglomérer dans le mucus de l'algue, produit en quantité importante lors de la découpe des zones jeune et médiane et à former des amas incomptables. Cette technique a en outre déjà été utilisée par des auteurs pour dénombrer les bactéries associées aux algues à tissus épais (Sieburth et Tootle, 1981; Koop et al., 1982).

Les échantillons d'algues sont fixées au glutaraldéhyde à 2,5%; la solution est préparée dans un mélange stérile (pH 7,2) eau de mer-tampon cacodylate 0,1M (v:v)(3:1) + CaCl₂ (0,01%). Ils sont ensuite rincés en eau de mer tamponnée, partiellement déshydratés dans des bains d'alcool de degré croissant, passés au point critique (Anderson, 1951) puis métallisés.

Le comptage des bactéries est effectué sur un microscope électronique à balayage (MEB), type Jeol JSM 35, au grossissement x4000 (à 35 KV), soit sur une surface de 642 μ m² et sur 20 champs pris au hasard à la surface d'un disque d'algue.

Cette technique a également été utilisée pour *Sargassum muticum*, sur les échantillonsensemencés par de souches alginolytiques, afin de rechercher d'éventuelles zones de nécrose sur l'algue.

3-3 Numérations sur milieux de culture

Les microflores viables sont obtenues par étalement de 0,1ml de suspension à des dilutions appropriées sur deux milieux de culture (dont la

composition figure dans l'annexe 1):

- le milieu 2216E (Oppenheimer et Zobell, 1952) considéré comme l'un des moins sélectif en milieu marin et permettant l'obtention de la microflore hétérotrophe.
- un milieu à base d'alginate. L'utilisation de ce milieu a pour but de sélectionner des peuplements capables d'utiliser les alginate, comme source de carbone et d'énergie.

Chaque étalement est dupliqué. Les lectures sont effectuées après incubation des boîtes de Petri 8 jours à la température de 19°C.

Les résultats de ces numérations sont exprimés en nombre de bactéries (numérations totales) ou en UFC (Unité Formant Colonie)(numérations sur milieu de culture) par gramme d'algue sèche. Le poids d'algue sèche est déterminé après passage des échantillons d'algues à l'étuve à 60°C jusqu'à obtention d'une valeur constante.

4 - Analyse qualitative des peuplements

4 - 1 Caractérisation des souches

A partir d'une boîte de Petri (contenant un milieu à base d'alginate pour *Sargassum muticum* et un milieu 2216E pour *Laminaria digitata*), 20 colonies sur chacun des niveaux étudiés sont prélevées au hasard et purifiées par repiquage successif.

Leurs caractéristiques sont déterminées sur galeries API 20B (Baleux, 1976). Ce système de galeries standardisées permet de tester la production de certaines enzymes extracellulaires (oxydase, catalase, protéase, β galactosidase, uréase et tryptophanase), l'hydrolyse de 12 sucres et polyols (sac., man., fru., glu., mal., amd., rha., gal., mne., sor., gly.), la formation d'H₂S à partir du thiosulfate, l'utilisation du citrate en tant que source unique de carbone et la production d'acétoïne à partir de l'acide pyruvique. La fermentation du glucose est testée sur milieu Hugh et Leifson (1953). Des observations microscopiques (morphologie, mobilité, coloration Gram et sporulation) sont associées à cette série.

De plus, l'aptitude des souches à se développer à des températures de 5 et 30°C et sur milieu 2216E à base d'eau distillée (0‰) a été étudiée.

4 - 2 Traitement des données

Les résultats de ces tests sont rentrés sur fichiers informatisés et

traités en taxonomie numérique sur un microordinateur.

Sur ce principe, les caractères ne sont pas hiérarchisés comme dans les méthodes de taxonomie classique. Toutes les souches à classer sont regroupées par deux; à chaque pair est associé le coefficient de Sokal et Michener (1958), qui tient compte des similitudes positives et négatives. Puis les regroupement des souches sont présentés sous forme de dendrogrammes, en utilisant la variance comme critère d'aggrégation (Benzecri et al., 1973; Delabre et al.; 1973). Le programme calcule en outre un indice de régularité fonctionnel (E), lié à la fréquence relative d'apparition de chaque caractère (Troussellier et Legendre, 1981) et un indice moyen d'activité métabolique (Ima), basé sur le pourcentage de réponses positives aux tests métaboliques (Troussellier et Baleux, 1981).

5 - Recherche des souches à activité alginolytique

Deux techniques ont permis la visualisation de l'activité alginolytique de souches isolées de *Sargassum muticum*.

5 - 1 Technique du cup-plate

Cette technique a été adaptées par Boyen (1987) selon Bertheau et al. (1984) pour la detection rapide d'activité alginatase à partir de solutions enzymatiques obtenues après culture de souches bactériennes pures sur un milieu à base d'alginates.

Elle s'est avérée également directement utilisable à partir de suspensions bactériennes, et constitue ainsi un outil pratique pour le screening de souches bactériennes.

Les suspensions sont ensemencées dans des puits taillés à l'emporte pièce sur un milieu gelosé à base d'alginates (cf annexe 1), coulé en boîtes de Petri. Les boîtes sont ensuite incubées à la température de 25°C pendant 48 h, puis leur révélation est effectuée par une solution tampon d'acétate de sodium 60 mM à pH 4,2 contenant du bleu de toluidine (0,1% w/v); les boîtes sont ainsi maintenues 10 mn sous agitation lente puis rincées (3x 10 mn) dans la solution tampon seule et enfin fixées dans une solution aqueuse de molybdate d'ammonium (4% w/v).

Le bleu de toluidine, réactif métachromatique présente un affinité pour les groupements carboxyliques de l'alginate. L'activité alginolytique se visualise sous forme de halos clairs autour des puits qui contrastent

avec la coloration bleu mauve du milieu gélosé. Des souches à activité alginolytique ensemencées sur un milieu sans alginate ne présentent pas de halo à la révélation, ce qui témoigne de la spécificité de la réaction colorée sur l'alginate. En outre, l'ensemencement d'une suspension contenant des enzymes alginolytiques détruits par autoclavage ne laissent pas apparaître de halo (Boyen, 1987).

5 - 2 Liquéfaction

Les souches dont l'activité s'est révélée positive par la technique du cup plate ont ensuite été ensemencées sur des solutions visqueuses contenant 20 et 40g d'alginate/litre et la liquéfaction du milieu observée de visu.

Deux types d'alginate ont été testés:

- l'un, extrait de *Laminaria digitata* fournit par la Sobalg
- l'autre, préparé au laboratoire à partir de sargasses prélevées sur le site étudié. Le protocole d'extraction de cet alginate est présenté dans l'annexe 2.

Ce dernier est testé de façon d'une part à vérifier l'efficacité de ces souches dans la dégradation des alginate de *Sargassum muticum*, et d'autre part à sélectionner les souches qui seront testées sur le tissu algal.

6 - Tests d'agressivité des souches alginolytiques sur le tissu algal

Ces tests ont été réalisés au mois de septembre sur les rameaux primaires se développant sur la base pérennante de *Sargassum muticum*.

Quatre souches ont été testées. Elles sont issues des zones jeune, médiane, âgée et des aerocystes de l'algue.

Sur chacun de ces niveaux la souche présentant l'activité alginolytique la plus marquée (établit en terme de rapidité de liquéfaction du milieu contenant 40g/l) a été sélectionnée.

Les rameaux sont séparés du thalle, rincés en eau de mer stérile, et ensuite contaminés par chacune de ces quatre souches selon le protocole suivant:

- 1- une première feuille sert de témoin
- 2- une deuxième feuille est contaminée :
 - directement par la colonie prélevée sur la boîte de Petri et déposée à la surface de l'algue.
 - par une goutte de suspension bactérienne dense (colonie prélevée sur

boîte de Petri et mise en suspension en eau de mer stérile).

3- sur une troisième feuille 2 lésions sont pratiquées à l'aide d'un scalpel préalablement flambé et refroidi; l'une de ces lésions estensemencée par une souche en suspension.

Ces trois feuilles sont ensuite placées durant 48h dans une boîte de Petri sur un filtre (type Whatman) imbibé d'eau de mer, de façon à maintenir un taux d'humidité convenable au voisinage des feuilles.

4- une quatrième feuille est plongée 1 heure dans une suspension bactérienne, rincée puis immergée pendant 8 jours dans un tube contenant de l'eau de mer stérile.

5- une cinquième feuille est immergée pendant 8 jours dans une suspension bactérienne dense.

A l'issue de l'expérience, les feuilles sont fixées dans une solution tamponnée de glutaraldéhyde puis déshydratées selon le protocole décrit dans le § 3-2 en vu de leur observation au MEB.

Résultats et discussion

1 - Densités des peuplements épiphytes

Les densités des microflores totales et viables des deux espèces algales sont présentées dans le tableau 1.

1 - 1 Microflore totale

Sur *Sargassum muticum*, les densités passent de $2,8 \cdot 10^9$ sur le tissu jeune à $6,3 \cdot 10^9$ bactéries/ g sur le tissu âgé au mois de mai. Au mois de septembre, les densités sont légèrement supérieures ($8,8 \cdot 10^9$ bactéries/g) sur les parties âgées de l'algue dont la sénescence était plus accentuée qu'au mois de mai, mais deviennent plus faibles sur les parties jeunes ($7,6 \cdot 10^6$ bactéries/g).

Sur *Laminaria digitata*, la colonisation de la fronde tend à s'intensifier entre mai et septembre. Les densités les plus faibles sont observées au niveau de la zone jeune (respectivement $1,6$ et $3 \cdot 10^9$ bactéries/ g en mai et septembre), les plus fortes sur les extrémités de l'algue (respectivement $1,1$ et $1,5 \cdot 10^{10}$ bactéries/g en mai et septembre).

Les densités de microflore totale sont ainsi comprises chez les deux espèces algales entre 10^9 et 10^{10} bactéries/ g d'algue sèche.

Il faut cependant préciser que ces valeurs ne sont pas directement comparables compte tenu des méthodes différentes utilisées (épifluorescence et MEB) et du mode d'expression des résultats choisi. Le stomacher ne décroche pas la totalité des bactéries épiphytes, ce qui conduit à une sous évaluation des densités trouvées à partir des suspensions. D'autre part l'expression des résultats par gramme d'algue sèche ne prend pas en compte les différences d'épaisseur des tissus des ces deux algues; ainsi les tissus de *Sargassum muticum* sont plus fins et les densités de bactéries associées sont en valeur relative sur évaluées par rapport à celles de *Laminaria digitata*.

Toutefois les résultats restent comparables sur chacune des espèces choisies et montrent dans les deux cas une augmentation de la colonisation des tissus jeunes aux tissus âgés des thalles.

1 - 2 Microflore hétérotrophe viable

1 - 2 - 1 sur milieu 2216E

La gradation de la colonisation des tissus jeunes au tissus âgés apparaît plus marquée sur les dénombrements effectués sur milieu 2216E.

Ainsi au mois de mai les densités passent chez *Sargassum muticum* de $8,9 \cdot 10^5$ sur le tissu jeune à $9,9 \cdot 10^7$ UFC/g sur le tissu âgé et chez *Laminaria digitata* de $2,4 \cdot 10^4$ à $1,7 \cdot 10^7$ UFC/g.

Au mois de septembre, la même progression est observée, mais les nombres de bactéries cultivables sur chacun des niveaux sont supérieurs à ceux notés en mai.

1 - 2 - 2 sur milieu à base d'alginate

Les densités trouvées montrent que ce milieu permet le développement d'une fraction plus importante des peuplements bactériens épiphytes que le milieu 2216E. Les densités évoluent, respectivement en mai et septembre, de $1,1$ et $1,5 \cdot 10^7$ UFC/g sur les zones jeunes à $3,8 \cdot 10^8$ et $3,2 \cdot 10^9$ sur les tissus âgés.

Les aerocystes, quant à eux, présentent une plus faible densité avec une valeur de $5,6 \cdot 10^5$ UFC/g.

		mai		septembre		août
		<i>S. muticum</i>	<i>L. digitata</i>	<i>S. muticum</i>	<i>L. digitata</i>	<i>S. muticum</i>
totale	j	2,8E+09	1,6E+09	4,3E+08	3,0E+09	
	m	3,5E+09	3,2E+09		6,5E+09	
	a	6,3E+09	1,1E+10	8,8E+09	1,5E+10	
2216E	j	8,9E+05	2,4E+04	7,6E+06	5,3E+04	
	m	6,1E+06	5,8E+05		3,2E+05	
	a	9,9E+07	1,7E+07	1,8E+09	1,2E+08	
alginates	j	1,1E+07		1,5E+07		
	m	2,3E+07				
	a	3,8E+08		3,2E+09		
	aero.					5,6E+05

tableau 1 : Densités des microflore totale (en nombre de bactéries/g. d'algue sèche) et cultivables sur milieu 2216E et sur milieu à base d'alginates (en UFC/g. d'algue sèche) sur *Sargassum muticum* et *Laminaria digitata*.

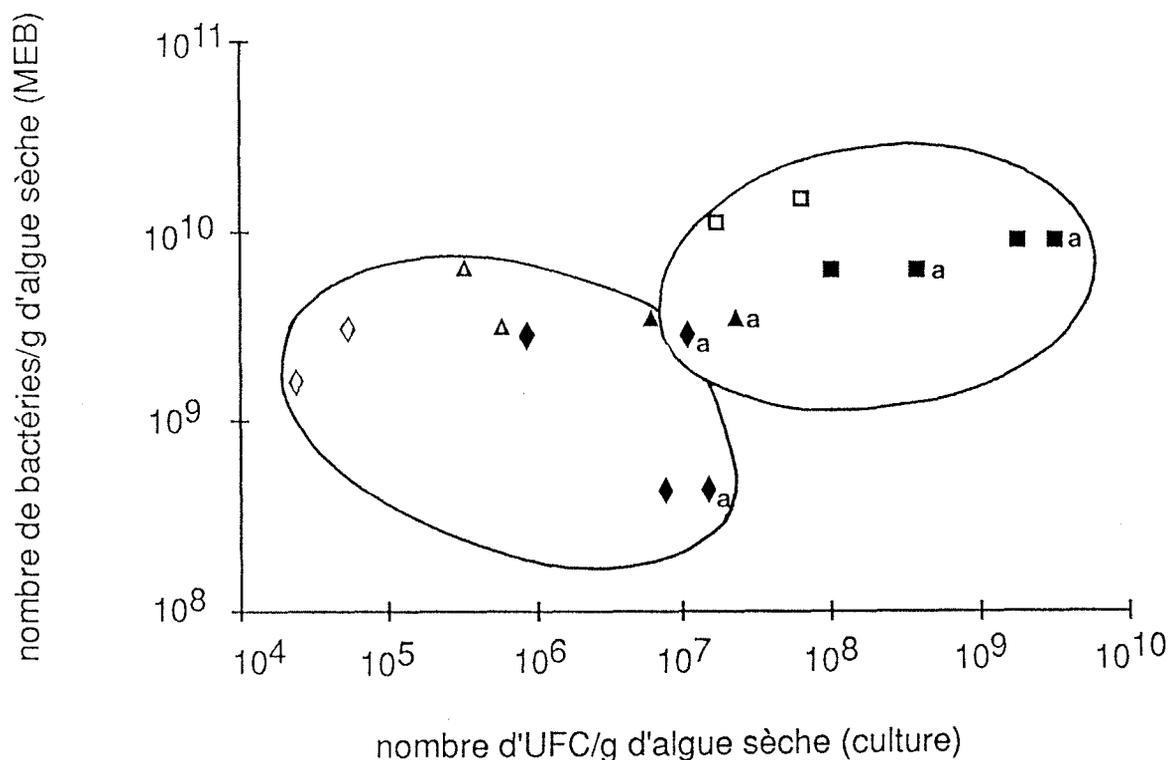


figure 2 : Comparaison des microflore cultivées sur milieu 2216E () et sur milieu à base d'alginates (a) (en abscisse) et totales (en ordonnée) sur les tissus jeunes (◇), médians (▲) et âgés (■□) de *Sargassum muticum* (symboles en plein) et *Laminaria digitata* (symboles en creux).

1 - 3 Comparaison des microflores viables et totale

La figure 2 permet de mieux visualiser l'abondance de ces deux microflores.

Si les densités de microflore totale sont comprises chez ces deux espèces algales entre $4,3 \cdot 10^8$ et $1,5 \cdot 10^{10}$ bactéries/ g d'algue sèche, elles présentent sur milieu de culture des valeurs s'échelonnant entre $2,4 \cdot 10^4$ (*Laminaria digitata*) et $1,8 \cdot 10^9$ (*Sargassum muticum*). Le même phénomène apparaît également sur milieu à base d'alginate, bien que de façon moins marquée.

Deux ensembles de points se différencient, correspondant, l'un au tissu jeune et médian, l'autre au tissu âgé et traduisant une augmentation du nombre de bactéries cultivables avec le vieillissement des tissus algaux.

Le gradient de colonisation des tissus jeunes au tissu âgés, observé sur *Sargassum muticum* et *Laminaria digitata*, a également été noté sur d'autres espèces algales telles que *Laminaria longicruris* (Canada) (Laycock, 1974) ou *Laminaria pallida* et *Ecklonia maxima* (Afrique du Sud) (Mazure et Field, 1980). Conover et Sieburth (1964) citent des densités de 10^1 à 10^4 bactéries/ 0,5g d'algue sèche chez *Sargassum natans* et à 10^5 chez *Sargassum fluitans* sur les extrémités des frondes; Sieburth (1968) précise que les autres parties de l'algue sont de 100 à 1000 fois plus colonisées que les extrémités jeunes.

Ces observations peuvent être mises en relation avec le métabolisme de ces algues et plus précisément avec leur cycle de croissance. Ainsi la formation récente des tissus jeunes pourrait expliquer leur moindre colonisation par rapport à ceux des autres niveaux étudiés. De plus une production de substances polyphénoliques (tannins) à activité antibactérienne a été mise en évidence au niveau des extrémités jeunes de sargasses (Sieburth et Conover, 1965; Padmini Sreenivasa Rao et al., 1986). La teneur en polyphénols de *Sargassum muticum* se développant au niveau de l'île de Wight passe par un maximum aux mois de juin-juillet et correspond alors à environ 5% du poids d'algue sèche (Gorham et Lewey, 1984). Ce matériel polyphénolique est principalement constitué de phloroglucinol (Glombitza et al., 1978) et se présente sous forme physodes, organites réfringents, localisés entre autre au niveau des cellules sécrétrices de mucilage (Craigie et Mc Lachlan, 1964; Ribier, 1969). Sieburth et Conover (1965) dénombrent ainsi de 40 à 68 physodes par cellules sur une sargasse en croissance contre 2 à 12 sur des thalles ne présentant pas de croissance active. Ces mêmes auteurs montrent que

la production de ces tannins coïncide avec la réduction du fouling bactérien des tissus en croissance active de plusieurs espèces algales. De même chez *Laminaria digitata*, la production de composés antimicrobiens présente un pic en hiver (Hornsey et Hide, 1976) soit à la période de croissance de l'algue.

Ces composés polyphénoliques sont solubles dans l'eau et peuvent créer une barrière contre l'invasion microbienne (Haborne, 1977) en provoquant une réponse chimiotactique négative de la part de bactéries mobiles (Chet et al., 1975). D'autre part, ils ont la propriété de précipiter les protéines (Sieburth et Conover, 1965) et bien que de fortes densités bactériennes soient notées au niveau des tissus jeunes, l'action de ces bactéries sur l'algue pourrait être limitée par l'inactivation de leurs exoenzymes (Sieburth, 1968).

Ces quelques observations seraient susceptibles d'expliquer la plus faible proportion de microflore tant totale que viable décelée à ce niveau sur milieu de culture par rapport aux autres tissus étudiés.

Sur les tissus âgés, le développement des peuplements bactériens serait favorisé par la sénescence progressive des cellules algales et la libération de matière organique dissoute lors de leur lyse (Laycock, 1974; Linley et al., 1981). L'augmentation de la microflore totale s'accompagne de celle de la microflore cultivable, ce qui suggère une évolution de la composition des peuplements avec l'état de détérioration des tissus de l'algue.

2 - Caractéristiques des peuplements bactériens

2 - 1 Caractéristiques générales

Les caractéristiques générales des peuplements bactériens isolés des deux espèces algales sont consignées dans le tableau 2.

Les 109 souches isolées présentent une morphologie de bâtonnet et sont Gram négatif.

Sur l'ensemble des souches, 93,4% d'entre elles se développent à 5°C, contre 85,5% à 30°C. Leur optimum de température est plus proche de 19°C que de 10°C, ce qui témoigne de l'existence d'une microflore de type mésophile associée à ces algues.

Les quelques souches se développant sur un milieu à base d'eau distillée (0‰) sont décelées sur les tissus âgés des thalles de *Sargassum*

	<i>S. muticum</i>			<i>L. digitata</i>		
	j	m	a	j	m	a
nombre de souches	19	17	19	18	18	18
5 °C	94,7	76,5	94,7	94,4	100	100
30 °C	100	76,5	100	88,9	83,3	77,7
0 %	5	0	15,8	0	0	0
mobilité	52,6	88,2	100	94,4	72,2	33,3
fermentation du glu	26	76,5	84,2	11,1	22,2	0
oxydase	10,5	17,6	21	72,2	66,6	27,7
catalase	73,7	88,2	68,42	94,4	83,3	44,4
<i>Pseudomonaceae</i>	73,7	23,5	15,8	88,8	77,7	100
<i>Vibrionaceae</i>	10,5	17,6	21	11,1	16,6	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	15,8	58,8	63,1	0	5,5	0

tableau 2 : Caractéristiques générales des souches isolées des tissus jeunes, médians et âgés de *Sargassum muticum* et *Laminaria digitata*. Les résultats sont exprimés en pourcentages de réponses positives.

muticum. Elles indiquent que des souches d'origine non typiquement marines sont capables de se développer sur l'algue.

Le nombre de souches mobiles tend, sur *Sargassum muticum*, à augmenter avec l'état de détérioration des tissus (de 52,6% sur le tissu jeune à 100% sur le tissu âgé), alors qu'il diminue au contraire chez *Laminaria digitata* (de 94,4% sur le tissu jeune à 33,3% sur le tissu âgé). Ces souches non mobiles observées chez *Laminaria digitata* correspondent à des colonies pigmentées en jaune orange dont les cellules apparaissent sous forme de long bâtonnets associés en chaîne à l'observation microscopique. De telles bactéries pigmentées n'ont été qu'occasionnellement rencontrées chez *Sargassum muticum*, ce qui pourrait suggérer l'existence d'espèces bactériennes différentes sur ces deux espèces algales.

Sur la base de leur aptitude à fermenter le glucose et sur la production ou non d'une oxydase, ces bâtonnets Gram négatif ont été répertoriés en trois grands groupes taxonomiques: *Pseudomonaceae*, *Vibrionaceae* et *Enterobacteriaceae* (Bauman et Bauman, 1984; Palleroni, 1984; Brenner, 1984).

La flore dominante du tissu jeune de *Sargassum muticum* et de la fronde de *Laminaria digitata* est constituée de *Pseudomonaceae*. Les

Vibrionaceae (fermentatif et possédant une oxydase) ne représentent pas plus de 21% de la microflore associée à ces deux espèces; ils ne sont pas représentés sur le tissu âgé de *Laminaria digitata*. Les *Enterobacteriaceae* (fermentatif et oxydase négatif) ne sont pas représentées sur *Laminaria digitata* (à l'exception d'une souche); ce groupe correspond à plus de la moitié des souches isolées des tissus médian et âgé (respectivement 58,8% et 63,1%) de *Sargassum muticum*. Ces entérobactéries sont des souches d'origine humaine ou animale. Leur proportion non négligeable sur *Sargassum muticum* pourrait s'expliquer par la situation de la zone de prélèvement (fond de Rade) et la proximité des rejets urbains. Ce groupe taxonomique est par contre très peu représenté sur les frondes de laminaires prélevées à Molène, soit à environ 6 milles au large des côtes bretonnes.

2 - 2 caractéristiques métaboliques (tableau 3)

L'activité protéolytique des souches augmente avec l'âge des tissus. Cette augmentation est plus marquée sur *Sargassum muticum* où 52,6% des souches isolées de la zone âgée produisent une protéase contre 10,5% en zone jeune. La valeur maximale enregistrée sur *Laminaria digitata* reste inférieure à 30%. Le développement de souches à activité protéolytique peut être relié à la sénescence des tissus âgés.

Sur l'ensemble des souches étudiées aucune n'est capable de dégrader le thiosulfate, une seule possède une uréase.

Le pourcentage de souches assimilant le nitrate passe de 5,4% en zone jeune à 36,8% sur le tissu âgé de *S. muticum* mais reste faible à nul sur *Laminaria digitata*.

Afin de mieux visualiser les aptitudes métaboliques des peuplements isolés, des profils métaboliques ont été établis à partir des 12 sucres et polyols testés (figure 3).

Les quatre sucres et polyols les plus utilisés sont le glucose, maltose, mannitol et galactose. Les souches isolées des tissus jeunes de *Sargassum muticum* et *Laminaria digitata* hydrolysent respectivement 8 et 7 des 12 sucres et polyols testés; le mannose, l'arabinose, le sorbitol et le glycérol ne sont pas utilisés. Le mannitol est hydrolysé par 10,5% des souches isolées de ce niveau sur *Sargassum muticum* et 66,6% de celles isolées de *Laminaria digitata*; le glucose par respectivement par 15,7 et 38,8%. Les isolats associés à la zone médiane se situent en position intermédiaire entre les tissus jeune et âgé. Le glucose est le plus utilisé, par un maximum de 47% des souches chez *Sargassum muticum* (de même

que le mannitol et le maltose) et 44% chez *Laminaria digitata*. Les souches isolées des tissus âgés présentent de plus forts pourcentages d'utilisation de ces substrats : respectivement 3 et 8 des substrats testés sont hydrolysés par au moins 50% des souches, avec un maximum de 73,6% (glucose - *Sargassum muticum*) et 55,5% (maltose - *Laminaria digitata*). De plus la totalité des substrats testés sont utilisés sur *Sargassum muticum* et les 11/12 sur *Laminaria digitata*.

Ainsi il apparaît à la fois une augmentation du nombre de substrats hydrolysés et du pourcentage de souches capables de les hydrolyser avec le vieillissement des tissus algaux.

	<i>S. muticum</i>			<i>L. digitata</i>		
	j	m	a	j	m	a
protéase	10,5	47	52,6	16,6	22,2	27,7
nitrate réductase	5,2	23,5	36,8	0	5,5	0
β galactosidase	57,9	47	78,9	16,6	38,8	11,1
uréase	0	0	0	5,5	0	0
tryptophanase	0	17,6	52,6	0	0	0
citrate	0	0	10,5	22,2	22,2	0
VP	0	0	36,8	33,3	16,6	33,3
H ₂ S	0	0	0	0	0	0
saccharose	10,5	17,6	57,8	0	5,5	22,2
arabinose	0	0	36,8	0	0	5,5
mannitol	10,5	47	57,8	66,6	38,8	50
fructose	5,2	29	63,1	16,6	27,7	11,1
glucose	10,5	47	73,6	38,8	44,4	38,8
maltose	15,7	47	68,4	33,3	33,3	55,5
amidon	10,5	35,3	36,8	5,5	27,7	33,3
rhamnose	5,2	17,6	21	0	0	5,5
galactose	5,2	41,2	52,6	22,2	22,2	50
mannose	0	17,6	63,1	0	5,5	16,6
sorbitol	0	0	36,8	0	0	0
glycerol	0	17,6	52,6	5,5	0	5,5

tableau 3 : Caractéristiques biochimiques des souches isolées des tissus jeunes, médians et âgés de *Sargassum muticum* et *Laminaria digitata*. Les résultats sont exprimés en pourcentages de réponses positives.

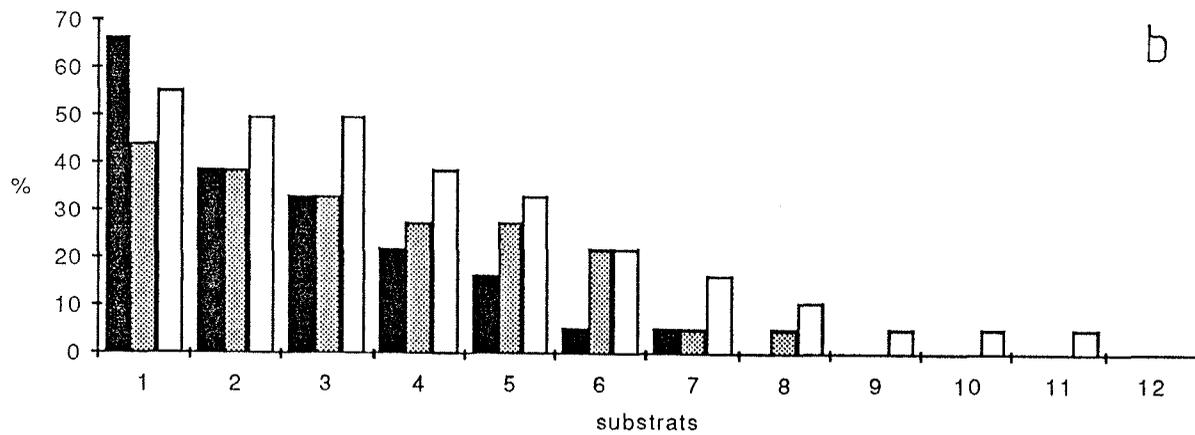
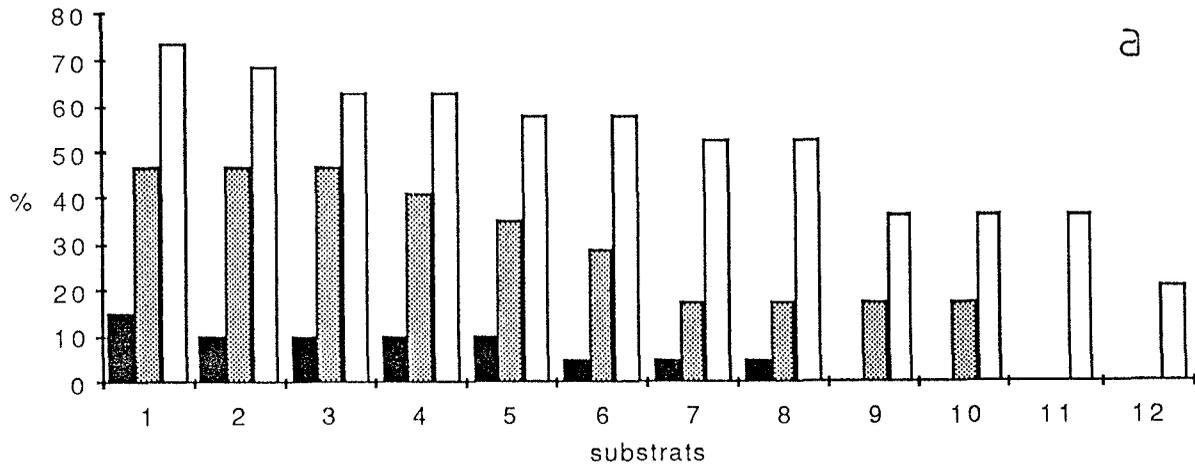


figure 3 : Pourcentages d'hydrolyse des 12 sucres et polyols testés par les souches isolées des tissus jeunes (■), médians (▨) et âgés (□) de *Sargassum muticum* (a) et de *Laminaria digitata* (b). Les substrats sont classés, sur chacun des niveaux, de 1 à 12 en fonction des pourcentages décroissants de réponses positives.

2 - 3 Diversités métabolique et spécifique

Ces observations sont confirmées sur l'ensemble des tests métaboliques effectués sur galerie API 20B par les indices d'activité métabolique et de régularité fonctionnelle (figure 4).

Avec le vieillissement des tissus algaux, les peuplements perdent leur spécialisation comme en témoigne l'augmentation de l'indice d'activité métabolique. Parallèlement l'indice de régularité fonctionnelle augmente également et traduit une diversification des communautés épiphytes. L'évolution de ces indices est plus marquée chez *Sargassum muticum* que chez *Laminaria digitata*.

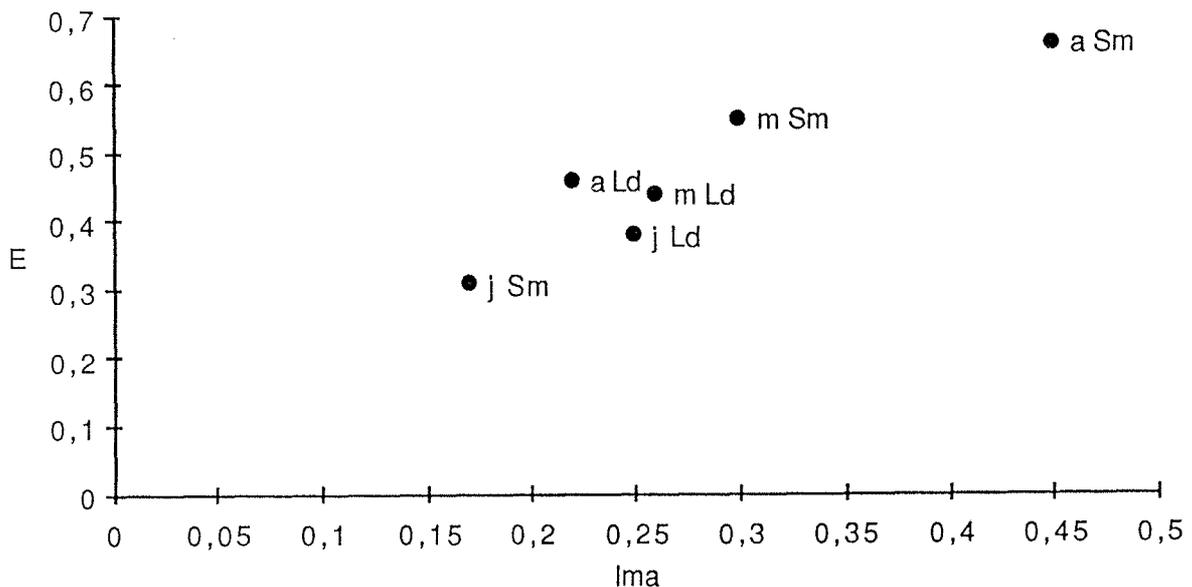


figure 4 : Evolution des indices d'activité métabolique (Ima) et de régularité fonctionnelle (E) sur les tissus jeunes, médians et âgés de *Sargassum muticum* et *Laminaria digitata*.

2 - 4 Comparaison des peuplements épiphytes des deux espèces algales.

Le dendrogramme présenté sur la figure 5 permet une analyse de la diversité des peuplements d'origine différentes.

Les similitudes entre les souches des zones jeunes, médianes et âgées de ces deux espèces diminuent dans l'ordre suivant :

- intrapeuplement : les similitudes les plus fortes sont observées au niveau des souches isolées d'un même niveau pour chacune des deux algues. Certaines de ces souches sont similaires à 100%; elles sont principalement issues des zones jeunes
- inter niveaux : pour chacune des espèces les similitudes sont plus marquées entre les souches isolées des zones jeunes et médianes qu'entre celles isolées des zones médianes et âgées.
- inter espèces : les peuplements isolés de chacune des espèces ne présentent que de faibles similitudes entre eux.

2 - 5 Aptitude des souches à dégrader les alginates

Les résultats présentés dans la tableau 4 montrent que les souches capables de dégrader les alginates sont essentiellement isolées de la zone médiane au mois de mai (59%) et de la zone jeune (37%) au mois de septembre. La souche présentant l'activité alginolytique la plus importante (rapidité de liquéfaction d'un milieu contenant 40g/l d'alginates) est isolée de la zone jeune de l'algue.

	mai		août		septembre	
	N	%	N	%	N	%
j	19	15,8			19	36,8
m	17	58,8				
a	19	21			20	0
aero			15	20		
putréf.	8	0				

tableau 4 : Pourcentages de souches à activité alginolytique, décelées par la technique du cup-plate, sur les souches (N) isolées des niveaux jeune, médian et âgé des frondes et des aerocystes de *Sargassum muticum* et de l'algue en putréfaction.

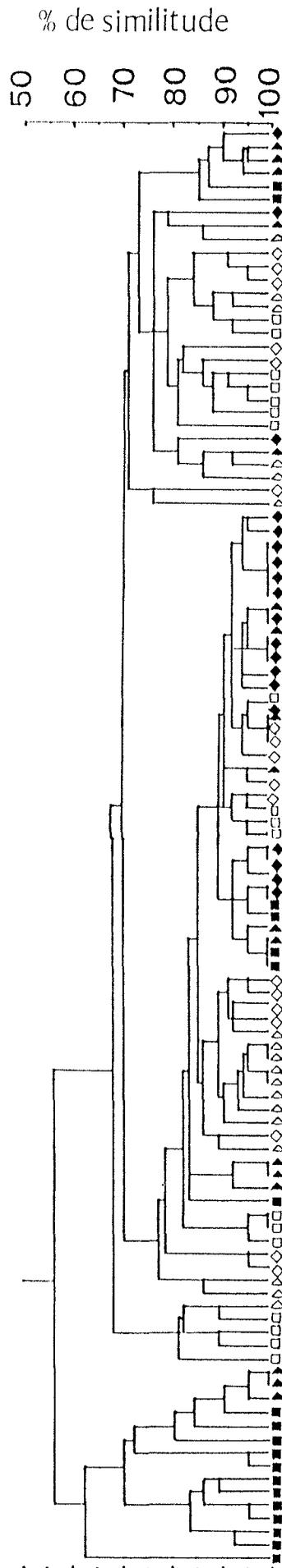


figure 5 : Dendrogramme obtenu à partir de souches isolées des tissus jeunes (◆◆), médians (▲▲) et âgés (■□) de *Sargassum muticum* (symboles en plein) et *Laminaria digitata* (symboles en creux).

Toutes les souches se développant sur un milieu à base d'alginate ne présentent donc pas d'activité alginolytique. Ceci peut être relié au fait que certaines de ces souches ont pu se développer à partir d'"impuretés" associées aux alginate, mais également à une perte de l'activité alginolytique au cours des repiquages successifs.

L'évolution de la composition des peuplements bactériens des tissus jeunes aux tissus âgés, mise en évidence précédemment est confirmée par l'analyse qualitative.

Les peuplements cultivables isolés des tissus jeunes apparaissent plus spécialisés dans leurs besoins nutritionnels, en ce sens qu'ils n'utilisent qu'un nombre réduit de substrats. Ils font place sur les tissus âgés à des peuplements plus diversifiés et à spectre métabolique plus large.

L'aptitude de ces peuplements à utiliser certains substrats entrant dans la composition de ces algues, tels que mannitol, glucose, mannose, galactose ou alginate, permet d'envisager une relation trophique directe entre l'algue et les bactéries qui lui sont associées.

Les faibles ressemblances notées entre les souches isolées de *Sargassum muticum* et de *Laminaria digitata* semblent plus attribuables aux sites de prélèvement de ces deux algues et/ou aux milieux sur lesquels elles ont initialement été cultivées qu'à une spécificité des peuplements bactériens associés à chacune de ces espèces. Sieburth (1968) ne détecte pas de genre bactérien spécifique chez les peuplements épiphytes de *Sargassum* et de *Polysiphonia*. Kong et Chan (1979) trouvent qu'une flore relativement spécifique est associée à chacun des trois phylums algaux se développant dans un même habitat mais ne mettent pas en évidence d'association algue-bactéries spécifique au sein d'un même phylum.

La plupart des souches bactériennes produisant une cellulase sont généralement isolées d'algues vertes, celles produisant une alginase d'algues brunes et celles produisant une agarase d'algues rouges; une partie de cette spécificité pourrait s'expliquer par le fait que ces composés sont respectivement caractéristiques de chacun de ces trois groupes d'algues (Kong et Chan, 1979). Mais il est également envisageable que cette spécificité ne soit pas exclusivement régit par les capacités biosynthétiques de l'algue, mais puisse résulter d'une adaptation des bactéries à utiliser les substrats disponibles. Dans ce sens, des

expériences menées en laboratoire sur du phytoplancton montrent que les composés spécifiques sécrétés par ces algues attirent les bactéries à des seuils de concentration inexplicablement élevés quand on les compare aux très faibles concentrations des composés organiques du milieu marin naturel (Bell et Mitchell, 1972). D'où l'hypothèse formulée par ces auteurs, d'un chimiotactisme qui servirait non pas à conduire les bactéries vers une source de carbone mais à les y maintenir quand elles y arrivent par hasard.

3 - Agressivité des souches alginolytiques sur le tissu algal

Observées à l'oeil nu et à la loupe binoculaire, les feuilles infestées par des souches à activité alginolytique ne présentent pas de signe particulier de nécrose par comparaison avec les feuilles témoins. Cependant la feuille immergée dans une suspension de la souche isolée du tissu jeune de l'algue, laisse apparaître une perte de rigidité associée à une fragilisation de ses tissus. Cette dernière se manifeste par une tendance à la désagrégation au cours de sa préparation en vue de l'observation en microscopie.

Observés au MEB, les endroits contaminés de la surface algale apparaissent en général recouvert d'une couche pluristratifiée de bactéries alors que les échantillons témoins présentent une colonisation plus clairsemée (photo 1). Ces derniers présentent cependant des regroupements préférentiels dans les microdépressions de la surface algale ou autour de diatomées pennées (photo 2). Chez les échantillons immergés durant 8 jours dans une suspension bactérienne cet important développement de bactéries est surtout sensible avec les souches isolées des tissus jeune (photo 5) et médian, dans une moindre mesure avec la souche isolée du tissu âgé et n'apparaît pas avec les souches isolées des aérocystes (photo 6). Cette observation pourrait suggérer que les rameaux jeunes ne constitue pas un substrat favorable au développement de toutes les souches bactériennes, mais elle ne repose que sur l'observation d'un échantillon et demanderait à être confirmé.

Cette expérience montre que des souches bactériennes isolées de l'algue sont capables de dégrader les alginates du tissu algal vivant. Ce principe est d'ailleurs actuellement utilisé pour la préparation de protoplastes (Kloareg et al., 1987). Ces derniers sont obtenus à partir de solutions enzymatiques spécifiques, entre autre issues de souches bactériennes, et non en utilisant les souches bactériennes elles mêmes.

1	2
3	4
5	6

Planche photo : rameaux primaires de *Sargassum muticum*

photo 1: rameau témoin

b : bactéries à forme de bâtonnet

photo 2: rameau témoin

développement de bactéries autour d'une diatomée pennée

photo 3 et 4 : surface du rameau à proximité d'une zone de nécrose
diversification des types morphologiques

c : formes coccoïdes

b : bacilles

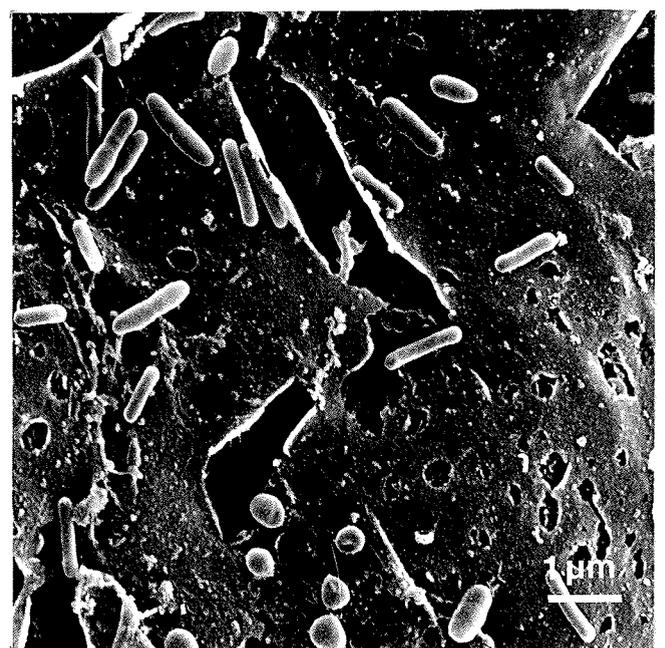
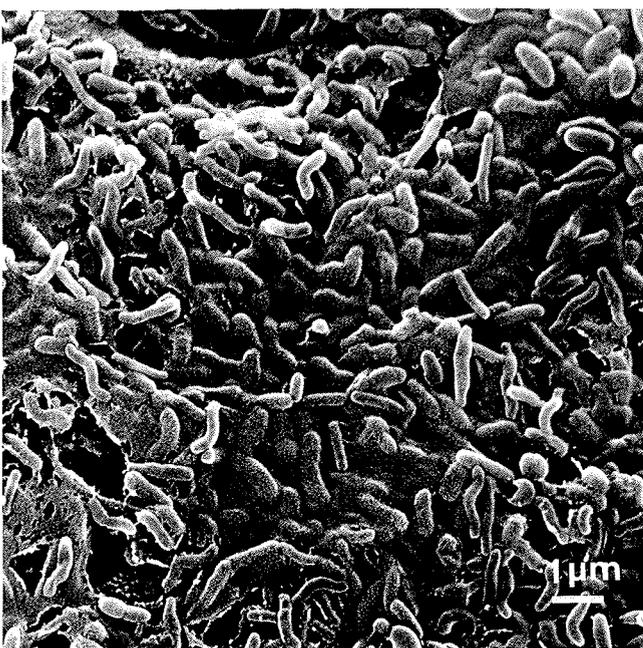
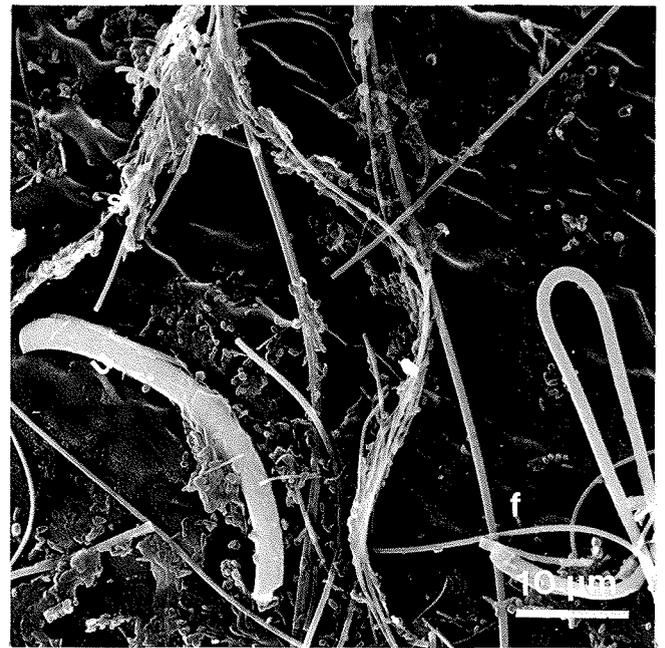
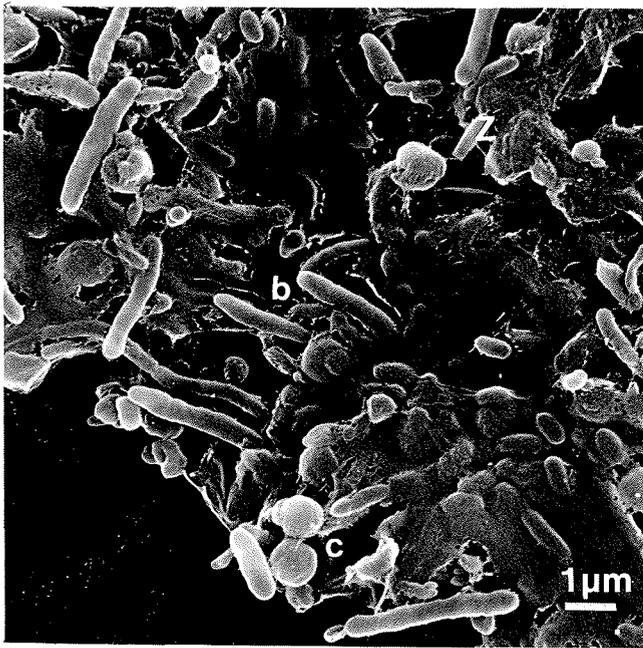
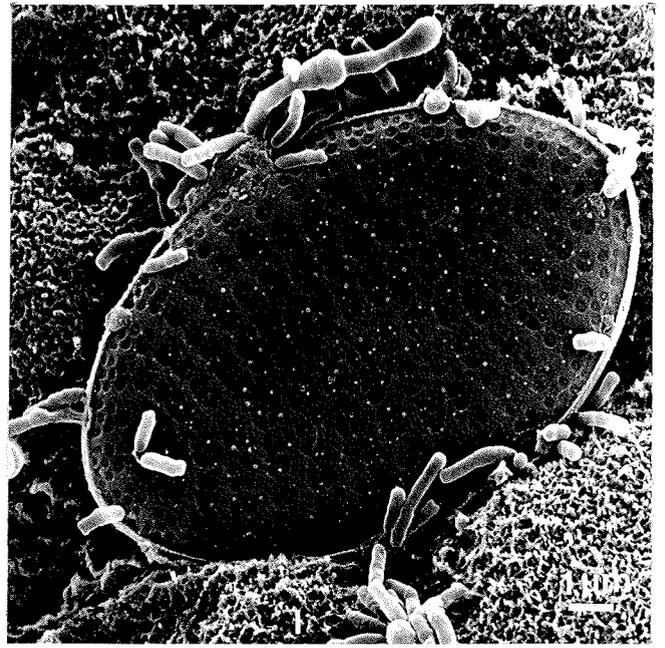
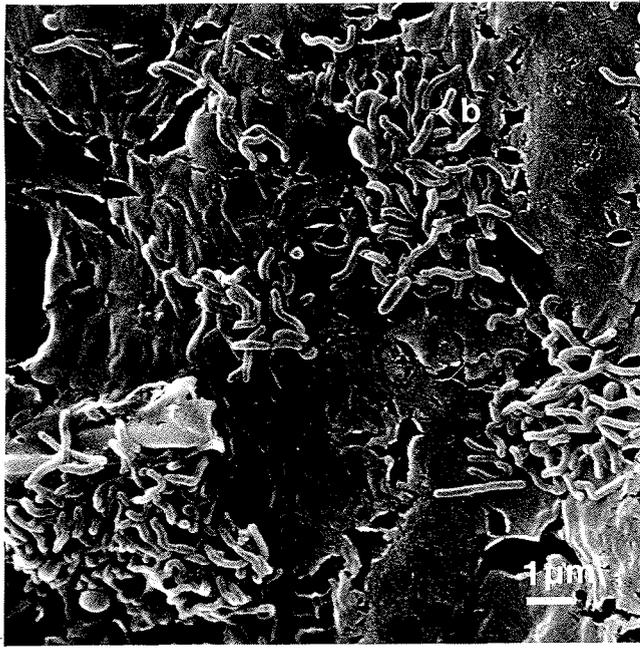
f : formes filamenteuses

photo 5 : rameau infesté par une souche alginolytique isolé du tissu
jeune

couche bactérienne recouvrant la surface algale

photo 6 : rameau infesté par une souche bactérienne isolée des
aerocystes

faible colonisation de la surface algale



Ensemencées directement sur l'algue, il est vraisemblable que ces bactéries utilisent prioritairement pour leur développement des substrats simples plus rapidement métabolisables que les alginates. En effet les composés dissous du mucilage comprenant principalement le mannitol et autres carbohydrates sont plus directement utilisables par les bactéries hétérotrophes que des composés plus complexes tels que les alginates (Lucas et al., 1981) ou les composés particuliers (Stuart et al., 1981). Ce phénomène peut être reflété par le temps mis par des peuplements microhétérotrophes pour utiliser 50% de ces substrats au cours d'incubations réalisées en laboratoire (10°C), à partir de mucilage ou de particules algales. Ce temps est de 48h pour le mannitol, contre 144h pour les sucres plus complexes et les alginates (Lucas et al., 1981) et de 240h pour les débris particuliers (Stuart et al., 1981).

Conclusions

La surface de *Sargassum muticum* constitue un substrat favorable au développement de bactéries. Ces peuplements bactériens épiphytes évoluent avec le vieillissement des tissus de l'algue. Cette évolution se traduit par:

- une augmentation de la colonisation bactérienne
- un élargissement du spectre métabolique de ces peuplements
- une modification de leur composition spécifique associée à une diversification des communautés épiphytes.

Les peuplements bactériens associés à *Laminaria digitata* présentent des caractéristiques similaires.

Outre l'action éventuelle de paramètres écologiques (non abordée dans cette étude) cette évolution apparaît liée à la formation de tissu neuf, ainsi qu'à la production de substances à activité antibactérienne, qui tendraient à minimiser le fouling bactérien ou à perturber le métabolisme des bactéries épiphytes sur ces tissus.

A l'inverse, la sénescence des tissus âgés associée à une lyse progressive des cellules algales s'accompagne d'une libération de matière organique dissoute favorable au développement bactérien.

Les souches alginolytiques ne représentent qu'une fraction de la microflore épiphyte mais sont présentes sur toute la surface de la fronde.

Ensemencées à forte densité, certaines d'entre elles sont capables de provoquer une modification de la rigidité des tissus de l'algue vraisemblablement liée à une dégradation des alginates des parois des cellules algales.

Cependant les résultats obtenus au cours de cette étude ne permettent pas d'envisager l'utilisation de souches algynolytiques dans la "lutte bactériologique" pour détruire *Sargassum muticum* ou limiter son expansion. A cela plusieurs raisons:

- le manque de spécificité des peuplements associés aux différentes espèces algales d'un même phylum.
- le manque de spécificité des enzymes algynolytiques sur les alginates de différentes algues brunes.
- l'utilisation préférentielle de substrats plus simples que les alginates par les bactéries hétérotrophes.

De plus les essais effectués au cours de cette étude ont été réalisés en milieu confiné et avec des concentrations bactériennes importantes. Dans le milieu naturel, par épendage de cultures bactériennes pures sur un champ d'algues, il faudrait tenir compte des phénomènes de dilution et de compétition qui minimiseraient l'effet potentiel de ces souches.

Dans le domaine de la bactériologie, la recherche de moyen de lutte contre *Sargassum muticum* pourrait s'orienter vers la sélection, soit de souches bactériennes dégradant un composé spécifique de cette espèce algale seule, s'il en existe, soit de souches pathogènes pour l'algue. Mais il convient néanmoins de formuler quelques réserves sur l'utilisation de ces dernières dans un environnement aqueux et dynamique.

BIBLIOGRAPHIE

ANDERSON T.F., 1951 - Techniques for the preservation of three dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. New York Acad. Sci.* ,13 : 130 p.

BALEUX B., 1976 - Dégradation biologique des agents de surface. Etude chimique et microbiologique. *Thèse de Doctorat d'Etat* - Montpellier. 242 p.

BAUMAN P. & L. BAUMAN, 1984 - *Vibrionaceae*. In : *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. vol. 1 : 516-548.

BELL W.H. & R. MITCHELL, 1972 - Chemotactic and growth responses of marine bacteria to algal extracellular products. *Biol. Bull.* 143 : 265-277.

BELSHER T., 1983 - Répartition de l'algue *Sargassum muticum* sur les côtes françaises. *Biull. Liaison Gr. Trav. Sargasse, Fr*, document ronéotypé: 8p.

BELSHER T. & C. BOYEN, 1983 - *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt : une sargasse parmi d'autres. *Biomasse actualité, Fr*, 12 (suppl.) : 13.

BENZECRI J.P. & al., 1973 - L'analyse des données. Tome 1 - La taxonomie. *Ed. Dunod*, Paris 615 p.

BERTHEAU Y., E. MADGIDI-HERVAN, A. KOTOUJANSKI, C. NGUYEN-THE, T. ANDRO & A. COLENO, 1984 - Detection of depolymerase isoenzymes after electrophoresis or electrofocusing, or titration curve. *Anal. Biochem.*, 139 : 383-389.

BLACK W.A.P., 1954 - Constituents of the marine algae. *Rep. Prog. Chem. Ind.*, 50 : 322-335.

BOYEN C., 1987 - Etude de la paroi cellulaire des Phéophycées. Approche physicochimique et immunocytologique. Préparation d'enzymes de dégradation spécifiques. *Thèse de doctorat de l'université de Paris 6*. 132 p.

BRENNER D., 1984 - *Enterobacteriaceae*. In: *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. vol. 1 : 409-498.

CHET I., P. ASKETH & R. MITCHELL, 1975 - Repulsion of bacteria from marine surfaces. *Appl. Microbiol.*, 30 : 1043-1045.

CONOVER J.T. & J. McN. SIEBURTH, 1964 - Effect of *Sargassum* distribution on its epibiota and antibacterial activity. *Bot. Mar.*, 6, fasc.1/2 : 147-157.

COSSON J., A. DUGLET & C. BILLARD C., 1977 - Sur la végétation algale de l'étage littoral dans la région de Saint-Vaast-la-Hougue et la présence d'une espèce

- japonaise nouvelle pour les côtes françaises : *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt (Phéophycées, Fucales). *Bull. Soc. Linn. Normandie, Fr*, 105 :109-116.
- CRAIGIE J.S. & J. Mc LACHLAN**, 1964 - Excretion of coloured ultraviolet absorbing substances by marine algae. *Can. J. Bot.*, 42 : 23.
- CRITCHLEY A.T.**, 1983 - *Sargassum muticum* : a morphological description of European material. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 63 : 813-824.
- CRITCHLEY A.T., FARNHAM W.F., MORRELL S.L.**, 1983 - A chronology of new European sites of attachment for the invasive brown algae, *Sargassum muticum*, 1973-1981. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 63 : 799-811.
- CUNDELL A.M., T.D. SLEETER & R. MITCHELL**, 1977 - Microbial populations associated with the surface of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Microbial. Ecol.*, 4 : 81-91.
- DELABRE M., A. BIANCHI & M. VERON**, 1973 - Etude critique de méthodes de taxonomie numérique. Application à une classification de bactéries aquicoles. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 124 A : 489-506.
- FARNHAM W.F. R. FLETCHER. & L.M. IRVINE.**, 1973 - Attached *Sargassum* found in Britain. *Nature, U.K.*, 243 : 2321-323.
- FELDMANN J.**, 1978 - Les algues. Précis de botanique-1- Végétaux inférieurs (*Masson ed., Paris*) 95-320.
- FRY J.C. & N.C.B. HUMPREY**, 1978 - Techniques for the study of bacteria epiphytic on aquatic macrophytes - In : *Techniques for the study of mixed populations.* (LOVELOCK D.W. & DAVIES R., eds). Soc. appl. Bact. Tech. Ser. n°11. San Francisco : Academic Press : 1-26.
- GERBAL M.**, 1985 - L'invasion de l'étang de Thau par des algues japonaises. Les peuplements à *Sargassum muticum* et la flore accompagnatrice. *DEA d'écologie méditerranéenne. Aix-Marseille.* 63 p.
- GLOMBITZA K.W., M. FORSTER & G. ECKHARDT**, 1978 - Polyhydroxyäther aus der Phaeophyceae *Sargassum muticum*. *Phytochem.*, 17 : 579-580.
- GORHAM J. & S.A. LEWEY**, 1984 - Seasonal changes in the chemical composition of *Sargassum muticum*. *Mar. Biol.*, 80 : 103-107.
- GRUET Y.**, 1976 - Présence de l'algue japonaise *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt sur la côte française de Normandie. *Bull. Soc. Sci. nat. Ouest Fr*, 74 : 101-104.
- HABORNE J.B.**, 1977 - Introduction to ecological biochemistry *Academic press, London*, 245 p.
- HAUG A., B. LARSEN & O. SMIDSRØD**, 1967 - Studies on the sequence of uronic acid residues in alginic acid. *Acta Chem. Scand.*, 21 : 691-704.

- HOBBIE J.E., R.J. DALEY & S. JASPER, 1977 - Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Ecol.*, 33 : 1225-1228.
- HORNSEY I.S. & D. HIDE, 1976 - The production of antimicrobial compounds by british marine algae. II. seasonal variation in production of antibiotics. *Br. Phycol. J.*, 11 : 63-67.
- HUGH R. & E. LEIFSON, 1953 - The taxonomic significance of fermentative versus oxydative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bact.*, 66 : 24-26.
- JEPHSON N.A. & P.W.G. GRAY , 1977 - Aspects of the ecology of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt, in the Solent region of the British Isles. I. The growth cycle and epiphytes. *Biology of benthic organisms*, B.F. KEEGAN, P. OCEIDIGH, P.J.S. BOADEN eds. Pergamon Press publ. : 367-375.
- KANE D.F. & CHAMBERLAIN A.H.L., 1979 - Laboratory growth studies on *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. I. Seasonal growth of whole plants and lateral sections. *Bot. Mar.*, 30 : 527-545.
- KLOAREG B., M. POLNE-FULLER & A. GIBOR, 1987 - Preparation of protoplasts from brown macroalge. *Proc.of a Workshop on Biotechnical Methods in Seaweed Cultivation : seaweed protoplast and tissue culture* (M. INDERGAARD, K. ØSTGAARD & M.D. GUIRY, eds) Trondheim, Norway : 44
- KLOAREG B. & R.S. QUATRANO, 1988 - Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu.*, 14 : 259-315.
- KONG M.K. & K.Y. CHAN, 1979 - A study on bacterial flora isolated from marine algae. *Bot. Mar.*, 22 : 83-97.
- KOOP K., R.C. NEWELL & M.I. LUCAS, 1982 - Biodegradation and carbon flow based on kelp (*Ecklonia maxima*) debris in a sandy beach microcosm *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 7: 315-326.
- LAYCOCK R.A., 1974 - The detrital food chain based on seaweeds. 1- Bacteria associated with the surface of *Laminaria* fronds. *Mar. Biol.*, 25 : 223-231.
- LEWEY S.A. & W.F. FARNHAM W.F., 1981 - Observations on *Sargassum muticum* in Britain. *Proc. Int. Seaweed Symp. 8 (Bangor, 1974)*(Fogg G.E. and W.E. Jones., eds Menai Bridge, N.Wales : The Marine Science Laboratory): 388-394.
- LEWIS J.R., 1964 - The ecology of rocky shores. *University Press, London* , 323 p.
- LINLEY E.A.S., R.C. NEWELL & S.A. BOSMA, 1981 - Heterotrophic utilisation of mucilage release during fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). 1- Development of microbial communities associated with the degradation of kelp mucilage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4 : 31-41.

- LUCAS M.I., R.C. NEWELL & B. VELIMIROV, 1981 - Heterotrophic utilisation of mucilage released during fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). 2 - Differential utilisation of dissolved organic compounds from kelp mucilage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4 : 43-55.
- MABEAU S., 1985 - Contribution à l'étude de la structure et de la fonction de la paroi des algues brunes. *Thèse de docteur ingénieur. Paris-Grignon*, 106p.
- MAZURE H.G.F. & J.G. FIELD, 1980 - Density and ecological importance of bacteria on kelp fronds in an upwelling region. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 43 : 173-182.
- OPPENHEIMER C.H. & C.E. ZOBELL, 1952 - The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.*, 11 : 10-18.
- PADMINI SREENIVASA RAO P., SREENIVASA RAO P. & S.M. KARMARKAR, 1986 - Antimicrobial substances from brown algae. II. Efficiency of solvents in the evaluation of antimicrobial substances from *Sargassum johnstonii* Setchell et Gardner. *Bot. Mar.*, 29 : 503-507.
- PALLERONI N.J., 1984 - *Pseudomonaceae*. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*. vol. 1 : 141-214.
- RIBIER J., 1969 - Le système mucifère des Laminariales bretonnes : origine, constitution. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 269, série D, : 1386-1388.
- SIEBURTH J. McN., 1968 - The influence of algal antibiosis on the ecology of marine microorganisms. In: *Advances in Microbiology of the sea* (DROOP M.R. and E.J.F. WOOD, eds) Academic Press : 63-94.
- SIEBURTH J. McN. & J.T. CONOVER, 1965 - *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling. *Nature*, 208 : 52-53.
- SIEBURTH J. McN. & J.L. TOOTLE, 1981 - Seasonality of microbial fouling on *Ascophyllum nodosum* (L.) Lejol, *Fucus vesiculosus* (L.), *Polysiphonia lanosa* (L.) Tandy and *Chondrus crispus* Stackh. *J. Phycol.*, 17 : 57-64.
- SOKAL D.M. & C.D. MICHENER, 1958 - A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin*, 38 : 1409-1438.
- STUART V., M.I. LUCAS & R.C. NEWELL, 1981 - Heterotrophic utilisation of particulate matter from the kelp *Laminaria pallida*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4 : 337-348.
- TROUSSELLIER M. & B. BALEUX, 1981 - Approche méthodologique pour l'analyse de peuplements bactériens hétérotrophes des étangs littoraux. *Acta Oecologia*, 2(1) : 63-74.
- TROUSSELLIER M. & P. LEGENDRE, 1981 - A fonctionnal evenness index for microbial ecology. *Microb. Ecol.*, 7 : 283-296.

Annexe 1

Milieux de culture

- Milieu 2216E d'Oppenheimer et Zobell (1952)

peptones	4 g
extrait de levure	1 g
FePO ₄	0,01 g
Bacto Agar Difco	15 g
eau de mer filtrée 0,2 µm	750 ml
eau distillée 250 ml	

- Milieu à base d'alginate

alginate (<i>Laminaria digitata</i>) (Sobalg- Landerneau-France)	10 g
extrait de levure	0,5 g
Fe PO ₄	0,01 g
Bacto Agar Difco	10 g
eau de mer filtrée 0,2 µm	750 ml
eau distillée	250 ml

- Milieu à base d'alginate utilisé pour le test du cup-plate

alginate (<i>Laminaria digitata</i>) (Sobalg- Landerneau-France)	5 g
extrait de levure	0,5 g (facultatif)
Fe PO ₄	0,01 g
Bacto Agar Difco	15 g
eau de mer filtrée 0,2 µm	750 ml
eau distillée	250 ml

Annexe 2

Protocole d'extraction des alginates (*Sargassum muticum*) :

- peser d'environ 400g d'algue fraîche
- les broyer grossièrement dans 5 l d'éthanol à 95°
- éliminer de l'alcool
- plonger les fragments d'algue dans 6 l d'une solution de Na_2CO_3 à 3%
- chauffer au bain marie à 70° sous agitation continue pendant au moins 4 heures
- centrifuger la solution obtenue à 5000 tr/mn pendant 10 mn
- rassembler les surnageants et ajuster à 6l
- dialyser la solution (jusqu'à précipité nul au contrôle par Ag NO_3 M/10)
- verser la solution dans un volume double d'éthanol à 95° sous agitation manuelle vive
- récupérer, dilacérer et sécher le précipité à l'étuve (à environ 50°C)
- pulvériser les fibres sèches au broyeur Danguomeau à bille